

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：82601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20803

研究課題名（和文）多発性骨髄腫における細胞外小胞を介した新規免疫調節薬耐性化機構の解明

研究課題名（英文）Understanding of multiple myeloma IMiDs resistance via extracellular vesicles

研究代表者

山元 智史（Yamamoto, Tomofumi）

国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・任期付研究員

研究者番号：40963369

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、以前報告した多発性骨髄腫治療薬であるレナリドミド耐性にEV分泌を介して関与することが明らかになっているLAMP2、SORT1遺伝子が感受性株よりどのように発現上昇し、耐性化に寄与するのか、その分子メカニズムの同定を試みた。その結果、LAMP2がSORT1の発現を制御していること、そのLAMP2はレナリドミドの標的タンパク質であるセレブロンとの発現と関係があることを示した。また、耐性株において内包されているmicroRNAをsmall-RNAseqにより、検討した。これまでに薬剤耐性に関して報告のあるいくつかのmicroRNAが有意に内包されることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性骨髄腫は近年、抗体医薬品を含む様々な治療薬が承認され、患者の予後は大きく改善した。しかしながら、薬剤への感受性がなくなり、いずれは再発を来す、治療困難な造血器腫瘍である。特に薬剤耐性による使用できる治療薬の減少は患者のQOLに大きく影響することから薬剤耐性機構を理解することは意義があるといえる。骨髄腫は様々なクローンが存在するヘテロな集団であり、さまざまな抵抗性獲得機構が存在すると考えられている。以前EVの分泌を抑制することで耐性獲得済み細胞から感受性株への抵抗性の伝播が抑制できることを報告した。本検討ではなぜ耐性株が生まれるのかに着目しており、骨髄腫治療戦略において重要である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on lenalidomide resistance in multiple myeloma cells. Previously, we showed that lenalidomide resistant cells more secreted EVs than those of parental cells. EV secretion was regulated by the LAMP2 and SORT1 genes in resistant cells. In this study, we attempted to identify the molecular mechanisms how these genes are upregulated in parental cells. As a result, we identified that the expression level of SORT1 was regulated by LAMP2 gene. Also, the expression level of LAMP2 was correlated with the expression of cereblon, which is a target protein of lenalidomide. Finally, we performed small-RNAseq to determine important microRNAs in the resistant cell-derived EVs. Several microRNAs that have been reported to be involved in drug resistance were included.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：細胞外小胞 エクソソーム 多発性骨髄腫 薬剤耐性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫(MM)は形質細胞ががん化した造血器腫瘍である(Pawlyn C, et al., Blood, 2018)。近年、MMはプロテアソーム阻害剤、免疫調節薬、抗体医薬品など様々な新規治療薬が開発され予後が大きく改善した。しかしながら、薬剤の長期ばく露による薬剤耐性や髄外へのMM細胞の漏出が始まると一転して予後不良となる(Bansal R, et al., Blood Cancer J, 2021)。特に維持療法にも使用される免疫調節薬の耐性化は患者の予後に寄与することが明らかとなっている。

これまでMM治療薬であるレナリドミド(Lenalidomide: Len)の薬剤耐性機構について研究を行ってきた。その中で樹立したLen耐性株では細胞外小胞(EV)の分泌が亢進していること、その分泌制御遺伝子としてSortilin 1: (SORT1)、Lysosome-associated membrane proteins-1: (LAMP2)を同定、さらにそれら耐性株由来EVを介して細胞接着関連薬剤耐性(CAM-DR)が感受性株に伝播されることを報告した(Yamamoto T, et al., Blood Adv., 2022)。また、SORT1、LAMP2の高発現が予後不良と関連することを見出した。

しかし、なぜLen投与で感受性株のSORT1、LAMP2発現が上昇し、耐性化するのか、その詳細な分子メカニズムは明らかになっていない。またLenの薬剤耐性には標的タンパク質であるセレブロンとの結合が重要であるといわれているが、その関連性も明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、いまだ明らかにされていない、MMにおいてEVを介した転移に関与するSORT1、LAMP2がどのように感受性株内で発現が上昇し、Len抵抗性株へと変化していくのか、標的タンパク質であるセレブロンとの関連性を明らかにしつつ、その分子メカニズムを同定することを目指す。また、EV内のどの内包物が薬剤耐性に寄与するのか、EVのsmall-RNAseqを行い内包されるmicroRNAに着目し、解析を行うことでMMにおける詳細な免疫調節薬の耐性化機構を明らかとする。

### 3. 研究の方法

これまでにSORT1、LAMP2、セレブロンの遺伝子変異株を作成している。それら樹立された株を用いて遺伝子発現量の変化をウエスタンブロットやRT-PCRを用いて確認する。また、耐性株においてSTAT3、p-PSAT3の発現亢進が確認された。SORT1はこれまでにEV上での発現が確認できており、細胞膜上のSORT1はGPCRと共役しており、AKT、STATなどの生存シグナルが活性化する(Cui H, et al., FASEB J, 2006)。耐性株由来のEVを添加することでSTAT3のような生存シグナルが活性化するのかを確認する。最後に耐性株由来EVと感受性株(親株)由来EVのsmall-RNAseqにより耐性株においてどのようなmicroRNAが内包されているのか、薬剤耐性との関わりを検討する。

### 4. 研究成果

まずは、樹立されたKMS21R、KMS27R、KMS34RにおけるSORT1、LAMP2ノックダウン株におけるSORT1、LAMP2の発現量をウエスタンブロットを用いて検討した(Figure 1a)。その結果、LAMP2ノックダウン株ではLAMP2だけでなくSORT1の発現量も減少していることが明らかとなった。LAMP2がSORT1の発現を制御している可能性が示唆された。次に、こ

これまでの検討により、本研究の RNAseq 発現データと公共データセットを用いた再解析で、セレブロンと LAMP2 の発現には相関があることが明らかとなった。そのため、セレブロンと LAMP2 の関係性を明らかにするため、セレブロンノックダウン株を作成した。Len を親株である KMS21 に添加し、経時的に LAMP2 の発現量を確認した (Figure 1b 左)。時間依存的に LAMP2 の発現量が上がることが明らかとなり、さらにセレブロンノックダウン株において LAMP2、SORT1 の発現上昇も確認できた (Figure 1b 右)。これらにより、セレブロンと LAMP2 にも何らかの関係があることが明らかとなった。さらにこれまでに EV 上に SORT1 が発現していることを同定した (Figure 1c 上)。これら EV 上の SORT1 が STAT3 のリン酸化を亢進できるのか、親株、耐性株、LAMP2、SORT1 ノックダウン株で同量の EV を親株に添加することで p-STAT3 の発現量を確認した (Figure 1c 下)。その結果耐性株由来の EV で処理された親株である KMS21 で最も p-STAT3 の発現が高く、LAMP2、SORT1 ノックダウン株ではその発現が抑制されていた。

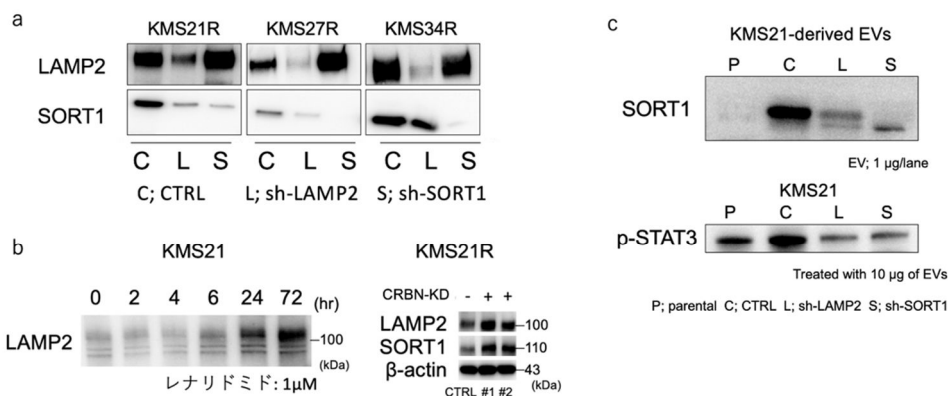


Figure 1. 遺伝子変異株におけるLAMP2、SORT1の発現解析

次に耐性株由来EVと感受性株(親株)由来EVのsmall-RNAseqを行い、内包されるmicroRNAプロファイルを得た。そこで、耐性株に2倍以上多く含まれており、 $p < 0.05$ のmicroRNAをリストアップすると123種類のmicroRNAが同定された。その中にはmiR-155-5pなどこれまでに薬剤耐性と関係すると報告されているmicroRNAが20種類程度含まれており、EVに内包されているmicroRNAもまた転移に関わる可能性が示唆された。最も発現差があったmiR-155-5pについてRT-PCRによって発現量を確認したところsmall-RNAseqの結果と同様に耐性株由来EVに有意に多く含まれていた。今後はターゲットの特定やセレブロンとLAMP2との関係性を明らかにすることで複合的にMMにおけるLen耐性機構を明らかとしたい。

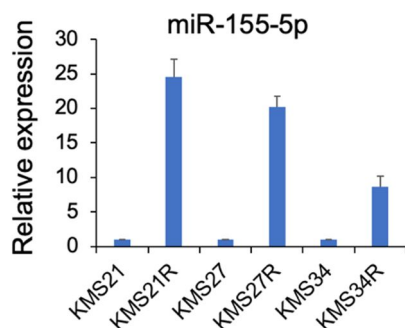


Figure 2. miR-155-5pの発現量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山元 智史, 中山 淳
2. 発表標題 多発性骨髄腫におけるレナリドミド耐性と細胞外小胞分泌
3. 学会等名 日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山元 智史, 中山 淳, 落谷 孝広, 山本 雄介
2. 発表標題 Establishment of a platform for single-cell meta-analysis in multiple myeloma
3. 学会等名 日本骨髄腫学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山元 智史, 中山 淳, 落谷 孝広, 山本 雄介
2. 発表標題 ヒト血漿模倣培地を用いた乳がん薬剤感受性と転移機能の解析
3. 学会等名 日本がん転移学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山元 智史, 中山 淳, 山本 雄介, 落谷 孝広
2. 発表標題 Phosphoserine Aminotransferase 1 Promotes Cancer Metastasis via Extracellular Vesicles
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山元 智史, 中山 淳, 山本 雄介, 落谷 孝広
2. 発表標題 セリン代謝異常による細胞外小胞分泌とがん転移促進機構
3. 学会等名 日本細胞外小胞学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山元智史, 山本雄介, 石井明子, 落谷孝広
2. 発表標題 microRNA制御を応用した細胞外小胞大量産生法の確立
3. 学会等名 日本再生医療学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 山元智史, 山本雄介, 石井明子, 落谷孝広
2. 発表標題 スループットなエクソソーム検出系を用いたエクソソーム分泌制御関連マイクロRNAのスクリーニングとがん悪性化機構
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2024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
---------	---------