

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461420

研究課題名(和文) インテグリン 8の骨髄内での発現・機能解析 - 多発性骨髄腫治療への応用に向けて -

研究課題名(英文) The role of integrin alpha 8 in the pathogenesis of multiple myeloma

研究代表者

一井 倫子 (ICHI, Michiko)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：30633010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫は腫瘍化した形質細胞が骨髄内で増殖し、多彩な合併症を来す難治性の血液悪性疾患であるが、その詳細なメカニズムはわかっていない。本研究では、インテグリン 8が形質細胞に発現している事に着目し、多発性骨髄腫における発現と機能解析を行った。患者検体を用いた検討では、骨髄腫細胞でインテグリン 8のRNA発現が確認された。インテグリン 8による微小残存病変測定が有用である可能性が考えられた。多発性骨髄腫細胞株を用いて、インテグリン 8発現の有無による機能比較を行った。細胞増殖、薬剤耐性作用の差は明らかでなく、インテグリン 8の機能について明らかにすることは出来なかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is evaluating the role of integrin alpha 8 in the pathogenesis of multiple myeloma. It is reported that human plasma cells express integrin alpha 8. First, we analyzed the expression of integrin alpha 8 on myeloma cells. As a result, not all of myeloma cell lines express integrin alpha 8. In contrast, the expression of integrin alpha 8 was detected in myeloma cells derived from patient bone marrow and peripheral blood. The effect of integrin alpha 8 on proliferation and resistance against cytotoxic drugs seemed similar between integrin alpha 8 positive and negative myeloma cell lines. These results indicated that integrin alpha 8 might be useful for evaluating residual disease during treatment.

研究分野：血液内科

キーワード：骨髄腫 インテグリン

1. 研究開始当初の背景

あらゆる細胞の働きには、細胞間の相互作用が必須である。ニッチと呼ばれる各々の細胞に特異的な微小環境は、インテグリン等の接着因子や分泌型蛋白、細胞表面蛋白を介して、直接・間接的に細胞の移動・ホーミング、発生・分化、増殖、炎症、がんへの進展や転移などを制御している。申請者らのグループは、以前より、血液細胞や悪性腫瘍の微小環境に関する研究に取り組んできた。

血液細胞や腫瘍細胞には様々な種類のインテグリンが発現しているが、これらは恒常状態では非活性化型を維持し、何らかの刺激が加わったときにのみ活性化され機能する。申請者らは2003年に、talin-1がインテグリン活性化に必須である事を世界で初めて報告した。さらに2011年には、血小板インテグリン活性化機構における負の調整因子として、 α -actininを同定し、 α -actininがインテグリン $\alpha 3$ 鎖と結合する事で非活性化状態を安定させている事を見出した。

多発性骨髄腫においては、インテグリン α 鎖4, 5, V, や β 鎖1, 2, 3, 7が発現している。インテグリンが、VEGF、MIP 蛋白分泌やNF κ Bシグナル制御に関わっている事が知られているが、その作用について未解明な部分は多く残されており、骨髄腫におけるインテグリンの発現や作用についての詳細な解析は皆無であった。

2. 研究の目的

本研究では、インテグリン・ファミリーの中で、インテグリン $\alpha 8$ の骨髄内での発現・機能を明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 多発性骨髄腫細胞におけるインテグリン $\alpha 8$ 発現と予後との相関について

多発性骨髄腫の患者骨髄・末梢血から、フローサイトメトリー法を用いて骨髄腫細胞を単離し、各分画におけるインテグリン $\alpha 8$ の発

現パターンを解析する。治療経過および予後との関連性を明らかにする。

(2) 骨髄腫前駆細胞におけるインテグリン $\alpha 8$ の役割について

各段階のBリンパ球系細胞分画をフローサイトメトリー法を用いて単離し、骨髄腫initiating-cell(骨髄腫幹/前駆細胞)が含まれる可能性のある、形質細胞よりも前段階の細胞が、インテグリン $\alpha 8$ を発現しているのか検討する。

(3) 健常人における造血組織・血液細胞のインテグリン $\alpha 8$ 発現について

健常人および野生型マウスにおける各系統血液細胞と間葉系細胞・血管内皮細胞等の骨髄内ニッチ構成細胞のインテグリン $\alpha 8$ の発現を調べる。

(4) インテグリン $\alpha 8$ の多発性骨髄腫病態での役割について

骨髄腫細胞の骨髄ホーミング、細胞増殖、薬剤耐性作用を検討し、多発性骨髄腫病態での役割を明らかにする。

(5) 骨髄腫細胞・正常形質細胞に発現するインテグリン $\alpha 8$ の活性化状態について

talin-1、 α -actinin発現を改変した細胞株を用いて機能を解析する。

(6) インテグリン $\alpha 8$ の骨髄内リガンドの同定

4. 研究成果

(1) 多発性骨髄腫細胞におけるインテグリン $\alpha 8$ 発現と予後との相関について

多発性骨髄腫の患者検体から単離した腫瘍細胞を用いて腫瘍特異的プライマー(ASO-PCRプライマー)を患者毎に作成し、骨髄腫細胞でのインテグリン $\alpha 8$ のRNA発現を比較した。腫瘍分画における発現はほぼ合致した。末梢血においても腫瘍細胞量を反映する結果が得られた。ASO-PCRは患者ごとにプライマーを設計する必要がある。インテグリン $\alpha 8$ による末梢血のMRD測定が有用

である可能性が考えられた。現在、治療後の長期予後についての定量性の検討を行っている。

(2) 骨髄腫前駆細胞におけるインテグリン $\alpha 8$ の役割について

多発性骨髄腫の患者検体から単離した腫瘍細胞を用いて腫瘍特異的プライマー (ASO-PCR プライマー) を患者毎に作成し、末梢血・骨髄中の B 前駆細胞、成熟 B 細胞、形質細胞を分化段階に細分化して単離し RNA 発現を解析した。骨髄中の sIgM 陽性 CD20 陽性 B 細胞分画では、患者腫瘍特異的プライマーによる PCR で発現が確認されたのに対して、インテグリン $\alpha 8$ の発現は認められなかった。これらの結果より、インテグリン $\alpha 8$ の発現が骨髄腫細胞と完全に合致する訳ではないことが分かった。

(3) 健常人における造血組織・血液細胞のインテグリン $\alpha 8$ 発現について

健常人および各系統血液細胞と間葉系細胞・血管内皮細胞等の骨髄内ニッチ構成細胞を単離しインテグリン $\alpha 8$ の RNA 発現を解析したところ、形質細胞への強い偏りが認められた。野生型マウスにおいては、形質細胞分画へのインテグリン $\alpha 8$ の RNA 発現は認められなかった。

(4) インテグリン $\alpha 8$ の多発性骨髄腫病態での役割について

多発性骨髄腫細胞株を用いて インテグリン $\alpha 8$ 強制発現株を作成した。インテグリン $\alpha 8$ 発現の有無による細胞増殖、薬剤耐性作用の差は明らかでなかった。

(5)および(6)については、明確な結論には至らなかった。

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)

Kato H, Nakazawa Y, Kurokawa Y, Kashiwagi H, Morikawa Y, Morita D,

Banno F, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y. Human CalDAG-GEFI deficiency increases bleeding and delays α IIb β 3 activation. Blood. 128(23):2729-2733,2016.doi:10.1182/blood-2016-03-704825. (査読あり)

Fujita N, Ichii M, Maeda T, Saitoh N, Yokota T, Yamawaki K, Kakitani M, Tomizuka K, Oritani K, Kanakura Y. Identification of osteoblast stimulating factor 5 as a negative regulator in the B-lymphopoietic niche. Exp Hematol. 43:963-973, 2015. (査読あり)

Fujita N, Oritani K, Ichii M, Yokota T, Saitoh N, Okuzaki D, Sekine Y, Kon S, Muromoto R, Saitoh K, Yoshimura A, Matsuda T, Kanakura Y.

Signal-transducing adaptor protein-2 regulates macrophage migration into inflammatory sites during dextran sodium sulfate induced colitis. Eur J Immunol. 44:1791-1801, 2014 (査読あり)

[学会発表](計 7 件)

Michiko Ichii, Kenji Oritani, Jun Toda, Hideaki Saito, Tadashi Matsuda, Yuzuru Kanakura. Suppression of normal B lymphopoiesis in bone marrow induced by myeloma progression. 16th International Myeloma Workshop. (March 1-4, 2017)(New Delhi, India)

Ishibashi T, Yokota T, Tanaka H, Ichii M, Sudo T, Satoh Y, Doi Y, Tanimura A, Hamanaka Y, Ezoe S, Shibayama H, Oritani K, Kanakura Y. Endothelial cell-selective adhesion molecule is a novel human hematopoietic stem cell marker associated with a subset of human leukemias. The 44th Annual Scientific Meeting of International

Society of Experimental Hematology.
(Sep 17-19, 2015)(Kyoto)

Ichii M, Oritani K, Fujita N, Saitoh N,
Sekine Y, Muromoto R, Kon S, Saitoh K,
Matsuda T, **Kanakura Y**. REGULATION
OF B LYMPHOPOIESIS BY
SIGNAL-TRANSDUCING ADAPTOR
PROTEIN-2, STAP-2. 19th Congress of
the European Hematology Association.
(2014.6.12-15)(Milan, Italy)

〔その他〕

大阪大学血液・腫瘍内科学ホームページ
<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/bldon/www/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一井 倫子 (ICHII, Michiko)
大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座
助教
研究者番号：30633010

(2) 研究分担者

加藤 恒 (KATO, Hisashi)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：20705214

横田 貴史 (YOKOTA, Takafumi)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：60403200

織谷 健司 (ORITANI, Kenji)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：70324762

金倉 譲 (KANAKURA, Yuzuru)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20177489

田所 誠司 (TADOKORO, Seiji)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：80403062
(平成 26 年度まで分担者として参画)

(3) 連携研究者

横崎 恭之 (YOKOSAKI, Yasuyuki)
広島大学・保健管理センター・准教授
研究者番号：80210607