

令和元年6月18日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07183

研究課題名(和文) 骨髄間質細胞由来機能強化型改変エクソソームによる多発性骨髄腫の新規治療法開発

研究課題名(英文) Novel therapies development of multiple myeloma using engineering exosomes derived from bone marrow stromal cells

研究代表者

大屋敷 純子 (Ohyashiki, Junko)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：20191950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腫瘍血管新生抑制効果を有する「機能強化型エクソソーム」を作成し、骨髄微小環境制御による多発性骨髄腫の新規治療法を開発することを目的とした。骨髄間質細胞(BMSC)の加齢性変化およびそれらが放出するエクソソームの機能解析を行い、若年者由来エクソソームに特徴的なmiRNAをプロファイリングにより選別し、候補となるmiRNAを同定した。これらを、直接的にエクソソームに導入を行い、腫瘍血管抑制効果の高い改変エクソソームを構築し、さらに、*in vivo*マウスモデルを用いてmiR-340およびmiR-365を導入した改変エクソソームでの抗腫瘍血管新生の抑制能が向上していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性骨髄腫の骨髄微小環境制御を主眼としたアプローチはSDF-1やCXCR4などの液性因子を中心に展開されている。本研究では人工的にmiRNAを直接エクソソームに添加し効果を発揮させるという我々が開発した革新的手法を用いている。また、抗原性が少なく細胞治療としての有用性が検証されているMSCに着目し、細胞治療の発展型ともいえる核酸医薬研究である。抗腫瘍血管新生効果の高い「機能強化型エクソソーム」を安定的に供給する事も可能になる。本研究は技術的にも革新的がん治療として注目の領域であると同時に高齢化社会でますます患者数の増加が見込まれる多発性骨髄腫患者のADL向上につながり社会的貢献度は大きい。

研究成果の概要(英文)：Bone marrow stromal cells (BMSCs) and their exosomes are a promising area of cancer therapy. Here, we investigated therapeutic effects of BMSC exosomes derived from young and elderly donors using *in vivo* models of bone marrow in multiple myeloma (MM). We found that the donor's age decides senescent changes in BMSC, and exosomes derived from young BMSCs could block MM cell-induced angiogenesis in Matrigel plug. We also noted young BMSC-specific exosomal miRNA, such as miR-340. Of note is that the anti-angiogenic effect was potentiated by engineering exosomes of elderly BMSCs; exosomes are directly transfected with miR-340, resulting in exosome rejuvenation. Our results suggest that the BMSC exosomes is able to transfer the miRNAs, which have the ability to inhibit angiogenesis and progression of MM. The present study provides a new insight toward exosome-based cancer therapy by engineering exosomes of BMSCs.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：エクソソーム 骨髄間質細胞 多発性骨髄腫 腫瘍血管新生 miRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 腫瘍血管新生におけるエクソソームの役割と問題点

腫瘍の発育進展には腫瘍をとりまく「がん環境」が重要である。このがん環境を構築する細胞としては血管内皮細胞、間質細胞に加えて、樹状細胞をはじめとする免疫担当細胞がある。これらの細胞から放出されるエクソソームについては樹状細胞を用いた研究が散見されるが、血管内皮細胞や間質細胞由来エクソソームについては詳細な情報伝達経路に関する報告がない。後者においては造血幹細胞移植後の移植片宿主病 (Graft-vs-host disease; GVHD) に BMSC 由来のエクソソームを輸注したところ、症状が軽快したという臨床報告があるが、その分子機構は不明である。このようにエクソソーム研究は飛躍的に進んでいるが、どの細胞から分泌されたエクソソームの、どのような使命を持ったエクソソームが、どの情報伝達物質を運ぶカーゴとして、細胞間シグナル伝達機構に関与しているかについては未知の部分が多く、現象としてとらえられていたものの科学的根拠を一つ一つ解明していく必要があると考えた。

(2) 多発性骨髄腫をめぐる昨今の治療の進歩と課題

多発性骨髄腫の発症率は人口 10 万人あたり 2 人程度と考えられているが、造血器腫瘍の約 10% を占める。発症年齢は 60 才代がピークであるが、高齢化社会に伴い増加傾向にある。腰痛や骨折を主訴として整形外科を受診することも多く、治療の成否は患者の日常生活動作 (activities of daily living; ADL) を大きく左右するため、患者の社会生活も十分に考慮した治療戦略の構築が望まれている。2000 年代に入り、プロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブや腫瘍血管新生を制御するサリドマイド類似体の台頭により、多発性骨髄腫の化学療法は劇的に進歩したが、造血幹細胞移植の適応外である 65 才以上が患者の大半を占めているため、再発や合併症により一旦は改善され ADL が低下してしまう例が依然として多い。

一方、多発性骨髄腫の生物学的特性は造血器腫瘍の中でも特殊で、多くは低酸素環境にある骨髄微小環境内で腫瘍は発育進展していく。腫瘍血管新生制御はサリドマイドの有効性でも明らかのように骨髄腫細胞増殖抑制効果に直結していると考えられるが、再発を繰り返す例での使用は必ずしも ADL 向上にはつながらない。そこで、抗原性が少なく細胞治療のソースとして安全性が証明されている BMSC 由来エクソソームを用いることによって、多発性骨髄腫のサルベージ治療が可能ではないかという着想にいたった。

2. 研究の目的

多発性骨髄腫 (multiple myeloma; MM) は高齢者に多い形質細胞の腫瘍で、骨髄内で腫瘍を形成し発育進展するため、骨髄微小環境がその病態に深く係っていることが想定されている。近年、骨髄間質細胞 (bone marrow stroma cell; BMSC) と MM 細胞の細胞間コミュニケーションに miRNA などの情報伝達物質を内包しているエクソソームが重要な役割を担っていることが明らかになった。そこで、本研究では細胞治療のソースとしても近年注目されている BMSC より放出されるエクソソームを用いて、内包している情報伝達物質を編集することによって、腫瘍血管新生抑制効果を有する「機能強化型エクソソーム」を作成し、骨髄微小環境制御による多発性骨髄腫の新規治療法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究の成否を握る鍵は腫瘍発育進展を抑制する機能の高いエクソソームのソースをまず確定する事であると考えられるので、健康人ドナーの年齢による優良エクソソームの選別を行い、優良エクソソームに特徴的な miRNA の選別を行なった。そして、候補 miRNA を単独または複数 (カクテル型) 導入した「腫瘍血管新生抑制型改変エクソソーム」の作製を行い、評価に際しては単独型とカクテル型の腫瘍血管新生抑制効果の差についてマウスモデル実験系を用いて解析した。

(1) エクソソーム供給細胞の選定

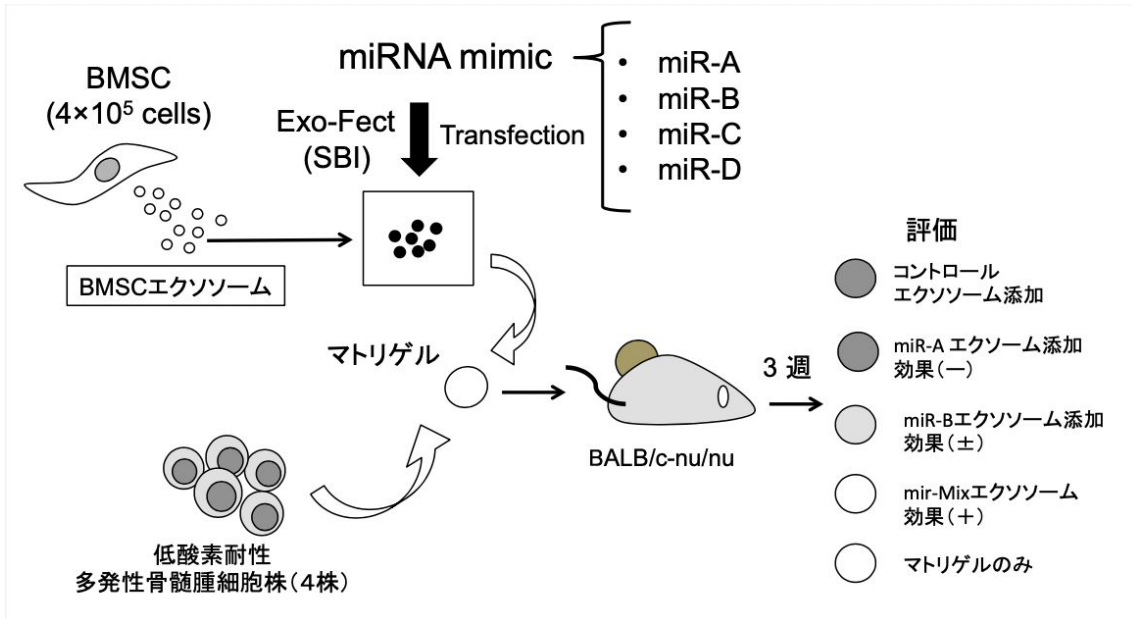
本研究では安定したエクソソーム供給源を得るため、まず LONZA 社より購入した若年者由来 (ドナー年齢 19-22 歳) 高齢者由来 (ドナー年齢 68-72 歳) の BMSC を用いた。これらの BMSC の培養上清 (無血清培地で 48 時間培養) から ExoQuick-TC (SBI) を用いてエクソソーム分画を抽出した。これらのエクソソームを腫瘍細胞の培養系に添加し、腫瘍細胞の増殖抑制や細胞死 (アポトーシス、Annexin V) の誘導を指標として解析した。また、骨髄腫細胞 (5×10^6 細胞) を 200 μ L のマトリゲルに骨髄間質細胞由来エクソソームと混合した状態でヌードマウスの皮下に移植し、3 週間後に腫瘍を回収し、血管新生能、腫瘍細胞の増殖を指標として解析した。

(2) 優良エクソソームに特徴的な miRNA 発現様式

若年者ドナー由来 BMSC と高齢者ドナー由来 BMSC の培養上清から回収したエクソソーム分画から miRNeasy kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出し、TaqMan Low-Density PCR Array (ABI) を用いてエクソソーム含有 miRNA を網羅的に解析した。

(3) 腫瘍抑制型改変エクソソームの作製

BMSC 由来エクソソームに「腫瘍血管新生抑制型 miRNA」を安定的に導入する方法および量・質



ともに安定的に産生、回収する方法を確立することを目的とし、Exo-Fect Exosome Transfection Reagent (SBI)で候補 miRNA の mimic (合成 2 本鎖 RNA) を直接的にエクソソーム に導入した。

4. 研究成果

(1) 若年者由来骨髄間質細胞のエクソソームによる抗腫瘍血管新生効果

若年者由来 BMSC および高齢者由来 BMSC の培養上清からエクソソームを回収し、マトリゲル内で腫瘍血管新生を誘導する低酸素耐性多発性骨髄腫細胞株 RPMI8226-HR を用いて上記のエクソソーム添加による変化を観察したところ、若年者由来 BMSC から分泌されたエクソソームを混合したマトリゲルでは明らかな血管新生の抑制が認められた。さらにこの抗腫瘍血管新生による腫瘍サイズの減少も見受けられた。そこで、若年者由来エクソソームに特徴的な miRNA をプロファイリングにより選別し、候補となる miRNA の同定を試みた。すなわち、若年者由来 BMSC より分泌されるエクソソームと高齢者 BMSC より分泌されるエクソソームに関して、エクソソームのサイズ、分布、分泌量には差がないものの、含有する miRNA が大きく異なることを見出した。若年者 BMSC 由来エクソソームに含有される miRNA のうち、ランキング上位のものは、miR-411, miR-374a, miR-340, miR-133a, miR-365 などであり、これらの miRNA を介してエクソソーム受容細胞の標的因子が制御されていると考えられた。以上より、優良エクソソームの条件としては若年者由来であること、腫瘍血管抑制効果が期待される miRNA を多く含有していることが重要であると結論づけた。

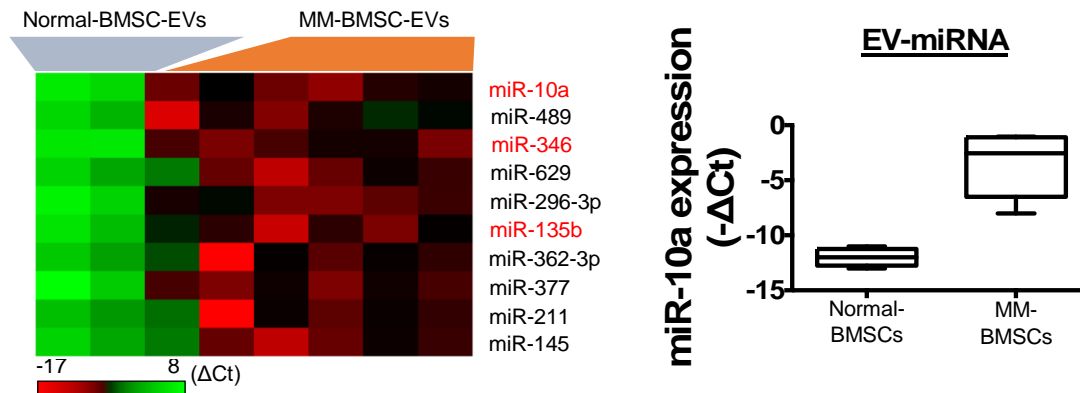
(2) 抗腫瘍血管抑制型改変エクソソームの作製と *in vivo* モデルを用いた検証

若年者由来エクソソームに特徴的な miRNA として選別された候補 miRNA を、高齢者由来 BMSC の培養上清から単離したエクソソーム分画に専用試薬 Exo-fect を用いて、単独、もしくは複数を混合して直接的に導入を行い、効果の高い改変エクソソームを作製した。この改変エクソソームを血管内皮細胞 HUVEC (human umbilical vein epithelial cells) を用いた *in vitro* 培養系に添加したところ、HUVEC における tube formation 効率の顕著な低下が見受けられた。

次に、低酸素耐性骨髄腫細胞株(RPMI8226-HR, U266-HR)をマトリゲルに上記の改変エクソソームと混合した状態でヌードマウスの皮下に移植し、3 週間後に腫瘤を回収し、血管新生能および腫瘍細胞の増殖を指標にして解析した。その結果、若年者 BMSC 由来エクソソームと同程度の抗腫瘍血管新生が得られることを見出した。また、miR-340 および miR-365 を単独導入した改変エクソソームでも抗腫瘍血管新生の抑制能が向上していることが示された。さらには、miR-340 の標的因子の探索を行い、数種類の血管新生に関与する因子群に候補を絞り解析を進めた結果、HUVEC をモデル系とした *in vitro* 解析から miR-340 が直接的に cMET の発現を阻害することを見出した。

また、優良エクソソームに対し、MM 患者由来 BMSC が分泌する「不良エクソソーム」の機能解析も同様の手法を用いて進めており、次頁図に示した通り、健常者(若年者由来、高齢者由来)BMSC と比較して MM 患者 BMSC 由来エクソソーム内で特異的に高発現している miRNA も同定している。腫瘍細胞の生存、進展を補助する効果を有する「不良エクソソーム」も本研究で用いたエクソソーム 改変技術を用いて機能改善することが可能であるか試みている。

従来エクソソームに特定の miRNA を梱包しようとする場合は、エクソソーム産生細胞に目的の miRNA を強制発現させ、その強制発現細胞由来のエクソソームを回収していたが、この方法



では miRNA の強制発現による産生細胞自体の特性の変化が生じ、産生されるエクソソーム内の情報伝達物質比率にも影響を与える可能性が高い。一方、本研究では BMSC の培養上清から単離したエクソソーム分画に直接 miRNA を導入する手法を用いた。この方法を用いると単独の miRNA だけではなく複数の候補 miRNA (カクテル型) を導入することも可能であった。

また、多発性骨髄腫の骨髄微小環境制御を主眼としたアプローチは SDF-1 や CXCR4 などの液性因子を中心に展開されているが、本研究では人工的に miRNA を直接エクソソームに添加し効果を発揮させるという革新的手法と考えられる。また、抗原性が少なく細胞治療としての有用性が検証されている BMSC に着眼し、細胞治療の発展型ともいえる核酸医薬研究である。この改変エクソソーム技術が確立すれば、抗腫瘍血管新生効果の高い「機能強化型エクソソーム」を安定的に供給する事も可能になる。エクソソームは体液中の miRNA を用いたバイオマーカーとして利用されてきたが、がん診断のみならず、がん治療の方面でも医療実現が望まれており、本研究は技術的にも革新的がん治療として注目の領域であり、今後 exosome-based therapy の開発に結びつくと考えられると同時に、高齢化社会でますます患者数の増加が見込まれる多発性骨髄腫患者の ADL 向上につながり社会的貢献度は大きい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

Katagiri S, Umezumi T, Azuma K, Kobayashi C, Akahane D, Suguro T, Furuya N, Fujimoto H, Nakamura N, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. Maintenance 5-azacytidine therapy by MRD monitoring after allogeneic HSCT in myeloid/lymphoid neoplasms with FGFR1 rearrangement. *Bone Marrow Transplant*. 2019. 査読有

DOI: 10.1038/s41409-019-0436-1.

Imanishi S, Umezumi T, Kobayashi C, Ohta T, Ohyashiki K, Ohyashiki JH. Chromatin Regulation by HP1 Contributes to Survival of 5-Azacytidine-Resistant Cells. *Front Pharmacol*. 2018; 9: 1166. 査読有

DOI: 10.3389/fphar.2018.01166.

Yoshizawa S, Umezumi T, Saitoh Y, Gotoh M, Akahane D, Kobayashi C, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. Exosomal miRNA Signatures for Late-Onset Acute Graft-Versus-Host Disease in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(9): E2493. 査読有

DOI: 10.3390/ijms19092493.

Ohyashiki JH, Umezumi T, Ohyashiki K. Extracellular vesicle-mediated cell-cell communication in haematological neoplasms. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2018; 373(1737): 20160484. 査読有

DOI: 10.1098/rstb.2016.0484.

Katagiri S, Umezumi T, Azuma K, Asano M, Akahane D, Makishima H, Yoshida K, Watatani Y, Chiba K, Miyano S, Ogawa S, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. Hidden FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia that evolved into very late relapse with T-lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2018; 59(6): 1490-1493. 査読有

DOI: 10.1080/10428194.2017.1382696.

Asano M, Umezumi T, Katagiri S, Kobayashi C, Tauchi T, Gotoh M, Ando K, Okabe S, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. Upregulated exosomal miRNA-140-3p in CML patients with musculoskeletal pain associated with discontinuation of tyrosine kinase inhibitors. *Int J Hematol*. 2017; 105(4): 419-422. 査読有

DOI: 10.1007/s12185-017-2199-z.

Umezumi T, Imanishi S, Azuma K, Kobayashi C, Yoshizawa S, Ohyashiki K, Ohyashiki JH. Replenishing exosomes from older bone marrow stromal cells with miR-340 inhibits

myeloma- related angiogenesis. *Blood Adv.* 2017; 1(13): 812-823. 査読有
DOI: 10.1182/bloodadvances.2016003251.
Imanishi S, Takahashi R, Katagiri S, Kobayashi C, UmezT, Ohyashiki K, OhyashikiJH. Teriflunomide restores 5-azacytidine sensitivity via activation of pyrimidine salvage in 5-azacytidine-resistant leukemia cells. *Oncotarget.* 2017; 8(41): 69906-69915. 査読有
DOI: 10.18632/oncotarget.19436.
Azuma K, UmezT, Imanishi S, Asano M, Yoshizawa S, Katagiri S, Ohyashiki K, OhyashikiJH. Genetic variations of bone marrow mesenchymal stromal cells derived from acute leukemia and myelodysplastic syndrome by targeted deep sequencing. *Leuk Res.* 2017; 62: 23-28. 査読有
DOI: 10.1016/j.leukres.2017.09.008.
Katagiri S, UmezT, Azuma K, Asano M, Akahane D, Makishima H, Yoshida K, Watatani Y, Chiba K, Miyano S, Ogawa S, OhyashikiJH, Ohyashiki K. Hidden FLT3-D835Y clone in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia that evolved into very late relapse with T-lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2017; 3: 1-4. 査読有
DOI: 10.1080/10428194.2017.1382696.
OhyashikiJH, UmezT, Ohyashiki K. Exosomes promote bone marrow angiogenesis in hematologic neoplasia: the role of hypoxia. *Curr Opin Hematol.* 2016; 23: 268-273. 査読有
DOI: 10.1097/MOH.000000000000235.

[学会発表](計 19 件)

UmezT, Gladkova N, Imanishi S, Ohyashiki K, OhyashikiJH. Characterization of novel bone marrow stromal cells from healthy donors. 第 36 回ヒト細胞学会学術集会 2018 年
KatagiriS, Azuma K, Saito Y, Yoshizawa S, Akahane D, Fujimoto H, Ito Y, UmezT, OhyashikiJH, Ohyashiki K. Sequential analysis of clonal evolution by targeted deep sequencing in therapy-related myeloid neoplasm. 第 80 回日本血液学会学術集会 2018 年
UmezT, Imanishi S, Yoshizawa S, Ohyashiki K, OhyashikiJH. Extracellular vesicle-mediated miRNA transfer enhances growth and survival of multiple myeloma. 第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年
Imanishi S, Azuma K, UmezT, Kawana C, Ohyashiki K, OhyashikiJH. 5-azacytidine targets chromatin regulation through piRNA pathway. 第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年
UmezT, Ohyashiki K, OhyashikiJH. The role of extracellular vesicle-mediated miR-10a transfer in bone marrow microenvironment of patients with multiple myeloma. International Society for Extracellular Vesicles 2018(国際学会) 2018 年
UmezT, Imanishi S, Gladkova N, Ohyashiki K, OhyashikiJH. Bone marrow mesenchymal stromal cells from healthy donors secrete anti-angiogenic EVs as well as soluble factors having growth inhibitory effect in MM. European Hematology Association 2018(国際学会) 2018 年
Yoshizawa S, UmezT, Saitoh Y, Gotoh M, Akahane D, Kobayashi C, OhyashikiJH, Ohyashiki K. Altered exosomal miRNA expression of late onset acute graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. The 79th Annual Meeting of Japanese Society of Hematology (JSH2017) 2017 年
UmezT, Imanishi S, Azuma K, Yoshizawa S, Ohyashiki K, OhyashikiJH. Inhibition of extracellular vesicle secretion induces apoptosis of bone marrow stromal cells derived from multiple myeloma patients. The 76th Annual Meeting of Japanese Cancer Association (JCA2017) 2017 年
UmezT, Imanishi S, Yoshizawa S, Ohyashiki K, OhyashikiJH. Cross-talk mediated by bone marrow stromal cells-derived extracellular vesicles. Tokyo Medical University, Institute of Medical Science, 1st International Symposium "Role of Aging and Cancer" (国際学会) 2017 年
Ohki T, UmezT, OhyashikiJH, Fukuoka Y. A statistical integrative analysis method for small size expression data of microRNAs and genes. 39th International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (IEEE EMBC2017)(国際学会) 2017 年
UmezT, Imanishi S, Yoshizawa S, Ohyashiki K, OhyashikiJH. Inhibition of extracellular vesicle secretion induces apoptosis of bone marrow stromal cells: Towards soil-targeted therapy in multiple myeloma. 22nd Congress of European Hematology Association (EHA2017)(国際学会) 2017 年

Ohyashiki K, Asano M, Umezumi T, Katagiri S, Kobayashi C, Tauchi T, Gotoh M, Ando K, Okabe S, Ohyashiki JH. miRNA profiling of circulating extracellular vesicles in CML patients with musculoskeletal pain associated with discontinuation of tyrosine kinase inhibitors. 22nd Congress of European Hematology Association (EHA2017)(国際学会) 2017年

Umezumi T, Imanishi S, Yoshizawa S, Ohyashiki K, Ohyashiki JH. A role of exosomal miR-10a in bone marrow stromal cells obtained from patients with multiple myeloma. 6th Annual Meeting of International Society for Extracellular Vesicles (ISEV2017)(国際学会) 2017年

Imanishi S, Takahashi R, Katagiri S, Umezumi T, Yoshizawa S, Kobayashi C, Ohyashiki K, Ohyashiki JH. Teriflunomide restores 5-azacytidine sensitivity via activation of pyrimidine salvage in 5-azacytidine-resistant leukemia cells. The 14th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes (MDS2017)(国際学会) 2017年

Ohyashiki JH, Umezumi T, Kobayashi C, Imanishi S, Asano M, Ohyashiki K. Telomeric repeat-containing RNA (TERRA) in MDS: Utility of cell-free TERRA packaged in extracellular vesicles. The 14th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes (MDS2017)(国際学会) 2017年

Ohyashiki K, Saitoh Y, Imanishi S, Umezumi T, Yoshizawa S, Asano M, Fujimoto H, Akahane D, Kobayashi C, Ohyashiki JH. Extracellular vesicles (EVs) released by bone marrow stromal cells show a distinct miRNA profile in high-risk MDS patients. The 14th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes (MDS2017)(国際学会) 2017

Umezumi T, Imanishi S, Azuma K, Yoshizawa S, Ohyashiki K, Ohyashiki JH. Replenishing exosomes from older bone marrow stromal cells by miR-340 inhibits myeloma-related angiogenesis. The Royal Society Scientific Meeting 2017 “Extracellular vesicles and the tumor microenvironment” (国際学会) 2017年

Ohyashiki JH. Role of extracellular vesicles-mediated angiogenesis in hematologic neoplasias Royal Society meeting entitled ‘Extracellular Vesicles in the Tumor Microenvironment’ (招待講演)(国際学会) 2017年

Umezumi T, Imanishi S, Azuma K, Yoshizawa S, Ohyashiki K, Ohyashiki JH. Anti-angiogenic effect of normal bone marrow stromal cell-derived exosomes rejuvenated by miR-340. The 78th Annual Meeting of Japanese Society of Hematology 2016年

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：がんの罹患の可能性の試験方法およびそれに用いる試験試薬

発明者：大屋敷純子

権利者：学校法人 東京医科大学

種類：特許

番号：特願 2017-083898

出願年：2017年

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

http://team.tokyo-med.ac.jp/ims_onc/index.html

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：梅津 知宏

ローマ字氏名：(UMEZU, tomohiro)

所属研究機関名：東京医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁)：40385547

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。