

2022年5月23日

報道関係者各位

慶應義塾大学
東京医科大学

治療抵抗性多発性骨髄腫細胞が分泌する細胞外小胞によって 薬剤感受性株が薬剤耐性を獲得することを発見

—長期使用すると薬が効かなくなる仕組みの1つを解明—

慶應義塾大学（塾長：伊藤 公平／東京都港区）薬学部病態生理学講座の服部豊教授、東京医科大学（学長：林 由起子／東京都新宿区）医学総合研究所分子細胞治療研究部門の落谷孝広教授と山元智史助教（特任）、分子病理学分野の黒田雅彦主任教授、国立がん研究センター病態情報学ユニットの山本雄介の研究グループは、薬剤に耐性となった多発性骨髄腫細胞から分泌される細胞外小胞（Extracellular Vesicles: 以下 EV）が薬剤感受性を持つ細胞に取り込まれることで新たに薬剤感受性株に薬剤耐性を獲得させることを報告しました。

多発性骨髄腫は造血器腫瘍の一つであり、2000年代になり、新規治療薬が次々と承認され、患者さんの予後は大きく改善しました。とくにレナリドミドは多くの患者さんが使用する治療薬ですが、薬剤の長期使用によって生じる治療抵抗性は臨床的問題となっています。これまでわかっていたレナリドミド抵抗性のメカニズムとして、その直接の標的分子であるセレブロン[®]の発現低下や遺伝子変異が報告されてきました。今回、EVを介して、治療抵抗性が耐性細胞から感受性細胞に伝播する新しい薬剤耐性化機構を発見しました。今後、多発性骨髄腫細胞に対するEV分泌阻害剤などの開発が進み、EV分泌抑制による治療抵抗性を予防する新たな多発性骨髄腫治療戦略の開発に繋がるものと期待されます。

この研究成果は、米国血液学会誌「*Blood*」の姉妹誌である「*Blood Advances*」(2020年度 IF = 6.69)に掲載されました。

1. 本研究のポイント

- ・レナリドミド耐性株ではEVの分泌が増加しており、細胞接着能が強くなっていることを発見しました。
- ・レナリドミド耐性株由来のEVをレナリドミド感受性株に添加することによって、感受性株が新たにレナリドミド抵抗性を獲得することを発見しました。
- ・レナリドミド耐性株において、EV分泌を促進させる遺伝子として *SORT1*、*LAMP2* 遺伝子を同定しました。
- ・骨髄腫検体を用いたデータベースの再解析より、*SORT1*、*LAMP2* 遺伝子の高発現症例は予後不良であることが明らかになりました。

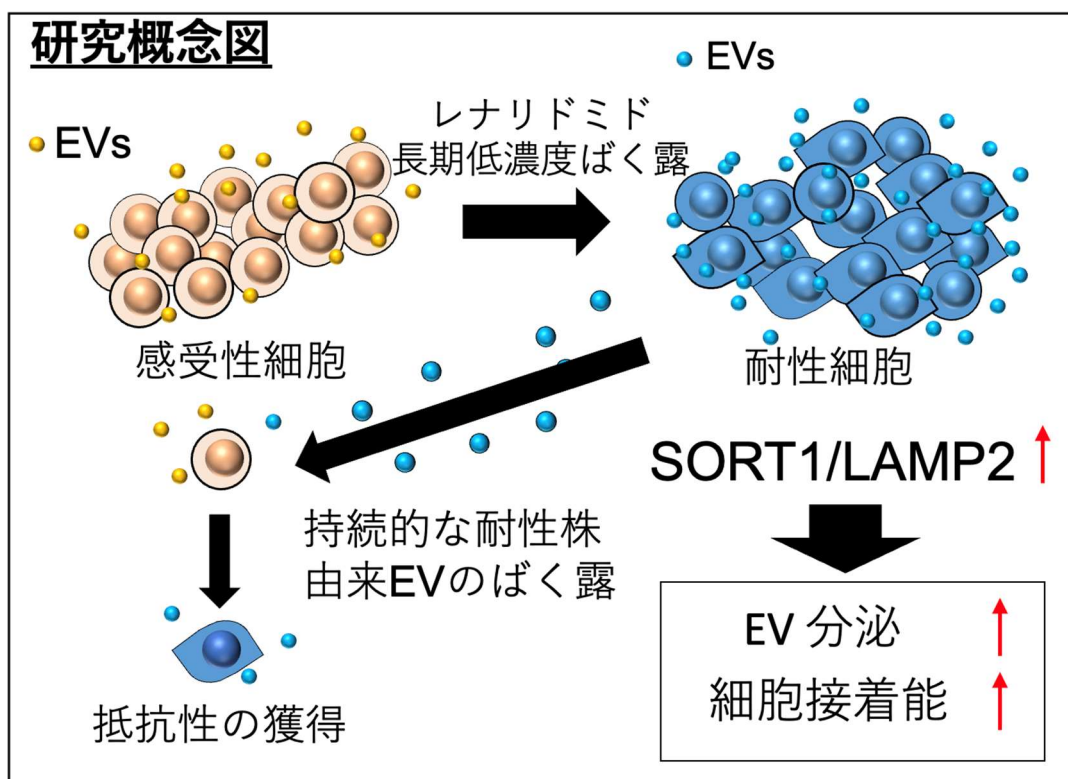


図 1. 研究概念図

本研究により、多発性骨髄腫細胞株は治療薬であるレナリドミドに長期ばく露することで EV 分泌が亢進し、新たに感受性株が耐性能を獲得することを発見しました。また、その EV 分泌を亢進させる遺伝子として、*SORT1*、*LAMP2*を同定しました。

2. 背景

EV は約 100 nm 前後の細胞外に分泌される小胞であり、脂質二重膜の安定的な構造の中に DNA、RNA、タンパク質など多くの物質を内包しています。EV は組織修復や再生、疾患の発症や進展など、多くの機能や病態に関与することが知られており、薬剤耐性についても大きな役割を果たすことがわかっています。

一方、多発性骨髄腫は、形質細胞が多段階の遺伝子変異を獲得することでがん化した造血器腫瘍です。2000 年代に、レナリドミドなどの免疫調節薬、プロテアソーム阻害薬、抗体医薬などの開発により多発性骨髄腫の予後は大きく改善されてきました。しかし、治療薬に長期間曝されることにより治療薬に対する耐性を獲得することが問題となっています。特に、免疫調節薬に対する薬剤耐性獲得は、多発性骨髄腫治療において深刻な問題であるが、その耐性化機構については完全には明らかになっていません。

研究チームは樹立されたレナリドミド耐性株において EV の分泌量が増加していることから、新たに EV を介した細胞間相互作用によるレナリドミド耐性化機構が存在すると考えました。

3. 研究手法・成果

(1). レナリドミド耐性株で細胞接着能や EV の分泌量が亢進していることを発見

慶應義塾大学薬学部病態生理学講座が所有するレナリドミド耐性株は親株である KMS21、KMS27、KMS34 に対してレナリドミドを長期低濃度でばく露させることで樹立した細胞株です (KMSR21R、KMSR27R、KMSR34R) (Hattori, et al., Int J Hematol., 2022)。特徴として、培養ディッシュへの接着を示します(図 2A)。また、超遠心法*1 で回収した EV を nanoparticle tracking analysis(NTA 法)*2 でその粒子数を計測したところ、親株と比較して耐性株では分泌される EV の量が多いことが明らかとなりました(図 2B)。

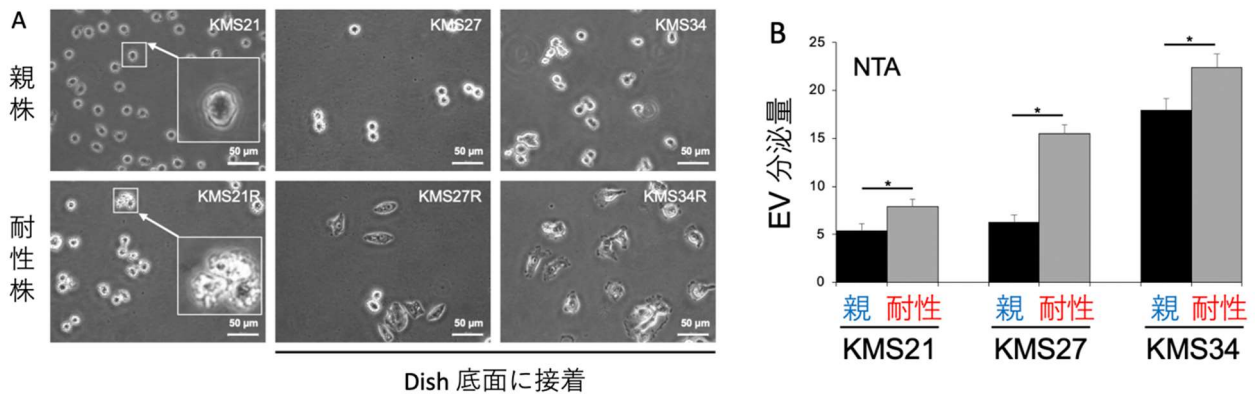


図 2. 樹立されたレナリドミド耐性株の特徴

親株とレナリドミド耐性株の顕微鏡写真(A)と EV 分泌量の比較(B)

(2). 共培養法による耐性株由来 EV の感受性株への影響の検討

次に耐性株で増加した EV がレナリドミドに感受性を持つ親株に与える影響を共培養法によって検討しました。トランズウェルという細胞を培養する容器の上部に耐性株を、下に親株を入れます。上下は $0.4 \mu m$ という小さな孔の開いた膜で隔てられています。 $0.4 \mu m$ という大きさは、EV は通過することが可能であるが、細胞などは通さないため、EV の作用・効果を確認するためによく用いられます(図 3A)。共培養の結果、親株である KMS21 細胞は、それぞれの耐性株と共培養することで細胞接着能が亢進し、薬剤感受性が低下することが明らかとなりました(図 3B)。

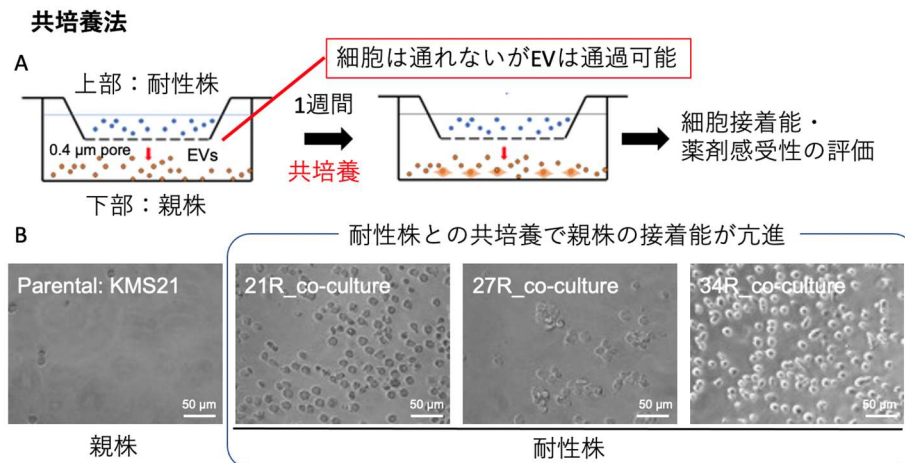


図 3. 共培養法による耐性株由来 EV の親株への影響の検討

(A) 共培養法の略図、(B) 耐性株と共培養後の KMS21 細胞株の顕微鏡写真

(3). 耐性株において EV を分泌亢進させている遺伝子 *SORT1*、*LAMP2* の同定

耐性株由来の EV が親株の薬剤耐性に影響することが明らかとなったので、実際にその薬剤耐性を制御する遺伝子の探索を行うために、6種類の細胞株、KMS21、KMS27、KMS34、KMS21R、KMS27R、KMS34R について RNA シークエンス^{*3}を行ない、耐性株で変動する遺伝子の発現量解析をしました。基準として、耐性株と親株における遺伝子発現を比較し、耐性株で発現が 1.5 倍以上、かつ、p 値^{*4}が 0.01 以下の遺伝子を 118 個選び、さらに文献調査により EV の分泌に重要なエンドソームなどに関連する遺伝子として 13 個の遺伝子を抽出しました。これら 13 遺伝子を siRNA^{*5}によって、遺伝子のノックダウン実験を行いました(図 4A)。この際、ノックダウンによってレナリドミドの感受性が回復した 8 個の遺伝子に対して、ExoScreen 法^{*6}による EV 分泌量の低下を確認しました。最終的にレナリドミド耐性細胞株において EV 分泌を亢進させる責任遺伝子として *SORT1* と *LAMP2* という 2 つの遺伝子を同定しました(図 4B)。

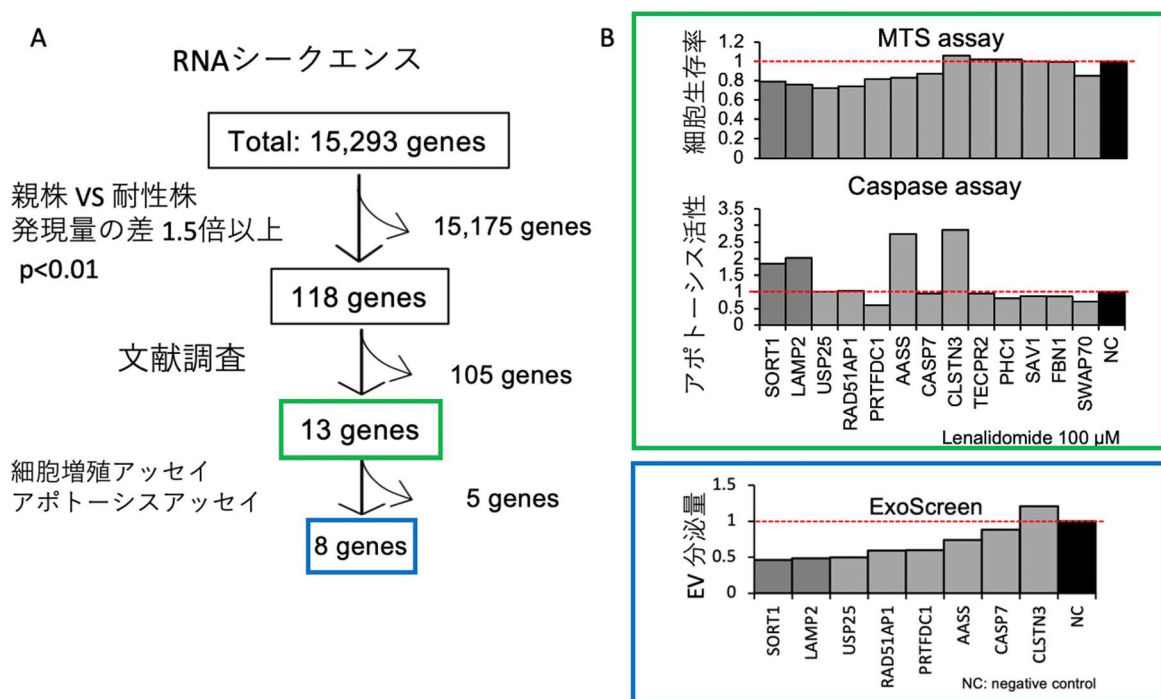


図 4. 耐性株で EV 分泌を制御する遺伝子の探索

(A) 本検討での遺伝子選択基準、概要 (B) レナリドミド存在化での細胞生存率、アポトーシス活性の測定(上)、ExoScreen 法による EV 分泌量(下)

(4). 臨床検体における *SORT1*、*LAMP2* 発現の意義の検討

最後に、*SORT1* と *LAMP2* 遺伝子の臨床的意義を検討するため、公共のデータベースを利用した予後解析を行ないました。レナリドミド治療を行なった患者検体群の臨床試験データセットでは、*SORT1* と *LAMP2* の高発現患者では、全生存期間、及び、無増悪生存期間が短かった。このことから、*SORT1*、*LAMP2* の高発現は予後を示すマーカーとなる可能性が示唆されました(図 5)。

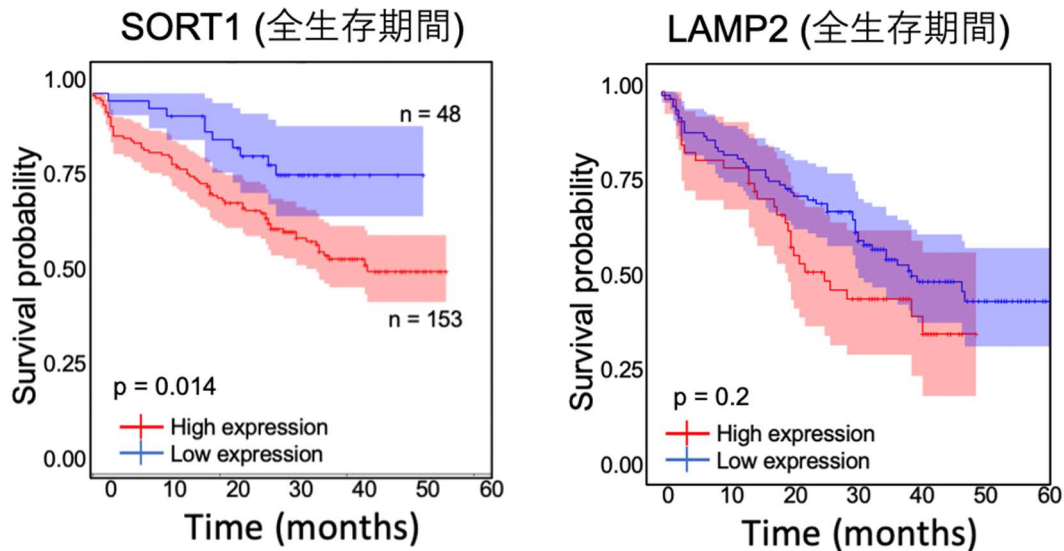


図 5. レナリドミド治療を受けた患者群における *SORT1*、*LAMP2* 発現と全生存期間の相関性の検討

4. 結論

本研究結果より、多発性骨髄腫における免疫調節薬の耐性化機構に EV が関与することが明らかとなりました。本研究では耐性株由来の EV が感受性株に耐性能を与えることを示しましたが、まだどのように耐性株で *SORT1*、*LAMP2* 遺伝子の発現が上昇するのか、その機序は解明できていません。現在、この耐性株における *SORT1*、*LAMP2* 遺伝子の発現亢進機構の解明に取り組んでいます。今後、多発性骨髄腫細胞に対する EV 分泌阻害剤などの開発が進むことで、既存の多発性骨髄腫治療に加えて、EV 分泌阻害剤を併用することが、治療に抵抗性を持たないように治療を続けるといった新たな多発性骨髄腫治療戦略の開発に繋がるものと期待しています。

5. 特記事項

本研究は、日本医療研究開発機構 (AMED) の課題番号 19ck0106366h0003、JP18ae0101011、慶應義塾大学 2020 年度潮田記念基金による博士課程学生研究支援プログラム、日本骨髄腫患者の会 2020 年度多発性骨髄腫研究助成金の支援を受けて実施されました。本研究に使用した耐性株の樹立については 2020 年度科学研究費助成事業(# 20K08763)により支援を受けました。

6. 論文情報

掲載雑誌： Blood Advances

論文タイトル： *SORT1/LAMP2*-mediated extracellular vesicle secretion and cell adhesion are linked to lenalidomide resistance in multiple myeloma.

著者： Tomofumi Yamamoto, Jun Nakayama, Yusuke Yamamoto, Masahiko Kuroda, Yutaka Hattori*, Takahiro Ochiya*

著者 (日本語表記)： 山元智史、中山淳、山本雄介、黒田雅彦、服部豊、落谷孝広

*服部豊、落谷孝広 (責任著者)

DOI: 10.1182/bloodadvances.2021005772.

<脚注、用語説明>

- *1. 超遠心法: エクソソームの現時点での最も標準的な回収方法。
- *2. nanoparticle tracking analysis 法: 回収した EV で粒子のブラウン運動などをもとに、溶液中の EV の粒子数を計測する方法。
- *3. RNA シークエンス: 次世代シーケンサーを駆使したトランスクリプトーム解析を実施するための実験手法。細胞中に含まれる RNA を網羅的かつ定量的にその量や種類を決定する方法。
- *4. p 値: データより発見された事が誤りである確率のこと。A が B を引き起こすという事に関する p 値は、A と B が完全に独立であるという仮定（帰無仮説）のもとで、得られた観測データより極端なものが得られる確率として計算されるもの。一般的にその p 値が 0.05 より低い場合、有意な差があると判定する。
- *5. siRNA: 標的となる mRNA の一部と同じ塩基配列を持つ“短い 2 本鎖 RNA” (short interfering RNA)。siRNA は特定の mRNA を効率よく分解する。
- *6. ExoScreen 法: EV 表面上のマーカータンパク質をビーズで標識することで、精製過程なしで EV を定量する方法。

※ご取材の際には、事前に下記までご一報くださいますようお願い申し上げます。

※本リリースは文部科学記者会、科学記者会、各社科学部等に送信させていただいております。

<本研究に関するお問い合わせ先>

慶應義塾大学薬学部病態生理学講座
教授 服部 豊 (はっとり ゆたか)

TEL : 03-5400-2672

Email : skc-shien@adst.keio.ac.jp

東京医科大学医学総合研究所分子細胞治療研究部門

教授 落谷 孝広 (おちや たかひろ)

TEL : 03-3342-6111

Email : tochiya@tokyo-med.ac.jp

<本発表資料のお問い合わせ先>

慶應義塾広報室 (若原)

TEL : 03-5427-1541 FAX : 03-5441-7640

Email : m-pr@adst.keio.ac.jp <https://www.keio.ac.jp/>

学校法人東京医科大学 企画部 広報・社会連携推進室

TEL : 03-3351-6141

Email : d-koho@tokyo-med.ac.jp