

平成 30 年 6 月 10 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18420

研究課題名(和文) がん抑制性ニッチの実態とその誘導による新規治療法の開発

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of activated osteoblast-induced myeloma death through mitochondrial impairment and metabolic perturbation

研究代表者

中村 信元 (NAKAMURA, Shingen)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・助教

研究者番号：10511321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：前骨芽細胞株MC3T3-E1にBMP-2を添加して成熟骨芽細胞を作成しMM細胞と共培養したところMM細胞に時間依存性の細胞死を誘導し、MM細胞のミトコンドリア量とATP産生量を抑制しAMPKのリン酸化を誘導した。また、MM細胞のPim-2とともにミトコンドリア代謝調節因子であるPGC-1の発現が低下し、AMPKがリン酸化した。以上より、未分化な骨髄間質細胞はMM細胞のPim-2発現を亢進しMM細胞を増殖させるが、分化した成熟骨芽細胞は、逆にMM細胞のPim-2の発現を抑制し、ミトコンドリアの機能障害やAMPKの活性化によるエネルギー代謝の攪乱を介しMM細胞に細胞死を誘導すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In contrast to bone marrow stromal cells or osteoclasts, mature osteoblasts (OBs) induced myeloma (MM) cell death in parallel with downregulation of the pro-survival mediator Pim-2. The Pim-2 reduction triggered the downregulation of PGC-1, an activator of glycolysis and mitochondrial biogenesis, along with subsequent ATP reduction and phosphorylation of AMPK, a key energy sensor, in MM cells. The AMPK inhibitor dorsomorphin mitigated MM cell death in cocultures with OBs. Therefore, the prompt reduction of Pim-2 and thereby PGC-1 suppression and AMPK activation in MM cells are suggested to cause the mature OB-triggered MM cell death with energy crisis.

研究分野：がん薬物療法学

キーワード：multiple myeloma osteoblast Pim-2 PGC-1 AMPK

1. 研究開始当初の背景

骨は造血幹細胞や白血病幹細胞のニッチを形成し、造血細胞や腫瘍細胞の維持生育に骨微小環境が深く関与する。多発性骨髄腫は、現在でも難治であるが、とりわけ骨に親和性を持ち進行性の骨破壊病変を形成し、骨微小環境に依存した治療抵抗性を獲得する。これまでに、我々はこの特異な骨髄腫細胞の生育環境を理解し、新たな治療戦略を構築するため、腫瘍増殖と骨代謝の制御機構との関わりを含めた統合的なアプローチを行い、現有の治療の弱点になっている部分を明らかにし、その弱点を克服しうる治療法の開発のための基礎検討を進めてきた。

これまでに我々の研究グループでは、骨髄腫細胞由来 MIP-1 α/β が破骨細胞形成を促進し(Abe, et al. Blood, 2002)、形成された破骨細胞が骨破壊だけでなく直接腫瘍増殖をもたらす(Abe, et al. Blood, 2004)、さらに骨髄腫細胞は Wnt 阻害因子 sFRP-2 を産生し骨芽細胞分化を強力に抑制し骨喪失をきたす(Oshima, et al. Blood, 2005)ことを報告した。次いで、TGF- β 阻害薬は骨髄腫細胞の存在下においても骨芽細胞分化を回復し、成熟骨芽細胞は、その前駆細胞である骨髄間質細胞とは全く対照的に骨髄腫細胞にアポトーシスを惹起することを見出した(Takeuchi, et al. PLoS One, 2010)。従って、骨系細胞はその種類、分化段階によって、腫瘍進展を正あるいは負に調節するという興味深い現象が明らかになった。

また、我々は患者骨病変を再現出来る骨髄腫動物モデルとして、SCID マウスの皮下に移植した家兔骨の骨髄腔内にヒト骨髄腫細胞を注入した SCID-rab モデルを用い骨髄腫骨髄微小環境の研究を行っている。右図のように、コントロール群では骨量が減少し腫瘍が骨の内外で進展・増大しているが、カテプシン K 阻害薬には直接的な抗

腫瘍抑制活性はないにも拘らず、カテプシン K 阻害薬治療群では骨量が増加し骨髄内部では腫瘍は退縮するという骨芽細胞誘導をもたらす腫瘍抑制性ニッチの概念を支持する興味深い所見を見出した。

2. 研究の目的

これまでの多くの腫瘍ニッチの研究は腫瘍増殖を促進させるニッチの分子機序の研究であったが、本研究では、骨系あるいは骨髄内に分布する細胞が構成する、腫瘍進展を促進し薬剤抵抗性を賦与する微小環境(腫瘍促進的ニッチ)を対比させ、腫瘍増殖を負に制御し腫瘍を許容しない骨微小環境(腫瘍排他的ニッチ)の存在を培養系で実証するという、今までに検討されることのなかった視点からの研究である点、さらに得られた分子生物学的結果をもとに治療標的を探索し、腫瘍促進ニッチを破綻させ、腫瘍排他的ニッチを骨の再生とともに誘導する治療の開発に繋げる。

3. 研究の方法

前骨芽細胞株 MC3T3-E1 に BMP-2 を添加し骨芽細胞分化を誘導させた。このようにして誘導した成熟骨芽細胞、あるいは分化誘導していない前骨芽細胞と骨髄腫細胞との共培養を行った。その後、骨髄腫細胞の細胞死の有無、骨髄腫細胞の代謝関連因子の影響を検討した。

4. 研究成果

分化していない前骨芽細胞と骨髄腫細胞の共存は骨髄腫細胞の増殖を促進するが、成熟させた骨芽細胞は、骨髄腫細胞株 RPMI8226 and INA6 に時間依存性に細胞死を誘導するとともにこれらの骨髄腫細胞のミトコンドリア量と ATP 産生量を抑制し AMPK のリン酸化を誘導した。AMP 類似物質 AICAR による AMPK の活性化は MM

細胞に細胞死を誘導し、逆に AMPK 阻害薬 dorsomorphin は骨芽細胞による MM 細胞の細胞死を減弱させた。成熟骨芽細胞との共存より MM 細胞の Pim-2 とともにミトコンドリアの量や機能の調節因子である PGC-1 α の発現を抑制した。Pim キナーゼは PGC-1 α の発現を調節することが報告されているが、Pim 阻害薬 SMI-16a の添加により MM 細胞の PGC-1 α の発現が減少し、AMPK がリン酸化した。以上より、骨髄間質細胞は MM 細胞の抗アポトーシス媒介因子の Pim-2 の発現を亢進し MM 細胞を増殖させるが、骨髄間質細胞から分化誘導した成熟骨芽細胞は、逆に骨髄腫細胞の Pim-2 の発現を抑制し、Pim-2 の下流因子の Mcl-1 や c-Myc などの生存因子の発現減少とともに PGC-1 α の発現抑制によるミトコンドリアの機能障害や AMPK の活性化によるエネルギー代謝の攪乱を介し MM 細胞に細胞死を誘導すると考えられた。今後さらに詳細な機序を検討し治療開発につなげる予定である。

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 9 件)

1. Nakamura S, Azuma M, Maruhashi T, Sogabe K, Sumitani R, Uemura M, Iwasa M, Fujii S, Miki H, Kagawa K, Hiraga T, Kondo N, Fujita H, Mahara F, Abe M. Steroid pulse therapy in patients with encephalopathy associated with severe fever with thrombocytopenia syndrome. *J Infect Chemother.* 24(5):389-392, 2018.
2. Nakamura S, Fujii S, Oda A, Miki H, Tenshin H, Teramachi J, Hiasa M, Maeda Y, Oura M, Takahashi M, Iwasa M, Endo I, Yoshida S, Aihara K, Kurahashi K, Harada T, Kagawa K, Nakao M, Sano S and Abe M. Unique anti-myeloma activity by thiazolidine-2,4-dione compounds with Pim inhibiting activity. *Br J Haematol.* 180(2):246-258, 2018.
3. Teramachi J, Hiasa M, Oda A, Harada T, Nakamura S, Amachi R, Tenshin H, Iwasa M, Fujii S, Kagawa K, Miki H, Kurahashi K,

Yoshida S, Endo I, Haneji T, Matsumoto T, Abe M. Pim-2 is a critical target for treatment of osteoclastogenesis enhanced in myeloma. *Br J Haematol.* 180(4):581-585, 2018.

4. Tenshin H, Teramachi J, Oda A, Amachi R, Hiasa M, Bat-Erdene A, Watanabe K, Iwasa M, Harada T, Fujii S, Kagawa K, Sogabe K, Nakamura S, Miki H, Kurahashi K, Yoshida S, Aihara K, Endo I, Tanaka E, Matsumoto T, Abe M. TAK1 inhibition subverts the osteoclastogenic action of TRAIL while potentiating its anti-myeloma effects. *Blood Advances* 1(24):2124-2137, 2017.

5. Nakamura S, Miki H, Iwasa M, Ikegame A, Maruhashi T, Sumitani R, Uemura M, Takahashi M, Kagawa K, Sumitani R, Uemura M, Takahashi M, Fujii S, Abe M. Multiple myeloma with high adenosine deaminase expression. *International Journal of Myeloma* 7(1): 1-5, 2017.

6. Nakamura S, Kagawa K, Sumitani R, Uemura M, Takahashi M, Iwasa M, Fujii S, Miki H, Abe M. Primary CD30-positive Diffuse Large B-cell Lymphoma in the Superior Vena Cava. *Intern Med.* 56(15):2043-2047, 2017.

7. Nakamura S, Miki H, Oda A, Tenshin H, Teramachi J, Hiasa M, Bat-Erdene A, Maeda Y, Oura M, Takahashi M, Iwasa M, Harada T, Fujii S, Kurahashi K, Yoshida S, Kagawa K, Endo I, Aihara K, Ikuo M, Itoh K, Hayashi K, Nakamura M, Abe M. Effective impairment of myeloma cells and their progenitors by hyperthermia. *Oncotarget.* 9(12):10307-10316, 2017.

8. Bat-Erdene A, Miki H, Oda A, Nakamura S, Teramachi J, Amachi R, Tenshin H, Hiasa M, Iwasa M, Harada T, Fujii S, Sogabe K, Kagawa K, Yoshida S, Endo I, Aihara K, Abe M. *Oncotarget.* 7(48):79064-79075, 2016.

9. Amachi R, Hiasa M, Teramachi J, Hrada T, Oda A, Nakamura S, Hanson D, Watanabe K, Fujii S, Miki H, Kagawa K, Iwasa M, Endo I, Kondo T, Yoshida S, Aihara KI, Kurahashi K, Kuroda Y, Horikawa H, Tanaka E, Matsumoto T, Abe M. A vicious cycle between acid sensing and survival signaling in myeloma cells: acid-induced epigenetic alteration. *Oncotarget.* 7:70447-70461, 2016.

[学会発表] (計 3 件)

1. Mature osteoblasts reduce Pim-2 to cause an energy crisis in myeloma cells. Shingen Nakamura, Hirokazu Miki, Hirofumi Tenshin, Keiichiro Watanabe,

Jumpei Teramachi, Masahiro Hiasa, Asuka Oda, Yusaku
Maeda, Masahiro Oura, Mamiko Takahashi, Masami Iwasa, Takeshi Harada, Shiro Fujii, Kumiko Kagawa, Masahiro Abe
日本血液学会総会 2017年10月20日-22日 東京国際フォーラム 東京都 千代田区

2. Mature osteoblasts reduce Pim-2 to cause an energy crisis in myeloma cells.
Shingen Nakamura, Hirokazu Miki, Hirofumi Tenshin, Keiichiro Watanabe, Jumpei Teramachi, Masahiro Hiasa, Asuka Oda, Yusaku
Maeda, Masahiro Oura, Mamiko Takahashi, Masami Iwasa, Takeshi Harada, Shiro Fujii, Kumiko Kagawa, Masahiro Abe
日本骨髄腫学会 2017年5月27-28日 日本赤十字看護大学 広尾キャンパス 東京都 渋谷区

3. Osteoblasts creates non-permissive niche for myeloma.
Ryota Amachi, Masahiro Hiasa, Jumpei Teramachi, Asuka Oda, Ariunzaya Bat-Erdene, Hirofumi Tenshin, Keiichiro Watanabe, Shingen Nakamura, Hirokazu Miki, Kumiko Kagawa, Shiro Fujii, Eiji Tanaka, Toshio Matsumoto, Masahiro Abe
IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition 2017年3月22-25日 San Francisco, Calif., USA

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織 (1) 研究代表者

中村 信元 (NAKAMURA, Shingen)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教

研究者番号：10511321