

氏名 (生年月日) あし ほん えい し (1962年3月25日)
芦原英司

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 論博薬 第213号

学位授与の日付 2019年3月16日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

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

論文審査委員 (主査) 教授 赤路 健一

(副査) 教授 田中 智之

(副査) 教授 中田 徹男

論文内容の要旨

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る方法として、 $\gamma\delta$ T 細胞を用いたがん免疫細胞療法との併用が考えられる。そこで、本細胞療法の実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ることが示唆された。

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。

論文審査の結果の要旨

《緒言》

多発性骨髄腫 (Multiple myeloma; MM) は抗体産生細胞が腫瘍性に増殖した造血器腫瘍の一つである。ボルテゾミブやサリドマイド、新規分子標的治療薬の登場などにより治療成績は改善されつつあるが、根治できる症例はごく一部に限られる。一般に、悪性腫瘍の根治が困難である理由の一つとして、がん幹細胞 (Cancer stem cell; CSC) による再発がある。CSC は、酸素濃度 1%以下の低酸素環境に存在すると考えられており、この CSC 駆逐に有効な治療薬の開発は、がん根治のための喫緊の課題である。本研究では、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、そのシグナル伝達経路を標的とする治療戦略を検討した。

《審査結果の要旨》

(1) β -Catenin の新規標的分子としての有用性

申請者は、多くのがん種の CSC の維持・増殖に関わっている Wnt/ β -catenin 経路に着目し、本経路のシグナル伝達を担う β -catenin を標的とする MM 治療薬の可能性を検討した。まず、健常人の形質細胞に比べ、MM 細胞では β -catenin が高発現していることを確認した。ついで、ヒト MM 細胞株 RPMI8226 細胞をヌードマウスの皮下に移植して作製した異所性 MM 担がんマウスに β -catenin siRNA を連日腫瘍局所に投与することで、MM の増殖を有意に抑制できることを見出した。

(2) HA-MM 細胞の性状解析

上記結果を受け、MM 幹細胞に近い性状を有する細胞株を用いた治療標的の探索を行った。まず、非致死量放射線照射を施した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 担がんマウスを作成した。ついで、マウス骨髄内に生着した AMO-1 細胞から、1%酸素濃度下で6か月以上生存可能な HA-MM 細胞株を樹立した。本 HA-MM 細胞は元の MM 細胞より造腫瘍能や腫瘍再構築能が高く、幹細胞マーカーも高発現していた。しかし、HA-MM 細胞中の β -catenin 発現量は元の MM 細胞と大きく相違していなかった。そこで、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。さらに、TGF- β /Smad 経路阻害剤

投与により、HA-MM 細胞では休止期の細胞分画が減少することや自己複製能が低下する事を認めた。これらのことから、TGF- β /Smad 経路が MM 幹細胞の治療標的となりうる事が示唆された。

(3) MM 細胞の分泌する $\gamma\delta$ T 細胞遊走因子の応用

ついで、MM 治療薬の効果を増強させるため、がん免疫細胞療法の併用を検討した。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り、数種の MM 細胞に高い抗腫瘍効果を発揮することが知られている。申請者はまず、少数の細胞の挙動を観察できるマイクロチャンバーを用いて MM 細胞から $\gamma\delta$ T 細胞遊走因子が分泌されていることを確認した。さらに、メバロン酸代謝経路の中間産物であるイソペンテルピロリン酸 (IPP) に着目し、IPP が濃度依存的に $\gamma\delta$ T 細胞の遊走速度を増加させることを見出した。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事が示唆された。

《結論》

本研究により、Wnt/ β -catenin 経路が MM の治療標的になり得ること、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できる可能性が示唆された。これらの研究成果は、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。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士 (薬学) の学位論文としての価値を有するものと判断する。