

令和 6 年 9 月 24 日現在

機関番号：32413

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07922

研究課題名（和文）エクソソーム解析に基づいた多発性骨髄腫の合併症形成メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanism elucidation of complications of multiple myeloma on exosome analysis.

研究代表者

飯島 史朗 (Iijima, Shiro)

学校法人文京学院 文京学院大学・保健医療技術学部・教授

研究者番号：30222798

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）：多発性骨髄腫の診断等に有用なバイオマーカーについて、培養細胞および細胞から放出されるMタンパクおよびエクソソームの糖鎖に着目して探索した。レクチンとの反応性を指標に検討した結果、細胞表面またはエクソソームに結合している糖鎖のうち、サイトカイン刺激に反応する複数のマーカー候補を見出した。また、多発性骨髄腫の合併症である骨融解病変の発症にエクソソームが関与しており、破骨細胞前駆細胞へのエクソソーム取り込みにエクソソーム糖鎖末端のシアル酸が関係することを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性骨髄腫の診断等には、侵襲性が高い検査が必要であることから、新たなバイオマーカーの開発が期待されている。さらに多発性骨髄腫患者に生じる全身性の合併症の発症機序はいまだ明らかになっていない。本研究では、全身へ分泌されるエクソソームをターゲットとした探索により、多発性骨髄腫に関して侵襲性の低い検査に応用して患者の負担軽減につなげることはもとより、他の固形癌においてもエクソソームが放出されていることから、新たな腫瘍マーカーの開発につながる。

研究成果の概要（英文）：We studied useful diagnostic markers for multiple myeloma by focusing on sugar chains of cultured cells, M proteins, and exosomes released from cells. Based on reactivity with lectins, we identified several marker candidates on cell surfaces or exosomes that respond to cytokine stimulation. Additionally, we suggested that exosomes are involved in the development of osteolytic lesions in patients with multiple myeloma, and that sialic acid at the terminal end of exosome sugar chains is related to the uptake of exosomes by osteoclast precursor cells.

研究分野：病態生化学

キーワード：エクソソーム 糖鎖 骨融解病変 インターロイキン6 インターロイキン27 二次元電気泳動

1. 研究開始当初の背景

- (1) 多発性骨髄腫 (**multiple myeloma; MM**) の診断等には、侵襲性が高い検査が必要であることから、新たなバイオマーカーの開発が期待されている。これまで、**MM** の新たなバイオマーカーになり得るターゲットとして、腫瘍の転移に関わるエクソソームおよび糖鎖に着目してきた。
- (2) **MM** は、全身に様々な合併症が生じる。この合併症発症には、骨髄腫細胞から分泌されるエクソソームの関与が強く疑われるものの、そのメカニズムは不明である。エクソソームの機能を明らかにすることは、エクソソームを標的とした新規治療薬や新たなバイオマーカーの開発につながる。

2. 研究の目的

- (1) 本研究では、骨髄腫由来株化細胞より分泌されたエクソソームが全身の標的細胞に取り込まれるメカニズム、および取り込まれた細胞におけるエクソソームの内包物の作用を明らかにするため、エクソソーム表面糖鎖、内包するタンパク、**miRNA** 等を解析する。
- (2) **MM** の様々な合併症発症への関与が強く疑われるエクソソームの量的・質的評価を行い、多発性骨髄腫の骨融解病変発症機序解明を目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 培養細胞から分泌されたエクソソームの回収

ヒト **MM** 細胞株 4 種 (**IM-9, RPMI8226, KMS12, KMS28-BM**) を無血清培地およびエクソソーム除去培地で培養し、培養上清を **10,000 × g, 30 分間遠心**し、さらにその上清を **100,000 × g, 60 分間遠心**してエクソソームを回収した。

- (2) 骨髄腫の増悪因子および抑制因子による刺激

多発性骨髄腫の増悪因子である **IL-6** または抑制因子である **IL-27** を用いて、各種細胞株を刺激した。刺激は、各サイトカイン濃度を **1, 10, 100 ng/mL** とし、**2, 4, 7 日間**刺激した。

- (3) エクソソーム数の測定

サイトカイン刺激後に各培養液中に放出されたエクソソーム数を、電気抵抗パルス法により測定した。

- (4) エクソソーム内包タンパク質の解析

培養上清からエクソソームを回収し、分泌されるエクソソーム数とエクソソーム内包タンパク質を 2 次元電気泳動法および銀染色法を用いて解析した。さらに、サイトカインの刺激前後で変化が見られたスポットを切り出し、トリプシン処理、質量分析後、**MASCOT** により変化したタンパク質を解析した。

- (5) エクソソーム、細胞表面、**M** タンパク糖鎖解析

糖鎖の検出には **22 種** のレクチン (**ABA, DBA, ECA, PHA-E4, PHA-L4, PNA, SBA, HAA, BPA, TL, Con A, AAL, LCA, Lotus, UEA-1, AAA, DSA, GS, WGA, LEA, MAM, SSA**) を用いた。細胞表面の解析は、これらのレクチンを用いたフローサイトメトリーと蛍光顕微鏡観察で行い、エクソソーム糖鎖はレクチンブロット法で解析した。**M** タンパク結合糖鎖については、細胞培養上清中のタンパク質を **SDS-PAGE** 法で分離後、レクチンを用いたウエスタンブロット法を用いて解析した。

- (6) エクソソームによる破骨細胞誘導の解析

破骨細胞前駆細胞 (**RAW264.7**) に骨髄腫細胞株より分離したエクソソームを添加し、培養した。また、陽性コントロールとして **RANKL** および **M-CSF** を添加し **RAW264.7** を破骨細胞に分化させた。破骨細胞への分化は、**TRAP** 染色により確認した。さらに、エクソソームへの取り込みに糖鎖が関与するか確認するため、回収したエクソソームの糖鎖をシアリダーゼ処理し、**RAW264.7** に添加して同様に検討した。また、共培養条件でのシアリダーゼ処理についても同様に検討した。

4. 研究成果

(1) 骨髄腫細胞の表面糖鎖とエクソソーム糖鎖の比較

RPMI8226 細胞および KMS12 細胞を IL-6 で 2, 4 日間刺激した結果、RPMI8226 細胞では、刺激後 2 日目まで放出されるエクソソーム数は増加傾向を示したが、KMS12 細胞では、減少傾向を示した、刺激 4 日目では放出されるエクソソーム数に変化は見られなかった。

(2) 骨髄腫細胞の表面糖鎖とエクソソーム糖鎖の比較

RPMI8226 細胞を骨髄腫の増悪因子としてのサイトカイン IL-6 と、抑制因子としてのサイトカイン IL-27 刺激では、細胞表面、エクソソーム糖鎖、M タンパク糖鎖ではレクチンとの反応が異なった。特に、エクソソーム糖鎖のうち、フコースと結合する AAL, LCA レクチンとの反応性が低く、エクソソーム分泌にフコースが関与している可能性が示唆された。

エクソソーム糖鎖が、MM の病態変化を反映するかについてレクチンとの反応性から検討した。その結果、IL-6 刺激により DBA, Lotus, GSII レクチンとの反応性が増加し、IL-27 刺激により DBA, ECA, Lotus, GSII, Con A レクチンとの反応性が増加した。すなわち、2つのサイトカイン刺激で反応性が異なった ECA および Con A レクチンとの反応する糖鎖が、MM の病態を検出するマーカーになりうると判断した。

細胞表面糖鎖の変化を同様に確認したところ、IL-6 刺激では Con A, LCA, SSA, ECA レクチンとの反応性が上昇し、そのうち Con A と ECA レクチンとの反応性は、IL-27 刺激でも上昇した。一方、IL-27 刺激では、LCA, PHA-E4, SSA レクチンとの反応性が低下し、LCA と SSA レクチンの変化は、IL-6 刺激と逆の結果となった。このことから、この2つ (LCA, SSA) のレクチンと反応する細胞表面糖鎖が、MM の病態マーカーとなる可能性がわかった。

M タンパクでは、IL-6 刺激により DBA, BPA, Lotus レクチンとの反応性、IL-27 刺激により PHA-E4 レクチンとの反応性が増加したが、特徴的な変化は見いだせなかった。

研究当初は、同じ MM 細胞から放出されるエクソソーム、細胞表面、M タンパクは、同じ糖鎖を共通でもっていると考えて進めてきたが、現時点の結果では、共通のマーカーは検出できなかった。

(3) エクソソーム内包タンパクの解析

多発性骨髄腫の増悪および抑制因子となるサイトカインで骨髄腫細胞株を刺激したときに、エクソソームの内包タンパク質で、増加または減少するものを 2 次元電気泳動法で探索した。

その結果、RPMI8226 細胞の IL-6 刺激により、スポット A (pI 9.3, MW 50 kDa)、スポット B (pI 9.2, MW 42 kDa)、スポット C (pI 9.2, MW 34 kDa)が増加した。これらのスポットを質量分析後 MASCOT 解析した結果、スポット A は ATP synthase subunit α , mitochondria、スポット B は EF1A1 (Elongation factor1- α 1)、スポット C は G3P (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)と同定した。この他に、スポット D (pI 6, MW 30kDa) とスポット E (pI 6, MW 50kDa)が増加した。また、IM9 細胞では RPMI8226 細胞と同様に、スポット D および E が増加していた。一方、IM9 細胞を、MM の抑制因子 IL-27 の刺激前後のエクソソーム内包タンパクの変化は、未刺激と比較して、スポット F (pI 10.0, MW 60 kDa) スポット C (pI 9.2, 25 ~ 34 kDa)が増加した。スポット C の増加は IL-6 刺激と同様だったが、スポット F は IL-27 独自の変化であった。以上より、スポット A, B, D, E は、MM の増悪によりエクソソーム内包量が増えるタンパクであり、MM の増悪マーカーとなり、スポット F は抑制マーカーとなりうる可能性を示唆した。

(4) エクソソームによる破骨細胞の融解病変の解析

RPMI8226 細胞より回収したエクソソームを、RAW264.7 細胞に添加し、破骨細胞への分化を観察した。その結果、エクソソーム添加により、RANKL および M-CSF の添加時と同様に TRAP 染色陽性の破骨細胞を認めた。従って、MM の全身に広がる骨融解病変には、MM 細胞から分泌されるエクソソームが関与することを明らかとした。

さらに、このときのエクソソームの取り込みに糖鎖が関与するかを検討するため、エクソソームのシアリダーゼ処理の有無が RAW264.7 細胞の分化に影響するかを確認したところ、単離したエクソソームのシアリダーゼ処理では未処理と同様の分化が観察されたが、共培養条件でシアリダーゼ処理したエクソソームで

は、**RAW264.7** 細胞の分化を誘導しないことがわかった。すなわち、エクソソームの糖鎖末端のシアル酸が、破骨細胞前駆細胞に取り込まれるために必要であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 飯島史朗.
2. 発表標題 私と電気泳動 等電点電気泳動法と歩んだ35年.
3. 学会等名 第74回日本電気泳動学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 飯島史朗, 小沼咲季, 内田裕菜, 飯島穂波, 下垣里河, 片山映.
2. 発表標題 多発性骨髄腫のバイオマーカー開発のためのM蛋白、細胞表面、エクソソーム糖鎖の解析.
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 中西勘提, 飯島史朗, 下垣里河, 伊藤悦子.
2. 発表標題 IL-6, IL-27刺激後の多発性骨髄腫細胞由来エクソソーム内包タンパクの変化の解析.
3. 学会等名 第31,32回生物試料分析化学会合同学術年次集会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 飯島史朗, 伊藤悦子, 中西勘提, 藤田美海, 石山莉瑚, 下垣里河.
2. 発表標題 多発性骨髄腫のバイオマーカー開発のための糖鎖解析.
3. 学会等名 第31,32回生物試料分析化学会合同学術年次集会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 飯島史朗, 中西勘提, 伊藤悦子, 藤田美海, 下垣里河.
2. 発表標題 サイトカイン刺激による多発性骨髄腫細胞株表面糖鎖解析.
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2021年~2022年

1. 発表者名 中西勘提, 飯島史朗, 下垣里河, 伊藤悦子.
2. 発表標題 サイトカイン刺激後の多発性骨髄腫細胞由来エクソソームタンパク変化の解析.
3. 学会等名 第60回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤悦子, 小島奈津季, 大塚幹生, 中西勘提, 下垣里河, 飯島史朗.
2. 発表標題 増悪因子刺激後の多発性骨髄腫細胞株より分泌されるエクソソームの変化.
3. 学会等名 第30回生物試料分析科学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 飯島 史朗, 伊藤 悦子, 大塚 幹生, 中西 勘提, 小守 祥裕, 下垣 里河.
2. 発表標題 エクソソーム解析による多発性骨髄腫の新たなバイオマーカー開発.
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------