

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09913

研究課題名(和文) 多発性骨髄腫の骨病変におけるIL-34の作用機序解明と治療応用に向けた研究

研究課題名(英文) Studies on the functions of IL-34 and its therapeutic application for multiple melanoma-relative osteolytic disease

研究代表者

石川 浩三 (Ishikawa, Kozo)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・客員研究員

研究者番号：20624795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫(Multiple Myeloma：MM)は骨破壊病変を主徴候とする。CSF-1受容体の新規のリガンドであるIL-34と骨破壊病態の関与が近年注目されている。我々は、MMモデルマウスの実験系で、骨髄の炎症性サイトカインや間質細胞がMM細胞のIL-34発現を増強することを示した。またIL-34をknockdownしたところ破骨形成が阻害されることを示した。MM患者の骨髄検体においてCD138+細胞のIL-34発現性は様々であったが、破骨形成誘導能はIL-34中和抗体により抑制された。以上からMM細胞に起因するIL-34はMM患者の骨破壊治療の有効な標的となる可能性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性骨髄腫は、高齢者の罹患率が高く骨破壊を主徴候とする造血器腫瘍の一つであるが、それに対する有効な治療薬が未だ開発されていない。我々は、腫瘍の増悪因子であるTAMの分化に関わり、幾つかの悪性腫瘍(肺癌、卵巣癌、腎臓癌など)の予後悪化への寄与が考えられるIL-34が、骨破壊病変に関与することを仮定し、実験系や臨床研究にて示した。このことは骨破壊病態に対する治療標的の開発として意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Multiple myeloma (MM) is a hematological malignancy and causes debilitating osteolytic disease. Interleukin-34 (IL-34), a ligand of CSF-1 receptor, might contribute to osteoclast differentiation. In this study, we identified IL-34 as an osteoclastogenic cytokine accelerates osteolytic disease in MM, which was enhanced by proinflammatory cytokines or bone marrow stromal cells. MM-derived IL-34 promoted osteoclast formation from mouse BM cells in vitro. Silencing of IL34 by small interfering RNA impaired osteoclast formation in vitro and attenuated osteolytic disease in vivo. In BM aspirates from MM patients, the expression levels of IL-34 in CD138+ populations vary among patients. MM-derived IL-34 promoted osteoclast formation from human monocytes, which was reduced by a neutralizing antibody against IL-34. Taken together, this study describes MM-derived IL-34 may enhance osteolysis and suggesting IL-34 as a potential therapeutic target on osteoclastogenesis in MM patient.

研究分野：がん免疫療法

キーワード：多発性骨髄腫 骨溶解病変 IL-34 破骨細胞形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫 (Multiple Myeloma : MM) は多様かつ重篤な臨床的特徴を示し、高齢者に罹患率が高い造血器系腫瘍である。MM の主徴候である骨破壊病変は骨痛、脊椎圧迫骨折 (脊髄圧迫) による知覚障害、運動麻痺や転倒骨折など骨関連事象 (SRE: Skeletal-related events) がもたらされ、QOL の低下につながっており、副作用の少ない有効な治療法開発が急務である。

骨破壊病態を担う破骨細胞の分化・増殖因子として、RANKL とともに M-CSF が知られている (Lauta et al. Cancer 2003) が、近年、M-CSF と受容体を共有する新規リガンド (Lin et al. Science 2008) として IL-34 が注目されている。

IL-34 は多種類のがん細胞で発現が報告され、抗癌剤耐性化や周囲微小環境の TAM (腫瘍関連マクロファージ) の分化誘導に関わることが示されている (Baghdadi et al. Cancer Research 2016)。一方で、造血器系腫瘍に関しては一部 (Komohara et al. J Clin Exp Hematop, 2018) を除いて殆ど報告がなされていない。我々の先行研究では、IL-34 がマウス (MOPC315.BM) 及びヒト (KMS-11、OPM2、TSPC1) の MM 細胞において産生されることを確認しており、MM 細胞由来の IL-34 が破骨病態形成に関わるか否か解明を試みた。

2. 研究の目的

本研究では IL-34 が多発性骨髄腫 (Multiple Myeloma : MM) の骨破壊病態に重要に寄与するか否か検証する。即ち、MM 細胞が IL-34 の産生を介して破骨細胞分化を誘導し、骨破壊病変を引き起こすか否か、さらにその機序を検証する。具体的にマウス MM モデルおよびヒト臨床検体において、基礎研究および臨床研究の側面から解析を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

IL34 knockdown MOPC315.BM 細胞株の作製

IL34-specific siRNA をレンチウイルスベクター-pLenti-PGK-V5-Luc Neo (W632-2) を用いて、MOPC315 細胞内に遺伝子導入し、恒久的に IL-34 発現を阻害する細胞株 MOPC315.BM^{IL34KD} を作製した。対照株として scramble siRNA を遺伝子導入した MOPC315.BM^{control} を作製した。IL-34 の遺伝子 knockdown 効率は 80% 以上であった。

定量リアルタイム PCR

PureLink™ RNA Micro Kit (Invitrogen) により RNA 抽出を行った後、cDNA を合成し、KAPA SYBR Fast qPCR Kit (Nippon Genetics) により目的遺伝子の増幅を行い、StepOne real-time PCR 装置 (Applied Biosystems) により解析を行った。

FACS 解析および細胞分取

骨髄細胞に含まれる MM 細胞を陽性マーカー CD138 (BioLegend)、低発現マーカー CD45R (BioLegend)、陰性マーカー CD19 (BioLegend) を用いて、FACS CANT にて検出した。細胞分取は SH800 Cell Sorter 装置 (Sony Biotechnology) を用いて行った。

MM 細胞の細胞内 IL-34 発現検出は、抗 IL-34 抗体 (Novus Biologicals) により行った。データは FlowJo software (FlowJo, USA) により表現している。

破骨細胞分化同定アッセイ

マウス骨髄細胞から間質細胞 (BMSC) をプレート接着法により分離し、破骨細胞前駆細胞 (CD14 陽性) とともにトランスウェルプレート (Corning Incorporated) の下層に、MM 細胞 (MOPC315.BM 株) を上層に播種させ、共培養による破骨細胞分化誘導アッセイを行った。

臨床骨髄液サンプルのうち、IL-34 高発現株および低発現株を同じくトランスウェルプレートの上層に播種し、健康人の単核球 (CD14 陽性) と共培養し上記のアッセイを行った。破骨細胞の同定は TRAP 染色キット (TRACP & ALP 187 double-stain kit, タカラ) を用いた。

マウス多発性骨髄腫 (Multiple Myeloma : MM) モデルの作製

ヒト MM と類似するマウス MM 株として MOPC315.BM 細胞を用いた。

6~8 週齢の野生型 BALB/c マウス (SLC 社) 2×10^5 個の Luc+GFP+MOPC315.BM 細胞 (Scramble および IL34Knockdown 株) を尾静脈から移植した。投与後、40~45 日後後肢麻痺症状が認められた。

発光イメージングによる MM 細胞のホーミング (帰巢) アッセイ

Luc+GFP+MOPC315.BM 細胞を移植後 45 日目に、In vivo イメージングを行った。測定 5 分前に発光基質 Luciferin (150 mg/kg, Avidin Ltd, Szeged, Hungary) を尾静脈投与し、発光シグナルを MM 細胞のホーミングとして IVIS スペクトラムイメージング装置 (Spectrum-FL-TKHD, Caliper Life Sciences Ltd., Hopkinton, USA) にて測定した。データ解析は Living Image software (Caliper Life Sciences Ltd., Hopkinton, USA) を用いて行った。

μCT を用いた骨断層イメージングおよび骨量定量アッセイ

マウス MM モデルの骨破壊病変の評価として、全身麻酔下に Latheta LCT200 system (Hitachi Aloka Medical, 東京)を用いて、24-μm 厚の断層像を集積し、頭蓋骨、腰椎第 6~7 椎体、大腿骨について、骨量定量とともに Amira 5.4.1 software (Maxnet Co., Tokyo)を用いて 3D 画像構築を行った。

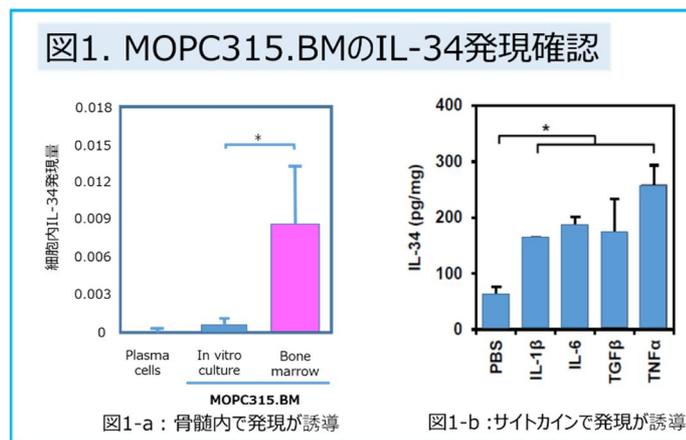
臨床サンプル（骨髄吸引液）の解析

北海道大学医学研究院血液内科学教室との臨床研究下に、MM と診断された患者様 15 症例の骨髄吸引サンプルを御提供して頂き、骨髄液と骨髄細胞について上記の RT-PCR、FACS 解析さらに破骨細胞分化アッセイを行った。

4. 研究成果

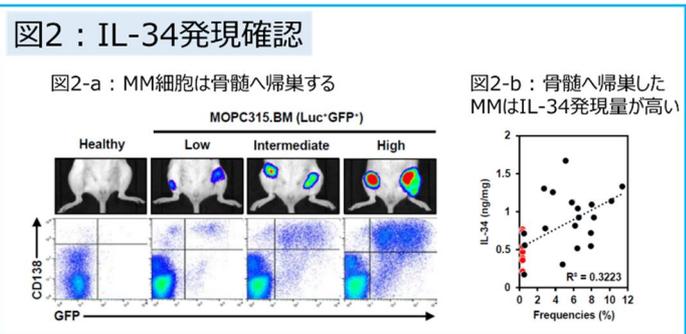
マウス MM 細胞 (MOPC315.BM) の IL-34 発現の確認

BALB/c マウスの骨髄細胞から正常な形質細胞 (CD19 陰性 CD138 陽性) と B リンパ球 (CD19 陽性 CD138 陰性) を取り出し、MOPC315.BM との IL-34 発現量を qRT-PCR により比較したところ、MOPC315.BM が有意に高い発現を示した。また、BALB/c マウス移植モデルの骨髄より回収した MOPC315.BM 株は移植前と比べ IL-34 発現量が顕著に高いことが分かった (図 1-a)。また、培養下で IL-1β、IL-6、TGFβ、TNFα の刺激により IL-34 は発現が促進された (図 1-b)。



マウス MM 細胞 (MOPC315.BM) の IL-34 発現が骨髄内で増加することを確認

Luc+GFP+MOPC315.BM 株を BALB/c マウスに移植し、45 日目に発光イメージングにより大腿骨へ帰巢したことを確認した後、大腿骨骨髄液を FACS 解析したところ MM 細胞の帰巢が確認され (図 2-a) さらに FACS 分取した MM 細胞に IL-34 発現を認めた (図 2-b)。



MM 細胞由来の IL-34 は、CSF-1R を介して培養下で破骨細胞形成を促進する。

トランスウェルプレートの下層と上層にそれぞれ、破骨細胞前駆細胞と MOPC315.BM を播種し共培養したところ、RANKL 添加により破骨細胞が分化誘導された。それに伴い破骨化誘導遺伝子である *Trap*、*Dc-stamp*、*Oc-stamp*、*Cathepsin K* の発現が亢進された。この現象は抗 IL-34 中和抗体添加や GW2586 (CSF-1R 阻害剤) 添加下で拮抗され、さらに、MOPC315.BM IL34KD 株においても抑制された。

骨髄微小環境内での BMSCs と MM 細胞の相互作用の解析

BMSC (骨髄間質細胞) と MOPC315.BM の共培養により、培養上清中に IL-3、IL-6、TNFα、IL-34 濃度が増加し、MOPC315.BM 細胞内で *Il3* と *Il34* 遺伝子が、BMSC 細胞内で *Il6*、*Tnfa*、*Rankl* の遺伝子発現が増加した。さらに、MOPC315.BM IL34KD 株において同一のアッセイを行ったところ、同じく IL-3、IL-6、TNFα の発現量は亢進した。これより、上記の炎症性サイトカインと IL-34 の作用に相関性はないことが分かった。

マウス MM モデルにおいて IL-34 は骨破壊病変を促す

MOPC315.BM Control 株 および MOPC315.BM *IL34KD* 株はともに全身の骨へ帰巢し、IL-34 の帰巢への関与は否定された(図 3-a)。一方で、骨破壊の程度は MOPC315.BM *IL34KD* 株では有意に弱かった(図 3-b)。また、血清中 Ca²⁺濃度は MOPC315.BM^{Control} では顕著に上昇するが MOPC315.BM^{*IL34KD*} では有意に低かった(図 3-c)。以上から IL-34 が骨溶解病変促進に重要に関与することが示された。

図3：IL-34は骨破壊病変への関与（マウスMMモデル）

図3-a：破骨病変

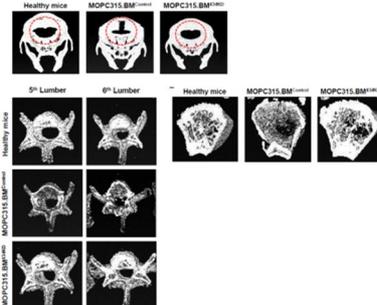


図3-b：骨量解析

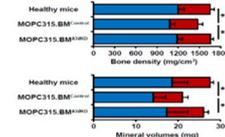
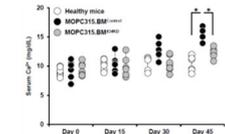


図3-c：血清中Ca²⁺



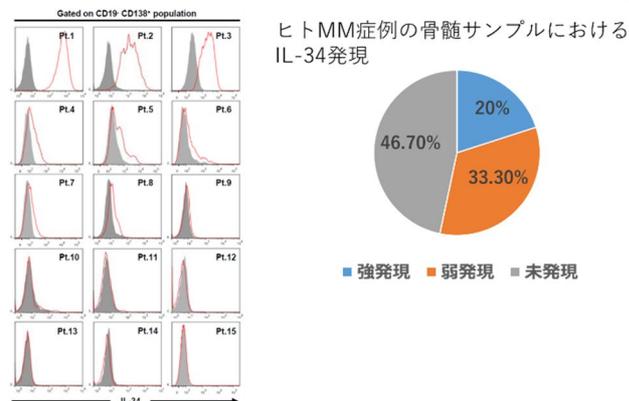
ヒト MM 細胞株においてサイトカイン刺激により IL-34 発現が促進される

ヒト MM 細胞株である IM-9、KMS-11、OPC、OPM-2、U226B1 において、マウス MM 株と同様に、IL-1β、IL-TGFβ、TNFα による IL-34 発現促進が認められた。

ヒト MM 症例の骨髄サンプルにおける IL-34 発現

続いて 15 症例の骨髄液サンプルから CD19⁻ CD138⁺ 細胞を分取して IL-34 発現解析を行ったところ、3 例 (20%) で強発現、5 例 (33.3%) で弱発現、7 例 (46.7%) で検出されなかったことから個体差が顕著に認められた(図 4)。

図4：人MM症例の骨髄サンプルにおけるIL-34発現



ヒト MM 臨床サンプルの破骨細胞誘導について

臨床サンプルの内 IL-34 強発現株または低発現株を健常人末梢血由来 CD14⁺ 単核球 (破骨細胞前駆細胞) と共培養したところ強発現株でのみ破骨細胞分化誘導が確認され、低発現株では誘導されなかった。また IL-34 高発現株と共培養した CD14⁺ 単核球では破骨細胞関連遺伝子である DC-STAMP と OC-STAMP の発現が亢進されていた。

図5：ヒトMM臨床サンプルでIL-34は破骨細胞誘導に関与する

図5-a：破骨細胞分化誘導能

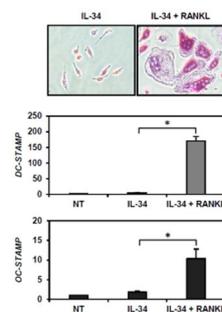
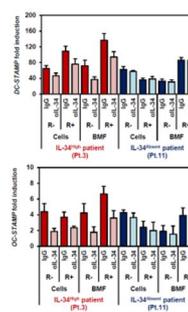


図5-b：DC-STAMP と OC-STAMP の発現



以上の結果から、MM 細胞において、IL-34 は骨髄微小環境のサイトカイン (TNF α 、IL-6、IL-1 β) や BMSC、さらに骨髄内環境の様々な活性化因子より発現が誘導され、CSF-1 受容体依存性に破骨細胞分化を促し、骨リモデリング調節の破綻をもたらすことが推測される。一方で、MM 症例の骨髄サンプルの IL-34 発現量には個体差が大きく、骨病変と IL-34 の相関性はなかったが、IL-34 強発現株に破骨細胞分化誘導能が確認された。このことから、実際の破骨病態においても IL-34 は何らかの破骨関連作用を及ぼしていると考えられる。IL-34 は、従来の破骨病変治療薬と異なり、正常な組織の生理機能への影響が少ない分子である観点から、今後破骨病変緩和の治療標的として大きく期待できる。

< 引用・参考文献 >

Bianchi G et al. Pathogenesis beyond the cancer clone(s) in multiple myeloma. *Blood*.

2015;125(20):3049-3058.

Paiva B, van Dongen JJ, Orfao A. New criteria for response assessment: role of minimal residual disease in multiple myeloma. *Blood*. 2015;125(20):3059-3068.

Lin H, Lee E, Hestir K, et al. Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science*. 2008;320:807-811.

Baghdadi M, Umeyama Y, Hama N, et al. Interleukin-34, a comprehensive review. *J Leukoc Biol*. 2018;104(5):931-951.

Chen Z, Buki K, Vääräniemi J, et al. The critical role of IL-34 in osteoclastogenesis. *PLOS ONE*. 2011; 6(4):e18689.

Baud'huin M, Renault R, Charrier C, et al. Interleukin-34 is expressed by giant cell tumours of bone and plays a key role in RANKL-induced osteoclastogenesis. *J. Pathol*. 2010;221(1):77-86.

Boström EA, Lundberg P. The newly discovered cytokine IL-34 is expressed in gingival fibroblasts, shows enhanced expression by pro-inflammatory cytokines, and stimulates osteoclast differentiation. *PLOS ONE*. 2013;8(12):e81665.

Cioce M, Canino C, Goparaju C, et al. Autocrine CSF-1R signaling drives mesothelioma chemoresistance via AKT activation. *Cell Death Dis*. 2014;5:e1167.

Ségaligny AI, Mohamadi A, Dizier B, et al. Interleukin-34 promotes tumor progression and metastatic process in osteosarcoma through induction of angiogenesis and macrophage recruitment. *Int J Cancer*. 2015;137(1):73-85.

Baghdadi M, Wada H, Nakanishi S, et al. Chemotherapy-induced IL34 enhances immunosuppression by tumor-associated macrophages and mediates survival of chemoresistant lung cancer cells. *Cancer Res*. 2016;76(20):6030-6042.

Zhou SL, Hu ZQ, Zhou ZJ, et al. miR-28-5p-IL-34-macrophage feedback loop modulates hepatocellular carcinoma metastasis. *Hepatology*. 2016;63(5):1560-1575.

Franzè E, Dinallo V, Rizzo A, et al. Interleukin-34 sustains pro-tumorigenic signals in colon cancer tissue. *Oncotarget*. 2017;9(3):3432-3445.

Raggi C, Correnti M, Sica A, et al. Cholangiocarcinoma stem-like subset shapes tumor-initiating niche by educating associated macrophages. *J Hepatol*. 2017;66(1):102-115.

Baghdadi M, Endo H, Takano A, et al. High co-expression of IL-34 and M-CSF 503 correlates with tumor progression and poor survival in lung cancers. *Sci Rep*. 2018;8(1):418.

Hofgaard PO, Jodal HC, Bommert K, et al., A novel mouse model for multiple myeloma (MOPC315.BM) that allows noninvasive spatiotemporal detection of osteolytic disease. *PLOS ONE*. 2012;7(12):e51892.

de Haart SJ, van de Donk NW, Minnewa MC, et al. Accessory cells of the microenvironment protect multiple myeloma from T-cell cytotoxicity through cell adhesion-mediated immune resistance. *Clin Cancer Res*. 2013;19(20):5591-5601.

Komohara Y, Noyori O, Saito Y, et al. Potential anti-lymphoma effect of M-CSFR inhibitor in adult T-cell leukemia/lymphoma. *J Clin Exp Hematop*. 2018;58(4):152-160.

Yasmin R, Siraj S, Hassan A, et al. Epigenetic regulation of inflammatory cytokines and associated genes in human malignancies. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:201703.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Baghdadi Muhammad, Ishikawa Kozo, Nakanishi Sayaka	4. 巻 3
2. 論文標題 A role for IL-34 in osteolytic disease of multiple myeloma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 541 ~ 551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2018020008	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Komohara Yoshihiro, Noyori Osamu, Saito Yoichi, Takeya Hiroto, Baghdadi Muhammad, Kitagawa Fumihito, Hama Naoki, Ishikawa Kozo, Okuno Yutaka, Nosaka Kisato, Seino Ken-ichiro, Matsuoka Masao, Suzu Shinya	4. 巻 58
2. 論文標題 Potential anti-lymphoma effect of M-CSFR inhibitor in adult T-cell leukemia/lymphoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Clinical and Experimental Hematopathology	6. 最初と最後の頁 152 ~ 160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3960/jslrt.18034	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Muhammad Baghdadi, Hiraku Endo, Atsushi Takano, Kozo Ishikawa	4. 巻 8
2. 論文標題 High co-expression of IL-34 andM-CSF correlates with tumor progression and poor survival in lung cancers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 1 : 418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-18796-8.	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 該当する

1. 著者名 Han N, Baghdadi M, Ishikawa K	4. 巻 5
2. 論文標題 Enhanced IL-34 expression in Nivolumab-resistant metastatic melanoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 5 : 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-018-0060-2. eCollection 2018	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石川浩三
2. 発表標題 IL-34 promotes osteoclast formation and enhances bone disease in multiple myeloma
3. 学会等名 第21回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2017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	清野 研一郎 (Seino Kenichirou) (20312845)	北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授 (10101)	