

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08857

研究課題名(和文) Role of the angiocrine factor Egfl7 in multiple myeloma progression and drug resistance

研究課題名(英文) Role of the angiocrine factor Egfl7 in multiple myeloma progression and drug resistance

研究代表者

ハイジツヒ ベアーテ (Heissig, Beate)

順天堂大学・大学院医学研究科・特任准教授

研究者番号：30372931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫(MM)の病因である癌形質細胞は、上皮成長因子様ドメイン7(EGFL7)を発現することが示されています。MM細胞は機能的なEGFL7受容体インテグリン 3を発現しました。患者由来のMM細胞のEGFL7ノックダウンおよびEGFL7に対する中和抗体の投与群において、インビボでのMM細胞増殖の阻害が確認されました。MMの既存の標準治療であるボルテゾミブ(BTZ)は、MM細胞におけるEGFL7とインテグリン3の発現を増強することが示されています。したがって、この研究の結果は、EGFL7シグナル伝達の阻害がBTZ耐性MMの新しい治療戦略を示唆していることを示唆しています。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性骨髄腫(MM)は、造血器の悪性腫瘍としては2番目に高頻度であり、さらには治療薬自体の副作用、また抵抗性が問題となり、5年生存率は概ね50%、長期無病生存は5%以下と予後不良で完治の難しい疾患に該当します。従って、治療法のオプションは多い程良く、また新しい分子標的が常に望まれている疾患と言えます。本研究成果は、血管内皮から分泌されるアンジオクリン因子を通じたMMの病態制御機構という、これまでに無い、新しい観点からの疾患病態へのアプローチという点で、学術的にも極めて有意義なものと考えます。今後の臨床応用への展開が強く期待される内容と、当方は判断致しております。

研究成果の概要(英文)：We showed malignant plasma cells express angiocrine factor EGF like-7 (EGFL7) mRNA and protein. MM cells expressed the functional EGFL7 receptor integrin b 3 (ITGB3), resulting in ITGB3 phosphorylation and FAK activation. Overexpression of ITGB3 or EGFL7 enhanced MM cell adhesion and proliferation. ITGB3 overexpression upregulated the transcription factor Kruppel-like factor 2 (KLF2), which further enhanced EGFL7 transcription in MM cells, thereby establishing an EGFL7-ITGB3-KLF2-EGFL7 amplification loop that supports MM cell survival and proliferation. NOD.scid./J mice transplanted with MM cells showed elevated human plasma EGFL7 levels. EGFL7 knockdown in patient-derived MM cells and treatment with neutralizing antibodies against EGFL7 inhibited MM cell growth in vivo. The MM drug bortezomib upregulates EGFL7, ITGB3, and KLF2 expression in MM cells. Inhibition of EGFL7 signaling in synergy with BTZ may provide a novel strategy for inhibiting MM cell proliferation.

研究分野：造血

キーワード：multiple myeloma angiocrine factor proliferation integrin

### 1. 研究開始当初の背景

#### Background at the beginning of research

Multiple myeloma (MM) is a malignant disease characterized by the proliferation of clonal plasma cells within the bone marrow (BM) (1). Typical treatments for MM patients include chemotherapies like bortezomib (BTZ) combined with steroid treatment (2, 3). However, the average survival rate for myeloma patients (even while receiving treatment) is poor, ranging from 4-6 years (4, 5). Furthermore, most patients relapse or become refractory to therapies implying that drug resistance prevents effective treatment of MM.

The BM microenvironment partially protects MM cells from chemotherapy, radiotherapy, or receptor-targeting drugs by enhancing integrin-mediated cellular adhesion. Major fibronectin receptors like the Very Late Activation Antigen-4 (VLA-4), VLA-5, the integrin alphaV beta3, and B7 integrins mediate MM drug resistance (6). MM drug resistance is partially due to mutations of the integrin beta 3 (Itgb3) pathway (7, 8). Itgb3 enhances MM cell proliferation, protease secretion, invasion, and spreading (9-11).

The angiogenic factor epidermal growth factor-like-7 (Egfl7) can bind to Itgb3 and Notch receptors through the RGD motif in its EGF domain (12, 13). Egfl7 is a protein of around 30 kDa that promotes endothelial cell (EC) survival, migration, and differentiation (14, 15). Dysregulation of Egfl7 has been frequently found in several types of solid cancers, and acute myeloid leukemia (16). Egfl7 is upregulated in malignancies including leukemia (17). MM cells can secrete angiogenic factors like vascular endothelial factor that support their growth (18, 19). Lagana et al. reported high Egfl7 expression in two of the newly identified disease clusters in a large-scale study of 450 patients with newly diagnosed MM: the multiple myeloma SET domain MMSET (enriched for translocations of MMSET) and the IMM (Immune; characterized by upregulation of the human cyclin D2 gene and several genes from the S100 cancer testis antigen family) cluster (20). However, the role of Egfl7 in MM cells is not well-defined.

### 2. 研究の目的

#### Purpose of research

In this study, we examined the role of the angiocrine factor Egfl7 for multiple myeloma growth and determined its mechanism of action. Furthermore, we tested whether Egfl7 contributes to drug resistance.

### 3. 研究の方法

#### Research method

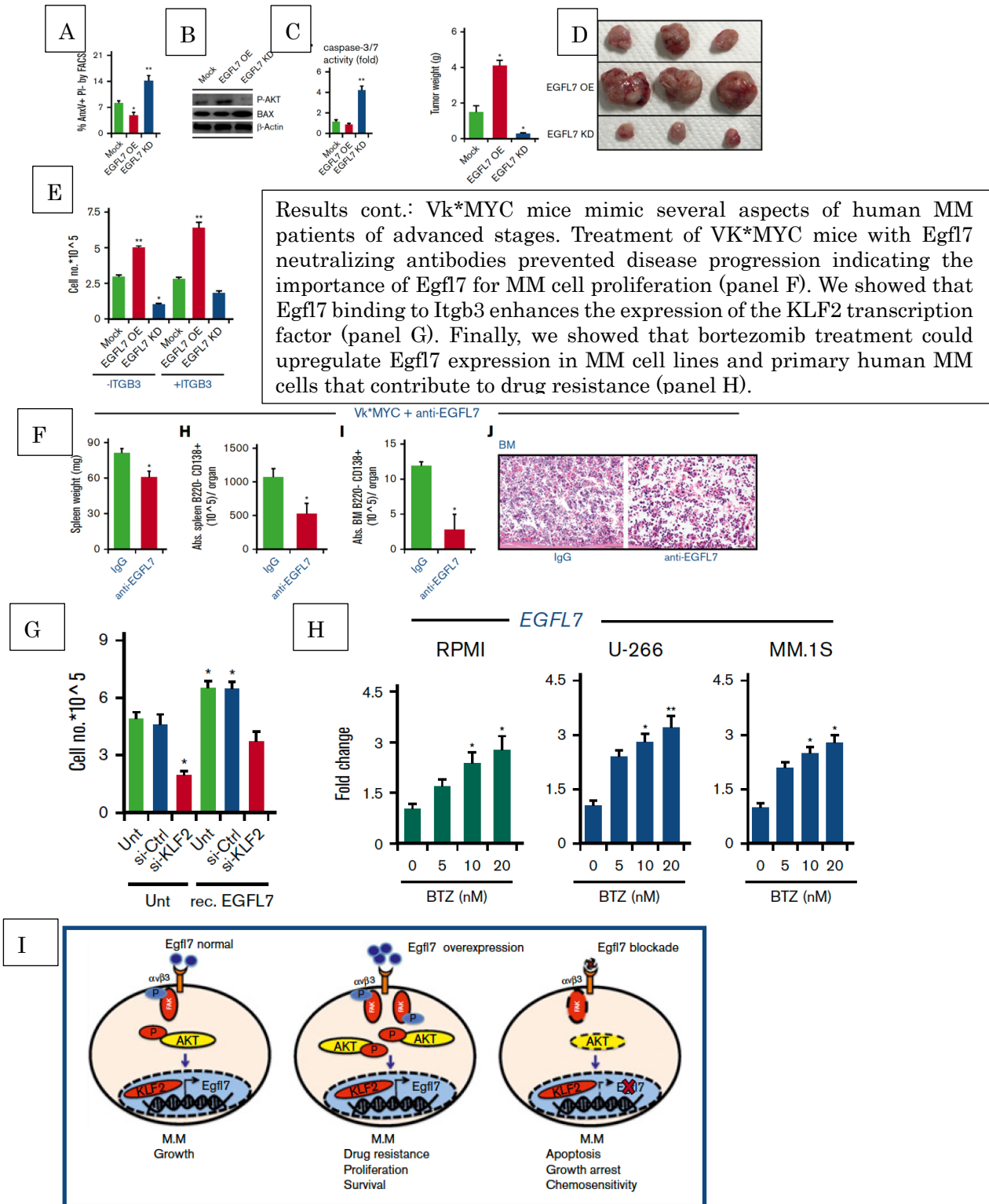
We examined multiple myeloma cell lines (human RPMI8226, MM.1S, HS-5, HL-60, HEL, U266, H929, and KMS11 cell lines) for Egfl7 expression. Cell growth after Egfl7 overexpression and knockdown was performed both in vitro and in vivo. In addition, we established the c-Myc murine MM model by transplanting c-Myc cells into C57/Bl6 mice. Finally, Vk c-MYC mice were treated with anti-EGFL7 neutralizing or IgG control antibodies.

### 4. 研究成果

#### Research results

Here, we demonstrate that MM cells express Egfl7 and Itgb3 where they convey increased proliferation and adhesion. Egfl7 enhances MM cell survival and promotes phosphorylation of AKT and anti-proliferative factor BAK expression (panels A-C). Overexpression of Egfl7 enhances MM cell growth in vivo (panel D). Co-expression of Egfl7 and integrin beta3 (Itgb3) increased MM cell proliferation in vitro (panel E).

All Data that follow have been published in **Salama et al. Blood advances, Vol. 4, 1021-37**



Results cont.: Vk\*MYC mice mimic several aspects of human MM patients of advanced stages. Treatment of VK\*MYC mice with Egfl7 neutralizing antibodies prevented disease progression indicating the importance of Egfl7 for MM cell proliferation (panel F). We showed that Egfl7 binding to Itgb3 enhances the expression of the KLF2 transcription factor (panel G). Finally, we showed that bortezomib treatment could upregulate Egfl7 expression in MM cell lines and primary human MM cells that contribute to drug resistance (panel H).

Mechanistically, Itgb3 overexpressing MM cells induced the expression of Krüppel-like factor 2 (Klf2), a transcription factor essential for MM cell survival (21). Furthermore, by using neutralizing antibodies for human Egfl7 or using Egfl7 knockdown approaches, we demonstrate that inhibition of Egfl7 and/or Itgb3 in vitro or in vivo inhibits the proliferation of MM cells. Finally, we provide data showing that the Egfl7-Itgb3-Klf3 axis contributes to MM cell resistance against the proteasome inhibitor BTZ (panel I).

Our studies indicate that Egfl7 could contribute to drug resistance to bortezomib and suggest that anti-EGFL7 antibodies could help to override drug resistance.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yousef Salama, Satoshi Takahashi, Koichi Hattori and Beate Heissig.	4. 巻 4(6)
2. 論文標題 The EGFL7-ITGB3-KLF2 axis enhances survival of multiple myeloma in preclinical models	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood Adv	6. 最初と最後の頁 1021-1037
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2019001002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sato-Okabayashi Y, Isoda K, Heissig B, Kadoguchi T, Akita K, Kitamura K, Shimada K, Hattori K, Daida H.	4. 巻 May 10; 28
2. 論文標題 Low-dose oral cyclophosphamide therapy reduces atherosclerosis progression by decreasing inflammatory cells in a murine model of atherosclerosis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Cardiol Heart Vasc	6. 最初と最後の頁 100529
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijha.2020.100529	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Heissig B, Salama Y, Osada T, Takahashi S Hattori K	4. 巻 Nov; 75
2. 論文標題 The multifaceted role of plasminogen in cancer and inflammation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular Signaling	6. 最初と最後の頁 109761
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cellsig.2020.109761.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Heissig B*, Salama Y, Takahashi S, Okumura K, Hattori K	4. 巻 13(5)
2. 論文標題 The multifaceted roles of EGFL7 in cancer and drug resistance.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1014
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers13051014.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Heissig B*, Salama Y, Osada T, Okumura K, Hattori K.	4. 巻 22(5)
2. 論文標題 The multifacted role of plasminogen in Cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Intern. J of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22052304	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Salama Y ,Andries H,Yokoyama K,Takahashi S,Hattori H,Heissig B	4. 巻 4(6)
2. 論文標題 The EGFL7- ITGB3-KLF2 axis enhances survival of multiple myeloma in preclinical models	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood Adv	6. 最初と最後の頁 1021-1037
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2019001002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件(うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Beate Heissig
2. 発表標題 The fibrinolytic factor tPA drives LRP1-mediated melanoma growth and metastasis.
3. 学会等名 American Association for Cancer Research (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Heissig Beate
2. 発表標題 The Fibrinolytic System Orchestrates the Development of Inflammation and Inflammation-Associated Carcinogenesis in the Proteolytic Niche
3. 学会等名 Gordon Conference (招待講演) (国際学会)
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
研究 分担 者	服部 浩一  (Hattori Koichi)  (10360116)	順天堂大学・大学院医学研究科・特任先任准教授   (32620)	

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
---------	---------