

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：16101  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23659946  
 研究課題名（和文）TIMP3による骨破壊性腫瘍での免疫抑制の病態解明と新規免疫治療法の開発  
 研究課題名（英文）Development of immunotherapy against the bone destructive tumor  
 研究代表者  
 日浅 雅博 (HIASA MASAHIRO)  
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教  
 研究者番号：90511337

研究成果の概要（和文）：形質細胞の悪性腫瘍である骨髄腫(MM)では、破骨細胞(OC)分化と活性化が亢進し広範な骨破壊病変を来す。その一方で樹状細胞(DC)の数、機能は抑制されている。我々はこれまで単球の TNF $\alpha$  converting enzyme (TACE)の活性化が単球表面のM-CSFRを切断することにより、単球からのOC分化を抑制することを報告した(Blood, 2009)。この成果を発展させ今回、骨髄間質細胞は TACE の内因性阻害因子である TIMP3を多量に産生し、TACEによる単球からのDC分化を抑制し、OC分化が誘導されることを明らかとした。この結果 MM 骨病変部では、骨髄間質細胞からの TIMP3 の産生が亢進し単球からの分化がより OC 側に偏っていると考えられ、TIMP3はMM骨病変の治療標的となりうると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Multiple myeloma (MM) generates devastating bone destruction. We recently reported that TNF $\alpha$  converting enzyme (TACE) expression in monocytes cleaved their surface M-CSF receptor (M-CSFR), which drastically disrupts osteoclastogenesis (Blood, 2009). Because TACE activity is inhibited by TIMP3, we explored the role of BMSC-derived TIMP3 in monocytic differentiation into DC or OC in MM. This study clarified that TIMP3 over-produced in MM bone marrow microenvironment restores surface M-CSFR on monocytes to facilitate their downstream signaling, which causes extensive bone destruction and impaired DC differentiation in MM. TIMP3 may therefore become a novel target in the treatment of MM bone disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：破骨細胞、樹状細胞、TACE、TIMP3

## 1. 研究開始当初の背景

舌癌や口腔底癌は、ひとたび顎骨に浸潤・転位が認められると、その生命予後は著しく悪化する。このような骨転位を認める癌は、骨格系細胞が提供する腫瘍細胞に好適な骨髄微小環境にて生育・増殖し、破骨細胞を分化・活性化させ骨破壊病変を形成する。一方で破骨細胞と同一の前駆細胞

より分化し免疫の中心的役割を担う樹状細胞は、骨転位した腫瘍の形成する骨髄微小環境では数・機能が低下し、その結果、腫瘍免疫低下・易感染性の原因となる。

我々はこれまでに破骨細胞・樹状細胞の新たな分化調節機序として、蛋白分解酵素である TNF $\alpha$  converting enzyme (TACE)が前駆細胞の M-CSF 受容体および RANK を切

断することにより、破骨細胞分化に必須因子の M-CSF および RANK ligand のシグナルを遮断し破骨細胞分化を抑制し、樹状細胞分化を誘導することを示した(Hiasa M, et al. Blood 114:4517-4526, 2009)。TACE は膜結合型として合成される TNF $\alpha$ 、 $\beta$ -APP、TGF $\alpha$ 、L-セレクトリン等を細胞外で切断・遊離する多機能酵素であり、炎症性疾患、アルツハイマー病や白血球のローリング・浸潤に関与する可能性が指摘されている。その活性を直接制御する因子については不明のままであったが、近年 Tissue inhibitors of matrix metalloproteinase 3 (TIMP3) が TACE を効果的に抑制する因子としての機能をもつことが見いだされ脚光をあびている (Black et al, Nat Genet. 36(9):934-5, 2004)。

骨破壊性悪性腫瘍での骨髄微小環境は骨髄間質細胞が豊富に存在し、その産生する IL-6 や TGF- $\beta$  等のサイトカインにより腫瘍増殖に適した環境を形成している。我々は予備的検討により骨髄微小環境を構成する細胞群の中で、骨髄間質細胞が TIMP3 を発現し多量に産生することを見いだしている。そこで本研究計画では TACE を中心とした破骨細胞・樹状細胞分化制御機構に対して、骨髄間質細胞が豊富に産生する TIMP3 の担う役割を明らかにし、骨破壊性悪性腫瘍の形成する骨髄微小環境や免疫抑制の病態解明を行うことで、これを分子標的とした新規治療の開発・評価を行うこととした。

## 2. 研究の目的

TIMP3 と呼ばれる酵素活性制御因子に着目し、骨転位をみせる腫瘍に特異な骨髄微小環境をもたらす破骨細胞・樹状細胞分化制御機構を解明することで、骨破壊病変の改善と同時に免疫低下による治療抵抗性の克服をもたらす新規治療戦略を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

- (1) マウスおよびヒト検体の骨髄間質細胞がもたらす樹状細胞分化抑制効果の検討

ヒト検体の骨髄間質細胞の初代培養系を用い、樹状細胞分化への影響について検討した。ヒト検体より CD14 で磁気ビーズを用いたセレクションにより前駆細胞を単離し、GM-CSF と IL-4 により誘導し、間質細胞との共培養との有無でこの樹状細胞分化がうける影響を評価した。解析はフローサイトメトリーを使用し CD1a, 14, 11b, 11c, 80, 86, HLA-DR 等の表面抗原の発現で検討した。

- (2) TIMP3 による破骨細胞・樹状細胞前駆細胞の TACE 活性抑制がもたらす樹状

細胞・破骨細胞分化への影響

ヒト単球を用い、TIMP3 存在下と非存在下で GM-CSF と IL-4 誘導性の樹状細胞分化を比較検討した。樹状細胞分化はフローサイトメトリーによる前述の方法を用いた。また同時に M-CSF と sRANKL 誘導性の破骨細胞分化を比較検討する。破骨細胞分化の判定は TRAP 染色による細胞数カウントで解析した。

- (3) 骨髄間質細胞の産生する TIMP3 と骨破壊性悪性腫瘍での樹状細胞分化抑制との関連性の検討

構築した間質細胞と樹状細胞前駆細胞および腫瘍細胞の共培養系を用い、間質細胞に対して TIMP3 siRNA を導入した。これによって骨髄間質細胞との共培養でうけた樹状細胞分化抑制がどう変化するかを検討した。

- (4) 間質細胞の産生する TIMP3 と樹状細胞分化抑制との関連の検討

我々はこれまで M-CSFR の切断が樹状細胞誘導と破骨細胞分化抑制の調節因子の一つと同定した。そこで間質細胞の共培養の有無により、単球表面の M-CSFR の発現に及ぼす影響をフローサイトメトリーと遺伝子レベルでの発現調節を real-time PCR で行った。また切断された M-CSFR の定量を ELISA 法にて行った。さらに、間質細胞の TIMP3 産生を調節する腫瘍由来因子の同定を行った。

- (5) TIMP3 ノックアウトマウスを用いた解析

当研究室では TIMP3 ノックアウトマウスを保有している。そこで TIMP3 ノックアウトマウスより採取した骨髄間質細胞の樹状細胞分化に及ぼす影響を野生型マウスの骨髄間質細胞と比較検討し、骨髄間質細胞の産生する TIMP3 が骨髄間質細胞による樹状細胞分化抑制の主要な因子である事を確認した。

## 4. 研究成果

- (1) 骨髄間質細胞は樹状細胞分化を抑制する

多発性骨髄腫の樹状細胞抑制のメカニズムを解明するため、まず骨髄微小環境の主要な構成成分である骨髄間質細胞と骨髄腫細胞、およびその協調作用の樹状細胞分化への影響を検討した。GM-CSF と IL-4 による CD14<sup>+</sup> ヒト単球からの CD14<sup>-</sup> CD1a<sup>+</sup> 樹状細胞分化は、骨髄腫細胞株 U266 との共培養にて 64% から 51% と軽度減弱され、骨髄間質細胞との共培養では 13% と強力に抑制された。さらには、骨髄腫細胞と骨髄間質細胞と両方と共培養することで CD14<sup>-</sup>

CD1a<sup>+</sup> 樹状細胞は 2%とほぼ完全な抑制を認めた。樹状細胞分化の抑制因子の一つに前述の M-CSF シグナルが考えられている。そこで次に、この骨髄間質細胞による樹状細胞分化抑制が M-CSF シグナルに依存しているかどうかを M-CSFR Fc による M-CSF シグナルのブロックを行い検討した。結果、骨髄間質細胞との共培養により単球からの CD14<sup>+</sup> CD1a<sup>+</sup> 樹状細胞分化は 47%から 10%に減弱するところ、M-CSFR Fc による M-CSF シグナルのブロックにより 23%まで回復を示した。これらの結果、多発性骨髄腫における樹状細胞分化の抑制には、骨髄間質細胞が特に重要な役割を担い、その抑制効果は骨髄腫細胞により増強されること、さらに骨髄間質細胞による樹状細胞分化の抑制のメカニズムの一部に M-CSF シグナルが関与することが明らかとなった。

(2) 間質細胞は単球の M-CSFR 発現を亢進する

我々は GM-CSF と IL-4 は TACE の活性化を介し単球の M-CSFR を shedding することで M-CSF シグナルを遮断することを報告した。しかしながら、GM-CSF と IL-4 による樹状細胞分化が骨髄間質細胞との共培養下では抑制され、M-CSF シグナルがそのメカニズムの一翼を担うことが示唆されたため、骨髄間質細胞による単球の M-CSFR 発現への影響を確認した。単球表面の M-CSFR 発現をフローサイトメトリーで解析したところ、単球表面の M-CSFR 発現は骨髄間質細胞との共培養により発現上昇を認めた。この発現増強のメカニズムを明らかにするため、遺伝子発現の変化について Real-time PCR で解析すると、単球は骨髄間質細胞との共培養によって M-CSFR の mRNA 発現が増強されることがわかった。次いで、骨髄間質細胞の M-CSFR の shedding への影響について培養上清中の可溶性 M-CSFR の定量を ELISA 法にて評価すると、骨髄間質細胞との共培養にて培養上清中の可溶性 M-CSFR の濃度は低下を示した。これらの結果、間質細胞によってもたらされる M-CSFR の発現上昇には遺伝子発現の上昇と shedding の抑制の双方が関与することが示唆された。この骨髄間質細胞による単球の M-CSFR 発現上昇のメカニズムの解明のため、まず、多発性骨髄腫の病態形成・腫瘍進展に関与する重要な増殖性サイトカインの M-CSFR の発現に対する影響について Real-time PCR で検討したところ IL-6 および TGFβ の添加により、単球の M-CSFR mRNA 発現上昇を認めた。この結果、間

質細胞による単球の M-CSFR の遺伝子発現上昇に IL-6 および TGFβ の関与が示唆された。

(3) 骨髄間質細胞は TIMP3 を産生し単球の M-CSFR の shedding を抑制する

骨髄間質細胞による単球の M-CSFR の shedding の抑制機序についてさらなる検討を行った。単球の M-CSF 受容体は TACE により shedding を受けることから、単球の TACE 活性が骨髄間質細胞により抑制されている可能性が考えられる。そこで TACE の内因性阻害因子である TIMP3 が骨髄間質細胞で発現しているかどうかを RT-PCR で検討したところ、骨髄間質細胞では TIMP3 の発現が恒性的に認められた。一方、TIMP3 の発現は単球ではわずかに、骨髄腫細胞株では全く認められなかった。また TIMP3 が可溶性因子として骨髄間質細胞から産生され影響しているかどうかを考慮し、培養上清中に産生される TIMP3 の濃度を ELISA 法で測定した。その結果、単球、骨髄腫細胞では可溶性 TIMP3 検出できなかったが、間質細胞からは可溶性 TIMP3 産生が豊富に認められた。興味深いことには、TIMP3 の間質細胞からの産生量は骨髄腫骨髄中に豊富に存在する TGFβ によって増強されることが明らかとなった。

(4) 骨髄間質細胞の産生する TIMP3 は樹状細胞分化を抑制する

次に骨髄間質細胞が産生する TIMP3 が単球の M-CSFR の shedding に対しどのような影響をもたらすかを、骨髄間質細胞の TIMP3 の発現を siRNA にてノックダウンを行い、単球表面の M-CSFR 発現と培養上清中の可溶性 M-CSFR 濃度を比較することで検討した。単球を GM-CSF と IL-4 で刺激すると単球表面の M-CSFR は発現が低下し、逆に培養上清中の可溶性 M-CSFR は濃度上昇を認め、旺盛な M-CSFR の shedding が確認される。しかし、control siRNA を遺伝子導入した骨髄間質細胞と共培養を行うと、単球表面の M-CSFR は発現が回復し培養上清中の可溶性 M-CSFR は濃度が低下することから、単球の M-CSFR の shedding の抑制が認められた。ところが、TIMP3 の発現を siRNA にてノックダウンした骨髄間質細胞と共培養を行った場合では、培養上清中の可溶性 M-CSFR の濃度低下や単球表面の M-CSFR の発現の回復はあまりみられず、単球の M-CSFR の shedding の抑制は認められなくなった。さらに、骨髄間質細胞の TIMP3 を抑制すると、単球の M-CSFR の shedding が回復したため、次に骨髄間質細胞の TIMP3 が樹状細胞分化に及ぼ

す影響を同じく siRNA を用いた実験で検討した。すると、CD14- CD1a<sup>+</sup> 樹状細胞分化は control siRNA を遺伝子導入した骨髄間質細胞との共培養では 12% に減少するが、TIMP3 siRNA を遺伝子導入した骨髄間質細胞との共培養では 12% から 31% へと回復を示した。このことから骨髄間質細胞による樹状細胞分化抑制には、骨髄間質細胞が産生する TIMP3 が単球の TACE 活性を抑制し M-CSF 受容体の shedding を抑制することで部分的に関与することが考えられた。

さらに TIMP3 ノックアウトマウスを用いて間質細胞と破骨細胞、樹状細胞分化との相互作用を検索した。TIMP3 ノックアウトマウスは、骨組織に対し特記すべき表現系は存在しなかったが、ヒトと同様に骨髄間質細胞には、豊富に TIMP3 の発現が認められ、骨髄間質細胞と破骨細胞の前駆細胞であるマウス単球を共培養すると、単球の細胞膜表面の M-CSFR 発現が著しく亢進した。一方、TIMP3 ノックアウトマウスの間質細胞と単球の共培養で単球の M-CSFR 発現上昇は認められなかった。これは TIMP3 ノックアウトマウスの間質細胞と野生型マウスの単球を共培養した場合でも同様であり、間質細胞の発現する TIMP3 が単球の M-CSFR 発現に対し正に制御することが考えられた。そこで骨髄間質細胞の発現する TIMP3 が単球の破骨細胞と樹状細胞分化にどのような影響を及ぼすかを検討した。TIMP3 ノックアウトマウス単球の GM-CSF と IL-4 の刺激による樹状細胞分化能については野生型と比較し優位な差は認められなかった。しかしながら、野生型マウスの骨髄間質細胞は破骨細胞分化を促進し、樹状細胞分化を抑制したのに対し、TIMP3 ノックアウトマウスの骨髄間質細胞は樹状細胞分化の抑制が認められず破骨細胞分化の促進も認められなかった。

これまで TIMP3 の骨代謝における役割については未だ不明な点が多く、こと多発性骨髄腫における骨破壊病変での機能、樹状細胞分化・破骨細胞分化における役割についての知見は皆無であった。本研究では骨髄間質細胞は IL-6、TGFβ による遺伝子レベルでの発現上昇に加え、TIMP3 による shedding の抑制を介して前駆細胞である単球表面の M-CSF 受容体の発現を強く増強することにより、樹状細胞分化を抑制することを明らかとした。このことは、骨髄腫骨病変部での病態の腫瘍免疫能の低下のメカニズムの一つと考えられる。さらに、骨髄間質細胞は骨髄腫細胞との共存に

より RANKL の発現を亢進し破骨細胞を活性化する。旺盛な骨吸収に伴い TGFβ は骨から放出され、骨髄間質細胞の TIMP3 の産生亢進に寄与すると考えられ、抑制された樹状細胞前駆細胞は破骨細胞へと誘導され骨病変形成の悪循環を生むと示唆された。これまでの本研究の成果は現在投稿準備中である。

## 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 5 件)

- ① Hirokazu Miki, Shingen Nakamura, Shuji Ozaki, A Oda, H Amou, Akishige Ikegame, Keiichiro Watanabe, Masahiro Hiasa, Q Cui, T Harada, Shiroh Fujii, A Nakano, Kumiko Kagawa, Kyoko Takeuchi, Ken-ichiro Yata, A Sakai, Masahiro Abe and Toshio Matsumoto : KRN5500, a spicamycin derivative, exerts anti-myeloma effects through impairing both myeloma cells and osteoclasts., *British Journal of Haematology*, 査読有, Vol.155, No.3, 2012, pp.328--339, DOI: 10.1111/j.1365-2141.2011.08844.x
- ② Akishige Ikegame, Shuji Ozaki, Daisuke Tsuji, T Harada, Shiroh Fujii, Shingen Nakamura, Hirokazu Miki, A Nakano, Kumiko Kagawa, Kyoko Takeuchi, Masahiro Abe, Keiichiro Watanabe, Masahiro Hiasa, N Kimura, Y Kikuchi, A Sakamoto, K Habu, M Endo, K Itoh, H Yamada-Okabe and Toshio Matsumoto : Small molecule antibody targeting HLA class I inhibits myeloma cancer stem cells by repressing pluripotency-associated transcription factors., *Leukemia*, 査読有, 2012, DOI: 10.1038/leu.2012.78
- ③ Ayako Nakano, Masahiro Abe, Asuka Oda, Hiroe Amou, Masahiro Hiasa, Shingen Nakamura, Hirokazu Miki, Takeshi Harada, Shirou Fujii, Kumiko Kagawa, Kyoko Takeuchi, Takashi Watanabe, Shuji Ozaki and Toshio Matsumoto : Delayed treatment with vitamin C and N-acetyl-L: -cysteine protects Schwann cells without compromising the anti-myeloma activity of bortezomib., *International Journal of Hematology*, 査読有, Vol.93, No.6, 2011, pp.727--735, DOI: 10.1007/s12185-011-0850-7
- ④ Qu Cui, Hironobu Shibata, Asuka Oda, Hiroe Amou, Ayako Nakano, Kenichiro Yata, Masahiro Hiasa, Keiichiro Watanabe, Shingen Nakamura, Hirokazu Miki, Takeshi Harada, Shiroh Fujii, Kumiko Kagawa,

Kyoko Takeuchi, Shuji Ozaki, Toshio Matsumoto and Masahiro Abe : Targeting myeloma-osteoclast interaction with V9V2 T cells., International Journal of Hematology, 査読有, Vol.94, No.1, 2011, pp.63--70, DOI: 10.1007/s12185-011-0885-9

- ⑤ J Asano, A Nakano, A Oda, H Amou, Masahiro Hiasa, Kyoko Takeuchi, H Miki, S Nakamura, T Harada, Shiroh Fujii, Kumiko Kagawa, Itsuro Endo, Ken-ichiro Yata, A Sakai, Shuji Ozaki, Toshio Matsumoto and Masahiro Abe : The serine/threonine kinase Pim-2 is a novel anti-apoptotic mediator in myeloma cells., 査読有, Leukemia, 2011, DOI: 10.1038/leu.2011.60

[学会発表] (計 7 件)

- ① 日浅雅博、Pim-2 acts as a common downstream mediator to suppress bone formation in myeloma, 第 74 回日本血液学会学術集会、2012.10.20、国立京都国際会館(京都府)
- ② Masahiro Hiasa、RelB attenuates the activation of the classical NF-κB pathway to facilitate osteoblastogenesis, ANZBMS 22nd Annual Scientific Meeting、2012.9.5、Pan Pacific Hotel (Australia)
- ③ 日浅雅博、A novel role of NF-κB relB in bone remodeling, 第 40 回日本免疫学会学術集会、2011.11.29、幕張メッセ(千葉県)
- ④ 日浅雅博、Pim キナーゼ阻害による腫瘍進展と骨破壊の抑制, 第 73 回日本血液学会学術集会、2011.9.16、名古屋国際会議場(愛知県)
- ⑤ Masahiro Hiasa、Prevention of tumor growth and bone destruction in myeloma by Pim kinase inhibition、ASBMR 2011 Annual Meeting、2011.9.19、San Diego Convention Center (USA)
- ⑥ Masahiro Hiasa、Dual effects of Pim inhibition on myeloma: induction of bone formation and tumor suppression、IOF-ANZBMS 2011 Annual Meeting、2011.9.6、Gold Coast Convention Centre (Australia)
- ⑦ 日浅雅博、Pim キナーゼの阻害は骨芽細胞分化を促進し、骨髄腫骨病変の形成と腫瘍進展を抑制する, 第 29 回日本骨代謝学会学術集会、2011.7.28、大阪国際会議場(大阪府)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

日浅 雅博 (HIASA MASAHIRO)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号 : 90511337

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号 :