

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591124

研究課題名 (和文)

Wnt・Rhoシグナルを分子標的とした骨髄腫の間質細胞接着依存性抗癌剤耐性の克服

研究課題名 (英文) Cell adhesion-mediated drug resistance of myeloma cells via Wnt/Rho signaling pathway.

研究代表者

小船 雅義 ( Masayoshi Kobune )

札幌医科大学医学部 講師

研究者番号：90336389

研究成果の概要：

近年、血液腫瘍に対する化学療法や分子標的療法は目覚ましい進歩をとげたが、骨髄腫や難治性白血病などでは、腫瘍細胞を骨髄から完全に排除することが出来ず、治癒を得ることは困難である。その理由として、骨髄間質と腫瘍細胞の相互作用で惹起される薬剤耐性の関与が想定されているが、その分子機構は明らかとなっていない。本研究では Wnt が細胞接着や増殖を制御することに着目し、血液腫瘍における Wnt の発現と抗癌剤耐性への関与を解析した。各種細胞株での Wnt の発現を検討した結果、骨髄腫細胞株において Wnt3 の発現が検出され、その発現量は骨髄腫細胞の stroma 細胞への接着性と相関していた。高接着性の骨髄腫細胞株の共培養で Doxorubicin に対する薬剤耐性は、stroma 細胞非存在下に比し有意に上昇したが、抗 integrin  $\beta 1$ 、Wnt inhibitor あるいは Wnt3 siRNA を用いることによって解除された。これらの結果より、骨髄腫において、Wnt3 経路は integrin  $\beta 1$  依存性薬剤耐性を惹起するために重要な役割をしており、新規治療の分子標的になる可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、血液内科学

キーワード：①骨髄腫、②Wnt、③Rhoシグナル、④骨髄間質細胞、⑤薬剤耐性

## 1. 研究開始当初の背景

近年、血液腫瘍に対する化学療法や分子標的療法は目覚ましい進歩をとげ、悪性リンパ腫や白血病の一部に長期生存が得られる症例が見られるようになった。しかしながら骨髄腫においては腫瘍細胞を根絶することが困難で、骨髄移植や近年進歩したサリドマイド

や bortezomib といった分子標的療法を併用しても、治療抵抗性の骨髄腫患者において延命効果は得られても、根治することは望めない。

最近、この治療抵抗性に腫瘍細胞と骨髄間質細胞の様々な相互作用が関与することが明らかとされている。しかしながら、ヒト骨髄

間質細胞の培養は極めて困難であり、約 20 継代程度で細胞分裂が停止してしまうことが、骨髄腫細胞とヒト間質細胞の相互作用を迅速に解析していく上での妨げとなっている。最近、申請者らはヒト骨髄間質細胞の株化に成功し、それらにおける遺伝子の発現を解析した。その結果、細胞の増殖や生存にかかわる Wnt をはじめとした様々な因子が骨髄間質細胞に発現していること、およびそれらの因子が造血前駆・幹細胞に働いて、その細胞の生存および増殖を支持することを見出した。さらに申請者らは、樹立したヒト骨髄間質細胞が腫瘍細胞に対する遊走性をもち、腫瘍に対して遊走・浸潤した後に腫瘍間質細胞として働く可能性を見出した。これらのことから申請者らは骨髄間質細胞が正常造血細胞を支持するのみならず、腫瘍間質として働き造血腫瘍細胞の生存・増殖にかかわる可能性を想定した。実際、急性骨髄白血病に関して解析した結果、薬剤抵抗性が integrin  $\alpha 4$ /integrin  $\beta 1$ (VLA-4)の発現量で規定され、急性骨髄白血病細胞が骨髄間質細胞から分泌されるフィブロネクチンへ接着することにより、抗がん剤に対する生存シグナルが惹起されることを見出した。さらに申請者らはこれらの仕事を背景にして、根治不能な骨髄腫細胞において骨髄間質細胞と integrin  $\beta 1$ の発現の関係を解析した。その結果、高接着性骨髄腫細胞株 KMS-5, ARH-77 および RPMI8226 と低接着性骨髄腫細胞株 MM1S においては、骨髄間質細胞に対する接着性に差異を認め、その接着性の強度に応じて doxorubicin に対する間質細胞依存性薬剤耐性（以下、Cell adhesion mediated drug resistance, CAM-DR）が惹起されることを見出した。しかし、その接着性を制御している機構は不明であった。

一方最近、Bリンパ球が形質細胞まで分化する過程に Wnt シグナルが関与することが見出され、形質細胞において Wnt のレセプターである frizzled が発現していることが明らかにされた。さらに、Wnt が形質細胞や骨髄腫細胞の遊走や間質細胞への浸潤能を亢進させることが基礎研究で明らかにされた。

これらのことから申請者らは Wnt シグナルが骨髄腫細胞と骨髄間質細胞との相互作用に重要な役割をもち、integrin の活性化を介し接着性 (CAM-DR) を制御する可能性を想定した。

本研究では骨髄腫細胞における CAM-DR に対する Wnt シグナルの関与を解析するとともに、CAM-DR を遮断する新規の分子標的療法を開発する目的とする。

## 2. 研究の目的

骨髄腫においては腫瘍細胞を根絶することが困難で、骨髄移植や近年進歩した分子標的療法を併用しても、治療抵抗性の骨髄腫患者

において延命効果は得られても根治することは望めない。本研究では骨髄腫細胞における CAM-DR に対する Wnt シグナルの関与を解析するとともに、CAM-DR を遮断する新規の分子標的療法を開発する目的とする。

## 3. 研究の方法

1) Wnt3-RhoA-Rho kinase シグナルを遮断することによる in vitro での薬剤耐性の解除の検討:25cm<sup>2</sup>プレートに 4x10<sup>5</sup>個のヒト骨髄間質細胞を播き 2 日間培養した後に、1x10<sup>6</sup>個の骨髄腫細胞を置き共培養する。共培養開始時に Wnt3 および Wnt5A conditioned medium、Wnt シグナル阻害因子 (Dkk-1 あるいは FRP-1) あるいは Rho-kinase 阻害剤を培養上清に添加する。共培養 24 時間後に 骨髄腫治療に使用されている doxorubicin を添加し、腫瘍細胞の生存率を MTT アッセイを用いて検討する他、アポトーシス誘導効果を解析する。また、細胞接着ペプチドおよび種々のシグナル伝達阻害剤との併用効果についてもスクリーニングする。

2) 骨髄腫細胞における Wnt の発現の解析:骨髄腫細胞株として MM1S, ARK77, KMS-5 および RPMI8226 における Wnt の発現を PCR およびウエスタンブロットにより解析する。integrin  $\beta$  鎖は、12 種の  $\alpha$  鎖と会合し、VLA を形成する。 $\alpha$  鎖に関しては flowcytometry を用いて一括スクリーニングする。

3) 骨髄腫細胞株 MM1S, ARK77, KMS-5 および RPMI8226 を stroma 細胞に接着させた後に、抗フィブロネクチン、抗ラミニン、抗 RGD ペプチドを添加し、その接着性の変化を検討する。また、接着性を低下させるペプチドのコンビネーションおよび抗インテグリン抗体のコンビネーションについて検討する。

4) Rho kinase inhibitor (Fasudil)によるシグナル in vitro での薬剤耐性の解除の検討:25cm<sup>2</sup>プレートに 4x10<sup>5</sup>個のヒト骨髄間質細胞を播き 2 日間培養した後に、1x10<sup>6</sup>個の骨髄腫細胞を置き共培養する。共培養開始時に 10  $\mu$ M の OH-fasudil あるいは抗接着ペプチドカクテルを培養上清に添加する。腫瘍細胞の増殖抑制効果は MTT アッセイを用いて検討する。

5) in vivo における骨髄腫腫瘍モデルの作成 骨髄腫腫瘍細胞株 (KMS-5) を、NOD/SCID マウスに移植することで骨髄腫モデルを作成する。

6) 抗腫瘍効果の検討に当たっては、腫瘍量を定量するために、KMS-5 にレトロウイルスベクター pRx-IRES-hrGFP を導入して GFP 標識を行う。これによりマウス骨髄内に生着した腫瘍細胞の局在を GFP で同定することで、骨髄腫細胞をスクリーニングする。

## 4. 研究成果

平成 19 年度分

1) 今回検討した 4 種の骨髄腫細胞株すべてにおいて Wnt3 の発現が検出され、その発現

量は骨髓腫細胞の stroma 細胞への接着性と相関していた。

2) 高接着性・骨髓腫細胞株のうちの 1 つである ARH-77 と stroma 細胞の共培養で Doxorubicin に対する薬剤耐性は、stroma 非存在下に比し有意に上昇したが、抗 integrin  $\beta 1$  抗体あるいは Wnt inhibitor である sFRP-1 によって約 70%まで解除されたものの、抗 integrin  $\alpha 4$  抗体で解除されなかった。

3) さらに Wnt シグナルの下流を、Rho kinase inhibitor Y27632 の添加により遮断すると、CAM-DR は stroma 非存在下のレベルまで解除された。これらの結果より、骨髓腫において、Wnt3/RhoA 経路は integrin  $\beta 1$  依存性 CAM-DR を惹起するために不可欠な役割をしている可能性が示唆された。今後、どの integrin  $\alpha$  鎖が用いられているか基礎的検討をすすめるとともに、Fasudil など人体に投与可能な Rho kinase inhibitor を用いる他、抗 integrin に関する検討を進める予定である。

平成 20 年度分

1) Fasudil などヒトに投与可能な ROCK inhibitor や、抗 integrin ペプチドを用いた in vitro の検討を行うと共に in vivo の骨髓腫動物実験モデルの確立を試みた。その結果、Fasudil の活性型：OH-Fasudil 10  $\mu\text{M}$  を作用させることで、doxorubicin および melpharan に対する CAM-DR はほぼ完全に解除されることが明らかとなった。

2) 抗 integrin  $\alpha 4, 5, 6$  および抗 integrin  $\beta 1$  抗体を作用させても、骨髓 stroma 細胞と Wnt3 高発現細胞株である KMS5 および ARH77 との接着性に変化を認めなかった。ところが、抗 RGD ペプチドである GRGDS あるいは cRGDFV で約 50%の骨髓腫細胞がストローマ細胞との接着性を失い、さらに、GRGDS と cRGDFV をコンビネーションで用いると、約 90%の骨髓腫細胞がストローマ細胞から乖離することが明らかとなった。さらに、GRGDS あるいは cRGDFV ペプチド存在下で doxorubicin に対する CAM-DR を MTT アッセイで解析した結果、著明に薬剤耐性が解除されることが明らかとなった。

3) In vivo での検討を行う目的で、KMS5 細胞を GFP 発現レトロウイルスベクターを用いてラベルし、尾静脈から静注投与したところ、骨髓、卵巣および肝に腫瘍浸潤を形成するモデルが確立できた。

#### 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 10 件)

1. Hirayama Y, Kohda K, Konuma Y, Hirata Y, Kuroda H, Fujimi Y, Shirao S, Kobune M, Takimoto R, Matsunaga T, Kato J. Late onset neutropenia and

immunoglobulin suppression of the patients with malignant lymphoma following autologous stem cell transplantation with rituximab. Intern Med. 2009;48:57-60. 査読有

2. Kobune M, Kato J, Kawano Y, Sasaki K, Uchida H, Takada K, Takahashi S, Takimoto R, Niitsu Y. Adenoviral vector-mediated transfer of the indian hedgehog gene modulates lymphomyelopoiesis in vivo. Stem Cells 2008;26:534-542. 査読有
3. Fujimi A, Matsunaga T, Kobune M, Kawano Y, Nagaya T, Tanaka I, Iyama S, Hayashi T, Sato T, Miyanishi K, Sagawa T, Sato Y, Takimoto R, Takayama T, Kato J, Gasa S, Sakai H, Tsuchida E, Ikebuchi K, Hamada H, Niitsu Y. Ex vivo large-scale generation of human red blood cells from cord blood CD34(+) cells by co-culturing with macrophages. Int J Hematol 2008;87:339-350. 査読有
4. Sato Y, Murase K, Kato J, Kobune M, Sato T, Kawano Y, Takimoto R, Takada K, Miyanishi K, Matsunaga T, Takayama T, Niitsu Y. Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone. Nat Biotechnol 2008;26:431-442. 査読有
5. Kobune M, Kawano Y, Takahashi S, Takada K, Murase K, Iyama S, Sato T, Takimoto R, Niitsu Y, Kato J. Interaction with human stromal cells enhances CXCR4 expression and engraftment of cord blood Lin-CD34- cells. Exp Hematol 2008;36:1121-1131. 査読有
6. Sato T, Machida T, Takahashi S, Murase

- K, Kawano Y, Hayashi T, Iyama S, Takada K, Kuribayashi K, Sato Y, Kobune M, Takimoto R, Matsunaga T, Kato J, Niitsu Y. Apoptosis supercedes necrosis in mitochondrial DNA-depleted Jurkat cells by cleavage of receptor-interacting protein and inhibition of lysosomal cathepsin. *J Immunol* 2008;181:197-207. 査読有
7. Iyama S, Matsunaga T, Sato T, Murase K, Araki N, Takimoto R, Kobune M, Sagawa T, Takayama T, Niitsu Y. Successful treatment of chronic myeloproliferative disease-unclassifiable (CMPD-U) with no chromosomal abnormalities by imatinib mesylate. *Intern Med* 2008;47:791-794. 査読有
8. Murase K, Matsunaga T, Hayashi T, Ishiwatari H, Araki N, Iyama S, Sato T, Kobune M, Takimoto R, Miyanishi K, Miyazaki T, Ikeda H, Kato J, Niitsu Y. Successful treatment of autoimmune pancreatitis complicated with autoimmune thrombocytopenia and interstitial pneumonia by prednisolone. *Intern Med* 2008;47:1033-1038. 査読有
9. Kobune M, Chiba H, Kato J, Kato K, Nakamura K, Kawano Y, Takada K, Takimoto R, Takayama T, Hamada H, Niitsu Y. Wnt3/RhoA/ROCK signaling pathway is involved in adhesion-mediated drug resistance of multiple myeloma in an autocrine mechanism. *Mol Cancer Ther* 2007;6:1774-1784. 査読有
10. Kato J, Kobune M, Ohkubo S, Fujikawa K, Tanaka M, Takimoto R, Takada K, Takahari D, Kawano Y, Kohgo Y, Niitsu Y. Iron/IRP-1-dependent regulation of mRNA expression for transferrin receptor, DMT1 and ferritin during human erythroid differentiation. *Exp Hematol* 2007;35:879-887. 査読有
- [学会発表] (計3件)
1. Kobune M, Murase K, Iyama S, Sato T, Kikuchi S, Kawano Y, Takada K, Miyanishi K, Takimoto R, Kato J.

- Interaction with human stromal cells enhances CXCR4 expression and engraftment of cord blood Lin-CD34-cells via Wnt signaling. In: The 50th Annual Meeting of American Society of Hematology : 2008 Dec 6-9:San Francisco, U.S.A. (Blood 2008;112:2325a)
2. Kobune M, Murase K, Iyama S, Sato T, Takimoto R, Kikuchi S, Kawano Y, Takada K, Miyanishi K, Kato J. Hedgehog inhibitors reduce the survival and drug resistance in CD34+ leukemic cells. In: The 50th Annual Meeting of American Society of Hematology : 2008 Dec 6-9:San Francisco, U.S.A. (Blood 2008;112:1611a)
3. Kobune M, Murase K, Iyama S, Sato T, Takimoto R, Kawano Y, Kikuchi S, Takada K, Miyanishi K, Sato Y, Kato J. Wnt3 signaling augments integrinβ1-dependent adhesion-mediated drug resistance of multiple myeloma in autocrine and paracrine manner. In: The 50th Annual Meeting of American Society of Hematology : 2008 Dec 6-9:San Francisco, U.S.A. (Blood 2008;112:1698a)

[図書] (計4件)

1. 加藤淳二, 小船雅義. 貧血治療指針 2008. IIIエビデンスからみた鉄剤適正使用のための指針—鉄の生理作用と過剰鉄による臓器障害. 札幌:響文社;2009, in press
2. 小船雅義, 加藤淳二. 血液疾患アプローチのための解剖生理 [病気と薬パーフェクトガイド3月増刊号 病気と薬パーフェクト BOOK 2008. 東京:南山堂;2008. pp 630-633.
3. 小船雅義, 加藤淳二, 新津洋司郎. 第1章 4鉄代謝の病態生理, フェリチン. 堀田知光, 押味和夫監修. Iron Overload 鉄キレート療法. 東京:メディカルレビュー社;2007. pp57-69.
4. 小船雅義, 新津洋司郎. 第2章 1鉄過剰症の病態と診断, 総論. 堀田知光, 押味和夫監修. Iron Overload 鉄キレート療法. 東京:メディカルレビュー社;2007. pp107-115.

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

無し

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小船 雅義 (Kobune Masayoshi)

札幌医科大学医学部 講師

研究者番号：90336389

### (2) 研究分担者

加藤 淳二 (Kato Junji)

札幌医科大学医学部 教授

研究者番号：20244345

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：