

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591193

研究課題名（和文） 多発性骨髄腫の微小環境の制御におけるプラスミンの役割

研究課題名（英文） The role of plasmin in the regulation of the multiple myeloma microenvironment

研究代表者

ハイジッヒ・ベアテ (Heissig Beate)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：30372931

研究成果の概要（和文）：

代表者らは、生体中のマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)の活性化を起点とした造血因子の細胞外ドメイン分泌の促進と共に、骨髄由来のCD11b陽性F4/80陽性細胞が、白血病・リンパ腫細胞周囲の微小環境中に集簇し、血管新生因子やMMPの産生を通じて、これらの腫瘍増殖に関与することを明らかにした。さらにこれら各種プロテアーゼが、新たな骨髄腫を含む血液腫瘍性疾患治療上の分子標的となることを示唆した。

研究成果の概要（英文）：

One of the outside cellular regulators are metalloproteinases (MMPs). MMP activation can promote the secretion of hematopoietic growth factors, which in turn drive hematopoietic cell differentiation into e.g. CD11b-positive F4/80 BM-derived cells. These angiopotent cells can be recruited into various tumor beds to further accelerate vasuarization necessary for tumor growth. In addition, these BM-derived cells are major producers of MMPs, creating a vicious cycle accelerating tumor cell growth. In this application, I suggest that proteases can become a novel molecular target in the treatment of blood tumor-related disease treatment including myeloma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011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：癌、酵素、細胞・組織、生体分子、凝固・線溶

1. 研究開始当初の背景

近年、多発性骨髄腫の病勢と、一部の線溶系因子の血中濃度との相関が指摘されており、骨髄腫及びびストローマ細胞より供給されるマトリックスメタロプロテイナーゼ及びこ

れを制御する血液線維素溶解系酵素群が骨髄腫細胞増殖の制御因子となっている可能性が指摘されている。

2. 研究の目的

多発性骨髄腫の病態形成における血液線維素溶解系亢進の生理学的意義と骨髄腫細胞の骨髄内増殖及び浸潤機構、そして骨髄微小環境がその機構中で担う役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

各種ヒト骨髄腫・形質細胞腫を含む血液腫瘍細胞株あるいは東京大学医科学研究所附属病院血液腫瘍内科骨髄腫患者及び正常対照群の骨髄中のCD138、CD20、可溶性ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子受容体(uPAR)陽性率を測定する。さらにこれらの細胞をMACS細胞分離装置で採取し、一定期間培養することにより、その培養上清中の各種MMP、組織型プラスミノゲン(Plg)アクチベータ(tPA)、ウロキナーゼ型(uPA)、Plg、プラスミン活性をELISA、ザイモグラフィあるいはウェスタンブロットで測定、検出する。

(1) 各種ヒト骨髄腫・形質細胞腫細胞株あるいはプライマリーの分離骨髄腫細胞を一定濃度のプラスミン酵素活性阻害剤とともに一定期間培養し、細胞増殖への影響を評価検討する。

(2) 各種ヒト骨髄腫・形質細胞腫細胞株 2×10^5 個あるいはプライマリーの分離骨髄腫細胞を 5×10^5 個ずつ、低線量放射線照射後のNO D/SCIDマウスに移植し、骨髄腫マウスモデルを作製する。これらのマウスに2.で使用したプラスミン阻害剤を投与し、生体内骨髄腫増殖状況について経時的に末梢血、骨髄病理組織を採取し精査する。末梢血については血漿中の血管内皮増殖因子(VEGF)、TNF- α 、IL-6等を測定する。

(3) 1の患者骨髄のスミア及び病理組織所見を詳細に観察する。さらにtPA、uPA、Plg/プラスミン、各種MMP等の蛋白分解酵素群、uPAR、von Willebrand 因子、VE-カドヘリン、VEGF 受容体(VEGFR)等の血管内皮特異抗原、骨芽細胞、線維芽細胞、脂肪細胞、各種血球系マーカーあるいは接着分子の発現等について免疫学的特殊染色を施行する。

4. 研究成果

代表者らは、生体中のマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)の活性化を起点としたKit-ligandをはじめとする造血因子の細胞外ドメイン分泌(プロセッシング)の促進と共に、分化・増殖、そして骨髄より動員される骨髄由来のCD11b陽性F4/80陽性細胞が、T細胞由来の白血病・リンパ腫細胞周囲の微小環境中に集簇し、血管内皮増殖因子等の血管新生因子やさらなるMMPの産生を通じて、これらの腫瘍増殖に関与することを明らかにした。さらに代表者らと神戸学院大学との共同研究で見出された新規プラスミン阻害剤は、

各種プロテアーゼの活性化を上流より阻害し、これらのT細胞性白血病・リンパ腫の増殖を抑制することを報告した。このことは、血液凝固・線維素溶解系因子群の血液腫瘍性疾患病態における新たな機能ばかりでなく、腫瘍増殖における骨髄由来細胞の重要性を示している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Beate Heissig, Makiko Ohki-Koizumi, Yoshihiko Tashiro, Ismael Gritli, Kaori Sato-Kusubata and Koichi Hattori, New functions of the fibrinolytic system in bone marrow cell-derived angiogenesis International Journal of Hematology 95.131.137.2012 10.1007/s12185-012-1016-y
2. Ishihara M, Nishida C, Tashiro Y, Gritli I, Rosenkvist J, Koizumi M, Yamamoto R, Yagita H, Okumura K, Nishikori M, Wanaka K, Tsuda Y, Okada Y, Nakauchi H, Hattori K, Heissig B: Plasmin inhibitor reduces lymphoid tumor growth by suppressing matrixmetalloproteinase-9 dependent CD11b+/F4/80+ myeloid cell recruitment, Leukemia, 26.332-339.2012 10.1038/leu.2011.203
3. Chiemi Nishida, Kaori Kusubata, Yoshihiko Tashiro, Ismael Gritli, Aki Sato, Makiko Ohki-Koizumi, Yohei Morita, Makoto Nagano, Takeharu Sakamoto, Naohiko Koshikawa, Takahiro Kuchimaru, Shinae Kizaka-Kondoh, Motoharu Seiki, Hiromitsu Nakauchi, Koichi Hattori, and Beate Heissig. MT1-MMP plays a critical role in hematopoiesis by regulating HIF-mediated chemo-/cytokine gene transcription within niche cells. Blood. in press 2012

4. Yoshihiko Tashiro, Chiemi Nishida, Kaori Sato-Kusubata, Makiko Ohki-Koizumi, Makoto Ishihara, Aki Sato, Ismael Gritli, Hiromitsu Komiyama, Yayoi Sato, Yuichi Tomiki, Hirokazu Sakamoto, Takashi Dan, Toshio Miyata, Ko Okumura, Hiromitsu Nakauchi, Koichi Hattori, and Beate Heissig: Inhibition of PAI-1 induces neutrophil-driven neoangiogenesis and promotes tissue regeneration via production of angiocrine factors in mice. *Blood*.in press 2012
 5. Okaji Y, Tashiro Y, Gritli I, Nishida C, Sato A, Ueno Y, Del Canto Gonzalez S, Ohki-Koizumi M, Akiyama H, Nakauchi H, Hattori K, Heissig B: Plasminogen deficiency attenuates post-natal erythropoiesis in male C57BL/6 mice through decreased activity of the LH-testosterone axis. *Exp Hematol*, Vol 40,143-154,2012.
10.1016/j.exphem.2011.10.008
 6. Piao JH, Hasegawa M, Heissig B, Hattori K, Takeda K, Iwakura Y, Okumura K, Inohara N, Nakano H: Tumor necrosis receptor-associated factor (Traf)2 controls homeostasis of the colon to prevent spontaneous development of murine inflammatory bowel disease, *J Biol Chem*, (151: 17879-17888, 2011)
<http://www.jbc.org/content/by/year>
 7. Aoki N., Yokoyama R., Asai N., Ohki M., Ohki Y., Kusubata K., Heissig B., Hattori K., Nakagawa Y., and Matsuda T. Adipocyte-Derived Microvesicles Are Associated with Multiple Angiogenic Factors and Induce Angiogenesis *in Vivo* and *in Vitro*. *Endocrinology* 151 : 2567-2576,2010
<http://endo.endojournals.org/content/by/year>
 8. Heissig B, Nishida C, Tashiro Y, Sato Y, Ishihara M, Ohki M, Hattori K. Role of Neutrophil-derived matrix metalloproteinase-9 for tissue regeneration. *Histology & Histopathology*, 25.765-770.2010
<http://www.hh.um.es/Issues.htm>
 9. Ohki M, Ohki Y, Ishihara M, Rosenkvist J, Gritli I, Tashiro Y, Akiyama H, Komiyama H, Lund LR, Nitta A, Yamada K, Zhu Z, Ogawa H, Yagita H, Okumura K, Nakauchi H, Werb Z, Hattori K, Heissig B: Tissue type plasminogen activator regulates myeloid-cell dependent neoangiogenesis during tissue regeneration *Blood*, 115: 4302-4312 2010.
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/search>
 10. Heissig B, Ohki M, Ishihara M, Tashiro Y, Nishida C, Gritli I, Rosenkvist J, Hattori K. Contribution of the Fibrinolytic Pathway to Hematopoietic Regeneration. *Journal of Cell Physiology*, 2009. 221(3):51-5 2009
 11. Sato Y, Ohki Y, Akiyama H, Rosenkvist J, Gritli I, Okumura K, Ogawa H, Heissig B, Hattori K, Ohsaka A : Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 reduces neutrophil accumulation during G-CSF-induced neoangiogenesis. *Cytometry Res.* 19(2):53-62,2009
- [学会発表] (計 18 件)
1. Chiemi Nishida, Kaori Kusubata, Yoshihiko Tashiro, Ismael Gritli, Aki Sato, Makiko Ohki-Koizumi, Motoharu Seiki, Hiromitsu

- Nakauchi, Beate Heissig and Koichi Hattori: MT1-MMP Regulates Hematopoiesis Through HIF-Mediated Chemo-/Cytokine Release From the Bone Marrow Niche 53 回 アメリカ血液学会 2011.12.10-13 サンディエゴ San Diego Convention Center
2. Chiemi Nishida, Kaori Kusubata, Motoharu Seiki, Hiromitsu Nakauchi, Beate Heissig, Koichi Hattori: MT1-MMP plays a critical role in the modulation of hematopoiesis. 第73 回日本血液学会、2011.10.15、名古屋国際会議場、名古屋市
 3. Beate Heissig : Fibrinolytic factors regulate tumor progression and growth by altering the interaction between cells of the tumor microenvironment. 第70回日本癌学会学術総会.2011.10.5. 名古屋国際会議場 (愛知県)
 4. Beate Heissig : The proteolytic bone marrow niche: The impact of membrane type-1 matrix metalloproteinase and plasminogen deficiency on hematopoiesis. 2011.9.18. 2011年度日独がんワークショップ. グランドプリンスホテル広島
 5. 西田知恵美、楠畑かおり、田代良彦、清水元治、中内啓光、Heissig Beate、服部浩一：生体内細胞分化制御因子としてのMT1-MMPの機能解析 第10回日本再生医療学会 2011.3.1-2(oral)京王プラザホテル.東京
 6. 楠畑かおり、小泉摩希子、Heissig Beate、服部浩一：線維素溶解系の活性化による骨髄内間葉系幹細胞の増殖 2011. 3. 1-2 第10回日本再生医療学会総会、京王プラザホテル東京 (poster).
 7. Chiemi Nishida, Kaori Kusubata, Motoharu Seiki, Hiromitsu Nakauchi, Koichi Hattori, Beate Heissig : MT1-MMP plays a critical role in the cell growth and maturation. 2011. 2. 3-4ワークショップ「個体レベルのがん研究の魅力：培養細胞と臨床研究をつなぐマトリクス」 琵琶湖ホテル (poster賞).
 8. Yurai Okaji, Chiemi Nishida, Koichi Hattori, Beate Heissig : 線溶系因子プラスミンによる赤血球造血制御機構の解明. 2011. 2. 3-4 ワークショップ「個体レベルのがん研究の魅力：培養細胞と臨床研究をつなぐマトリクス」 琵琶湖ホテル (poster)
 9. Nishida Chiemi, Heissig Beate, Tashiro Yoshihiko, Seiki Motoharu, Hiromitsu Nakauchi, Koichi Hattori: MT1-MMP Plays a Critical Role In the Modulation of Hematopoiesis. December 4-7, 2010, 52nd ASH Annual Meeting; Orange County Convention Center, Orlando, FL
 10. Okaji Yurai, Nishida Chiemi, Gritli Ismael, Tashiro Yoshihiko, Ohki Makiko, Hattori Koichi, Heissig Beate: Plasminogen Deficiency Impairs Erythropoietic Recovery Capacity in Male C57BL/6J Mice through Testosterone Defect. December 4-7, 2010. 52nd ASH Annual Meeting; Orange County Convention Center, Orlando, FL (poster)
 11. Chiemi Nishida, Beate Heissig, Motoharu Seiki, Hiromitsu Nakauchi, Koichi Hattori: MT1-MMP is a critical modulator of normal hematopoiesis. 第72回日本血液学会 2010.9.24-26 パシフィコ横浜
 12. Ismael Gritli, Chiemi Nishida, Makoto Ishihara, Hiromitsu Nakauchi, Koichi Hattori, Beate Heissig: Epidermal growth factor-like domain 7, a vascular niche factor, regulates myelopoiesis. The 72nd Annual Meeting of the Japanese Society of

Hematology. Pacifico Yokohama 2010.9.24
(oral)

13. 石原誠人、ハイジツヒベアテ、田代良彦、西田知恵美、小泉摩希子、和中敬子、津田裕子、岡田芳男、八木田秀雄、奥村康、中内啓光、服部浩一：リンパ腫増殖における線維素溶解系の役割と新規治療法の開発第72回 日本血液学会
2010.9.24-26 パシフィコ横浜
14. 田代良彦、石原誠人、西田知恵美、Ismail Gritli)、小泉摩季子、小見山博光、坂本一博、Beate Heissig、宮田敏男、中内啓光、服部浩一：生体内組織再生における線溶系因子PAI-1の機能解明 第72回 日本血液学会 2010.9.24-26 パシフィコ横浜
15. 石原誠人、山本玲、八木田 秀雄、奥村康、ハイジツヒベアテ、服部浩一：癌増殖における線維素溶解系因子の役割と新規治療法の開発 第69回日本癌学会学術集会
2010.9.24
16. 田代良彦、Heissig Beate、服部浩一：生体内組織再生における線維素溶解系因子PAI-1の機能解明 第8回血液血管オルビス 2010.8.21
17. 田代良彦、Heissig Beate、服部浩一：生体内組織再生における線維素溶解系因子PAI-1の機能解明. 2010.6.1: 東京 (平成22年度医科学研究所研究成果発表会)
18. Ismael Gritli, Chiemi Nishida, Koichi Hattori, Beate Heissig. EGFL7 - a novel stress response factor in the bone marrow niche. 2010.6.1: 東京 (平成22年度医科学研究所研究成果発表会. 第2位)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1件)

名称：炎症性疾患治療剤

発明者：服部浩一、津田裕子、ハイジツヒ・

ベアテ

権利者：学校法人神戸学院

種類：

番号：2011-211450

出願年月日：2011/9/27

国内外の別：日本

6. 研究組織

(1)研究代表者

ハイジツヒ・ベアテ (Heissig Beate)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：30372931

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号：