

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461436

研究課題名(和文) 骨髄低酸素微小環境に潜む多発性骨髄腫幹細胞の根絶をめざした新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel therapy against myeloma stem cells in a bone marrow hypoxic 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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年の造血幹細胞移植術の進歩や新規薬剤の登場によっても、多発性骨髄腫(MM)は治癒を望める症例はごく一部に限られ、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推察されている。申請者はそのMM幹細胞の性状解析を続け、さらなる新たな知見を得た。MMにおける幹細胞性の維持にはTGF- β /Smadシグナルが重要で、そのシグナルを遮断することで幹細胞性が減弱することがclonogenic replating assayで明らかとなった。このことからTGF- β /SmadシグナルがMM幹細胞の治療標的の一つとなることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The prognosis of patients with multiple myeloma (MM) has been improved by the emergence of new molecular targeting agents including proteasome inhibitors and immunomodulating agents. Nevertheless, MM remains incurable at present because it is likely that MM stem cells are resistant to these targeting agents. Thus, it is important to further investigate the biology of MM stem cells to cure the MM patients. We have established the hypoxia-adapted MM cells (MM-HA) that can survive under hypoxic conditions (O₂ 1%) for more than six months and these MM-HA cells have cancer stem cell-like characters. In this project, we clarified further characters of HA-MM cells. HA-MM cells have significantly higher plating efficiencies in a clonogenic replating assay. Moreover, the inhibition of TGF- β /Smad signaling reduced plating efficiencies, suggesting that TGF- β /Smad signal could be a novel target against MM-stem cells.

研究分野：血液内科

キーワード：多発性骨髄腫 がん幹細胞 骨髄微小環境 低酸素環境 TGF-

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。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。研究代表者は Wnt シグナル系に着目し、古典的 Wnt シグナルの下流分子 β -catenin が MM の新規標的分として有効であ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)。しかし新規薬剤の登場によっても、治癒を望める症例はごく一部に限られ、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推察されている。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乏しい。表面抗原解析による MM 幹細胞の同定研究では、CD138 陰性分画や CD19 陽性 B 細胞に MM 幹細胞が存在すると報告されてきた (Matsui et al. *Blood* 2004, Matsui et al. *Cancer Res* 2008) が、反例も示されている (Jakubikova et al. *Blood* 2005, Hosen et al. *Leukemia* 2012)。研究代表者は白血病幹細胞のように表面抗原で幹細胞分画を分離することは不可能と考え、別観点から MM 幹細胞同定研究を進めている。MM の病態の主座である骨髄微小環境内が、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ことに注目し、低酸素適応 MM 細胞株を樹立し、その性状解析を行い (H23-25 年度基盤研究 (C) “骨髄腫幹細胞ニッチの解析と標的分子の同定”) 以下のような知見を得た。

1) 非致死量の放射線照射を施した NOD/SCID マウスに MM 細胞株である AMO-1 細胞を移植し、生着した MM 細胞の性状を解析した。骨端部 (epiphysis) の内膜直下に MM 細胞を認

め、かつ MM 細胞はピモニダゾール (PIM) 陽性であり、酸素分圧 10 mmHg 以下の低酸素状態にあった。

- 2) 酸素濃度 1% の低酸素状態で 1 年以上の長期間にわたり生存・増殖する低酸素環境適応 MM (MM-HA) 細胞株を樹立した。これらの細胞には G0 期分画が多く、NOD/SCID マウス移植後の増殖能力が高く、親株 (O₂ 20% で培養) より早期に死に至らしめた。
- 3) MM-HA 細胞における幹細胞マーカーの発現は親株より高く、幹細胞性を有する。
- 4) リン酸化 Smad2 の発現が高く、MM 細胞における幹細胞性の維持に TGF- β /Smad 系シグナルの関与が示唆された。

2. 研究の目的

新規薬剤の登場によっても治癒を望める症例は限られている MM に対して、その原因の一つとして MM 幹細胞の存在が考察される。我々が樹立した MM-HA 細胞はその MM 幹細胞様に性状を有する。本研究では MM 化細胞維持機構を破綻させることにより、MM 幹細胞を撲滅し MM 患者に福音をもたらすことを最終目標として、MM-HA 細胞の更なる正常解析と新規治療法の開発を目的として研究を進めた。

3. 研究の方法

1) MM-HA 細胞の性状解析

Limiting dilution 法による MM-HA 細胞の性状解析

H23-25 年度基盤研究 (C) で行った移植よりもさらに移植細胞数を減少させ、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し、親株 MM 細胞との生着率を比較した。

Serial transplantation 法による幹細胞性の確認

親株細胞、並びに MM-HA 細胞を移植した NOD/SCID マウスの骨髄より MM 細胞を採り出し、CD138 抗原を指標に MM 細胞を二次移植し、生着率および生存期間を検討した。MM 細胞の骨髄内での接着・生存に関わる接着因子の発現を親株の MM 細胞と MM-HA 細胞で比較検討した。MM-HA 細胞の幹細胞性を、clonogenic replating assay を用いて検討した。

2) 疑似骨髄環境における MM-HA 幹細胞の動態解析

骨髄での環境を模擬するために、ヒト骨髄間質細胞由来の HS-5 細胞株との共培養系において、Normxia (O₂ 20%) および低酸素環境における細胞周期、幹細胞マーカー発現を解析した。

3) MM-HA 幹細胞維持分子の機能阻害による治療効果解析

MM-HA 細胞で活性化している TGF-β/Smad シグナルを SB431542 にて阻害し幹細胞性の変化を、clonogenic replating assay を用いて検討した。

4. 研究成果

1) MM-HA 細胞の性状解析

Limiting dilution 法および serial transplantation 法による MM-HA 細胞の幹細胞性の確認

移植細胞数を 1×10^6 /mouse から 8×10^3 /mouse まで希釈し、2 Gy 照射した NOD/SCID マウスに移植し、生着率および生存期間を解析した。MM-HA 細胞では、より少数の MM 細胞でも生着し宿主マウスを死亡させた。さらに、二次移植モデルにおいて MM-HA 細胞では全例

死亡したのに対し、同期間の観察期間で親株の MM 細胞移植では 20% しか死亡しなかった。このことから、MM-HA 細胞は MM 幹細胞であることが強く示唆された。

MM 細胞の骨髄内での接着・生存に関わる接着因子の発現

生着率の相違を明らかにするために、MM 細胞に発現する接着因子について検討した。今回検討した 3 株においては一定の変化は認めなかったが、正所性移植モデルに用いた AMO-1 細胞株では CD44、CD49d および CD54 の発現増加を強く認めた。このことから、AMO-1-HA 細胞における生着率の亢進は、これら 3 種の接着因子の発現増加が関与していることが示唆された。

clonogenic replating assay を用いた MM-HA 細胞の幹細胞性の検討

次に MM-HA 細胞の clonogenicity を clonogenic replating assay により検証した。メチルセルロース培地を用いコロニーを作製し、10 から 11 日目にコロニー数をカウントし、播種細胞数で除することで plating efficiency を算出した。また形成されたコロニーを全て集め、PBS(-)で 3 回洗浄後再度メチルセルロース培地を用い細胞を播種し、この操作を 3 回繰り返し、plating efficiency を親株と HA 細胞株で比較検討した。すべての replating において HA 細胞での plating efficiency が高く、かつコロニーあたりの平均細胞数も有意に多かった。以上より、*in vitro* 系においても HA 細胞の幹細胞性が証明された。

2) 疑似骨髄環境における MM-HA 幹細胞

の動態解析

細胞周期解析

HS-5 細胞との共培養系において、親株および HA 細胞ともに G0 期分画の細胞集団が増加し、特に HA 細胞において著明に増加した。

幹細胞マーカー発現解析

次に、幹細胞マーカーである SOX2、OCT4、NANOG mRNA 発現を比較検討した。興味深いことに、親株においてはこれらの分子の発現亢進は認めず、HA 細胞でも発現亢進を認めたものの、G0 期分画の増加に相当するほどの増加は認めなかった。これらのことより、MM 細胞においては、G0 期に留まっていることと幹細胞であることは同義でない可能性があること、さらに MM 細胞の幹細胞性維持には骨髄間質細胞との接着よりも低酸素環境に存在することが寄与する可能性が高いことが示唆された。

3) MM-HA 幹細胞維持分子の機能阻害による治療効果解析

最後に、活性化している TGF- β /Smad 経路を SB431542 にて遮断することによる clonogenicity の変化を replating assay にて検討した。TGF- β /Smad 経路を阻害することで、replating efficiency が有意に減少した。

以上より、MM 細胞において低酸素環境は幹細胞性の獲得維持に重要なシグナルで、その一部に TGF- β /Smad 経路が関与していることが明らかにされ、MM の治療のため TGF- β /Smad 経路が標的経路の1つであることが推察された。ただし、本検討は細胞株での検討であり、今後は患者検体を用いた検討、さらに *in vivo* 系における検討にて検証する必要があると考える。

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)(全て査読有、*責任著者)

1. Imayoshi N, Yoshioka M, Ashihara E*, et al. CG13250, a novel bromodomain inhibitor, suppresses proliferation of multiple myeloma cells in an orthotopic mouse model. *Biochem Biophys Res Commun*, 484:262-268, 2017.
2. Matsumura K, Nakata S, Ii H, Ashihara E, et al. Depletion of γ -glutamylcyclotransferase inhibits cancer cell growth via induction of cellular senescence mediated by upregulated CDK inhibitors. *BMC Cancer*, 16:748, 2016.
3. Ashihara E*, Takada T, Maekawa T. Targeting the canonical Wnt/ β -catenin pathway in hematological malignancies. *Cancer Sci*, 106:665-671, 2015.
4. Fukuda H, Nakamura S, Ashihara E*, et al. Daphnetin inhibits invasion and migration of LM8 murine osteosarcoma cells by decreasing RhoA and Cdc42 expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 471:63-67, 2016.
5. Takada T, Takata K, Ashihara E*. Inhibition of monocarboxylate transporter 1 suppresses the proliferation of glioblastoma stem cells. *J Physiol Sci*, 66:387-396, 2016.
6. Fujii W, Ashihara E*, et al. Monocarboxylate transporter 4,

associated with the acidification of synovial fluid, is a novel therapeutic target for inflammatory arthritis. *Arthritis Rheumatol*, 67:2888-2896, 2015.

7. Tamura A, Hirai H, Yokota A, Maekawa T, et al. Accelerated apoptosis of peripheral blood monocytes in Cebpb-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 464:654-658, 2015.
8. Hirai H, Yokota A, Tamura A, Sato A, Maekawa T. Non-steady-state hematopoiesis regulated by the C/EBP β transcription factor. *Cancer Sci*, 106:797-802, 2015.
9. Ashihara E*, Munaka T, Kimura S, Maekawa T, et al. Isopentenyl Pyrophosphate Secreted from Zoledronate-Stimulated Myeloma Cells, Activates the Chemotaxis of $\gamma\delta$ T Cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 463:660-665, 2015.
10. Nakamura T, Nakao T, Yoshimura N, Ashihara E*. Rapamycin prolongs cardiac allograft survival in a mouse model by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Am J Transplant*, 15:2364-2377, 2015.
11. Toda Y, Takata K, Akaji K, Ashihara E*, et al. Effective internalization of U251-MG-secreted exosomes into cancer cells and characterization of their lipid components. *Biochem Biophys Res Commun*, 456:768-773, 2015.

[学会発表](計9件)

1. Imayoshi N, Yoshioka M, Ashihara E, et al.: A novel BRD4 inhibitor CA2

suppresses MM cell proliferation in an orthotopic myeloma mouse model. The 58th American Society of Hematology annual meeting, 2016. 12. 3-6; San Diego, USA.

2. 芦原英司: 「造血器悪性腫瘍に対する Wnt/ β -catenin シグナルを標的とした創薬研究」第39回日本分子生物学会年会・シンポジウム「ダウン症遺伝子を科学する。～精神発達遅滞、固形がん、白血病の病態メカニズムを解明する～」2016.11.30-12.02; 横浜。(招聘講演)
3. Matsumura K, Nakata S, Ii H, Ashihara E, et al.: Depletion of β -glutamylcyclotransferase inhibits cancer cell growth via cellular senescence caused by CDK inhibitor induction. The 24th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, 2016.7.11; Manchester, UK.
4. Tomogane M, Shimizu T, Toda Y, Takata K, and Ashihara E: $\gamma\delta$ T cells exert cytotoxicity against cancer cells regardless of PD-L1 expression in cancer cells. 第75回日本癌学会学術総会. 2016.10.6-8; 横浜.
5. Kado Y, Ashihara E, and Shimazaki C, et al.: Monitoring of lenalidomide levels for prediction of its toxicity and efficacy in myeloma patients. 第78回日本血液学会学術集会, 2016.10; 横浜.
6. Ashihara E, Imayoshi N, et al.: Novel bromodomain inhibitors suppress proliferation of multiple myeloma cells. The 57th American Society of Hematology annual meeting, 2015. 12. 5-8; Orlando, USA.
7. Kado Y, Ashihara E, and Shimazaki C, et al.: Prediction of the lenalidomide

toxicity and its therapeutic efficacy in Japanese multiple myeloma patients by measuring its plasma concentration. The 57th American Society of Hematology annual meeting, 2015. 12. 5-8; Orlando, USA.

8. Ashihara E, Nakagawa Y, Maekawa T, et al.: Hypoxia-adapted myeloma cells possess stem cell characters. 日本癌学会シンポジウム/共同利用・共同研究拠点シンポジウム がん幹細胞・微小環境・分子標的 ~がん進展制御への挑戦 (金沢), 2015.1,21-22.
9. Toda Y, Takata K, Ashihara E, et al.: Cancer cell tropism of glioblastoma-derived exosomes regulated by their lipid components. FEBS EMBO 2014. 2014. 8. 30-9. 4; Paris, France.

〔図書〕(計1件)

1. 芦原英司. Wnt シグナル経路を標的とした骨髄腫治療薬開発. 日本臨床 増刊号 多発性骨髄腫学 最新の診療と基礎研究 谷脇雅史 編. 日本臨床社, 大阪: pp.173-179, 2016

〔産業財産権〕

出願状況 (計1件)

名称: エクソソームの遺伝子機能を抑制することができる複合体、がんの増殖および/または転移抑制剤

発明者: 山吉麻子、村上 章、芦原英司、小堀哲生

権利者: 国立大学法人京都大学、大学法人京都薬科大学

種類: PCT 出願 特許権

番号: PCT/JP2017/005994

出願年月日: 2017年2月17日

国内外の別: 国際特許

取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔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

横田明日美 (YOKOTA ASUMI)

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号: 00571556

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

島崎千尋 (SHIMAZAKI CHIHIRO)

地域医療機能推進機構京都鞍馬口医療センター・院長

高田哲也 (TAKADA TESTUYA)

京都薬科大学・薬学部・大学院生