

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08841

研究課題名(和文) 多発性骨髄腫の微小環境の病態解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenesis of the bone marrow microenvironment in multiple myeloma and treatment strategies

研究代表者

八尾 尚幸 (Yao, Hisayuki)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：90835282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄には血球細胞の生存や分化、増殖を支持する微小環境が存在しており、多発性骨髄腫患者骨髄において、骨髄微小環境が骨髄腫細胞の生存と増殖を支持し、化学療法後の微小残留病変や薬剤に対する耐性化を引き起こし、骨髄腫の完治を困難にしていると考えられる。また、高齢者での骨髄腫の罹患率が非常に高いことから、我々は加齢による骨髄微小環境の変化が骨髄腫細胞の生存や増殖に有利に働いていると考えた。我々は骨髄微小環境を構成する主要な細胞の一つである間葉系幹細胞の加齢性変化、また間葉系幹細胞による骨髄腫細胞の生存と増殖に及ぼす影響とそのメカニズムを明らかにするため解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性骨髄腫は特に高齢者で罹患率が高い疾患であり、わが国でさらに高齢化社会が進むとともに患者数の増加が予想される。また、骨髄腫細胞を標的とした化学療法に対して治療抵抗性を獲得し、再燃・再発を繰り返す症例も少なくない。さらに、骨髄腫は骨病変や腎不全など他の造血器腫瘍と比較して合併症が多く、合併症により日常生活動作が制限され、生活の質が低下する症例も多く見受けられる。このため、骨髄腫の治療抵抗性の分子機構を解明し、メカニズムに基づいた新たな治療法開発は喫緊の課題である。

研究成果の概要(英文)：The bone marrow microenvironment regulates the survival, differentiation, and proliferation of hematopoietic cells. In patients with multiple myeloma, the bone marrow microenvironment is thought to regulate the survival and proliferation of myeloma cells, which leads to minimal residual disease and drug resistance after chemotherapy, making complete cure of myeloma difficult. We hypothesized that aging alters the bone marrow microenvironment to favor the survival and growth of myeloma cells, because myeloma has a high incidence in the elderly. Therefore, we analyzed the age-related changes in mesenchymal stem cells, one of the major components of the bone marrow microenvironment, their effects on myeloma cell survival and proliferation, and their mechanisms.

研究分野：血液内科学

キーワード：多発性骨髄腫 骨髄微小環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫は抗体産生を役割とする形質細胞が腫瘍化した血液悪性腫瘍で、貧血、骨病変、腎不全などを呈する疾患である。近年、多発性骨髄腫の病態解明が進み、病態生理に基づいて開発された新薬が次々と登場し、大きな治療効果を上げている。治療薬が増えたことで患者の治療選択肢が増え、患者の予後は改善しているが、多発性骨髄腫を完治させるに至っていない。

骨髄には血球細胞の生存・増殖・分化を支持するニッチと呼ばれる微小環境が存在し、間葉系幹細胞はニッチを構成する細胞の一つである。骨髄腫患者の骨髄では、骨髄腫細胞が間葉系幹細胞に直接作用し、微小環境を形成していることが報告されている(Kumar S, et al. Leukemia 2003)。骨髄腫細胞は VLA-4 を発現し、間葉系幹細胞が発現する VCAM-1 に結合することで、間葉系幹細胞に直接接着している。また、骨髄腫細胞は VLA-4 を介して、間葉系幹細胞により産生されるタイプ コラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞外マトリックスにも結合している。骨髄腫細胞の間葉系幹細胞や細胞外マトリックスへの接着は、細胞周期亢進するシグナル経路や、抗アポトーシスタンパクを産生するシグナル経路を活性化することが知られている(Hideshima T, et al. Blood 2004)。骨髄腫細胞は生存や増殖を間葉系幹細胞が作る微小環境に依存していると考えられる。また、一般的に悪性腫瘍の罹患者の多くが高齢者により占められているが、骨髄腫ではその傾向が特に高く、骨髄腫の 50 歳未満の罹患率はわずか 1.6%であるが、50 歳以降は加齢に伴って罹患率が急激に高くなる。加齢が骨髄腫発症の大きなリスク因子であることは統計から明らかであり、加齢による変化が骨髄腫の発症と進展に深く関与していることが示唆される。我々は加齢による骨髄微小環境の変化が骨髄腫の発生や骨髄腫の化学療法後の微小残存病変や薬剤に対する耐性化に関与しているものと考えた。

2. 研究の目的

間葉系幹細胞はニッチを構成する細胞の一つで、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞などの細胞に分化できる多分化能を有していることに加え、造血幹細胞と相互作用することにより、造血幹細胞の動態に重要な役割を果たしている。間葉系幹細胞は様々な起源や分化段階にある細胞集団で、異なる遺伝子マーカーや異なる役割を持つヘテロな細胞集団である。これまで特定の細胞表面マーカーを持つ間葉系幹細胞として NG2 陽性間葉系幹細胞やレプチン受容体陽性間葉系幹細胞が報告されている。NG2 陽性間葉系幹細胞は細動脈ニッチを形成し、造血幹細胞の静止状態の維持に関与し、またレプチン受容体陽性間葉系幹細胞は骨髄洞ニッチを形成し、造血幹細胞の増殖に関与していることが知られている(Kunisaki et.al. Nature 2013、Zhou et.al. Cell Stem Cell 2014)。これまで正常造血における間葉系幹細胞の役割は多く報告されているが、間葉系幹細胞の加齢性変化と多発性骨髄腫細胞の生存や増殖、また、骨髄腫の抗癌剤耐性化や微小残存病変との関連性について十分に解明されていない。我々は、多発性骨髄腫の骨髄において、間葉系幹細胞の加齢性変化が骨髄腫細胞の生存と増殖に及ぼす影響とそのメカニズムを明らかにし、間葉系幹細胞を治療標的とした新規治療法の確立を目標として研究を行った。

3. 研究の方法

我々はマウス骨髄腫細胞株 5TGM1 細胞を C57BL6/KaLwRijHsd マウス (以下 KaLwRijHsd マウス) に移植して作製した骨髄腫マウスモデルを用いて解析を行った。5TGM1 細胞に蛍光タンパク monomeric Kusabira-Orange 1 (mK01) 遺伝子を導入し、mK01 を発現する 5TGM1-mK01 細胞を作製した。この 5TGM1-mK01 細胞を KaLwRijHsd マウスに移植し、骨髄内での 5TGM1-mK01 細胞の増

殖と進展について共焦点蛍光顕微鏡を用いて観察した。

KaLwRijHsd マウスは複数の遺伝子変異を認め、骨髄腫を発症する素因を持つマウスで、細胞株 5TGM1 は骨髄腫を発症した KaLwRijHsd マウスから樹立された細胞株である。5TGM1 細胞は KaLwRijHsd マウスへの生着を確認されており、野生型 C57BL/6 マウスへの生着は難しいことが知られている。これらマウスでの 5TGM1 細胞の生着率の違いは、骨髄微小環境の違いから生じていると考えた。また、我々は高齢の野生型 C57BL/6 マウスでは、若齢の野生型 C57BL/6 マウスと比較して 5TGM1 細胞の生着率が高いことを見出した(図 1)。高齢マウスで 5TGM1 細胞の高い生着

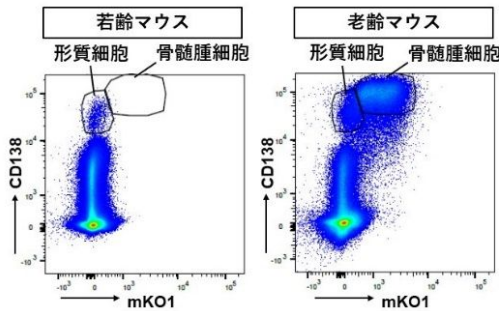


図1：マウス骨髄腫細胞株5TGM1細胞を移植した若齢マウスと高齢マウスの骨髄

率が認められた理由は、高齢マウスの骨髄微小環境が骨髄腫の生存や増殖に有利であるためと考えられた。間葉系幹細胞は骨髄微小環境を構成する主要な細胞集団であることから、我々は骨髄間葉系幹細胞に着目して研究を行った。我々はこれらマウスでの骨髄の間葉系幹細胞を確認し、単離した間葉系幹細胞から RNA を抽出して間葉系幹細胞の遺伝子発現を RNA シーケンス法で比較解析した。

4. 研究成果

KaLwRijHsd マウスに移植された 5TGM1-mK01 細胞は、KaLwRijHsd マウス骨髄内において増殖することをフローサイトメーターによる解析で確認した。また、共焦点顕微鏡による KaLwRijHsd マウス骨髄内の観察では、5TGM1-mK01 細胞が微小血管周囲に生着し、血管に沿って増殖・進展することを確認できた。骨髄の間葉系幹細胞の多くが血管周囲に存在していることが知られており、これらの間葉系幹細胞が骨髄腫細胞の増殖や進展を支持しているものと考えられた。また、血管周囲の間葉系幹細胞の多くが、CD45 陰性 Ter119 陰性 CD51 陽性 CD140a 陽性細胞分画に存在することが報告されており、この細胞分画に存在する間葉系幹細胞について解析を行った。

KaLwRijHsd マウスと高齢の野生型 C57BL/6 マウスでは若齢の野生型 C57BL/6 マウスと比較して、CD45 陰性 Ter119 陰性細胞分画中での間葉系幹細胞の割合が高いことが判明した(図 2)。骨

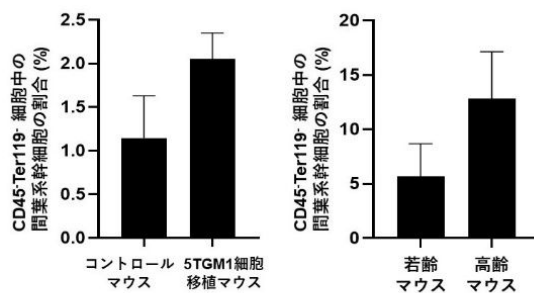


図2：(左図) 5TGM1細胞移植前後の間葉系幹細胞の割合 (右図) 若齢マウスと高齢マウスの間葉系幹細胞の割合

髄微小環境の加齢性変化として骨髄中の間葉系幹細胞の増加が、骨髄腫の生着と増殖に有利な条件の一つとなると考えられた。また、RNA シーケンス解析による若齢の野生型 C57BL/6 マウスと KaLwRijHsd マウス、高齢の野生型 C57BL/6 マウスの間葉系幹細胞の遺伝子発現の比較では KaLwRijHsd マウスと高齢の野生型 C57BL/6 マウスの両者の間葉系幹細胞に共通して発現

上昇がみられる分泌タンパクや接着因子が認められた。これらの分泌タンパクや接着因子のうち、5TGM1 細胞の生存と増殖に有利に働く特定の分子が存在しているものと考えており、責任分子の同定を試みている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------