

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 2 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591404

研究課題名(和文) "骨髄腫幹細胞ニッチ" の解析と治療標的分子の同定

研究課題名(英文) Analysis of myeloma stem cells and their niche

研究代表者

芦原 英司 (Ashihara, Eishi)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70275197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：新規分子標的薬の開発によっても、多発性骨髄腫(MM)の症例において治癒が望めないのが現状で、その原因の一つとしてMM幹細胞が残存することがあげられる。そこで本研究ではMM幹細胞の性状解析を進めた。免疫不全マウスに移植したMM細胞が低酸素状態であることから、長期間低酸素状態で生存可能なMM(HA-MM)細胞株を樹立した。この細胞は、幹細胞マーカーを発現し、静止期の細胞集団も多く、がん幹細胞の性状を有することが明らかとなった。またSmad2のリン酸化亢進を認め、TGF- $\beta$ /Smadシグナル系がMM幹細胞の治療標的である可能性が示唆された。今後骨髄環境との関係から治療標的分子を明らかにしていく。

研究成果の概要(英文)：We investigated the characteristics of hypoxia-adapted MM (HA-MM) cells. Irradiated NOD/SCID mice were inoculated with AMO-1 MM cells. After 2 or 4 weeks transplantation, the inoculated MM cells were positive for pimonidazole. These observations suggested that MM cells are hypoxic in the BM. We then established HA-MM cell lines that can continue to proliferate in hypoxic conditions (1% O<sub>2</sub>) for more than six months. The G0 fraction cells significantly increased in HA-MM cells compared with those in the parental MM cells. The survival durations of mice transplanted with HA-MM cells were significantly shorter than that of mice transplanted with parental MM cells. Stem cell markers such as Sox2, Oct3, and Nanog mRNA transcripts increased in the HA-MM AMO-1 cells. Furthermore, phosphorylated Smad2 expression was increased in HA-AMO-1 cells. These findings suggest that HA-MM cells possess stem cell-like characters and may provide a useful model to investigate the mechanism of MM stem cells.

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：多発性骨髄腫 低酸素 骨髄微小環境 がん幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫 (MM) に対する治療成績は、近年の造血幹細胞移植術の進歩やボルテゾミブやレナリドマイドなどの新規治療薬の開発により急速に向上した。研究代表者は  $\beta$ -catenin に対する siRNA、および新規 Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル阻害剤 AV65 を用い、 $\beta$ -catenin が MM 治療の新規分子標的となることを明らかにしてきた (**Ashihara et al. Clin Cancer Res 2009, Yao, et al. Blood Cancer J 2011**)。しかし既存の治療法や分子標的薬によっても根治できるのはごく一部の症例に限られる。その原因の一つとして MM 細胞を供給する幹細胞が残存することがあげられる。MM 幹細胞に関する研究は、他の固形腫瘍、造血器腫瘍幹細胞研究に比して世界的にみても非常に乏しいが、2010 年のアメリカ血液学会 Scientific Program で、MM 幹細胞のセッションが初めて企画されており、MM 幹細胞研究は今後注目されるテーマである。今までの研究で明らかにされているように、MM 細胞の維持・増殖には特に骨髄微小環境との関係が重要でそれらを標的とした治療法が開発されているが、MM 幹細胞の骨髄微小環境における動態については解明されていない。

MM の増殖の主座である骨髄腔内は、酸素分圧約 50 mmHg (Harrison et al. *BLOOD* 2002, Skouby et al. *Acta Med Scand* 1976)、酸素濃度約 1% と低酸素状態にある。Wnt/ $\beta$ -catenin 経路は幹細胞維持には極めて重要なシグナルであるが、低酸素環境における Wnt/ $\beta$ -catenin 経路は細胞種により異なる。大腸がん細胞株では、活性化された低酸素誘導因子 (HIF-1) により  $\beta$ -catenin はユビキチン化を受けプロテアソームにて分解され、Wnt/ $\beta$ -catenin 経路の下流シグナルが阻害される (Kaidi et al. *Nat Cell Biol* 2007)。一方、ES 細胞や神経幹細胞では HIF-1 により Wnt/ $\beta$ -catenin 経路は活性化される (Mazumdar et al. *Nat Cell Biol* 2010)。しかしながら、低酸素環境下の MM における Wnt/ $\beta$ -catenin 経路活性について今まで報告をみていない。

## 2. 研究の目的

”MM 幹細胞ニッチ”、およびがん幹細胞維持に重要な Wnt/ $\beta$ -catenin 経路をはじめとするシグナルに注目し、MM 幹細胞維持に関わるシグナルを同定し、MM を完治できる治療法開発に寄与することを目的とし研究を行った。

## 3. 研究の方法

### 1) 正所性 MM マウスモデルによる“MM 幹細胞ニッチ”の同定

2 Gy 照射した NOD/SCID マウスにヒト MM 細胞株 AMO-1 細胞を経尾静脈投与することで、正所性 MM マウスモデルが作製される (移植後約 35 日で全例死亡)。このマウスを用いて移植後初期の生着部位を確認するとともに、ピモニダゾール染色 (Takeuchi et al. *Cell Death Differ* 2010) により低酸素状態を検証した。

### 2) 低酸素環境適応 (HA-) MM 細胞の性状解析

O<sub>2</sub> 濃度 1% に設定した低酸素インキュベータ内で MM 細胞株を培養し、HA-MM 細胞株の作製を試みた。これら HA-MM 細胞と親株を比較し、低酸素環境である骨髄内での MM 幹細胞の性状を解析した。

### 3) MM 幹細胞維持機構の解析

低酸素状態および骨髄疑似環境における MM 幹細胞維持のための分子機構の解明を行った。

## 4. 研究成果

### 1) 正所性 MM マウスモデルによる“MM 幹細胞ニッチ”の同定と低酸素環境適応 (HA-) MM 細胞の性状解析

ヒト MM 細胞株 AMO-1 細胞を 2 Gy 照射した NOD/SCID マウスに経尾静脈投与し、正所性 MM 担がんマウスを作製し、MM 細胞の骨髄内の動態を解析した。移植後 2 週間では骨端部に生着を認め、4 週間を経過すると骨幹部にも生着部位は広がり、主に骨内膜直下に多くの MM 細胞を認めた。これらの生着 MM 細胞はピモニダゾール染色で染まり、低酸素状態 (O<sub>2</sub><1.3%) であることが示された。以上のことから、骨髄に定着した MM 細

胞は低酸素状態に存在することが考えられた。

そこでヒト MM 細胞株を用いて、O<sub>2</sub> 濃度 1% の低酸素環境下で長期生存できるテイン酸素環境適応 MM (HA-MM) 細胞株を作製した。AMO-1、OPM-2、U266、H929、IM-9 の 6 株で作製を試み、すべての細胞株で 6 ヶ月以上安定して生存・増殖を続ける HA-MM 細胞株の樹立に成功した。それぞれの細胞増殖を解析したところ、低酸素環境では細胞増殖速度はそれぞれ HA 株で有意に遅く、また doubling time (倍加時間) も有意に長かった。これらの HA 細胞株を Normoxia (20%) 下の培養条件に戻したところ、増殖速度は Normoxia 下での培養細胞と同等の増殖速度に復した。次に Ki67/7-AAD を用いた二重染色による細胞周期解析では、親株である Normoxia 下での培養細胞に比して、G<sub>0</sub> 期の細胞集団が有意に増加しており、また SP 分画の細胞集団も有意に多く認められた。

次に、放射線照射を施した NOD/SCID マウスへの移植実験を行った。HA-MM 細胞移植マウス群は親株細胞の移植マウス群より生存期間は有意に短く、またより少数の細胞での定着を認めた。さらに二次移植実験においても親株に比べ生着率が高かった。次に Oct3/4、Sox2 といった幹細胞マーカーの mRNA の発現を RT-PCR にて検討したところ、HA-MM 細胞株でそれらの発現亢進を認めた。以上のことから、低酸素環境で長期生存可能な MM 細胞は MM 幹細胞 (がん幹細胞) の性状を有することが示唆された。

## 2) MM 幹細胞維持機構の解析

HA-MM 細胞におけるシグナル解析を行った。まず MM の治療標的として有効であると報告してきた  $\beta$ -カテニン (Ashihara et al. *Clin Cancer Res* 2009, Yao, Ashihara, et al. *Clin Cancer Res*, 2011.) の発現や、慢性骨髄性白血病の HA 株で治療標的分子の一つとして同定した Glyoxalase 1 (Takeuchi et al. *Cell Death Differ* 2010) の発現を検討したが、いずれの分子も MM 親株と HA 株で発現の差は認めなかった。次に、TGF- $\beta$  シグナルに着目した。O<sub>2</sub> 濃度 1% に設定した低酸素イ

ンキュベータ内で MM 細胞株 (OPM-2、U266、IM-9) を培養し、自律的に増殖を続ける HA-MM 細胞株の作製を試み、HA-OPM-2 の樹立に成功した (HA-OPM-2 細胞の *in vitro* での増殖スピードは、親株に比べ遅い)。今後、他株においても樹立を試み、TGF- $\beta$  シグナルの下流の Smad2 のリン酸化亢進を認めた。以上のことから MM においては TGF- $\beta$ /Smad シグナル系が MM 幹細胞維持に関与することが示唆された。

## 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 18 件) (すべて査読有)

1. Yao H, Miura Y, Ashihara E, Hirai H, et al. (他 11 名、12 番目) Parathyroid hormone enhances hematopoietic expansion via upregulation of cadherin-11 in bone marrow mesenchymal stromal cells. *Stem Cells*, in press. doi: 10.1002/stem.1701.
2. Fujii W, Ashihara E, Kawahito Y. (他 10 名、2 番目) . Myeloid-Derived Suppressor Cells Play Crucial Roles in the Regulation of Mouse Collagen-Induced Arthritis. **J Immunol**, 191:1073-1081, 2013. doi: 10.4049/jimmunol.1203535.
3. Takaoka Y, Ashihara E. (他 8 名、6 番目) . Quantitative Comparison of Endogenous Protein Dynamics between in Live Cell and in vitro by in cell 19F-NMR. **ChemCom**, 49:2801-2803, 2013. doi: 10.1039/c3cc39205h.
4. Hirai H, Ashihara E, Maekawa T. (他 8 名、8 番目) . Cyclic AMP responsive element binding proteins are involved in 'emergency' granulopoiesis through the upregulation of CCAAT/enhancer binding protein  $\beta$ . **PLoS One**, 8: e54862, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0054862.

5. Hayashi Y, Hirai H, Ashihara E. (他 7 名、7 番目). C/EBP $\beta$  promotes BCR-ABL-mediated myeloid expansion and leukemic stem cell exhaustion. **Leukemia**, 27:619-628, 2013. doi: 10.1038/leu.2012.258.
6. Sawai Y, Murata H, Ashihara E. (他 8 名、8 番目). Effectiveness of sulforaphane as a radiosensitizer for murine osteosarcoma cells. **Oncol Rep**, 29:941-945, 2013. doi: 10.3892/or.2012.2195. doi: 10.3892/ijo.2012.1735.
7. Koto K, Murata H, Ashihara E. (他 8 名、8 番目). Zoledronic acid significantly enhances radiation-induced apoptosis against human fibrosarcoma cells by inhibiting radioadaptive signaling. **Int J Oncol**, 42:525-534, 2013.
8. Hosogi S, Ashihara E. (他 6 名、4 番目). An inhibitor of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (NHE), ethyl-isopropyl amiloride (EIPA), diminished proliferation of MNK28 human gastric cancer cells by decreasing the cytosolic Cl<sup>-</sup> concentration via DIDS-sensitive pathways. **Cell Physiol Biochem**, 30:1241-1253, 2012. doi: 10.1159/000343315.
9. Satake S, Hirai H, Ashihara E. (他 11 名、11 番目). C/EBP $\beta$  is involved in the amplification of early granulocyte precursors during candidemia-induced 'emergency' granulopoiesis. **J Immunol**, 189:4546-4555, 2012. doi: 10.4049/jimmunol.1103007.
10. Sawai Y, Murata H, Ashihara E. (他 6 名、6 番目). Effects of low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on osteosarcoma and cancer cells. **Oncol Rep**, 28:481-486, 2012. doi: 10.3892/or.2012.1816.
11. Yao H, Ashihara E, Yokota A, Shimazaki C. (他 13 名、2 番目). AV-65, a novel Wnt/ $\beta$ -catenin signal inhibitor, successfully suppresses progression of multiple myeloma in a mouse model. **Blood Cancer J**, 1:e43, 2011. doi:10.1038/bjc.2011.41.
12. Yao H, Ashihara E, Maekawa T. Targeting the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in human cancers. **Exp Opin Ther Targets**, 15:873-887, 2011. doi: 10.1517/14728222.2011.577418.
13. Yamamoto-Sugitani M, Kuroda J, Ashihara E. (他 14 名、3 番目). Galectin-3 induced by leukemia microenvironment promotes drug resistance and bone marrow lodgment in chronic myelogenous leukemia. **Proc Natl Acad Sci USA**, 108:17468-73, 2011. doi: 10.1073/pnas.1111138108.
14. Tanaka R, Kimura S, Ashihara E. (他 15 名、3 番目). Rapid automated detection of ABL kinase domain mutations in imatinib-resistant patients. **Cancer Lett**, 312:228-234, 2011. doi: 10.1016/j.canlet.2011.08.009.
15. Nagao R, Ashihara E, Maekawa T. (他 9 名、2 番目). Growth inhibition of imatinib-resistant CML cells with the T315I mutation and hypoxia-adaptation by AV65, a novel Wnt/ $\beta$ -catenin signaling inhibitor. **Cancer Lett**, 312:91-100, 2011. doi: 10.1016/j.canlet.2011.08.002.
16. Tauchi T, Okabe S, Ashihara E. (他 3 名、3 番目). Combined effects of novel heat shock protein 90 inhibitor NVP-AUY922 and nilotinib in a random mutagenesis screen. **Oncogene**, 30:2789-2797, 2011. doi: 10.1038/onc.2011.3.
17. Takeuchi M, Ashihara E, Maekawa T. (他 8 名、2 番目). Rakicidin A effectively induces apoptosis in hypoxia adapted Bcr-Abl positive leukemic cells. **Cancer Sci**, 102:591-596, 2011. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01813.x.

18. Sakai K, Ashihara E, Yokota A, Maekawa T. (他 11 名、3 番目). Galectin-9 ameliorates acute Graft-versus-host disease through the induction of T-cell apoptosis. ***Eur J Immunol***, 41:67-75, 2011. doi: 10.1002/eji.200939931.
- [学会発表](計 16 件、うち招聘講演 1 件)
1. Ashihara E, Hirai H, et al. Hypoxia-adapted myeloma cells possess stem cell-like character. The 55<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Hematology. 2013.12.7-10. New Orleans, USA.
  2. Yao H, Miura Y, Ashihara E, et al. Direct interaction with bone marrow mesenchymal stromal/stem cells is required for hematopoietic expansion by parathyroid hormone. The 55<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Hematology. 2013.12.7-10. New Orleans, USA.
  3. Tamura A, Hirai H, Ashihara E, et al. Expression of C/EBP $\beta$  is involved in the exhaustion of hematopoietic stem cells through cell-intrinsic and cell-extrinsic mechanisms. The 55<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Hematology. 2013.12.7-10. New Orleans, USA.
  4. Yokota A, Hirai H, Ashihara E, et al. Cytokine-STATs signaling upregulate C/EBP $\beta$  in BCR-ABL+ leukemic cells independently from BCR-ABL/JAK-STAT pathway. The 55<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Hematology. 2013.12.7-10. New Orleans, USA.
  5. Takata K, Ashihara E, et al. Microglia-like monocytic cells derived from bone marrow cells phagocytose amyloid- $\beta$  and facilitate phagocytosis of amyloid- $\beta$  by resident microglia. The 55<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Hematology. 2013.12.7-10. New Orleans, USA.
  6. Fujii W, Ashihara E, Kawahito Y, et al. Myeloid-derived suppressor cells have regulatory roles in mouse collagen-induced arthritis. The Annual European Congress of Rheumatology. 2013.6-12-25. Madrid, Spain.
  7. Hayashi H, Hirai H, Ashihara E, et al. C/EBP $\beta$  is upregulated through STAT5 and accelerates exhaustion of leukemic stem cells during BCR-ABL-mediated myeloid expansion. The 54<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Hematology. 2012.12.8-11. Atlanta, USA.
  8. Tamura A, Hirai H, Ashihara E, et al. C/EBP $\beta$ -mediated expansion of hematopoietic stem/progenitors precedes 'Emergency' granulopoiesis induced by cadidemia. The 54<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Hematology. 2012.12.8-11. Atlanta, USA.
  9. Fujii W, Ashihara E, Kawahito Y, et al. Myeloid-derived suppressor cells accumulated in spleens of mice with collagen-induced arthritis and inhibited immune response of CD4+ T cells. The 2012 American College of Rheumatology Annual meeting. 2012.11.9-14. Washington DC, USA.
  10. Ashihara E et al. AV-65, a novel Wnt/ $\beta$ -catenin signal inhibitor, suppresses progression of multiple myeloma in a mouse model. The 3dr JSH International Symposium. 2012.5.25-26. Kawagoe, Japan.
  11. 芦原英司、他 . 新規 Wnt/ $\beta$ -カテニン経路阻害剤 AV65 による多発性骨髄腫細胞の増殖抑制効果 . 第 71 回日本癌学会学術総会 2012.9.19-21.札幌
  12. Hayashi Y, Hirai H, Ashihara E, et al. BCR/ABL-mediated myeloid expression

is promoted by C/EBP $\beta$ , a regulator of emergency granulopoiesis. The 53<sup>rd</sup> Annual Meeting of American Society of Hematology. 2011.12.10-13. San Diego, USA.

13. Tauchi T, Ashihara E, et al. Targeting the hedgehog signaling pathway in therapy-resistant Bcr-Abl1 positive leukemia with ponatinib. The 53<sup>rd</sup> Annual Meeting of American Society of Hematology. 2011.12.10-13. San Diego, USA.
14. Munaka T, Ashihara E, et al. A microfluidic device to mimic the bone marrow environment: real-time observation of the leukemic cell behavior. The 15<sup>th</sup> International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences. 2011.10.2-6. Seattle, USA.
15. Ashihara E. Future prospect of RNA interference for cancer therapies. The 12<sup>th</sup> Congress of the Asian Society of Transplantation. 2011.9.27. Seoul, Korea.
16. Yao H, Ashihara E, et al. AV-65 inhibited the growth of myeloma cells by enhancing  $\beta$ -TrCP-mediated  $\beta$ -catenin ubiquitination. 第73回日本血液学会総会 2011.10.15. 名古屋.

〔図書〕(計4件)

1. Ashihara E, Maekawa T. Springer. Emerging Trends in Cell and Gene Therapy. 2013. 705 (287-305).
2. 芦原英司. 医療ジャーナル社. 多発性骨髄腫 Updating. 第4巻 移植適応骨髄腫の治療. ~新規薬剤時代における移植適応患者の治療戦略~ 2013. 203 (74-78).
3. 芦原英司. 医療ジャーナル社. 多発性骨髄腫 Updating. 第4巻 移植適応骨髄腫の治療. ~新規薬剤時代における移植適応患者の治療戦略~ 2013. 203 (97-100).

4. 芦原英司, 前川 平. 医歯薬出版. RAN 医学・医療—新たな診断・治療を拓く— 2011. 608 (547-552).

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 細胞選別器及び細胞選別方法

発明者: 務中達也、阿部浩久、叶井正樹、前川 平、木村晋也、芦原英司

権利者: 株式会社島津製作所 国立大学法人 京都大学

種類: 特許権

番号: 特願 2011-210160

出願年月日: 2011.9.27.

国内外の別: 国内

○取得状況(計1件)

名称: マイクロ反応装置を用いた細胞運動評価システム

発明者: 務中達也、阿部浩久、叶井正樹、前川 平、木村晋也、芦原英司、庄子習一

権利者: 株式会社島津製作所 国立大学法人 京都大学 学校法人早稲田大学

種類: 特許権

番号: 特許第 5166360 号

取得年月日: 2012.12.28.

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://labo.kyoto-phu.ac.jp/seiri/seiri-j.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

芦原 英司 (ASHIHARA EISHI)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 70275197

### (2)研究分担者

平位 秀世 (HIRAI HIDEYO)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 50315933