

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：34306

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17388

研究課題名(和文) 骨髄腫幹細胞のexosome分泌型miRNAを介した低酸素生存適応

研究課題名(英文) Exosomal secretion of hypoxia-adapted multiple myeloma cells

研究代表者

戸田 侑紀 (Toda, Yuki)

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：40779724

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)：これまでの検討から、低酸素環境下において多発性骨髄腫細胞の細胞外小胞(exosomes)分泌を阻害すると、HK2発現量の低下と細胞死の誘導が生じることがわかっている。本研究では、exosomes分泌阻害によりHK2のミトコンドリアにおける抗アポトーシス機能が低下している可能性を見出した。また、多発性骨髄腫細胞の低酸素環境におけるexosomes分泌制御メカニズムの一つとしてAkt/AS160経路を明らかにした。上記は多発性骨髄腫細胞の低酸素環境適応メカニズムの解明に繋がる重要な知見と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性骨髄腫(MM)の再発に関与する幹細胞性の高い集団(骨髄腫幹細胞)は、骨髄低酸素環境に存在すると言われている。代表者は、上記骨髄腫幹細胞を低酸素環境での長期培養によって再現し、その生存に細胞外小胞(exosomes)の分泌が関与することを見出した。さらに本課題ではその分泌制御に関わるシグナルおよび生存メカニズムの一部を明らかにした。本知見を基盤とする、骨髄腫幹細胞を標的とした再発を防ぐ治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Ineffectiveness of traditional therapies against cancer stem cells (CSCs) is reportedly associated with the poor outcome for multiple myeloma (MM) patients. Myeloma stem cells reside in hypoxic bone marrow niche where maintains their stem cell property. We previously established MM cells experienced long-term exposure of hypoxia and characterized their enhanced stem cell characteristics. The hypoxia-adapted (HA) cells require exosomal secretion for their survival in hypoxic condition. In this study, we identified Akt/AS160 signal as a regulatory signal for the exosome secretion and demonstrated mitochondrial localization of hexokinase 2 with anti-apoptotic function which was possibly involved in survival of HA-MM cells. The study provides insights in design novel therapy for prevention of recurrence resulting from myeloma stem cells.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：低酸素 Exosomes HK2 ミトコンドリア 分泌制御機構

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんは幹細胞の性質を有する少数の細胞を起源として発生するという「がん幹細胞仮説」が提唱されて以来、がん幹細胞 (CSCs) やその生育環境 (CSC ニッチ) の特性については各がん種で精力的に研究されてきた。多発生骨髄腫 (MM) においても既存治療に抵抗性を示す CSCs が骨髄内に存在し、低酸素などの周辺環境により維持されることがわかっている。しかし、MM 幹細胞の治療標的候補となりうる真のドライバー因子が特定されていない。代表者らは、低酸素環境に適応した MM 細胞の特性を明らかにするために、ヒト MM 細胞株を低酸素環境 (1% O₂) 下にて長期間培養し、MM-HA 細胞として樹立した。本細胞ががんの再発に関与するがん幹細胞 (CSCs) の性質を示すことを報告している [*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 496:490-496, 2018]

HA-MM 株において、miRNA などを内包する細胞外小胞 (exosomes) の分泌を阻害すると細胞死が誘導されると共に、解糖系関連酵素であるヘキソキナーゼ 2 (HK2) の発現が低下した。これより、MM 幹細胞は exosome 分泌を介して自身の HK2 発現量を制御し、生存を図る可能性が浮かび上がった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、上記仮説を基盤とした MM 幹細胞の低酸素環境適応メカニズムを明らかにすることである。すなわち、exosome 分泌型 miRNA (exRNA) や HK2 の抗アポトーシス機能を発揮するためのミトコンドリア局在が HA-MM 細胞の生存に関与するか検証する。

3. 研究の方法

(1) 使用した各種阻害剤

Exosome 分泌阻害にはその作用が既に報告されている中性スフィンゴミエリナーゼ阻害剤 (GW4869; *J. Biol. Chem.*, 285:17442-17452, 2010) およびカルパイン阻害剤 (Calpeptin; *Sci. Rep.*, 5: 13006, 2015) を用いた。また、HIF-1 シグナルを誘導するために塩化コバルト (CoCl₂) を使用した。PI3K-Akt シグナルの抑制には PI3K 阻害剤 (Pictilisib) を用いた。

(2) Exosomes の単離と定量

HA-MM またはその親株の培養上清を超遠心し、得られた 100,000g ペレットに含まれる CD63⁺exosomes を ELISA 法 (市販キット from Hakarel) で定量した。

(3) ミトコンドリア局在の解析

薬物処置した細胞サンプルから Mitochondria Isolation Kit および Dounce 型ホモジナイザーを用いてミトコンドリア画分を得た後、Western blot で目的タンパク質の発現を解析した。

(4) その他の生物学的解析

細胞増殖試験には Cell Counting Kit-8 (同仁) およびダイレクトセルカウンティング法を用いた。細胞内の活性酸素種 (ROS) の定量として、H2DCFDA (Thermo) を処置した細胞を Flow cytometer で解析した。細胞内乳酸量は Lactate Assay Kit-WST (同仁) に従って比色法で定量した。

4. 研究成果

(1) HA-MM 株の exosome 分泌制御

当初、遺伝子組換え操作にて exRNA の分泌制御を試行したが、遺伝子組換え株を樹立できな

かった。そこで、作用機序の異なる既知の exosome 分泌阻害剤を使用し、HA-MM 株の生物学的応答について検討した。Calpeptin の HA-MM 株における増殖抑制効果は親株に比べて高く、GW4869 を処置した場合と同様の傾向であった。

また低酸素適応時の exosome 分泌制御について検討として、CoCl₂ により HIF-1 シグナルを誘導しても exosome 分泌量は変化しなかったため、低酸素適応により exosome 分泌量が増加する細胞株と低下する細胞株の低酸素関連シグナルについて比較解析した。リン酸化 Akt およびその下流分子であるリン酸化 AS160 の発現レベルが exosome 分泌と相関する傾向がみられ、Pictilisib 処置により両リン酸化体を発現低下させると、exosome 分泌量が低下した。

(2) Exosome 分泌阻害時の HK2 のミトコンドリア局在およびその他の解糖系関連因子の解析

GW4869 にて exosome 分泌を阻害すると、ミトコンドリア分画中の HK2 発現量が低下した。HK2 のオートファジーへの関与が知られているが、GW4869 処置時の LC3 および p62 の発現解析の結果からオートファジーの関与が否定された。HK2 は解糖系およびペントースリン酸経路の律速酵素である。そこで、GW4869 処置時の細胞内乳酸量を解析したが、有意な変化はなかった。また HK2 以外の解糖系関連分子のタンパク質発現にも著名な変化なかった。ペントースリン酸経路の活性が低下すると、NADPH による抗酸化作用が減少し、細胞内 ROS が上昇すると考えられたが、GW4869 処置時により細胞内 ROS は変化しなかった。

以上より、HA-MM 株の exosome 分泌制御機構の一つとして Akt/AS160 経路を同定した。また exosome 分泌阻害による細胞死誘導機構として、HK2 のミトコンドリア局在の低下が示唆された。exRNA を含む exosome 分泌による HK2 発現制御機構については不明のままであるが、MM 幹細胞の低酸素環境適応メカニズムの解明に繋がる重要な知見を提供できたと考えられる。

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 1件）

1. 著者名 Yusuke Sano, Naoko Kuwabara, Saori Nakagawa, Yuki Toda, Shigekuni Hosogi, Shinji Sato, Eishi Ashihara	4. 巻 43
2. 論文標題 Hypoxia-adapted Multiple Myeloma Stem Cells Resist -T-Cell-mediated Killing by Modulating the Mevalonate Pathway	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 547 ~ 555
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.16191	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 Sugiyama Yuki, Nakamura Seikou, Tokuda Yuichi, Nakano Masakazu, Hattori Yasunao, Nishiguchi Hiroki, Toda Yuki, Hosogi Shigekuni, Yamashita Masayuki, Tashiro Kei, Ashihara Eishi	4. 巻 638
2. 論文標題 7,8-Dihydroxy-3-(4 -hydroxyphenyl)coumarin inhibits invasion and migration of osteosarcoma cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 200 ~ 209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.11.056	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 Imayoshi Natsuki, Yoshioka Makoto, Tanaka Kuniaki, Yang Shyh-Ming, Akahane Koshi, Toda Yuki, Hosogi Shigekuni, Inukai Takeshi, Okada Seiji, Maloney David J., Nakahata Tatsutoshi, Takita Junko, Kato Itaru, Ashihara Eishi	4. 巻 590
2. 論文標題 CN470 is a BET/CBP/p300 multi-bromodomain inhibitor and has an anti-tumor activity against MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 49 ~ 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.12.078	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 Soma Emi, Yamayoshi Asako, Toda Yuki, Mishima Yuji, Hosogi Shigekuni, Ashihara Eishi	4. 巻 14
2. 論文標題 Successful Incorporation of Exosome-Capturing Antibody-siRNA Complexes into Multiple Myeloma Cells and Suppression of Targeted mRNA Transcripts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 566 ~ 566
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14030566	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 Amari Keigo, Sasagawa Satoru, Imayoshi Natsuki, Toda Yuki, Hosogi Shigekuni, Imamura Toshihiko, Ashihara Eishi	4. 巻 588
2. 論文標題 The CDK4/6-UCL5-BRD4 axis confers resistance to BET inhibitors in MLL-rearranged leukemia cells by suppressing BRD4 protein degradation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 147 ~ 153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.12.063	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 Tomogane Mako, Omura Maho, Sano Yusuke, Shimizu Daiki, Toda Yuki, Hosogi Shigekuni, Kimura Shinya, Ashihara Eishi	4. 巻 588
2. 論文標題 Expression level of BTN3A1 on the surface of CD14+ monocytes is a potential predictor of cell expansion efficiency	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 47 ~ 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.12.060	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 Tomogane Mako, Sano Yusuke, Shimizu Daiki, Shimizu Teruki, Miyashita Masatsugu, Toda Yuki, Hosogi Shigekuni, Tanaka Yoshimasa, Kimura Shinya, Ashihara Eishi	4. 巻 573
2. 論文標題 Human V 9V 2?T cells exert anti-tumor activity independently of PD-L1 expression in tumor cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 132 ~ 139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.08.005	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 Wakabayashi R, Hattori Y, Hosogi S, Toda Y, Takata K, Ashihara E.	4. 巻 535
2. 論文標題 A novel dipeptide type inhibitor of the Wnt/ -catenin pathway suppresses proliferation of acute myelogenous leukemia cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 73-79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.12.027	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 Kado Y, Tsujimoto M, Fuchida SI, Okano A, Hatsuse M, Murakami S, Sugii H, Ueda K, Toda Y, Minegaki T, Nishiguchi K, Muraki Y, Shimazaki C, Ashihara E.	4. 巻 43
2. 論文標題 Factors Associated with Dose Modification of Lenalidomide Plus Dexamethasone Therapy in Multiple Myeloma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull	6. 最初と最後の頁 1253-1258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-00337	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 E, Nishimura K, Kawanishi S, Sueyoshi M, Ueno F, Toji Y, Abo N, Konishi T, Harada K, Satake S, Shima C, Toda Y, Kitamura Y, Shimohama S, Ashihara E, Takata K.	4. 巻 438
2. 論文標題 Mouse Bone Marrow-derived Microglia-like Cells Secrete Transforming Growth Factor- 1 and Promote Microglial A Phagocytosis and Reduction of Brain A	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 217-228
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2020.05.004	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23件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 小西和也, 松井透磨, 戸田侑紀, 細木誠之, 芦原英司
2. 発表標題 転移予定臓器における組織酸性化の転移巣形成への寄与
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Toma Matsui, Yuki Toda, Anna Mosnikova, Oleg A. Andreev, Shigekuni Hosogi, Yana K. Reshetnyak, Eishi Ashihara
2. 発表標題 H-low insertion peptide detects lactic acidosis contributing metastatic niche formation in lungs
3. 学会等名 American Association for Cancer Research Special Conference: CANCER METASTASIS (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toma Matsui, Yuki Toda, Shigekuni Hosogi, Eishi Ashihara
2. 発表標題 pH-low insertion peptide accumulated in lung metastatic niche with lactic acidosis
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 戸田侑紀, 松井透磨, 細木誠之, 芦原英司
2. 発表標題 pH-low insertion peptideで捉える転移予定臓器における組織pHの変化
3. 学会等名 第26回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toma Matsui, Yuki Toda, Anna Mosnikova, Oleg A. Andreev, Shigekuni Hosogi, Yana K. Reshetnyak, Eishi Ashihara
2. 発表標題 pH-low insertion peptide detects lactic acidosis contributing metastatic niche formation in lungs
3. 学会等名 American Association for Cancer Research Special Conference: CANCER METASTASIS (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toma Matsui, Yuki Toda, Shigekuni Hosogi, Eishi Ashihara
2. 発表標題 pH-low insertion peptide accumulated in lung metastatic niche with lactic acidosis
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 戸田侑紀, 松井透磨, 細木誠之, 芦原英司
2. 発表標題 pH-low insertion peptideで捉える転移予定臓器における組織pHの変化
3. 学会等名 第26回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小西和也, 松井透磨, 戸田侑紀, 細木誠之, 芦原英司
2. 発表標題 転移予定臓器における組織酸性化の転移巣形成への寄与
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松井透磨, 戸田侑紀, 中井亮太, 横川碧, 板垣里奈, 細木誠之, 芦原英司
2. 発表標題 pH-low insertion peptideを用いた転移予定臓器における組織酸性化の検出
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toma Matsui, Yuki Toda, Eiko Sawada, Aoi Yokogawa, Ryota Nakai, Rina Itagaki, Anna Mosnikova, Oleg A. Andreev, Shigekuni Hosogi, Yana K. Reshetnyak, Eishi Ashihara
2. 発表標題 Detection of acidic environment in metastatic niche by pH-low insertion peptide
3. 学会等名 The 5th International Cancer Research Symposium - a Training for Oncology Professionals (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Keigo Amari, Yuki Toda, Shigekuni Hosogi, Toshihiko Imamura, Eishi Ashihara
2. 発表標題 UCHL5 overexpression confers resistance to BETi in MLL-r leukemia cells by suppressing degradation of BRD4 protein
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Sugiyama, Seikou Nakamura, Kimika Yamaguchi, Yasunao Hattori, Yuki Toda, Shigekuni Hosogi, Eishi Ashihara
2. 発表標題 A novel coumarin-based compound inhibits invasion and migration of osteosarcoma cells
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Hadate, Ryosuke Wakabayashi, Yasunao Hattori, Shigekuni Hosogi, Yuki Toda, Kazuyuki Takata, Eishi Ashihara
2. 発表標題 A novel dipeptide type Wnt/ -catenin pathway inhibitor suppresses proliferation of acute myelogenous leukemia cells
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shura Yarimizu, Shigekuni Hosogi, Mina Suzuki, Nobuhisa Tohdo, Daiki Shimizu, Yusuke Sano, Natsuki Imayoshi, Keigo Amari, Makou Tomogane, Yuki Toda, Eishi Ashihara
2. 発表標題 Acidic microenvironment increased the anti-tumor effect of T cell on A549 lung cancer cells
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Natsuki Imayoshi, Makoto Yoshioka, Shyh-Ming Yang, Koshi Akahane, Yuki Toda, Shigekuni Hosogi, Takeshi Inukai, Seiji Okada, David J. Maloney, Jeffrey W. Strovel, Eishi Ashihara.
2. 発表標題 Application of BET/CBP/p300 multi-bromodomain inhibitors as a novel therapeutic strategy for MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemia
3. 学会等名 American Association for Cancer Research Annual Meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keigo Amari, Yuki Toda, Shigekuni Hosogi, Toshihiko Imamura, Eishi Ashihara.
2. 発表標題 Cdk4/6 inhibitor Abemaciclib overcomes resistance to BET inhibitor in leukemic cells with MLL-AF5q31 fusion gene
3. 学会等名 American Association for Cancer Research Annual Meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 若林亮介, 服部恭尚, 戸田侑紀, 細木誠之, 芦原英司
2. 発表標題 急性骨髄性白血病に対する新規ペプチド型Wnt/ -catenin阻害剤の効果
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 友金眞光, 宮下雅亜, 佐野友亮, 清水大器, 戸田侑紀, 細木誠之, 芦原英司
2. 発表標題 T細胞の体外増幅培養における予測可能なバイオマーカーの探索
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐野友亮, 友金眞光, 清水大器, 宮下雅亜, 戸田侑紀, 細木誠之, 芦原英司
2. 発表標題 低酸素環境に適応した多発性骨髄腫に対する T細胞の抗腫瘍効果
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松井透磨, 戸田侑紀, 細木誠之, 芦原英司
2. 発表標題 骨髄系細胞が動員された前転移ニッチにおける乳酸アシドーシス
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Natsuki Imayoshi, Makoto Yoshioka, Kuniaki Tanaka, Shyh-Ming Yang, Koshi Akahane, Yuki Toda, Shigekuni Hosogi, Takeshi Inukai, Seiji Okada, David J. Maloney, Itaru Kato, Eishi Ashihara.
2. 発表標題 Novel BET/CBP/p300 multi-bromodomain inhibitors as a strategy for MLL-rearranged ALL
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 Keigo Amari, Yuki Toda, Shigekuni Hosogi, Toshihiko Imamura, Eishi Ashihara.
2. 発表標題 Cdk4/6i Abemaciclib overcomes resistance to BETi in leukemic cells with MLL-AF5q31 fusion gene
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 Keigo Amari, Yuki Toda, Shigekuni Hosogi, Toshihiko Imamura, Eishi Ashihara.
2. 発表標題 MLL-AF5q31 cells acquire BET inhibitor resistance by Brd4-regulated molecules upregulation
3. 学会等名 Global Academic Programs 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都薬科大学病態生理学分野ホームページ https://labo.kyoto-phu.ac.jp/seiri/pg402.html</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
---------	---------