

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16244

研究課題名（和文）骨形成環境による多発性骨髄腫の腫瘍進展の抑制：腫瘍抑制性ニッチの分子病態の解明

研究課題名（英文）Suppression of tumor progression in multiple myeloma by osteogenic microenvironment: Elucidation of the molecular pathogenesis of tumor suppressing niche

研究代表者

藤井 志朗 (FUJII, Shiro)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：00618473

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：多発性骨髄腫は、骨に親和性を持ち、骨破壊病変を形成しつつ骨髄外にも進展する難治造血器悪性腫瘍である。骨髄腫骨病変部では骨形成が抑制されているが、プロテアソーム阻害薬などの新規薬での治療奏効例で腫瘍抑制効果と骨形成誘導の逆相関が示唆されている。本研究では、骨髄間質細胞から分化誘導させた成熟骨芽細胞を骨髄腫細胞と共培養すると、骨髄間質細胞とは異なり、骨髄腫細胞に細胞死を誘導することが示された。その機序として、前骨芽細胞株を成熟骨芽細胞に分化誘導させるとIL-6発現の減少やosteoprotegerinとmiR-125bの発現増加が認められ、骨髄腫細胞死の誘導に関与していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髄腫細胞は骨芽細胞分化を抑制し自らの生存・増殖に好適な骨髄微小環境を形成していること、そして骨形成誘導により骨髄腫細胞の生存を許容しない排他的ニッチが形成され、骨量の回復と共に抗腫瘍活性を高める可能性が示唆された。骨芽細胞分化を基軸に骨髄腫骨髄微小環境内での各種細胞間でのmiRの移動や骨髄腫細胞の代謝制御が明らかになると新たな治療概念、治療戦略の構築に寄与すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Multiple myeloma (MM) is an incurable hematopoietic malignancy which has an affinity for bone. MM develops exclusively in the bone marrow and generates destructive bone disease. While the bone formation was suppressed in the MM bone marrow environment, inverse correlation between the tumor suppressive effects and osteogenesis has been shown in MM patients with responder of novel agents such as proteasome inhibitors. In the present study, co-culture of MM cells with mature osteoblasts which were differentiated from bone marrow stromal cells induced MM cell death different from co-culture with MC3T3-E1 pre-osteoblasts. We also found that the reduction of IL-6 expression, the increase of osteoprotegerin and miR-125b were shown in mature osteoblasts derived from pre-osteoblasts which conferred to MM cell death.

研究分野：血液悪性腫瘍

キーワード：多発性骨髄腫 微小環境 細胞外小胞

1. 研究開始当初の背景

骨は造血幹細胞や白血病幹細胞のニッチを形成し、造血細胞や腫瘍細胞の維持生育に骨微小環境が深く関与する。多発性骨髄腫は、新規治療薬や造血幹細胞移植の導入によっても未だ難治であるが、とりわけ骨に親和性を持ち進行性の骨破壊病変を形成し、骨髄微小環境に依存した治療抵抗性を獲得する。多発性骨髄腫はどのように骨を好み、骨を破壊し進展するのか。そしてなぜ依然として治癒がもたらされず、一部は初発治療から難治なのかが明らかにされていない。これまでに、骨髄腫細胞由来MIP-1 / が破骨細胞形成を促進し(Blood. 2002)、形成された破骨細胞が骨破壊だけでなく直接腫瘍増殖をもたらす(Blood. 2004)、さらに骨髄腫細胞はWnt阻害因子sFRP-2を産生し骨芽細胞分化を強力に抑制し骨喪失をきたす(Blood. 2005)ことを報告した。次いで、骨髄間質細胞および破骨細胞の共存により、骨髄腫細胞のPIM2の発現が亢進し、薬剤耐性や生存に関わる代謝を制御すること(Leukemia 2011)、PIM2を阻害すると骨破壊が抑制され骨形成が回復すること、骨髄腫骨病変は酸性環境下で進展し、この酸性環境下においてもPIM阻害(チアゾリジンジオン誘導体)は強い抗腫瘍活性をもたらすことなどを報告し、PIM2を標的とした治療が骨髄腫および骨髄腫骨病変に対する新規治療薬として有望であることを見出した(Leukemia 2015, Br J Haematol 2017, Br J Haematol 2018)。

このような一連の研究において、成熟骨芽細胞は、その前駆細胞である骨髄間質細胞とは全く対照的に骨髄腫細胞にアポトーシスを惹起することも報告したが(PLoS One,2010)、これらの研究過程で骨系細胞はその種類、分化段階によって、腫瘍進展を正あるいは負に調節するという興味深い現象を見出した。そこで、骨系あるいは骨髄内に分布する各種細胞が構成する、腫瘍進展を促進し薬剤抵抗性を賦与する微小環境(腫瘍促進的ニッチ)とともに腫瘍増殖を負に制御し腫瘍を許容しない骨微小環境(腫瘍排他的ニッチ)の存在を実証するという、今までに検討されることのなかった視点からの研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

これまでの検討で石灰化基質を産生している成熟骨芽細胞は、その前駆細胞である骨髄間質細胞と対照的に骨髄腫細胞の生存・増殖を抑制することを明らかにしたため、本研究課題では骨髄腫骨病変微小環境において重要な役割を果たす骨髄間質細胞と対比させ、骨髄間質細胞から分化誘導された成熟骨芽細胞が骨髄腫細胞の生存・増殖を抑制する分子機序を明らかにする。特に骨芽細胞由来エクソソームに着目して研究を行う。

3. 研究の方法

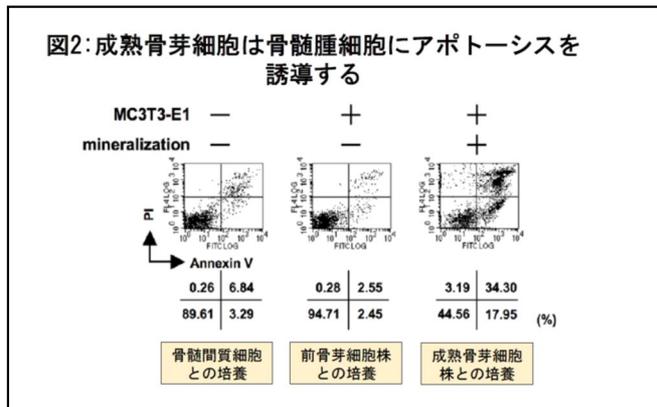
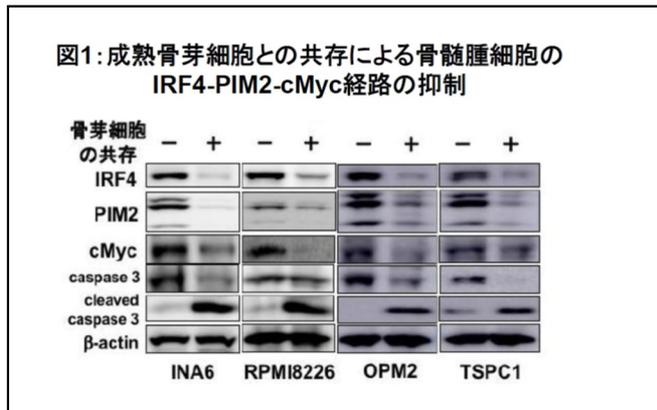
BMP2 など骨形成促進因子添加による骨髄間質細胞および前骨芽細胞株 MC3T3-E1 による骨芽細胞分化誘導系において骨芽細胞への分化誘導の過程での miR-125b mRNA の発現の発現を real time RT-PCR で解析する。石灰化結節は von Kossa 染色および Arizarin red 染色で検出する。骨髄腫細胞株は、マウス由来(5TGM1)、ヒト由来(RPMI8226、INA6、OPM2、TSPC-1)を使用し、アポトーシスの評価は Annexin V-PI 二重染色で評価する。

各種細胞の培養上清中のエクソソームを回収し miR-125b の含有を調べる。エクソソーム添加による骨髄腫細胞への miR-125b の移行、miR-125b の骨髄腫細胞の生存・増殖への影響を miR-125b mimic, miR-125b inhibitor を導入し検討する。

4. 研究成果

(1) 成熟骨芽細胞と MM 細胞との相互作用

骨髄間質細胞や前骨芽細胞株 MC3T3-E1 は骨髄腫細胞株の IRF4-PIM2-cMyc 経路を活性化し骨髄腫細胞の生存・増殖を促進した。一方で、BMP-2 を添加し、石灰化結節を形成するまで分化誘導させた MC3T3-E1 細胞と骨髄腫細胞株 (RPMI8226、INA6、OPM2、TSPC-1) を共培養したところ、骨髄腫細胞の IRF4、PIM2、Sp1、MYC などの生存促進因子の発現を抑制し、caspase-3 が活性化した(図 1)。また骨髄腫細胞株 (5TGM1) にアポトーシスを誘導した(図 2)。骨髄腫細胞株でのアポトーシスの誘導は骨髄腫細胞数と活性化成熟骨芽細胞との比率が重要であり、 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 以下だと骨髄腫細胞密度が低いほど骨髄腫細胞のアポトーシスの誘導が顕著であった。また骨髄腫細胞の密度が $5 \times 10^5/\text{ml}$ 以上だと成熟骨芽細胞による



骨髄腫細胞増殖抑制活性の産生が減弱した。骨髄腫細胞が高密度で共存すると、骨芽細胞分化を抑制するが、成熟骨芽細胞からの骨髄腫細胞増殖抑制活性の産生を減弱させる可能性が考えられた。また、骨細胞にまで分化可能な骨細胞様細胞 IDG-SW3 細胞を用いても骨髄腫細胞への細胞死の誘導が見られた。従って、成熟活性化骨芽細胞だけでなく、骨芽細胞から分化した骨細胞も骨髄細胞の生存抑制活性を産生している可能性が考えられた。

(2) 成熟骨芽細胞由来 miR-125b の MM 細胞増殖抑制への関与

骨芽細胞が出芽的に放出する基質小胞は石灰化に関与するが、最近骨芽細胞への分化過程で高発現する miR-125b が選択的に基質小胞に内包され、骨基質に運搬、貯蔵され、骨基質から周囲に放出されていることが報告された (Minamizaki, et al. Commun Biol, 2020)。一方、乳癌、膀胱癌、甲状腺癌細胞では miR-125b はがん抑制遺伝子様の作用を惹起するため、miR-125b の発現を抑制し増殖していることが報告されている (Bu Q, et al. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, Wang Y, et al. Cancer Management and Research, 2020)。骨髄腫細胞においても miR-125b を強制発現させると、骨髄腫細胞における遺伝子発現全般を制御するマスター調節因子である IRF4 の発現が抑制され、骨髄腫細胞の生存・増殖が負に制御されることが示されている (Morelli E, et al. Leukemia, 2015)。骨髄腫細胞や骨髄間質細胞や前骨芽細胞株 MC3T3-E1 では miR-125b 発現はないが、石灰化を呈する成熟骨芽細胞では miR-125b 発現が亢進していた。BMP-2 を添加し骨髄間質細胞や前骨芽細胞株 MC3T3-E1 を成熟活性化骨芽細胞へ分化誘導させる培養系を用い、時間経過とともに miR-125b の発現を検討したところ、骨芽細胞へ成熟分化するに従い miR-125b の発現が誘導された。miR-125b の発現は石灰化結節を形成する成熟活性化した骨芽細胞へ分化すると大きく増加することが示された。

さらに lithium chloride 添加により GSK3 β 活性を阻害し WNT- β -catenin シグナルを活性化させると、石灰化結節の形成が増強すると同時に miR-125b の発現も大きく増加し、骨髄腫細胞死の誘導活性も増強した。骨芽細胞分化に伴う miR-125b 産生亢進の分子機序ならびに miR-125b 産生の制御機構として骨髄腫骨病変由来因子として TGF β や骨髄腫細胞由来因子等の影響を検討中である。

(3) 成熟骨芽細胞由来エクソソームの MM 細胞増殖抑制への関与

成熟活性化した骨芽細胞とその前駆細胞である骨髄間質細胞の培養上清を回収し、それぞれからエクソソームを単離した。単離したエクソソームを回収した細胞上清と同程度にまで希釈し、添加したところ骨芽細胞由来のエクソソームが骨髄腫細胞の増殖を抑制し、細胞死を誘導した。骨髄腫細胞には miR-125b がほとんど見られないが、成熟活性化した骨芽細胞と共存培養した骨髄腫細胞には miR-125b が検出された。miR-125b mimic を骨髄腫細胞に導入すると骨髄腫細胞の生存が抑制され、骨髄腫細胞に miR-125b inhibitor を導入すると成熟活性化した骨芽細胞との共存による骨髄腫細胞死の誘導が減弱した。これらの結果から、miR-125b は骨芽細胞分化に伴い産生亢進し、成熟活性化した骨芽細胞から miR-125b はエクソソームに含まれ細胞外に放出され、骨髄微小環境にいる骨髄腫細胞の生存を抑制するものと考えられた。

プロテアソーム阻害薬などの新規骨髄腫治療薬において良好な奏効が得られ骨形成が誘導される場合は、その後の腫瘍抑制効果が良いとされているが、本研究で示された骨芽細胞由来 miR-125b の関与が考えられるため今後さらに検討を進めたい。また、骨髄微小環境中に放出される miR-125b の、造血、骨代謝、免疫系などの各種骨髄腫病態に対する役割についてもさらに検討する必要がある。今後特に免疫系の細胞や骨代謝に対する影響を検討する予定である。さらに miR-125b 含有エクソソームの大量産生系を構築しその治療応用についても研究を発展させたい。

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 6件）

1. 著者名 Miki Hirokazu, Nakamura Shingen, Oura Masahiro, Nakamura Masafumi, Sumitani Ryohei, Sogabe Kimiko, Takahashi Mamiko, Maruhashi Tomoko, Harada Takeshi, Fujii Shiro, Hamano Hirofumi, Kondo Masateru, Okada Naoto, Endo Itsuro, Abe Masahiro	4. 巻 3
2. 論文標題 The importance of retaining physical functions to prevent skeletal related events in multiple myeloma patients with bone disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eJHaem	6. 最初と最後の頁 480 ~ 483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jha2.402	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 Fuchida Shin-ichi, Kawamura Koji, Sunami Kazutaka, Tsukada Nobuhiro, Fujii Shiro, Ohkawara Hiroshi, Usuki Kensuke, Wake Atsushi, Endo Shinya, Ishiyama Ken, Ueda Yasunori, Nakamura Yukinori, Miyamoto Toshihiro, Fukuda Takahiro, Ichinohe Tatsuo, Atsuta Yoshiko, Takamatsu Hiroyuki	4. 巻 28
2. 論文標題 Retrospective Analysis of Autologous Stem Cell Transplantation for AL Amyloidosis: A Study from the Multiple Myeloma Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Transplantation and Cellular Therapy	6. 最初と最後の頁 76 ~ 82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtct.2021.10.021	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 Takei Minoru, Okada Naoto, Nakamura Shingen, Kagawa Kumiko, Fujii Shiro, Miki Hirokazu, Ishizawa Keisuke, Abe Masahiro, Sato Youichi	4. 巻 45
2. 論文標題 A Genome-Wide Association Study Predicts the Onset of Dysgeusia Due to Anti-cancer Drug Treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 114 ~ 117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b21-00745	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 Kondo Shin, Kagawa Kumiko, Saito Takashi, Oura Masahiro, Sogabe Kimiko, Harada Takeshi, Fujii Shiro, Nakamura Shingen, Miki Hirokazu, Sato Nori, Ono Rei, Abe Masahiro, Katoh Shinsuke	4. 巻 -
2. 論文標題 Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation-clinical outcomes: impact of leg muscle strength	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMJ Supportive & Palliative Care	6. 最初と最後の頁 3256 ~ 3256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bmjspcare-2021-003256	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 Takahashi Mamiko, Sumitani Ryohei, Hori Taiki, Murai Jumpei, Kawata Shiyori, Oura Masahiro, Sogabe Kimiko, Harada Takeshi, Fujii Shiro, Miki Hirokazu, Kagawa Kumiko, Abe Masahiro, Nakamura Shingen	4. 巻 68
2. 論文標題 Intravenous busulfan-based conditioning with autologous stem cell transplantation for refractory B-cell lymphoma with central nervous system involvement	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Medical Investigation	6. 最初と最後の頁 196 ~ 201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2152/jmi.68.196	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 Sumitani Ryohei, Hori Taiki, Murai Jumpei, Kawata Shiyori, Oura Masahiro, Sogabe Kimiko, Takahashi Mamiko, Harada Takeshi, Fujii Shiro, Miki Hirokazu, Kagawa Kumiko, Abe Masahiro, Nakamura Shingen	4. 巻 60
2. 論文標題 Acute Myeloid Leukemia Developing with Acute Pancreatitis Mimicking Autoimmune Pancreatitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 1753 ~ 1757
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.4916-20	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 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Yusuke Inoue, Takeshi Harada, Hirofumi Tenshin, Asuka Oda, Ryohei Sumitani, Masahiro Oura, Kimiko Sogabe, Shiro Fujii, Shingen Nakamura, Hirokazu Miki, Kumiko Kagawa, Masahiro Hiasa, Jumpei Teramachi, Masahiro Abe
2. 発表標題 Down-regulation of the IRF4-SLAMF7 axis in MM cells by CELMoDs and HDAC inhibition.
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 Kimiko Sogabe, Takeshi Harada, Shingen Nakamura, Hirokazu Miki, Asuka Oda, Yusuke Inoue, Ryohei Sumitani, Tomoko Maruhashi, Masahiro Oura, Shiro Fujii, Kumiko Kagawa, Hirofumi Tenshin, Masahiro Hiasa, Jumpei Teramachi, Masahiro Abe
2. 発表標題 Resumption of myeloma cell sensitivity to proteasome inhibitors by PIM and Akt inhibition
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 Hirokazu Miki, Shingen Nakamura, Shiro Fujii, Masafumi Nakamura, Makiko Mizuguchi, Ryohei Sumitani, Masahiro Oura, Kimiko Sogabe, Mamiko Takahashi, Tomoko Maruhashi, Takeshi Harada, Kumiko Kagawa, Susumu Nishio, Tetsu Tomonari, Masahiro Abe
2. 発表標題 Diagnostic efficacy of non-invasive ultrasound shear wave elastography for hepatic AL amyloidosis.
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 Takeshi Harada, Yusuke Inoue, Hirofumi Tenshin, Asuka Oda, Ryohei Sumitani, Masahiro Oura, Kimiko Sogabe, Shiro Fujii, Shingen Nakamura, Hirokazu Miki, Kumiko Kagawa, Masahiro Hiasa, Jumpei Teramachi, Masahiro Abe
2. 発表標題 Expansion of T cells by CELMoDs and enhancement of their anti-myeloma effects by elotuzumab.
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 Takeshi Harada, Yusuke Inoue, Hirofumi Tenshin, Asuka Oda, Ryohei Sumitani, Masahiro Oura, Kimiko Sogabe, Shiro Fujii, Shingen Nakamura, Hirokazu Miki, Kumiko Kagawa, Masahiro Hiasa, Jumpei Teramachi, Masahiro Abe
2. 発表標題 Induction of elotuzumab 's ADCC activity by Th1-like T cells towards osteoclasts as well as myeloma cells.
3. 学会等名 EH2021 26th Congress of European Hematology Association
4. 発表年 2021年

1. 発表者名	Kimiko Sogabe Takeshi Harada, Shingen Nakamura, Hirokazu Miki, Asuka Oda, Yusuke Inoue, Ryohei Sumitani, Masahiro Oura, Shiro Fujii, Kumiko Kagawa, Hirofumi Tenshin, Jumpei Teramachi, Masaki Ri, Shinsuke Iida, Masahiro Abe
2. 発表標題	Mechanisms for the resistance to proteasome inhibitors in myeloma cells: the role of PIM2 and Akt kinase activation and NRF2 accumulation
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	Takeshi Harada, Yusuke Inoue, Hirofumi Tenshin, Asuka Oda, Ryohei Sumitani, Masahiro Oura, Kimiko Sogabe, Shiro Fujii, Shingen Nakamura, Hirokazu Miki, Kumiko Kagawa, Masahiro Hiasa, Jumpei Teramachi, Masahiro Abe
2. 発表標題	Development of combinatory treatment of Th1-like T cells with elotuzumab against osteoclasts as well as 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	Hirokazu Miki, Shingen Nakamura, Masafumi Nakamura, Makiko Mizuguchi, Ryohei Sumitani, Masahiro Oura, Kimiko Sogabe, Mamiko Takahashi, Tomoko Maruhashi, Takeshi Harada, Shiro Fujii, Kumiko Kagawa, Hirofumi Hamano, Masateru Kondo, Naoto Okada, Yoshimi Bando, Itsuro Endo, Masahiro Abe
2. 発表標題	The importance of retaining physical functions to prevent SRE in 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	Hirokazu Miki, Shingen Nakamura, Masafumi Nakamura, Makiko Mizuguchi, Ryohei Sumitani, Masahiro Oura, Kimiko Sogabe, Mamiko Takahashi, Tomoko Maruhashi, Takeshi Harada, Shiro Fujii, Kumiko Kagawa, Hirofumi Hamano, Masateru Kondou, Naoto Okada, Yoshimi Bando, Itsuro Endo, Masahiro Abe
2. 発表標題	The importance of retaining physical functions to prevent skeletal-related events in multiple myeloma patients with bone disease.
3. 学会等名	The 48th annual meeting of European Calcified Tissue Society (ECTS)
4. 発表年	2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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