

機関番号：16101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591130

研究課題名 (和文) 脂質ラフト構造を標的とした多発性骨髄腫の新規治療法の開発

研究課題名 (英文) Development of novel therapy targeting lipid rafts in multiple myeloma

研究代表者

尾崎 修治 (OZAKI SHUJI)

徳島大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：90314872

研究成果の概要 (和文)：骨髄腫細胞に特異的に高発現している HM1.24 および HM1.27 を認識する新規モノクローナル抗体が骨髄腫細胞膜上の脂質ラフト構造の変化を引き起こし、細胞障害を誘導することを明らかにした。これらの抗体は薬剤抵抗性の骨髄腫幹細胞にも作用し、細胞死やコロニー形成阻害を誘導した。以上の結果から、本抗体療法は多発性骨髄腫に対する新しいターゲティング療法として重要である可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：HM1.24 and HM1.27 are specifically overexpressed in myeloma cells and monoclonal antibodies specific to these antigens induced myeloma cell death by aggregation of lipid rafts. These antibodies mediated cell death and inhibited colony formation of myeloma stem cells. These results suggest that the antibody therapy targeting lipids rafts will be an important strategy for the treatment of multiple myeloma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：血液内科学

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫は難治性の造血器腫瘍であり、治癒を目指した新しい治療戦略の開発が求められている。近年の細胞生物学的研究の進歩により、サイトカイン受容体や接着分子を介した骨髄腫細胞の増殖機構が明らかにされてきたが、個々のシグナル経路を遮断しても別の経路が活性化され、現在までに有効な治療法は確立されていない。従って、これまでの手法とは異なる新しい作用機序による治療法を確立する必要がある。

2. 研究の目的

細胞情報伝達に関与する多くの分子が生体膜上の脂質ラフト構造に集積していることから、我々が開発した新規モノクローナル抗体はこの複合体に構造変化をきたすものと推測された。そこで、本抗体が骨髄腫細胞の脂質ラフトやサイトカイン受容体、ならびに細胞の増殖に及ぼす影響を明らかにし、抗体療法の有効性を探ることを目的として本研究を計画した。

3. 研究の方法

- (1) 既に作製した骨髄腫特異抗体 (HM1. 24 抗体と HM1. 27 抗体) を用い、共焦点レーザー顕微鏡下で抗体の反応性と脂質ラフト構造の変化について観察した。
- (2) 細胞内アクチンやシグナル伝達分子の変化は、蛍光標識した特異抗体を用いて免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。
- (3) ウェスタンブロット法により、サイトカイン受容体を介するシグナル伝達への影響を検討した。
- (4) 細胞障害活性は WST-8 細胞増殖試験を用いて測定した。
- (5) 骨髄腫幹細胞は Hoechst33342 で染色後、セルソーターにより side population 分画をソートすることにより純化した。
- (6) 転写因子の mRNA 発現は PCR 法にて測定した。
- (7) メチルセルロース培地を用いて骨髄腫細胞のコロニー形成能を測定した。

4. 研究成果

(1) 抗体による細胞障害

HM1. 24 抗体と HM1. 27 抗体を骨髄腫細胞株 RPMI 8226 に添加し、細胞増殖に及ぼす影響について検討した。HM1. 24 抗体よりも HM1. 27 抗体の方が濃度依存的により強力な細胞障害を誘導した。そこで、以下の研究では HM1. 27 抗体について検討を進めた。

(2) HM1. 27 抗体による脂質ラフトの構造変化

Alexa 488 標識した HM1. 27 抗体を骨髄腫細胞株 RPMI 8226 に加えた後、37°C で 60 分間培養した。その後、サイトスピン標本を作製し、脂質ラフトを検出する Alexa 594 標識 cholera toxin subunit B で染色し、抗体と脂質ラフトの局在を観察した。培養前には抗体と脂質ラフトは共に局在していたが、60 分後には抗体は capping により脂質ラフトの局在変化を引き起こした。

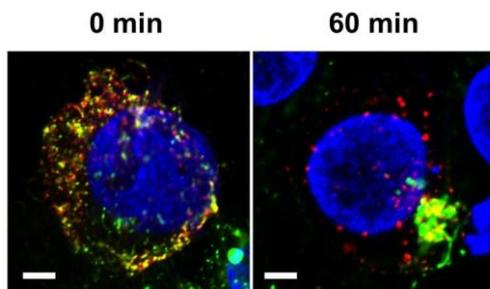


図 1 HM1. 27 抗体と脂質ラフトの局在変化

(3) HM1. 27 抗体によるサイトカインシグナルへの影響

HM1. 27 抗体による脂質ラフト構造の変化

が明らかとなったことから、局在するサイトカイン受容体の機能について検討を加えた。RPMI 8226 細胞を HM1. 27 抗体の存在下に培養し、IL-6 や IGF-1 で刺激した後、MAPK, STAT3, Akt のリン酸化の有無をウェスタンブロット法にて検討した。MAPK, STAT3, Akt は HM1. 27 抗体の前処理にかかわらず、サイトカインの添加によりリン酸化されたことから、Ras/MAPK, Jak/STAT, PI3K/Akt のシグナル伝達は阻害されないことが示された。

次に、HM1. 27 抗体の処理後にサイトスピン標本を作製し、Alexa 488 標識 phalloidin で染色し、細胞骨格アクチンの構造変化について検討した。同時に幹細胞性の維持に重要な活性型 b-catenin の局在について Alexa568 標識特異抗体を用いて免疫染色を行ったところ、HM1. 27 抗体の存在下では著明なアクチン凝集が誘導され、b-catenin の発現が低下していることが明らかとなった。

このことから、HM1. 27 抗体は骨髄腫の主な増殖因子である IL-6 や IGF-1 の受容体を介するシグナルは抑制しないが、脂質ラフトとアクチンの凝集を介して Wnt/b-catenin 経路を障害することが明らかとなった。

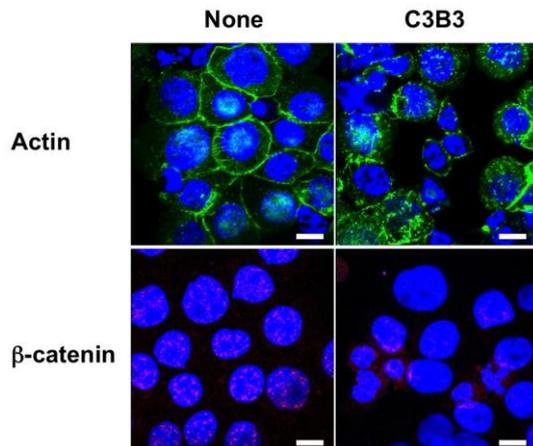


図 2 HM1. 27 抗体 (C3B3) による活性型 b-catenin の抑制

(4) HM1. 27 抗体の骨髄幹細胞に及ぼす影響

さらに、骨髄腫幹細胞に対する HM1. 27 抗体の効果について検討した。Side population (SP) 分画の細胞を純化し、薬剤耐性に関与する ABC トランスポーターの発現を検討したところ、ABCG2 が高発現していた。また、薬剤に対する感受性を main population (MP) 分画の細胞と比較したところ、SP 細胞は MP 細胞よりも melphalan (Mel) や bortezomib (Bor) などの抗がん剤に抵抗性を示した。しかしながら、HM1. 27 抗体 (C3B3) は MP 分画細胞と同様に SP 分画細胞にも細胞障害を誘導した。

このことから、HM1. 27 抗体は薬剤抵抗性の細胞分画に対しても同様の抗腫瘍効果を発

揮ることが示された。

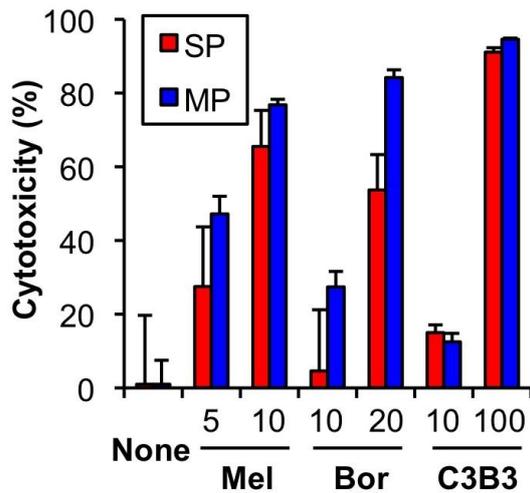


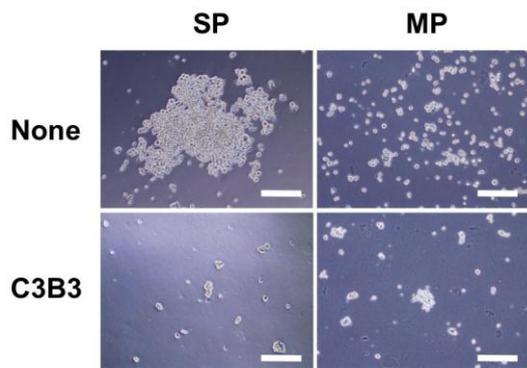
図3 SP分画とMP分画に対する各種薬剤の細胞障害活性

(5) 骨髄腫細胞コロニー形成能に及ぼす影響

RPMI 8226 細胞の SP 分画と MP 分画における骨髄腫細胞コロニー形成能を比較した。SP 分画細胞はメチルセルロース培地で 14 日間培養後、コロニーを形成したが、MP 分画細胞にはコロニー形成は認められなかった。また、HM1.27 抗体で前処理した後にコロニー形成を比較したところ、抗体を添加した細胞ではコロニー形成が著明に抑制された。

このことから、HM1.27 は骨髄幹細胞に作用し、腫瘍形成能を抑制することが示された。

図4 骨髄腫コロニー形成における HM1.27 抗体の抑制効果



(6) 幹細胞因子の発現変化

骨髄幹細胞に対する HM1.27 抗体の作用機序を解明するため、幹細胞の維持に重要な転写因子である SOX2 や Oct3/4 の mRNA の発現を PCR 法にて検討した。RPMI 8226 細胞を HM1.27 抗体で処理した後は、SOX2 や Oct3/4 の発現が低下しており、このことが幹細胞性

の維持や細胞の生存に影響を及ぼした可能性が示唆された。

以上の結果から、本抗体療法は多発性骨髄腫に治療をもたらす可能性を有する新しいターゲティング療法であり、臨床的にも意義が大きいものと考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- 1) Ozaki S, Harada T, Fujii S, Nakamura S, Miki H, Nakano A, Kagawa K, Takeuchi K, Abe M, Matsumoto T. Transient inflammatory reaction during lenalidomide plus reduced-dose dexamethasone therapy in two patients with relapsed multiple myeloma. *Int J Hematol* 93: 257-259, 2011 査読有
- 2) Nakamura M, Ozaki S, Abe M, Doi H, Matsumoto T, Ishimura K. Size-controlled synthesis, surface functionalization, and biological applications of thiol-organosilica particles. *Colloids Surf B Biointerfaces* 79: 19-26, 2010 査読有
- 3) Takeuchi K, Abe M, Hiasa M, Oda A, Amou H, Kido S, Harada T, Tanaka O, Miki H, Nakamura S, Nakano A, Kagawa K, Yata K, Ozaki S, Matsumoto T. TGF- β inhibition restores terminal osteoblast differentiation to suppress myeloma growth. *PLoS ONE* 5: e9870, 2010 査読有
- 4) Hiasa M, Abe M, Nakano A, Oda A, Amou H, Kido S, Takeuchi K, Kagawa K, Yata K, Hashimoto T, Ozaki S, Asaoka K, Tanaka E, Moriyama K, Matsumoto T. GM-CSF and IL-4 induce dendritic cell differentiation and disrupt osteoclastogenesis through M-CSF receptor shedding by up-regulation of TNF-alpha converting enzyme (TACE). *Blood* 114: 4517-4526, 2009 査読有
- 5) Kodama T, Abe M, Iida S, Ozaki S, Sakai A, Sawamura M, Shimazaki C, Miyata A, Wakayama T, Murakami H. A pharmacokinetic study evaluating the relationship between treatment efficacy and incidence of adverse events with thalidomide plasma concentrations in patients with refractory multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma* 9: 154-159, 2009 査読有
- 6) Wang W, Nishioka Y, Ozaki S, Jalili A, Abe S, Kakiuchi S, Kishuku M, Minakuchi

- K, Matsumoto T, Sone S. HM1.24 (CD317) is a novel target against lung cancer for immunotherapy using anti-HM1.24 antibody. *Cancer Immunol Immunother* 58: 967-976, 2009 査読有
- 7) Miki H, Ozaki S, Tanaka O, Lee E, Takimoto T, Watanabe H, Fujii S, Nakamura S, Kagawa K, Takeuchi K, Yata KI, Abe M, Kagami S, Matsumoto T. Marked improvement of platelet transfusion refractoriness after bortezomib therapy in multiple myeloma. *Int J Hematol* 89 : 223-226, 2009 査読有
- 8) Abe M, Hiura K, Ozaki S, Kido S, Matsumoto T. Vicious cycle between myeloma cell binding to bone marrow stromal cells via VLA-4-VCAM-1 adhesion and macrophage inflammatory protein-1alpha and MIP-1beta production. *J Bone Miner Metab* 27: 16-23, 2009 査読有
- 9) Wang W, Nishioka Y, Ozaki S, Jalili A, Verma VK, Hanibuchi M, Abe S, Minakuchi K, Matsumoto T, Sone S. Chimeric and humanized anti-HM1.24 antibodies mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity against lung cancer cells. *Lung Cancer* 63: 23-31, 2009 査読有
- 10) Kawai S, Azuma Y, Fujii E, Furugaki K, Ozaki S, Matsumoto T, Kosaka M, Yamada-Okabe H. Interferon-alpha enhances CD317 expression and the antitumor activity of anti-CD317 monoclonal antibody in renal cell carcinoma xenograft models. *Cancer Sci* 99: 2461-2466, 2008 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- 1) 池亀彰茂, 尾崎修治, 辻 大輔, 原田武志, 中村信元, 三木浩和, 中野綾子, 賀川久美子, 竹内恭子, 矢田健一郎, 安倍正博, 伊藤孝司, 松本俊夫. HLA class I に特異的な single-chain Fv diabody は骨髄腫細胞の side population 分画に傷害を及ぼす. 第 72 回日本血液学会総会 2010. 9. 24-26. パシフィコ横浜
- 2) Akishige Ikegame, Shuji Ozaki, Daisuke Tsuji, Takeshi Harada, Shingen Nakamura, Hirokazu Miki, Ayako Nakano, Kumiko Kagawa, Kyoko Takeuchi, Ken-ichiro Yata, Masahiro Abe, Kohji Itoh, and Toshio Matsumoto. A recombinant HLA class I-specific single-chain Fv diabody can target cancer stem cell-like side population cells in multiple myeloma. 51th Annual Meeting of the American

Society of Hematology 2009. 12. 5-8. New Orleans, Louisiana, USA

- 3) 池亀彰茂, 尾崎修治, 辻 大輔, 原田武志, 中村信元, 三木浩和, 中野綾子, 賀川久美子, 竹内恭子, 矢田健一郎, 安倍正博, 伊藤孝司, 松本俊夫. 骨髄腫細胞の side population を標的とした HLA class I に特異的な scFv diabody の抗腫瘍効果. 第 71 回日本血液学会総会 2009. 10. 23-25. 国立京都国際会館
- 4) Hirokazu Miki, Shuji Ozaki, Osamu Tanaka, Shingen Nakamura, Ayako Nakano, Kumiko Kagawa, Kyoko Takeuchi, Ken-ichiro Yata, Masahiro Abe, and Toshio Matsumoto. KRN5500, a spicamycin derivative, exerts anti-myeloma effects through impairing both myeloma cells and osteoclasts. 50th Annual Meeting of the American Society of Hematology 2008. 12. 6-9. San Francisco, CA, USA
- 5) 三木浩和, 尾崎修治, 田中 修, 藤井志朗, 中村信元, 賀川久美子, 竹内恭子, 坂井 晃, 矢田健一郎, 安倍正博, 松本俊夫. Spicamycin 誘導体 KRN5500 は骨髄腫細胞とともに破骨細胞の生存を抑制し, 抗腫瘍効果を発揮する. 第 70 回 日本血液学会総会 2008.10.10-12. 国立京都国際会館

[図書] (計 1 件)

- 1) Ozaki S. Biologic therapies for multiple myeloma and plasma cell disorders. *Emerging Protein Biotherapeutics*. Editor Iqbal S. Grewal, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, p267-279, 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾崎 修治 (OZAKI SHUJI)
研究者番号 : 90314872