

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461434

研究課題名(和文) Microvesicleを介する骨髄腫細胞と間質細胞の相互作用の解明と臨床応用

研究課題名(英文) Microvesicle-mediated interaction between multiple myeloma cells and bone marrow stroma

研究代表者

古川 雄祐 (Furukawa, Yusuke)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：00199431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫の薬剤耐性には骨髄間質細胞との相互作用が重要である(接着耐性)。本研究においては、骨髄腫細胞が産生するcirculating microvesicle (cMV)に着目し、接着耐性における役割を解析した。骨髄腫細胞と間質細胞を共培養し、上清からcMVを分離した。分離したcMVよりRNAを抽出し、microRNAアレイを用いて、含有されるmicroRNAをスクリーニングしたところ、miR-155とmiR-135bが多く含まれていた。それぞれの機能解析を行い、miR-155がプロテアソーム阻害剤の感受性を規定することを見いだした。現在、そのメカニズムに関する詳細な検討を進めている。

研究成果の概要(英文)：Multiple myeloma cells acquire the resistance to anti-cancer drugs via interaction with bone marrow stroma (cell adhesion-mediated drug resistance). In this study, we investigated the role of circulating microvesicles (cMV) produced by myeloma cells in cell adhesion-mediated drug resistance. We isolated cMV from the co-culture supernatant of myeloma cells and human bone marrow-derived stromal cells. We then extracted total RNA from cMV and subjected them to microRNA arrays, and found that myeloma-derived cMV was very rich in miR-155 and miR-135b. Functional studies revealed that the expression level of miR-155 was positively correlated with the sensitivity of myeloma cells to proteasome inhibitors. We are currently investigating the precise mechanisms by which miR-155 determines the sensitivity of myeloma cells to proteasome inhibitors.

研究分野：血液腫瘍学・分子生物学

キーワード：多発性骨髄腫 接着耐性 間質細胞 Microvesicle microRNA

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫は悪性腫瘍の中でも最も予後が不良なもの1つである。日本骨髄腫研究会の統計によると、1990年から2000年に登録された骨髄腫患者1,383名の生存期間中央値は3.1年で、10年以上の生存はわずか2.6%であった(Shimizu, K. et al. *Leuk. Lymphoma* 45: 2465, 2004)。2000年代に入って、プロテアソーム阻害剤(ボルテゾミブ)と免疫調節薬(サリドマイド・レナリドミド)が導入され、治療成績は明らかに改善の傾向にあるが、生存期間中央値は6~7年とまだ満足すべきレベルには達していない。

多発性骨髄腫の治療成績が不良である最大の要因は、骨髄腫細胞が抗がん剤に対して強い抵抗性を示すことである。抗がん剤抵抗性の原因として、骨髄間質細胞との接着によって誘導されるG0/G1期停止とアポトーシス抵抗性が指摘されており、接着耐性と呼ばれる(Damiano, J. S. et al. *Blood* 93: 1658, 1999)。またinterleukin-6やIGF-1などの液性因子を介する相互作用も単独で、あるいは接着耐性を増強することで抗がん剤抵抗性に重要な役割を果たしている。

申請者らは多発性骨髄腫の治療成績の改善を目的として、接着耐性を解除するための方策について研究を続けている。まず骨髄腫細胞と間質の接着に直接関与する分子を同定するため、siRNAを用いたfunctional screeningを行い、VLA-4(CD49d/CD29複合体)が最も重要な役割を果たしていることを明らかにした(Oncogene 2009)。さらにボルテゾミブがヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の発現を抑制し、クロマチン構造を改変すると共にCD49dの発現を低下させ、その結果、他の抗がん剤の感受性を亢進させることを見いだした(*Blood* 2010)。ボルテゾミブによる接着耐性の解除は、米国のグループによっても追試報告されている(McMillin, D. W. et al. *Nat. Med.* 16: 483, 2010)。

このような基礎研究の成果は臨床にトランスレートされつつあり、例えばVISTA試験によると、従来の標準的レジメンであるメルファラン+プレドニソロン(MP)による5年生存率が、ボルテゾミブを併用することによって約30%向上している(Fayers, P. M. et al. *Blood* 118: 1239, 2011)。それでも5年生存率の実数は46%であり、さらなる改善の余地があると言わざるを得ない。また接着耐性の解除を目的として行われた抗CD49d抗体の第II相試験では、残念ながら期待された結果が得られなかった(NIH治験番号NCT00675428)。骨髄腫/間質相互作用に関与する液性因子に対する中和抗体も、耐性解除への有効性は限定的である。

以上の結果は、骨髄腫細胞と間質の相互作用に、従来示されている直接の接着および液性因子を介する作用のほかに第3のメカニズムが存在することを強く示唆する。そこで本研究においては、circulating

microvesicle(exosomeおよびmicrovesicle)に着目し、骨髄腫細胞と間質の相互作用とくに抗がん剤耐性におけるその役割を明らかにする。その上でcirculating microvesicleを治療標的とする方策を考案し、多発性骨髄腫の治療成績を向上させるための新たな分子基盤を提供することを目的とする。

2. 研究の目的

多発性骨髄腫の抗がん剤抵抗性は、ボルテゾミブや接着分子・サイトカインに対する抗体などで間質との相互作用を抑制しても完全には解除されない。このことは、直接の接着および液性因子を介する作用のほかに第3のメカニズムが存在することを示唆する。本研究はcirculating microvesicleに着目し、骨髄腫細胞と間質の相互作用とくに抗がん剤耐性における役割を明らかにするもので、新規性・独創性の高いものである。本研究によって骨髄腫特異的なcMVが同定され、その抗がん剤耐性への関与が明らかになれば、cMVをターゲットとする新しい治療が可能となり、治療成績の向上に大きく貢献することが期待される。

3. 研究の方法

Circulating microvesicle(cMV)は、細胞膜の一部が袋状に分離・独立し、細胞から分泌されるもので、巨核球や単球などの血液細胞および胎盤によって産生されることが知られている。分泌されたcMVは近接する細胞あるいは血行性に移動して遠隔部位の細胞に取り込まれ、内部に含まれるタンパク質・脂質・核酸が受容細胞内で作用する。正常細胞におけるcMVの生理的役割にはまだ不明の点が多いが、自然免疫やストレス応答への関与が推察されている。

まず間質細胞との共培養において骨髄腫細胞がmicrovesicleを産生することを確認する。その上でmicrovesicleに含まれる活性化シグナル蛋白・mRNA・microRNAをスクリーニングし、単独培養時の骨髄腫細胞・間質細胞で得られるmicrovesicleとの比較で、相互作用に関与する含有因子を同定する。次いでmicrovesicleが間質細胞にどのような影響を及ぼしているかを解析し、その中心として働いている分子を同定する。さらにmicrovesicleの産生および内部分子の抑制によって骨髄腫細胞の薬剤耐性が解除されることを証明する。最後に臨床検体を用い、血中cMV濃度と治療成績(寛解率・無病生存率など)との逆相関を明らかにする。

1) 骨髄腫細胞の産生する circulating microvesicle の分離

Circulating microvesicle(cMV)には大きく分けてexosomeとmicrovesicleの2種類がある。前者が30~100nm、後者が200~1000nmとサイズが異なることから、ショ糖密度勾配遠心法によって別々に分離するこ

とが可能である。

本研究においては、まず骨髄腫細胞が cMV を産生していることを確かめるため、間質細胞との共培養を行い、培養液をシヨ糖密度勾配遠心にかけて cMV を分離する。cMV の単離は、電子顕微鏡を用い、サイズと特徴的な形態によって確認する（下図参照）。プロテアソーム阻害剤や抗 VLA-4 抗体などで接着を解除した状態での cMV 産生を再現するため、培養は Boyden chamber を用いて直接の接着を避けた状態で行う。通常の共培養および骨髄腫と間質細胞それぞれを単独で培養した上清を同様に解析して対照とする。

2) 骨髄腫細胞由来 circulating microvesicle に含まれる分子の解析

単離した cMV よりタンパク質を抽出し、phosphoprotein array を用いて、どのような活性化シグナル分子が含まれているかを解析する。また RNA を抽出し、cDNA array および microRNA array にかけて、含有される mRNA・miRNA のパターンを同定する。培養前後の骨髄腫細胞および間質細胞で同様の解析を行い、cMV に含まれる分子の由来を明らかにする。

3) 骨髄腫細胞の産生する circulating microvesicle の間質細胞への作用の解析

骨髄腫細胞由来の精製 cMV を間質細胞に作用させ、どのような変化がおこるかを、サイトカイン産生能・接着分子の発現などを中心に網羅的に解析する。とくに骨髄腫維持に関与する interleukin-6・骨髄腫に特徴的な血管増生に関与する VEGF・骨吸収を促進する RANKL や DKK-1 などに注目する。

以上から cMV の間質細胞への作用が確認されたら、cMV に含まれるどの分子によってこれらの細胞現象が介在されるかを、siRNA によるノックダウンで明らかにする。すなわち、骨髄腫細胞に候補分子に対する siRNA を作用させた上で cMV を精製し、間質細胞への作用が減弱することを確かめる。

4) 骨髄腫細胞による circulating microvesicle 産生機構の解明

cMV が産生されるメカニズムはまだ完全には解明されていないが、microvesicle においては Ras-related small GTP-binding protein である ARF6 の関与と RhoA による ROCK と LIM kinase の活性化の関与が報告されている (D' Souza-Schorey, C. et al. *Genes Dev.* 26: 1287, 2012)。一方、exosome の産生には Ras-related GTPase の Rab ファミリー蛋白が必須の働きをしている (Frasa, M. A. M. et al. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13: 67, 2012)。そこで骨髄腫細胞においてこれらの因子の発現と活性を解析し、cMV 産生のメカニズムを明らかにする。

次いで、上記の方法で同定した関連因子の活性を特異的阻害剤でブロックあるいは

siRNA を用いて発現を抑制し、cMV 産生の低下を確認する。この方法を応用し、骨髄腫細胞と間質細胞の共培養においても cMV 産生の抑制と薬剤感受性の亢進を誘導できるかどうかを調べる。

一方、骨髄腫細胞の薬剤耐性は骨髄微小環境における低酸素状態によって増強されるとの報告がある (Chesi, M. et al. *Blood* 120: 376, 2012)。この現象への cMV の関与を、通常の酸素濃度と低濃度での産生の比較、さらに cMV 産生を阻害することで低酸素状態での薬剤感受性が改善されることで証明する。

5) 骨髄腫患者末梢血中の circulating microvesicle の検出と治療効果との相関

患者検体を用い、実際に血中に cMV が存在するかどうかを確認する。治療前に測定した cMV の量と治療成績（寛解率・無病生存率など）との逆相関を統計的に明らかにする。

4. 研究成果

多発性骨髄腫の薬剤耐性には骨髄間質細胞との接着が重要である（接着耐性）。しかしながら、プロテアソーム阻害剤や接着分子・サイトカインに対する抗体によって接着を阻害しても抗がん剤耐性は完全には解除されない。本研究においては、骨髄腫細胞が産生する circulating microvesicle (cMV) に着目し、間質の相互作用とくに薬剤耐性におけるその役割とメカニズムを明らかにする。その上で circulating microvesicle を治療標的とする方策を考案し、多発性骨髄腫の治療成績を向上させるための新たな分子基盤を提供することを目的とした。

骨髄腫細胞と間質細胞の直接の接触・接触なしの共培養・骨髄腫単独での培養の 3 つの条件で培養を行い、それぞれの上清からの cMV の分離システムを確立した。分離した cMV より RNA を抽出し、RT-PCR アレイを用いて、含有される microRNA をスクリーニングした。その結果、骨髄腫由来の cMV には miR-155 と miR-135b が多く含まれていることが明らかとなった。それぞれについて機能解析を行い、miR-155 がプロテアソーム阻害剤の感受性を規定することを見いだした。現在、そのメカニズムに関する詳細な検討を進めている。

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 13 件)

1) Nemoto, A., Saida, S., Kato, I., Kikuchi, J., Furukawa, Y., Maeda, Y., Akahane, K., Honna-Oshiro, H., Goi, K., Kagami, K., Kimura, S., Sato, Y., Okabe, S., Niwa, A., Watanabe, K., Nakahata, T., Heike, T., Sugita, K. and Inukai, T.: Specific Anti-leukemic Activity of PD0332991, a

CDK4/6 inhibitor, against Philadelphia Chromosome-positive Lymphoid Leukemia.

Mol. Cancer Ther. 15: 94-105, 2016.

2) Kikuchi, J., Koyama, D., Wada, T., Izumi, T., Hofgaard, P.O., Bogen, B. and Furukawa, Y.: Phosphorylation-mediated EZH2 Inactivation Promotes Drug Resistance in Multiple Myeloma.

J. Clin. Invest. 125: 4375-4390, 2015.

3) Wada, T., Koyama, D., Kikuchi, J., Honda, H. and Furukawa, Y.: Overexpression of the Shortest Isoform of Histone Demethylase LSD1 Primes Hematopoietic Stem Cells for Malignant Transformation.

Blood 125: 3731-3746, 2015.

4) Tago, K., Funakoshi-Tago, M., Itoh, H., Furukawa, Y., Kikuchi, J., Kato, T., Suzuki, K. and Yanagisawa, K.: Arf Tumor Suppressor Disrupts the Oncogenic Positive Feedback Loop Including c-Myc and DDX5.

Oncogene 34: 310-318, 2015.

5) Koyama, D., Sato, Y., Aizawa, M., Maki, T., Kurosawa, M., Kuro-o, M. and Furukawa, Y.: Soluble α Klotho as a Candidate for the Biomarker of Aging.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 467: 1019-1025, 2015.

6) Koyama, D., Kikuchi, J., Hiraoka, N., Wada, T., Kurosawa, H., Chiba, S. and Furukawa, Y.: Proteasome Inhibitors Exert Cytotoxicity and Increase Chemosensitivity via Transcriptional Repression of Notch1 in T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia.

Leukemia 28: 1216-1226, 2014.

7) Hiraoka, N., Kikuchi, J., Yamauchi, T., Koyama, D., Wada, T., Uesawa, M., Akutsu, M., Mori, S., Nakamura, Y., Ueda, T., Kano, Y. and Furukawa, Y.: Purine Analog-like Properties of Bendamustine Underlie Rapid Activation of DNA Damage Response and Synergic Effects with Pyrimidine Analogues in Lymphoid Malignancies.

PLoS One 9: e90675, 2014.

8) Kikuchi, J., Koyama, D., Mukai, H.Y. and Furukawa, Y.: Suitable Drug Combination with Bortezomib for Multiple Myeloma under Stroma-free Conditions and in Contact with Fibronectin or Bone Marrow Stroma.

Int. J. Hematol. 99: 726-736, 2014.

9) Sripayap, P., Nagai, T., Hatano, K.,

Kikuchi, J., Furukawa, Y. and Ozawa, K.: Romidepsin Overcomes Cell Adhesion-mediated Drug Resistance in Multiple Myeloma Cells.

Acta Haematol. 132: 1-4, 2014.

10) Kikuchi, J., Yamada, S., Koyama, D., Wada, T., Nobuyoshi, M., Izumi, T., Akutsu, M., Kano, Y. and Furukawa, Y.: The Novel Orally Active Proteasome Inhibitor K-7174 Exerts Anti-myeloma Activity *in Vitro* and *in Vivo* by Down-regulating the Expression of Class I Histone Deacetylases.

J. Biol. Chem. 288: 25593-25602, 2013.

11) Kikuchi, J., Shibayama, N., Yamada, S., Wada, T., Nobuyoshi, M., Izumi, T., Akutsu, M., Kano, Y., Sugiyama, K., Ohki, M., Park, S.-Y. and Furukawa, Y.: Homopiperazine Derivatives as a Novel Class of Proteasome Inhibitors with a Unique Mode of Proteasome Binding.

PLoS One 8: e60649, 2013.

12) Kuroda, I., Inukai, T., Zhang, X., Kikuchi, J., Furukawa, Y., Nemoto, A., Akahane, K., Hirose, K., Honna-Ooshiro, H., Goi, K., Kagami, K., Yagita, H., Tauchi, T., Maeda, Y. and Sugita, K.: BCR-ABL Regulates Death Receptor Expression for TNF-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) in Philadelphia Chromosome-positive Leukemia.

Oncogene 32: 1670-1681, 2013.

13) Hiraoka, N., Kikuchi, J., Koyama, D., Wada, T., Mori, S., Nakamura, Y. and Furukawa, Y.: Alkylating Agents Induce Histone H3K18 Hyperacetylation and Potentiate HDAC Inhibitor-mediated Global Histone Acetylation and Cytotoxicity in Mantle Cell Lymphoma.

Blood Cancer J. 3: e169, 2013.

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.jichi.ac.jp/stem/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川 雄祐 (FURUKAWA, Yusuke)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：00199431

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：