

低酸素環境適応多発性骨髄腫細胞の
シグナル伝達経路を標的とする治療戦略の探索

2018 年度

京都薬科大学 論文博士学位論文

芦原 英司

論文博士学位論文 内容の要旨

氏名：芦原英司 (Eishi Ashihara)

学位論文題目：

低酸素環境適応多発性骨髄腫細胞のシグナル伝達経路を標的とする治療戦略の探索

序章 (はじめに)

多発性骨髄腫 (multiple myeloma; MM) は抗体産生細胞である形質細胞が腫瘍性に増殖し、貧血、白血球減少、出血傾向、腎不全、骨融解等、様々な症状を引き起こす造血器腫瘍である。従来の治療ではメルファランとプレドニンを中心とした多剤併用療法が主体であったが、ボルテゾミブやレナリドミドといった新規分子標的治療薬の登場、また造血幹細胞移植術の進歩により、治療成績は劇的に改善された。しかし、これら既存の治療法や分子標的薬によっても根治できる症例は一部に限られ、根治されない MM に対する有効な治療法の開発は、MM 治療において最重要課題と考えられる。

悪性腫瘍が従来の抗悪性腫瘍治療で治癒されない理由の一つとして、がん幹細胞 (cancer stem cell; CSC) による再発が考えられている。CSC はがん組織を再構築する自己複製能を有する細胞で、従来の抗がん薬や分子標的治療薬では駆逐することができない。がん組織において、酸素濃度が 1% 以下の低酸素環境に CSC が存在すると考えられており、この CSC の性状の解明に基づく CSC 駆逐に有効な新規治療薬の開発は、がん根治のための喫緊の課題である。

本研究では、「MM を再構築する MM 幹細胞は骨髄中の酸素濃度が 1% 以下の部位に存在する」と仮説を立て、1% 低酸素環境下で生存可能な hypoxia-adapted MM (HA-MM) 細胞株を樹立した。得られた HA-MM 細胞の性状を解析し、シグナル伝達経路を標的とする治療戦略を考案する基礎検討を行った。

第1章 β -catenin の新規標的分子としての有用性の検討

Wnt/ β -catenin 経路は、胚成熟時の対軸形成、器官形成、幹細胞の増殖・分化制御、等の重要な働きをしており、本経路の活性化は多くのがん種の CSC の維持・増殖に関わっている。そこで、本経路のシグナル伝達を担う β -catenin を標的タンパク質とする MM 治療薬の可能性を検討した。MM 細胞株および MM 患者細胞を用いて、 β -catenin タンパク質の発現を解析したところ、健常人の形質細胞に比べて、MM 細胞において β -catenin の高発現を認めた。次にヒト MM 細胞株 RPMI8226 細胞をヌードマウスの皮下に移植し作製した異所性 MM 担がんマウスに対し、 β -catenin siRNA による MM 増殖抑制効果を検討した。siRNA 送達キャリアとしてアテロコラーゲンを用いた。皮下腫瘍の形成を確認後、 β -catenin siRNA を連日腫瘍局所に投与したところ、MM の増殖を有意に抑制した。また β -catenin siRNA 投与マウスの MM 腫瘍組織内に、TUNEL 陽性細胞および活性化カスパーゼ 3 陽性細胞の増加を認めた。以上より、 β -catenin は MM の治療標的として有用であることが示された。

第2章 HA-MM 細胞の性状解析

第1章の結果を受けて、MM 幹細胞に近い性状を有する細胞株に対する治療標的の探索を行った。「MM 幹細胞は酸素濃度が 1% 以下の部位の骨髄中に存在する」との仮説に基づき、まず非致死量放

射線照射を施した NOD/SCID マウスの尾静脈からヒト MM 細胞株 AMO-1 細胞を輸注し、正所性 MM 担がんマウスを作製した。MM 担がんマウスの骨髄内に生着した AMO-1 細胞の酸素濃度を検討した。生着した AMO-1 細胞はピモニダゾール陽性で、酸素濃度 1.3%以下の低酸素状態であることが明らかとなった。そこで 1%酸素濃度下で長期（6 か月以上）生存可能な HA-MM 細胞株を樹立し、その性状を解析した。HA-MM 細胞は正常酸素濃度（20%）培養時の細胞（parental MM 細胞）に比べ増殖速度は遅く、休止期分画および side population 分画の細胞集団を多く認めた。また、HA-MM 細胞は parental MM 細胞より造腫瘍能および腫瘍再構築能が高く、さらに幹細胞マーカーが高発現していることを見出した。これらのことから、HA-MM 細胞は MM 幹細胞としての性状を有することが明らかとなった。次に第 1 章で MM の標的シグナルとして有効性を示した Wnt/ β -catenin 経路に着目し、 β -catenin タンパク質の発現を検討した。しかし parental MM 細胞と発現量に明らかな相違を認めなかった。そこで次に造血幹細胞の幹細胞性維持に関わる TGF- β /Smad 経路に着目し Smad2 のリン酸化を検討したところ、HA-MM 細胞でリン酸化 Smad2 の増加を認めた。TGF- β /Smad 経路阻害剤 SB431542 を投与したところ、HA-MM 細胞では休止期の細胞分画の減少を認め、さらに replating colony assay 法にて HA-MM 細胞の自己複製能の低下を認めた。これらのことから、HA-MM 細胞は MM 幹細胞の性状を有し、TGF- β /Smad 経路が活性化されていること、本経路の阻害により HA-MM 細胞の自己複製能が抑制されることが示され、TGF- β /Smad 経路が MM 幹細胞の治療標的となりうることが示唆された。

第 3 章 MM 細胞の分泌する $\gamma\delta$ T 細胞遊走因子の解析

T 細胞の一種である $\gamma\delta$ T 細胞は自然免疫担当細胞であるが、近年ビスホスホネート製剤 (BPs) であるゾレドロン酸 (ZOL) を用いた培養系で大量増幅可能であることや、細胞障害性 T 細胞と異なり主要組織適合性抗原非拘束性に殺腫瘍細胞作用を発揮することなどが示され、臨床試験が行われている。また著者らも $\gamma\delta$ T 細胞が数種の MM 細胞に高い抗腫瘍効果を発揮することを明らかにしている。これらのことから、上記 2 章で可能性が示唆された MM 治療薬の効果を増強させうる方法として、 $\gamma\delta$ T 細胞を用いたがん免疫細胞療法の併用が考えられる。そこで、本細胞療法の応用について検討を加えた。まず、ZOL 処理した MM 細胞から分泌される $\gamma\delta$ T 細胞遊走因子を、少数の細胞の挙動を観察できる細胞機能解析チップ（マイクロチップ）を用いて探索した。まず、マイクロチップの微小培養室に健常人ボランティアから分取した $\gamma\delta$ T 細胞を入れ、ヒト MM 細胞株 RPMI8226 細胞の培養上清をマイクロインジェクターにて導入口より注入し、 $\gamma\delta$ T 細胞の挙動を位相差顕微鏡でタイムラプス撮影を行った。新鮮な完全培地注入時には $\gamma\delta$ T 細胞はランダムに動くのに対し、培養上清の注入時にマイクロチップの導入口を目指して遊走していることを発見し、さらに導入口方向への $\gamma\delta$ T 細胞の遊走速度が速くなっていることも明らかにした。次に、メバロン酸代謝経路の中間産物であるイソペンテニルピロリン酸 (IPP) に着目し IPP による $\gamma\delta$ T 細胞の遊走変化を検討した。IPP を導入口より注入したところ、 $\gamma\delta$ T 細胞は導入口を目指して遊走し、導入口方向への $\gamma\delta$ T 細胞の遊走速度も増加した。最後に RPMI8226 細胞の培養上清中の IPP を HPLC-MS/MS 法にて測定したところ、培養上清中の IPP 濃度は処置した ZOL 濃度依存的に増加していることを見出した。これらの結果から、本遊走因子 IPP を利用した $\gamma\delta$ T 細胞を介するがん免疫細胞療法の併用が、MM に対する治療効果を増強させうることを示唆された。

総括

本研究の遂行により、Wnt/ β -catenin 経路が MM 治療の有効な治療標的であること、また低酸素環境に適応した HA-MM 細胞が MM 幹細胞としての性状を有し、TGF- β /Smad 経路が治療標的として有効であることが示唆された。さらに、分子標的治療に、 $\gamma\delta$ T 細胞の遊走因子を利用したがん免疫細胞療法を併用することで治療効果を増強させる可能性が示唆された。本基礎的研究の成果は、MM 幹細胞を駆逐できる新たな治療戦略の開発につながる新たな知見である。

目次

序論 (はじめに)	1
第1章 β -catenin の新規標的分子としての有用性の検討.....	3
第1節 緒言.....	3
第2節 材料と方法.....	5
1. 細胞株とヒト検体.....	5
2. 抗体.....	5
3. MM 細胞における β -catenin タンパク質の発現解析.....	5
4. β -catenin small interfering RNA (siRNA) によるノックダウン効果の検証.....	6
5. マウスモデルを用いた β -catenin siRNA による MM に対する抗腫瘍効果の検証.....	8
6. 統計解析.....	8
第3節 結果.....	9
1. MM 細胞における β -catenin タンパク質の発現.....	9
2. マウスモデルを用いた β -catenin siRNA による MM に対する抗腫瘍効果.....	12
第4節 考察.....	16
第5節 小括.....	18
第2章 低酸素適応 MM (HA-MM) 細胞の性状解析.....	19
第1節 緒言.....	19
第2節 材料と方法.....	21
1. 細胞株.....	21
2. 抗体.....	21
3. MM 細胞の免疫不全マウスへの生着実験.....	21
4. フローサイトメトリー法による解析.....	22
5. MM 細胞コロニー形成能の検討.....	22
6. ウェスタンブロッティング法による解析.....	22
7. qRT-PCR 法による解析.....	22
8. 統計解析.....	23
第3節 結果.....	24
1. MM 細胞の免疫不全マウスへの生着.....	24
2. 低酸素環境適応 MM 細胞株の樹立.....	25
3. HA-MM 細胞の幹細胞性の検証.....	27
4. HA-MM 細胞の幹細胞様性状の維持に関わるシグナルの解析.....	31
第4節 考察.....	33
第5節 小括.....	35

第3章 MM細胞の分泌する $\gamma\delta$ T細胞遊走因子の解析.....	36
第1節 緒言.....	36
第2節 材料と方法.....	39
1. 細胞株.....	39
2. 試薬.....	39
3. ヒト $\gamma\delta$ T細胞の培養.....	39
4. RPMI8226細胞の培養上清の作製.....	39
5. トランスウエルチャンバーを用いた $\gamma\delta$ T細胞遊走の解析.....	39
6. マイクロチップを用いた $\gamma\delta$ T細胞遊走の定量的解析.....	40
7. 培養上清中のIPP濃度測定.....	40
8. 統計解析.....	41
第3節 結果.....	42
1. RPMI8226細胞の培養上清による $\gamma\delta$ T細胞遊走に及ぼす影響.....	42
2. RPMI8226細胞培養上清中のIPP濃度測定.....	44
3. IPPによる $\gamma\delta$ T細胞遊走に及ぼす影響.....	45
第4節 考察.....	47
第5節 小括.....	49
総括.....	50
謝辞.....	52
引用文献.....	54
Supplementary information.....	64

略語集

MM	multiple myeloma
IGH	immunoglobulin heavy chain
MAF	musculoaponeurotic fibrosarcoma
MMSET	multiple myeloma set domain
CCND	cyclin D
MGUS	monoclonal gammopathy of undetermined significance
MP	melphalan • prednisolone
CR	complete remission
CSC	cancer stem cell
HA	hypoxia-adapted
Fz	frizzled
GSK3 β	glycogen synthase kinase-3 β
LPR5/6	low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6
Dvl	Dishevelled
APC	adenomatous polyposis coli
CK1 α	casein kinase α 1
CBP	cAMP response element binding protein
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
FCS	fetal calf serum
SM/PC	streptomycin/penicillin
mAb	monoclonal antibody
HRP	horseradish peroxidase
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
RIPA	radioimmunoprecipitation assay
PVDF	polyvinylidene difluoride
siRNA	small interfering RNA
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
quantitative RT-PCR	qRT-PCR
SPF	specific pathogen-free
Gy	gray
PBS	phosphate buffer saline
DDS	drug delivery system
TANEL	terminal uridine deoxynucleotide nick end-labeling
IL-6	interleukin-6
HIF	hypoxia-inducible factor
PHD	prolyl-hydroxylase domain containing protein
APC	allophycocyanin

FITC	fluorescein
HE	Hematoxylin-Eosin
Pimo	pimonidazole hydrochloride
FCM	flow cytometry
7-AAD	7-amino-actinomycin D
SP	side population
TGF- β	transforming growth factor- β
MHC	major histocompatibility complex
IPP	isopentenyl pyrophosphate
BP	bisphosphonate
μ TAS	micro total analysis system
ZOL	zoledronic acid
HPLC	high-performance liquid chromatography
MTT	3-(4, 5-dimethylthial-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide
ECI	effective chemotaxis index
MS/MS	tandem mass spectrometry
DMAPP	dimethylallyl pyrophosphate
CM	conditioned medium
E:T	Effector cell:Target cell

序論 (はじめに)

多発性骨髄腫 (multiple myeloma; MM) は形質細胞の腫瘍性増殖により、それに伴うモノクローナルな免疫グロブリン (M タンパク質) の産生、M タンパク質による腎機能不全、増殖した MM 細胞の骨髄内占拠による貧血や白血球減少とそれに伴う易感染性、骨融解に伴う骨折や高カルシウム血症等、多彩な臓器障害や症状を呈する造血器腫瘍である。MM は全造血器腫瘍の約 10% を占め (1)、本邦の MM の罹患者数は高齢者人口の増加に伴う増加傾向を示している。国立がん研究センターの最新がん統計では 2013 年での罹患率は、1 年間に人口 10 万人あたり男性で 5.9 人、女性で 4.7 人であり、また 2016 年の統計での死亡率は 1 年間に人口 10 万人あたり男性で 3.6 人、女性で 5.4 人である (2)。

ほとんどの MM 細胞の起源は末梢リンパ組織の胚中心 B 細胞で、長期間生存する形質細胞へ分化が決定された形質芽球と考えられている。胚中心において B 細胞は抗原提示細胞である濾胞樹状細胞から刺激・活性化され、活性化誘導シチジンデアミナーゼにより免疫グロブリン遺伝子の VDJ 領域の体細胞超変異、および免疫グロブリンの C 領域に遺伝子再構成が誘導されクラススイッチが生じる。この過程で、MM 細胞によく認める免疫グロブリン重鎖 (Immunoglobulin heavy chain: IGH) 領域の染色体転座が生じると考えられていた (3)。近年の次世代シーケンサーの解析結果から MM における IGH 領域の異常な転座のいくつかは骨髄中の proB 細胞における DJ 再構成に伴って生じることが示された (4)。このようにいずれの分化段階の細胞であっても認める IGH 領域の染色体転座が MM 発症の最初のステップの約 50% に同定されており (5)、その結果 *c-MYC*、*musculoaponeurotic fibrosarcoma (MAF)*、*MM set domain (MMSET)*、等のがん遺伝子、細胞の増殖・生存に有利に働く遺伝子の活性化や *cyclin D (CCND)* が脱抑制され、MM 細胞の起源細胞の腫瘍化をもたらす (6, 7)、MM の前がん病変である monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) へと形質転換される。そこにがん遺伝子 *Ras* の活性化変異 (8)、DNA の低メチル化 (9) や nuclear factor κ B (NF- κ B) 経路の活性化 (10)、等の 2 番目の異常が加わり、MGUS はくすぶり型 (smoldering) MM、種々の症状を伴う症候性 MM、さらには予後不良な髄外増殖を伴う MM へと進展していく。このように MM 発症・進展には多種多様な遺伝子異常が複雑に関わるため、1 個の細胞から発症した MM であっても、MM 腫瘍内は極めて不均一であることが明らかにされた (11-13)。

MM は 1844 年に“mollities and fragilitas ossium” (soft and fragile bones) を有する病態として記載され (14)、1962 年にアルキル化剤であるメルファランが MM 治療薬としての有効性が報告された (15)。その後、有効性が報告されていたプレドニゾン (16) との併用治療の有効性が認められて (17) 以来、メルファラン・プレドニゾン (melphalan・prednisone; MP) 療法が MM の治療として行われてきた。両薬剤ともに経口薬であり、高齢者患者の多い MM では比較的使いやすいこともあり、長年にわたり MM の標準的治療法としてもちいられてきたが、MP 療法の完全奏効率 (complete remission: CR) は 5% 未満、全生存期間中央値は約 3 年と、決して満足できるものではなかった (18)。その後 1970 年代以降には多剤併用療法も行われてきたが、MP 療法を凌駕する結果は得られなかった (19)。1990 年代以降は大量化学療法を伴う自家造血幹細胞移植術が、65 歳以下の若年症例に

は標準的治療法と位置づけられ、CR 率も約 40%まで改善した (20)。

1990 年代には種々の造血器悪性腫瘍の分子病態が解明され、病態に基づいた分子標的治療薬が開発されるようになり、MM に対しても 2000 年代に免疫調節薬であるサリドマイド、プロテアソーム阻害薬であるボルテゾミブが登場し、MM の治療成績は著明に改善された (1)。現在もなお病態把握に基づいた多くの新規治療薬の開発が近年精力的に進められており、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬のパノビノスタット (21)や抗体医薬品であるダラツムマブやエロツズマブ (22)が開発されている。しかしながら、MM は既存治療薬では未だに治癒が望めない難治性の造血器腫瘍であり、さらなる病態解析による根治に到達できる治療法の開発は、MM 治療の最重要課題の 1 つである。

がん治療において、再発や治療抵抗性により治癒が望めない原因の 1 つに、既存の治療薬にがん幹細胞 (cancer stem cell: CSC) が無効であることが推察されている。正常組織が自己複製能と多分化能を有する幹細胞から分化した多様な細胞集団から構成されるのと同様に、がん組織内のがん細胞も、がん組織も増殖能力を有する様々な非幹細胞性がん細胞と、非幹細胞性がん細胞を生み出し、がん組織を構成する大元になるがん組織の幹細胞、すなわち CSC から構成されることが明らかにされた (23, 24)。さらに CSC には、正常の組織幹細胞と同じ性状を有し静止期にあり、かつ ABC トランスポーターを発現し、さらに薬剤耐性能や転移能を有するといった高い悪性度を示す細胞集団も存在する (25)。CSC の起源細胞としては 2 つのモデルが考えられている。正常幹細胞に遺伝子変異が蓄積し CSC に変化したとするモデルと、幹細胞から分化が進み限定された増殖能力を有する組織前駆細胞に多種多様な遺伝子変異が蓄積し、幹細胞性を獲得し CSC に変化したとするモデルである (26, 27)。CSC は、正常組織幹細胞が組織の微小環境、“ニッチ (Niche)”の影響を受け生存・維持されるのと同様に、がん発生源母地組織の環境、“がん微小環境ニッチ”の中で守られ維持されている (26)。

MM も、MM の“ニッチ”である骨髄微小環境の影響を受け生存しており (28-31)、多くの研究者によって MM 幹細胞が存在する可能性が示唆されてきた (32-34)。骨髄組織は元来酸素濃度 1-6% の低酸素環境にある (35-37)。特に正常造血幹細胞が存在する骨芽細胞ニッチは酸素濃度 1%程度の極度の低酸素状態である (36)。本研究では、「MM を維持・再構成する MM 幹細胞も骨髄中の酸素濃度が 1%以下の部位に存在する」と仮説を立て、その検証のために 1%低酸素環境下で生存可能な低酸素適応 MM (hypoxia-adapted MM; HA-MM) 細胞株を樹立した。得られた HA-MM 細胞の性状を解析し、シグナル伝達経路を標的とする治療戦略を考案する基礎検討を行った。

第1章 β -catenin の新規標的分子としての有用性の検討

第1節 緒言

Wnt シグナル経路は、線虫、ショウジョウバエ、マウス、ラットのげっ歯類およびヒトに至るまで、進化上種々の動物で保存されている経路で、胚発生初期における体軸形成、各種器官形成、細胞の増殖・分化、組織再生等、生命現象に関わる重要な働きをしている (38)。リガンドとなる Wnt タンパク質は分子量が約 39-45 kDa の脂質修飾を受けた分泌糖タンパク質で、哺乳類では 19 種類が同定されている。Wnt タンパク質が 7 回膜貫通型受容体である frizzled (Fz) 受容体に結合することで刺激が入り、Wnt 経路は活性化される。Wnt 経路には β -catenin タンパク質依存的な古典的 (canonical) 経路と、非依存的な経路、すなわち planar cell polarity 経路と Ca^{2+} 経路があり、 β -catenin 非依存的経路は主に細胞骨格、細胞遊走や細胞極性の制御をしている (39)。 β -catenin は分子量が約 92 kDa のタンパク質で、接着分子であるインテグリンの裏打ちタンパク質として組織形成・維持に働く一方で、古典的 Wnt 経路の中間シグナル伝達分子でもある。古典的 Wnt/ β -カテニン経路では、リガンドである Wnt 分子が Fz 受容体に結合せず作用しない状態では、 β -catenin は adenomatous polyposis coli、Axin、glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β)、casein kinase 1 α と複合体を形成する。引き続き GSK3 β により β -catenin はリン酸化を受け、E3 リガーゼである β -transducin-repeat-containing protein によりユビキチン化される。ユビキチン化された β -catenin は 26s プロテアソームで分解される。Wnt 分子が Fz 受容体に結合すると、low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6 (LPR5/6) 受容体とともに受容体複合体を形成し、Dishevelled を介して β -catenin のリン酸化が抑制される。こうして細胞質内に蓄積された β -catenin が核内へ移行し、T cell factor/lymphoid enhancer factor ファミリー転写因子と結合する。さらに B-cell chronic leukocytic leukemia/lymphoma 9 protein や Pygopus と複合体を作り、*c-myc* や *cyclin D1*、*c-jun* 遺伝子の転写活性を促進し (Figure 1-1)、細胞増殖、幹細胞維持、体節や器官形成に働く。

近年、この古典的 Wnt/ β -catenin 経路が多くのがん種で恒常的に活性化しており、新たな治療標的分子として注目されている (39-41)。また本経路は CSC の維持にも関わるシグナルとして考えられており、本経路を遮断することで CSC を駆逐できる可能性が示唆されてきた (42-45)。本章では本経路のシグナル伝達を担う β -catenin を標的タンパク質とする MM 治療薬の可能性を検討した。

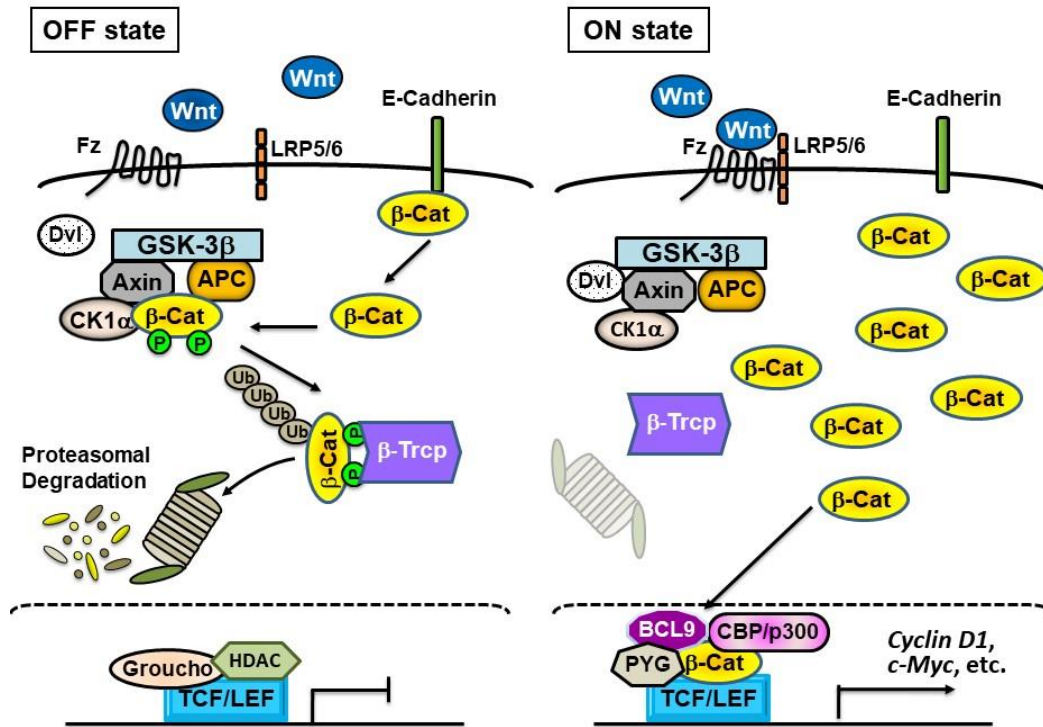


Figure 1-1 The Wnt/β-catenin Signaling Pathway.

In the absence of Wnt, in the “Wnt signal-off” state (left panel), “β-catenin degradation complex” is polyubiquitinated by β-TrCP and phosphorylated β-catenin is then degraded by the proteasome. In the presence of Wnt, in the “Wnt signal-on” state (right panel), phosphorylation of β-catenin is suppressed and β-catenin escapes from degradation. Free cytoplasmic β-catenin translocates to the nucleus and forms a complex with TCF/LEF. The β-catenin/TCF complex activates the transcription of target genes including *cyclin D1* and *c-myc*. Fz receptor, Frizzled receptor; LRP5/6, lipoprotein receptor-related protein 5/6; Dvl, Dishevelled; GSK-3β, glycogen synthase kinase-3β; APC, adenomatous polyposis coli; CK1α, casein kinase α1; β-TrCP, β-transducin repeat-containing protein; BCL9, B-cell chronic leukocytic leukemia/lymphoma 9 protein; PYG, Pygopus; CBP, cAMP response element binding protein; TCF, T-cell factor; LEF, lymphocyte enhancer factor; Ub, ubiquitin.

第2節 材料と方法

1. 細胞株とヒト検体

ヒト MM 細胞 AMO-1、RPMI8226、NCI-H929、U266、OPM-2、KMS-BM-12、EJM、LP-1 細胞株、および Epstein-Barr ウイルスにより形質転換した B 細胞株 IM-9 細胞は Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH (Braunschweig, Germany) から購入した。ヒト大腸がん細胞株 SW480 細胞およびヒト肺がん細胞株 A549 細胞は、American type culture collection (Manassas, VA, USA) から購入した。

IM-9、OPM-2、RPMI8226、NCI-H929、U266、SW480、A549 細胞株は、10%牛胎仔血清 (FCS; fetal calf serum、Invitrogen、東京)、終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシンと終濃度 100 units/mL ペニシリンとの混合溶液 (SM/PC; streptomycin/penicillin、Gibco、東京) および 2 mM l-glutamine (Gibco) 含有 RPMI1640 培地 (Gibco) を用い、AMO-1、KMS-12-BM 細胞株は、20%FCS、ST/PC および 2 mM l-glutamine 含有 RPMI1640 培地で、EJM、LP-1 細胞株は、10%FCS、ST/PC および 2 mM l-glutamine 含有 IMDM 培地 (Gibco) を用いて培養した。すべての細胞株は 5%CO₂ および 37°C で加湿条件下により培養した。

ヒト MM 患者検体として、5名の MM 患者から骨髄細胞から分離した 6 検体、腹水から分離した 1 検体および胸水から分離した 2 検体を用いた。ヒト非患者検体には、健康人ボランティアより分取した末梢血単核球、骨髄単核球および正常形質細胞を用いた。なお、いずれの検体もヘルシンキ宣言に則り、京都府立医科大学倫理委員会の承認後、文書による同意を得た患者および健康人より採取した検体である。

2. 抗体

マウス由来抗 β -catenin モノクローナル抗体 (monoclonal antibody; mAb) は BD Pharmingen (San Jose, CA, USA) から、マウス由来抗 dephosphorylated β -catenin mAb は Alexis Biochemicals (San Diego, CA, USA) から、マウス由来抗 phosphorylated β -catenin (pSer⁴⁵) mAb およびラビット由来ポリクローナル抗 actin Ab は Sigma-Aldrich (東京) から、ラビット由来ポリクローナル抗 caspase-3 Ab および抗 cleaved caspase-3 Ab は Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) から、ラビット由来ポリクローナル抗 Oct-1 Ab、マウス由来抗 β -catenin 抗体および抗 c-MYC mAb は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) からそれぞれ購入した。ワサビペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase; HRP) 結合型抗マウスおよび抗ラビット IgG 抗体は Amersham Biosciences (東京) から購入した。

3. MM 細胞における β -catenin タンパク質の発現解析

ヒト MM 細胞株および MM 患者検体における β -catenin タンパク質の発現を、既報(46)に基づくウエスタンブロッティング法にて解析した。患者 MM 細胞および健康人形質細胞は、患者ならびに健康人の骨髄検体および健康人の末梢血検体から Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences) を用いた密度勾配遠心法にて単核球を分離後、MM 細胞および正常形質細胞に発現する CD138 に対する抗体 (Miltenyi, Gladbach, Germany) と反応させ、magnetic cell sorting separation system (Miltenyi) を用いて純化し分取した。純化した細胞は Cell Quest ソフトウェアを用いて FACS Calibur (BD

Bioscience、東京)にて解析し、90%以上のMM細胞および形質細胞に濃縮されていることを確認し解析に用いた。腹水ならびに胸水から分離した細胞は、MM細胞が100%であった。

純化したMM細胞および形質細胞は、終濃度1mMのphenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)と終濃度10 μ g/mLのprotease inhibitorを含むradioimmunoprecipitation (RIPA) buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 0.25 M NaCl; 5 mM EDTA; 20 mM NaF; 1% NaF)で溶解し、14,000gで4 $^{\circ}$ C、30分間遠心後、上清を回収した。核分画と細胞質分画のタンパク質を含む上清はNE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents kit (Pierce Biotechnology, Rocjford, IL, USA)を用いて作製した。それぞれの上清は使用するまで-80 $^{\circ}$ Cで凍結保存した。タンパク質濃度はDC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories、大阪)で測定した。電気泳動には20 μ gのタンパク質を含む抽出液を用い、タンパク質分離は10%ドデシル硫酸ナトリウム-アクリルアミドゲルを用いた電気泳動により行い、ポリビニルデシフロライド (polyvinylidene difluoride; PVDF) メンブレン (Immobilon-P mambrae; Millipore、東京)に転写した。ブロッキング操作は5%スキムミルクを含有したウォッシュバッファーにより行った。転写したメンブレンは、1次抗体を含む5%スキムミルクを含有したウォッシュバッファーに4 $^{\circ}$ Cで16時間以上浸漬し、その後HRPを結合した2次抗体を室温にて1時間反応させた。タンパク質の検出は、メンブレンをECL Western blotting detection reagents またはECL plus Western blotting detection system (Amersham Biosciences)に浸漬することで発色させ、Hyperfilm (Amersham Biosciences)に焼き付けを行った。メンブレンはストリップ操作により結合抗体を除去し、再度1次抗体を反応させ、複数のタンパク質発現を評価した。

4. β -catenin small interfering RNA (siRNA) によるノックダウン効果の検証

マウスモデルに対する β -catenin siRNAの抗腫瘍効果を検討するため、3種類の β -catenin (Gene Bank accession number NM_001904) に対するsiRNAと1種類のscramble siRNAを購入した (Table 1-1; Takara Bio、草津)。まず、siRNAによるノックダウン効果を定量的real-time reverse transcription polymerase chain reaction (quantitative RT-PCR; qRT-PCR)法およびWestern blot法にて解析した。購入したsiRNAをSW480およびA549細胞にLipofectamine 2000 (Invitrogen)を用いトランスフェクション後、全RNAをMicro-to-Midi Total RNA Extraction Kit (Invitrogen)にて抽出し、逆転写を行った。Table 1-2に示すプライマーを用いて増幅させ、LightCycler System (Roche Diagnostics, Sandhoferstraße, Mannheim, Germany)とFastStart DNA Master SYBER Green I (Roche Diagnostics)を用い解析した。ハウスキーピング遺伝子として β -actin遺伝子を用いて標準化し、発現レベルを既報(47)に従い解析した。また β -catenin siRNAおよびscramble siRNAを導入した細胞を用いたWestern blot法は、上述した“3. MM細胞における β -cateninタンパク質の発現解析”の項の方法にて解析した。

Table 1-1 使用した siRNA の塩基配列

siRNAs		塩基配列
β -catenin siRNA #1	sense	5'-CCAGGAUGAUCCUAGCUAUTT-3'
	antisense	5'-AUAGCUAGGAUCAUCCUGGTT-3'
β -catenin siRNA #2	sense	5'-GUAUUUGAAGUAUACCAUATT-3'
	antisense	5'-UAUGGUAUACUCAAUAUACTT-3'
β -catenin siRNA #3	sense	5'-CCAUUACAACUCUCCACAATT-3'
	antisense	5'-UUGUGGAGAGUUGUAAUGGTT-3'
scramble siRNA	sense	5'-GGAAGAUAAUCUUUUCUAATT-3'
	antisense	5'-UUAGAAAAGAUUAUCUUCCTT-3'

Table 1-2 使用したプライマーの塩基配列

プライマー		塩基配列
β -catenin	forward	5'-GCTTGGTTCACCAGTGGATT
	reverse	3'-CCTTCCAGAGGAACCCTGAG
β -actin	forward	5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG
	reverse	3'-GACATGCGGTTGTGTCACGA

5. マウスモデルを用いた β -catenin siRNA による MM に対する抗腫瘍効果の検証

SLC (東京) より購入し京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設において specific pathogen-free (SPF) 環境下で飼育された 6~7 週齢の雄性 Balb/c nu/nu マウス (ヌードマウス) に 3 gray (Gy) の X 線を照射後、100 μ L の phosphate buffer saline (PBS) に浮遊した 5×10^6 個の RPMI8226 細胞をヌードマウスの右大腿部の皮下に移植した。腫瘍の大きさが 100 mm³ になった時点 (移植後 1~2 週間) から、drug delivery system (DDS) として用いた 1%アテロコラーゲン (終濃度 0.5% ; 大日本住友製薬より供与) と混和した β -catenin siRNA および scramble siRNA (終濃度 2.5 μ M、125 pmole) を、皮下腫瘍を包み込むように週 2 回皮下投与した。腫瘍の大きさはノギスを用いて計測し、(短径)² × (長径) / 2 で算出した。 β -catenin siRNA のノックダウン効果は、免疫組織染色にて投与 4 週間後に確認した。摘出した腫瘍塊をパラフィンで包埋後、マイクロトームを用いて 5 μ m に薄切し、1 次抗体を反応させ、VECTASTAIN Elite ABC kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) にて発色させた。細胞形態を明らかにするためヘマトキシリン・エオジン染色も併用した。MM 細胞のアポトーシスは、ApopTag plus peroxidase in situ apoptosis detection kit (Millipore、東京) を用いて terminal uridine deoxynucleotide nick end-labeling (TANEL) 法にて検証した。本実験は京都大学医学部動物実験委員会の承認を受け行った。

6. 統計解析

siRNA による効果は Student の t 検定にて解析し、p 値が 5%未満で統計学的に有意差ありと判定した。

第3節 結果

1. MM 細胞における β -catenin タンパク質の発現

8種類のヒトMM細胞株およびEbstein-Barrウイルスにより形質転換したB細胞株IM-9細胞株における β -cateninタンパク質レベルは、健常人の骨髄単核球および形質細胞における発現より増加していた (Figure 1-2)。またMM患者の骨髄、腹水ならびに胸水から分取したMM細胞においても、健常人末梢血および骨髄単核球より高発現していた (Figure 1-3)。さらにMM細胞株の細胞より抽出した核分画および細胞質分画タンパク質において、活性型の dephosphorylated β -catenin タンパク質も、プロテアソームへの分解経路に導かれる phosphorylated β -catenin タンパク質 (pSer⁴⁵) (Table 1-1) も発現しており (Figure 1-2)、MM患者検体においても両フォームの β -cateninタンパク質が、種々のレベルで健常人細胞より高発現していた (Figure 1-4)。以上より、MM細胞において β -cateninタンパク質が高発現していることが明らかとなった。

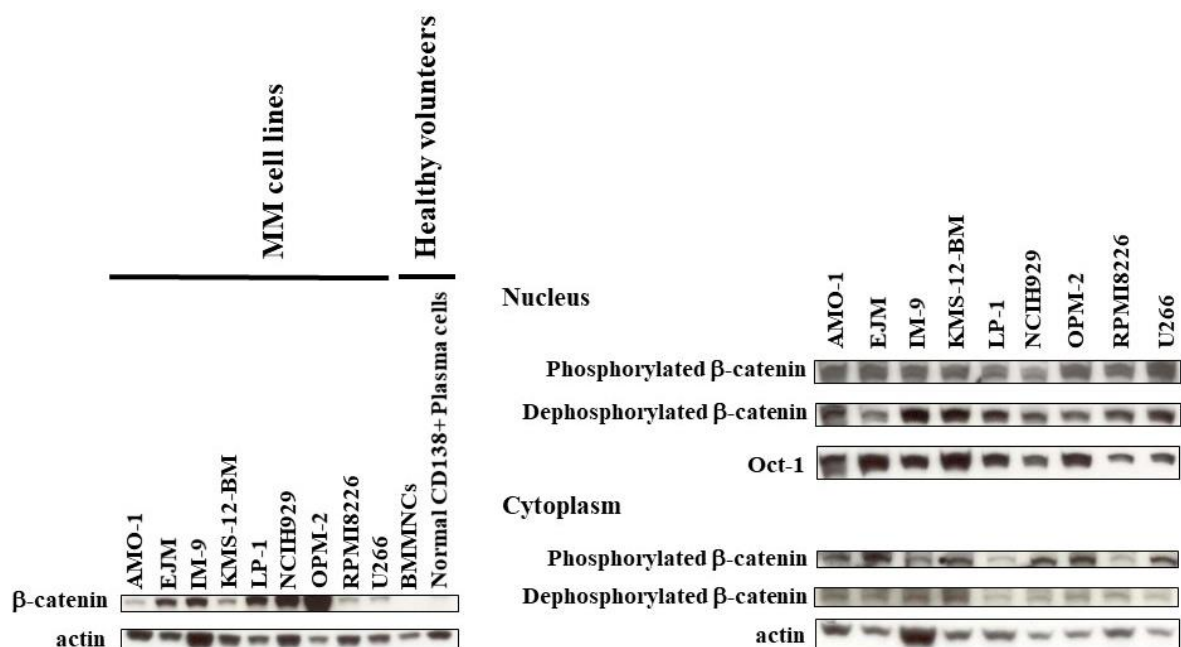


Figure 1-2 β -catenin expression in human MM cell lines was examined by Western blotting.

Left panel, β -catenin was overexpressed in myeloma cell lines compared with bone marrow mononuclear cells and normal CD138+ plasma cells obtained from healthy volunteers. Actin expression was used as a loading control. Right panel, phosphorylated and dephosphorylated forms of β -catenin were expressed in MM cell lines. American Association for Cancer Research permitted to use this figure for thesis.

Ashihara, E., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, **15**, 2731-2738 (2009)

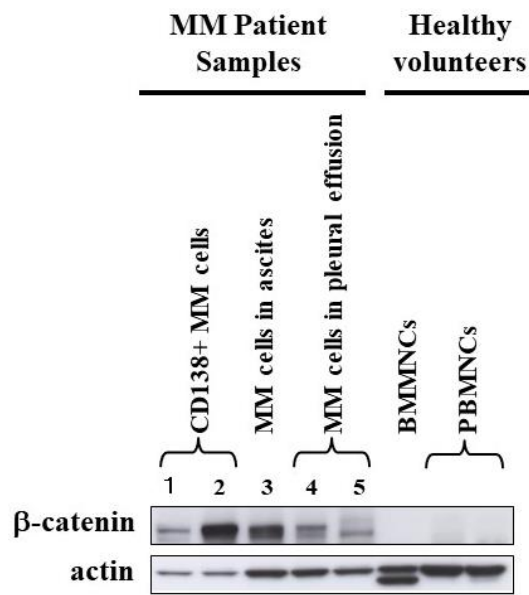


Figure 1-3 β -catenin expression in MM cells obtained from MM patients was examined by Western blotting.

β -catenin was overexpressed in MM patient samples compared with peripheral blood and bone marrow mononuclear cells obtained from healthy volunteers.

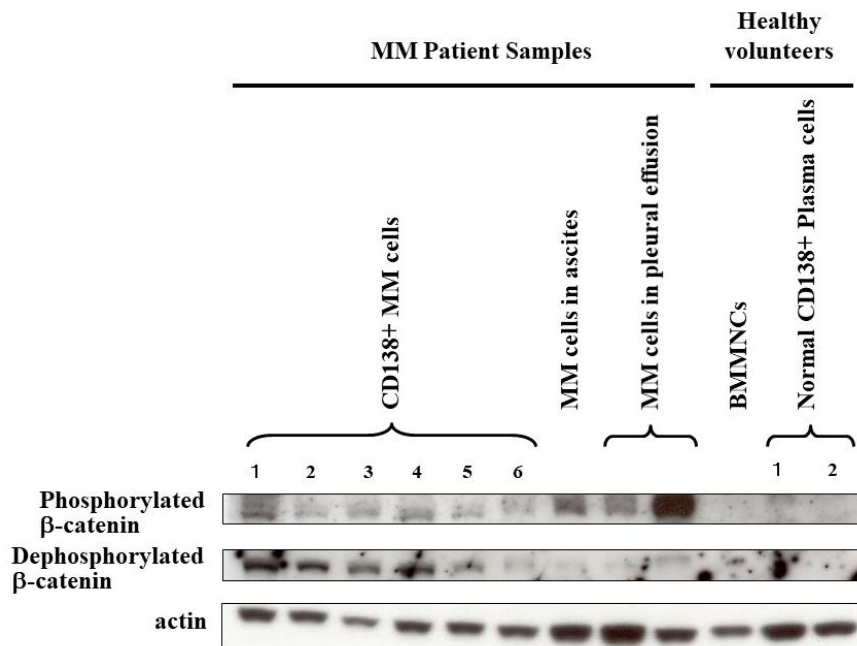


Figure 1-4 Phosphorylated and dephosphorylated forms of β -catenin expression in MM cells obtained from MM patients was examined by Western blotting.

Both forms of β -catenin were expressed in primary MM cells compared with those in cells obtained from healthy volunteers. American Association for Cancer Research permitted to use this figure for thesis.

Ashihara, E., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, **15**, 2731-2738 (2009)

2. マウスモデルを用いたβ-catenin siRNA による MM に対する抗腫瘍効果

次に高発現するβ-catenin タンパク質を RNA 干渉法にて発現を抑制することによる MM 細胞に対する抗腫瘍効果を、担がんモデルマウスを用いて検討した。3 種類のβ-catenin に対する siRNA のノックダウン効果を SW480 大腸がん細胞、ならびに A549 肺がん細胞を用いて検討した。100 nM の siRNA をリポフェクションにて SW480 細胞に導入 24 時間後、β-catenin siRNA #1-#3 のいずれも β-catenin mRNA 発現を減少させることを、qRT-PCR 法にて確認した (Figure 1-5A)。これら 3 種類のβ-catenin siRNA のうち、β-catenin siRNA#2 を A549 細胞にリポフェクションにて導入したところ、β-catenin mRNA 発現は 72 時間までは少なくとも抑制されることがわかり (Figure 1-5B)、導入 72 時間後のβ-catenin タンパク質発現が減少していることが Western blot 法にて確認された (Figure 1-5C)。

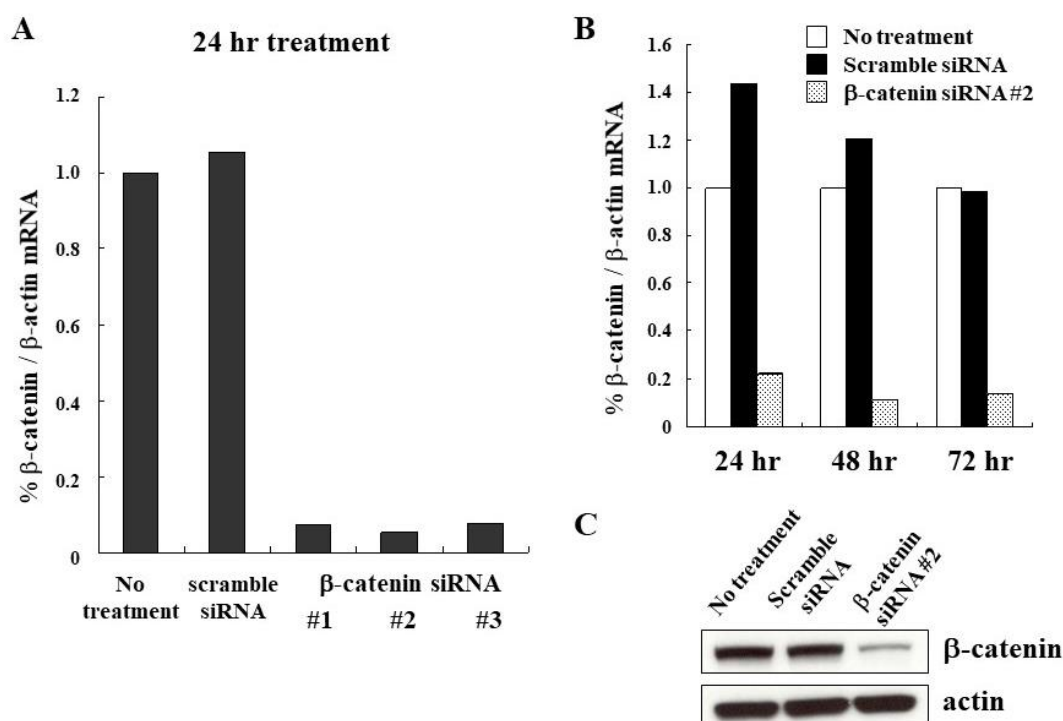


Figure 1-5 Effects of β-catenin siRNA *in vitro*.

(A) RT-PCR analysis indicates that all three β-catenin siRNAs decreased β-catenin mRNA levels in SW480 cells after 24 hr treatment. No reduction in expression was observed for cells with no treatment or treatment with scramble siRNA. (B) Real-time PCR analysis demonstrates that treatment of A549 cells with β-catenin siRNA #2 leads to a decrease in β-catenin mRNA levels over a period of 72 hr. No reduction in expression was observed for cells with no treatment or treatment with scramble siRNA. (C) Western blotting analysis of A549 cell lysates showed decreased expression of β-catenin siRNA after 72 hr treatment with β-catenin #2. No reduction in expression was observed for cells with no treatment or treatment with scramble siRNA. Actin expression was used as a loading control. American Association for Cancer Research permitted to use this figure for thesis.

Ashihara, E., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, **15**, 2731-2738 (2009)

次にβ-catenin siRNA #2 投与によるヒト MM RPMI8226 細胞に対する治療効果を担がんモデルマウスを用いて検討した。β-catenin siRNA 投与 4 週間後の MM 腫瘍組織では、β-catenin および Wnt/β-catenin シグナル経路の下流分子である c-MYC タンパク質の発現が減少していた (Figure 1-6)。また TANEL 陽性細胞および cleaved capase-3 陽性細胞も増加しており (Figure 1-7)、β-catenin siRNA 投与により Wnt/β-catenin シグナル経路は抑制され、RPMI8226MM 細胞にアポトーシスが誘導された。次に 6 週間β-catenin siRNA #2 を投与し、RPMI8226MM 腫瘍の大きさを計測したところ、アテロコラーゲンを DDS としてβ-catenin siRNA を用いた群は、他の群より有意に腫瘍増殖は抑制された (Figure 1-8)。

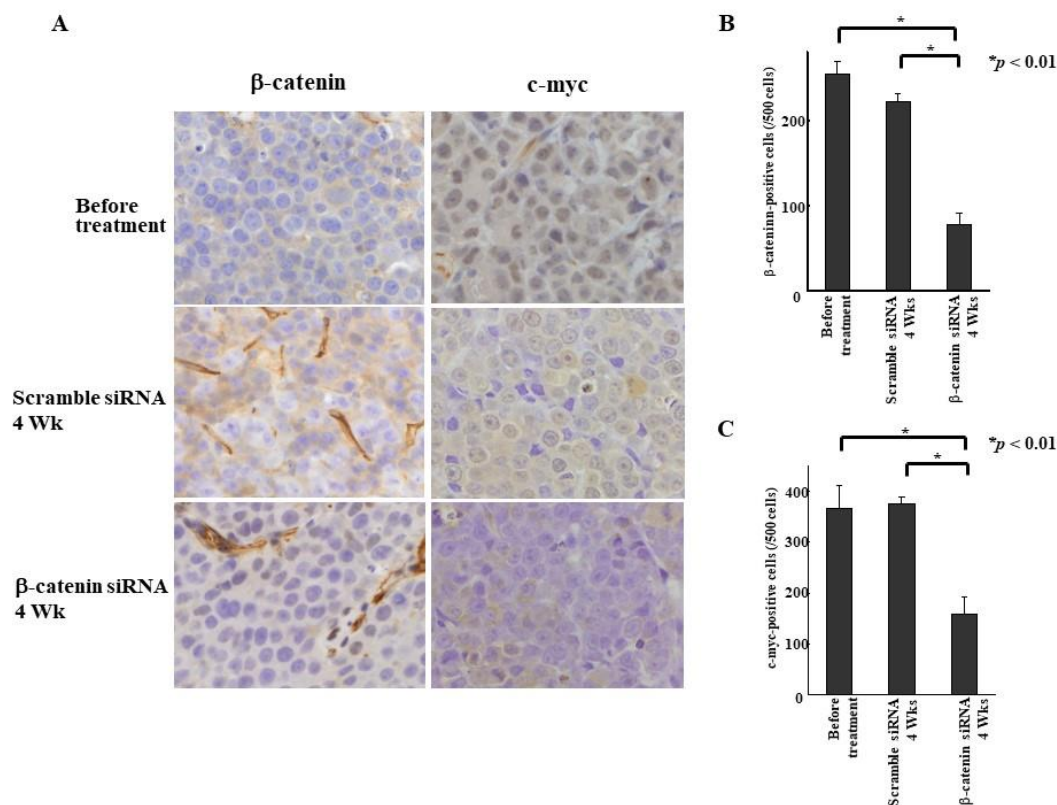


Figure 1-6 Changes to β-catenin expression in myeloma tumors following treatment with β-catenin siRNA. (A) Mice (n=3 per group) were treated with subcutaneous injections of β-catenin siRNA (2.5 μM, 125 pmole)/1% atelocollagen complex (final atelocollagen concentration 0.5%) or scramble siRNA (2.5 μM, 125 pmole)/1% atelocollagen complex. Immunohistochemical studies revealed that β-catenin and c-myc expression diminished following 4 weeks of treatments with β-catenin siRNA/atelocollagen complex, relative to before treatment and with the scramble siRNA/atelocollagen complex. Original magnification, ×400. (B) β-catenin siRNA/atelocollagen complex treatment significantly decreased β-catenin expression in MM tumors, relative to no treatment and treatment with the scramble the siRNA/atelocollagen complex. Results represent means + standard errors. C, β-catenin siRNA/atelocollagen complex treatment significantly decreased c-myc expression in MM tumors, relative to no treatment and treatment with the scramble the siRNA/atelocollagen complex. Results represent means + standard errors. American Association for Cancer Research permitted to use this figure for thesis.

Ashihara, E., et al., *Clin. Cancer Res.*, **15**, 2731-2738 (2009)

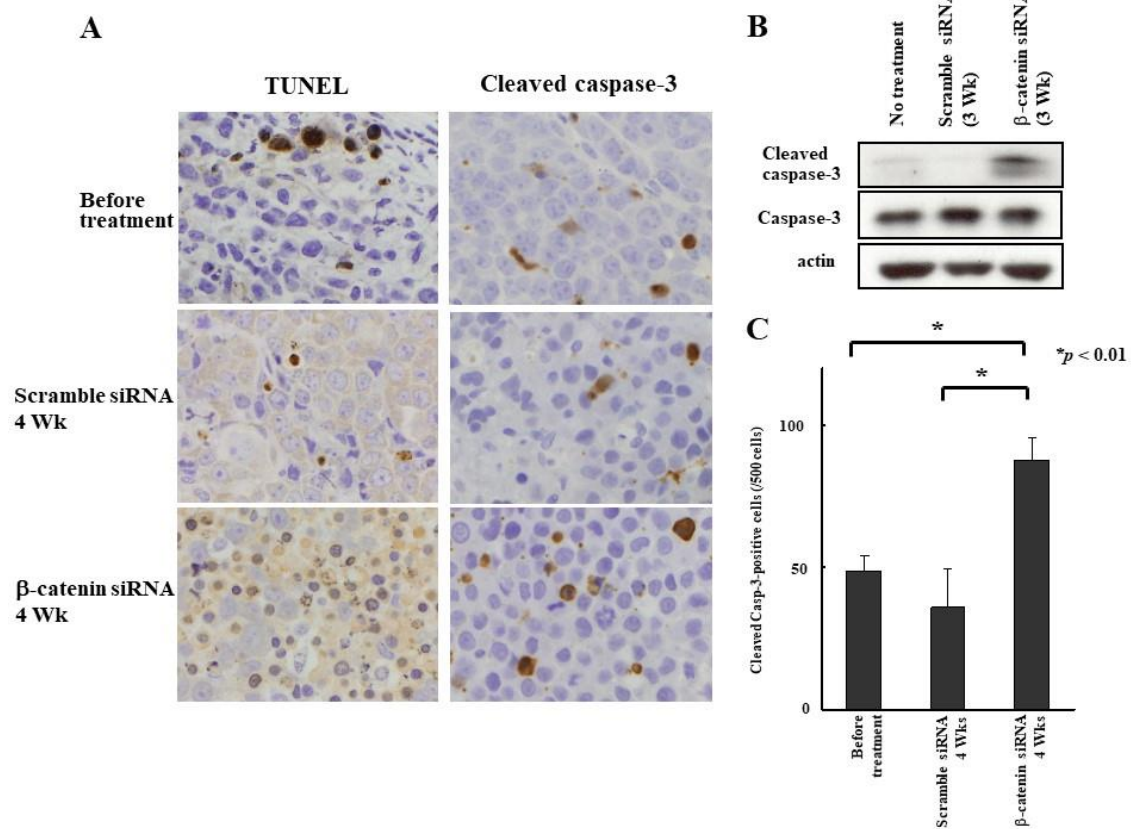


Figure 1-7 Apoptotic cells and cleaved caspase-3 expression in myeloma tumors following treatment with β -catenin siRNA. (A) Apoptotic cell (TUNEL-positive cell) numbers and cleaved caspase-3 expression increased following 4 weeks of treatment with the β -catenin siRNA/atelocollagen complex, relative to before treatment and with scramble the siRNA/telocollagen complex treatment. Original magnification, $\times 400$. (B) The expression of cleaved capsase-3 was increased in tumors after 3 weeks treatment with β -catenin siRNA/atelocollagen complex. C, Cleaved caspase-3 positive cell numbers significantly increased in tumors of mice treated with β -catenin siRNA/atelocollagen complex compared with those before treatment and those treated with scramble siRNA/atelocollagen complex. Results represent means + standard errors. American Association for Cancer Research permitted to use this figure for thesis.

Ashihara, E., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, **15**, 2731-2738 (2009)

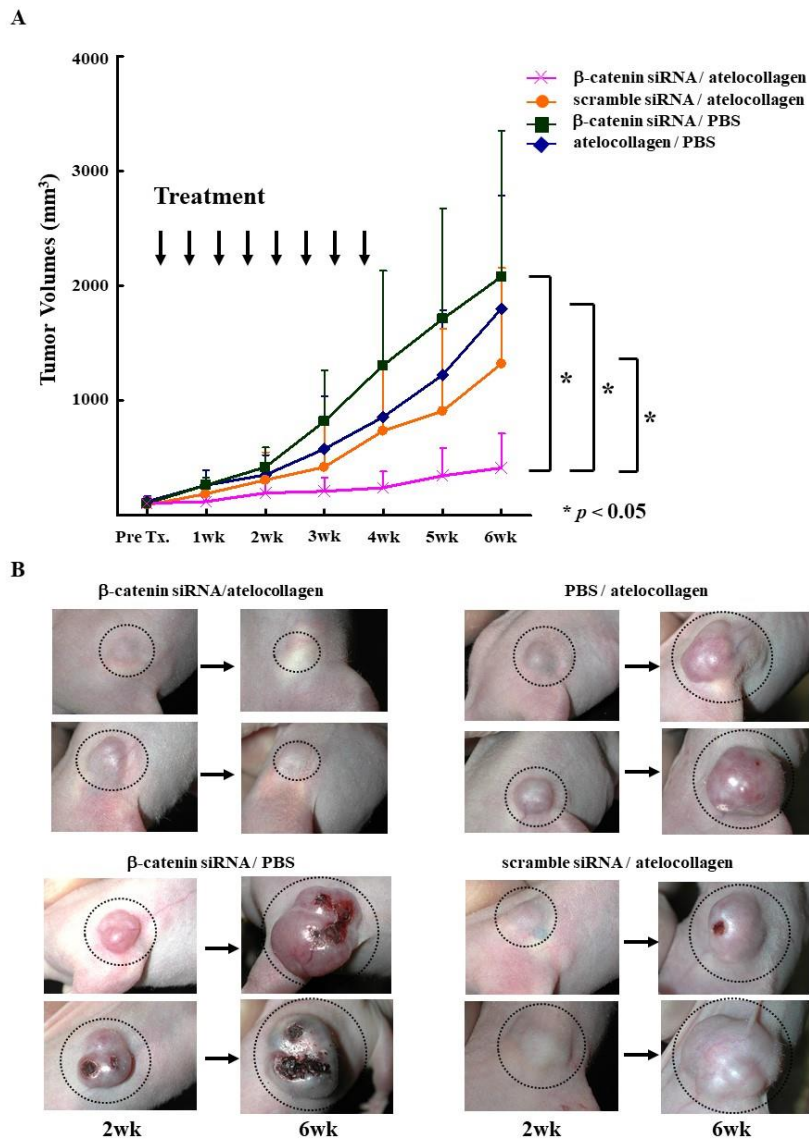


Figure 1-8 Anti-myeloma effects of β -catenin siRNA in RPMI8226 xenografts. (A) Tumor growth curves. Palpable myeloma tumors (~ 100 mm³ in volumes) were treated with subcutaneous (around the tumors) injections of β -catenin siRNA (2.5 μ M, 125 pmole)/1% atelocollagen complex (final atelocollagen concentration 0.5%), scramble siRNA (2.5 μ M, 125 pmole)/1% atelocollagen complex, β -catenin siRNA (2.5 μ M)/PBS, or PBS/1% atelocollagen twice a week for a total of eight injections ($n=5$ per group). Treatment with β -catenin siRNA/atelocollagen complex significantly reduced tumor volumes ($p<0.05$). Results represent means + standard errors. (B) Representative photos of tumor grafts after 2 and 6 weeks of treatment. Dashed circles indicate myeloma tumors. American Association for Cancer Research permitted to use this figure for thesis.

Ashihara, E., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, **15**, 2731-2738 (2009)

第4節 考察

MM細胞は骨髄微小環境に定着し増殖や生存維持されており、MM細胞と骨髄微小環境との接着因子を介したシグナル伝達やInterleukin-6 (IL-6)、Insulin-like growth factor-1、Vascular endothelial growth factor、等の多くのサイトカインや成長因子により、phosphatidylinositol-3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin 経路、Ras/Raf/MEK/ERK 経路、Janus kinase-signal transducer and activator of transcription 経路や NF- κ B 経路が活性化している (48, 49)。本検討にて MM 細胞において β -catenin タンパク質が高発現しており、その発現を抑制することで MM 細胞増殖が抑制されることを、異所性 MM 担がんモデルマウスで示した。MM 細胞における本経路の活性化の機序として、1 つには Wnt 経路の antagonist である Wnt inhibitory factor 1、分泌型 Fz 受容体関連タンパク質や分泌型 Dickkopf ファミリータンパク質の遺伝子がメチル化されていることでこれらの転写が抑制され、その結果、antagonist タンパク質発現が抑制され、恒常的に Wnt 経路が活性化されていることが考えられる (50)。本検討の結果は、古典的な Wnt/ β -catenin 経路が MM 細胞において活性化しており、MM 細胞の増殖や生存に関わることを裏付け、古典的な Wnt/ β -catenin 経路が MM に対する治療標的として有効な経路であることを明らかにしたもので、Wnt 分泌タンパク質の添加で MM 細胞の増殖を促進した *in vitro* 系における検討結果 (51, 52) や、異所性 (52) および正所性 (53) MM 担がんモデルマウスへの Wnt/ β -catenin 経路阻害剤投与により、担がんマウスの生存期間が有意に延長される検討結果も本検討結果を支持する。

MM において活性化された Wnt/ β -catenin 経路を遮断することで MM 細胞の増殖が抑制され、アポトーシスが誘導される機序としては、細胞の増殖、生存に必須である c-MYC タンパク質の発現の抑制および、細胞増殖を正に制御する CCND1 タンパク質発現 (15, 53) の抑制が、Wnt/ β -catenin 経路遮断によりもたらされる結果と考える。c-MYC タンパク質は胚性幹細胞やがん細胞の DNA 複製と伸長を促進する転写因子であり (54, 55)、ほとんどの MM 細胞の増殖、生存は c-MYC タンパク質に依存 (“addiction”) している (56)。また MM の約 50% に認める IGH 領域を含む 14 番染色体長腕 (14q) を含む染色体転座の多くは、IGH エンハンサーにより CCND の発現が活性化されており (6, 7)、これらの MM 細胞の増殖・生存に必須のタンパク質は、Wnt/ β -catenin 経路の下流の分子でもあるため、本シグナル経路の遮断は MM 細胞の増殖抑制には有効であることが示唆される。

今回、*in vitro* 系での siRNA の効果の検証は、SW480 大腸がん細胞および A549 肺がん細胞を用いた。予備検討にて、RPMI8226 細胞を含め、MM 細胞株 (浮遊系腫瘍細胞株) 3 株を用いて β -catenin siRNA の導入を、アテロコラーゲン、エレクトロポレーション、リポフェクション法を用いて行ったが、有意に β -catenin タンパク質の発現低下をウエスタンブロットング法にて確認できなかったため、付着系固形腫瘍細胞を用いて siRNA 自体の有効性を証明した (Figure 1-5)。しかし核酸医薬品開発のためには造血器腫瘍に対する有効な DDS 開発は必須であり、造血器腫瘍をはじめとする血液細胞に対する非ウイルス性ベクター開発研究を進めている。

In vivo 系における非ウイルスベクターとしてアテロコラーゲンを用いて行った。アテロコラーゲンは天然のポリマーであり、腫瘍周囲に滞留し徐放性に siRNA を腫瘍内に浸透させていき、siRNA の効果を *in vivo* 系にて発揮する。今回の検討において、 β -catenin siRNA を、アテロコラーゲンを DDS として用いずに投与した群では、統計学的には有意差を認めないが却って MM 腫瘍の成長を

認められた。アテロコラーゲンを用いていないため RPMI8226 細胞への siRNA の導入はなされていないと考えるが、腫瘍内の線維芽細胞や血管内皮細胞等の腫瘍微小環境を形成する細胞集団へは導入され、それらの機能を抑制し、MM 腫瘍の壊死およびそれに伴う出血、および腫瘍の軽度成長をもたらした可能性は否定できない。実臨床への β -catenin siRNA 投与を考えた場合、腫瘍微小環境への影響を前臨床段階で検討しておく必要はあるかもしれないと考える。

以上より、本研究では古典的 Wnt シグナル経路の中間シグナル伝達タンパク質である β -catenin が MM 細胞に高発現しており、 β -catenin を RNA 干渉法にて発現を抑制させることで、MM 細胞の増殖を抑制することを明らかにした。この増殖抑制作用は、MM 細胞の増殖、生存に必須の c-MYC タンパク質の発現が抑制され、アポトーシスを介した細胞死によるものであることが示唆された。本研究の進展により、Wnt/ β -catenin 経路を MM の治療標的経路とした治療法の開発が期待される。

第5節 小括

本章では古典的 Wnt シグナル経路の中間シグナル伝達タンパク質である β -catenin の MM 細胞における増殖抑制効果を検討し、以下の知見を得た。

1. ヒト MM 細胞株、および MM 患者より分取した MM 細胞において、 β -catenin タンパク質が高発現していた。
2. 免疫不全マウスに移植し作製した MM 腫瘍に対して、RNA 干渉法にて β -catenin をノックダウンしたところ、MM 腫瘍の増殖が抑制された。
3. β -catenin siRNA を投与した MM 腫瘍では、 β -catenin タンパク質の発現低下とともに、c-MYC タンパク質の発現低下を認め、また活性化した caspase-3 の発現および TUNEL 陽性の細胞が増加していた。
4. MM 細胞における RNA 干渉法による β -catenin タンパク質の発現を抑制することにより、MM 細胞にアポトーシスを誘導し MM 腫瘍の増殖を抑えることが明らかとなった。

第2章 低酸素適応 MM (HA-MM) 細胞の性状解析

第1節 緒言

MMの多様な遺伝子異常や病態が近年明らかにされ、その病態に基づき多くの分子標的治療薬が開発されてきた。中でもボルテゾミブやレナリドミド等の登場はMM患者の予後を著明に改善してきた。しかし、残念ながらMMは未だ治癒が望める症例は少なく、再発が余儀なくされる症例も多数存在する。その理由として、腫瘍組織を形成し維持する能力を有し通常の抗がん剤や分子標的治療薬では駆逐されないMM幹細胞(32-34)による再発が考えられており、MM根治のためMM幹細胞の性状解析が多くの研究者により行われてきている。MMが複数のクローンからなるheterogenousな腫瘍であること(11, 12, 57)から考えると、MM幹細胞も複数存在することが考えられ、治癒を目指した治療法を考案するにはこれらに共通した性状を明らかにする必要がある。その1つとして表面抗原によるMM幹細胞の同定が行われてきた。この方法は造血幹細胞の性状解析の一手法に則ったもので、形質細胞およびMM細胞に通常発現するCD138抗原が発現しないMM細胞集団がMMにおけるCSC候補として考えられ、CD138陰性MM細胞は*in vitro*系においても、また免疫不全マウスを用いた移植実験においても、クローン増殖を維持することが示された(58)。またさらに詳細な表面抗原解析により、B細胞前駆細胞であるCD19陽性/CD138陰性細胞分画にMM細胞コロニー形成細胞集団が存在し、MM幹細胞が存在していることが示されている(59)。しかし一方で、CD138陽性のMM細胞分画に、MM幹細胞と同義語であるmyeloma-initiating cellsやclonogenic cellsが存在するという研究結果もみられ(60-63)、CD138抗原の有無によるMM幹細胞の定義付けには議論があり、この手法ではMMにおけるCSCを同定することはできないと考える。

固形腫瘍組織において、酸素や栄養は腫瘍血管から供給され、酸素は血管から拡散にて腫瘍組織内に供給されるため、腫瘍細胞までの距離に反比例して酸素分圧、酸素濃度は低下していく。酸素濃度が4%まで低下するとhypoxia-inducible factor (HIF)-1は活性化される(64)。HIF-1はbasic helix-loop-helix型の転写因子であり、生体内の低酸素状態に応答し多くの遺伝子発現を調節する低酸素センサーである(65)。HIF-1 α とHIF-1 β の二量体からなり、通常酸素下ではHIF-1 α のプロリン残基がprolyl-hydroxylase domain containing protein (PHD)により水酸化され、ユビキチン・プロテアソーム系で分解されるが、低酸素状態ではPHD活性が減少するためHIF-1 α の発現が維持され、HIF-1が活性化される。その結果、がん細胞の転移を促進する上皮間葉転換の誘導や薬剤耐性というがん細胞の悪性化をもたらす(66)とともに、幹細胞性の維持に関わるSox2やOct4(67)、さらにがん幹細胞マーカーであるCD133やCD44抗原を発現させ(68)、HIF-1の活性化はがん幹細胞維持にも関わっている。

正常組織での酸素濃度は、肺胞では約21%であるが、末梢各組織では2-9% (酸素分圧 15-68 mmHg)であり、骨髄内では高々1-6% (酸素分圧 7.6-45.6 mmHg)である(35-37)。幹細胞がその機能を維持するために定着・存在する場所を“ニッチ (Niche)”と呼ぶが、造血幹細胞が生存する造血幹細胞ニッチには、endosteal niche (骨芽細胞ニッチ)、CXCL12-abundant reticular cellに代表される構成細胞が存在する骨髄の間質のreticular niche、骨髄の毛細血管である類洞の内皮細胞や類洞周囲の間葉系幹細胞等が形成するperivascular niche (血管性ニッチ)がある(69-71)。これらはいず

れも低酸素環境にあるが、endosteal niche は他のニッチに比べてより低酸素状態(酸素濃度 1%前後)と考えられており、造血幹細胞を静止期に留め維持する役割を担っている (69, 71)。骨髄を病態の主座とする白血病細胞は、その維持のため造血幹細胞ニッチを乗っ取り、白血病幹細胞を endosteal niche に定着させている (72-74)。白血病幹細胞は細胞回転を停止し静止期状態で、かつ白血病の進展に関わる特有のシグナル経路を抑制し、その代わりに Wnt/ β -catenin 経路 (43, 75, 76)や Hedgehog 経路 (77, 78)、等を活性化し生存している。そのため、白血病幹細胞には通常の抗がん薬や分子標的治療薬は功を奏せず、白血病幹細胞の残存が白血病再発の原因となる。

MM も骨髄を病態の主座とする造血器悪性腫瘍であり、「MM 腫瘍を構築・維持する MM 幹細胞も骨髄中の酸素濃度が 1%以下の部位に存在する」と仮説を立て、その検証のために 1%低酸素環境下で生存可能な低酸素適応 MM (HA-MM) 細胞株を樹立した。本研究では第 1 章の結果を受け、得られた HA-MM 細胞の性状を解析し、MM 幹細胞に近い性状を有する HA-MM 細胞のシグナル伝達経路を標的とする治療戦略を考案する基礎検討を行った。

第2節 材料と方法

1. 細胞株

ヒト MM 細胞 AMO-1、OPM-2 細胞株、および Ebstein-Barr ウイルスにより形質転換した B 細胞株 IM-9 細胞は DSMZ GmbH から購入した。これらの細胞株は 10%FCS (Invitrogen)、SM/PC (和光純薬工業、大阪) 含有 RPMI1640 培地 (和光純薬工業) を用い、5%CO₂ および 37°C で加湿条件下により培養した。また O₂ 濃度が 1% の低酸素環境に適応した AMO-1 (HA-AMO-1) 細胞株、OPM-2 (HA-OPM-2) 細胞株および IM-9 (HA-IM-9) 細胞株は、1%O₂、5%CO₂、94%N₂ および 37°C で加湿条件下にて 6 か月以上生存・増殖した細胞株を低酸素環境適応 MM (HA-MM) 細胞株とした。

2. 抗体

Allophycocyanin (APC) 標識されたマウス由来抗ヒト CD138mAb は Miltenyi から、fluorescein (FITC) 標識されたマウス由来抗ヒト Ki67 mAb、マウス由来抗β-catenin mAb は BD Pharmingen から、ラビット由来ポリクローナル抗ヒト Oct1 Ab は Santa Cruz Biotechnology から、ラビット由来ポリクローナル抗ヒト Smad2/3 Ab、ラビット由来ポリクローナル抗ヒト phosphorylated Smad2 Ab、ラビット由来ポリクローナル抗ヒト HDAC1 Ab は Cell Signaling Technology から、ラビット由来ポリクローナル抗ヒト hypoxia-inducible factor (HIF) 1α Ab は R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) から、ラビット由来ポリクローナル抗ヒト HIF2α Ab は Novus Biologicals (Littleton, CO, USA) から、ラビット由来ポリクローナル抗 actin Ab は Sigma-Aldrich からそれぞれ購入した。HRP 結合型抗マウスおよび抗ラビット IgG 抗体は Amersham Biosciences から購入した。

3. MM 細胞の免疫不全マウスへの生着実験

京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設において SPF 環境下で飼育された 7~8 週齢の雌性 NOD/SCID マウス (日本クレア、大阪) に 2 Gy の X 線を照射後、通常酸素濃度 (20%) で培養した親株である AMO-1 細胞、または低酸素環境に適応した HA-AMO-1 細胞を 8×10^3 から 2×10^6 個を 100 μL の PBS に浮遊し、尾静脈より静脈注射にて移植した。移植後の骨髄内の酸素状態を検討するため、pimonidazole hydrochloride (79) (Pimo; Chemicon, Temecula, CA, USA) 60 mg/kg を腹腔内投与し、60 分後にマウスを屠殺した。大腿骨および脊椎を取り出し、塩酸および ethylenediaminetetraacetic acid にて脱灰した。パラフィン包埋後 5 μm に薄切し、脱パラフィン化し Hematoxylin-Eosin (HE) 染色および、抗 Pimo 抗体 (Chemicon) を用いた DAB 免疫染色 (ニチレイ、東京) を行った。

HA-AMO-1 細胞の幹細胞性の獲得を検討するために、既報 (80) に基づき二次移植を行った。親株の AMO-1 細胞および HA-AMO-1 細胞の一次移植を行い生着した正所性 MM 担がんマウスの体重が移植前より 20% 以上減少した時点で MM 担がんマウスを屠殺し、大腿骨より骨髄細胞を分離した。採取した骨髄細胞を APC 標識された抗 CD138 抗体で染色し、FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を用いて骨髄中の CD138 陽性 MM 細胞数を評価した。5000 個の CD138 陽性 MM 細胞を含む全骨髄細胞を、一次移植と同様に 2 Gy の X 線照射した NOD/SCID マウスの尾静脈より移植し、生着した MM 担がんマウスの生存率および生存期間を比較検討した。また一次移植

の生着率から、MM 幹細胞に相当し、MM を発症させる myeloma-initiating cell (81, 82)を、親株 AMO-1 細胞ならびに HA-AMO-1 細胞が含む頻度を、L-Calc (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada) を用いて解析した (83)。本実験は京都大学医学部動物実験委員会の承認を受け行った。

4. フローサイトメトリー (flow cytometry; FCM) 法による解析

MM 細胞における CD138 の発現は APC 標識された抗 CD138 抗体を用いて検討した。細胞周期中の静止期にある MM 細胞集団の頻度は、抗 Ki67 Ab と 7-amino-actinomycin D (7-AAD) を用いて二重染色を施し、既報 (74)に従い行った。G0 期、G1 期、S/G2/M 期分画の gate は、forward scatter/side scatter dotpgram にて生細胞分画を定義し、その分画内の細胞集団を 7-AAD 単染色の histogram にて G0/G1 期分画および S/G2/M 期を定義した。次に Ki67/7-AAD の dotgram にて G0 期、G1 期分画をそれぞれ定義した。これらの解析は FACSCanto II を用いて Diva software (BD Biosciences) で行った。side population (SP) 分画の細胞集団の頻度は、BD LSR II (BD Biosciences) にて行った。1×10⁶ 個の MM 細胞を、Hoechst33342 (終濃度 5 μg/mL) と 37°C の恒温槽に 90 分間浸し、10 分ごとに振とうさせながら反応させた。解析には FlowJo (LLC, Ashland, OR, USA) を用いた。

5. MM 細胞コロニー形成能の検討

MM 細胞および HA-MM 細胞を 250 個/mL または 500 個/mL の細胞濃度で human methylcellulose base media (R&D Systems) を用いて培養し、コロニー形成能を検討した。培養 10 日後にコロニーあたり 40 個以上の細胞集落を倒立顕微鏡にてカウントした。引き続き、メチルセルロース培地をすべて回収し、完全 RPMI1640 培地で洗浄し、再度同じ細胞濃度で human methylcellulose base media を用いてコロニー形成能を検討した。また一部の実験では、transforming growth factor (TGF) -β/Smad 経路阻害剤である SB431542 (和光純薬工業) を終濃度 3 μM にて添加し検討した。

6. ウェスタンブロッティング法による解析

MM 細胞の各種タンパク質発現をウェスタンブロッティング法にて解析した。1×10⁶ 個の細胞を PMSF (終濃度 1 mM) と protease inhibitor (終濃度 10 μg/mL) を添加した氷冷した RIPA buffer にて溶解した。上清を回収し、上清中のタンパク質を用いて 10% ドデシル硫酸ナトリウム-アクリルアミドゲルを用いた電気泳動により行いタンパク質分離を行い、Hybond-PVDF 膜 (GE Healthcare Life Sciences Japan, 東京) に転写し、第 1 章の方法に従い抗体反応および発色を行った。

7. qRT-PCR 法による解析

MM 細胞での各種分子の mRNA 発現解析を qRT-PCR 法にて行った。全 RNA は QIAamp RNA Blood Mini Kit (QIAGEN, 東京) を用いて抽出し、逆転写を行った。cDNA は Taqman fast universal PCR master mix (Roche Diagnostics)、Table 2-1 に示す Taqman probe (Universal Probe Library, Roche Diagnostics) とプライマーを用いて増幅させ、Applied Biosystems Step One Plus thermal cycler (Applied Science, Mannheim, Germany) にて解析した。ハウスキーピング遺伝子として *18S ribosomal RNA* 遺伝子を用いて標準化し、発現レベルを第 1 章と同じく解析した。

Table 2-1 使用したプライマーの塩基配列

プライマー		塩基配列	Probe
<i>SOX2</i>	forward	5'-TGCTGCCTCTTTAAGACTAGGAC	#35
	reverse	3'-CCTGGGGCTCAAACCTTCTCT	
<i>OCT4</i>	forward	5'-GAAACCCACACTGCAGATCA	#3
	reverse	3'-CGGTTACAGAACCACACTCG	
<i>NANOG</i>	forward	5'-AGATGCCTCACACGGAGACT	#31
	reverse	3'-TTTGCGACACTCTTCTGC	
<i>18S ribosomal RNA</i>	forward	5'-GCAATTATCCCCATGAACG	#48
	reverse	3'-GGACTTAATCAACGCAAGC	

8. 統計解析

MM 担がんマウスの生存曲線は Kaplan-Meier 法により作成し、log-rank 法にて解析した。2 群間の統計解析は Student の t 検定にて解析し、p 値が 5%未満で統計学的に有意差ありと判定した。

第3節 結果

1. MM 細胞の免疫不全マウスへの生着

放射線 (2 Gy) を照射した NOD/SCID マウスに 2×10^6 個/マウスの AMO-1 細胞を移植したところ、マウスは約 30 日で全例死亡した。移植後 2 週間後および 4 週間後にマウスを屠殺し、大腿骨および脊椎骨を取り出し、HE 染色にて移植した AMO-1 細胞の生着を確認した。移植 2 週間後のマウスでは、骨端部の骨内膜 (endosteum) 直下から海綿骨付近に大きな胞体を有し核小体明瞭な細胞を認め、多くの細胞分裂像も認めた。また移植 4 週後のマウスでは、大腿骨骨幹部の骨内膜部から中央にかけて、同様の細胞集団を認めた。これらの細胞集団は Pimo 陽性であった (Figure 2-1)。これらのことから、移植し骨髄内に生着した AMO-1 細胞は、酸素濃度 1.3%以下の低酸素状態であることが示された。

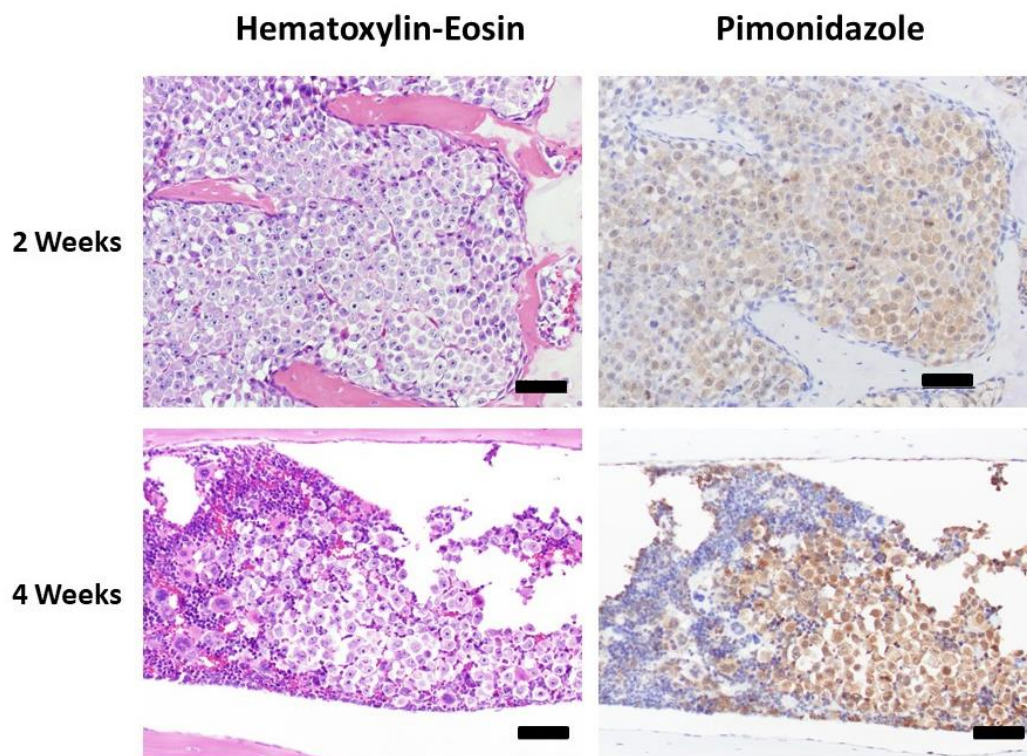


Figure 2-1 Engraftment of human AMO-1 MM cells in mice. After 2 Gy irradiation, mice were intravenously injected with 2×10^6 AMO-1 cells via the tail vein. Hematoxylin-eosin staining revealed that inoculated AMO-1 cells engrafted into the epiphysis of recipient mice at two weeks after transplantation and populated the endosteum of the epiphysis after four weeks (left panels). Immunohistochemical staining of Pimo showed that these MM cells were hypoxic in the BM (right panels). Scale bars indicate 50 μm . Elsevier permitted to use this figure for thesis.

Nakagawa, Y., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **496**, 490-496 (2018)

2. 低酸素環境適応 MM 細胞株の樹立

ヒト MM 細胞株 AMO-1、OPM-2 および Epstein-Barr ウイルスにより形質転換した B 細胞株 IM-9 細胞を、酸素濃度 1% 下で培養し、長期間 (6 か月以上) 生存可能で増殖する HA-MM 細胞株を樹立した。3 株とも通常酸素濃度 (O₂20%) で培養している親株に比べて増殖速度は遅かった (Figure 2-2A)。そこで、それぞれの細胞株の継代ごとに細胞数の倍加時間 (τ ; doubling time) を算出した。継代培養の間隔は 3 また 4 日とし、細胞数を算出し、以下の計算式に従い倍加時間を算出した。

$$N_T = N_0 \times 2^{T/\tau}$$

(N_T : T 時間後の細胞数、 N_0 : 培養開始時の細胞数、 τ : 倍加時間)

いずれの MM 細胞株においても酸素濃度 20% で培養している親株に比べて、HA 株では倍加時間が長いことが明らかになった (Table 2-2)。

Table 2-2 Doubling time (hours) of cell lines

Cell line	Parental	Hypoxia-adapted (HA)
AMO-1	23.9 ± 2.5	39.2 ± 2.7
OPM-2	24.5 ± 1.9	31.2 ± 3.3
IM-9	16.3 ± 1.4	21.9 ± 1.5

Results represent the mean ± standard deviation of subculture in each cell line.

次に、これらの細胞株の細胞周期解析を行った。静止期 (G₀ 期) を G₁ 期から区別するため、抗 Ki67 抗体/7-AAD を用いた二重染色を行った。いずれの細胞株においても、G₀ 期分画の細胞集団が親株に比して、HA 細胞株で有意に増加していた (Figure 2-2B, C)。

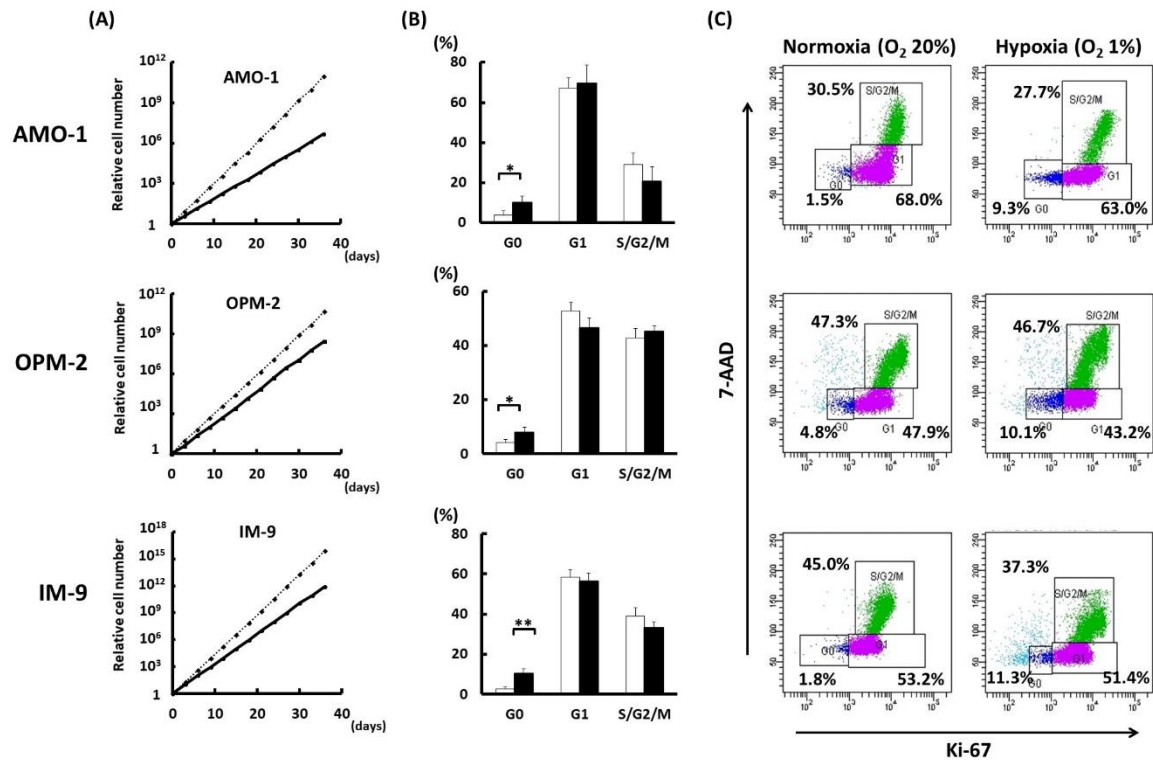


Figure 2-2 Proliferation of HA-MM cells under hypoxic conditions (1%O₂). (A) HA-MM cells proliferated more slowly than parental cells under normoxic conditions (20%O₂). Dashed and solid lines show the numbers of parental and HA-MM cells, respectively. (B, C) The frequency of G0 cells was higher among HA-MM cells than among parental cells. Data represent the mean + standard error of three independent experiments. White and solid bars show the frequencies of parental and HA-MM cells at each cell cycle stage, respectively. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (B). Dot plots of cell cycle data obtained via Ki-67/7-AAD staining. Results are representative of three independent experiments (C). Elsevier permitted to use this figure for thesis.

Nakagawa, Y., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **496**, 490-496 (2018)

3. HA-MM 細胞の幹細胞性の検証

次に、HA-MM 細胞の幹細胞性の有無を検討した。幹細胞の性状の 1 つである SP 分画 (84) の頻度について AMO-1 細胞株で検討したところ、HA-AMO-1 細胞株で親株に比して、より多く認められた (Figure 2-3)。さらに樹立した 3 株の HA-MM 細胞における幹細胞マーカーである *SOX2*、*OCT4* および *NANOG* mRNA 発現を親株と比較したところ、いずれの MM 株においてもこれらの幹細胞マーカー発現が亢進していた (Figure 2-4A)。

In vitro 実験系における clonogenicity を検討すべく、replating colony 形成法を行った。HA-AMO-1 細胞は通常酸素濃度下で培養している親株の AMO-1 細胞に比べ、replating efficiency が高く、かつ 1 コロニー当たりの MM 細胞数も親株に比べて多いことが明らかとなった (Figure 2-4B)。次に、免疫不全マウスを用いた正所性 MM 担がんモデルでの limiting dilution 法により clonogenicity を検討した。NOD/SCID マウス 1 匹あたり 1×10^6 個の MM 細胞の移植では全例生着し、親株細胞を移植したマウスおよび HA 細胞を移植したマウスの生存期間の中央値は、それぞれ 59 日、36 日であったが、さらに移植細胞数を 8×10^3 個と少数の MM 細胞を移植した際には、親株では移植後 130 日を経過した時点での死亡率は 14%、HA 細胞を移植したマウスでは 63%であった (Table 2-3)。さらに、この一次移植の結果から算出した myeloma-initiating cells の頻度は、親株の AMO-1 細胞では 51423 個に 1 個の割合、HA-AMO-1 細胞では 21088 個に 1 個の割合で存在することが予測され (Figure 2-5)、HA-AMO-1 細胞の方が myeloma-initiating cell を約 2.4 倍多く含むことが示唆された。

次に一次移植で MM を発症したマウスの大腿骨骨髓中の親株の AMO-1 細胞および HA-AMO-1 細胞を用いて、二次移植を行った。MM を発症したマウスの大腿骨から全骨髓細胞を分取し、FCM 法にて CD138 陽性 MM 細胞を評価し、CD138 陽性 MM 細胞が 3000 個となる親株の AMO-1 細胞および HA-AMO-1 細胞生着マウスの骨髓細胞を 2 Gy の X 線照射した NOD/SCID マウスに移植し、生存率および生存期間を検討した。HA-AMO-1 細胞が生着し MM を発症したマウスの骨髓細胞を移植されたマウスは全例 MM を発症し死亡したが、親株の AMO-1 細胞が生着し MM を発症したマウスの骨髓細胞を移植されたマウスでは 75%が生着し、MM を発症しなかった (Figure 2-4C)。これらのことから、HA-AMO-1 細胞は幹細胞様の性状を有する MM 細胞であることが示唆された。

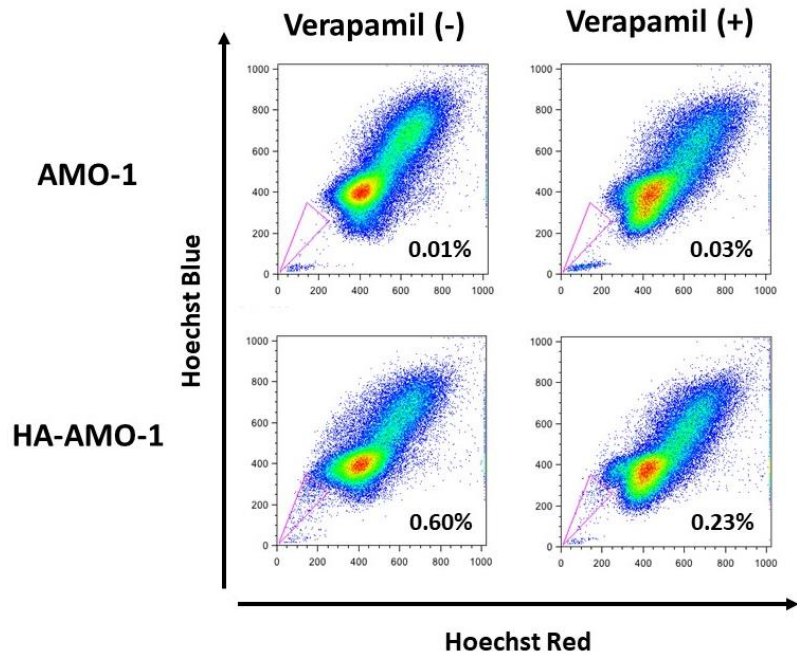


Figure 2-3 Frequencies of SP cells among parental AMO-1 and HA-AMO-1 cells. SP fractions of AMO-1 and HA-AMO-1 cells were analyzed in the absence or presence of verapamil (50 μ M). Cells co-incubated with verapamil were used as a control. Pink triangles indicate SP fractions. Elsevier permitted to use this figure for thesis.

Nakagawa, Y., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **496**, 490-496 (2018)

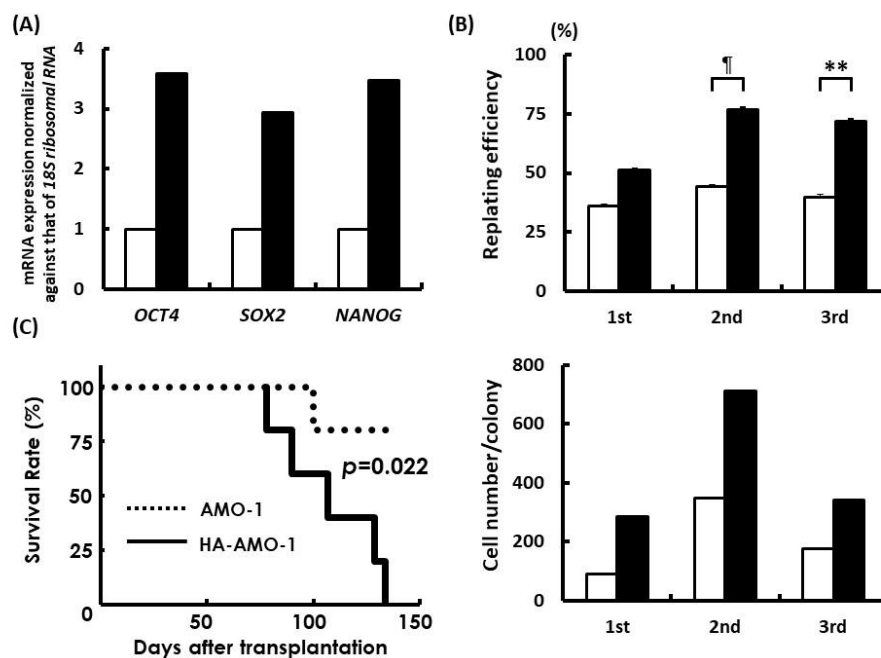


Figure 2-4 Stem cell-like characteristics of HA-MM cells. (A) mRNA expression of stem cell-related molecules was increased in HA-MM cells. White and black bars show mRNA levels in parental and HA-MM cells, respectively. Results are representative of three independent experiments. (B) Clonogenic assay. Clonogenicity of HA-AMO-1 cells was higher than that of parental AMO-1 cells. The upper panel shows representative replating efficiencies from three independent experiments. Efficiencies show the percentages of colony numbers in plated cell numbers. Data represent mean + standard error of duplicate cultures. The lower panel shows cell numbers per colony. All colonies were collected and washed with RPMI1640 medium, and then the number of cells was counted. The number of cells was divided by the number of colonies to determine the cell number per colony. The lower panel shows representative data from three independent experiments. White and solid bars indicate results from parental AMO-1 and HA-AMO-1 cells, respectively. $**p < 0.01$, $^{\#}p < 0.5 \times 10^{-4}$. (C) Survival of secondary recipients transplanted with 3000 CD138-positive MM cells obtained from the BM of primary recipients transplanted with parental AMO-1 (dashed line) or HA-AMO-1 (solid line) cells. Elsevier permitted to use this figure for thesis.

Nakagawa, Y., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **496**, 490-496 (2018)

Table 2-3 Outcomes of primary transplantation of parental and HA-AMO-1 cells

Transplanted cell number	Median survival time (days)		<i>p</i> value*	Frequencies of dead mice (%)	
	Parental	HA		Parental	HA
1×10^6	59	36	0.06	100	100
2×10^5	71	46	0.008	100	100
8×10^4	85	41	0.03	75**	88**
8×10^3	n.r.	110	0.07	14 [¶]	63 [¶]

n.r.: not reached; *: parental v.s. HA; **: @100 days after transplantation; ¶: @130 days after transplantation
Elsevier permitted to use this table for thesis.

Nakagawa, Y., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **496**, 490-496 (2018)

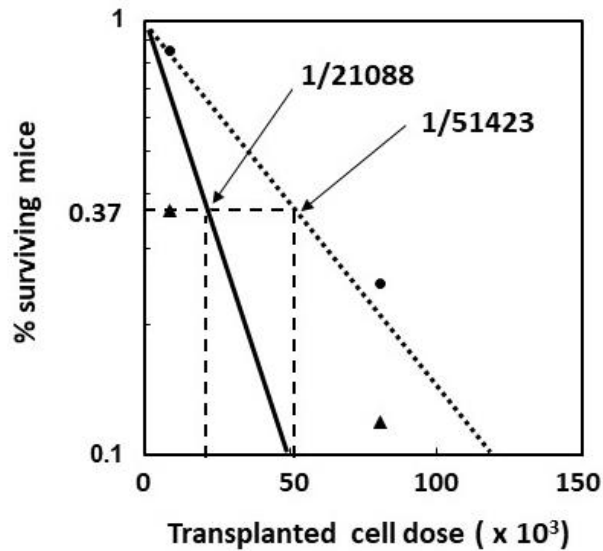


Figure 2-5 The frequencies of myeloma-initiating cells in the parental AMO-1 cells or HA-AMO-1 cells. The dot line and the solid line indicate the approximate straight lines of in the parental AMO-1 and HA-AMO-1 cells, respectively.

4. HA-MM 細胞の幹細胞様性状の維持に関わるシグナルの解析

HA-MM 細胞が幹細胞様の性状を維持するために関わっているシグナルを探索するため、急性および慢性骨髄性白血病の幹細胞維持に関わり (42, 43, 76, 85)、第 1 章で MM の治療標的分子となり得ることを示した古典的 Wnt シグナル経路 (41) の中間シグナル経路分子である β -catenin タンパク質の発現を検討した。しかし、HA-AMO-1 細胞および HA-OPM-2 細胞ともに、親株の細胞株と比べ発現の亢進は認めなかった (Figure 2-6)。

次に、正常造血および造血器腫瘍細胞造血に関わる TGF- β 経路について検討した。TGF- β 経路の中間シグナル伝達タンパク質の 1 つである Smad2/3 の発現量には、親株と HA 細胞株に違いは認めなかったが、リン酸化 Smad2 の発現は HA 細胞株で増加しており (Figure 2-7A)、HA 細胞株において TGF- β /Smad 経路が活性化していることが示唆された。そこで、本経路阻害剤である SB431542 を HA-MO-1 細胞株に処置 (終濃度 3 μ M) し、細胞周期の変化ならびに MM コロニー形成法による clonogenicity の変化を検討した。SB431542 処置により G0 期分画の細胞集団は減少し、S/G2/M 期分画の集団が増加した (Figure 2-7B)。その結果、1 コロニーあたりの細胞数は増加したが、replating efficiency は低下した (Figure 2-7C)。以上のことから、HA-MM 細胞の幹細胞様の性状の 1 つである clonogenicity は、低酸素環境に適応し活性化された TGF- β /Smad 経路が関与していることが示された。

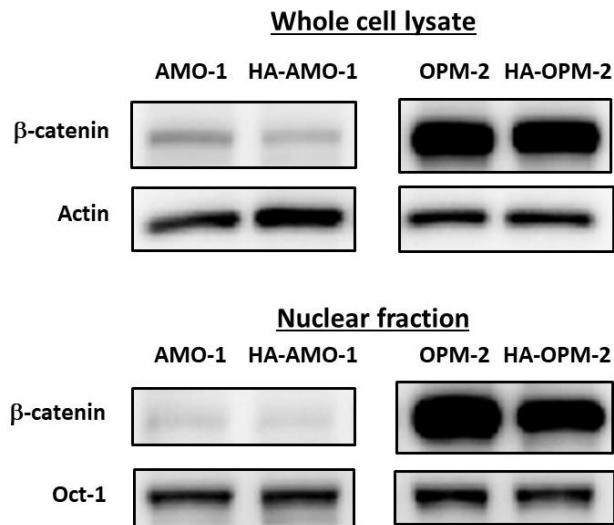


Figure 2-6 Protein expression of β -catenin in parental and HA-MM cells. Expression levels of β -catenin in whole cell lysates (upper panel) and nuclear fractions (lower panel) of parental and HA-MM cells are shown. Elsevier permitted to use this figure for thesis.

Nakagawa, Y., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **496**, 490-496 (2018)

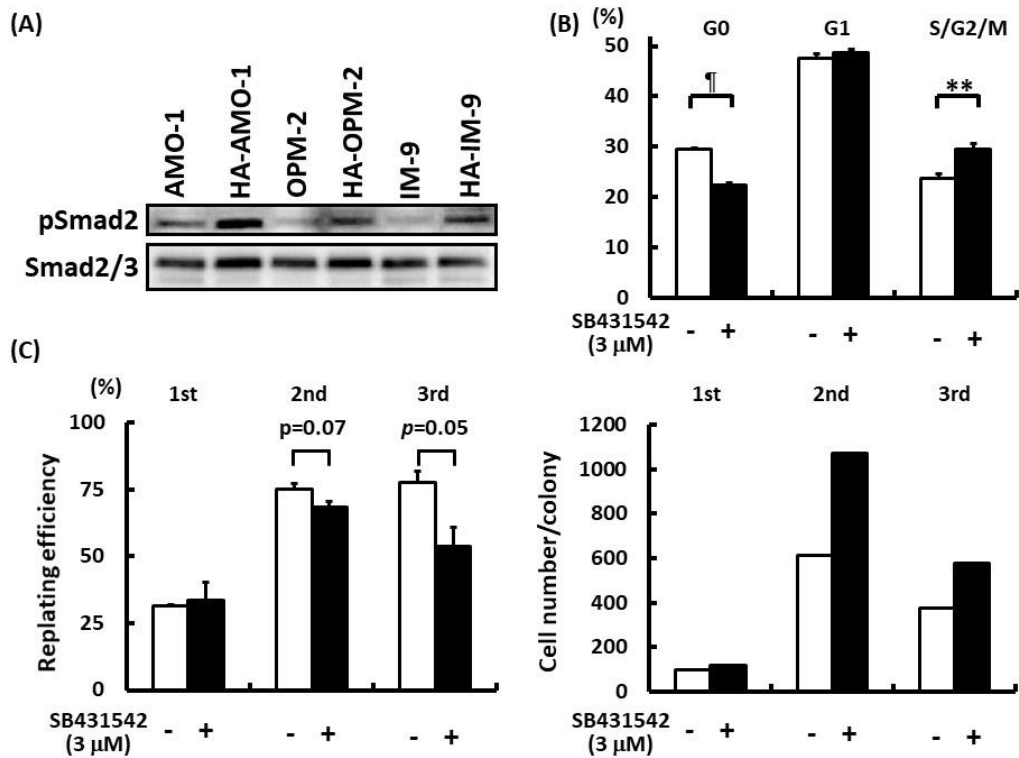


Figure 2-7 Influence of TGF- β /Smad signaling on the maintenance of stemness in HA-AMO-1 cells. (A) Expression of phosphorylated Smad2 was increased in HA-MM cells. Representative data from three independent experiments are shown. (B) In flow cytometric analysis, SB431542 treatment (3 μ M) decreased the frequency of G0 cells, but increased that of S/G2/M cells. Data represent mean + standard error of three independent experiments. White and solid bars indicate results from HA-AMO-1 cells treated with vehicle and SB431542, respectively. ** $p < 0.01$, $^{\#}p < 5 \times 10^{-4}$. (C) Effect of SB431542 on the clonogenicity of HA-AMO-1 cells. SB431542 treatment decreased the clonogenicity of HA-MM cells. Data represent mean + standard error of duplicate cultures (left panel). The right panel shows the cell numbers per colony. White and solid bars indicate results from HA-AMO-1 cells treated with vehicle and SB431542 (3 μ M), respectively. Elsevier permitted to use this figure for thesis.

Nakagawa, Y., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **496**, 490-496 (2018)

第4節 考察

MM 細胞は、染色体の付加や増幅、欠失、転座、等の複雑で多彩な染色体異常を発症初期から有しているが、次世代シーケンサーの登場により今まで着目されなかったマイナーな異常も明らかにされ (86, 87)、MM 腫瘍を形成する MM 細胞集団にはいくつかのサブクローンが存在することが明らかにされた。治療抵抗性を示し再発を繰り返す MM では、治療後の再発毎に増殖してくるクローンが異なることが示され (11)、これらのサブクローンごとに多様な MM 幹細胞が存在することも考えられ、治癒をめざすにはこれらの複数の MM 幹細胞に共通する性状を把握し、標的分子を探索する必要がある。

CSC の性状解析は正常幹細胞と同じく、SP 分画や表面抗原解析など、FCM を用いた方法が汎用されている。SP 分画の細胞集団は、幹細胞クラスの細胞が薬剤耐性を示す multidrug resistance 関連の ATP-binding cassette をもつトランスポーターを発現し、bisbenzimid というクラスに属する蛍光試薬 Hoechst33342 を排泄することを利用して定義された細胞集団 (84)で、造血幹細胞のみではなく、神経幹細胞 (88)、肺胞や気道上皮細胞の幹細胞 (89)、肝細胞様幹細胞 (90)、等の組織幹細胞が濃縮された細胞集団であり、近年では多くの種類の CSC も SP 分画の細胞集団に濃縮されていることも示されている (91)。また、FCM を用いて細胞表面に発現する抗原により幹細胞の性状を示すことも良く行われるが、MM 幹細胞においては当初、CD138 抗原が陰性であることが MM 幹細胞の性状の1つであると示され (58)、さらに詳細な表面抗原解析により、CD19 陽性/CD138 陰性細胞分画に MM 幹細胞が存在していることが示されてきた (59)。しかし、CD138 陽性 MM 細胞に MM 幹細胞が存在することが示され (60-63)、さらに CD138 抗原発現は、造血幹細胞と同様、MM 幹細胞が quiescent な状態と cell-cycling な状態によって変化することも示されている (63)。今回の検討では、樹立した 3 つの HA-MM 細胞株はいずれもほぼ CD138 抗原を発現していた (Supplementary Figure 1)。これらの解析では MM 幹細胞の傍証であることは示せても、正しく MM 幹細胞を同定できないと考える。

そこで著者は、MM 細胞や白血病細胞が生存・維持される骨髄での低酸素環境に着目し研究を行った。骨髄は造血幹細胞が生存維持する部位であり、その酸素濃度は他の末梢組織の酸素濃度 (2-9%) より低く、特に骨芽細胞ニッチでは高々1%前後である。これらのことから、「MM 腫瘍を構築・維持する MM 幹細胞は骨髄中の酸素濃度が1%以下の部位に存在する」と仮説を立て、研究を進めた。まず仮説の検証のため、MM 細胞を免疫不全マウスに移植し生着した MM 細胞の酸素濃度を検証することにした。生着した MM 細胞は、予想通り Pimo 陽性の低酸素状態 (O_2 濃度<1.3%) であった。またこれらの細胞は骨芽細胞ニッチである骨内膜下から定着・増殖していることが推察された。次に、骨髄に生着した MM 細胞が低酸素状態であることを受けて、酸素濃度1%の低酸素環境下で長期生存する HA-MM 細胞を樹立した。細胞株3株を使って HA 細胞株を樹立したが、いずれも通常酸素濃度 (20% O_2) 下で培養する親株に比べて増殖速度は遅く、倍加時間は長くなっていた。また静止期の細胞分画および SP 分画の細胞集団も多く認めた。

CSC の定義ともいえる重要な性状である自己複製能は、マウスへの移植により腫瘍組織構築能、および replating efficiency により clonogenicity を評価するコロニー形成法にて証明される。移植実験では、HA-AMO-1 細胞は一次移植でより少ない細胞数で MM 腫瘍組織を構築し、limiting dilution 法

の結果をポアソン分布に従った myeloma-initiating cell 数の予測も、親株の AMO-1 細胞より約 2 倍含まれていることが推定できた。さらに二次移植実験においても、HA-AMO-1 細胞に MM 腫瘍の再構築能が高いことが示された。またコロニー形成法においても、HA-AMO-1 細胞で replating efficiency が高く clonogenicity が高いことが示され、かつ 1 コロニー当たりの細胞数が多く、増殖能力が高いことが示された。これらのことより、HA-AMO-1 細胞が MM 幹細胞様の性状を有することが明らかになり、SOX2、OCT4、NANOG といった幹細胞マーカーの mRNA の高発現が HA-AMO-1 細胞で高発現していることの傍証として示された。

次に、この HA-MM 細胞を MM 幹細胞と捉え、MM 幹細胞に対する治療標的分子を探索した。第 1 章の結果を踏まえ、古典的 Wnt 経路に注目し β -catenin タンパク質の発現を確認したが、親株と HA-MM 細胞株で細胞全体でも核分画においても β -catenin タンパク質の発現には差を認めず、MM 幹細胞維持への関与は少ないものと考えた。次に、正常造血および造血器腫瘍細胞造血の双方に関わる TGF- β 経路に着目し検討した。下流シグナル分子である Smad2 のリン酸化型タンパク質の発現亢進を認め、HA-MM 細胞では TGF- β /Smad 経路が活性化していることがわかった。そこで、本シグナル経路阻害剤である SB431452 を処置することで、HA-MM 細胞の幹細胞性の変化を検討した。G0 期細胞分画は減少し、S/G2/M 期の細胞集団が増え細胞回転が回ることが示された。さらにコロニー形成法では、replating efficiency が統計学的に有意に低下した。また 1 コロニー当たりの MM 細胞数は無処置の HA-MM 細胞に比して増加しており、G0 期の細胞分画が減少したことを裏付けた。

以上より、酸素濃度 1% 環境に適応し生存・増殖可能な HA-MM 細胞は、MM 幹細胞様の性状を有し、その性状を維持する機構として TGF- β /Smad 経路が関与していることが示された。しかし未だ明らかにされていない事項もある。1 つには低酸素状態でどのようにして MM 細胞に Smad2 の活性化が起こっているのかという点である。おそらく低酸素環境下で活性化された HIF-1 が TGF- β 産生を促し、オートクラインにより TGF- β /Smad 経路の活性化をもたらした (92-97) と推察する。HIF-1 が TGF- β 1 promoter の hypoxia response element に結合し TGF- β 1 の産生をもたらすこと (92)、HIF-1 が TGF- β シグナルを制御する miR-191 を誘導し TGF- β 2 産生を促進すること (97) が、他の細胞種を用いて示されている。本 HA-MM 細胞でも検証する必要がある、今後検討する予定である。また幹細胞維持の主たる経路である Wnt/ β -catenin 経路の中間シグナル伝達タンパク質である β -catenin の発現は、HA-MM 細胞株と親株で発現に有意な差は認めなかったことから、Wnt/ β -catenin 経路は MM の病態に関わり治療標的経路となりうるが、MM 幹細胞特異的なものではないと考えた。しかし、シグナル経路の活性化の違いについては検討しておらず、この点についても今後検討する予定である。いずれにせよ、第 1 章ならびに第 2 章で示した有効な標的分子であっても、それぞれ単独の治療では十分な効果が見込めない可能性が考えられる。MM 細胞の根絶のためには、併用療法の可能性を探索する必要があると考える。

第5節 小括

本章では MM 幹細胞様の性状を有する HA-MM 細胞株を樹立し、その性状解析を行い、以下の知見を得た。

1. HA-MM 細胞株の増殖速度は通常酸素濃度下で培養している親株の MM 細胞に比して遅く、HA-MM 細胞は G0 期や SP 分画細胞集団を多く含み、*SOX2*、*NANOG*、*OCT4* といった幹細胞マーカーの発現も亢進していることを認めた。
2. HA-MM 細胞は NOD/SCID マウスに対する serial transplantation 法やコロニー形成法により、親株の MM 細胞より clonogenicity が高いことが示された。
3. HA-MM 細胞では、TGF- β /Smad 経路が活性化しており、TGF- β 阻害剤 SB431542 処置により、その clonogenicity が減弱することがコロニー形成法にて示された。
4. MM 幹細胞様の性状を有する HA-MM 細胞の幹細胞様の性状の維持には、TGF- β /Smad 経路の活性化が関与していることが明らかとなった。

第3章 MM 細胞の分泌する $\gamma\delta$ T 細胞遊走因子の解析

第1節 緒言

1950年代、自己の細胞から発生したがん細胞が非自己と認識されるがん抗原を有するために、自己の免疫機構により排除されるがん免疫応答は、「がん免疫監視機構」として提唱された(98)。しかし現代では、発がんからがん組織成立の初期段階ではこの監視機構によりがんの進展を抑制しているが、がんは成長とともにその監視機構からすり抜け、生き残るがん細胞を生み出すとともに、積極的に免疫応答を抑制する環境を作り、がん組織が進展し顕在化していく「がん免疫編集」という概念に発展している(99)。この過程で、癌の進展を妨げるように働く免疫担当細胞として、非自己抗原を貪食する単球・マクロファージ、細胞性免疫に関わるT細胞、液性免疫に関わるB細胞、免疫担当細胞への抗原提示を主たる機能とする樹状細胞、等が存在する。これらの細胞による免疫応答には、生まれながらにして、非自己抗原をパターン認識し外来異物に攻撃をする自然免疫と、非自己抗原を major histocompatibility complex (MHC) 分子上に乗せ、T細胞に抗原提示することで惹起される獲得免疫がある。このような免疫担当細胞を用いたがんに対する治療法をがん細胞免疫療法という。

T細胞は、樹状細胞上のMHC分子上に提示された抗原ペプチドを $\alpha\beta$ T細胞受容体にて認識し、その抗原を有する非自己を攻撃する細胞障害性の $\alpha\beta$ T細胞と、寄生虫などの外来微生物のイソプレノイド合成経路で産生される非ペプチド性の phosphoantigen を $\gamma\delta$ T細胞受容体にて認識し非自己を攻撃する $\gamma\delta$ T細胞に大別される。 $\gamma\delta$ T細胞のほとんどは腸管や皮膚に存在する。外来微生物から生体を防御する働きを有し、末梢血液中にはT細胞の高々4-6%程度しか存在しない。ヒト $\gamma\delta$ T細胞のV γ 遺伝子は6種類であり、V δ 遺伝子はV δ 1、V δ 2、V δ 3の3種類しかなく、末梢血液中の $\gamma\delta$ T細胞はV γ 9V δ 2(またはV γ 2V δ 2)T細胞にほぼ限定されている(100)。またこのV γ 9V δ 2T細胞は、メバロン酸代謝経路の中間代謝産物である isopentenyl pyrophosphate (IPP) を抗原として認識し、増幅・活性化される(101, 102)。さらに興味深いことに、V γ 9V δ 2T細胞は bisphosphonate (BP) 製剤と IL-2 で著明に体外増幅でき、BP で前処置した各種がん細胞に対してMHC非拘束的に抗腫瘍効果を示すことが、著者を含め多くの研究者により明らかにされてきた(103-108)。これらの知見をもとに臨床試験が行われており、 $\gamma\delta$ T細胞によるがん細胞免疫療法の安全性は確認されている(106, 109-118)。以上の知見、著者らの前臨床研究の成果(105)により、上記2章で可能性が示唆されたMM治療薬の効果を増強させMMの根治を目指す方法として、 $\gamma\delta$ T細胞を用いたがん免疫細胞療法の併用を考え、本細胞療法の応用について検討を加えた。

著者は、 $\gamma\delta$ T細胞がランダムに遊走し偶然近づいたMM細胞に接触し抗腫瘍効果を発揮するのではなく、MM細胞に引き寄せられるようにMM細胞に接触し攻撃することを過去の前臨床研究において発見した(105)。このことから、「MM細胞が $\gamma\delta$ T細胞を引き寄せる因子を放出しており、 $\gamma\delta$ T細胞がその濃度勾配に従ってMM細胞に近づき抗腫瘍効果を発揮している」と仮説を立て、この仮説の検証実験を行うことを計画した。島津製作所基盤技術研究所は micro total analysis system (μ TAS) 技術(119-121)を用いて細胞機能解析チップ(マイクロチップ)を開発しており(122)、このマイクロチップは、240 nLの極めて小さな培養室と、数 nLの液体を定量的に導入できるマイク

ロインジェクターを併せ持つ細胞機能解析チップで、少数個の細胞をナノサイズの微小環境で安定して培養し、マイクロインジェクターより注入した液性因子の刺激によって応答する細胞の挙動をリアルタイムに観測することができる (Figure 3-1)。またマイクロインジェクターより注入した液性因子は、マイクロインジェクターのポートロを点源として、そこから拡散により広がっていく (Figure 3-2)。このマイクロチップを用いて、MM 細胞から分泌される $\gamma\delta$ T 細胞の遊走因子の探索を行った。

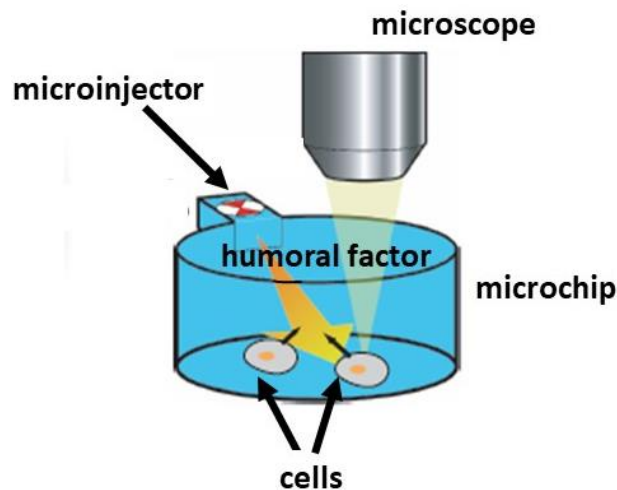


Figure 3-1 Scheme of cellular analysis microchip. Small number of cells can cultivate in the microchamber. After the stimulation by humoral factors put into the chamber through the microinjector, the cellular response is estimated using a microscope.

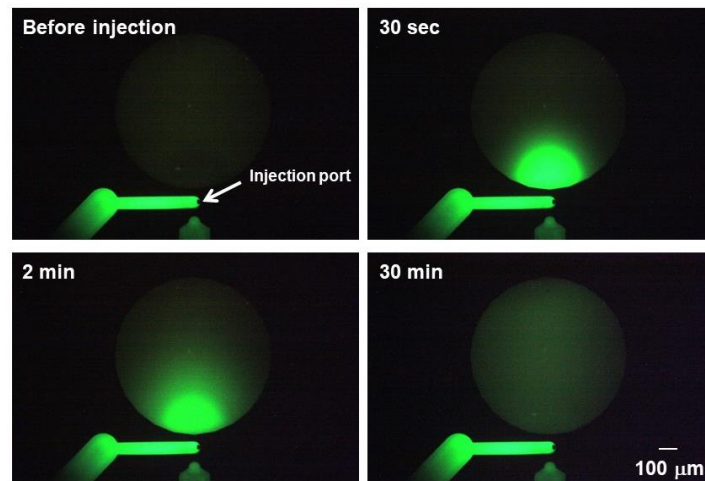


Figure 3-2 Time-lapse photos of fluorescent dye solution diffusing in the microchamber. Alexa Fluor A488-dextran (3000 molecular weight) solution was introduced to the microchamber using the microinjector. Elsevier permitted to use this figure for thesis.

Ashihara, E., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **463**, 650-655 (2015)

第2節 材料と方法

1. 細胞株

ヒト MM 細胞 RPMI8226 細胞株は DSMZ GmbH から購入した。RPMI8226 細胞株は 10%FCS、SM/PC および 2 mM l-glutamine 含有 RPMI1640 培地を用いて、5%CO₂ および 37°C で加湿条件下により培養した。

2. 試薬

$\gamma\delta$ T 細胞培養に用いた合成ピロリン酸モノエステル化合物 2-methy-3-butenyl-1-pyrophosphate は、田中義正博士（京都大学医学部）から供与をうけ、RPMI8226 細胞の刺激に用いた zoledronic acid (ZOL; 1-hydroxy-2-(1H-imidazole-1-yl) ethylidene-bisphosphonic acid) は Novartis Pharma AG (Basel, Switzerland) より供与された。遺伝子組み換えヒト interleukin-2 (IL-2) はシオノギ製薬（東京）から供与された。IPP、炭酸水素アンモニウム (NH₄HCO₃) 溶液、28% NH₄OH 溶液は Sigma-Aldrich から購入した。High-performance liquid chromatography (HPLC) グレードの 2-プロパノール、アセトニトリルは和光純薬工業より購入した。

3. ヒト $\gamma\delta$ T 細胞の培養

京都大学医学部附属病院 医の倫理委員会の指針に則り、ヘルシンキ宣言に基づくインフォームドコンセントを取得した健康人ボランティアから末梢血を採取し、既報(105)に基づき増幅培養を 11 日間行った。また培養に用いた AB 型血清は、ヘルシンキ宣言に基づくインフォームドコンセントを取得した AB 型健康人ボランティアの末梢血より分離・採取し、使用するまで -80°C で保存し、使用時に解凍し用いた。

4. RPMI8226 細胞の培養上清の作製

RPMI8226 細胞を 1×10⁶ /mL で播種後に BP 製剤である ZOL を終濃度 1 μ M で添加し、18 時間培養後、上清を回収しフィルター (0.22 μ m ; 日本ミリポア、東京) でろ過し、-20°C で保存した。凍結保存した上清は使用時に解凍し用いた。

5. トランスウェルチャンバーを用いた $\gamma\delta$ T 細胞遊走の解析

細胞遊走実験で通常使用されるトランスウェルチャンバー (123, 124)を用いて、 $\gamma\delta$ T 細胞遊走の定量的解析を行った。インサートのポアサイズが径 3.0 μ m のトランスウェルチャンバー (Corning、東京) のインサートチャンバーに、RPMI8226 細胞を 5×10⁶ /mL で播種し、下方のチャンバーに刺激となる液性因子を添加し、4 時間後に下方のチャンバーに遊走した $\gamma\delta$ T 細胞数を、Cell-Counting Kit-8 (Dojindo、熊本) を用いた 3-(4, 5-dimethylthial-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 法にて評価した。

6. マイクロチップを用いた $\gamma\delta$ T 細胞遊走の定量的解析

$\gamma\delta$ T 細胞を 1×10⁶ /mL でマイクロチップの培養室内に入れ、刺激となる液性因子をマイクロインジェクターより 24 nL 注入後、 $\gamma\delta$ T 細胞の挙動をタイムラプス顕微鏡下で、30 秒ごとに 30 分間撮像した。Image J を用いて細胞遊走を測定し、遊走速度を以下の指標で評価した (Figure 3-3)。

$$\text{Speed} : \frac{d}{\Delta t}$$

$$\text{Effective Chemotaxis Index (ECI)} : d \cos \theta / \Delta t = \Delta x / \Delta t$$

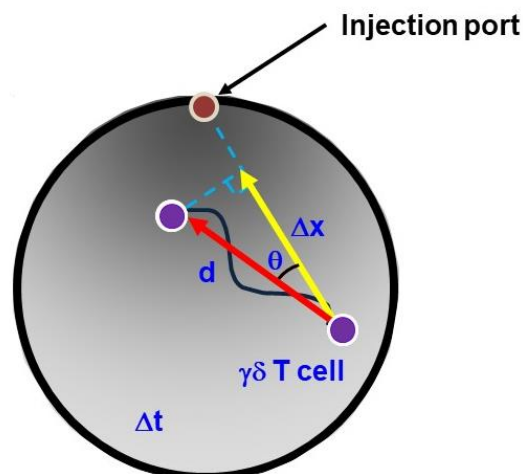


Figure 3-3 Diagram showing the parameters of chemotaxis measured in the microchamber. *d*, distance of $\gamma\delta$ T cell (purple circles) migration; Δx , distance of $\gamma\delta$ T-cell migration toward the injection port; θ , angle between *d* and Δx ; Δt , observation time. Elsevier permitted to use this figure for thesis.

Ashihara, E., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **463**, 650-655 (2015)

7. 培養上清中の IPP 濃度測定

培養上清中の IPP の測定は、既報 (125)に基づき、HPLC-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) 法により行った。HPLC 装置のシステムコントローラー (CBM-20A)、オンラインデガッサ (DGU-20A₃)、送液ユニット (LC-20AD)、オートサンプラ (SIL-20AC_{HT}) およびカラムオーブン (CTO-20A) は Prominence UFLC (島津製作所、京都) を使用した。MS/MS は、API 3200 (AB SCIEX、東京) を使用し、窒素ガス発生器は AT5NP-25CSL (エアーテック、大阪) を使用した。分析カラムは InertSustain C18 (2.1×150 mm, 粒子径 5 μ m; 島津ジーエルサイエンス、東京) を用いた。

まず、IPP とその異性体の dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP) の検量線の作成を行った。IPP および DMAPP (終濃度としてそれぞれ 75 ng/mL) を含む水溶液 200 μ L に、アセトニトリル 1.5 mL および 2-プロパノールと 0.1 M の NH_4HCO_3 の混合溶液 (容量比 1:1) 1.0 mL および水 400 μ L を加え、2 分間攪拌後、4°C、3000 rpm、20 分間、遠心分離した。そして、IPP および DMAPP を 0.05~75 ng/mL の濃度範囲で LC-MS/MS を用いて定量した。なお、LC-MS/MS の条件は Table 3-1 および 3-2 に示した。

次に RPMI8226 細胞の培養上清 200 μ L に、水を 400 μ L および 0.01 M の NH_4OH を 100 μ L 加えて混和した。さらに、容量比 1 : 1 に混和した 2-プロパノールと 0.1 M の NH_4HCO_3 溶液を 1 mL および 1.5 mL のアセトニトリルを加え、混和後、氷上に 10 分間静置し、4°Cにて 3000 rpm で 20 分間

の遠心分離にかけた。その上清 160 μL を窒素気流下で乾固後、0.01 M の NH_4OH 溶液 40 μL に溶解させ、そのうち 20 μL を注入し、LC-MS/MS 法で測定した。なお、定量はサンプルの培養上清に、培養上清中終濃度として 0、3、5、10 ng/mL の標準品を添加し、標準添加法で定量した。

Table 3-1 LC-MS/MS conditions

Column: InertSustain C18 (2.1 \times 150 mm, particle diameter 5 μm , GL Sciences)

Column temperature: 30 $^\circ\text{C}$

Mobile phase A: 0.2 M NH_4HCO_3 , 0.1% triethylamine

Mobile phase B: CH_3CN , 0.1% triethylamine

Gradient program:	0 - 5 min	B	0% to 80%
	5 - 7 min	B	80%
	7 - 7.01 min	B	80% to 0%
	7.01 - 10 min	B	0%

Flow rate: 0.4 mL/min

Injection Volume: 20 μL

Ion source: Turbo Ion Spray (ESI)

Ionization mode: Negative (-)

Ion spray voltage: -4500 V

MS mode: Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode

Table 3-2 Conditions of Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode

Isoprenoids	<i>m/z</i>		DP (eV)	CE (eV)
	Precursor Ion	Product Ion		
IPP and DMAPP	244.8	79.0	-25	-42

DMAPP is a stereoisomer of IPP, therefore, detection conditions of both compounds are the same.

DP, Declustering Potential; CE, Collision Energy

IPP, isopentenylpyrophosphate; DMAPP, dimethylallylpyrophosphate

8. 統計解析

$\gamma\delta\text{T}$ 細胞遊走の遊走速度の統計解析は Student の t 検定にて解析し、またトランスウェルチャンバーを用いた遊走細胞数の統計解析は Williams 法にて解析し、p 値が 5%未満で統計学的に有意差ありと判定した。

第3節 結果

1. RPMI8226 細胞の培養上清による $\gamma\delta$ T 細胞遊走に及ぼす影響

ZOL 処理によりヒト MM 細胞株 RPMI8226 細胞が、 $\gamma\delta$ T 細胞遊走因子を分泌しているかを明らかにするために、ZOL を処理した RPMI8226 細胞の培養上清（最終濃度 v/v 10%）による $\gamma\delta$ T 細胞の挙動を、マイクロチップを用いタイムラプス顕微鏡下で評価した。陰性コントロールとして RPMI1640 完全培地（10%FCS、ST/PC 含有）を用いた。RPMI8226 細胞の培養上清を注入したところ、 $\gamma\delta$ T 細胞は RPMI1640 完全培地の注入に比して、注入口に向かって遊走した（Figure 3-4A）。また ECI > 1 $\mu\text{m}/\text{分}$ の細胞数は、RPMI8226 細胞の培養上清を注入した際に多く、遊走速度（Speed）および ECI は、RPMI8226 細胞の培養上清を注入した際には、それぞれ $2.69 \pm 0.81 \mu\text{m}/\text{分}$ 、 $0.89 \pm 0.66 \mu\text{m}/\text{分}$ であり、RPMI1640 完全培地を注入した際には、それぞれ $2.0 \pm 0.69 \mu\text{m}/\text{分}$ 、 $0.22 \pm 0.53 \mu\text{m}/\text{分}$ であり、RPMI8226 細胞の培養上清を注入した際の $\gamma\delta$ T 細胞の遊走速度および ECI が統計学的に有意に速かった（Figure 3-4B, C）。以上のことから、ZOL で処理した RPMI8226 細胞の培養上清には、何らかの $\gamma\delta$ T 細胞を遊走因子が含まれていることが示唆された。

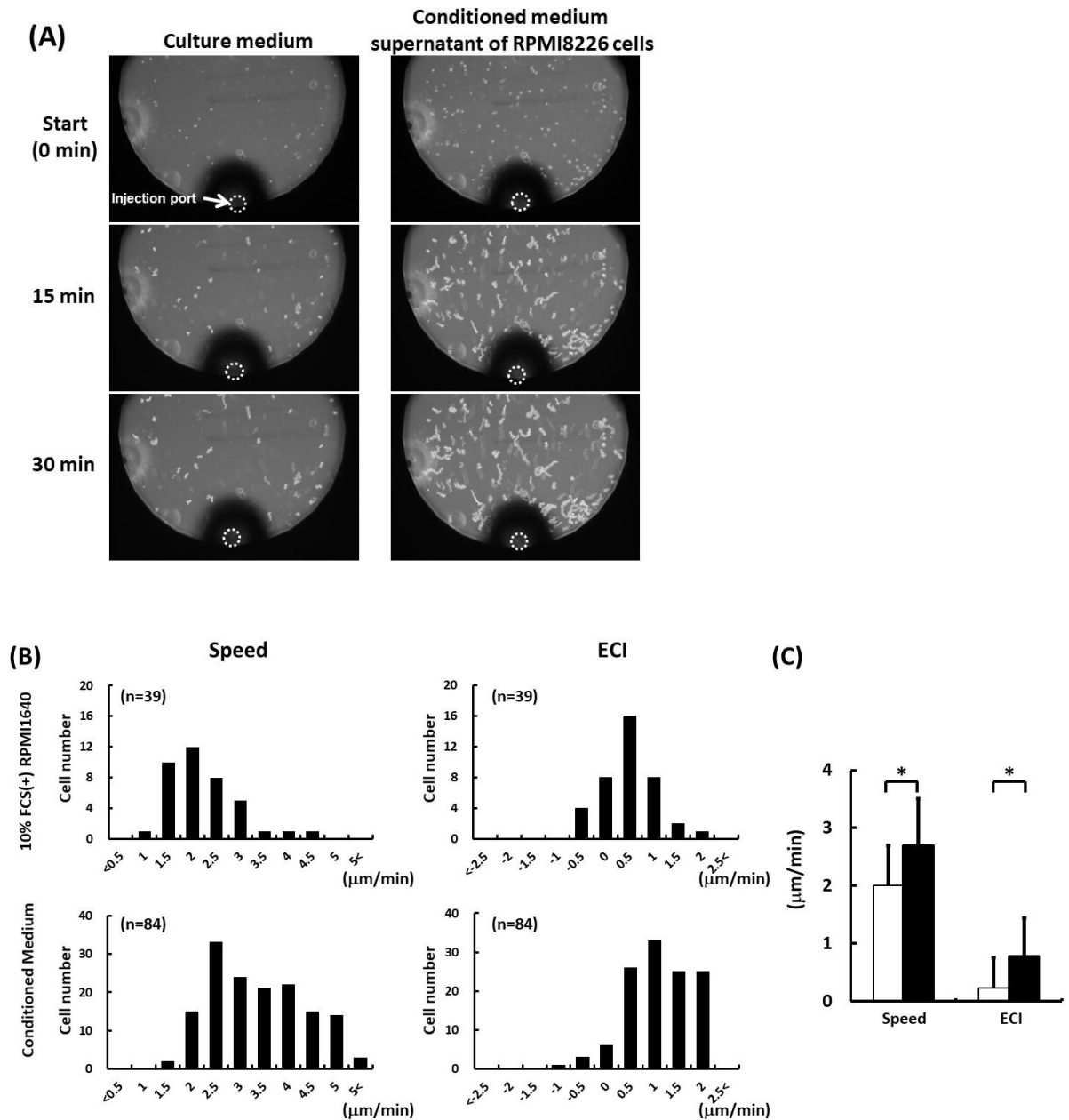


Figure 3-4 Quantitative analysis of $\gamma\delta$ T cell migration induced by RPMI8226-conditioned medium (CM). (A) Tracking $\gamma\delta$ T cell migration after injection of the 10% FCS-containing culture medium or RPMI8226-CM via the microinjector. Images were captured every 30 sec for the indicated times and overlaid. White tracks indicate each $\gamma\delta$ T cell movement in the time during the indicated time. (B) Histograms of speed and effective chemotaxis index (ECI) of migrating $\gamma\delta$ T cells. The negative values for speed and ECI indicate $\gamma\delta$ T cell migration from the initial point in the opposite direction of the microinjector. (C) The mean values of speed and ECI of the $\gamma\delta$ T cells treated with the medium (white bars) and with RPMI8226-CM (black bars) from the data in Figure 3-4B. The data represent means + standard deviations and are representative data of four independent experiments. * $p < 0.0001$. Elsevier permitted to use this figure for thesis.

Ashihara, E., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **463**, 650-655 (2015)

2. RPMI8226 細胞培養上清中の IPP 濃度測定

ZOL 処理による RPMI8226 細胞の分泌する $\gamma\delta$ T 細胞遊走因子として、ZOL 処理に伴い細胞質内に蓄積されるメバロン酸代謝経路の中間代謝産物であり、 $\gamma\delta$ T 細胞の活性化因子である IPP (101) に着目し、ZOL 処置により IPP が細胞外に分泌され、遊走因子となっているとの仮説に基づき、ZOL 処置を受けた RPMI8226 細胞株の培養上清中に IPP が分泌されていることを示すため、RPMI8226 細胞株の培養上清中の IPP 濃度を HPLC-MS/MS 法で測定した。IPP と立体異性体である DMAPP は本方法では分離し測定できない (125) ため、IPP および DMAPP を合わせて測定した。RPMI8226 細胞を ZOL で処置した培養上清には IPP および DMAPP が存在し (Supplementary Figure 2)、ZOL の処置濃度依存的に増加した (Figure 3-5)。

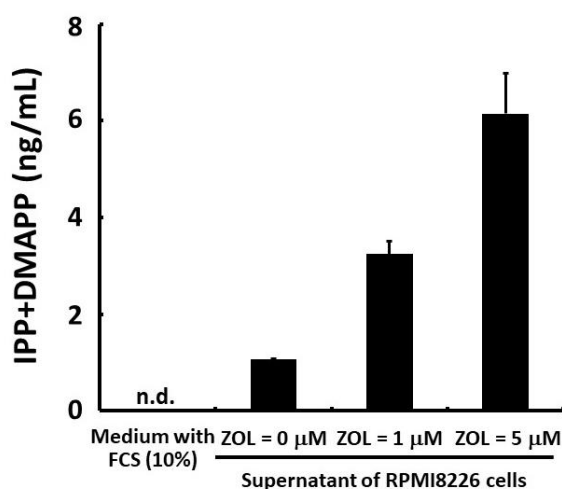


Figure 3-5 Concentration of isopentenyl pyrophosphate (IPP) and dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP) in the supernatant of RPMI8226 myeloma cells. Zoledronic acid was added to 1×10^6 cells at the indicated concentration and the cells were cultured for 18 hours. The concentration of IPP and DMAPP in the supernatant was then determined by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The data represent means + standard deviation of two independent experiments. n.d.; not detected. Elsevier permitted to use this figure for thesis.

Modified from Ashihara, E., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **463**, 650-655 (2015)

3. IPP による $\gamma\delta$ T 細胞遊走に及ぼす影響

以上の結果を踏まえ、メバロン酸代謝経路産物である IPP による $\gamma\delta$ T 細胞への遊走作用を検討した。まず細胞遊走の評価に用いられるトランスウェルチャンバーを用いて MTT 法にて評価した。

4 時間の遊走実験にて下層のチャンバーに遊走する $\gamma\delta$ T 細胞数は、IPP 処置濃度により増加傾向があることが明らかとなった (Figure 3-6)。

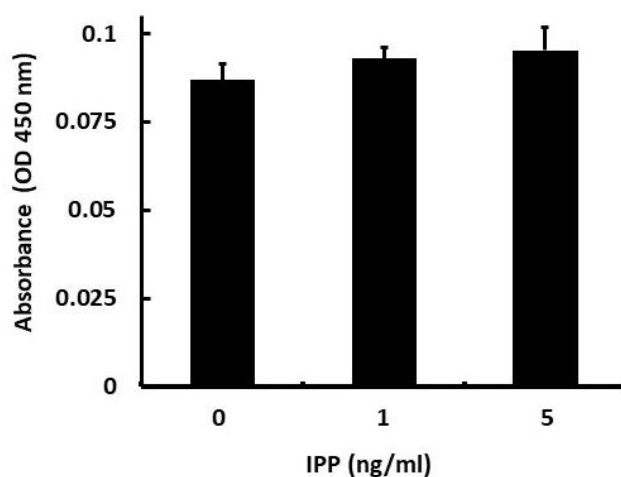


Figure 3-6 Quantitative migration assay of $\gamma\delta$ T cells using tranwell chambers with porous transwell inserts. Isopentenyl pyrophosphate (IPP) was added to the wells below the insert at the indicated concentrations and the number of $\gamma\delta$ T cells migrating across the transwell membrane was evaluated by the absorbance at a 450 nm wavelength. The data represent means + standard deviations of six wells and are representative data of two independent experiments. Elsevier permitted to use this figure for thesis.

Ashihara E., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **463**, 650-655 (2015)

次に、マイクロチップを用いて $\gamma\delta$ T 細胞の遊走を検証した。RPMI8226 細胞の培養上清による遊走の実験と同様に、 $\gamma\delta$ T 細胞をマイクロチャンバー内に入れ、IPP を最終濃度が 5 ng/mL となるようにマイクロポートより注入し、タイムラプス顕微鏡下で観察した。IPP 注入により $\gamma\delta$ T 細胞は、マイクロポートに向かって遊走してきたが、溶媒として用いたメタノールのみ (最終濃度 0.005%v/v) の注入時にはランダムな挙動を示した (Figure 3-7A)。また ECI > 1 μ m/分の細胞数は、IPP 注入時に多く、遊走速度および ECI は、IPP 注入時では、それぞれ $2.89 \pm 0.80 \mu$ m/分、 $1.29 \pm 0.80 \mu$ m/分であり、溶媒として用いたメタノールを注入した際には、それぞれ $1.92 \pm 0.89 \mu$ m/分、 $0.19 \pm 0.43 \mu$ m/分であり、IPP を注入した際の $\gamma\delta$ T 細胞の遊走速度および ECI が統計学的に有意に速かった (Figure 3-7B, C)。

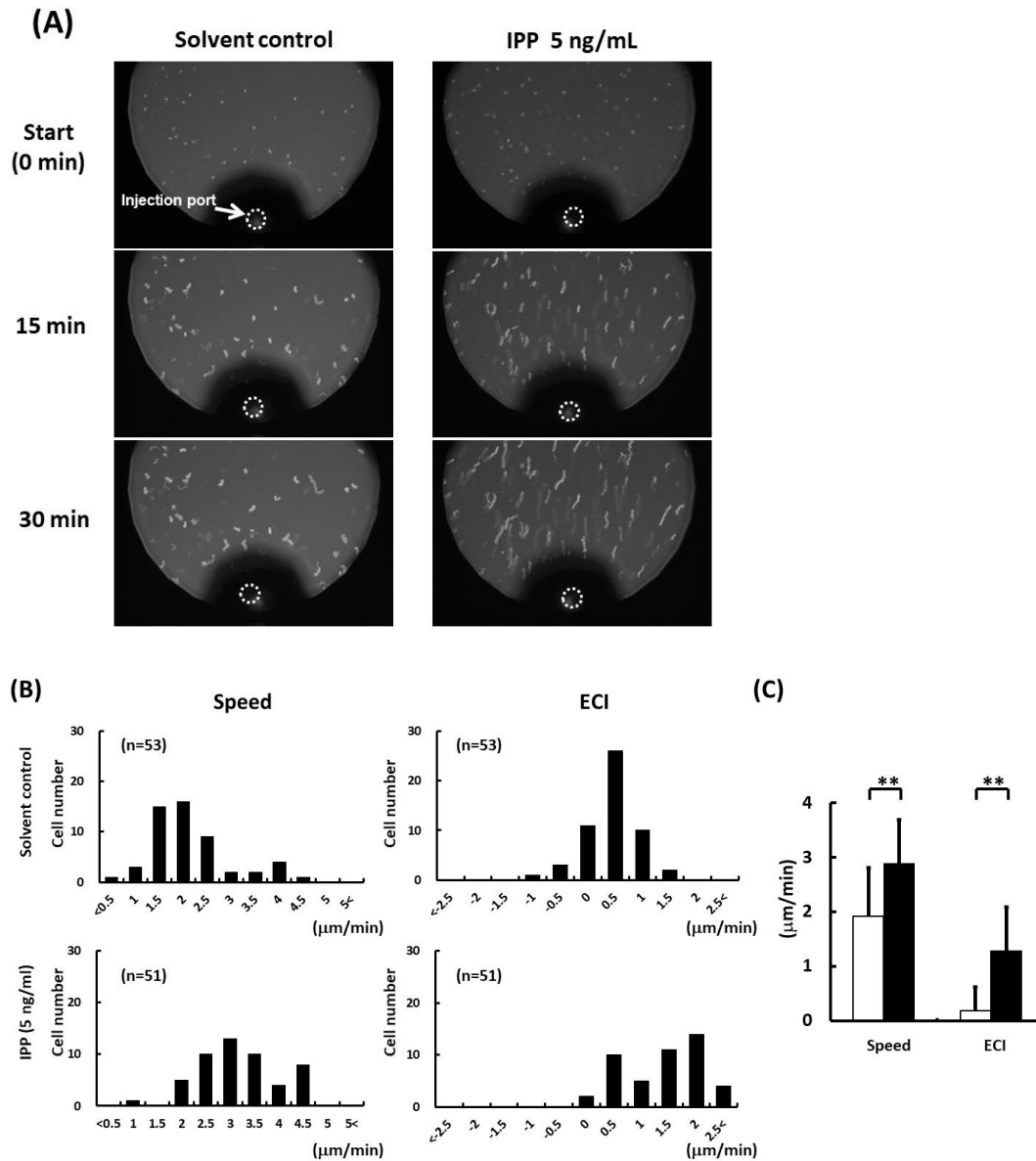


Figure 3-7 Quantitative analysis of $\gamma\delta$ T cell migration induced by isopentenyl pyrophosphate (IPP). (A) Tracking $\gamma\delta$ T cell migration after treatment with 5 ng/mL IPP-containing control solvent or control solvents. White tracks indicate each $\gamma\delta$ T cell movement. (B) Histograms of speed and effective chemotaxis index (ECI) of migrating $\gamma\delta$ T cells. The negative values for speed and ECI indicate $\gamma\delta$ T cell migration from the initial points in the opposite direction of the microinjector. (C) The mean values of speed and ECI of migrating $\gamma\delta$ T-cells induced by IPP (black bars) or solvent control (white bars) from the data in Figure 3-7B. The data represent means + standard deviations and are representative data of two independent experiments. $**p < 1 \times 10^{-5}$. Elsevier permitted to use this figure for thesis.

Ashihara, E., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **463**, 650-655 (2015)

第4節 考察

今回の検討で用いた細胞機能解析マイクロチップは、液性因子を注入するマイクロポートを点源として液性因子が拡散で拡がり、細胞から放出された液性因子が細胞表面から自然拡散で拡がっていく過程を模擬でき (Figure 3-8)、その過程で生じる液性因子の濃度勾配が再現できた (Figure 3-2)。このマイクロチップを用いることで、メバロン酸代謝経路の中間代謝産物である IPP に $\gamma\delta$ T 細胞を引き寄せる遊走作用があることが明らかとなった。また従来用いられてきたトランスウエルチャンパー (123)を用いた結果 (Figure 3-5) に比べ、遊走現象が著明に変化することが示せ、さらにその遊走速度も測定できた。この遊走速度は、既報(126)で示された定常的な濃度勾配 (350 μ m で 100 nM) に対する T 細胞の遊走速度に相当する結果であり、本マイクロチップを用いて得られた結果は信頼できるものと考えられる。がん細胞ではメバロン酸代謝経路が活性化しており (127, 128)、IPP 産生量は高く、かつ細胞外への分泌量も多い。さらに、ZOL 処置にてファルネシルピロリン酸合成酵素活性が阻害され、IPP の細胞質内蓄積が増加し、その結果 MM 細胞における IPP 分泌量が、ZOL 処置の容量依存的に増加したと推察される。しかし IPP 単独で $\gamma\delta$ T 細胞を遊走させ (Figure 3-7)、IPP の $\gamma\delta$ T 細胞遊走作用を証明したが、今回の ZOL 処理後の RPMI8226 細胞の培養上清による $\gamma\delta$ T 細胞遊走の検討では、細胞刺激に用いた ZOL も上清中に残っているため、ZOL による遊走刺激や IPP 以外の MM 細胞から産生させた物質にても遊走が惹起されている可能性は残る。

$\gamma\delta$ T 細胞によるがん細胞免疫療法は多くの臨床試験が進められてきた (106, 109-118)。しかしながら、いずれも安全性は確認できたものの、治療効果を認めたものはほとんど認められなかった。その理由として、 $\gamma\delta$ T 細胞を全身投与しても腫瘍局所の到達する $\gamma\delta$ T 細胞が少なく、*in vitro* 実験系で効果が認められたほどの E:T 比が確保できていないことが推察される。既報 (104, 105)に基づく培養方法で、 $\gamma\delta$ T 細胞は約 1000 倍に増幅される。著者らの前臨床研究の結果(105)を基に考察すると、 $\gamma\delta$ T 細胞と MM 細胞の Effector cell:Target cell (E:T) 比は最低でも 20 : 1 は必要である。また完全緩解の状態で行うと想定した場合、完全緩解状態で約 10^8 個の腫瘍細胞が生体内に残存すること、かつ、全身投与した $\gamma\delta$ T 細胞の約 10%が腫瘍局所に到達すると仮定すると、 2×10^{10} 個の $\gamma\delta$ T 細胞を準備する必要がある、体外増幅前には約 2×10^7 個の $\gamma\delta$ T 細胞が必要となる。健常人の 20 mL の末梢血液中には約 2×10^5 個の $\gamma\delta$ T 細胞が存在するので、約 2000 mL 以上の採血が必要となり、複数回の採血と体外増幅は必須である。より有効で患者負担を軽減した $\gamma\delta$ T 細胞を用いたがん免疫療法を確立し、MM の根治を目指すには、今回の研究結果を用いた $\gamma\delta$ T 細胞を引き寄せる環境を考案することは極めて意義深いと考える。

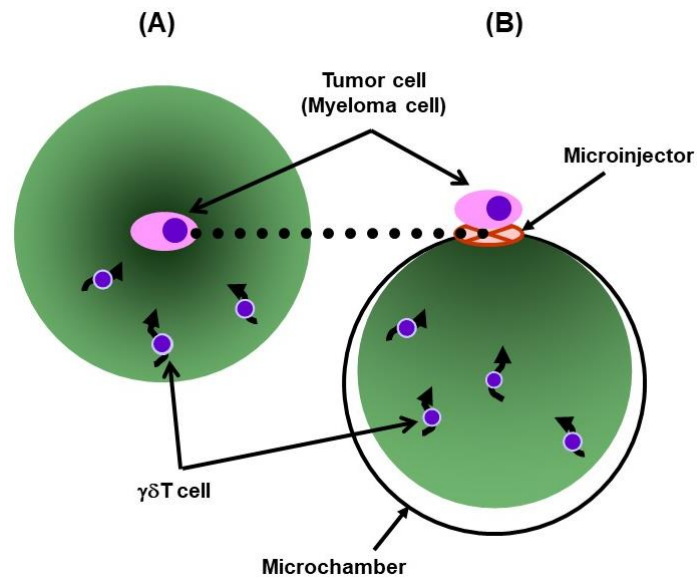


Figure 3-8 Scheme of the μ TAS-based microchamber mimicking the secretion of humoral factor released from the myeloma cell surface. (A) The secreted humoral factor spreads from the cell surface into the microenvironment in a diffusion-dependent manner. (B) The solute introduced via a microinjector can spread within the microchamber in a diffusion-dependent manner, mimicking the spread of humoral factor secreted from the myeloma cell surface. The gradient of color (green) indicates that of the secreted humoral factor. $\gamma\delta$ T cells migrate in accordance with the gradient of the secreted humoral factor. Elsevier permitted to use this figure for thesis.

Ashihara, E., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **463**, 650-655 (2015)

第5節 小括

本章ではMM細胞のメバロン酸代謝経路の中間代謝産物であるIPPの $\gamma\delta$ T細胞に対する遊走作用について検討し、以下の知見を得た。

1. BP製剤であるZOLを投与したヒトMM細胞株 RPMI8226細胞の培養上清が、 $\gamma\delta$ T細胞に対する遊走作用を有することを発見した。
2. メバロン酸代謝経路の中間代謝産物であるIPPが、RPMI8226細胞の培養上清中に処置したZOL濃度依存的に増加することを示した。
3. IPPに $\gamma\delta$ T細胞の遊走作用があることを明らかにした。
4. MM細胞を刺激することで、 $\gamma\delta$ T細胞を引き寄せる遊走因子を分泌させることが可能で、この方法を確立することで、有効ながん細胞免疫療法を構築できる可能性が示唆された。

総括

MM 治療を歴史的に振り返ると、1960 年代以降、MP 療法が **golden standard** として広く用いられてきたが、約半数の患者が治療によって M タンパク質が減少し、各臓器障害に進行を認めない状態が 3 か月以上続く“プラトー”と呼ばれる状態を維持する程度であった。高齢者に多く発症する MM においては、安全性の高い治療法であったが、若年者の MM 患者には不十分な治療で、かつ“プラトー”以上の成績は期待できなかった。1980 年代には、より強く MM 腫瘍量を減らすことを目的として、自家造血幹細胞移植術が開発され、MM 腫瘍細胞量を可能な限り減らすため、メルファランをはじめ、骨髄機能を破壊する大量の抗がん薬を大量投与し、あらかじめ採取しておいた自身の造血幹細胞を移植することで骨髄機能を回復させることを目的に行われた。この移植救済療法により部分緩解以上の奏効率は約 79%と治療成績はかなり改善され (129)、若年者の標準治療に組み込まれるようになった。1990 年代には多くの分子標的治療薬が開発され、ボルテゾミブやサリドマイド、レナリドミドといった新規分子標的治療薬が MM 治療にも導入され、65 歳を超える高齢者でも約 65%の長期生存率が望めるようになった (130)。しなしながら、治癒を望むにはまだ十分な治療法が開発されているとは言い難く、MM の病態をさらに解明し、より有効な治療法の開発は重要課題である。

そこで本研究では、現存する治療に抵抗性を示す原因として CSC の概念を MM に導入し、新たな治療標的分子の探索と MM 幹細胞の性状解析ならびに、成績をさらに改善させるための併用細胞免疫療法の強化因子の可能性を考察してきた。第 1 章では正常幹細胞の増殖・分化制御に重要な働きをし、さらに近年では多くのがん種の CSC の維持・増殖に関わっていることが示されている古典的 Wnt 経路の中間シグナル伝達タンパク質である β -catenin に着目し、治療標的としての有効性を検証した。その結果、 β -catenin が MM 細胞で高発現しており、RNA 干渉法にて β -catenin タンパク質の発現を抑制すると、MM 腫瘍の増殖が抑制されることを担がんマウスモデルで明らかにした。第 2 章では MM の主座である骨髄微小環境に着目し、正常造血幹細胞ニッチと同様に、酸素濃度 1%の低酸素環境で長期間生存する HA-MM 細胞を樹立し、HA-MM 細胞の性状解析を行った。その結果、HA-MM 細胞が CSC 様の性状を有し、その幹細胞性の維持に TGF- β /Smad 経路の活性化が関与していることを明らかにした。第 3 章では、上記 2 章で可能性が示唆された MM 治療薬の効果を増強させる方法として、 $\gamma\delta$ T 細胞を用いたがん免疫細胞療法をより有効な治療法とするために、MM 細胞が分泌する $\gamma\delta$ T 細胞の引き寄せ遊走因子を解析した。その結果、がん細胞で活性化しているメバロン酸代謝経路の中間代謝産物である IPP の MM 細胞から分泌が ZOL 処置により増加し、分泌された IPP が $\gamma\delta$ T 細胞の遊走因子であることを、定量的解析で証明した。

以上より、著者は HA-MM 細胞が MM の根治を目指すための標的細胞である MM 幹細胞に酷似した幹細胞性を有することを示し、その維持に必要なシグナル経路の 1 つとして TGF- β /Smad シグナル経路を示し、本シグナルを標的とした新たな MM 幹細胞治療薬開発の可能性を示した。また MM の標的分子として β -catenin タンパク質が新たな標的分子であることを明らかにした。本成果を受けて、現在本分子に対する新規がん分子標的治療薬開発研究を進めている。さらに $\gamma\delta$ T 細胞を用いたがん免疫細胞療法をより強力な治療法にすべく、MM 細胞が分泌する IPP が $\gamma\delta$ T 細胞遊走因子であることを示し、MM 根治のため、分子標的治療に $\gamma\delta$ T 細胞の遊走因子を利用したがん免疫細胞

療法を併用することで治療効果を増強させる可能性を示唆した。これら3つの併用治療の治療効果について考えてみる。著者は Wnt/ β -catenin 経路阻害剤が正所性 MM 担がんマウスの生存期間を有意に延長し、MM に対して治療効果を有することを明らかにしている (53)が、治療を受けたマウスは治癒には至らなかった。おそらく MM 幹細胞が残存していたものと推察するが、Wnt/ β -catenin 経路阻害剤に TGF- β /Smad 阻害薬を併用することで、MM 幹細胞を細胞周期に入れ Wnt/ β -catenin 経路阻害剤による強力な殺細胞効果が期待でき、生体内に残存する MM 細胞をより減少させることが考えられる。その後 $\gamma\delta$ T 細胞による治療を行うことで、MM 幹細胞を主体とする残存 MM 細胞に対して高い E:T 比が維持でき、かつ ZOL 投与により MM 細胞から分泌される IPP の引き寄せ効果により、輸注された $\gamma\delta$ T 細胞が MM 細胞に到達し抗腫瘍効果が期待でき、3者併用治療で、より深い緩解、治癒が望めると考える。本基礎的研究の成果は、MM 幹細胞を駆逐できる新たな治療戦略の開発につながる新たな知見であり、MM に苦しむ患者さんたちに大きな福音をもたらすことが期待される。

謝辞

本研究をまとめるにあたり、ご指導を賜りました研究科長 京都薬科大学 薬品化学分野 赤路健一 教授に心から御礼申し上げます。

本論文の査読およびご指導を賜りました京都薬科大学 薬理学分野 田中智之 教授、同臨床薬理学分野 中田徹男 教授に篤く御礼申し上げます。

本研究を推進にあたりご指導およびご助言いただき、また本研究の遂行にあたり、多大なご協力をいただきました次の方々に、心より感謝申し上げます。

京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部

中川陽子 研究員、木村晋也 院内講師 (現 佐賀大学医学部 教授)、平位秀世 院内講師、三浦康生 助教、河田英里 大学院生 (現 University of Western Ontario, Division of Hematology) 加登 (田中) 瑠璃子 大学院生 (現 ヤンセンファーマ メディカルサイエンティフィックリエゾン部)、横田明日美 大学院生 (現 Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Division of Experimental Hematology and Cancer Biology)、武内美紀 大学院生 (現 公立甲賀病院 血液内科部長)、上辻由里 大学院生 (現 市立福知山市民病院 血液内科医長)、八尾尚幸 大学院生 (現 国立病院機構 広島西医療センター 血液内科)、林 嘉広 大学院生 (現 東京薬科大学 講師)

京都府立医科大学 血液内科学

黒田純也 先生 (現 京都府立医科大学医学部 教授)、吉原 (谷口) 享子 大学院生 (現 兵庫医科大学 輸血・細胞治療科 病院助教)、内山人二 大学院生 (現京都第一赤病院 血液内科 部長)、谷脇雅史 名誉教授

京都府立医科大学 感染制御・検査医学

稲葉 亨 講師

JCHO 京都鞍馬口医療センター

島崎千尋 院長

(株) 島津製作所 基盤技術研究所

務中達也 課長、叶井正樹 課長 (現 基盤技術研究所 部長)

阿部浩久 課長 (現 分析計測事業部 部長)

新潟薬科大学 薬学部 薬品分析化学研究室

中川沙織 准教授、大和 進 名誉教授

早稲田大学 理工学部 ナノ・ライフ創新研究機構

庄子習一 教授

順天堂大学医学部 臨床検査医学講座

三井田孝 教授

京都薬科大学

病態生理学分野 戸田侑紀 助教、臨床腫瘍学分野 中田 晋 准教授

最後に、本研究すべてのご指導ならびにご鞭撻を賜りました京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部 前川 平 名誉教授（現 京都府保健環境研究所所長）に衷心より謝意を表します。

引用文献

1. Kyle, R. A.; Rajkumar, S. V. Multiple myeloma. *Blood*. **2008**, 111, 2962-2972.
2. 最新がん統計. 国立がん研究センターがん情報サービス.
3. Kuehl, W. M.; Bergsagel, P. L. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat. Rev. Cancer*. **2002**, 2, 175-187.
4. Walker, B. A.; Wardell, C. P.; Johnson, D. C.; Kaiser, M. F.; Begum, D. B.; Dahir, N. B.; Ross, F. M.; Davies, F. E.; Gonzalez, D.; Morgan, G. J. Characterization of IGH locus breakpoints in multiple myeloma indicates a subset of translocations appear to occur in pregerminal center B cells. *Blood*. **2013**, 121, 3413-3419.
5. Rajkumar, S. V.; Gupta, V.; Fonseca, R.; Dispenzieri, A.; Gonsalves, W. I.; Larson, D.; Ketterling, R. P.; Lust, J. A.; Kyle, R. A.; Kumar, S. K. Impact of primary molecular cytogenetic abnormalities and risk of progression in smoldering multiple myeloma. *Leukemia*. **2013**, 27, 1738-1744.
6. Mattioli, M.; Agnelli, L.; Fabris, S.; Baldini, L.; Morabito, F.; Biccato, S.; Verdelli, D.; Intini, D.; Nobili, L.; Cro, L.; Pruneri, G.; Callea, V.; Stelitano, C.; Maiolo, A. T.; Lombardi, L.; Neri, A. Gene expression profiling of plasma cell dyscrasias reveals molecular patterns associated with distinct IGH translocations in multiple myeloma. *Oncogene*. **2005**, 24, 2461-2473.
7. Zhan, F.; Huang, Y.; Colla, S.; Stewart, J. P.; Hanamura, I.; Gupta, S.; Epstein, J.; Yaccoby, S.; Sawyer, J.; Burington, B.; Anaissie, E.; Hollmig, K.; Pineda-Roman, M.; Tricot, G.; van Rhee, F.; Walker, R.; Zangari, M.; Crowley, J.; Barlogie, B.; Shaughnessy, J. D., Jr. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood*. **2006**, 108, 2020-2028.
8. Neri, A.; Murphy, J. P.; Cro, L.; Ferrero, D.; Tarella, C.; Baldini, L.; Dalla-Favera, R. Ras oncogene mutation in multiple myeloma. *J. Exp. Med.* **1989**, 170, 1715-1725.
9. Walker, B. A.; Wardell, C. P.; Chiecchio, L.; Smith, E. M.; Boyd, K. D.; Neri, A.; Davies, F. E.; Ross, F. M.; Morgan, G. J. Aberrant global methylation patterns affect the molecular pathogenesis and prognosis of multiple myeloma. *Blood*. **2011**, 117, 553-562.
10. Annunziata, C. M.; Davis, R. E.; Demchenko, Y.; Bellamy, W.; Gabrea, A.; Zhan, F.; Lenz, G.; Hanamura, I.; Wright, G.; Xiao, W.; Dave, S.; Hurt, E. M.; Tan, B.; Zhao, H.; Stephens, O.; Santra, M.; Williams, D. R.; Dang, L.; Barlogie, B.; Shaughnessy, J. D., Jr.; Kuehl, W. M.; Staudt, L. M. Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell*. **2007**, 12, 115-130.
11. Keats, J. J.; Chesi, M.; Egan, J. B.; Garbitt, V. M.; Palmer, S. E.; Braggio, E.; Van Wier, S.; Blackburn, P. R.; Baker, A. S.; Dispenzieri, A.; Kumar, S.; Rajkumar, S. V.; Carpten, J. D.; Barrett, M.; Fonseca, R.; Stewart, A. K.; Bergsagel, P. L. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood*. **2012**, 120, 1067-1076.
12. Pawlyn, C.; Morgan, G. J. Evolutionary biology of high-risk multiple myeloma. *Nat. Rev. Cancer*. **2017**, 17, 543-556.
13. Egan, J. B.; Shi, C. X.; Tembe, W.; Christoforides, A.; Kurdoglu, A.; Sinari, S.; Middha, S.; Asmann, Y.;

- Schmidt, J.; Braggio, E.; Keats, J. J.; Fonseca, R.; Bergsagel, P. L.; Craig, D. W.; Carpten, J. D.; Stewart, A. K. Whole-genome sequencing of multiple myeloma from diagnosis to plasma cell leukemia reveals genomic initiating events, evolution, and clonal tides. *Blood*. **2012**, 120, 1060-1066.
14. Solly, S. Remarks on the pathology of mollites ossium with cases. *Med Chir Trans Lond*. **1844**, 27, 435-461.
 15. Hoogstraten, B.; Sheehe, P. R.; Cuttner, J.; Cooper, T.; Kyle, R. A.; Oberfield, R. A.; Townsend, S. R.; Harley, J. B.; Hayes, D. M.; Costa, G.; Holland, J. F. Melphalan in multiple myeloma. *Blood*. **1967**, 30, 74-83.
 16. McIntyre, O. R.; Pajak, T. F.; Kyle, R. A.; Cornwell, G. G., 3rd; Leone, L. Response rate and survival in myeloma patients receiving prednisone alone. *Med. Pediatr: Oncol*. **1985**, 13, 239-243.
 17. Alexanian, R.; Haut, A.; Khan, A. U.; Lane, M.; McKelvey, E. M.; Migliore, P. J.; Stuckey, W. J., Jr.; Wilson, H. E. Treatment for multiple myeloma. Combination chemotherapy with different melphalan dose regimens. *JAMA*. **1969**, 208, 1680-1685.
 18. Alexanian, R.; Dimopoulos, M. The treatment of multiple myeloma. *N. Engl. J. Med*. **1994**, 330, 484-489.
 19. Combination chemotherapy versus melphalan plus prednisone as treatment for multiple myeloma: an overview of 6,633 patients from 27 randomized trials. Myeloma Trialists' Collaborative Group. *J. Clin. Oncol*. **1998**, 16, 3832-3842.
 20. Barlogie, B.; Tricot, G.; Rasmussen, E.; Anaissie, E.; van Rhee, F.; Zangari, M.; Fassas, A.; Hollmig, K.; Pineda-Roman, M.; Shaughnessy, J.; Epstein, J.; Crowley, J. Total therapy 2 without thalidomide in comparison with total therapy 1: role of intensified induction and posttransplantation consolidation therapies. *Blood*. **2006**, 107, 2633-2638.
 21. San-Miguel, J. F.; Hungria, V. T.; Yoon, S. S.; Beksac, M.; Dimopoulos, M. A.; Elghandour, A.; Jedrzejczak, W. W.; Gunther, A.; Nakorn, T. N.; Siritanaratkul, N.; Corradini, P.; Chuncharunee, S.; Lee, J. J.; Schlossman, R. L.; Shelekhova, T.; Yong, K.; Tan, D.; Numbenjapon, T.; Cavenagh, J. D.; Hou, J.; LeBlanc, R.; Nahi, H.; Qiu, L.; Salwender, H.; Pulini, S.; Moreau, P.; Warzocha, K.; White, D.; Blade, J.; Chen, W.; de la Rubia, J.; Gimsing, P.; Lonial, S.; Kaufman, J. L.; Ocio, E. M.; Veskovski, L.; Sohn, S. K.; Wang, M. C.; Lee, J. H.; Einsele, H.; Sopala, M.; Corrado, C.; Bengoudifa, B. R.; Binlich, F.; Richardson, P. G. Panobinostat plus bortezomib and dexamethasone versus placebo plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: a multicentre, randomised, double-blind phase 3 trial. *Lancet Oncol*. **2014**, 15, 1195-1206.
 22. Zamagni, E.; Tacchetti, P.; Pantani, L.; Cavo, M. Anti-CD38 and anti-SLAMF7: the future of myeloma immunotherapy. *Expert Rev. Hematol*. **2018**, 11, 423-435.
 23. Bonnet, D.; Dick, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med*. **1997**, 3, 730-737.
 24. Reya, T.; Morrison, S. J.; Clarke, M. F.; Weissman, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. **2001**, 414, 105-111.
 25. Visvader, J. E.; Lindeman, G. J. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell*. **2012**, 10, 717-728.

26. Clarke, M. F.; Fuller, M. Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell*. **2006**, 124, 1111-1115.
27. Magee, J. A.; Piskounova, E.; Morrison, S. J. Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell*. **2012**, 21, 283-296.
28. Noborio-Hatano, K.; Kikuchi, J.; Takatoku, M.; Shimizu, R.; Wada, T.; Ueda, M.; Nobuyoshi, M.; Oh, I.; Sato, K.; Suzuki, T.; Ozaki, K.; Mori, M.; Nagai, T.; Muroi, K.; Kano, Y.; Furukawa, Y.; Ozawa, K. Bortezomib overcomes cell-adhesion-mediated drug resistance through downregulation of VLA-4 expression in multiple myeloma. *Oncogene*. **2009**, 28, 231-242.
29. Chen, Z.; Orlowski, R. Z.; Wang, M.; Kwak, L.; McCarty, N. Osteoblastic niche supports the growth of quiescent multiple myeloma cells. *Blood*. **2014**, 123, 2204-2208.
30. Hu, J.; Van Valckenborgh, E.; Menu, E.; De Bruyne, E.; Vanderkerken, K. Understanding the hypoxic niche of multiple myeloma: therapeutic implications and contributions of mouse models. *Dis. Model. Mech.* **2012**, 5, 763-771.
31. Tai, Y. T.; Acharya, C.; An, G.; Moschetta, M.; Zhong, M. Y.; Feng, X.; Cea, M.; Cagnetta, A.; Wen, K.; van Eenennaam, H.; van Elsas, A.; Qiu, L.; Richardson, P.; Munshi, N.; Anderson, K. C. APRIL and BCMA promote human multiple myeloma growth and immunosuppression in the bone marrow microenvironment. *Blood*. **2016**, 127, 3225-3236.
32. Hajek, R.; Okubote, S. A.; Svachova, H. Myeloma stem cell concepts, heterogeneity and plasticity of multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* **2013**, 163, 551-564.
33. Huff, C. A.; Matsui, W. Multiple myeloma cancer stem cells. *J. Clin. Oncol.* **2008**, 26, 2895-2900.
34. Johnsen, H. E.; Bogsted, M.; Schmitz, A.; Bodker, J. S.; El-Galaly, T. C.; Johansen, P.; Valent, P.; Zojer, N.; Van Valckenborgh, E.; Vanderkerken, K.; van Duin, M.; Sonneveld, P.; Perez-Andres, M.; Orfao, A.; Dybkaer, K. The myeloma stem cell concept, revisited: from phenomenology to operational terms. *Haematologica*. **2016**, 101, 1451-1459.
35. Carreau, A.; El Hafny-Rahbi, B.; Matejuk, A.; Grillon, C.; Kieda, C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J. Cell. Mol. Med.* **2011**, 15, 1239-1253.
36. Mohyeldin, A.; Garzon-Muvdi, T.; Quinones-Hinojosa, A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell*. **2010**, 7, 150-161.
37. Simon, M. C.; Keith, B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, 9, 285-296.
38. Logan, C. Y.; Nusse, R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2004**, 20, 781-810.
39. Anastas, J. N.; Moon, R. T. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat. Rev. Cancer*. **2013**, 13, 11-26.
40. Yao, H.; Ashihara, E.; Maekawa, T. Targeting the Wnt/beta-catenin signaling pathway in human cancers. *Expert Opin. Ther. Targets*. **2011**, 15, 873-887.
41. Ashihara, E.; Takada, T.; Maekawa, T. Targeting the canonical Wnt/beta-catenin pathway in hematological malignancies. *Cancer Sci*. **2015**, 106, 665-671.

42. Jamieson, C. H.; Ailles, L. E.; Dylla, S. J.; Muijtjens, M.; Jones, C.; Zehnder, J. L.; Gotlib, J.; Li, K.; Manz, M. G.; Keating, A.; Sawyers, C. L.; Weissman, I. L. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *351*, 657-667.
43. Zhao, C.; Blum, J.; Chen, A.; Kwon, H. Y.; Jung, S. H.; Cook, J. M.; Lagoo, A.; Reya, T. Loss of beta-catenin impairs the renewal of normal and CML stem cells in vivo. *Cancer Cell.* **2007**, *12*, 528-541.
44. Holland, J. D.; Klaus, A.; Garratt, A. N.; Birchmeier, W. Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2013**, *25*, 254-264.
45. Lenz, H. J.; Kahn, M. Safely targeting cancer stem cells via selective catenin coactivator antagonism. *Cancer Sci.* **2014**, *105*, 1087-1092.
46. Kuroda, J.; Kimura, S.; Segawa, H.; Kobayashi, Y.; Yoshikawa, T.; Urasaki, Y.; Ueda, T.; Enjo, F.; Tokuda, H.; Ottmann, O. G.; Maekawa, T. The third-generation bisphosphonate zoledronate synergistically augments the anti-Ph⁺ leukemia activity of imatinib mesylate. *Blood.* **2003**, *102*, 2229-2235.
47. Nogawa, M.; Yuasa, T.; Kimura, S.; Tanaka, M.; Kuroda, J.; Sato, K.; Yokota, A.; Segawa, H.; Toda, Y.; Kageyama, S.; Yoshiki, T.; Okada, Y.; Maekawa, T. Intravesical administration of small interfering RNA targeting PLK-1 successfully prevents the growth of bladder cancer. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 978-985.
48. Hideshima, T.; Mitsiades, C.; Tonon, G.; Richardson, P. G.; Anderson, K. C. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nat. Rev. Cancer.* **2007**, *7*, 585-598.
49. Hu, J.; Hu, W. X. Targeting signaling pathways in multiple myeloma: Pathogenesis and implication for treatments. *Cancer Lett.* **2018**, *414*, 214-221.
50. Chim, C. S.; Pang, R.; Fung, T. K.; Choi, C. L.; Liang, R. Epigenetic dysregulation of Wnt signaling pathway in multiple myeloma. *Leukemia.* **2007**, *21*, 2527-2536.
51. Derksen, P. W.; Tjin, E.; Meijer, H. P.; Klok, M. D.; MacGillavry, H. D.; van Oers, M. H.; Lokhorst, H. M.; Bloem, A. C.; Clevers, H.; Nusse, R.; van der Neut, R.; Spaargaren, M.; Pals, S. T. Illegitimate WNT signaling promotes proliferation of multiple myeloma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 6122-6127.
52. Sukhdeo, K.; Mani, M.; Zhang, Y.; Dutta, J.; Yasui, H.; Rooney, M. D.; Carrasco, D. E.; Zheng, M.; He, H.; Tai, Y. T.; Mitsiades, C.; Anderson, K. C.; Carrasco, D. R. Targeting the beta-catenin/TCF transcriptional complex in the treatment of multiple myeloma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 7516-7521.
53. Yao, H.; Ashihara, E.; Strovel, J. W.; Nakagawa, Y.; Kuroda, J.; Nagao, R.; Tanaka, R.; Yokota, A.; Takeuchi, M.; Hayashi, Y.; Shimazaki, C.; Taniwaki, M.; Strand, K.; Padia, J.; Hirai, H.; Kimura, S.; Maekawa, T. AV-65, a novel Wnt/beta-catenin signal inhibitor, successfully suppresses progression of multiple myeloma in a mouse model. *Blood Cancer J.* **2011**, *1*, e43.
54. Dang, C. V. MYC on the path to cancer. *Cell.* **2012**, *149*, 22-35.
55. Rahl, P. B.; Lin, C. Y.; Seila, A. C.; Flynn, R. A.; McCuine, S.; Burge, C. B.; Sharp, P. A.; Young, R. A. c-Myc regulates transcriptional pause release. *Cell.* **2010**, *141*, 432-445.
56. Holien, T.; Vatsveen, T. K.; Hella, H.; Waage, A.; Sundan, A. Addiction to c-MYC in multiple myeloma.

Blood. **2012**, 120, 2450-2453.

57. Weinhold, N.; Ashby, C.; Rasche, L.; Chavan, S. S.; Stein, C.; Stephens, O. W.; Tytarenko, R.; Bauer, M. A.; Meissner, T.; Deshpande, S.; Patel, P. H.; Buzder, T.; Molnar, G.; Peterson, E. A.; van Rhee, F.; Zangari, M.; Thanendrarajan, S.; Schinke, C.; Tian, E.; Epstein, J.; Barlogie, B.; Davies, F. E.; Heuck, C. J.; Walker, B. A.; Morgan, G. J. Clonal selection and double-hit events involving tumor suppressor genes underlie relapse in myeloma. *Blood*. **2016**, 128, 1735-1744.
58. Matsui, W.; Wang, Q.; Barber, J. P.; Brennan, S.; Smith, B. D.; Borrello, I.; McNiece, I.; Lin, L.; Ambinder, R. F.; Peacock, C.; Watkins, D. N.; Huff, C. A.; Jones, R. J. Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance. *Cancer Res*. **2008**, 68, 190-197.
59. Boucher, K.; Parquet, N.; Widen, R.; Shain, K.; Baz, R.; Alsina, M.; Koomen, J.; Anasetti, C.; Dalton, W.; Perez, L. E. Stemness of B-cell progenitors in multiple myeloma bone marrow. *Clin. Cancer Res*. **2012**, 18, 6155-6168.
60. Jakubikova, J.; Adamia, S.; Kost-Alimova, M.; Klippel, S.; Cervi, D.; Daley, J. F.; Cholujova, D.; Kong, S. Y.; Leiba, M.; Blotta, S.; Ooi, M.; Delmore, J.; Laubach, J.; Richardson, P. G.; Sedlak, J.; Anderson, K. C.; Mitsiades, C. S. Lenalidomide targets clonogenic side population in multiple myeloma: pathophysiologic and clinical implications. *Blood*. **2011**, 117, 4409-4419.
61. Kim, D.; Park, C. Y.; Medeiros, B. C.; Weissman, I. L. CD19-CD45 low/- CD38 high/CD138+ plasma cells enrich for human tumorigenic myeloma cells. *Leukemia*. **2012**, 26, 2530-2537.
62. Nara, M.; Teshima, K.; Watanabe, A.; Ito, M.; Iwamoto, K.; Kitabayashi, A.; Kume, M.; Hatano, Y.; Takahashi, N.; Iida, S.; Sawada, K.; Tagawa, H. Bortezomib reduces the tumorigenicity of multiple myeloma via downregulation of upregulated targets in clonogenic side population cells. *PLoS One*. **2013**, 8, e56954.
63. Wen, J.; Tao, W.; Kuitatse, I.; Lin, P.; Feng, Y.; Jones, R. J.; Orlowski, R. Z.; Zu, Y. Dynamic balance of multiple myeloma clonogenic side population cell percentages controlled by environmental conditions. *Int. J. Cancer*. **2015**, 136, 991-1002.
64. Yu, A. Y.; Frid, M. G.; Shimoda, L. A.; Wiener, C. M.; Stenmark, K.; Semenza, G. L. Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung. *Am. J. Physiol*. **1998**, 275, L818-826.
65. Wilson, W. R.; Hay, M. P. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*. **2011**, 11, 393-410.
66. Schito, L.; Semenza, G. L. Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression. *Trends Cancer*. **2016**, 2, 758-770.
67. McCord, A. M.; Jamal, M.; Shankavaram, U. T.; Lang, F. F.; Camphausen, K.; Tofilon, P. J. Physiologic oxygen concentration enhances the stem-like properties of CD133+ human glioblastoma cells in vitro. *Mol. Cancer Res*. **2009**, 7, 489-497.
68. Heddleston, J. M.; Li, Z.; Lathia, J. D.; Bao, S.; Hjelmeland, A. B.; Rich, J. N. Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. *Br. J. Cancer*. **2010**, 102, 789-795.
69. Hira, V. V. V.; Van Noorden, C. J. F.; Carraway, H. E.; Maciejewski, J. P.; Molenaar, R. J. Novel therapeutic

- strategies to target leukemic cells that hijack compartmentalized continuous hematopoietic stem cell niches. *Biochim. Biophys. Acta.* **2017**, 1868, 183-198.
70. Wei, Q.; Frenette, P. S. Niches for Hematopoietic Stem Cells and Their Progeny. *Immunity.* **2018**, 48, 632-648.
 71. Guitart, A. V.; Hammoud, M.; Dello Sbarba, P.; Ivanovic, Z.; Praloran, V. Slow-cycling/quiescence balance of hematopoietic stem cells is related to physiological gradient of oxygen. *Exp. Hematol.* **2010**, 38, 847-851.
 72. Ninomiya, M.; Abe, A.; Katsumi, A.; Xu, J.; Ito, M.; Arai, F.; Suda, T.; Ito, M.; Kiyoi, H.; Kinoshita, T.; Naoe, T. Homing, proliferation and survival sites of human leukemia cells in vivo in immunodeficient mice. *Leukemia.* **2007**, 21, 136-142.
 73. Saito, Y.; Uchida, N.; Tanaka, S.; Suzuki, N.; Tomizawa-Murasawa, M.; Sone, A.; Najima, Y.; Takagi, S.; Aoki, Y.; Wake, A.; Taniguchi, S.; Shultz, L. D.; Ishikawa, F. Induction of cell cycle entry eliminates human leukemia stem cells in a mouse model of AML. *Nat. Biotechnol.* **2010**, 28, 275-280.
 74. Takeuchi, M.; Kimura, S.; Kuroda, J.; Ashihara, E.; Kawatani, M.; Osada, H.; Umezawa, K.; Yasui, E.; Imoto, M.; Tsuruo, T.; Yokota, A.; Tanaka, R.; Nagao, R.; Nakahata, T.; Fujiyama, Y.; Maekawa, T. Glyoxalase-I is a novel target against Bcr-Abl⁺ leukemic cells acquiring stem-like characteristics in a hypoxic environment. *Cell Death Differ.* **2010**, 17, 1211-1220.
 75. Gandillet, A.; Park, S.; Lassailly, F.; Griessinger, E.; Vargaftig, J.; Filby, A.; Lister, T. A.; Bonnet, D. Heterogeneous sensitivity of human acute myeloid leukemia to beta-catenin down-modulation. *Leukemia.* **2011**, 25, 770-780.
 76. Yeung, J.; Esposito, M. T.; Gandillet, A.; Zeisig, B. B.; Griessinger, E.; Bonnet, D.; So, C. W. beta-Catenin mediates the establishment and drug resistance of MLL leukemic stem cells. *Cancer Cell.* **2010**, 18, 606-618.
 77. Dierks, C.; Beigi, R.; Guo, G. R.; Zirlik, K.; Stegert, M. R.; Manley, P.; Trussell, C.; Schmitt-Graeff, A.; Landwerlin, K.; Veelken, H.; Warmuth, M. Expansion of Bcr-Abl-positive leukemic stem cells is dependent on Hedgehog pathway activation. *Cancer Cell.* **2008**, 14, 238-249.
 78. Zhao, C.; Chen, A.; Jamieson, C. H.; Fereshteh, M.; Abrahamsson, A.; Blum, J.; Kwon, H. Y.; Kim, J.; Chute, J. P.; Rizzieri, D.; Munchhof, M.; VanArsdale, T.; Beachy, P. A.; Reya, T. Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature.* **2009**, 458, 776-779.
 79. Varia, M. A.; Calkins-Adams, D. P.; Rinker, L. H.; Kennedy, A. S.; Novotny, D. B.; Fowler, W. C., Jr.; Raleigh, J. A. Pimonidazole: a novel hypoxia marker for complementary study of tumor hypoxia and cell proliferation in cervical carcinoma. *Gynecol. Oncol.* **1998**, 71, 270-277.
 80. Hayashi, Y.; Hirai, H.; Kamio, N.; Yao, H.; Yoshioka, S.; Miura, Y.; Ashihara, E.; Fujiyama, Y.; Tenen, D. G.; Maekawa, T. C/EBPbeta promotes BCR-ABL-mediated myeloid expansion and leukemic stem cell exhaustion. *Leukemia.* **2013**, 27, 619-628.
 81. Hosen, N. Multiple myeloma-initiating cells. *Int. J. Hematol.* **2013**, 97, 306-312.
 82. Van Valckenborgh, E.; Matsui, W.; Agarwal, P.; Lub, S.; Dehui, X.; De Bruyne, E.; Menu, E.; Empsen, C.;

- van Grunsven, L.; Agarwal, J.; Wang, Q.; Jernberg-Wiklund, H.; Vanderkerken, K. Tumor-initiating capacity of CD138- and CD138+ tumor cells in the 5T33 multiple myeloma model. *Leukemia*. **2012**, *26*, 1436-1439.
83. Taswell, C. Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies. I. Data analysis. *J. Immunol.* **1981**, *126*, 1614-1619.
84. Goodell, M. A.; Brose, K.; Paradis, G.; Conner, A. S.; Mulligan, R. C. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J. Exp. Med.* **1996**, *183*, 1797-1806.
85. Wang, Y.; Krivtsov, A. V.; Sinha, A. U.; North, T. E.; Goessling, W.; Feng, Z.; Zon, L. I.; Armstrong, S. A. The Wnt/beta-catenin pathway is required for the development of leukemia stem cells in AML. *Science*. **2010**, *327*, 1650-1653.
86. Chapman, M. A.; Lawrence, M. S.; Keats, J. J.; Cibulskis, K.; Sougnez, C.; Schinzel, A. C.; Harview, C. L.; Brunet, J. P.; Ahmann, G. J.; Adli, M.; Anderson, K. C.; Ardlie, K. G.; Auclair, D.; Baker, A.; Bergsagel, P. L.; Bernstein, B. E.; Drier, Y.; Fonseca, R.; Gabriel, S. B.; Hofmeister, C. C.; Jagannath, S.; Jakubowiak, A. J.; Krishnan, A.; Levy, J.; Liefeld, T.; Lonial, S.; Mahan, S.; Mfuko, B.; Monti, S.; Perkins, L. M.; Onofrio, R.; Pugh, T. J.; Rajkumar, S. V.; Ramos, A. H.; Siegel, D. S.; Sivachenko, A.; Stewart, A. K.; Trudel, S.; Vij, R.; Voet, D.; Winckler, W.; Zimmerman, T.; Carpten, J.; Trent, J.; Hahn, W. C.; Garraway, L. A.; Meyerson, M.; Lander, E. S.; Getz, G.; Golub, T. R. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*. **2011**, *471*, 467-472.
87. Lohr, J. G.; Stojanov, P.; Carter, S. L.; Cruz-Gordillo, P.; Lawrence, M. S.; Auclair, D.; Sougnez, C.; Knoechel, B.; Gould, J.; Saksena, G.; Cibulskis, K.; McKenna, A.; Chapman, M. A.; Straussman, R.; Levy, J.; Perkins, L. M.; Keats, J. J.; Schumacher, S. E.; Rosenberg, M.; Multiple Myeloma Research, Consortium; Getz, G.; Golub, T. R. Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer Cell*. **2014**, *25*, 91-101.
88. Murayama, A.; Matsuzaki, Y.; Kawaguchi, A.; Shimazaki, T.; Okano, H. Flow cytometric analysis of neural stem cells in the developing and adult mouse brain. *J. Neurosci. Res.* **2002**, *69*, 837-847.
89. Reynolds, S. D.; Shen, H.; Reynolds, P. R.; Betsuyaku, T.; Pilewski, J. M.; Gambelli, F.; Di Giuseppe, M.; Ortiz, L. A.; Stripp, B. R. Molecular and functional properties of lung SP cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2007**, *292*, L972-983.
90. Hussain, S. Z.; Strom, S. C.; Kirby, M. R.; Burns, S.; Langemeijer, S.; Ueda, T.; Hsieh, M.; Tisdale, J. F. Side population cells derived from adult human liver generate hepatocyte-like cells in vitro. *Dig. Dis. Sci.* **2005**, *50*, 1755-1763.
91. Hadnagy, A.; Gaboury, L.; Beaulieu, R.; Balicki, D. SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations. *Exp. Cell Res.* **2006**, *312*, 3701-3710.
92. Hung, S. P.; Yang, M. H.; Tseng, K. F.; Lee, O. K. Hypoxia-induced secretion of TGF-beta1 in mesenchymal stem cell promotes breast cancer cell progression. *Cell Transplant.* **2013**, *22*, 1869-1882.
93. Furuta, C.; Miyamoto, T.; Takagi, T.; Noguchi, Y.; Kaneko, J.; Itoh, S.; Watanabe, T.; Itoh, F. Transforming growth factor-beta signaling enhancement by long-term exposure to hypoxia in a tumor microenvironment

- composed of Lewis lung carcinoma cells. *Cancer Sci.* **2015**, 106, 1524-1533.
94. Akman, H. O.; Zhang, H.; Siddiqui, M. A.; Solomon, W.; Smith, E. L.; Batuman, O. A. Response to hypoxia involves transforming growth factor-beta2 and Smad proteins in human endothelial cells. *Blood.* **2001**, 98, 3324-3331.
 95. Zhang, H.; Akman, H. O.; Smith, E. L.; Zhao, J.; Murphy-Ullrich, J. E.; Batuman, O. A. Cellular response to hypoxia involves signaling via Smad proteins. *Blood.* **2003**, 101, 2253-2260.
 96. Zhang, H.; Wu, H.; Zheng, J.; Yu, P.; Xu, L.; Jiang, P.; Gao, J.; Wang, H.; Zhang, Y. Transforming growth factor beta1 signal is crucial for dedifferentiation of cancer cells to cancer stem cells in osteosarcoma. *Stem Cells.* **2013**, 31, 433-446.
 97. Nagpal, N.; Ahmad, H. M.; Chameettachal, S.; Sundar, D.; Ghosh, S.; Kulshreshtha, R. HIF-inducible miR-191 promotes migration in breast cancer through complex regulation of TGFbeta-signaling in hypoxic microenvironment. *Sci. Rep.* **2015**, 5, 9650.
 98. Burnet, M. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br. Med. J.* **1957**, 1, 779-786.
 99. Schreiber, R. D.; Old, L. J.; Smyth, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science.* **2011**, 331, 1565-1570.
 100. Kabelitz, D.; Wesch, D.; Pitters, E.; Zoller, M. Potential of human gammadelta T lymphocytes for immunotherapy of cancer. *Int. J. Cancer.* **2004**, 112, 727-732.
 101. Gober, H. J.; Kistowska, M.; Angman, L.; Jenö, P.; Mori, L.; De Libero, G. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J. Exp. Med.* **2003**, 197, 163-168.
 102. Tanaka, Y.; Morita, C. T.; Tanaka, Y.; Nieves, E.; Brenner, M. B.; Bloom, B. R. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature.* **1995**, 375, 155-158.
 103. Kato, Y.; Tanaka, Y.; Tanaka, H.; Yamashita, S.; Minato, N. Requirement of species-specific interactions for the activation of human gamma delta T cells by pamidronate. *J. Immunol.* **2003**, 170, 3608-3613.
 104. Sato, K.; Kimura, S.; Segawa, H.; Yokota, A.; Matsumoto, S.; Kuroda, J.; Nogawa, M.; Yuasa, T.; Kiyono, Y.; Wada, H.; Maekawa, T. Cytotoxic effects of gammadelta T cells expanded ex vivo by a third generation bisphosphonate for cancer immunotherapy. *Int. J. Cancer.* **2005**, 116, 94-99.
 105. Uchida, R.; Ashihara, E.; Sato, K.; Kimura, S.; Kuroda, J.; Takeuchi, M.; Kawata, E.; Taniguchi, K.; Okamoto, M.; Shimura, K.; Kiyono, Y.; Shimazaki, C.; Taniwaki, M.; Maekawa, T. Gamma delta T cells kill myeloma cells by sensing mevalonate metabolites and ICAM-1 molecules on cell surface. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, 354, 613-618.
 106. Mattarollo, S. R.; Kenna, T.; Nieda, M.; Nicol, A. J. Chemotherapy and zoledronate sensitize solid tumour cells to Vgamma9Vdelta2 T cell cytotoxicity. *Cancer Immunol. Immunother.* **2007**, 56, 1285-1297.
 107. Yuasa, T.; Sato, K.; Ashihara, E.; Takeuchi, M.; Maita, S.; Tsuchiya, N.; Habuchi, T.; Maekawa, T.; Kimura, S. Intravesical administration of gammadelta T cells successfully prevents the growth of bladder cancer in the murine model. *Cancer Immunol. Immunother.* **2009**, 58, 493-502.
 108. Shimizu, T.; Tomogane, M.; Miyashita, M.; Ukimura, O.; Ashihara, E. Low dose gemcitabine increases the

- cytotoxicity of human Vgamma9Vdelta2 T cells in bladder cancer cells in vitro and in an orthotopic xenograft model. *Oncoimmunology*. **2018**, 7, e1424671.
109. Abe, Y.; Muto, M.; Nieda, M.; Nakagawa, Y.; Nicol, A.; Kaneko, T.; Goto, S.; Yokokawa, K.; Suzuki, K. Clinical and immunological evaluation of zoledronate-activated Vgamma9gammadelta T-cell-based immunotherapy for patients with multiple myeloma. *Exp. Hematol*. **2009**, 37, 956-968.
110. Kobayashi, H.; Tanaka, Y.; Yagi, J.; Minato, N.; Tanabe, K. Phase I/II study of adoptive transfer of gammadelta T cells in combination with zoledronic acid and IL-2 to patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother*. **2011**, 60, 1075-1084.
111. Nakajima, J.; Murakawa, T.; Fukami, T.; Goto, S.; Kaneko, T.; Yoshida, Y.; Takamoto, S.; Kakimi, K. A phase I study of adoptive immunotherapy for recurrent non-small-cell lung cancer patients with autologous gammadelta T cells. *Eur. J. Cardiothorac. Surg*. **2010**, 37, 1191-1197.
112. Nicol, A. J.; Tokuyama, H.; Mattarollo, S. R.; Hagi, T.; Suzuki, K.; Yokokawa, K.; Nieda, M. Clinical evaluation of autologous gamma delta T cell-based immunotherapy for metastatic solid tumours. *Br. J. Cancer*. **2011**, 105, 778-786.
113. Wada, I.; Matsushita, H.; Noji, S.; Mori, K.; Yamashita, H.; Nomura, S.; Shimizu, N.; Seto, Y.; Kakimi, K. Intraperitoneal injection of in vitro expanded Vgamma9Vdelta2 T cells together with zoledronate for the treatment of malignant ascites due to gastric cancer. *Cancer medicine*. **2014**, 3, 362-375.
114. Bennouna, J.; Bompas, E.; Neidhardt, E. M.; Rolland, F.; Philip, I.; Galea, C.; Salot, S.; Saiagh, S.; Audrain, M.; Rimbart, M.; Lafaye-de Micheaux, S.; Tiollier, J.; Negrier, S. Phase-I study of Innacell gammadelta, an autologous cell-therapy product highly enriched in gamma9delta2 T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother*. **2008**, 57, 1599-1609.
115. Aoki, T.; Matsushita, H.; Hoshikawa, M.; Hasegawa, K.; Kokudo, N.; Kakimi, K. Adjuvant combination therapy with gemcitabine and autologous gammadelta T-cell transfer in patients with curatively resected pancreatic cancer. *Cytotherapy*. **2017**, 19, 473-485.
116. Noguchi, A.; Kaneko, T.; Kamigaki, T.; Fujimoto, K.; Ozawa, M.; Saito, M.; Ariyoshi, N.; Goto, S. Zoledronate-activated Vgamma9gammadelta T cell-based immunotherapy is feasible and restores the impairment of gammadelta T cells in patients with solid tumors. *Cytotherapy*. **2011**, 13, 92-97.
117. Sumi, E.; Sugie, T.; Yoshimura, K.; Tada, H.; Ikeda, T.; Suzuki, E.; Tanaka, Y.; Teramukai, S.; Shimizu, A.; Toi, M.; Minato, N. Effects of zoledronic acid and the association between its efficacy and gammadelta T cells in postmenopausal women with breast cancer treated with preoperative hormonal therapy: a study protocol. *J. Transl. Med*. **2014**, 12, 310.
118. Pressey, J. G.; Adams, J.; Harkins, L.; Kelly, D.; You, Z.; Lamb, L. S., Jr. In vivo expansion and activation of gammadelta T cells as immunotherapy for refractory neuroblastoma: A phase 1 study. *Medicine (Baltimore)*. **2016**, 95, e4909.
119. Janasek, D.; Franzke, J.; Manz, A. Scaling and the design of miniaturized chemical-analysis systems. *Nature*. **2006**, 442, 374-380.
120. Kovarik, M. L.; Gach, P. C.; Ornoff, D. M.; Wang, Y.; Balowski, J.; Farrag, L.; Allbritton, N. L. Micro total

- analysis systems for cell biology and biochemical assays. *Anal. Chem.* **2012**, 84, 516-540.
121. Ohno, K.; Tachikawa, K.; Manz, A. Microfluidics: applications for analytical purposes in chemistry and biochemistry. *Electrophoresis.* **2008**, 29, 4443-4453.
122. Munaka, T.; Abe, H.; Kanai, M.; Sakamoto, T.; Nakanishi, H.; Shoji, S.; Kimura, S.; Maekawa, T.; Murakami, A. Real-time monitoring of antibody secretion from B-cells on a microchip stimulated with a minute amount of mitogen. *Analyst.* **2007**, 132, 512-514.
123. Benzaid, I.; Monkkinen, H.; Stresing, V.; Bonnelye, E.; Green, J.; Monkkinen, J.; Touraine, J. L.; Clezardin, P. High phosphoantigen levels in bisphosphonate-treated human breast tumors promote Vgamma9Vdelta2 T-cell chemotaxis and cytotoxicity in vivo. *Cancer Res.* **2011**, 71, 4562-4572.
124. Mohan, K.; Ding, Z.; Hanly, J.; Issekutz, T. B. IFN-gamma-inducible T cell alpha chemoattractant is a potent stimulator of normal human blood T lymphocyte transendothelial migration: differential regulation by IFN-gamma and TNF-alpha. *J. Immunol.* **2002**, 168, 6420-6428.
125. Henneman, L.; van Cruchten, A. G.; Denis, S. W.; Amolins, M. W.; Placzek, A. T.; Gibbs, R. A.; Kulik, W.; Waterham, H. R. Detection of nonsterol isoprenoids by HPLC-MS/MS. *Anal. Biochem.* **2008**, 383, 18-24.
126. Frevert, C. W.; Boggy, G.; Keenan, T. M.; Folch, A. Measurement of cell migration in response to an evolving radial chemokine gradient triggered by a microvalve. *Lab Chip.* **2006**, 6, 849-856.
127. Clendening, J. W.; Pandyra, A.; Boutros, P. C.; El Ghamrasni, S.; Khosravi, F.; Trentin, G. A.; Martirosyan, A.; Hakem, A.; Hakem, R.; Jurisica, I.; Penn, L. Z. Dysregulation of the mevalonate pathway promotes transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, 107, 15051-15056.
128. Freed-Pastor, W. A.; Mizuno, H.; Zhao, X.; Langerod, A.; Moon, S. H.; Rodriguez-Barrueco, R.; Barsotti, A.; Chicas, A.; Li, W.; Polotskaia, A.; Bissell, M. J.; Osborne, T. F.; Tian, B.; Lowe, S. W.; Silva, J. M.; Borresen-Dale, A. L.; Levine, A. J.; Bargonetti, J.; Prives, C. Mutant p53 disrupts mammary tissue architecture via the mevalonate pathway. *Cell.* **2012**, 148, 244-258.
129. Palumbo, A.; Bringhen, S.; Bruno, B.; Falcone, A. P.; Liberati, A. M.; Grasso, M.; Ria, R.; Pisani, F.; Cangialosi, C.; Caravita, T.; Levi, A.; Meloni, G.; Nozza, A.; Pregno, P.; Gabbas, A.; Callea, V.; Rizzo, M.; Annino, L.; De Stefano, V.; Musto, P.; Baldi, I.; Cavallo, F.; Petrucci, M. T.; Massaia, M.; Boccadoro, M. Melphalan 200 mg/m² versus melphalan 100 mg/m² in newly diagnosed myeloma patients: a prospective, multicenter phase 3 study. *Blood.* **2010**, 115, 1873-1879.
130. Kumar, S. K.; Dispenzieri, A.; Lacy, M. Q.; Gertz, M. A.; Buadi, F. K.; Pandey, S.; Kapoor, P.; Dingli, D.; Hayman, S. R.; Leung, N.; Lust, J.; McCurdy, A.; Russell, S. J.; Zeldenrust, S. R.; Kyle, R. A.; Rajkumar, S. V. Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia.* **2014**, 28, 1122-1128.

Supplementary information

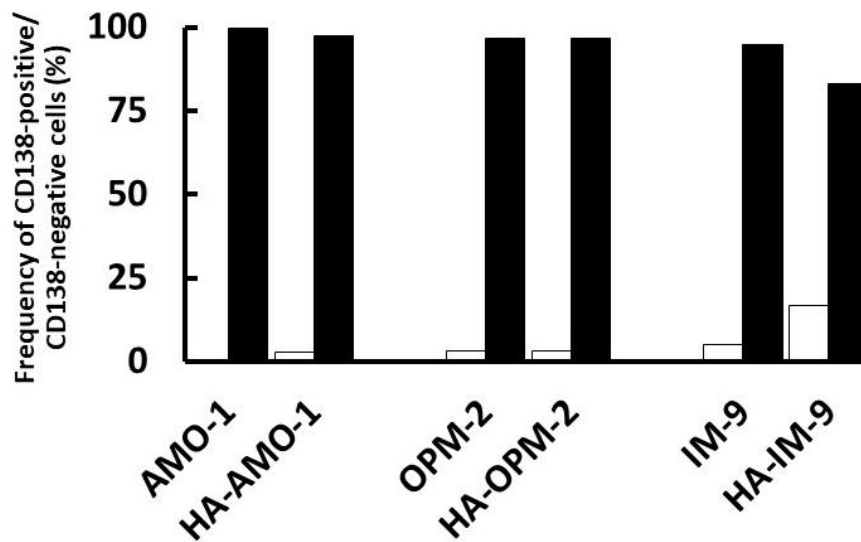
低酸素環境適応多発性骨髄腫細胞の
シグナル伝達経路を標的とする治療戦略の探索

2018年度

京都薬科大学 論文博士学位論文

芦原 英司

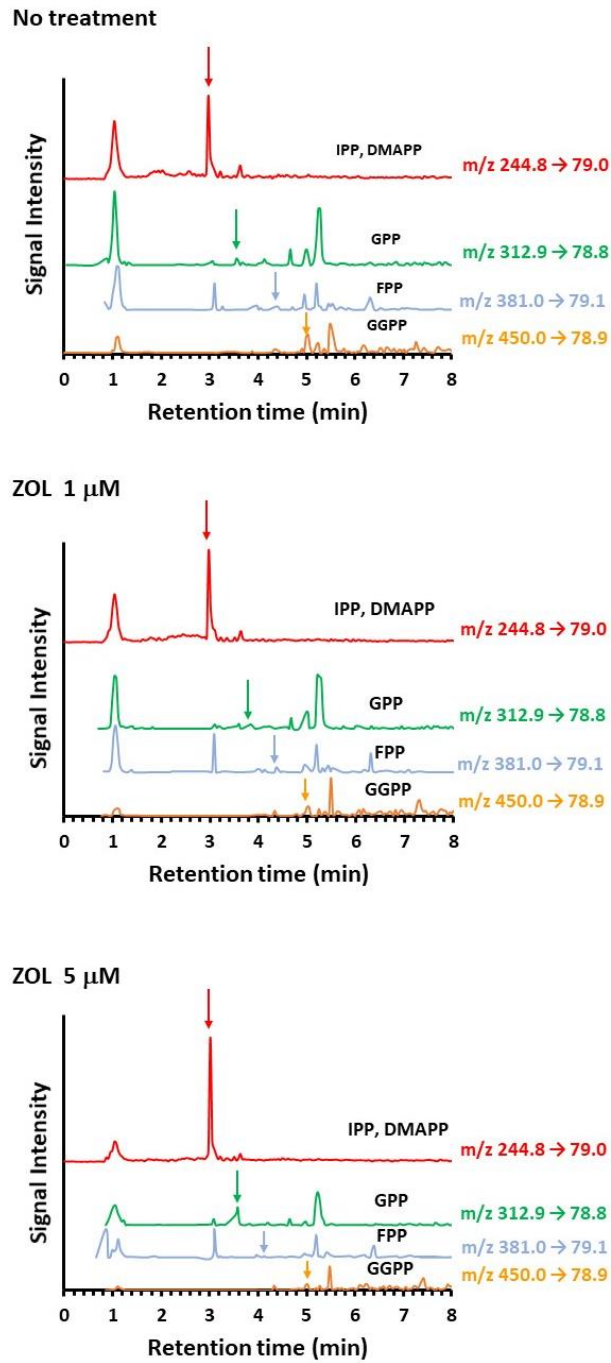
Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 1 Flow cytometric analysis of CD138 expression in parental and HA-MM cells. Flow cytometric analysis of CD138 expression in parental and HA-MM cells. The results are representative of three independent experiments. White and black bars show CD138-negative cells and CD138-positive cells, respectively. Elsevier permitted to use this figure for thesis.

Nakagawa, Y., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **496**, 490-496 (2018)

Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 2 High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry spectrogram of RPMI8226 cell conditioned medium. IPP, isopentenylpyrophosphate; DMAPP, dimethylallylpyrophosphate; GPP, geranylpyrophosphate; FPP, farnesylpyrophosphate; GGPP, geranylgeranylpyrophosphate