

令和 5 年 5 月 4 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08761

研究課題名(和文) 多発性骨髄腫の髄外増幅形成と薬剤耐性獲得機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanisms of extramedullary disease development and drug resistance in multiple myeloma.

研究代表者

菊池 次郎 (Kikuchi, Jiro)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60371035

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)：多発性骨髄腫の予後不良因子である髄外増幅の発症と予後悪化の機序は未解明であった。私たちは、骨髄腫細胞株を骨髄ストローマ細胞との共培養時にシエアストレスを加えると、骨髄腫細胞同士が凝集した細胞塊形成を見いだした。細胞塊形成は、ストローマ細胞の産生するヒアルロン酸(HA)と骨髄腫細胞に発現するCD44との結合を介しており、マウス骨髄腫モデルへのHA投与は髄外増幅を発症させた。一方、細胞塊の形成はCD44を切断、細胞内領域がプロテアソーム阻害剤耐性に働く機序を明らかにした。以上より、HAとCD44を介した経路が髄外増幅発症と薬剤耐性の獲得に働き、予後を悪化させる機序が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者が見出したシエアストレス下における骨髄腫細胞塊の形成は前例のない独自のモデルである。このモデルにより骨髄腫細胞同士の相互作用の役割や、薬剤耐性獲得における新たな機序解明の進展が期待できるなど、本研究には極めて高い学術的独創性が示唆される。また、髄外増幅発症と薬剤耐性獲得機序の解明は、その予防や克服に有効な新規治療法の開発を介して予後を改善する効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)： Elucidating the mechanism of extramedullary disease (EMD) development would contribute to improvement of treatment outcome in patients with MM. Here, we show that bone marrow stroma cell-derived hyaluronan (HA) elicits homophilic interactions of MM cells by binding to surface CD44 variants, under physiological shear stress and generates cell clusters that might develop into EMD. We recapitulated the development of EMD via administration of HA in a syngeneic murine MM model in a CD44-dependent manner. HA-induced MM cell clusters exhibited the specific resistance to proteasome inhibitors (PIs) via α -secretase-mediated cleavage of the intracellular domains of CD44, which in turn transactivated PI resistance-inducible genes. Anti-CD44 antibody or α -secretase inhibitors readily suppressed the development of EMD and significantly prolonged the survival of recipients. The HA-CD44 axis represents a novel pathway to trigger EMD development and could be a target of the treatment of EMD.

研究分野：血液学、腫瘍内科学

キーワード：多発性骨髄腫 髄外増幅 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫は、現在も約 40%が 6 年以内に死亡する難治性の造血器腫瘍であり、さらなる治療成績の向上が望まれている。治療には抗がん剤と骨髄移植が施されるが、完全奏効に至ることはまれで、数年後には再燃し治療抵抗性を獲得する。特に、骨髄腫細胞が肝臓、皮下や軟部組織などに転移、細胞塊を形成しながら増幅する髄外増幅が発症すると、さらに予後が悪化する。しかしながら、その発症と予後悪化に至る機序は未解明であった。

2. 研究の目的

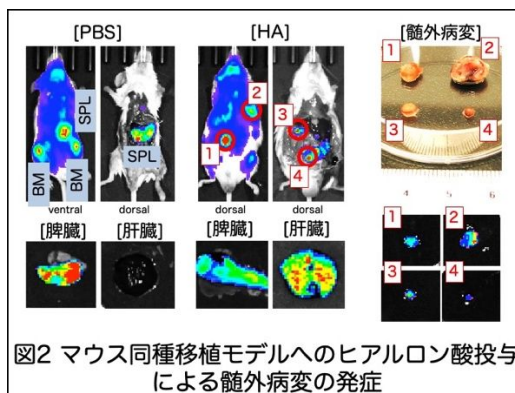
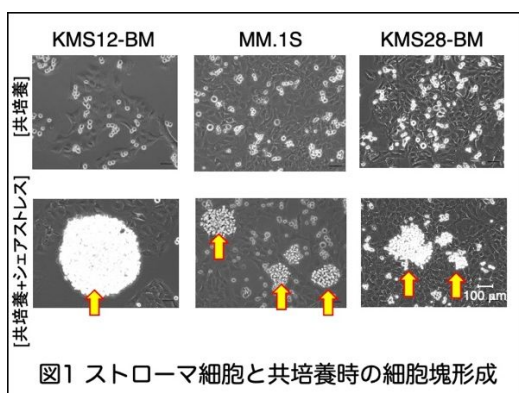
私たちは、骨髄腫細胞株を骨髄ストローマ細胞と共培養、ここへ振盪により血流と同程度のシェアストレスを加えた結果、骨髄腫細胞同士が凝集した細胞塊の形成を見いだした。そこで、細胞塊の形成機序の解明が、髄外増幅発症と薬剤耐性獲得機序の解明に有効と考えた。本研究では、骨髄腫細胞の細胞塊形成モデルを用いて、1) 細胞塊形成と薬剤耐性獲得の責任分子の解明、2) 髄外増幅を形成するマウスモデルを樹立、3) 細胞塊形成と薬剤耐性克服に有効な治療薬のスクリーニング等から、髄外増幅発症例に有効な治療法の開発を進め、予後の改善を目指す。

3. 研究の方法

- (1) CD44 を含む接着分子に対する中和抗体を用いて細胞塊形成の責任分子を同定する。
- (2) 骨髄ストローマ細胞の産生する液性因子(SDF-1、IL-6、IGF-1、ヒアルロン酸、SCF など)の中から細胞塊形成の責任分子を同定する。
- (3) 細胞塊形成に伴う薬剤感受性を解析し、細胞間相互作用に関わる分子に対する抗体やゲノム編集によるノックアウトにより薬剤耐性獲得の責任分子を同定する。
- (4) マイクロアレイ解析により細胞塊形成時の遺伝子発現変化とシグナル伝達機序をスクリーニングし薬剤耐性獲得の責任分子を同定する。
- (5) CD44 の正常型(CD44s)とバリエーション(CD44v)の発現様式を解析し、細胞塊形成を誘導する CD44v を同定する。CD44v を強発現させた骨髄腫細胞株をマウスに移植、ヒアルロン酸投与により髄外増幅を形成するマウスモデルを樹立する。なお、申請者らはルシフェラーゼ遺伝子を導入した骨髄腫細胞株を骨髄内で増殖可能なマウスモデルを有している(J Clin Invest, 125, 4375, 2015)。このマウスモデルにより骨髄腫細胞の局在と増殖、髄外増幅の有無を経時的かつ定量的に解析できる。
- (6) 阻害剤ライブラリー(化学療法基盤支援活動より入手)や shRNA を用いた網羅的スクリーニングから、薬剤耐性獲得の責任分子の発現抑制や活性阻害を介して薬剤耐性克服に有効な治療薬を探索する。
- (7) 先のマウスモデルを用いて候補薬剤の有効性を検証する。
- (8) 髄外増幅を有する患者を含む骨髄腫患者由来の細胞における細胞塊形成能、CD44 や Notch 関連分子の発現様式、血清中ヒアルロン酸濃度を解析、髄外増幅の有無との関連を解析する。

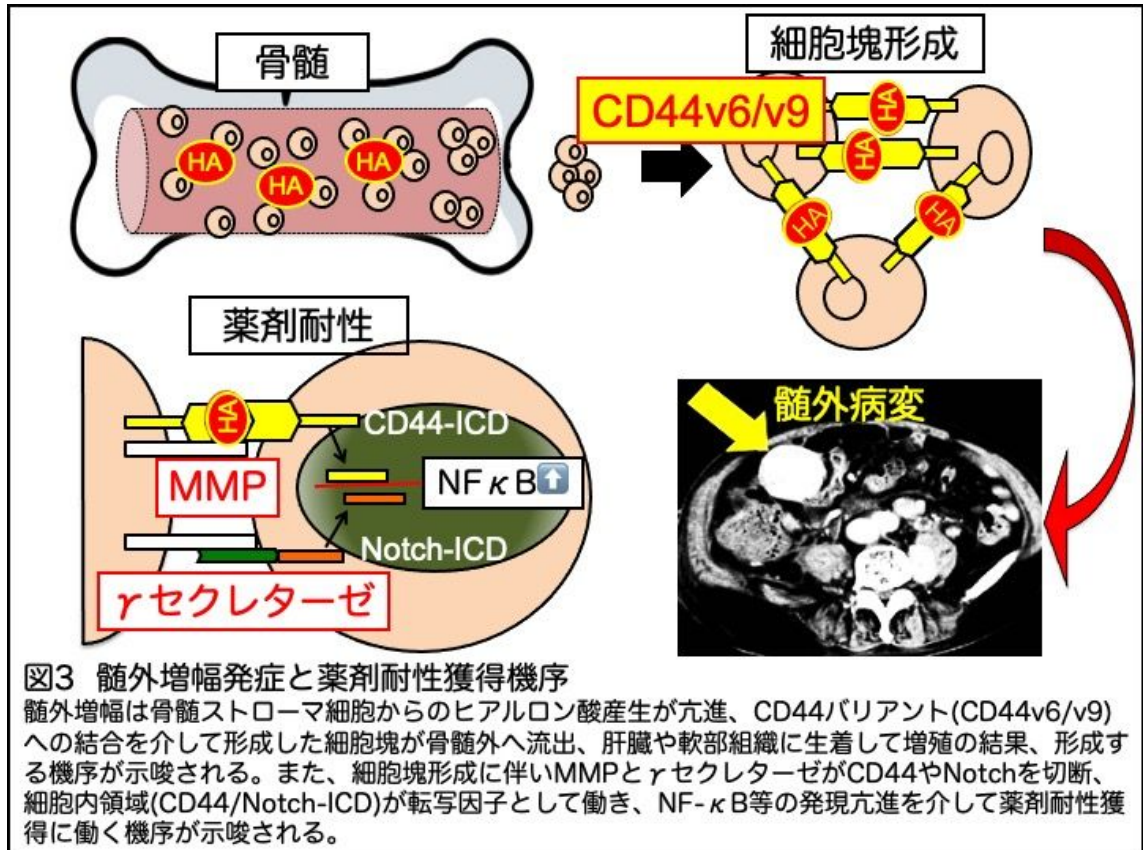
4. 研究成果

- (1) 細胞塊形成は、ストローマ細胞の産生するヒアルロン酸が骨髄腫細胞に発現する CD44 に結合、ここへ血流と同程度のシストレスが加わるとヒアルロン酸を介して細胞同士が凝集し、形成することを明らかにした(図 1)。
- (2) 髄外増幅を発症した患者血清中のヒアルロン酸濃度を解析の結果、髄外増幅を発症していない患者や健常人よりも有意に高濃度であることがわかった。また、全症例で CD44 の発現、中でも細胞外領域の長い CD44 バリエントの発現が検出された。
- (3) 骨髄腫患者由来細胞及び細胞株において、細胞塊形成は CD44 バリエント発現細胞に特異的であった。
- (4) CD44 バリエント発現陽性の骨髄腫細胞株を移植したマウス骨髄腫モデルにヒアルロン酸を投与すると、ほとんどのマウスに髄外増幅の発症が確認されるとともに、生存期間が有意に短くなるなど、骨髄腫患者で見られる病態がよく反映されていた(図 2)。



- (5) ヒアルロン酸投与前の CD44 抗体の投与が、髄外増幅発症の抑制と生存期間延長に有効であった。
- (6) 細胞塊の形成は骨髄腫のキードラッグであるプロテアソーム阻害剤耐性を示した。
- (7) 細胞塊形成に伴いマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)と セクレターゼが CD44 や Notch を切断、転写因子として働く CD44-ICD、Notch-ICD の形成を見出し、これが耐性獲得に働く可能性を明らかにした。
- (8) MMP 阻害剤や セクレターゼ阻害剤が、*in vitro* 及びマウスモデルを用いた *in vivo* でプロテアソーム阻害剤耐性の解除に有効であった。

以上より、髄外増幅発症機序とプロテアソーム阻害剤耐性の獲得が予後悪化に働く可能性を明らかにした(図 3)(Kikuchi J. et al. Blood Adv. 7: 508-524, 2023)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kuroda Yoshiaki, Koyama Daisuke, Kikuchi Jiro, Mori Shigehisa, Ichinohe Tatsuo, Furukawa Yusuke.	4. 巻 111
2. 論文標題 Autophagic degradation of NOXA underlies stroma cell-mediated resistance to proteasome inhibitors in mantle cell lymphoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Leukemia Research	6. 最初と最後の頁 196672
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.leukres.2021.106672	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 -
1. 著者名 Osada Naoki, Kikuchi Jiro, Koyama Daisuke, Kuroda Yoshiaki, Yasui Hiroshi, Levenson JD, Furukawa Yusuke.	4. 巻 106
2. 論文標題 mTOR inhibitors sensitize multiple myeloma cells to venetoclax via IKZF3 and Blimp-1-mediated Bcl-2 up-regulation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 3008-3013
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2021.278506	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 該当する
1. 著者名 Kikuchi Jiro, Osada Naoki, Furukawa Yusuke.	4. 巻 11
2. 論文標題 A suitable anti-myeloma drug to overcome drug resistance in bone marrow microenvironment.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Myeloma	6. 最初と最後の頁 7-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -
1. 著者名 Kuroda Yoshiaki, Yashima-Abo Akiko, Koyama Daisuke, Kikuchi Jiro, Mori Shigehisa, Ito Shigeki, Furukawa Yusuke.	4. 巻 35
2. 論文標題 Bone marrow stromal cell-mediated degradation of CD20 leads to primary rituximab resistance in mantle cell lymphoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 1506-1510
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-020-01035-x	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 -

1. 著者名 Koyama Daisuke, Kikuchi Jiro, Kuroda Yoshiaki, Ohta Masatsugu, Furukawa Yusuke.	4. 巻 112
2. 論文標題 AMPK hyperactivation primes cytoplasmic translocation and autophagic degradation of the BCR-ABL protein in chronic myeloid leukemia cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 194-204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14698	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 -

1. 著者名 Furukawa Yusuke, Kikuchi Jiro	4. 巻 111
2. 論文標題 Molecular basis of clonal evolution in multiple myeloma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 496 ~ 511
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-020-02829-6	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 -

1. 著者名 Nagamachi Akiko, Kikuchi Jiro, Kanai Akinori, Furukawa Yusuke, Inaba Toshiya	4. 巻 105
2. 論文標題 Kinetics of cytokine receptor internalization under steady-state conditions affects growth of neighboring blood cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 e325 ~ e327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2019.232959	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 -

1. 著者名 Kikuchi Jiro, Hori Mitsuo, Iha Hidekatsu, Toyama-Sorimachi Noriko, Hagiwara Shotaro, Kuroda Yoshiaki, Koyama Daisuke, Izumi Tohru, Yasui Hiroshi, Suzuki Atsushi, Furukawa Yusuke	4. 巻 34
2. 論文標題 Soluble SLAMF7 promotes the growth of myeloma cells via homophilic interaction with surface SLAMF7	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 180 ~ 195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-019-0525-6	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 -

1. 著者名 Kikuchi Jiro, Kodama Nobuyuki, Takeshita Msataka, Ikeda Sho, Kobayashi Takahiro, Kuroda Yoshiaki, Uchiyama Michihiro, Osada Naoki, Bogen Bjarne, Yasui Hiroshi, Takahashi Naoto, Miwa Akiyoshi, Furukawa Yusuke	4. 巻 7
2. 論文標題 EMD originates from hyaluronan-induced homophilic interactions of CD44 variant-expressing MM cells under shear stress	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 508-524
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2022007291	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 -

1. 著者名 Yamamoto Naoki, Kikuchi Jiro, Furukawa Yusuke, Shibayama Naoya	4. 巻 17
2. 論文標題 Fast in-vitro screening of FLT3-ITD inhibitors using silkworm-baculovirus protein expression system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0261699
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2022007291	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13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Kikuchi Jiro, Kodama Nobuyuki, Takeshita Masataka, Hijima Tomoko, Ikeda Sho, Kobayashi Takahiro, Kuroda Yoshiaki, Uchiyama Michihiro, Osada Naoki, Koyama Daisuke, Bogen Bjarne, Yasui Hiroshi, Takahashi Naoto, Miwa Akiyoshi, Furukawa Yusuke
2. 発表標題 Extramedullary diseases originate from hyaluronan-induced homophilic cell-cell interaction of myeloma cells.
3. 学会等名 第46回日本骨髄腫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Osada Naoki, Kikuchi Jiro, Koyama Daisuke, Kuroda Yoshiaki, Yasui Hiroshi, Levenson JD, Furukawa Yusuke.
2. 発表標題 Identification of suitable drugs to be combined with venetoclax for the treatment of multiple myeloma
3. 学会等名 第46回日本骨髄腫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kikuchi Jiro, Kodama Nobuyuki, Takeshita Masataka, Hijima Tomoko, Ikeda Sho, Kobayashi Takahiro, Kuroda Yoshiaki, Uchiyama Michihiro, Osada Naoki, Koyama Daisuke, Bogen Bjarne, Yasui Hiroshi, Takahashi Naoto, Miwa Akiyoshi, Furukawa Yusuke
2. 発表標題 Extramedullary diseases originate from hyaluronan-induced homophilic cell-cell interaction of myeloma cells.
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Osada Naoki, Kikuchi Jiro, Yasui Hiroshi, Furukawa Yusuke.
2. 発表標題 c-FOS mediates IMiDs resistance acting as a co-activator of IKZF1-target genes in multiple myeloma.
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kikuchi Jiro, Hori Mitsuo, Iha Hidekatsu, Toyama-Sorimachi Noriko, Hagiwara Shotaro, Kuroda Yoshiaki, Koyama Daisuke, Izumi Tohru, Yasui Hiroshi, Suzuki Atsushi, Furukawa Yusuke
2. 発表標題 Soluble SLAMF7 promotes the growth of myeloma cells via homophilic interaction with surface SLAMF7
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Koyama Daisuke, Kikuchi Jiro, Kuroda Yoshiaki, Ohta Masatsugu, Furukawa Yusuke
2. 発表標題 AMP activated protein kinase activation primes cytoplasmic translocation and autophagic degradation of the BCR ABL protein in CML cells
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名	Kuroda Yoshiaki、Yashima-Abo Akiko、Koyama Daisuke、Kikuchi Jiro、Mori Shigehisa、Ito Shigeki、Furukawa Yusuke
2. 発表標題	Bone marrow stromal cell-mediated degradation of CD20 leads to primary rituximab resistance in mantle cell lymphoma
3. 学会等名	第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	Nagamachi Akiko、Kikuchi Jiro、Kanai Akinori、Furukawa Yusuke、Inaba Toshiya
2. 発表標題	Kinetics of cytokine receptor internalization under steady-state conditions affects growth of neighboring blood cells
3. 学会等名	第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	Kikuchi Jiro, Kodama Nobuyuki, Takeshita Msataka, Ikeda Sho, Kobayashi Takahiro, Kuroda Yoshiaki, Uchiyama Michihiro, Osada Naoki, Bogen Bjarne, Yasui Hiroshi, Takahashi Naoto, Miwa Akiyoshi, Furukawa Yusuke
2. 発表標題	Extramedullary diseases originate from hyaluronan-induced homophilic cell-cell interaction of myeloma cells.
3. 学会等名	第47回日本骨髓腫学会学術集会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	Osada Naoki, Kikuchi Jiro, Yasui Hiroshi, Furukawa Yusuke.
2. 発表標題	c-FOS mediates IMiDs resistance by acting as a co-activator of IKZF1-target genes in multiple myeloma
3. 学会等名	第47回日本骨髓腫学会学術集会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名 Tenshin Hirofumi, Harada Takeshi, Inoue Yusuke, Kikuchi Jiro, Oda Asuka, Sumitani Ryohei, Oura Masahiro, Sogabe Kimiko, Maruhashi Tomoko, Takahashi Mamiko, Fujii Shiro, Nakamura Shingen, Miki Hirokazu, Hiasa Masahiro, Teramachi Jumpei, Furukawa Yusuke, Abe Masahiro
2. 発表標題 Osteoclasts robustly express SLAMF7 and secrete soluble SLAMF7
3. 学会等名 第47回日本骨髄腫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kikuchi Jiro, Kodama Nobuyuki, Takeshita Msataka, Ikeda Sho, Kobayashi Takahiro, Kuroda Yoshiaki, Uchiyama Michihiro, Osada Naoki, Bogen Bjarne, Yasui Hiroshi, Takahashi Naoto, Miwa Akiyoshi, Furukawa Yusuke
2. 発表標題 Extramedullary diseases originate from hyaluronan-induced homophilic interaction of CD44v-expressing myeloma cells
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Osada Naoki, Kikuchi Jiro, Yasui Hiroshi, Ikeda Sho, Takahashi Naoto, Furukawa Yusuke.
2. 発表標題 c-FOS mediates IMiDs resistance acting as a co-activator of IKZF1-target genes in multiple myeloma.
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>多発性骨髄腫の抗体薬エロツズマブの新たな作用機序を発見 https://www.jichi.ac.jp/news/research/20190820/</p> <p>BCL-2阻害剤venetoclaxの効果増強のメカニズムを発見 https://www.jichi.ac.jp/news/research/2021080901/</p> <p>多発性骨髄腫の予後を悪化させる髄外病変がヒアルロン酸によって誘導される機序を解明し有効な治療法を開発 https://www.jichi.ac.jp/news/research/2022080901/</p>

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