

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591049

研究課題名（和文） 骨髄腫幹細胞の同定と機能解析

研究課題名（英文） Analysis of myeloma stem cells

研究代表者

宮川 義隆（MIYAKAWA YOSHITAKA）

慶應義塾大学・医学部・専任講師

研究者番号：50250238

研究成果の概要（和文）：血液のがんである骨髄腫は難治性であり、生命予後は悪い。本研究では先天的にリンパ球と補体を欠損する重度免疫不全マウスを用いてヒト骨髄腫細胞の挙動と病態の解析を行い、抗がん剤治療モデルを作成した。マウスに移植されたヒト骨髄腫細胞は血流が豊富な骨幹端に集まり、局所では骨芽細胞、破骨細胞と接触していた。また、骨髄腫細胞の増殖に伴い骨破壊が進み、病的骨折を合併した。移植されたがん細胞の一部は低酸素状態において接着分子カドヘリンを発現し、抗がん剤に対する薬剤耐性を獲得した。本研究により骨髄腫の骨微小環境における動態ならびに抗がん剤の耐性獲得の機序があきらかとなり、新薬開発につながると期待された。

研究成果の概要（英文）：Multiple myeloma is one of the intractable hematological malignancies and its prognosis is poor. In this study, we analyzed the character of human myeloma cells in vivo using the congenitally immunodeficient mice. Transplanted myeloma cells accumulated at the metaphyseal region of bone marrow and formed a complex with osteoblasts and osteoclasts. A subpopulation of myeloma cells expressed cadherin and became chemoresistant. We expect this new findings using murine model of human myeloma is useful for developing the new anti-cancer drugs in future.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：骨髄腫、がん幹細胞、新規治療薬、化学療法

1. 研究開始当初の背景

(概要)

多発性骨髄腫を根治できない現状を打破するため、骨髄腫幹細胞の基礎的研究が必要である。本研究計画では、骨髄腫幹細胞を純化・同定し、正常造血幹細胞、自己再生能をもつメモリーB細胞、形質細胞との差異を明らかにする。さらに、ヒト多発性骨髄腫モデルマウスを作成し、骨髄腫幹細胞の自己再生能維持に必要なケモカイン受容体 CXCR4 と接着分子の働きについて解析する。骨髄腫幹細胞の同定と機能解析を通じて、腫瘍化のメカニズム、骨髄腫の再発と薬剤耐性獲得の機序の解明、骨髄腫幹細胞を標的とする新規治療法の開発を目的とする。

(学術的背景)

多発性骨髄腫は単クローン性の免疫グロブリン、もしくはその断片であるモノクローナル蛋白を産生する形質細胞が腫瘍性に増殖した造血器悪性腫瘍である。悪性腫瘍全体の1%、造血器腫瘍の13%を占め、わが国では人口の高齢化に伴い患者数が増加している。自家末梢血幹細胞移植を2回繰り返す Tandem 移植により、3~5年ほど生存期間は延長するが、半数以上の症例が短期間で再発するため新しい治療法の開発が必要である。昨年、国内でも承認されたサリドマイドには直接的な抗腫瘍効果、免疫細胞の賦活化あるいは腫瘍血管の増殖抑制などを介した間接的な抗腫瘍効果があることがこれまでに明らかにされている。しかし、サリドマイドには

催奇形性と不可逆的な神経毒性があることから、既に神経毒性の少ないサリドマイド誘導体(レナリドマイド、ボマリドマイド)の臨床開発が進んでいる。また、化学療法と自家末梢血幹細胞移植では治癒を期待できないため、50歳未満かつ造血幹細胞ドナーがいる症例に対して、実験的に同種造血幹細胞移植が実施されている。しかしながら、同種造血幹細胞移植による無病生存率と全生存率の延長効果については、最終的な結論が得られていない。大量化学療法を用いる自家移植後の再発率が非常に高いことから抗がん剤が作用しにくい「がん幹細胞」の存在を疑わざるを得ない。

現在までに急性白血病、脳腫瘍、乳がんのがん幹細胞が同定されているが、骨髄腫細胞については CD138 陽性の形質細胞分画、あるいは CD19 陽性 CD27 陽性 CD138 陰性のメモリーB細胞分画に存在すると学説が分かれている。骨髄腫細胞の増殖は遅いため既存の免疫不全 CB17-SCID、NOD/SCID マウスに移植しても生着しないことから、幹細胞の自己再生能を評価する SCID repopulating assay (SRC)法が実施できないという最大の問題点があった。私たちの研究グループは、免疫不全 NOG マウスに増殖の遅いヒト骨髄腫細胞株が生着し、マウス末梢血中にヒト免疫グロブリンが検出できること、マウス骨髄中にヒト骨髄腫細胞がホーミングし、破骨細胞の増殖を伴う骨溶解病変を示すことを報告し、米国特許を取得している。

本研究では、この骨髄腫モデルマウスを活用して、骨髄腫幹細胞の純化・同定と機能解析を精力的に行う。難治性の造血器腫瘍であ

る多発性骨髄腫を根治させるためには、今一度基礎研究に立ち戻る必要があると考え、本研究計画の着想に至った。

2. 研究の目的

多発性骨髄腫を根治できない現状を打破するためには、骨髄腫幹細胞の基礎的研究が必要である。本研究では骨髄腫幹細胞の純化と機能解析、ならびに疾患モデルを作成して骨髄腫細胞の接着分子の発現と機能解析を通じて、骨髄腫の再発と薬剤耐性獲得の分子機序の解明、新規治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 骨髄腫幹細胞の純化と同定

メチルセルロースコロニーアッセイ、免疫不全 NOG マウスへの移植実験系を用い、腫瘍幹細胞が CD138 陽性の形質細胞分画と CD19 陽性 CD27 陽性 CD138 陰性のメモリーB 細胞分画のどちらに含まれているかをあきらかにする。腫瘍幹細胞の自己再生能を、コロニーアッセイの繰り返し、免疫不全マウスへの再移植により証明する。さらに正常のメモリーB 細胞・形質細胞を比較対象として、腫瘍幹細胞の遺伝子発現の変化（メチル化、アセチル化など）を解析する。

(2) 骨髄腫幹細胞におけるケモカイン受容体 CXCR4 の機能解析

骨髄腫幹細胞を純化し、幹細胞の維持に関係すると期待されるケモカイン受容体 CXCR4 の発現解析を行う。CXCR4 の機能を抗体や低分子化合物で阻害し、骨髄腫幹細胞の細胞周期と抗がん剤に対する感受性亢進、アポト

ーシス誘導効果を検討する。

(3) 骨病変を呈するヒト多発性骨髄腫モデルマウスの作成

骨髄腫細胞を免疫不全 NOG マウスに移植し、骨溶解病変を有する新しい疾患モデルマウスを作製する。患者検体の生着率を向上させるため、NOG マウスの樹状細胞機能を低下させる前処置を併用する。ヒト骨髄腫細胞株を用いたヒト骨髄腫モデルマウスについては既に米国特許が成立しており、その技術を応用する。本モデルマウスを用いることより、骨髄腫幹細胞の同定、骨髄腫細胞と骨髄内の造血微小環境の相互作用、新規抗がん剤のがん細胞とがん周囲微小環境への影響などを評価する。

4. 研究成果

免疫不全 NOG マウスにヒト骨髄腫細胞を移植すると大腿骨においては血流が豊富な骨幹端に集まり、局所では骨芽細胞と破骨細胞と隣接した。また、骨髄腫細胞が大腿骨内で増えると骨破壊が進み、骨代謝が乱されて病的骨折を起こした。このモデルマウスに抗がん剤を投与したところ、p53 依存的に腫瘍細胞が死滅し、さらに骨の再生が進んだ。移植された骨髄腫細胞の一部は接着分子カドヘリンを発現し、抗がん剤に対する薬剤耐性を獲得した。本研究により体内における骨髄腫細胞の動態ならびに接着分子と抗がん剤に対する耐性獲得の関係などがあきらかにされた。今後は当該モデルを用いて難治性の血液がんである骨髄腫に対する新規抗がん剤の開発に発展することが期待される。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件) (査読あり)

Iriuchishima H, Takubo K, Miyakawa Y, Nakamura-Ishizu A, Miyauchi Y, Fujita N, Miyamoto K, Miyamoto T, Ikeda E, Kizaki M, Nojima Y, Suda T. Neovascular niche for human myeloma cells in immunodeficient mouse bone. PLoS One. 2012;7(2):e30557.

[学会発表] (計 1 件)

第 73 回 日本血液学会総会(2011 年 10 月 16 日) 愛知県名古屋市

Iriuchishima H, Takubo K, Miyauchi Y, Fujita N, Miyamoto T, Miyakawa Y, Nojima Y, Suda T. Anti-tumor effects of bendamustine on multiple myeloma cells and myeloma niche in vivo.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

宮川 義隆 (MIYAKAWA YOSHITAKA)

慶應義塾大学・医学部・専任講師

研究者番号 : 50250238

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし