

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03572

研究課題名(和文) ヒト多発性骨髄腫モデルマウスにおけるがんニッチ間相互作用の解析

研究課題名(英文) Analysis of interaction of multiple myeloma cells and bone marrow stroma cells using xenograft models

研究代表者

安藤 潔 (ANDO, Kiyoshi)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：70176014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：がんニッチを介したNotchシグナル活性化の多発性骨髄腫細胞増殖及び薬剤抵抗性獲得における分子メカニズムとして、ニッチによって誘導されるJagged1-Notchシグナリング活性化がPKCを活性化し、続いてMARCKSをリン酸化することで骨髄腫細胞の生存とボルテゾミブ耐性誘導に関わっていることを初めて見出した。また、多発性骨髄腫細胞とニッチの間で特異的に起こっている相互作用を解析するために、異種移植モデルのインタラクトーム解析を行い、ボルテゾミブ耐性に関与すると思われる9つの相互作用を同定した。その候補の中のSEMA3A-NRP1のボルテゾミブ感受性における作用について現在解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性骨髄腫の薬剤耐性メカニズムの中で重要な要素としてがんニッチ相互作用が深く関わっていることが分かっているが、in vivoにおいてがんとニッチを同時に解析する適切なツールが欠如している。申請者らが確立したヒト骨髄腫細胞を免疫不全マウスに移植した異種移植マウスを用いて網羅的にインタラクトーム解析を行うことで、薬剤耐性に関与する相互作用のメカニズムの全貌が明らかになると考えられ、最終的にはニッチを標的とする新たな治療薬の開発を通して多発性骨髄腫の治療につながる重要な治療オプションにつながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated for the first time that niche-induced Jagged1-Notch signaling activates PKC, subsequently phosphorylates MARCKS, and finally leads to the proliferation, survival and acquired resistance to bortezomib in multiple myeloma cells. as a molecular mechanism of Notch signaling activation through cancer niche. In addition, in order to analyze the interactions that occur specifically between multiple myeloma cells and niches, we performed an interactome analysis using xenograft models and identified nine interactions that may be involved in bortezomib resistance. The effect of SEMA3A-NRP1 on bortezomib susceptibility among the candidates is currently being analyzed in multiple myeloma cells and bone marrow stroma cells.

研究分野：血液学

キーワード：ニッチ 多発性骨髄腫 インタラクトーム ヒト環境マウス ニッチ間相互作用

1. 研究開始当初の背景

生体内でがん細胞が単独で存在する状態は考えられず、試験管内ではなくモデル動物の生体環境においてのみ本来の細胞動態を解析する事が可能となるからである。申請者らが重症免疫不全 (NOG) マウス (J. Immuno. 2002) を実験動物中央研究所と共同開発したことにより、疾患モデルマウスの作製が可能となった。更に申請者ら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にヒト接着因子やサイトカインを産生する遺伝子改変マウス(ヒト環境マウス)の作製にも取り組んだ。なかでも、Notch シグナルは様々な細胞の運命・分化決定に重要であり、ある種のがんの発生や進行にも深く関与していることに着目し、Notch のリガンドである Jagged 1 を骨芽細胞に発現するマウス (NOGJ) を開発した (Exp. Hematol. 2014)。そして、NOGJ マウスにヒト骨髄腫細胞を移植すると腫瘍の生着が向上することを見出した (Blood Cancer J. 2017)。

多発性骨髄腫は形質細胞ががん化した代表的な造血器悪性腫瘍であり、近年の新薬開発により予後の改善が得られているものの、未だに不治の病とされている。骨髄腫細胞は、骨髄内の環境構成細胞とネットワークを形成し、自らの生存・増殖・進展を促す環境を構築していることが明らかとなってきた (Nat Rev Cancer, 2007)。申請者らは、ヒト環境マウスモデル作製のノウハウを応用することで、トランスクリプトームシーケンスにより骨髄腫細胞とニッチ側の遺伝子を判別し、*in vivo* におけるがん ニッチ間相互作用を定量的に同定するというこれまでにない手法を確立したので、ニッチを標的とするがん治療の開発を目指した本研究計画を立案した。

2. 研究の目的

近年、がん環境 (ニッチ) を標的としたがん治療が注目されている。多発性骨髄腫は病態が非常に複雑な不治の病であり、ニッチにおける骨髄腫細胞の動態が治療抵抗性や再発の根本原因である。本研究は、申請者らがすでに確立したヒト多発性骨髄腫モデルマウスを利用して、ヒト由来骨髄腫細胞と宿主であるマウス環境との「がん ニッチ相互作用 (インタラクトーム)」を定量的に同定し、多発性骨髄腫の病態におけるその相互作用の役割を実験的に明らかにすることによって、治療標的を特定することを目的とする。本研究の遂行により、生体環境におけるヒトがん細胞とニッチの相互作用の分子の実態を解明する画期的な動物モデルが確立され、革新的ながん治療戦略につながる成果が得られることが期待できる。

3. 研究の方法

申請者らが確立した多発性骨髄腫モデルマウスを用いて、ニッチを介した Notch シグナルの活性化が骨髄腫細胞の増殖と薬剤耐性獲得に果たしている役割を解明するとともに、インタラクトーム解析により骨髄腫細胞とニッチの *in vivo* での相互作用を定量的に同定する。そして、多発性骨髄腫の病態の特定や薬剤感受性及び抵抗性獲得を制御している分子シグナルを *in vivo*, *in vitro* の機能解析により明らかにし、治療標的を特定する。最終的には、骨髄腫患者の細胞を移植して作製した患者特異的多発性骨髄腫マウスを用いて、標的分子シグナルを遮断した場合の抗腫瘍効果を判定する。本研究では、多発性骨髄腫モデルをプロトタイプに利用して、がん細胞とニッチの相互作用を標的とした先端的がん治療戦略の開発を目指す。

4. 研究成果

(1)ニッチを介した Notch シグナル活性化の骨髄腫細胞増殖及び薬剤抵抗性獲得における分子メカニズムの特定

これまでの実験から、ヒト Jagged1 を骨芽細胞 (ニッチ) に発現する NOGJ マウスでは骨髄腫細胞の生着が顕著に向上しており、骨髄腫治療薬であるボルテゾミブを投与した場合に、治療抵抗性を示すことを確認しており、ニッチによって誘導される Jagged1-Notch シグナリング活性化がボルテゾミブ抵抗性獲得に必要な不可欠であることが示唆された。申請者らはこの抵抗性獲得のメカニズムとして MARCKS (myristoylated alanine-rich C-kinase substrate) に注目した。MARCKS は protein kinase C (PKC) によってリン酸化を受ける基質蛋白質として知られており、多発性骨髄腫を含めた様々な腫瘍において過剰発現していることが報告されているが、がんの病態にどのように関わっているかは明らかになっていなかった。*in vitro* においてボルテゾミブ投与により多発性骨髄腫細胞株 U266 の MARCKS 発現と活性化が抑制されたが、興味深いことに Jagged1 のコーティングされたプレートを用いて培養した系ではボルテゾミブ投与下でも MARCKS 活性化は維持された (図 1 上)。この結果から、ボルテゾミブ耐性に Notch 活性化と PKC 経路が関わることを示唆された。また、PKC 阻害剤投与により、骨髄腫細胞株において Jagged1 により維持されている MARCKS 活性化が有意に抑制されることを見出した (図 1 下左)。更には、siRNA により MARCKS 発現抑制された骨髄腫細胞株 U266 のボルテゾミブ投与下でのゼノグラフトマウスモデルにおける生着率を検証したところ、コントロール群と比較して、有意に生着率が低

下した。以上から、申請者らはニッチ細胞によって誘導される Jagged1-Notch シグナリングが PKC を活性化し、続いて MARCKS をリン酸化することで骨髄腫細胞の生存とボルテゾミブ耐性誘導に関わっていることを初めて見出した(図1下右)(Blood Cancer J. 2017)。更に、PKC 阻害剤による PKC シグナル経路の抑制が、Notch シグナル活性化によって誘導される薬剤耐性の克服に導きうる可能性についても見出した。以上の解析結果をまとめ、2017 年に査読付き論文として Blood Cancer J に公表した

(2) インタラクトーム解析によるがん ニッチ間相互作用の同定

多発性骨髄腫細胞とニッチの間で特異的に起こっている相互作用を解析するために、異種移植モデルのインタラクトーム解析を行うことで、ヒト骨髄腫細胞側とマウスのニッチ側の遺伝子発現をそれぞれの塩基配列の違いから判別し、定量化して得られる発現プロファイルと、公共のタンパク相互作用データベースの情報を結合することで、がんニッチにおける相互作用全体の包括的解析を行った(図2)。特に、ボルテゾミブ投与群と非投与群のインタラクトーム解析を比較することで、ボルテゾミブ投与によりがん ニッチ間に誘導されるプロファイルの変化について注目した。インタラクトーム解析は受容体依存性を縦軸、リガンド依存性を横軸とし、相互作用を“がん細胞 がん細胞”、“ニッチ ニッチ”、“がん ニッチ”、“ニッチ がん”の4象限に落とし込み解析を行った。特徴として、多くの強い相互作用は“ニッチ ニッチ”象限、“ニッチ がん”象限で認められた。興味深い点として、ボルテゾミブ投与により、“ニッチ ニッチ”象限から“がん ニッチ”象限に移動する相互作用を9つ同定した(PDGF β -PDGFR β 、SEMA3A-NRP1、EPHB1-EFNB1、LAMA2-DAG1、IFN β -IFNAR2、IFN γ -IFNGR1、IFN γ -IFNGR2、GDF5-BMPR2、GDF5-BMPR1A)(図2)。

(3) インタラクトーム解析で得られた結果の機能解析

ボルテゾミブ投与群と非投与群を比較したインタラクトーム解析にてボルテゾミブ投与により“ニッチ ニッチ”象限から“がん ニッチ”象限への移動を認めた9つの相互作用の内、“SEMA3A-NRP1”の相互作用に着目した。セマフォリンは、当初発生段階の神経軸索伸長因子として発見された分子群である。近年、セマフォリンの機能解析により、セマフォリンの活性は、神経発生以外にも免疫細胞の調節や血管新生、腫瘍の増殖・生存・浸潤・転移、骨代謝等多岐に渡ることが判明してきた(Cancer Cell. 2012)。特にセマフォリン 3A (SEMA3A)は上手に受容体を使い分けながら、腫瘍の組織型によって増殖や生存、遊走能を正にも負にも制御することが報告されている(Oncotarget. 2014)。しかし、何故この組織間の反応の差が生じるかについては未だ解明されていないのが現状である。そのため、セマフォリン 3A とその受容体ニューロピリン 1(NRP1)の相互作用と、ボルテゾミブのような骨髄腫治療薬に対する薬剤耐性との関連を明らかにすることを目標とした。

1 まず公共データベースにおいて開示されているマイクロアレイデータ GSE6477、GSE13591 を用いて、多発性骨髄腫患者の病態伸展に伴う SEMA3A 発現変動について解析したところ、特徴としては多発性骨髄腫の前がん病変ともされる意義不明の単クローン性高グロブリン血症(MGUS)や無症候性骨髄腫において発現が上昇するものの、更に症候性から再発・難治性の病態に進展すると発現低下を認めることから、SEMA3A は多発性骨髄腫伸展の初期段階において重要な因子であることが示唆された(図3)。

2 SEMA3A は分泌因子であり、分泌ソースとして多発性骨髄腫細胞、骨髄ストローマ細胞、またはその他の骨髄微小環境構成因子の可能性が考えられるが、その主要な供給源としてまずは多発性骨髄腫細胞に注目して検証した。まず初めに代表的な多発性骨髄腫細胞株 10 種における SEMA3A 蛋白のベースラインの発現をウェスタンブロットにより確認したところ、全ての細胞株で SEMA3A 発現を認め、そしてそれぞれの細胞株で活性型と不活性型と思われる SEMA3A バンドも認めた。次にボルテゾミブ投与後の骨髄腫細胞内の SEMA3A 発現変動を確認するために代表的な多発性骨髄腫細胞株である RPMI-8226、MM.1S、U266 を用いて、ボルテゾミブ投与後の経時的な発現変動について TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法で解析したが、投与後数時間後でコントロールと比較して 1.3~1.4 倍の軽微な発現上昇を認めた。ウェスタンブロットでも RPMI-8226、KMS-11、OPM2 においてボルテゾミブ非投与群と比較してボルテゾミブ投与群において活性型 SEMA3A 発現の上昇を認めた。次に実際にボルテゾミブ投与が多発性骨髄腫細胞株からの SEMA3A 分泌上昇を誘導するか培養上清の ELISA にて解析したが、ボルテゾミブ投与群・非投与群間で培養上清中の SEMA3A 濃度に有意な差は見られなかった。以上から、ボルテゾミブによる骨髄腫細胞内の SEMA3A 発現誘導は軽微に認められるものの、培養上清中の濃度上昇までの効果はないことから、骨髄腫細胞はニッチ内での SEMA3A の主要な供給源ではないと考えられた。

3 上記の解析から、SEMA3A-NRP1 の相互作用の内、ニッチ側の SEMA3A によって誘導される効果がボルテゾミブ耐性において重要ではないかと考えた。ヒト骨髄ストローマ細胞株に対してリコンビナント SEMA3A を投与したところ、CellTiter-Glo 解析において濃度依存性、または時間依存性に細胞増殖への影響は認められなかった。しかしながら、多発性骨髄腫細胞株 KMS-11 と HS-5 の共培養系において、CellTiter-Glo 解析においてリコンビナント SEMA3A は濃度依存性に両細胞株の増殖を抑制した。現在はこの増殖抑制効果のメカニズムについて解析を進める予定である。多発性骨髄腫の薬剤耐性メカニズムの中で細胞接着を介した耐性メカニズムも重要とされているが、SEMA3A からのシグナルが骨髄腫細胞とニッチ間の細胞接着を“切り離す”ことによって細胞増殖の autocrine loop を断ち切る可能性を想定している。申請者らはリコンビナント SEMA3A 投与により、HS-5 において PI3K-Akt 経路と NF B 経路が活性化することをウェスタンブロット解析にて見出し、この経路の下流で細胞接着因子の発現が制御されているか、そして最終的には SEMA3A のニッチ側から誘導するボルテゾミブ感受性調節の詳細はメカニズムの解明に迫りたいと考えている。

図1: MARCKSによるボルテゾミブ耐性メカニズム

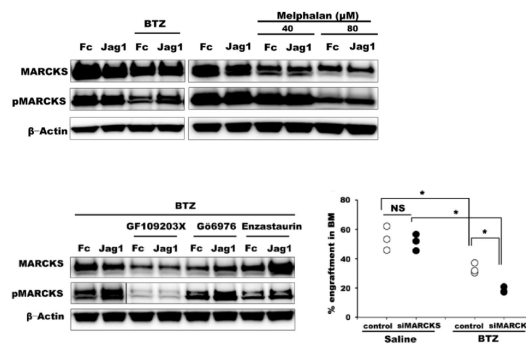


図2: 多発性骨髄腫の病態進展に伴うSEMA3A発現の変化

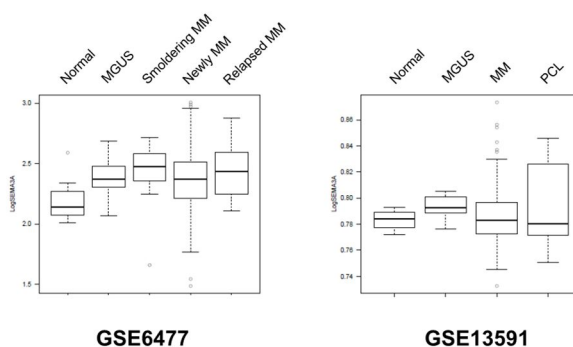
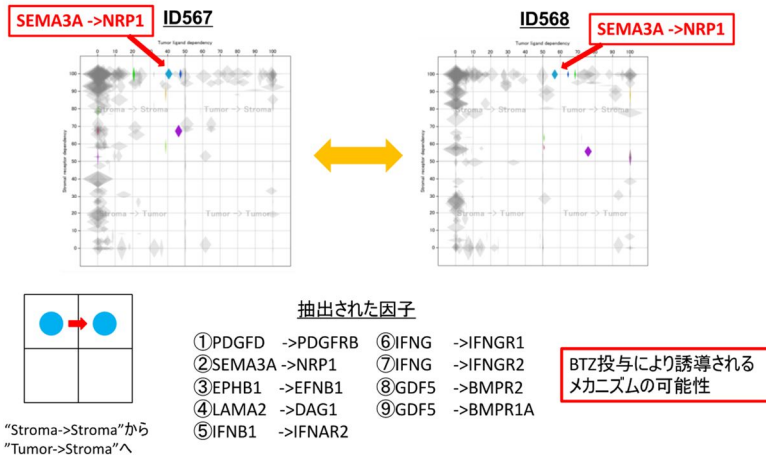


図3: BTZ投与の有無に伴うインタラクトームの変化



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Ibrahim AA, Yahata T, Muguruma Y, Miyata T, Ando K.	4. 巻 516(2)
2. 論文標題 Blockade of plasminogen activator inhibitor-1 empties bone marrow niche sufficient for donor hematopoietic stem cell engraftment without myeloablative conditioning.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 500-505
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.06.076	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kawai H, Matsushita H, Aoyama Y, Matsui K, Onizuka M, Ando K	4. 巻 108
2. 論文標題 Correction to: Dysplastic features seen in a patient with acute myeloid leukemia harboring the KMT2A-TET1 fusion gene	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Hematol.	6. 最初と最後の頁 232
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11007/s12185-018-2476-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tsuma-Kaneko M, Sawanobori M, Kawakami S, Uno T, Nakamura Y, Onizuka M, Ando K, Kawada H	4. 巻 26;8(1)
2. 論文標題 Iron removal enhances vitamin C-induced apoptosis and growth inhibition of K562 leukemia cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 17377
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/s2352-3026(18)30155-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Amaki J, Sekiguchi T, Hiraiwa S, Kajiwra H, Kawai H, Ichiki A, Nakamura N, Ando K	4. 巻 108
2. 論文標題 Three case of spontaneous splenic rupture in malignant lymphoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Hematol.	6. 最初と最後の頁 647-651
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/12185-018-2523-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Muguruma Y, Yahata T, Warita H, Hozumi K, Suzuki R, Ito M, Ando K.	4. 巻 7
2. 論文標題 Jagged1-induced Notch activation is responsible for the acquisition of bortezomib resistance in myeloma cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Blood Cancer J.	6. 最初と最後の頁 1007-1012
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41408-017-0001-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yahata T, Ibrahim AA, Muguruma Y, Mesut Eren, Alex, Watanabe N, Kaneko S, Dan T, Douglas E. Vaughan, Miyata T, Ando K.	4. 巻 130
2. 論文標題 TGF-b-induced intracellular PAI-1 is a critical regulator of haematopoietic stem and progenitor cell motility in the niche.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Blood,	6. 最初と最後の頁 2283-2396
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood-2017-02-767384	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Muguruma Y, Hozumi K, Warita H, Yahata T, Uno T, Ito M and Ando K.	4. 巻 1002
2. 論文標題 Maintenance of bone homeostasis by Dll1-mediated Notch signaling.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Cell Physiol.,	6. 最初と最後の頁 25647
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.25647	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 9.Kametani Y, Katano I, Miyamoto A, Kikuchi Y, Ito R, Muguruma Y, Tsuda B, Habu S, Tokuda Y, Ando K, Ito M.	4. 巻 12
2. 論文標題 NOG-hIL-4-Tg, a new humanized mouse model for producing tumor antigen specific IgG antibody by peptide vaccination.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0179239.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0179239	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawai H, Matsushita H, Kawada H, Ogawa Y, Ando K.	4. 巻 56
2. 論文標題 The successful use of rivaroxaban in the prevention of thromboembolism in a patient with antithrombin deficiency in the perioperative period	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int Med.	6. 最初と最後の頁 2339-2342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.8487-16	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計5件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Abd Aziz Ibrahim, 八幡 崇、安藤 潔
2. 発表標題 Pharmacological Inhibition of PAI-1 Empties BM Niche Without Myeloablative Conditioning
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kaito Harada, Takashi Yahata, Kiyoshi Ando
2. 発表標題 Bone Marrow Adipocyte-Derived PAI-1 As a Negative Regulator of Hematopoietic Regeneration
3. 学会等名 Annual Meeting of the ASH (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木利貴央、川井英嗣、天木惇、川上翔平、古谷大輔、小川吉明、川田浩志、安藤潔
2. 発表標題 移植適応多発性骨髄腫に対するダラツムマブ+ボルテゾミブ+デキサメサゾン併用療法の有効性の検討
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 八幡崇、Abd Aziz Ibrahim, 仲一仁、宮田敏男、安藤潔
2. 発表標題 PAI-1活性の阻害による慢性骨髄性白血病幹細胞の治療高感受性
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安藤潔
2. 発表標題 濾胞性リンパ腫—最近の動向
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	八幡 崇 (YAHATA TAKASHI) (10398753)	東海大学・医学部・准教授 (32644)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------