

## 多発性骨髄腫の治療抵抗性獲得において接着分子が果たす役割

東京女子医科大学医学部血液内科学

イマイ ヨウイチ モトジト シコ  
今井 陽一・泉二登志子

(受理 平成25年1月11日)

## Role of Adhesion Molecules in the Acquisition of Drug Resistance by Multiple Myeloma Cells

Yoichi IMAI and Toshiko MOTOJI

Department of Hematology, Tokyo Women's Medical University School of Medicine

Multiple myeloma is an incurable hematological malignancy that is characterized by the expression of paraproteins and aberrant expansion of plasma cells. Multiple myeloma is accompanied by various symptoms including anemia and lytic bone lesions. Previous studies on the molecular pathology of multiple myeloma have revealed factors that are involved in the progression of multiple myeloma. Among them, adhesion molecules expressed by multiple myeloma cells play crucial roles in the pathophysiology of multiple myeloma through their interaction with the bone marrow stromal cells. The activation of adhesion molecules leads to drug resistance, which is the main cause of relapse and refractory disease. Here, we have reviewed the roles of adhesion molecules in the acquisition of drug resistance by multiple myeloma cells, i.e., cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR). P-selectin on endothelial cells and  $\alpha_4$  and  $\beta_7$  integrins on the surface of multiple myeloma cells induce the adhesion of myeloma cells on endothelial cells in the bone marrow, and this adhesion induces CAM-DR. Furthermore, we have explained the molecular mechanism involved in the activation of integrins through conformational changes, which result in CAM-DR. Further, we have discussed the roles of adhesion molecules in anemia and lytic bone lesions that are observed in multiple myeloma patients. These findings will help in establishing a new strategy of therapy for multiple myeloma patients.

**Key Words:** multiple myeloma, adhesion molecule, integrin, CAM-DR

## はじめに

多発性骨髄腫は造血組織のなかでも形質細胞を起源とする腫瘍である。モノクローナル抗体などの異常たんぱく質の産生を特徴とする機能性腫瘍 (functioning tumor) であり、腎機能障害あるいは骨病変など多彩な症状を呈する。造血幹細胞移植の導入で生存期間が改善<sup>1)</sup>、さらに従来メルファラン・プレドニン (melphalan, Predonine®: MP) 療法に代わる、サリドマイド、ボルテミゾブなどの新規治療薬の併用により治療反応性が約30%から60~70%に上昇している<sup>2)</sup>。しかし、依然多くの治療抵抗症例や治療に反応しても再発する症例が存在する難治性疾患である。この治療抵抗性の獲得に、骨髄腫細胞に発現する接着分子が重要な役割を果たすことが示

唆されている<sup>3)</sup>。接着分子と骨髄微小環境の間質細胞に発現するリガンドの結合によって誘導される骨髄腫細胞の増殖・抗アポトーシスシグナルの活性化が抗がん剤耐性を誘導すると考えられる。本論文では、多発性骨髄腫の治療抵抗性に関わる接着分子について最近の知見をまとめるとともに、接着分子のなかでもインテグリンについて、その活性化機構・多発性骨髄腫の治療抵抗性獲得において果たす役割について解説する。

## 1. N-カドヘリンを介した多発性骨髄腫細胞と骨髄微小環境の相互作用

N-カドヘリンはMMSET (multiple myeloma SET domain) の高発現が特徴的なt(4;14)(p16;q32)転座を有する多発性骨髄腫の約80%で高発現

がみられた<sup>5)</sup>。N-カドヘリンは健康人の骨髄形質細胞では発現しないか発現が低かった。一方、多発性骨髄腫の前癌状態と考えられる MGUS (monoclonal gammopathy of undetermined significance) では N-カドヘリンの発現の上昇傾向がみられた。また、骨髄腫細胞には  $\beta$ -カテニンが高発現するが、骨髄腫細胞では  $\beta$ -カテニンと N-カドヘリンが結合体を形成することが見出された。骨髄腫細胞における N-カドヘリンの発現および N-カドヘリンを介した骨髄腫細胞と間質細胞あるいは骨髄腫細胞同士の結合は骨髄腫細胞の増殖速度に対しては影響を及ぼさないことが明らかになった。しかしながら、N-カドヘリンは骨髄腫細胞と骨髄微小環境の間質細胞との結合を介した骨髄腫細胞の骨髄内での貯留 (retention) を調節することにより、骨髄腫細胞の生体内での動態を制御することが明らかになった。多発性骨髄腫に特徴的な臨床症状のひとつである溶骨病変の形成は骨芽細胞と造骨細胞の活性化のバランスが崩れることが要因となる。N-カドヘリンを介した骨髄腫細胞と骨芽細胞の結合が骨芽細胞の分化に及ぼす影響が解析された。その結果、N-カドヘリンを介した結合は骨芽細胞の形成を抑制することが明らかになった。以上の結果から、N-カドヘリンは骨髄腫細胞と骨芽細胞の相互作用で重要な役割を果たし骨芽細胞の分化抑制を介して溶骨病変の形成を促進することが明らかになった。

## 2. $\alpha_4$ インテグリンを介した治療抵抗性の獲得

$\alpha_4$ ,  $\beta_1$  サブユニットのヘテロダイマーから形成されるインテグリン VLA-4 はケモカイン CXCL12 による骨髄腫細胞の骨髄内での動態の変化に関与する。CXCL12 により血管内皮細胞の透過性が増し、VLA-4 を介した VCAM-1, フィブロネクチンへの結合性が上昇する<sup>6)</sup>。さらに、接着分子を介した治療抵抗性の獲得機構 (cell adhesion-mediated drug resistance : CAM-DR) が注目されている。CAM-DR として、多発性骨髄腫患者由来の細胞株は骨髄間質細胞との共培養により抗癌剤の増殖抑制効果が減弱することが知られている。一方、骨髄腫細胞株において、接着分子のなかでも  $\alpha_4$  インテグリンの発現を shRNA (short hairpin RNA) によって低下させるとボルテゾミブ、ビンクリスチン、ドキシソルビシン、デキサメタゾンに対する CAM-DR が阻害された<sup>7)</sup>。ボルテゾミブは他の薬剤と比較して CAM-DR が少ないと考えられるが、これはボルテゾミブが転写能の抑制を介して  $\alpha_4$  インテグリンの発現を低下させ

るためと考えられる。以上から、VLA-4 は化学療法に対する抵抗性で重要な役割を果たし、ボルテゾミブは  $\alpha_4$  インテグリンの転写抑制を介して CAM-DR を軽減することが示唆された。実際に、 $\alpha_4$  インテグリンに対するヒト化抗体である natalizumab は in vitro で骨髄腫細胞の増殖を抑制するほか、ボルテゾミブへの感受性を高めることが示された<sup>8)</sup>。さらに、in vivo でもヒト多発性骨髄腫のマウスモデルで natalizumab の投与により骨髄腫細胞の増殖抑制と生存期間の延長が見られた。

## 3. $\beta_7$ インテグリンを介した骨髄腫細胞の治療抵抗性獲得と血管新生

インテグリンとしては、 $\alpha_4$  インテグリンのほかに  $\beta_7$  インテグリンが多発性骨髄腫症例の細胞で高発現し、特に予後不良の症例で発現が高いことが示された<sup>9)</sup>。自家造血幹細胞移植後やボルテゾミブによるサルベージ療法後の予後不良と  $\beta_7$  インテグリンの高発現が相関していた。 $\beta_7$  インテグリンの shRNA による低下により骨髄腫細胞のフィブロネクチン、E-カドヘリンへの接着能が低下した。さらに、ボルテゾミブ、メルファランに対する CAM-DR が軽減した。骨髄腫細胞の免疫不全マウスへの皮下移植では、 $\beta_7$  インテグリンの低下により血管新生が抑制された。これは、 $\beta_7$  インテグリンの低下により focal adhesion kinase (FAK), Src のリン酸化, Rac1 の活性化が低下して VEGF (vascular endothelial growth factors) の産生が減少することによると考えられた。以上から、 $\beta_7$  インテグリンも多発性骨髄腫に特徴的な血管新生や CAM-DR の獲得に深く関与し、その高発現が予後不良因子となると考えられる。

## 4. P-セレクチンを介した骨髄腫細胞と骨髄微小環境の相互作用

接着分子 P-セレクチンは骨髄腫細胞で発現はみられなかったが、そのリガンドである PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) は骨髄腫細胞で高発現していた<sup>10)</sup>。特にその発現は多発性骨髄腫の前癌状態と考えられる MGUS から、多発性骨髄腫に進行するとともに上昇していた。さらに、多発性骨髄腫症例の骨髄から得られた血管内皮細胞では、P-セレクチンの高発現が認められた。このように骨髄の血管内皮細胞に発現する P-セレクチンは骨髄腫細胞に発現する PSGL-1 との相互作用を介して、骨髄腫細胞の骨髄内の血管内皮への接着を制御する。その分子メカニズムとして、P-セレクチンと PSGL-1 の相互作用が細胞内シグナルの活性化を介して骨髄腫

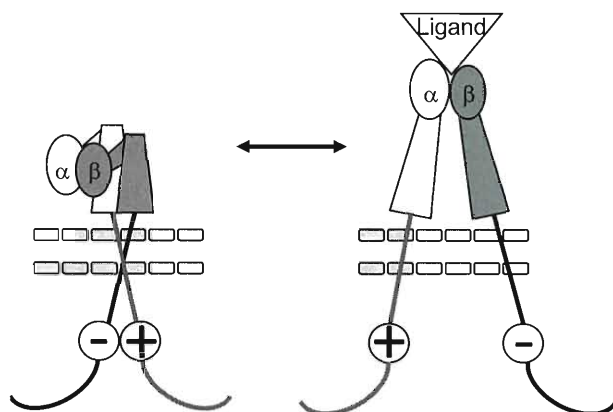


Fig. 1 Conformational changes in integrins mediated by the interaction of cytoplasmic domains

細胞表面の  $\beta_1$  インテグリンの活性化とクラスター形成の増加を誘導し骨髄腫細胞の血管内皮への接着を促すことが示唆された。以上から、PSGL-1 は骨髄腫細胞の骨髄へのホーミングを誘導し、骨髄腫細胞の生体内分布の制御に重要な役割を果たすことが示された。このように PSGL-1 と P-セレクチンの相互作用は骨髄腫細胞の骨髄微小環境での動態を制御するが、この制御を介して CAM-DR の獲得でも重要な役割を果たすことが予想される。実際に、*in vitro* の系でセレクチンの特異的阻害剤である GMI-1070 によって、骨髄間質細胞との共培養で誘導されたボルテゾミブとデキサメタゾンに対する CAM-DR が低下した。

#### 5. インテグリンの高次構造の変化による機能調節

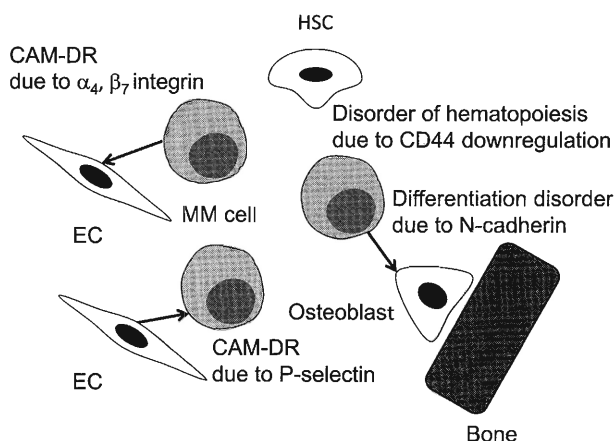
これまで述べてきたように、接着分子インテグリンは多発性骨髄腫の化学療法抵抗性において重要な役割を果たす。インテグリンは  $\alpha$ ,  $\beta$  サブユニットのヘテロダイマーからなる糖蛋白質であるが、活性化能、すなわち、リガンドへの結合能は定常状態では不活化されている。細胞外からサイトカインなどの刺激が加わると活性化が上昇しリガンドへの結合能が増す。このインテグリンの活性化能の調節は  $\alpha$ ,  $\beta$  サブユニットのヘテロダイマーの高次構造の変化によって制御されていると考えられている<sup>11)</sup>。不活化状態では、 $\alpha$ ,  $\beta$  サブユニットの細胞内ドメインは強い結合状態“clamping”にあり、細胞外ドメインは縮こまりリガンドが結合しにくい状態となる。一方、活性化状態では細胞内シグナルにより細胞内ドメインは構造変化を起こして遊離した状態となり“un-clamping”，細胞外ドメインは伸びてリガンドに結合しやすくなる (Fig. 1)。核磁気共鳴 (nuclear mag-

		R + charge
$\alpha_4$ (mouse)	KAGFFFKRQYKSI LQEENRRD -	
$\alpha_{IIb}$ (human)	KVGFFFKRNRPPLEEDDEEGE -	
$\alpha_L$ (human)	KVGFFFKRNLKEKMEAGRGPV -	
$\alpha_M$ (human)	KL GFFFKRQYKDMMSSEGGPPG -	
$\alpha_1$ (mouse)	KI GFFFKRPLKKKMEK	
$\alpha_2$ (mouse)	KL GFFFKRQYKKMGQNPDEMD -	
$\alpha_3$ (mouse)	KCGFFFKRARTRALYEAKRQK -	
$\alpha_6$ (mouse)	KCGFFFKRNKKDHYDATYHKA -	

GFFFKR motif

Fig. 2 GFFFKR motif in the cytoplasmic domains of the  $\alpha$  subunits of integrins

netic resonance : NMR) による構造解析の結果<sup>12)</sup>、インテグリンの高次構造の変化が  $\alpha$ ,  $\beta$  サブユニットの細胞内ドメインの接触面の間を生じる静電的引力により制御されることが明らかになった。インテグリン  $\alpha$  サブユニットの膜近傍には GFFFKR モチーフが種・サブユニットの違いを超えて保存されている (Fig. 2)。GFFFKR モチーフのアルギニンに正に荷電しており、 $\alpha$ ,  $\beta$  サブユニットの細胞内ドメインの結合に重要な役割を果たすと考えられる。そこで、筆者らはアルギニンをアラニンに置換した GFFKA 変異体を導入した遺伝子改変マウスを樹立した<sup>13)</sup>。多発性骨髄腫の接着分子を介した薬剤抵抗性において重要な役割を果たす VLA-4 は  $\alpha_4$ ,  $\beta_1$  サブユニットのヘテロダイマーから形成される。筆者らは、 $\alpha_4$  インテグリンに GFFKA 変異体を導入したところ、同マウス由来のリンパ球は VLA-4 のリガンドである VCAM-1, MAdCAM-1 に対する結合性が上昇しており恒常的に活性化されていた。以上から、 $\alpha_4$  インテグリンの細胞内ドメインの GFFFKR モチーフを GFFKA に変異させることにより VLA-4 が恒常的に活性化されることが示された。これらの結果から、インテグリンの  $\alpha$  サブユニットの細胞内ドメインの GFFFKR モチーフを介した  $\alpha$ ,  $\beta$  サブユニットの細胞内ドメインの相互作用が生体内でもインテグリンの活性化状態の調節に重要な役割を果たすことが示された。さらに、GFFKA 変異遺伝子導入マウスのリンパ球はリガンドへの結合性が上昇しているものの、ケモカイン存在下での遊走能は低下していた。リンパ球の遊走において、インテグリンとリガンドへの結合と遊離が協調的に行われることが必要のため、GFFKA 変異遺伝子導入マウスでは、一度結合したりリガンドへの強い結合のため、遊離が適切に行われず、遊走能が低下すると考えられた。その結



**Fig. 3** Molecular mechanism involved in the pathophysiological changes caused by adhesion molecules in multiple myeloma

HSC: hematopoietic stem cell, MM: multiple myeloma, EC: endothelial cell, CAM-DR: cell adhesion-mediated drug resistance

果, GFFKA 変異遺伝子導入マウスでは特に腸管のリンパ組織へのリンパ球の遊走能が障害され, 腸管のリンパ組織であるパイエル板 (Peyer patch) の形成不全がみられた。以上のように  $\alpha_4$  インテグリンの細胞内ドメインに GFFKA 変異体を導入することにより生体内でインテグリンを恒常的に活性化させ, 生体内でのリンパ球分布を変化させることが可能となった。

先に述べたように, VLA-4 インテグリンの活性化により多発性骨髄腫の化学療法への抵抗性が誘導されると考えられる。そこで, 多発性骨髄腫患者由来の細胞株の  $\alpha_4$  インテグリンに GFFKA 変異体を導入することにより, VLA-4 インテグリンが恒常的に活性化し治療抵抗性が細胞株において再現可能になると考えられる。これらの細胞株での遺伝子・蛋白質の発現を解析することにより多発性骨髄腫の難治化の鍵分子が同定され, それを標的とする新規治療法の開発につながると考えられる。また, GFFKRモチーフなど, 高次構造の変化の鍵分子を標的とする新規治療法の開発も期待される。

## 6. 多発性骨髄腫における CD44 の低下を介した造血障害

接着分子は骨髄腫細胞の CAM-DR の獲得において重要な役割を果たすが, 多発性骨髄腫に合併する造血障害にも寄与することが示されている<sup>14)</sup>。多発性骨髄腫症例から得られた骨髄細胞では造血幹細胞や前駆細胞, そのなかでも特に, 巨核球と赤芽球系細胞の前駆細胞である megakaryocyte-erythrocyte

progenitor が減少していた。これらの前駆細胞の遺伝子発現を網羅的に解析したところ, TGF $\beta$  シグナルや細胞骨格, 接着分子, 細胞周期制御分子の遺伝子発現の異常がみられた。骨髄微小環境において TGF $\beta$  シグナルが活性化することにより造血細胞の増殖, コロニー形成能, 自己再生能が障害されていた。さらに, 造血幹細胞や前駆細胞における接着分子 CD44 の発現が低下していた。CD44 の低下により造血幹細胞や前駆細胞の遊走・接着能が低下し造血能の障害をもたらすことが示唆された。多発性骨髄腫症例由来の造血幹細胞や前駆細胞を免疫不全マウスに移植しても造血能に障害がみられなかったことから, 多発性骨髄腫における造血障害は TGF $\beta$  の活性化や CD44 の低下による骨髄微小環境の変化によると考えられた。以上のように接着分子 CD44 は多発性骨髄腫の造血障害で重要な役割を果たすことが明らかになった。

## おわりに

本論文では, 多発性骨髄腫において接着分子が果たす役割について, 主に治療抵抗性の獲得の面から解説した。 $\alpha_4$ ,  $\beta_7$  インテグリンなどのインテグリンが骨髄腫細胞の骨髄内の血管内皮細胞への接着性を介して治療抵抗性の獲得に重要な役割を果たしている。一方, P-セレクチンは骨髄の血管内皮細胞に発現して骨髄腫細胞に発現する PSGL-1 との相互作用を介して骨髄微小環境における骨髄腫細胞の動態を変化させ, 治療抵抗性の獲得をもたらすと考えられる。そのほか, N-カドヘリンは骨髄腫細胞と骨芽細胞の相互作用を介して溶骨病変の形成を促進するなど, 接着分子は多発性骨髄腫で臨床上問題となる骨病変の合併にも深く関与する。また, 貧血などの原因となる造血障害においても CD44 などの接着分子の低下により骨髄微小環境が変化することが誘因のひとつとなっている (Fig. 3)。以上のように, 多発性骨髄腫の病態に様々な面で接着分子は関与しており, 今後, 治療においても重要な治療標的のひとつとなると考えられる。筆者らがその一端を明らかにしたインテグリンの高次構造変化を制御する細胞内ドメインの相互作用も, インテグリンの活性化の制御調節の標的としての可能性が示唆される。このように, 多発性骨髄腫での接着分子の機能制御は新規治療法の開発の鍵となると考えられる。

## 文 献

- 1) Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM et al: A prospective, randomized trial of autologous bone mar-

- row transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. *Intergroupe Français du Myélome. N Engl J Med* **335**: 91–97, 1996
- 2) **Hulin C, Facon T, Rodon P et al**: Efficacy of melphalan and prednisone plus thalidomide in patients older than 75 years with newly diagnosed multiple myeloma: IFM 01/01 trial. *J Clin Oncol* **27**: 3664–3670, 2009
  - 3) **San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK et al**: Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med* **359**: 906–917, 2008
  - 4) **Hideshima T, Chauhan D, Kiziltepe T et al**: Biologic sequelae of I $\kappa$ B kinase (IKK) inhibition in multiple myeloma: therapeutic implications. *Blood* **113**: 5228–5236, 2009
  - 5) **Groen R, de Rooij M, Kocemba K et al**: N-cadherin-mediated interaction with multiple myeloma cells inhibits osteoblast differentiation. *Haematologica* **96**: 1653–1661, 2011
  - 6) **Sanz-Rodriguez F, Hidalgo A, Teixeira J**: Chemokine stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  modulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/fibronectin and VCAM-1. *Blood* **97**: 346–351, 2001
  - 7) **Noborio-Hatano K, Kikuchi J, Takatoku M et al**: Bortezomib overcomes cell adhesion-mediated drug resistance through downregulation of VLA-4 expression in multiple myeloma. *Oncogene* **28**: 231–242, 2009
  - 8) **Podar K, Zimmerhackl A, Fulciniti M et al**: The selective adhesion molecule inhibitor Natalizumab decreases multiple myeloma cell growth in the bone marrow microenvironment: therapeutic implications. *B J Haematol* **155**: 438–448, 2011
  - 9) **Neri P, Ren L, Azab AK et al**: Integrin  $\beta_7$ -mediated regulation of multiple myeloma cell adhesion, migration, and invasion. *Blood* **117**: 6202–6213, 2011
  - 10) **Azab AK, Quang P, Azab F et al**: P-selectin glycoprotein ligand regulates the interaction of multiple myeloma cells with the bone marrow microenvironment. *Blood* **119**: 1468–1478, 2012
  - 11) **Tadokoro S, Shattil SJ, Eto K et al**: Talin binding to integrin  $\beta$  tails: a final common step in integrin activation. *Science* **302**: 103–106, 2003
  - 12) **Vinogradova O, Velyvis A, Velyviene A et al**: A structural mechanism of integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  “inside-out” activation as regulated by its cytoplasmic face. *Cell* **110**: 587–597, 2002
  - 13) **Imai Y, Park EJ, Peer D et al**: Genetic perturbation of the putative cytoplasmic membrane-proximal salt bridge aberrantly activates  $\alpha_4$  integrins. *Blood* **112**: 5007–5015, 2008
  - 14) **Bruns I, Cadeddu R-P, Brueckmann I et al**: Multiple myeloma-related deregulation of bone marrow-derived CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **120**: 2620–2630, 2012