

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591382

研究課題名(和文)多発性骨髄腫病態における膜型マトリックスメタロプロテアーゼ活性の機能解明

研究課題名(英文) Multifunctional role of Membrane-type 1 matrix metalloproteinase in multiple myeloma

研究代表者

Heissig Beate (Heissig, Beate)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：30372931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：B細胞系、形質細胞のがん化による多発性骨髄腫の病態において、骨髄腫の微小環境を構成するマトリックスメタロプロテナーゼ(MMP)活性の重要性が示唆されている。本研究を通じて、研究代表者らは、各種MMPの活性化に参与する膜型MMP(MT1-MMP)が、B細胞、形質細胞分化に参与し、ストローマ由来のKit-ligandやstromal cell-derived factor-1、インターロイキン-7の分泌と、HIF-1発現誘導に伴うこれらの遺伝子発現を制御することを明らかにし、多発性骨髄腫の病態形成に寄与する可能性を示唆した。また代表者らは、ヒト骨髄腫病態を再現したマウスモデルの作製に成功した。

研究成果の概要(英文)：Multiple myeloma (MM) is a B-cell malignancy characterized by the monoclonal proliferation of plasma cells in the bone marrow (BM). In the initial stages of disease establishment, MM cells reside in a hypoxic BM microenvironment. The long-term objective of this proposal is to examine the role of membrane type-1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in the regulation of normal B cell development and malignant plasma cell growth in models of MM. MT1-MMP is expressed in MM cells, and cells of the MM microenvironment. Stroma cells produce cytokines. MT1-MMP is required for normal B cell development. Mechanistically we showed that MT1-MMP drives HIF-1-mediated activation of cytokines like Kit ligand, stromal cell-derived factor-1, and interleukin-7. Most cell line-based MM models show BM infiltration of MM cells. We established a novel murine model that mimics various aspects of clinical signs of MM, which will help to understand the interaction between malignant plasma and stroma cells.

研究分野：血液学、腫瘍学、幹細胞生物学、免疫学

キーワード：生体・分子 細胞・組織 発現制御 酵素

1. 研究開始当初の背景

(1)多発性骨髄腫は、骨髄中の形質細胞のがん化増殖と血中の異常免疫グロブリンの増加、そしてこれに伴う溶骨性変化、腎障害等の特徴的な病態を有するB細胞性の血液腫瘍性疾患である。研究代表者らは、以前の研究で、骨髄中の造血幹細胞動態におけるマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)、とりわけMMP-9の重要性を示した。代表者らは、その後の研究で、MMPの活性が、セリンプロテアーゼに属するプロテアーゼの一群である血液線維素溶解系(線溶系)によって制御されていることを明らかにし、さらに線溶系による造血制御機構の存在を明らかにした(Heissig et al. Cell Stem Cell 2007; Heissig et al. Cell 2002)。骨髄中のストローマ細胞、また骨髄腫病変中の血管内皮細胞からは、大量の活性型MMP-2が産生されることが知られている(Barillé et al, Blood 1997, Vacca Blood et al, 2003)。膜型MMPのプロトタイプであるMT1-MMP(MMP-14)は、間葉系幹細胞や未熟な造血系細胞での産生が確認されており、線溶系とも相互活性化機構を有しながら、潜在型酵素ProMMP-2を活性化し、これらは接着分子をはじめ、造血因子、またこれらの受容体の細胞外ドメイン分泌を制御していると考えられている。

(2)低酸素誘導因子HIF-1あるいはHIF-2は、低酸素状態への適応に際し、赤血球産生、糖代謝、細胞生存、そして血管新生等を制御する転写因子である。HIF-1 α は骨髄中の様々な細胞に発現が認められるが、HIF-2 α は、CD68陽性のマクロファージ、CD138陽性の骨髄腫細胞等、発現が限定的であるとされ、その異常な発現増加が骨髄腫の病勢進展にも関与していることが示唆されている。また骨髄腫の初期は、骨髄腫微小環境は低酸素状態にあるとされているが、病勢の進展に伴い、遺伝子異常に伴った低酸素状態と関連性のないHIF発現増加、転写亢進、c-Mycの異常発現等の病態を誘導していることが示唆されている。

2. 研究の目的

MT1-MMPは、細胞表面で基質の限定分解にあたる金属要求性蛋白分解酵素の一種で、近年、がん増殖過程に伴う異常血管新生において、血管内皮細胞あるいは周皮細胞の動態制御因子として機能していることが示唆されている。多発性骨髄腫の腫瘍細胞は、近年こうした異常血管新生と、これを含めた骨髄中での至適微小環境(ニッチ)を形成を伴い、血管新生因子や接着分子、各種炎症性サイトカイン、ケモカインを介して、骨髄ストローマ細胞、骨芽細胞、破骨細胞の他骨髄中の構造蛋白とのシグナル相互作用を展開し、増殖、そして骨髄腫に特異的な病態形成にも寄与することが解ってきている。本研究では、多発性骨髄腫の増殖、またその病態形成過程におけMT1-MMP

の機能解明を主目的とし、その活性制御と骨髄腫病勢との関連性、またその臨床的意義を探ることまでをその範疇とする。

3. 研究の方法

正常造血機構におけるMT1-MMPの機能解析

MT1-MMP遺伝子欠損マウスとその野生型について、骨髄造血の状況、特にB細胞系の分化、形質細胞数に注目してフローサイトメーター等による解析を進める。またこれに伴う造血因子、サイトカイン、ケモカイン、各種MMPの血中濃度、及び活性等を測定する。またさらにこれらのマウスから、造血系、血管内皮系、線維芽細胞系—ストローマ細胞を分離採取し、一定時間培養の後、その上清中のMT1-MMP活性と炎症性サイトカイン、ケモカイン等をザイモグラフィー、RT-PCR、酵素結合免疫吸着法(ELISA)等により測定する

多発性骨髄腫細胞とその微小環境(骨髄腫ニッチ)の相互作用におけるMT1-MMPの機能解析

ヒト及びマウス多発性骨髄腫細胞株、また患者臨床検体中の多発性骨髄腫細胞をCD138をはじめとする細胞表面抗原やマグネティックビーズを使用し、分離採取し、一定量を一定期間培養する。この培養上清中のMT1-MMP活性と炎症性サイトカイン、ケモカイン等をザイモグラフィー、RT-PCR、ELISA法等により測定する。さらにストローマ細胞株のMT1-MMPをShRNA法を用いて失活させたものとその対照群とをの細胞株らとの共培養、またはMT1-MMPの中和抗体によって活性を抑制したものと対照群との細胞株らとの共培養により腫瘍細胞増殖における微小環境中のMT1-MMP活性の重要性について精査する。

多発性骨髄腫増殖におけるMT1-MMP活性の重要性の解明

多発性骨髄腫のマウスモデル、形質細胞腫瘍モデル等を作製し、経時的に末梢血、骨髄、脾臓他各種臓器を採取する。末梢血については、血球数を算定し、血漿を凍結保存する。各種臓器については病理切片を作製し、細胞表面抗原、各種プロテアーゼ、接着分子等による免疫特殊染色を施行し、細胞構成、骨髄腫増殖に伴う組織変化、病勢等について精査する。また各種臓器より単核球を分離し、フローサイトメーター解析を施行し、細胞構成の推移を追う。多発性骨髄腫のマウスモデルを作製し、経時的に採取した血漿中の各種液性因子濃度、プロテアーゼ活性を測定する。さらに、末梢血、骨髄、脾臓他各種臓器より単核球を分離し、さらにソーティングすることにより得られた細胞分画の培養により、液性因子、プロテアーゼ分泌細胞を同定する。さらに、新規のプラスミン阻害剤、MMP阻害

剤を使用し、プロテアーゼ活性制御による骨髄腫病態への影響、有効性について精査する。

多発性骨髄腫の臨床検体における

MT1-MMP活性の重要性の解明

多発性骨髄腫患者及び健康者の末梢血及び骨髄を採取し、末梢血については、血漿を凍結保存する。患者状況を各種検査データ、X線写真等で掌握しつつ、骨髄組織検査による骨髄腫増殖状況の評価、さらに血中の各種液性因子濃度、プロテアーゼ活性を測定し、病態、病勢との相関性を確認する。

4. 研究成果

(1) 代表者らは、骨髄中の膜型MMP(MT1-MMP)が、各種細胞増殖因子のプロセッシング、及びこれらの遺伝子発現を制御することによって骨髄細胞動態の起点として機能していることを明らかにした。MT1-MMP 遺伝子欠損マウス(MT1-MMP^{-/-})では、有意な汎血球減少を呈しており、二週間から三週間で全てのマウスが死亡することが判明した。また、こうした汎血球減少は、主に成熟障害が原因となっており、B細胞系では、MT1-MMP^{-/-}の末梢血中でB細胞は有意に減少しているのに対し、骨髄では、割合として late (B220⁺CD43⁻)B細胞よりも early (B220⁺CD43⁺)B細胞が有意に保持されているという結果を得ている。

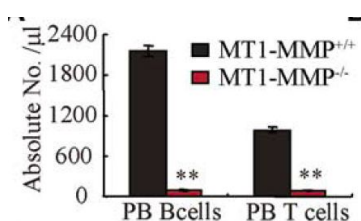


Figure 1: from Nishida, Blood 2012

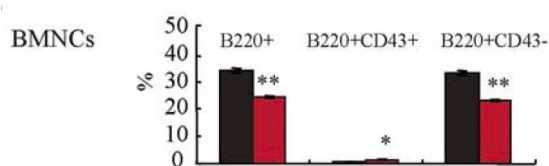


Figure 2: from Nishida, Blood 2012

(2) 多発性骨髄種細胞の動態に関与するとされるサイトカインやケモカインの血中濃度が正常マウスと比較して有意に低下しており、その原因として、第一にMT1-MMPによって上方制御される各種MMPの相互活性化によるこれらKit-ligand (KitL)等の造血因子、CXCL-12(SDF-1)等のケモカイン、さらにはインターロイキン7(IL-7)等、骨髄種細胞動態制御分子群の一部は骨髄ストローマ細胞からの細胞外ドメイン分泌が阻害されていること、さらに、MT1-MMPの細胞内ドメインに結合している低酸素誘導因子(HIF-1)阻害物質であるFIH-1が細胞質内に遊離し、HIF-1

活性が阻害され、骨髄種細胞動態制御分子群の遺伝子発現自体が抑制されていることを解明した。またこれまで、代表者らは、各種MMPの活性化が線溶系因子プラスミンによって制御されていることを報告してきたが、今回の研究で、MT1-MMPが各種MMPの活性を上方制御していることも明らかにした。

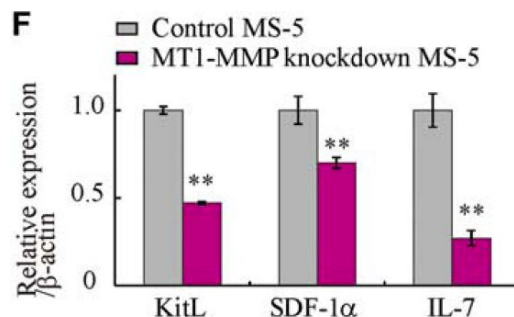


Figure 3. From Nishida 2012 Blood

(3) 代表者らは、近交系マウスにマウス由来の形質細胞腫、B細胞性リンパ腫を皮下あるいは末梢血中に移植することにより、生体内で骨髄腫細胞が増殖するプロセスを精査するモデルを確立した。特に形質細胞、ハイブリドーマB53を移植する系では免疫グロブリンの産生、貧血、髄外病変、さらに致死率の高い多発性骨髄腫に酷似した病態を認めている(投稿準備中)。これらのマウス中では、線溶系因子の動態と病勢に相関性を認めており、これらのマウスに対しMMP阻害剤と骨髄移植を行うことで、骨髄腫の予後を改善するというデータを得ている。このことはこれらの腫瘍増殖過程においてもMMPの活性が重要な役割を有していることを示唆したものと云えよう。さらに代表者らは、線溶系・プラスミン阻害剤の投与が、骨髄腫と同様の血液腫瘍であるT細胞性リンパ腫モデルの増殖を抑制し得ることを明らかにしている。今後、何らかの化学療法との併用により、骨髄腫制圧の新たな補助療法としての基盤形成を進めていきたいと考えている。

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 9 件)

shared senior author

1. Munakata S, Tashiro Y, Nishida C, Sato A, Komiyama H, Shimazu H, Dhahri D, Salama Y, Eiamboonsert S, Takeda K, Yagita H, Tsuda Y, Okada Y, Nakauchi H, Sakamoto K, Heissig B#, Hattori K#. Inhibition of Plasmin Protects Against Colitis in Mice by Suppressing Matrix Metalloproteinase 9-Mediated Cytokine Release From Myeloid Cells. *Gastroenterology*.

- 148(3):565-578.e4, 2015. doi: 10.1053/j.gastro.2014.12.001.
2. Sato A, Nishida C, K Sato-Kusubata, M Ishihara, Y Tashiro, I Gritli, H Shimazu, S Munakata, H Yagita, K Okumura, Y Tsuda, Y Okada, A Tojo, H Nakauchi, S Takahashi, Heissig B#, Hattori K#. Inhibition of plasmin attenuates murine acute graft-versus-host disease mortality by suppressing the matrix metalloproteinase-9-dependent inflammatory cytokine storm and effector cell trafficking. *Leukemia*. 29(1):145-56, 2015. doi: 10.1038/leu.2014.151.
 3. Nakahara F, Kitaura J, Uchida T, Nishida C, Togami K, Inoue D, Matsukawa T, Kagiya Y, Enomoto Y, Kawabata KC, Chen-Yi L, Komeno Y, Izawa K, Oki T, Nagae G, Harada Y, Harada H, Otsu M, Aburatani H, Heissig B#, Hattori K#, Kitamura T. Hes1 promotes blast crisis in chronic myelogenous leukemia through MMP-9 upregulation in leukemic cells. *Blood*. 123(25):3932-42, 2014. doi: 10.1182/blood-2013-01-476747.
 4. Caiado F, Carvalho T, Rosa I, Remédios L, Costa A, Matos J, Heissig B, Yagita H, Hattori K, da Silva JP, Fidalgo P, Pereira AD, Dias S. Bone Marrow-Derived CD11b+Jagged2+ Cells Promote Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Metastasis in Colorectal Cancer. *Cancer Res*. 73(14):4233-4246, 2013. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0085.
 5. Tashiro Y, Nishida C, Sato-Kusubata K, Ohki-Koizumi M, Ishihara M, Sato A, Gritli I, Komiyama H, Sato Y, Dan T, Miyata T, Okumura K, Tomiki Y, Sakamoto K, Nakauchi H, Heissig B#, Hattori K#. Inhibition of PAI-1 induces neutrophil-driven neoangiogenesis and promotes tissue regeneration via production of angiocrine factors in mice. *Blood*. 119(26):6382-93, 2012. doi: 10.1182/blood-2011-12-399659.
 6. Nishida C, Kusubata K, Tashiro Y, Gritli I, Sato A, Ohki-Koizumi M, Morita Y, Nagano M, Sakamoto T, Koshikawa N, Kuchimaru T, Kizaka-Kondoh S, Seiki M, Nakauchi H, Heissig B#, Hattori K#. MT1-MMP plays a critical role in hematopoiesis by regulating HIF-mediated chemo/cytokine gene transcription within niche cells. *Blood*. 119(23):5405-16, 2012. doi: 10.1182/blood-2011-11-390849.
 7. Okaji Y, Tashiro Y, Gritli I, Nishida C, Sato A, Ueno Y, Del Canto Gonzalez S, Ohki-Koizumi M, Akiyama H, Nakauchi H, Hattori K#, Heissig B#. Plasminogen deficiency attenuates post-natal erythropoiesis in male C57BL/6 mice through decreased activity of the LH-testosterone axis. *Exp Hematol*. 40(2):143-54, 2012. doi: 10.1016/j.exphem.2011.10.008.
 8. Heissig B, Ohki-Koizumi M, Tashiro Y, Gritli I, Sato-Kusubata K, Hattori K. New functions of the fibrinolytic system in bone marrow cell-derived angiogenesis. *Int J Hematol*. 95(2):131-7, 2012. doi: 10.1007/s12185-012-1016-y.
 9. Ishihara M, Nishida C, Tashiro Y, Gritli I, Rosenkvist J, Koizumi M, Okaji Y, Yamamoto R, Yagita H, Okumura K, Nishikori M, Wnaka K, Tsuda Y, Okada Y, Nakauchi H, Heissig B#, Hattori K#. Plasmin inhibitor reduces T-cell lymphoid tumor growth by suppressing matrix metalloproteinase-9-dependent CD11b(+)/F4/80(+) myeloid cell recruitment. *Leukemia*. 26: 332-9, 2012. doi: 10.1038/leu.2011.203.
- [学会発表](計 6 件)
1. Heissig B. The fibrinolytic system modulates the cytokine and cellular environment during cancer progression and chronic inflammation. Joint International Symposium on TGF- β Family and Cancer. Signal Network in Tumor Microenvironment. つくば国際会議場 Tsukuba, Japan, Jan. 12-13, 2015
 2. Heissig B. The fibrinolytic pathway is required for Mesenchymal Stem Cell expansion by initiating a crosstalk between Mesenchymal Stem and Endothelial cells. IMSUT, Stem Cell Forum 東京大学医科学研究所 April 25, 2014.
 3. Heissig B. The fibrinolytic pathway is required for Mesenchymal Stem Cell expansion by initiating a crosstalk between Mesenchymal Stem and Endothelial cells. International vascular biology meeting (IVBM). みやこめっせ Kyoto April 14-17, 2014.
 4. Heissig B. Role of the microenvironment in cancer initiation and development. Nagoya University, Japan, 名古屋大学 June 10th, 2013.
 5. Heissig B. Regulation of Blood Stem Cell Function through life by MT1-MMP.

Tokyo, Japan, Nov. 30, MT1-MMP symposium, 東京大学医科学研究所 2012.

6. Heissig B. MT1-MMP plays a critical role in hematopoiesis by regulating HIF-mediated chemo-/cytokine gene transcription within niche cells. がん微小環境ネットワークの統合的研究 文部科学省・科学研究費補助金・新学術領域研究 公開シンポジウム, 東京大学医学部総合中央館 Tokyo, Japan, July 05, 2012.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://stemcell-u-tokyo.org/scd/>
<http://ganshien.umin.jp/public/research/main/heissig/index.html>

6. 研究組織

- (1)研究代表者
ハイジツヒ ベアテ (HEISSIG BEATE)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：30372931

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：