

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500501

研究課題名(和文)新規ヒト骨髄微小環境マウスを用いた多発性骨髄腫モデルの確立と病態解析

研究課題名(英文) Analysis of Multiple myeloma pathophysiology using xenograft model having humanized BM microenvironment

研究代表者

中山 ゆかり(六車ゆかり)(MUGURUMA, Yukari)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：80398750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫は、造血抑制に加えて骨破壊による症状を特徴とする進行性の血液がんである。Notchシグナルの多発性骨髄腫発症と進行への関与が示唆されているが明確になっていない。今回我々は、骨芽細胞特異的にヒトJagged1を発現するヒト骨髄環境を有するマウスにヒト多発性骨髄腫細胞を移植することによって、骨髄腫モデルマウスを作製した。そして、Jagged1-Notchシグナルが、モデルマウスの骨髄内における骨髄腫細胞の生存・増殖さらには薬剤耐性の獲得を促進していることを明らかにした。また、in vitroの解析によって、Notchシグナルの上記作用は骨髄腫細胞に直接作用していることも確認された。

研究成果の概要(英文)：Multiple myeloma is a hematopoietic malignancy characterized by proliferation of malignant plasma cells and concomitant hematopoietic suppression as well as bone disease. Although Notch signal has been implicated in pathogenesis of multiple myeloma, its precise role is unknown. We created a myeloma mouse model by transplanting human myeloma cells into previously established immunodeficient mice that express human Jagged1 in osteoblastic manner. We demonstrated that Jagged1-Notch signal supported survival and proliferation of myeloma cells in bone marrow. Furthermore, Jagged1-Notch signal directly promoted drug resistance in vivo and in vitro.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：multiple myeloma humanized mice xenograft microenvironment

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) ヒト疾患モデル動物の重要性

ヒト疾患モデル動物は、病気の発生機序や病態を生体内(in vivo)で解明するために不可欠なツールであり、新規の薬物や治療法の開発および治療効果の判定に重要な役割を果たしてきた。また、近年においては、実験動物中央研究所と我々の共同研究により、新規免疫不全(NOG)マウス(Yahata et al. J Immunol. 2002)が開発されたことにより、長年作成が困難であった白血病、例えば、急性骨髄性白血病(AML)や急性リンパ球性白血病(ALL)などの移植モデルマウスが確立された。これにより、これまではコンセプトでしかなかった白血病幹細胞の存在が実験的に証明され、白血病細胞の抗がん剤抵抗性のメカニズムも解明されつつある(Ishikawa et al. Nature Biotechnology, 2007, Saito et al. Nature Biotechnology, 2010)。

一方、細胞株ではなく患者さん由来の腫瘍細胞の移植によってのみ作成することができる疾患モデルマウスは、個々の患者さん本来の病態を反映するものである。患者さんの癌細胞を移植したマウスによって得られる知見は、病態の解明および新規治療法開発の基盤となるものであり、実験医学と臨床医学を結びつけるための重要なツールと考えられる。しかしながら、細胞株に比べてヒトの体内から取り出した細胞を直接動物に移植しその体内で生存させるのは困難であり、NOGマウスを利用しても患者さんの細胞の生着を得ることができない難治疾患がいまだに数多く存在する。

### (2) 多発性骨髄腫の治療標的としての骨髄微小環境

多発性骨髄腫は、免疫システムの一部を担っている形質細胞が癌化し、骨髄中で無制限に増殖し蓄積するために発生する血液癌で

ある。形質細胞が癌化する過程や疾患の進行のメカニズムには未だ不明な点が多く、さらに、多発性骨髄腫は多様な病型を示すため、症例ごとの最適で有効な治療法の探索が治療成績改善のため急務となっている。現時点では、近年の分子標的薬の開発や治療方法の進歩にもかかわらず、再発例や治療抵抗例が多い不治の病である。

本疾患の造血異常以外の最も特徴的な症状は、骨病変である。骨病変は、多発性骨髄腫の5割以上の患者さんにみられ、X線画像では骨のもろい部分が打ち抜かれたように見える骨打ち抜き像「パンチアウト」と呼ばれるものがよく観察される。こうした骨融解は、従来は、骨髄腫細胞が骨髄内で異常増殖した結果、骨髄内のサイトカイン産生が上昇し、破骨細胞が刺激されて2次的に骨の吸収が亢進したものであり、病態とは直接関係がないと思われていた。しかし、近年、骨髄腫細胞は、ストローマ細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞、破骨細胞などとネットワークを形成し、自ら骨髄腫細胞の生存・増殖・薬剤耐性を促す環境を構築していることが明らかとなってきた(Hideshima et al. Nature Reviews Cancer, 2007)。とりわけ、破骨細胞による骨吸収が骨髄腫細胞の増殖を促進する一方で、成熟した骨芽細胞は細胞増殖に抑制的に働くことから、多発性骨髄腫の病態と骨代謝は密接な関係にあると考えられる(Takeuchi et al. Plos one, 2010)。実際、骨粗しょう症治療薬であるビスフォスフォネートを、多発性骨髄腫患者に投与したことによる抗腫瘍効果も報告されている(Kondo et al. Leuk Lymphoma, 2002, Corso et al. Hematology, 2005)。

### (3) ヒト骨髄微小環境マウスを使用した疾患モデルマウス

造血幹細胞は、自己複製をしながら成熟血球を供給するという特別な仕組みを有する

ことで、ヒトの一生分の造血を維持している。我々はこれまで、NOG マウスに臍帯血由来のヒト造血幹細胞を移植することにより、正常造血がどのように維持されているかのメカニズムを *in vivo* にて解明してきた(Yahata et al. Stem Cells, 2008, Blood 2006, Ando et al. Blood, 2006))。また、ヒト間葉系幹細胞を NOG マウスの骨髄に直接移植する方法で、マウスの体内にヒトの造血環境を構築し、ヒト造血微小環境マウスの作成に成功している(Muguruma et al. Blood, 2006)。このヒト造血微小環境マウスにヒト造血幹細胞を移植すると、通常の NOG マウスに比べて効率よく生着し、ヒト造血を再構築するという期待通りの結果が得られた。このことから、ヒト細胞の生着を阻害する免疫細胞を持たない NOG マウスであっても、環境をヒト化することにより生着改善がもたらされることが明らかとなった。

そこで我々は、実験動物中央研究所との共同研究により、造血幹細胞ニッチを構成する骨芽細胞特異的にヒト接着因子を発現するマウスやヒトサイトカインを産生するマウスなど、様々な遺伝子改変マウス(ヒト骨髄微小環境マウス)の作成に取り組んできた。そのうちのひとつである、膜貫通型受容体分子 Notch のリガンドの Jagged 1 を発現させたマウス(NOGJ)の骨は、骨吸収の亢進を示すとともに、骨髄内での血管の増加も認められた。これらの骨髄病変は多発性骨髄腫の特徴であることから、NOGJ マウスは、多発性骨髄腫のモデル作成に適していると考えた。

## 2. 研究の目的

多発性骨髄腫は、骨髄を主たる病変とする進行性の血液癌であるが、実験動物を用いた *in vivo* での解析が十分に行われていないことなどから、その病態には不明な点が多い。また、病型が多様であるため薬剤の使用法

や使い分けの基準も確立しておらず、今もって不治の病である。本研究では、我々が開発した骨髄微小環境をヒト化した免疫不全マウス(NOGJ)を用いて多発性骨髄腫モデルを作成し、*in vivo* 解析により骨髄腫細胞の増殖及び薬剤耐性獲得のメカニズムを明らかにする。さらに、最近注目を集めている、骨髄腫細胞とそれを支持する骨髄微小環境の相互作用を解析して、新たな治療戦略の礎となる基礎的知見を収集し、新薬開発を推進することを目的とする。最終的には、患者さん由来の骨髄細胞を移植することで、個々の患者さんの病型を反映する多発性骨髄腫モデルマウスを作製して、この病気の病態の多様性を解明し、個々の症例に最適な治療法の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 多発性骨髄腫モデルマウスの作成

#### ヒト骨髄腫細胞株の移植

細胞株を NOGJ マウスに経静脈的に移植する。NOGJ マウスは、骨髄環境がヒト化されていることおよび、すでに骨病変と血管の増加を示していることにより、骨髄腫細胞の生着が促進されると期待される。

#### 患者さんの細胞の移植

前述したように、癌細胞といえども体内から取り出した細胞をそのまま静脈に移植しても、マウスの体内に生着させるのは非常に困難である。これまでに、基礎的実験として、多発性骨髄腫の患者さんの造血幹細胞(CD34陽性細胞)を通常の NOG マウス移植したところ、ヒト血液の生着を認めたが、腫瘍細胞の解析には至っていない。そこで本研究では、当研究室で開発された骨髄内移植法(IBM T)を用いて、患者さんの骨髄細胞を NOGJ マウスの骨髄内に直接移植する。なぜなら、IBM T

法は通常の経静脈移植に比べ移植効率が良いことが証明されているからである (Yahata et al. Blood 2003)。さらに、ヒト間葉系幹細胞を骨髄細胞と同時に移植し、骨髄微小環境をヒト化することも計画している。なぜなら、我々はこの手法により、それまで作成が困難であった骨髄異形成症候群モデルマウスの確立に成功しているからである (Muguruma et al. Haematologica, 2011)。

## (2) 生着確認

腫瘍細胞の生着は、マウスの血清を採取し、オリジナルの腫瘍細胞が産生するヒト免疫グロブリンを測定して確認する。さらに、FACS や染色した組織切片を観察して、腫瘍細胞の生着度合いや骨髄内での局在を確認する。

## (3) 病態解析

マウスに細胞株や患者さんの腫瘍細胞を移植すると、短期間で骨髄腫モデルを作成することができ、個別の骨髄腫細胞の動態や薬剤感受性などを早期に解析することが可能である。一方、患者さんの造血幹細胞を移植すると、幹細胞が形質細胞に分化して腫瘍化する過程や、病気の進行状況を追跡することができる。こうした解析は、細胞株を用いたモデルでは不可能であったので、造血幹細胞移植モデルマウスは多発性骨髄腫の病態解明に大変有用である。具体的な病態解析は、マウスに生着したヒト骨髄腫細胞とストローマ細胞の接着や局所的なサイトカインの産生などを組織学的手法と細胞培養実験によって、in vivo, in vitro で評価する。

## (4) 創薬への応用

本研究で確立した新規の多発性骨髄腫モデルマウスに多発性骨髄腫治療薬を投与す

ることによって、薬の作用機序の解明と治療効果を判定する。また、個々の患者さんの細胞の薬剤に対する抵抗性も評価し、病態と治療抵抗性の関係を明らかにする。さらに、薬剤投与による腫瘍細胞と骨髄微小環境の相互作用の変化を解析し、骨髄微小環境をターゲットとした治療の開発につなげる。

本研究では、幹細胞ニッチを形成する骨芽細胞特異的にヒト Jagged1 を発現するマウス (NOGJ) を使用している。多発性骨髄腫と Notch シグナルの関係はこれまで調べられていなかった。しかし、最近では、Notch シグナルを抑制すると骨髄腫細胞のアポトーシスが促されるという結果や、病気の進行と密接なかわりを持つ破骨細胞の活性化が抑えられるという論文が発表され、多発性骨髄腫への Notch シグナルの関与が示唆されている (Schwarzer et al. Leukemia 2008, Nefedova et al. Blood 2008)。よって、本研究で確立されたモデルマウスに、Notch シグナル抑制剤を投与した場合の腫瘍の増殖変化を解析し、Notch シグナルの関与を明らかにする。また、現行の治療薬と Notch シグナル抑制剤の併用効果なども評価し、従来の抗腫瘍薬と Notch シグナル抑制剤の併用という新たな治療戦略の可能性を追求する。

## 4. 研究成果

### (1) モデルマウスの解析

ヒト多発性骨髄腫の代表的な細胞株である U266 を、NOGJ および対照となる免疫不全マウス (NOG) に移植し、6週間後にヒト骨髄腫細胞のマーカーである CD138 抗体を用いて免疫染色したところ、NOGJ において謙虚な生着率の増幅を確認した (下図参照)。

さらに、HE 染色した骨髄病理標本を詳細に観察すると、NOG マウスではヒト骨髄腫細胞の大部分がアポトーシスもしくはネクローシスにより死滅していることが明らかとな

った。一方、NOGJ マウスの骨髄は骨髄腫細胞が骨内膜から骨髄中央部まで広範囲に存在していた。したがって、NOG マウスで骨髄腫細胞の生着率が低いのは、生着不全ではなく、生着後の生存や増殖が妨げられているものと思われる。また、NOGJ マウスは、ヒト Jagged1 を骨芽細胞特異的に発現させることにより骨髄環境をヒト化しており、骨吸収がすでに亢進していることや骨髄内の血管が発達していることなどから、NOGJ マウスの骨髄環境はヒト骨髄腫細胞の増殖をサポートする環境が整っていると考えられる。以上の結果は、骨髄腫細胞の増殖における骨髄微小環境の重要性を実験的に証明したものである。



茶色が CD138 陽性のヒト骨髄腫細胞である。

## (2) 多発性骨髄腫細胞の薬剤耐性と Notch シグナル

NOGJ マウスで骨髄腫細胞の生着が顕著に高いことが明らかとなったが、それが Notch シグナルの直接的な作用によるものか、骨吸収亢進による骨髄環境の変化によるものか

は不明であった。こうした疑問に答えるために以下の実験を行った。

### In vivo 薬剤抵抗性評価

骨髄腫細胞株の移植後 3 週目から 3 週間、多発性骨髄腫の分子標的薬であるボルテゾミブをマウスに投与し、骨髄腫細胞の生存を FACS および組織学的解析により評価した。NOG モデルではマウスの骨髄内の骨髄腫細胞が薬剤非投与群の 10~20 分の 1 以下になるのに対し、NOGJ モデルでは、個体差はあるけれども、薬剤非投与群の 2 分の 1 から 5 分の 1 程度にしかならなかった。つまり、NOGJ マウスの骨髄環境は、骨髄腫細胞の生着を促すばかりでなく、薬剤抵抗性をもサポートすることが明らかとなった。

### In vitro 薬剤感受性試験

Jagged1 を発現する骨髄ストローマ細胞と通常のストローマ細胞と骨髄腫細胞を共培養して in vitro の薬剤感受性試験を行ってみると、Jagged1 発現ストローマ細胞上で培養された場合に、細胞がより生き残っていた。さらに、非特異的なストローマ細胞の影響を排除するために、Jagged1 ペプチドを固相化した培養皿を用いて同様の実験を行ったところ、ペプチド上でのヒト骨髄腫細胞株の生存が、統計学的に有意な差をもって上昇していることが確認された。

これらの結果から、Notch シグナルはヒト骨髄腫細胞の生着促進および薬剤抵抗性に直接的に関与していると考えられる。

### 骨吸収阻害剤の in vivo 抗腫瘍効果

上記多発性骨髄腫モデルマウスに骨吸収抑制剤の 1 種であるアレンドロネートを投与すると、いずれのモデルマウスの場合も薬剤投与群で腫瘍負荷が軽くなったが、NOGJ マウスの方でその効果が大きいことがわかった。このことから、骨吸収亢進による骨髄環境の

変化が NOGJ マウスにおける骨髄腫細胞の生着促進の要因の一つであることもうかがえる。

以上の結果をまとめると、我々の研究は、骨髄腫細胞の生存・増殖・薬剤耐性獲得においては骨吸収やそれに伴うサイトカインの放出などの骨髄環境の変化が大きく関与していることとともに、Notch シグナルの活性化が重要であることを明らかにした、

現在、これらの結果を踏まえて、患者さんの検体を移植したマウスを解析中である。

#### 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 2 件)

Muguruma Y, Matsushita H, Yahata T, Yumino S, Tanaka Y, Miyachi H, Ogawa Y, Kawada H, Ito M, Ando K  
Establishment of a xenograft model of human myelodysplastic syndromes.  
Haematologica. 2011 Apr;96(4):543-51.  
査読有

Yahata T, Takanashi T, Muguruma Y, Ibrahim AA, Matsuzawa H, Uno T, Sheng Y, Onizuka M, Ito M, Kato S, Ando K.  
Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells.  
Blood. 2011 Sep 15;118(11):2941-50.  
査読有

[学会発表](計 3 件)

Matsushita H, Yahata T, Nakamura Y, Sheng Y, Muguruma Y, Matsuzawa H, Uno T, Takanashi T, Ando K  
CD34+/CD38+ cells from human cord blood initiate APL by induction of PML-RARA  
JSH International Symposium, 2012年5月26日～27日、川越プリンスホテル

Yahata T, Takanashi T, Muguruma Y, Ibrahim AA, Matsuzawa H, Uno T, Sheng Y, Onizuka M, Ito M, Kato S, Ando K.

Non-telomeric stem cell aging in hematopoietic regeneration.

第74回日本血液学会、2012年10月19日～21日、京都国際会議場。

Matsushita H, Yahata T, Nakamura Y, Sheng Y, Muguruma Y, Matsuzawa H, Uno T, Takanashi T, Ando K  
CD34+/CD38+ cells from human cord blood initiate APL by induction of PML-RARA

第73回日本血液学会、2011年10月15日、名古屋国際会議場

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.u-tokai.ac.jp/daigakuin/web/saisei.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中山(六車) ゆかり (MUGURUMA YUKARI)  
東海大学・医学部・助教  
研究者番号：80398750

##### (2) 研究分担者

安藤 潔 (ANDO KIYOSHI)  
東海大学・医学部・教授  
研究者番号：70176014

八幡 崇 (YAHATA TAKASHI)  
東海大学・医学部・准教授  
研究者番号：10398753