

ボルテゾミブがG-CSFの造血幹細胞動員作用を最も促進する投与条件の解明

特定チーム（課題番号：167202）

研究期間：平成28年7月28日～平成29年3月31日

研究代表者：松本太一

1. 背景

多発性骨髄腫は、体液性免疫に中心的な役割を担う形質細胞の腫瘍である。この疾患に対して最も有効な治療法は、自家造血幹細胞移植である¹。この治療法では、予め、患者自身から、造血幹細胞ならびに造血前駆細胞（Hematopoietic Stem and Progenitor Cells；HSPC）を採取・保存しておき、化学療法により多発性骨髄腫細胞を死滅させた後、保存しておいたHSPCが移植される。以前は、骨髄穿刺により取り出した骨髄からHSPCを分離することでHSPCを得ていたが、現在は、薬剤を用いてHSPCを骨髄から末梢血に流出させ、末梢血からHSPCを分離するのが一般的である。骨髄から末梢血にHSPCを動員するために、顆粒球コロニー刺激因子（granulocyte-colony stimulating factor；G-CSF）が投与される。ところが、G-CSFを投与してもHSPCが末梢血に動員されない患者（poor mobilizer）が存在し²、これらの患者は、自家造血幹細胞移植を断念せざるを得ない。最近、同疾患に対する治療薬であるボルテゾミブに、G-CSFのHSPC動員作用を促進する効果があることが報告され、G-CSFとボルテゾミブを併用すれば、poor mobilizerからもHSPCを採取できる可能性が浮上した^{3,4}。しかし、その投与スケジュールは不明であった。そこで、本研究では、ボルテゾミブがG-CSFのHSPC動員作用を最も促進する投与条件の解明に取り組んだ。

また、ボルテゾミブがG-CSFのHSPC動員作用を促進するメカニズムについても検討を行った。骨髄の中には、造血幹細胞を維持するために特化した領域（造血幹細胞ニッチ）が存在する⁵。造血幹細胞ニッチを構成する細胞（造血ニッチ細胞）として、骨芽細胞⁶や血管内皮細胞⁷、CXCL12-abundant reticular細胞⁸、Nestin陽性細胞⁹など、様々な細胞が提唱されているが、結論は出ていない。しかし、いずれにせよ、どの細胞も共

通した接着因子により造血幹細胞と結合している。共通した接着因子として、ケモカインC-X-C chemokine 12（CXCL12）とその受容体であるC-X-C chemokine receptor 4（CXCR4）がある。ニッチ細胞から分泌されたCXCL12は、造血幹細胞上のCXCR4に結合し、細胞遊走を引き起こす¹⁰。また、造血ニッチ細胞が発現しているvascular cell adhesion molecule-1（VCAM-1）と、造血幹細胞が発現しているvery late antigen-4（VLA-4）も両細胞の結合に関与する¹⁰。G-CSFによるHSPC動員作用は、未だ完全には解明されていないが、G-CSFは、骨髄内のC-X-C chemokine 12（CXCL12）やvascular cell adhesion molecule-1（VCAM-1）発現抑制を介して、HSPCを末梢血に動員する¹¹。そこで、本研究では、G-CSFによるCXCL12およびVCAM-1発現抑制作用に対して、ボルテゾミブがどのように影響するか検討した。

2. 材料と方法

2-1. 実験動物

C57BL/6マウス（8週齢）を用いた。このマウスは、他のストレインに比べて、G-CSFのHSPC動員作用に対する感受性が低く、poor mobilizerのモデルとして汎用されている¹²。このマウスに対して、G-CSF（グランシリンジM300、協和発酵キリン）を250 μg/kgで、ボルテゾミブ（LC Laboratories）を0.8 mg/kgで皮下投与した。

2-2. 末梢血中HSPC数の測定

末梢血に動員されたHSPC数を測定するために、造血コロニー形成アッセイを行った。マウスを三種混合麻酔により麻酔を行い、開腹後、左心室から末梢血を採取した。採取した末梢血500 μLをammonium chloride solution（STEM CELL Technologies）9500 μLに添加し、赤血球を溶解した。Iscove's Modified Dulbecco's

Medium (IMDM) + 2% fetal bovine serum (FBS) で 3 回洗浄した後、IMDM + 2% FBS 500 μ L で懸濁した。このうちの 100 μ L を MethoCult™ GF M3434 1mL と混合し、35mm ディッシュに播種した。37℃、5% CO₂ 条件下で 14 日間培養した後、コロニー数をカウントした。

2-3. 骨髄中 CXCL12、sVCAM-1 発現の測定

マウスを三種混合麻酔により麻酔を行った後、大腿骨を摘出した。軟骨や筋肉などの不要な組織を除去した後、PBS (-) 500 μ L で骨髄を押し出し、懸濁した。300 × g で 5 分間、室温で遠心分離した後、上清を採取した。Mouse CXCL12/SDF-1 alpha Quantikine ELISA Kit および Mouse sVCAM-1/CD106 Quantikine ELISA Kit (共に R&D systems) を用いて骨髄上清中の CXCL12 および sVCAM-1 量を測定した。

3. 結果

3-1. ボルテゾミブが G-CSF の造血幹細胞動員作用を最も促進する投与条件の検討

Ghobadi らは、マウスを用いて、G-CSF とボルテゾミブを併用すると、G-CSF 単独よりも 2 倍以上多くの HSPC が末梢血に動員されることを報告した³。しかし、その研究でのボルテゾミブの用法は、採血の 12 時間前に 1 回投与のみであった。そこで、我々は、様々なボルテゾミブの投与回数や投与タイミングを試験し、ボルテゾミブが G-CSF の造血幹細胞動員作用を最も促進する投与条件を探った。G-CSF は、day 2 から day 5 にかけて、1 日 1 回、朝 9 時に 250 μ g/kg で皮下投与した。また、ボルテゾミブは、day 1、day 3、day 5 のいずれか 1 回、

もしくは、それら全て (計 3 回)、21 時に 0.8 mg/kg で皮下投与した。Day 6 に末梢血を採取し、造血コロニー形成アッセイにより、末梢血中の HSPC 数を測定した (Fig. 1A)。

ボルテゾミブを day1、day3、day5 のいずれかに 1 回投与した群 (Bor (d1)、Bor (d3)、Bor (d5)) の末梢血 HSPC 数は、コントロール群と比べて差はなかった。ボルテゾミブを day1、day3、day5 に計 3 回投与した群 (Bor (d1, 3, 5)) の末梢血 HSPC 数は、コントロール群と比べて増加したが、その差は有意ではなかった。これらの結果は、ボルテゾミブそのものには、HSPC 動員作用がない、もしくは、その作用は弱いことを示している。G-CSF 投与した群 (G) の末梢血 HSPC は、コントロール群に比べて 4.7 倍増加した。G-CSF に加えてボルテゾミブを day 1 に 1 回投与した群 (G+Bor (d1)) の末梢血 HSPC 数は、G-CSF 単独投与群 (G) と差がなかった。G-CSF に加えてボルテゾミブを day 3 に 1 回投与した群 (G+Bor (d3)) の末梢血 HSPC 数は、G-CSF 単独投与群に比べて有意に減少し、コントロール群とほぼ同等であった。一方、G-CSF に加えてボルテゾミブを day 5 に 1 回投与した群 (G+Bor (d5)) の末梢血 HSPC 数は、G-CSF 単独投与群に比べて 2.2 倍増加した。G-CSF に加えて、ボルテゾミブを day1、day3、day5 に計 3 回投与した群 (G+Bor (d1, 3, 5)) 群の末梢血 HSPC 数は、G-CSF 単独投与群 (G) と差がなかった。これらの結果から、① G-CSF に加えて、採血の 12 時間前にボルテゾミブを 1 回併用すると、最も多くの HSPC を末梢血に動員できること、② G-CSF に加えて、ボルテゾミブを 48 時間前に 1 回投与すると、G-CSF の HSPC 動員作用を阻害することがわかった。(Fig. 1B)

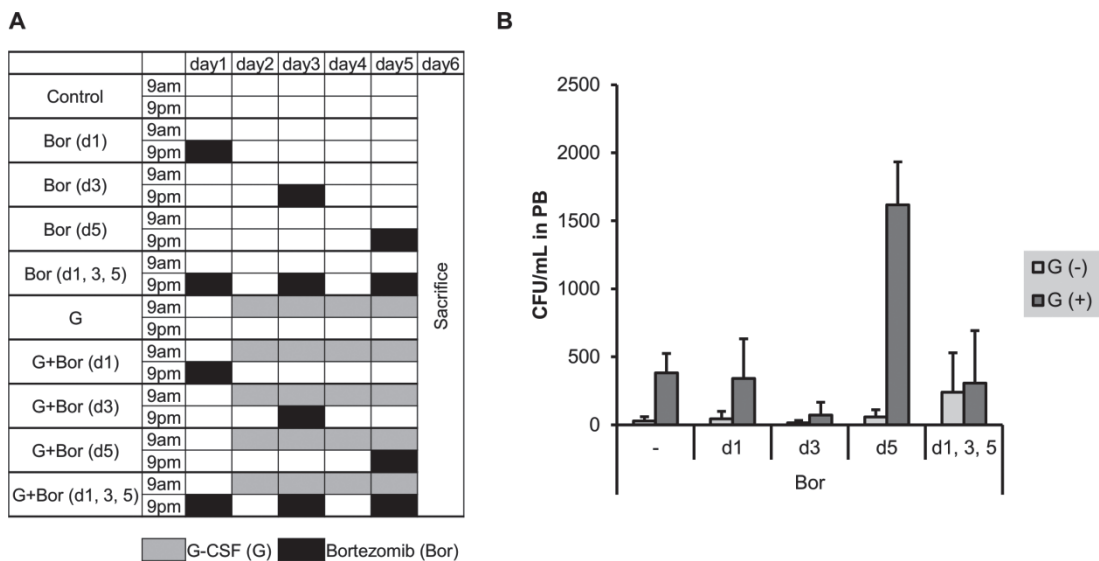


Figure 1. G-CSFによるHSPC動員作用に対するボルテゾミブ併用の効果

(A) C57BL/6マウスの群分けとG-CSFおよびボルテゾミブの投与スケジュール (B) G-CSFおよびボルテゾミブを投与した各群の末梢血中HSPC数

3-2. ボルテゾミブがG-CSFの造血幹細胞動員作用を促進するメカニズムの検討

ボルテゾミブがG-CSFによるHSPC動員作用を促進するメカニズムを解明するために、造血幹細胞と造血ニッチ細胞との結合に中心的な役割を果たすとされているCXCL12とVCAM-1の発現に対するG-CSFとボルテゾミブ併用の影響を検討した。

G-CSFは、詳細なメカニズムは分かっていないが、骨髄中のCXCL12発現を抑制する。また、G-CSFは、骨髄に作用し、好中球の分化や増殖を促進する¹³。好中球は、neutrophil elastaseやcathepsin G、metalloprotease-9などのセリンプロテアーゼを分泌するため、その数が増え、骨髄中のセリンプロテアーゼも増加する。VCAM-1は、多くのセリン残基を有しているため、セリンプロテアーゼによって切断され¹⁴、その断片は、soluble VCAM-1 (sVCAM-1)と呼ばれている。G-CSFを投与すると、骨髄中のsVCAM-1発現が低下することが過去に報告されている。そこで、本研究では、G-CSFならびにボルテゾミブで処理したマウスの骨髄中の

CXCL12とsVCAM-1発現をELISAによって定量した。

C57BL/6マウスをコントロール群 (Control)、G-CSF単独投与群 (G)、ボルテゾミブ単独投与群 (Bor)、G-CSFとボルテゾミブ併用群 (G+Bor)の4群に分けた (Fig. 2A)。G-CSFは、day 2からday 5にかけて、1日1回、午前9時に250 μg/kgで皮下投与した。ボルテゾミブは、day 5の午後9時に1回、0.8 mg/kgで皮下投与した。Day 6に骨髄中のCXCL12やVCAM-1発現をELISA法により測定した。

骨髄中のCXCL12発現量は、G-CSF投与によりコントロール群の51.8%に、ボルテゾミブ投与によりコントロール群の19.4%に、G-CSFとボルテゾミブを併用するとコントロール群の10.8%に減少した。Bor群とG+Bor群の骨髄中のCXCL12発現量には有意差はなかった (Fig. 2B)。骨髄中のsVCAM-1発現は、G-CSF投与により、コントロール群の22.7%に減少した。ボルテゾミブ投与により影響はなかった。G-CSFとボルテゾミブを併用すると、コントロール群の34.8%に減少したが、G-CSF単独投与群との間に有意差はなかった (Fig. 2C)。

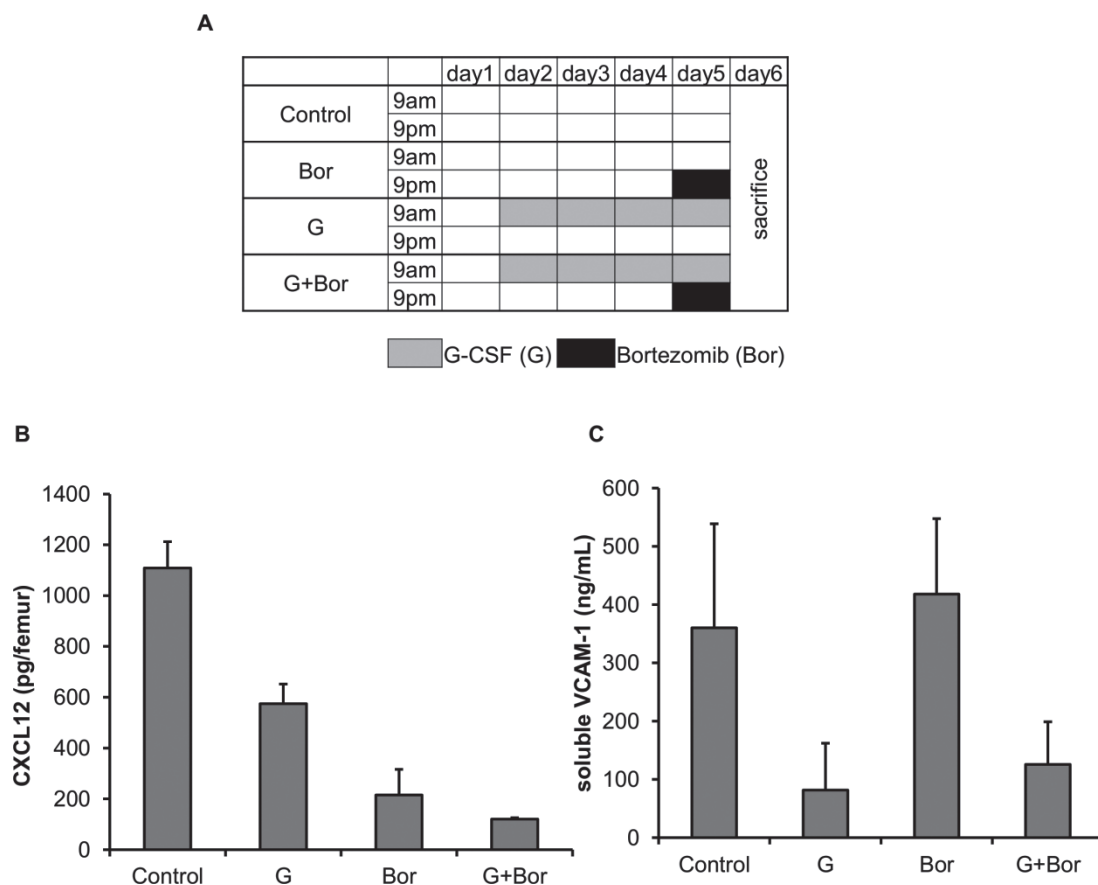


Figure 2. G-CSF、ボルテゾミブ、それらの併用による骨髄CXCL12およびsVCAM-1発現への影響

(A) 各群におけるG-CSFおよびボルテゾミブの投与スケジュール (B、C) G-CSFおよびボルテゾミブで処理した各群の骨髄中CXCL12およびsVCAM-1発現量

4. 考察

本研究では、G-CSFに加えて、様々な投与回数や投与タイミングでボルテゾミブを投与した結果、ボルテゾミブを採血の0.5日前に1回のみ投与すると、G-CSFによるHSPC動員作用が最も促進されることを明らかにした。この結果は、過去にGhobadiらが報告した結果と一致した³。ボルテゾミブは、多発性骨髄腫治療目的で用いる場合、1クールにつき、1、4、8、11、22、25、29、32日目に合計8回投与されるのが一般的である。複数回投与することで抗腫瘍効果が得られるため、G-CSFのHSPC動員作用に対する促進効果を期待する場合にも、単回投与より複数回投与の方が、また、投与後しばらく時間が経過した方が、高い効果を得られると考え、採血の0.5日前に加えて、2.5日前と4.5日前にボルテゾミブを投与した。しかし、予想に反して、ボルテゾミブを4.5日前に1回投与しても、または、4.5、2.5、0.5日前に合計3回投与しても、G-CSFのHSPC動員作用に対する促進効果は見られなかった。2.5日前に1回投与した群では、G-CSFによるHSPC動員作用を抑制した。これらの結果から、ボルテゾミブによるG-CSFのHSPC動員作用に対する促進効果は、効果発現までの時間が短く（少なくとも12時間で効果発現）、一過性であることが明らかになった。また、投与時間を早めたり、投与回数を増やしたりしても、G-CSFのHSPC動員作用に対する促進効果は得られないことも分かった。この結果を基に、福岡大学病院にて、G-CSFに加えて、ボルテゾミブを採血の12時間前に投与して、HSPC動員を検証する臨床試験が、現在進行中である。

メカニズムの解析から、ボルテゾミブは、骨髄中のCXCL12発現を抑制することでG-CSFによるHSPC動員作用を促進することが示唆された。G-CSFは、CXCL12とVCAM-1発現抑制作用により、HSPCを末梢血に動員するが、CXCL12発現抑制は弱い。ボルテゾミブには、VCAM-1発現に対する作用はないが、骨髄CXCL12発現を強力に抑制することが、本研究から初めて明らかになった。G-CSFとボルテゾミブを併用すると、G-CSF単独投与よりも、CXCL12発現がより低下したことにより、G-CSFのみを投与した時よりも多くのHSPCが血中に流出したと考えられる。G-CSFは、好中球の分化や増殖を促進するため、好中球から分泌されるneutrophil elastaseやcathepsin G、metalloprotease 9などのセリンプロテアーゼが増加する。これらのセリンプロテアーゼがVCAM-1のセリン残基を切断することが、HSPC動員作用のメカニズムの一つと考えられている。セリンプロテアーゼ阻害薬は、G-CSFによるHSPC動員作用を減弱することが報告されているが¹⁵、その一方で、セリンプロテアーゼ欠損マウスにG-CSFを投与すると、野生型マウスと同等のHSPCが血中に動員されることも報告

されており¹⁶、G-CSFによるHSPC動員作用におけるセリンプロテアーゼの役割は、完全には明らかになっていない。本研究の結論は、セリンプロテアーゼによってVCAM-1が切断されることを前提としている。G-CSFによるHSPC動員作用に対するボルテゾミブの促進作用メカニズムに、好中球が必須かどうか確かめるために、一時的に好中球欠損状態を作製することができる抗Gr-1抗体を投与した時に、ボルテゾミブがHSPC動員促進作用を發揮するか検討中である。

【参考文献】

- 1 Moreau, P., Attal, M. & Facon, T. Frontline therapy of multiple myeloma. *Blood* **125**, 3076-3084, doi:10.1182/blood-2014-09-568915 (2015).
- 2 Olivieri, A. *et al.* Proposed definition of 'poor mobilizer' in lymphoma and multiple myeloma: an analytic hierarchy process by ad hoc working group Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo. *Bone marrow transplantation* **47**, 342-351, doi:10.1038/bmt.2011.82 (2012).
- 3 Ghobadi, A. *et al.* Bortezomib is a rapid mobilizer of hematopoietic stem cells in mice via modulation of the VCAM-1/VLA-4 axis. *Blood* **124**, 2752-2754, doi:10.1182/blood-2014-08-595967 (2014).
- 4 Niesvizky, R. *et al.* Overcoming the response plateau in multiple myeloma: a novel bortezomib-based strategy for secondary induction and high-yield CD34+ stem cell mobilization. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **19**, 1534-1546, doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1429 (2013).
- 5 Morrison, S. J. & Scadden, D. T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* **505**, 327-334, doi:10.1038/nature12984 (2014).
- 6 Zhang, J. *et al.* Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* **425**, 836-841, doi:10.1038/nature02041 (2003).
- 7 Ding, L. & Morrison, S. J. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature* **495**, 231-235, doi:10.1038/nature11885 (2013).
- 8 Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M. & Nagasawa, T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* **25**, 977-988, doi:10.1016/j.immuni.2006.10.016 (2006).
- 9 Mendez-Ferrer, S. *et al.* Mesenchymal and

- haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* **466**, 829-834, doi:10.1038/nature09262 (2010).
- 10 Rettig, M. P., Ansstas, G. & DiPersio, J. F. Mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells using inhibitors of CXCR4 and VLA-4. *Leukemia* **26**, 34-53, doi:10.1038/leu.2011.197 (2012).
 - 11 Tay, J., Levesque, J. P. & Winkler, I. G. Cellular players of hematopoietic stem cell mobilization in the bone marrow niche. *International journal of hematology* **105**, 129-140, doi:10.1007/s12185-016-2162-4 (2017).
 - 12 Ryan, M. A. *et al.* Pharmacological inhibition of EGFR signaling enhances G-CSF-induced hematopoietic stem cell mobilization. *Nature medicine* **16**, 1141-1146, doi:10.1038/nm.2217 (2010).
 - 13 Liu, F., Wu, H. Y., Wesselschmidt, R., Kornaga, T. & Link, D. C. Impaired production and increased apoptosis of neutrophils in granulocyte colony-stimulating factor receptor-deficient mice. *Immunity* **5**, 491-501 (1996).
 - 14 Levesque, J. P., Takamatsu, Y., Nilsson, S. K., Haylock, D. N. & Simmons, P. J. Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* **98**, 1289-1297 (2001).
 - 15 Petit, I. *et al.* G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nature immunology* **3**, 687-694, doi:10.1038/ni813 (2002).
 - 16 Levesque, J. P. *et al.* Characterization of hematopoietic progenitor mobilization in protease-deficient mice. *Blood* **104**, 65-72, doi:10.1182/blood-2003-05-1589 (2004).