

令和元年6月12日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16187

研究課題名(和文)多発性骨髄腫は交感神経によって制御されるか？

研究課題名(英文)Can sympathetic nervous system regulate multiple myeloma?

研究代表者

川野 宏樹(KAWANO, Hiroki)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：90631622

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、交感神経による骨髄腫の病態への影響について解析した。まず、各種のヒト骨髄腫細胞を用いて、特定の交感神経作動薬がin vitroにおいて、アポトーシスを誘導し骨髄腫細胞の増殖を抑制することを特定した。さらに、特定の交感神経作動薬が、骨髄腫モデルのマウスに投与することで、顕著な骨髄腫の抑制効果が確認された。さらに、アドレナリン受容体は各種の骨髄腫細胞で発現しており、作用機序をあきらかにするために、特定の交感神経受容体に関して、CRISPR/Cas9を用いた遺伝子欠損株の作成を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性骨髄腫は難治性の血液腫瘍であり、特に高齢者に好発する。これまで、複数の抗がん剤治療が開発されているが、治療後の再発も多く、根治は困難である。また、高齢者では治療による毒性も問題となり、従来の治療とは異なったアプローチが必要と考えられる。本研究成果は、骨髄腫の増殖と進展が特定の交感神経受容体刺激によって抑制できる可能性を示唆する点が新しい知見であり、生体において骨髄腫が交感神経との相互作用によって制御されていることが予想される。さらに、実際に臨床で使用される交感神経作動薬を用いてマウス実験において治療効果が確認されており、将来は臨床での応用も可能と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have analyzed the involvement of sympathetic nervous system in pathophysiology of multiple myeloma. Firstly, we have screened and specified which adrenergic receptor (AR) agonist can regulate myeloma cells in vitro, and found that a certain agonist can drastically suppress tumor growth via induction of apoptosis. Secondly, we have evaluated the efficiency of a drug that can act as an agonist for this specific receptor in murine myeloma model. We have found that this drug can significantly suppress tumor progression in vivo. We have confirmed that ARs are expressed on several kinds of myeloma cell lines. Finally, to elucidate its mechanism, we tried to delete the gene of this receptor by CRISPR/Cas9 system.

研究分野：血液内科学

キーワード：骨髄腫 交感神経受容体 抗腫瘍作用

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫（以下、骨髄腫）は難治性造血器腫瘍であり、これまで各種の抗がん剤治療が開発されているが、治癒は困難である。特に高齢者では治療の副反応が問題となり、治療を継続できないこともある。申請者の所属する研究室では、これまで造血システムが造血細胞以外の骨髄の微小環境において制御されることを明らかにしてきた。また、この骨髄の微小環境は、骨芽、血管内皮、脂肪、神経などの多様な間葉系細胞によって構成、調整されていることが近年わかってきている。従って、申請者は、造血環境の一要素である交感神経と骨髄腫病態との関連に着目し、交感神経がどのように骨髄腫の進展に影響を及ぼすか解析を行った。

2. 研究の目的

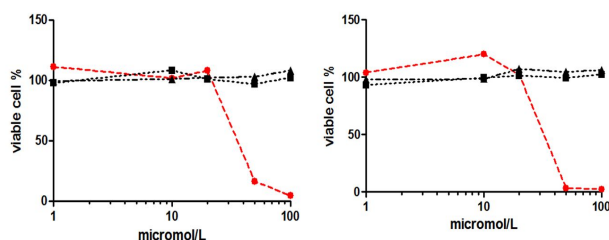
骨髄腫細胞は骨髄内の骨組織や間質細胞と作用し、腫瘍生存に有利な微小環境である骨髄腫ニッチを形成するという概念が提唱されているが、神経組織の関与は不明である。申請者は、予備実験から、交感神経を介した新たな骨髄腫増殖制御機構の存在を示唆する結果を得ており、本研究では、交感神経作動薬を用いた *in vitro* での骨髄腫細胞への作用を解析し、マウスモデルを用いた *in vivo* の系にて骨髄腫病態における交感神経の関与を解明することが目的である。

3. 研究の方法

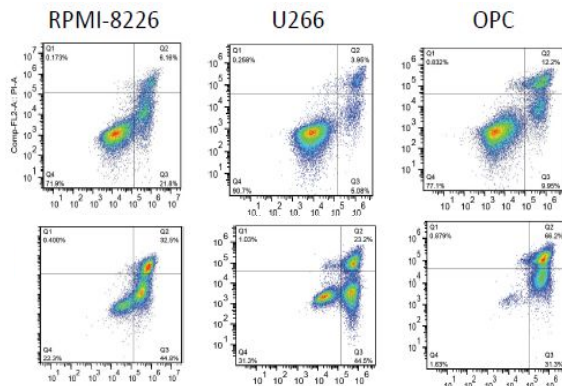
- (1) 骨髄腫細胞における交感神経受容体発現の解析：各種の骨髄腫細胞における アドレナリン受容体の mRNA 発現を PCR にて行う。
- (2) 交感神経作動薬が骨髄腫細胞に与える影響の解析：汎 アドレナリン受容体刺激薬であるイソプロテレノールまたは各種の選択的作動薬を骨髄腫細胞に投与し、細胞数の変化や、non RI 法である WST-8 を用いた細胞増殖アッセイで定量化する。アポトーシス解析は、PI/annexin V を用いたフローサイトメトリー解析にて評価する。また、骨髄腫細胞が分泌する免疫グロブリンや free light chain の分泌測定は ELISA をもちいて評価する。
- (3) 既存薬剤との相乗効果に関する検証：交感神経作動薬が、既存の抗骨髄腫薬 (bortezomib, lenalidomide, dexamethasone) と併用することで、骨髄増殖効果において相乗効果をしめすかについて、synergy 解析ソフトを用いて評価する。
- (4) 交感神経作動薬による骨髄腫細胞の増殖抑制メカニズム解析：アポトーシスや増殖シグナルに及ぼす影響について、ウェスタンブロットにて解析を行う。
- (5) マウス骨髄腫モデルにおける交感神経作動薬を用いた実験系の確立：マウス骨髄腫細胞である 5TGM1 をマウスへ投与し生着後の腫瘍進展について画像 (IVIS) 評価をおこなう。
- (6) 骨髄腫に作用する特定の交感神経受容体に関して、CRISPR/Cas9 を用いて、遺伝子欠損株作成をおこない、*in vitro* での解析やマウスに移植し腫瘍進展への影響を評価する。

4. 研究成果

- (1) 各種骨髄腫細胞 (U266, RPMI8226, OPC) において、各種交感神経受容体の発現が確認された。
- (2) 三種類の選択的 アドレナリン受容体作動薬 (:drug A, drug B, :drug C) による抗腫瘍作用の検証。drugA 選択的に、腫瘍抑制効果およびアポトーシス誘導作用が確認された。



交感神経受容体作動薬による
抗腫瘍作用
左：RPMI8226，右：U266 細胞株



交感神経受容体作動薬による
アポトーシス誘導作用：
上段 vehicle, 下段 100 μM

また、U266 細胞における IgE 分泌の抑制効果（3 日間の培養にて約 2/3 の減少あり）をみとめた。

- (3) U266 細胞株を用いて、レナリドミド、ボルテゾミブ、あるいはデキサメサゾンと選択的交感神経作動薬を併用し、細胞増殖への影響を解析したが、それぞれ明らかな相乗効果は確認されなかった。
- (4) 選択的交感神経作動薬による、アポトーシス関連蛋白への影響を解析した。U266 細胞株に、50 μM の薬剤 A を投与すると、抗アポトーシス関連の Bcl-2 の発現低下が、デキサメサゾンと同程度に確認された。また、Caspase-3 の誘導もみとめ、これらの蛋白発現の調整を介して、アポトーシスを誘導している可能性が示唆された。今後は上流の関連シグナルへの影響について検討していく予定である。
- (5) 骨髄腫モデルとして、 1×10^6 個細胞の 5TGM1-Luc マウス骨髄腫細胞を intra-tibial に移植して (day0)、腫瘍が生着したのち、day7 または day8 に、選択的交感神経作動薬の腹腔内投与 (4 mg/kg/daily) をおこなった。Day21 または day22 に IVIS をもちいて腫瘍量の評価を行い、まだ実験回数が少なく、再現性の確認が必要ではあるものの、著明な腫瘍縮小効果を認めた。
- (6) マウス骨髄腫細胞である 5TGM1-Luc 細胞株を用いて、CRISPR/Cas9 システムを用いて、責任受容体の遺伝子欠損株の作成を試みた。しかしながら、プラスミド導入効率が不良であり、物理的あるいは化学的導入法を検討したが、改善しなかった。導入した細胞のソーティングを行い、シングルセルの希釈培養をおこなったのち、増殖した細胞を回収しウェスタンブロッティングにて、蛋白発現を評価したが、有意なノックダウン細胞は得られなかった。原因として、当該受容体が細胞の生存に必要である可能性も考えられた。今後は、導入効率の改善として、異なる細胞株の選択や、レンチウイルスベクターなどの変更について検討が必要である。

本研究では、骨髄腫の増殖進展が、特定の交感神経受容体を介して制御されることを示唆するものである。骨髄腫は、主に骨髄環境において増殖進展するため、腫瘍細胞が骨髄微小環境の一因子である、交感神経によって支配されている可能性は多いにあると推測される。また、高齢者に多発する原因の一つとして、加齢による神経調整バランス異常が骨髄腫の病態に関与している可能性も考えられる。今後は、生体において交感神経刺激による骨髄腫病変への影響やメカニズムについて、さらなる解析が必要であるが、研究成果にしめすように、実際の臨床で用いられる交感神経調整薬を、過去に報告されている至適投与量と比較して、低用量の投与 (20% 程度の量) でもマウスのモデルで骨髄腫抑制効果が確認されており、将来は従来の抗がん剤とくらべ、比較的安全にもちいることができる薬剤として、臨床応用される可能性を期待できると考えられる。

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〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等：特記事項なし。

6. 研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号(8桁)：
該当なし

(2)研究協力者
研究協力者氏名：安倍 正博
ローマ字氏名：ABE, Masahiro

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。