

令和 3 年 6 月 20 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08374

研究課題名(和文) 骨髄腫におけるKL-6およびMUC1-galactin-3による増悪化機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of exacerbation mechanism by KL-6 and MUC1-galactin in multiple myeloma

研究代表者

田村 秀人 (Tamura, Hideto)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：70256949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：MUC1上に存在するシアル化糖鎖抗原KL-6の多発性骨髄腫(MM)病態への関与を明らかにすることを本研究の目的とした。初発MM患者での検討では、血清KL-6高値群(n=22)では正常群(n=173)と比べ、LDH高値、Hb低値、有意に無増悪生存期間不良であった。次に急性増悪患者よりKL-6産生MM細胞株MOST1-40を樹立し検討した。1q21+を含む複雑核型、CD28+CD229+、高い細胞増殖能を有したが、抗MM薬への感受性は他の細胞株と差がなかった。

これらはKL-6が直接的にMM病勢進行に関与することを示唆した。その関連遺伝子、増殖メカニズムを明らかにするために現在解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、新規MM患者の約10%が示す血清KL-6高値の臨床的意義が明らかとなり、血清KL-6が予後の予測、治療の選択に役立つことが示唆された。また、MM細胞におけるKL-6産生とMUC1 mRNAと細胞膜タンパク発現、MUC1遺伝子多型などの関連が解明され、本研究の学術的意義が示された。さらに、MMにおけるKL-6は腫瘍細胞増殖に重要な役割を果たしており、Gal-3-MUC1-KL-6相互作用が、形質細胞白血病進展に関与する可能性があり、KL-6を標的とした新規治療法の開発が期待された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to determine the function of KL-6, a sialylated carbohydrate glycoprotein present in human MUC1 mucin, in the pathophysiology of multiple myeloma (MM). In the analysis of newly diagnosed MM patients, those with high levels of KL-6 (n=22) had lower hemoglobin and higher LDH levels and significantly shorter progression-free survival time compared with the normal-level group (n=173). Next, we established a KL-6-producing cell line from a refractory, rapidly progressing MM patient. It exhibited complex karyotypes including the 1q21+, CD28+CD229+ phenotype and high proliferative potential but the same sensitivity to anti-myeloma drugs as other MM cell lines.

Those results suggest that KL-6 is directly associated with MM disease progression. Further studies are underway to clarify the related gene expression and mechanisms of proliferation potential.

研究分野：血液腫瘍学

キーワード：多発性骨髄腫 KL-6 予後不良因子 MUC1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 多発性骨髄腫 (multiple myeloma; MM) は腫瘍化した形質細胞が骨髄中で増殖する疾患で、高カルシウム血症、腎障害、貧血、骨病変などを臨床的特徴とする。近年、プロテアソーム阻害薬、免疫調節薬、抗体治療薬など新規薬剤の登場によりその予後は顕著に改善しているが、予後不良染色体異常、髄外腫瘍、形質細胞白血病を有するなど予後不良群が存在し、その病態解明と治療法の開発が急務である。

(2) 我々は新規MM患者において、初診時より血清KL-6高値で、KL-6値が病勢を反映し、治療経過早期に形質細胞白血病となり発症後約1年で死亡した進行性MM症例を経験した。また、これまで血清KL-6高値で予後不良であったMM症例が多数報告されている。KL-6は、MUC1上に存在するシアル化糖鎖抗原で、血清KL-6は間質性肺炎のマーカーとして実臨床で使用されている。また、MUC1はムチンの1種の膜貫通型糖タンパクで、galectin-3 (Gal-3) との相互作用による腫瘍進展能、免疫チェックポイント分子PD-L1の発現調整能を有し、また、KL-6産生に影響するMUC1遺伝子多型が存在すると考えられる。しかし、MMにおけるKL-6の機能と意義については不明な点が多い。

2. 研究の目的

(1) 本研究の学術的問いは、血清KL-6が予後不良因子となりうるのか、またその機序は何か、KL-6産生は、MUC1発現レベルと一致するのか、MUC1遺伝子多型に関与するか、またKL-6産生機構は何か、さらにはKL-6/MUC1発現は治療効果・抵抗性と関連するか、MMにおけるGal-9-MUC1相互作用は腫瘍増殖と髄外病変(髄外腫瘍・形質細胞白血病)形成に関与するのか、KL-6高値群の予後改善のため、癌関連糖型MUC1を標的とした抗体治療やキメラ抗原受容体T細胞療法が可能か、また、その際にMUC1によるPD-L1(B7-H1)発現調整が免疫治療を抑制する可能性があるのか、である。

(2) 本研究ではこれまで長い間疑問であったMMにおけるKL-6の臨床的意義、KL-6/MUC1の機能を明らかにするとともに、腫瘍特異的な癌関連糖型MUC1を標的とした新規治療法の開発を目的とする。血清KL-6測定は間質性肺炎マーカーとしてすでに使用されており、MMの予後不良マーカーとしての役割が明らかになれば、簡便、安価で迅速な予後不良高リスク群の抽出が可能となり、さらにその病態、さらにはそれらの症例に対する治療戦略の確立が期待できる。

3. 研究の方法

(1) 新規MM患者の血清KL-6を測定し、患者の臨床的特徴、予後との関連について解析した。さらに、骨髄中CD38陽性形質細胞のMUC1発現(フローサイトメトリーFCM法)、MUC1 mRNA発現(real-time PCR法)、末梢血単核球のMUC1遺伝子多型rs4072037(PCR法)を解析し、血清KL-6値との関連について検討を行なった。

(2) 初診時より血清KL-6高値で、KL-6値が病勢を反映し、治療経過早期に形質細胞白血病となり発症後約1年で死亡した進行性MM患者検体より、KL-6産生MUC1 mRNA高発現MM細胞株MOSTI-40を樹立した。加えて、ヒトMM細胞株12種(MOSTI-1, -2, -4, -6, KMS18, KMS20, KMS27, KMS28PE, KMS28BM, KMS34, U266, RPMI8226) ヒトストローマ細胞株HS-5、293T細胞、HeLa細胞を用いて実験を行なった。

次世代シーケンサーを用いてMOSTI-40細胞株の1q22領域に存在するMUC1遺伝子異常について解析。

ストローマ細胞上清あるいは IL-6 などのサイトカインにより MM 細胞の MUC1 発現を増強させ、KL-6 産生量との関連を解析。

MUC1 発現 MM 細胞における KL-6・MUC1 の機能解析：まず初めに MM 患者の血清中 Gal-3 濃度と MM 患者の臨床的特徴との関連について解析。次に、recombinant Gal-3 添加により MAPK や PI3K/Akt などのシグナル伝達経路の活性化を解析 (Western blotting 法) さらに腫瘍増殖能 (Cell Counting Kit-8 を使用; FCM 法による BrdU, Ki-67, 細胞周期, apoptosis を解析) および髄外移動能 (Transwell を用いて解析) について検討。また、Gal-3-MUC1 経路の効果を明らかにするため、MUC1 ノックダウン MM 細胞株を作成し (shRNA レンチウイルスシステム) 使用。

癌関連糖型 MUC1 を抗原に用いて抗体作製を行い、その特異性に関して MM 細胞株と正常末梢血単核球を対象に FCM 法を用いて MM 細胞特異的抗体を選出する。抗体作製ができれば、in vitro およびマウス MM モデルを用いた in vivo にて、その抗体効果を検証。

MUC1 および PD-L1 発現亢進に關与する共通 microRNA および遺伝子発現に関してマイクロアレイを使用した網羅的解析を行い、MUC1 の PD-L1 調整機能について検討。

4. 研究成果

(1) 初発 MM 患者について、間質性肺炎症例を除外し、KL-6 高値 (基準値 500U/mL 以上) 例と正常例間で、臨床的特徴と予後について比較検討した。血清 KL-6 高値は 195 症例中 22 例 11.3% に認め、正常群と比べて、LDH 高値、Hb 低値であり、有意に無増悪生存期間が短かったが、今回の解析では全生存期間での有意差はなかった。解析結果および我々の経験症例から、KL-6 高値例の MM 細胞では細胞増殖能が高い可能性が示唆された。また、初発 MM 患者骨髄 37 検体と正常骨髄 9 検体を用いて、CD138 陽性形質細胞を分離し、MUC1 mRNA 発現を RT-PCR で測定、比較検討したところ、MM 例ではコントロール例と比較して有意に MUC1 mRNA 発現が高かった (p=0.0469)。

(2) ヒト MM 細胞株を用いた MUC1 の解析では、DNA コピー数は、MOST1-40 のほか、KMS20、RPMI8226 で増幅、mRNA、蛋白発現は MOST1-40 でもっとも高かったが、KMS20、RPMI8226 においても比較的高いレベルであった。MOST1-40 および KMS20 細胞ではその培養液中に KL-6 産生を認め、MUC1 発現レベルと一致した。また、染色体解析により 1q21.1 gain 陽性、細胞周期関連遺伝子 CCND2 が高発現していた。さらに、細胞培養における腫瘍増殖を検討したところ、MOST1-40 細胞が他の MM 細胞株と比べて極めて増殖が速かった。この KL-6 産生 MM 細胞の腫瘍増殖能は NF B シグナル伝達経路の活性化に關与すると考えられた。また、抗骨髄腫治療薬メルファラン、ボルテゾミブ、デキサメタゾンに対する薬剤感受性を細胞生存率で評価したところ、MOST1-40 細胞は他の MM 細胞株と同様であった。これらの結果より、KL-6 は腫瘍増殖能に關与するものの、治療薬抵抗性の誘導には關与していないと考えられた。MOST1-40 細胞株の 1q22 領域に存在する MUC1 遺伝子異常については現在もなお解析を進めている。ストローマ細胞上清あるいは IL-6 などのサイトカインによる MM 細胞の MUC1 発現増強は認めず、骨髄微小環境と KL-6 産生増加との関連はないと考えられた。

(3) 癌関連糖型 MUC1 のみに反応する抗体作製に關しては、MOST1-40 など MM 細胞特異的抗体の作製にはいたっていない。MUC1 発現亢進に關与する遺伝子発現に關して網羅的解析を行い、現在も検討を重ねている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 砂川 実香、田村 秀人、石橋 真理子、海渡 裕太、木下 量介、朝山 敏夫、守屋 慶一、半田 寛、佐々木 純、今井 陽一、田中 紀奈、伊藤 薫樹、田野崎 栄、田中 淳司、小松則夫、猪口 孝一
2. 発表標題 血清KL-6値は多発性骨髄腫の予後予測因子となりうる
3. 学会等名 第44回日本骨髄腫学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石橋 真理子 (Ishibashi Mariko) (20599047)	日本医科大学・医学部・助教 (32666)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------