

令和元年6月10日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09862

研究課題名(和文) 未分化造血細胞の異常に起因する多発性骨髄腫の新たな発生機構についての解析

研究課題名(英文) Analysis of novel pathogenesis caused by disorder of immature hematopoietic cells in multiple myeloma

研究代表者

田中 宏和 (TANAKA, Hirokazu)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：40360846

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)：申請者らは、54例の多発性骨髄腫(MM)症例の骨髄サンプルを用いた解析を行い、CD38+ CD138+ CD19- CD45-で定義されるMM細胞(PhMCs)からMMの起源となる細胞を分離した。PhMCsには、CD34+のわずかな分画が存在し、*in vitro* および *in vivo*でのMM発症、抗腫瘍薬抵抗性に寄与した。骨髄中のCD34+ PhMCsの割合は、初発例よりも再発難治例で有意に高かった。遺伝子発現解析の結果、CD34- PhMCsでは一般的なMM細胞の遺伝子発現様式を示し、CD34+ PhMCsではより未分化な胚中心以前の発現様式を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髄腫における幹細胞は、2,30年来その存在が提唱されてきたが、未だその実体については議論が分かれている。骨髄腫の起源となる細胞の同定は、骨髄腫のより詳細な病態解明だけでなく、骨髄腫根絶に向けた新たな治療戦略を構築する上で有用な基盤となる。

研究成果の概要(英文)：We isolated myeloma initiating cells from phenotypically defined CD38+ CD138+ CD19- CD45- multiple myeloma (MM) cells (PhMCs) from a set of 54 bone marrow MM patient samples. And we found PhMCs contains a minor CD34+ fraction that possess myeloma-propagating activities *in vitro* and *in vivo*, as well as resistance to anticancer drugs. The percent of CD34+ PhMCs was significantly higher in relapse/refractory than in newly diagnosed samples. Gene expression profiling revealed that CD34- PhMCs had a general myeloma cell signature, whereas CD34+ PhMCs exhibited a more immature pre-germinal center like signature. The presence of cancer stem cells in MM was proposed for a few decades, however the identity of these cells remains controversial. The identification of these MM propagating cells provides a basis for better understanding the pathogenesis of MM and for designing novel therapeutic strategies aimed to eradicate total MM cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：多発性骨髄腫 腫瘍幹細胞 表面抗原 薬剤感受性 分子標的

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

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫(MM)における幹細胞, initiating cell は1980年代にその存在を指摘されており、今日まで様々なグループが同定を試みているが、現在も不明な点が多く残されている。MMでは、VDJ 遺伝子再構成パターンにクロナリティがあること、また、特定の抗原に対しての体細胞突然変異を認めることから、post-germinal center 由来と考えられてきた¹⁾。一方、次世代シーケンサーを用いた解析から、MMで認める転座のうち t(11;14) や t(14;20) の約2割は、骨髄の pro-B cell における DJ 再構成に伴って生じることが示されている²⁾。また、免疫不全マウスへの異種移植の実験において、CD19+27+138-のメモリー細胞分画を輸注することで、骨髄腫の再構築が得られたことから、memory 細胞分画が initiating cell である可能性も示唆されている^{3,4)}。また、最終分化したモノクローナルな形質細胞が initiating cell として存在しているという報告もなされている。CD38 陽性形質細胞分画を分離し、胎児の骨を埋め込んだ SCID-hu マウス⁵⁾や rabbit の骨を埋め込んだ SCID-rab マウス^{6,7)}に移植した結果、生着が得られ、かつ一部には骨病変など MM 様の病態やヒトの M タンパクの産生が認められた。さらに、マウス実験ではあるが、t(14;16)で過剰発現を認める MafB を Sca1 プロモーター下で発現させたトランスジェニックマウスでは、溶骨病変を伴う MM 様病態が出現したことから、MM initiating cell が造血幹前駆細胞レベルである可能性も報告されている⁸⁾。

2. 研究の目的

MM に対する治療成績は、プロテオソーム阻害薬や免疫調節薬などの新規薬剤の導入により明らかに改善してきた。しかしながら、多くの症例で再発が認められることから、MM においても、多くの悪性腫瘍同様に“腫瘍(MM)幹細胞”が存在し、治療抵抗性に深く関与していると考えられる。本研究では、MM の根絶に向けた取り組みとして、未分化な造血細胞分画から、表面分子と疾患特異的に発現する遺伝子プロファイルをもとに MM 幹細胞を同定し、その生物学的・分子遺伝学的な特性や生体内動態を解析する。さらに、MM 幹細胞の増殖と生存に必須の分子を標的とした新規治療法の開発基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

- 1) 治療抵抗性の3症例を対象として、幹細胞を特徴づける休止期(side population, SP)にある骨髄腫(MM)細胞の表面抗原の発現を single cell PCR 法にて網羅的に解析した。
- 2) 未分化な MM 細胞に特異的に発現する表面分子に関して、15例の MM 患者において CD38+19-45-138+で定義される MM 細胞での表面分子の発現パターン、及び表面分子を発現する MM 細胞の特性を解析した。
- 3) 未分化な MM 細胞の薬剤耐性機構について、B 細胞の分化度、および免疫チェックポイント分子の発現の観点から解析を行った。

4. 研究成果

- 1) SP-MM 細胞に共通して特異的に発現するとして CD34 を同定した。CD34 を発現しない MM 細胞は、メチルセルロース培地でのコロニー形成を認めなかったのに対して、発現する MM 細胞では、形態的にも、また免疫組織化学的にも均一な細胞からなる MM コロニーの形成を有意に認め、より未分化であると考えられた。興味深いことに、症例特異的に認められる遺伝子変異が、成熟 MM 細胞だけでなく、同定した未分化な MM 細胞においてもすでに認められ、病態形成に寄与していると推察された。
- 2) 15例を対象に解析を行った結果、初発時の CD38+19-45-138+で定義される MM 細胞(PhMCs)における CD34 陽性率は 0.63 % (range: 0.39-0.99)であった。治療後の陽性率は同一症例で比較した結果、有意に増加していたことから、CD34 陽性 PhMCs は薬剤耐性である可能性が示唆された。さらに、

CD34 陽性 PhMCs を免疫不全マウスへ移植した結果、4 例中 2 例で骨髄への生着が認められ、移植後 6 ヶ月時点で患者と同様のモノクローナルな免疫グロブリンの産生が認められた。生着したマウス骨髄の MM 細胞のほとんどが CD34 陰性であったことから、CD34 陽性から陰性細胞へと分化し、増殖したと考えられた(図)。

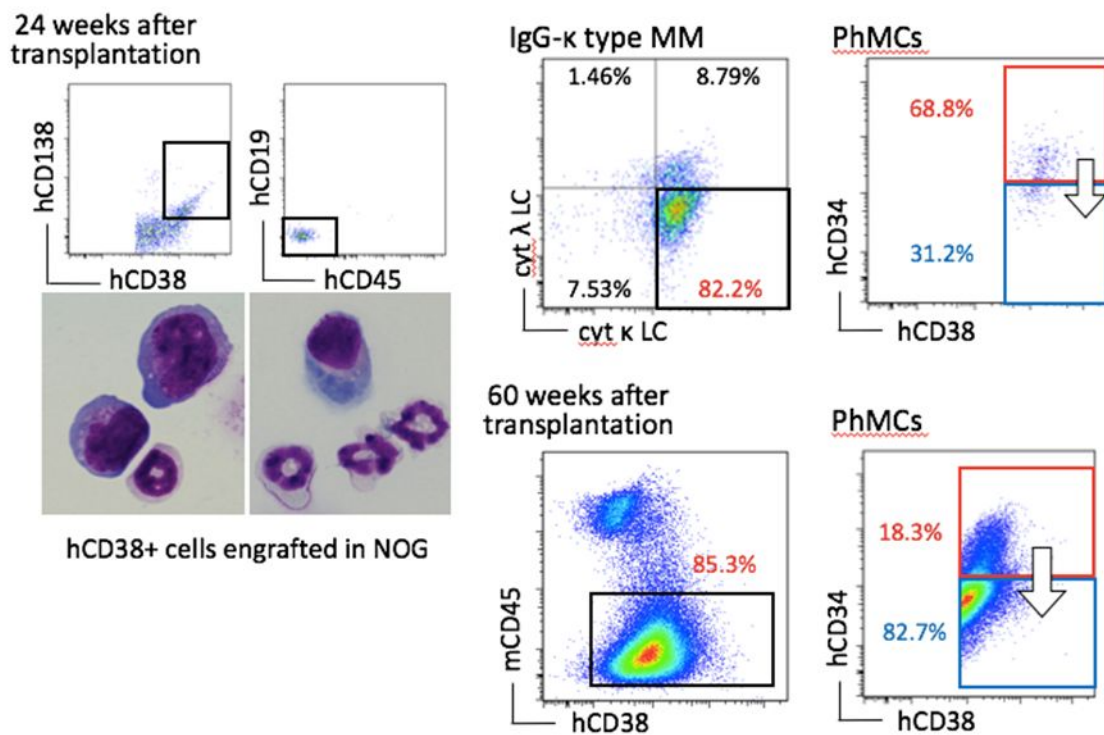


図 NOG マウスに生着した MM 細胞の特性

初発症例の骨髄を用いて phMC から CD34+/CD34- をそれぞれ sorting し、放射線を照射した NOG マウスに CD34+ 群は 6×10^3 から 1×10^4 個、CD34- 群は、 1×10^5 から 1×10^6 個の細胞を移植しました。

生着後 24 週時点で、患者検体と同様の population の再構築を確認できた。形態はマウス細胞と比較して大型で核の偏在化と核周明庭を持った細胞群を認めた。また、免疫グロブリンも輸注前の検体と同じ特性を保持しており、移植後 60 週で PhMC の割合の増加と、CD34- 分画への移行を確認した。

さらに、CD34 陽性、陰性細胞の遺伝子発現をマイクロアレイを用いて網羅的に比較した結果、CD34 陽性細胞では免疫回避に関わる遺伝子の発現上昇、免疫拒絶に関わる遺伝子の発現の低下を認めた。

3) CD34 陽性 PhMCs、CD34 陰性 PhMCs との網羅的な遺伝子発現比較の結果、B 細胞分化に関わる転写因子の中で、Pax5 の発現は共に認められなかったのに対し、IRF4、XBP1 は、CD34 陰性 PhMCs で有意に高い発現を認め、PU.1、EBF1、Oct2 の発現には両者での有意差は認められなかった。興味深い結果として、CD34 陽性 PhMCs においてのみ GATA2 の発現を、造血幹/前駆細胞と同程度認めた。これまで実験的に、XBP1 の発現とプロテアソーム阻害薬の効果との関連が報告されているが⁹⁾、プロテアソーム阻害薬投与前後の骨髄を用いて、CD34 陽性、CD34 陰性 PhMCs の割合を比較した結果、臨床的な奏効に関わらず XBP1 発現の少ない CD34 陽性 PhMCs の残存を認めた。抗腫瘍免疫に関わる表面分子の発現を比較した結果、PDL1、CD155 等の抗腫瘍免疫の抑制分子の発現が CD34 陽性 PhMCs において有意に高く、初発症例よりも再発難治例により多く発現を認めた。以上の結果から、CD34 陽性 PhMCs は幹細胞活性を有する clonogenic な骨髄腫細胞であり、多発性骨髄腫における新たな治療標的となる可能性が示唆された。

<引用文献>

1. Bakkus MH, Heirman C, Van Riet I, et al.
Evidence that multiple myeloma Ig heavy chain VDJ genes contain somatic mutations but show no intraclonal variation.
Blood. 1992; 80: 2326-35.
2. Walker BA, Wardell CP, Johnson DC, et al.
Characterization of IGH locus breakpoints in multiple myeloma indicates a subset of translocations appear to occur in pregerminal center B cells.
Blood. 2013; 121: 3413-9.
3. Bergsagel PL1, Smith AM, Szczeppek A, et al.
In multiple myeloma, clonotypic B lymphocytes are detectable among CD19+ peripheral blood cells expressing CD38, CD56, and monotypic Ig light chain.
Blood. 1995; 85: 436-47.
4. Matsui W, Wang Q, Barber JP, et al.
Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance.
Cancer Res. 2008; 68: 190-7.
5. Yaccoby S, Barlogie B, Epstein J. et al.
Primary myeloma cells growing in SCID-hu mice: a model for studying the biology and treatment of myeloma and its manifestations.
Blood. 1998; 92: 2908-13
6. Hosen N, Matsuoka Y, Kishida S, et al.
CD138-negative clonogenic cells are plasma cells but not B cells in some multiple myeloma patients.
Leukemia. 2012; 26: 2135-41.
7. Kim D, Park CY, Medeiros BC, et al.
CD19-CD45 low/- CD38 high/CD138+ plasma cells enrich for human tumorigenic myeloma cells.
Leukemia. 2012; 26: 2530-7.
8. Vicente-Dueñas C, Romero-Camarero I, González-Herrero I, et al.
A novel molecular mechanism involved in multiple myeloma development revealed by targeting MafB to haematopoietic progenitors.
EMBO J. 2012; 31: 3704-3717
9. Leung-Hagesteijn C, Erdmann N, Cheung G, et al.
Xbp1s-negative tumor B cells and pre-plasmablasts mediate therapeutic proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma.
Cancer Cell. 2013; 24: 289-304.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

CD34陽性ヒト骨髄腫幹細胞の同定と特性解析

芹澤 憲太郎, 田中 宏和, 福井 彩乃, 藤原 亮介, 佐野 圭吾, 口分田 貴裕, 谷口 康博, 森田 泰慶, ルイス エスピノザ, 辰巳 陽一, 芦田 隆司, 松村 到

2018年 第80回日本血液学会学術集会

Identification of a Patients-Derived CD34+ Myeloma Cell Population with Tumor-Propagating Capacity and Resistance to Anticancer Drugs
Kentaro Serizawa, Hirokazu Tanaka, Ayano Fukui, Ryosuke Fujiwara, Keigo Sano, Hiroaki Inoue, Takahiro Kumode, Yasuhiro Taniguchi, Yasuyoshi Morita, Luis Espinoza and Itaru Matsumura
2017 59th American Society of Hematology Annual Meeting

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 松村 到

ローマ字氏名: (MATSUMURA, itaru)

所属研究機関名: 近畿大学

部局名: 医学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 00294083

研究分担者氏名: 森田 泰慶

ローマ字氏名: (MORITA, yasuyoshi)

所属研究機関名: 近畿大学

部局名: 医学部

職名: 講師

研究者番号(8桁): 80411594

研究分担者氏名: 頼 晋也

ローマ字氏名: (RAI, shinya)

所属研究機関名: 近畿大学

部局名: 医学部

職名: 講師

研究者番号(8桁): 70460855

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 芹澤 憲太郎

ローマ字氏名: (SERIZAWA, kentaro)

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。