

博士学位論文 2021 年度

細胞外小胞によるがん悪性化機構の解明に関する研究

慶應義塾大学大学院薬学研究科

山元 智史

目次

1. 序論	5
2. 方法	12
2-1. 細胞培養	12
2-2. 試薬	12
2-3. EV 精製法	13
2-4. タンパク質定量	13
2-4-1. サンプル調整.....	13
2-4-2. タンパク質濃度測定.....	14
2-5. ウェスタンブロット法	14
2-6. EV の検出	15
2-6-1. EXOSCREEN ASSAY SYSTEM	15
2-6-2. NANOPARTICLE TRACKING ANALYSIS : NTA.....	17
2-7. 細胞増殖アッセイ	17
2-8. カスパーゼ活性確認試験.....	17
2-9. RNA 抽出	18
2-10. LEN 耐性関連因子の探索	19
2-10-1. GSEA 解析.....	19
2-10-2. IPA 解析	19
2-11. MM 細胞の細胞接着能試験	20
2-11-1. FN コーティングプレートを用いた試験.....	20
2-11-2. BMSC との共培養試験.....	20
2-12. トランズウェルを用いた共培養試験.....	20

2-13. 超低吸着プレートを用いた LEN 感受性試験.....	21
2-14. 定量的 PCR.....	21
2-15. SORT1、LAMP2 siRNA の導入.....	22
2-16. SORT1、LAMP2 発現量と CRBN 発現量との相関.....	22
2-17. レンチウイルスを用いた SORT1、LAMP2、CRBN のノックダウン株の 作成.....	23
2-18. CRBN ノックダウンによる細胞接着能への影響.....	23
2-19. SORT1、LAMP2 ノックダウンによる表現系の変化.....	23
2-19-1. LEN 感受性の変化.....	24
2-19-2. EV 分泌量.....	24
2-19-3. 細胞接着能.....	24
2-20. 公共データベースを用いた解析.....	24
2-20-1. SORT1、LAMP2 遺伝子発現量の相関.....	25
2-20-2. シングルセルデータベースを用いた発現解析.....	25
2-20-3. 予後解析.....	26
2-21. データ登録.....	26
2-22. 解析コードの利用方法.....	26
2-24. 統計処理.....	26
3. 結果.....	27
3-1. LEN 耐性株の性状比較.....	27
3-2. 耐性株における EV (EXTRACELLULAR VESICLES) の分泌促進.....	33
3-3. LEN 耐性 MM 細胞株由来 EV の LEN 感受性株の細胞接着に対する影響の 検討.....	36
3-4. LEN 耐性株由来 EV を介した薬剤耐性と CRBN との関係性の検討.....	41

3-5. EV を介した細胞接着能の亢進による薬剤耐性獲得機構の探索	44
3-6. SORT1、LAMP2 と CRBN、既知の薬剤関連因子との関連性の検討 ...	51
3-7. 遺伝子発現データベース解析を用いた SORT1、LAMP2 の発現と予後の 検討.....	53
4.考察.....	62
5.引用文献.....	69
6.謝辞.....	85

1. 序論

多発性骨髄腫 (Multiple myeloma; MM) は、意義不明の単クローン性免疫グロブリン血症 (Monoclonal gammopathy of undetermined significance; MGUS) として発症し、くすぶり型多発性骨髄腫 (Smoldering multiple myeloma; SMM) を経て、治療を要する症候性 MM へと移行する(1)。現在、MM の発症・悪性化に寄与するドライバー遺伝子の研究が進んでいる。遺伝子変異の網羅的解析によって、クローンの不均一性 (heterogeneity) が明らかとなった(2-5)。過去 10 年で、サリドマイド、レナリドミド (Lenalidomide; Len)、ポマリドミド (Pomalidomide; Pom) などの免疫調節薬 (Immunomodulatory drugs; IMiDs)、プロテアソーム阻害薬、抗体医薬など治療薬の開発により MM の予後は改善されてきた。しかしながら、ほとんどの患者は最終的に再発をきたす。再発する原因の一端として、治療薬に長期間さらされることで治療薬に対する耐性を獲得することが考えられている。特に、IMiDs は長期維持療法にも使用されており、IMiDs に対する薬剤耐性獲得は MM 治療において深刻な問題である。IMiDs の MM 細胞に対する主な分子メカニズムは、その主要な標的であるセレブロン (CRBN) に IMiDs が直接結合し、MM 細胞の生存に必須な転写因子であるイカロス (IKZF1) およびアイオロス (IKZF3) の分解を引き起こすことである。IKZF1、IKZF3 の分解が促進されると、下流の *c-Myc* または *IRF4* 遺伝子の発現が抑制される。MM 患者では IKZF1、IKZF3、*c-Myc*、*IRF4* の発現が亢進していることがわかっており、IMiDs はタンパク質の分解を促進することで抗腫瘍効果を示す。つまり、これら *CRBN*、*IKZF1*、*IKZF3* 遺伝子の変異が、IMiDs に対する薬剤耐性獲得の主な原因と考えられてきた (6-7)。しかし、IMiDs に対する耐性獲得のメカニズムはこれら遺伝子の変異のみでは完全には説明できない。

例えば、Dimopoulos らは、IMiDs である Len、Pom を、これら薬剤に感受性のある MM 細胞に対して、6 ヶ月の間、IMiDs を低濃度で暴露し続けることで安定して IMiDs に耐性を示す MM 細胞株を樹立した (8)。樹立された IMiDs 耐性 MM 細胞では SMAD3 の恒常的な発現減少が確認された。これらの IMiDs 耐性株に DNA メチルトランスフェラーゼ阻害剤の 5-azacytidine と EZH2 阻害剤である EPZ-6438 を併用すると、SMAD3 の発現が回復し、IMiDs への感受性が回復した。このような MM 細胞のエピジェネティックなリプログラミングが薬剤耐性獲得の原因となっており、CRBN 非依存的な経路による IMiDs に対する薬剤耐性獲得機構の存在が示されている。他にも Yamamoto らは ARID2 を新たな CRBN の基質として報告している (9)。ARID2 は、MYC を含む Pom の標的遺伝子の転写制御に関与している。Pom は Len よりも ARID2 の分解に有効であり、Len 耐性細胞株における MYC の発現および増殖を抑制することを報告している。特に、ARID2 の発現は予後不良と関連しており、化学療法抵抗性の患者、微小残存病変 (Extramedullary Disease; MRD) を有する集団や、再発/難治性 MM の患者において発現が高いことが分かっている。一方、Len 耐性を示す再発難治性 MM 患者の独立した予後不良因子としては TP53 遺伝子が報告されている (10)。ヘミ接合性 TP53 遺伝子欠失は核内に異常な p53 タンパク質を発現させる。ヘミ接合性 TP53 欠失と p53 タンパク質発現には強い相関があり、p53 タンパク質発現のある患者の全生存期間 (OS) は、p53 タンパク質発現のない患者より有意に短かった。Liu らは MM 細胞における Tumor necrosis factor (TNF) 受容体関連因子 2 (TRAF2) のノックダウン/ノックアウトが、NF- κ B および細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK) シグナルの活性化を介して IMiDs 抵抗性を誘導することを明らかにしている (11)。このように CRBN に依存しない IMiDs の薬剤耐性機構の研究も重要である。

これらに加えて、MM 細胞の治療薬に対する薬剤耐性獲得機構では、細胞接着も重要であると考えられている (12-14)。MM 細胞における細胞接着が関連する薬剤耐性獲得機構は Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR) と呼ばれている。MM 細胞が Wnt3/RhoA/ROCK 経路を介して骨髄間質細胞 (BMSC) に接着する能力を高め、薬剤感受性に影響を与えること (13)、MM 治療薬であるボルテゾミブ (Bor) 耐性に VLA-4 の発現上昇が関わっており、VLA-4 のサイレンシングが MM 細胞の BMSC への接着能を減弱し、Bor への感受性を回復させることを示している (14)。このように MM の薬剤耐性獲得にはがん細胞のみだけでなく骨髄微小環境内に存在する細胞との相互作用が重要となってくる。

細胞外小胞 (EVs) は約 100 nm 前後の細胞外に分泌される小胞であり、細胞内のエンドソームを経由して産生される。EV は分泌する細胞により、大きさ、分泌経路、そして機能が異なることがわかっている (15)。EV は脂質二重膜の安定な構造を取っており、中に DNA、RNA、タンパク質など多くの物質を内包している。EV は血流に乗って遠方の受け手細胞にその情報を伝えることが可能であることから細胞間コミュニケーションの担い手として注目されている。Tominaga らは乳がん細胞の脳転移に EV が関与していることを報告している (16)。乳がん細胞由来の EV に含まれる *miR181-c* がターゲットの PDK1 の発現を抑制することで、アクチンの脱重合を促進するコフィリンを活性化する。これによって、血液脳関門を破壊され、がん細胞による浸潤を可能にする。同じ脳転移にしても Rodrigues らは乳がんの脳転移において CEMIP というタンパク質を内包した EV が脳血管内皮細胞およびミクログリア細胞に取り込まれることによって、脳血管リモデリングおよび転移を促進する炎症誘発性サイトカインの分泌を亢進し、血管周囲ニッチにおける内皮細胞の分岐および炎症を誘発

すると報告している (17)。近年、造血器腫瘍の治療はがん細胞をターゲットとするだけでなく、周囲の骨髄 niche をターゲットとすることで大きな成果を挙げている。これまで MM における細胞間コミュニケーションの担い手として、ケモカインやサイトカインなどが深く研究されてきた。しかし、それに加えて、細胞外小胞、特にエクソソームによる細胞間コミュニケーションが重要であり、EV によって骨髄微小環境を MM 細胞自身に有利になるように作り変えていることがわかってきている (18-26)。Faict らは MM 細胞由来の EV が骨芽細胞の分化抑制と破骨細胞の活性化により骨吸収を促進するとしている (18)。同様に MM 細胞由来の EV が骨髄線維芽細胞内の *miR-27b* と *miR-214* の発現を亢進させ、MM の前がん病変とされる MGUS から MM への進展に寄与することを示している (19)。このように MM 細胞由来の EV は骨髄微小環境内に存在する様々な細胞に作用している。また逆に、骨髄微小環境内に存在する細胞からの EV を MM 細胞が受け取ることで生存に有利に働くこともある。例えば、Histone deacetylases (HDACs) の阻害剤であるパノビノスタットは MM の治療薬として用いられている。Ho らは HDAC の阻害剤を用いることで、BMSC 由来の EV 分泌が抑制され、MM 細胞への取り込み量が減ることで MM 細胞の増殖を抑えることを報告している (20)。

薬剤耐性に関しても EV は重要な役割を果たすことがわかっている。EV は細胞のストレス応答の手段として分泌されていると考えられており、がん細胞が薬剤に暴露された時、薬剤への応答として EV を分泌する。卵巣がんにおいてシスプラチン耐性が問題となるが、シスプラチンに耐性を有するクローンがシスプラチンに晒されたとき、特別な EV を分泌する (27)。これら分泌された EV は近傍のシスプラチン感受性細胞に取り込まれ、感受性細胞のシスプラチンへの抵抗性を増し、かつ、その感受性細胞の細胞浸潤能を上昇させる。また、乳

がん細胞は不均一性を持った集団であることがわかっている。乳がん細胞のシングルセル解析にて、親株とドセタキセル長期暴露によるドセタキセル耐性株の遺伝子発現解析をしたところ、ドセタキセル耐性株では **Wnt** および上皮間葉転換 (**EMT**) 経路に関わる遺伝子の発現が誘導され、対照的に、細胞周期を制御する遺伝子の発現が抑制されていた。これは幹細胞の特徴を示している。さらに未処理の親株の中にドセタキセル耐性株と同じ遺伝子プロファイルを持つ細胞集団がすでに一定数存在することがわかった (28)。つまり、未処理の親株にすでにドセタキセル耐性の素因を持つ幹細胞のような亜集団が含まれていることを示唆している。乳がん細胞と同様に、**MM** 細胞は形質細胞が多クローン性に増殖する造血器腫瘍である。このことから、**MM** 細胞の中には薬剤耐性能を持ったクローンが治療前から存在しており、薬剤への暴露により感受性細胞が淘汰され、薬剤耐性能を持ったクローンが選択的に増殖すると考えられている。また、**MM** 細胞由来の **EV** は **Bor** 耐性に関与することが知られている (29-33)。その上、**BMSC** 由来の **EV** もまた薬剤耐性に関与することが報告されている。**BMSC** 由来 **EV** に含まれる **PSMA3** は **MM** 細胞に取り込まれ、**PSMA3-AS** と結合することで、**PSMA3** の安定性を上昇させる。**PSMA3** の発現上昇によって、 α -サブユニットに関連したキモトリプシン様 (**ChT-L**) 活性が亢進し、プロテアソーム活性を上昇させる。これによって **MM** 細胞が **Bor** への耐性を獲得することが報告されている (33)。以上のように **EV** を介したプロテアソーム阻害剤に対する耐性獲得機構については報告があるが、**EV** を介した **MM** 細胞の薬剤耐性獲得機構については報告が限られており、耐性化の分子機構については全く情報がない。

IMiDs への薬剤耐性獲得機構を研究するために、当研究室では **IMiDs** の1つである **Len** を複数の **MM** 細胞株 (**KMS21**、**KMS27**、**KMS34**、**MUM24**) に長期低濃度暴露させ、**Len** 耐性株 **KMS21R**、**KMS27R**、**KMS34R**、**MUM24R** を

樹立した (34)。先行研究より、これら樹立された Len 耐性株では細胞接着能が亢進していることがわかっている。また、Len の主要なターゲット分子である CRBN は KMS21R、KMS27R で軽度に発現が低下しており、IKZF1、IKZF3 遺伝子は軽度に発現が上昇していた。このことから KMS21R や KMS27R の Len 耐性化機構の一部には CRBN 依存的な経路の関与が示唆されたが、MUM24R については CRBN の基質となるようなタンパク質の発現変動は見られず、CRBN 非依存的な経路の関与が考えられた。そこで MUM24 と MUM24R の RNA シークエンスを行い、発現解析よりインテグリン $\beta 5$ 、インテグリン $\beta 7$ を含む、細胞接着因子であるインテグリン群の発現上昇を確認した。現在、さらなる機能解析を進めている。しかしながら、MM 細胞のクローン不均一性を考えるとさらに多様な薬剤耐性機構が存在すると考えられる。本研究では IMiDs の薬剤耐性化機構に関して未だ報告のない EV に着目し、EV を介した新たな IMiDs への薬剤耐性化機構を解明することを目的とした。この研究を遂行するにあたり、6 種類の MM 細胞株、KMS21、KMS27、KMS34、KMS21R、KMS27R、KMS34R について RNA シークエンスを行なった。これらの RNA シークエンスの発現解析では、これまで MM の薬剤耐性に関与するといわれている「Cell adhesion」を含む、いくつかの遺伝子群に加え、「Snare interaction in vesicular transport」という EV の生合成に関わるような遺伝子群の発現上昇が確認できた。実際、樹立された Len 耐性株では、EV の分泌量が亢進していた。これに加えて、樹立された Len 耐性株は細胞接着能の亢進が特徴として確認されている。これら 6 種類の MM 細胞の RNA シークエンスの結果からも Len 耐性細胞において、細胞接着関連遺伝子群の発現亢進が明らかとなった。そこで薬剤耐性と細胞接着、EV の関連を検討するため、Len 耐性株由来 EV を Len 感受性株に暴露させ、薬剤感受性と細胞接着能の変化を確認した。すると、トランズウェルを用いた Len 耐性株と

親株の共培養法では細胞接着能が亢進し、薬剤感受性がわずかではあるが、有意に回復することがわかった。さらに、Len 耐性 MM 細胞において 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た。Len 耐性株にてこれら遺伝子をノックダウンすると、細胞接着能が低下し、Len への薬剤感受性が回復することを示した。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、MM の予後に *SORT1* と *LAMP2* の遺伝子発現が関与することを示している。本研究によって、今まで報告がされていなかった IMiDs の薬剤耐性化機構に新たに EV が関与していることを証明した。

2. 方法

2-1. 細胞培養

MM 細胞株である KMS21、KMS27、KMS34 は、大槻博士 (川崎医科大学) の好意により提供していただいた。Len 耐性細胞株、KMS21R、KMS27R および KMS34R は、当研究室で約 1 年間低用量の Len に曝露させることで樹立した (34)。全ての MM 細胞は 10% 牛胎児血清 (FBS) と 1% Antibiotic-Antimycotic (#15240096, Gibco, California, USA) を添加した RPMI1640 培地 (#11875119, Gibco) で、空気 95%、二酸化炭素 5% の条件で培養した。また、MM 細胞株はフィブロネクチン (FN) コーティングガラス (#GG-18-FIBRONECTIN, Neuvitro corporation, Washington, USA) や FN (#10838039001, Roche, Basel, Switzerland) をコーティングした培養プレートを用いて、細胞接着実験を行なった。FN の培養プレートへのコーティングは、製造元であるロシュ社のプロトコルに従って作製した。共培養実験に用いた BMSC (#PCS-500-012, ATCC, Virginia, USA) は、1% の Antibiotic-Antimycotic (#15240096, Gibco) を添加した MesenPro 培地 (#12746012, Gibco) を用いて培養した。

2-2. 試薬

EV 検出のための ExoScreen アッセイには、マウスモノクローナル抗ヒト CD9 (クローン 12A12, #SHI-EXO-M01, Cosmo Bio, Tokyo, Japan) および CD63 (クローン 8A12, #SHI-EXO-M02, Cosmo Bio) の抗体を使用した。これらの抗体は、添付のプロトコルに従って、アクセプタービーズまたはビオチン化修飾を行なった。SORT1、LAMP2 遺伝子の発現抑制実験に用いた siRNA は Allstar siRNA (#SI03650318, Qiagen, Venlo, Netherlands)、TSG101 siRNA (#SI02655184,

Qiagen) を使用した。SORT1 siRNA および LAMP2 siRNA は (siGENOME SMART pool siRNA、#M-010620 および#M-011715, Dharmacon, Colorado, USA) を使用した。EV の分泌を抑制することがわかっている siTSG101 は EV 分泌抑制の陽性コントロールとして用いた。Allstar は EV 分泌制御の陰性コントロールとして用いた。Len (CC-5013) (#S1029, Selleck, Houston, USA) を使用した。

2-3. EV 精製法

MM 細胞は、EV を回収する際には FBS 由来の EV を除くために 2mM の L-グルタミンと 1% Antibiotic-Antimycotic (#15240096, Gibco) を添加した無血清の Advanced RPMI1640 培地 (#12633012, Gibco) で培養した。48 時間培養後、培養上清液を回収し、200 x g で 3 分間遠心分離し、死細胞を除いた。その後、2,000 x g で 10 分間遠心分離してさらなる細かい細胞残渣を除去した。0.22 μ m フィルター (#SLGV033RS, Millipore, Massachusetts, USA) でろ過し、ろ過後の培養上清液を conditioned medium (CM) として保存した。精製した CM は 110,000 x g、4°C で 70 分間超遠心分離した。超遠心後は上清をアスピレートし、PBS (-) (#14249-95, Nacalai tesque, Kyoto, Japan) で洗浄をした。本研究の EV 回収は、EV 研究の国際学会である International Society for Extracellular Vesicles が発行した MISEV2018 の EV 回収ガイドラインに従って実施した (35)。

2-4. タンパク質定量

2-4-1. サンプル調整

細胞溶解液として、M-PER™ Mammalian Protein Extraction Reagent (#78501, Thermo Fisher, Massachusetts, USA) を用いてタンパク質を抽出した。6 ウェ

ルプレートに細胞を播種し、24 時間後に細胞を回収し、200 μ L の M-PER でタンパク質抽出をした。タンパク質の抽出液は 2 μ L を 398 μ L の PBS (-) (#14249-95, NACALAI TESQUE) で希釈して濃度測定に使用した。EV サンプルは超遠心後、PBS(-) (#14249-95, NACALAI TESQUE) で洗浄したものを 10 μ L に 300 μ L の PBS(-) (#14249-95, NACALAI TESQUE) で希釈して使用した。

2-4-2. タンパク質濃度測定

EV のタンパク質濃度は、Micro BCA™ Protein Assay Kit (#23235, Thermo Fisher) を用いて測定した。2.0 mg/mL のアルブミンを用いて検量線を作成した。標準品またはサンプルをそれぞれ 150 μ L ずつ 96 ウェルプレートに加えた。各ウェルに Working Reagent (MA reagent : MB reagent : MC reagent = 25:24:1 で混合したもの) を 150 μ L ずつ添加し、プレート振とう器で 30 秒間、十分に混合後、37°C で 2 時間インキュベートした。インキュベート後にプレートリーダー EnVision Multilabel Plate Reader (PerkinElmer, Massachusetts, USA)、SpectraMax iD3 plate reader (Molecular Devices, California, USA) を用いて 562 nm 付近の吸光度を測定した。標準品の吸光度をもとにサンプルのタンパク質濃度を計算した。

2-5. ウェスタンブロット法

一次抗体として以下の抗体を用いた。Cosmo Bio 社のマウスモノクローナル抗ヒト CD9 抗体 (#SHI-EXO-M01, Cosmo Bio) (クローン 12A12, 希釈倍率 1 : 1000) および CD63 抗体 (#SHI-EXO-M02, Cosmo Bio) (クローン 8A12, 希釈倍率 1 : 1000)、SORT1 抗体 (#ab16640, Abcam, Cambridge, England) (希釈倍率 1 : 1000)、LAMP2 抗体 (#HPA029100, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) (希釈

倍率 1 : 1000)、STAT-3 抗体 (#9139s, CST, Massachusetts, USA) (希釈倍率 1 : 1000)、p-STAT3 (Y705) 抗体 (#9145s, CST) (希釈倍率 1 : 1000)、VLA-4 抗体 (#67040-1, Proteintech, Illinois, USA) (希釈倍率 1 : 1000)、および Cereblon 抗体 (#NBP1-91810, Novus Biologicals, Colorado, USA) (希釈倍率 1 : 1000)。二次抗体は (HRP 標識抗マウス IgG: #NA931, GE healthcare, Illinois, USA ; HRP 標識抗ウサギ IgG: #NA934, GE healthcare, Illinois, USA) (希釈倍率 1 : 5000) を使用した。Mini-PROTEAN TGX ゲル (4-20%: #4561096, Bio-Rad, California, USA) を使用し、各レーンに細胞タンパク質 ; 15 µg、EV 溶液 ; 500 ng のタンパク質をロードした。100 V、70 分で電気泳動をし、PVDF 膜に 100 V、60 分で転写を行なった。ブロッキングワシ (#03953-95, Nacalai tesque)を用いて室温で 1 時間ブロッキングを行なった。上記の希釈倍率で 1 次抗体、2 次抗体をそれぞれ室温で 1 時間インキュベートとした。イムノスターLD キット (#290-69904, FUJIFILM, Tokyo, Japan) を用いて化学発光で可視化し、発光画像を Luminolmager (LAS-4000 ; FUJIFILM) で分析した。

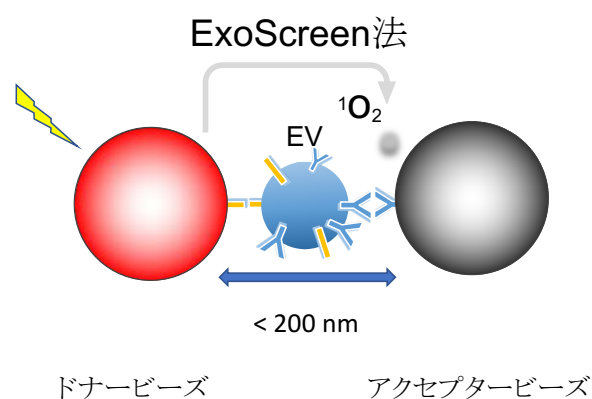
2-6. EV の検出

2-6-1. ExoScreen assay system

MM 細胞 (2×10^4 cells/well) を、1%グルタミンおよび 1%Antibiotic-Antimycotic (#15240096, Gibco) を添加した無血清 Advanced RPMI1640 培地 (#12633012, Gibco) を用いて 96 ウェルプレートに播種した。48 時間のインキュベーション後、ExoScreen アッセイを行った。96 ウェルプレート中の培養上清をそれぞれのウェルから 10 µL ずつ、精製した EV の場合は 5 µL ずつ 1/2 area 96 プレート (#6002290, Perkin Elmer)に移した。そこに培養上清の場合は 15 µL、

精製した EV は 20 μL のアクセプタービーズとビオチン標識した CD9、CD63 抗体混合液を加えた。2 時間 37°C でインキュベートし、その後 25 μL のドナービーズ溶液を添加した。30 分 37°C でさらにインキュベートした。その後、励起波長 680 nm、発光波長 615 nm、これらの吸光度を EnSpire Alpha 2300 Multilabel Plate reader (PerkinElmer, Massachusetts, USA) を用いて測定した。その他、細かいプロトコルは Perkin Elmer 社のプロトコルに従い行なった。また、未処理の Advanced RPMI1640 培地 (#12633012, Gibco) または PBS(-) (#14249-95, Nacalai tesque) から得られたシグナルをバックグラウンドとして補正した (36)。本検出法は EV の表面膜上に存在するタンパク質を異なる修飾が施された 2 種類の抗体で挟み込み、2 種類の抗体が 200 nm 以内に近接する場合のみ、抗体に付加されたビーズが発光し、EV を検出する方法である (図 1)。ExoScreen で得られたシグナルは全て Cell Counting Kit-8 (#341-08001, FUJIFILM) を用いた細胞増殖アッセイのシグナルで補正を行なった。

図 1. ExoScreen 法の原理



EV 表面に存在するタンパク質に対する抗体を用いて EV を検出する方法。2 種類の方法で標識した抗体が互いに EV を挟み込み、その間隔が 200 nm 以下になった時のみ、一重項酸素がドナービーズ側からアクセプタービーズへと伝わ

り、発光することを利用している。

2-6-2. Nanoparticle tracking analysis : NTA

EV の粒子の単位量 (mL) あたりの濃度を NTA を用いて測定した。精製した EV は PBS(-) (#14249-95, NACALAI TESQUE) でさらに 10-50 倍に希釈して、測定プロトコルに従って NanoSight LM10-HS システム (Quantum Design, California, USA) を用いて、添付プロトコルに従い、カメラレベル 13 にて分析した。

2-7. 細胞増殖アッセイ

細胞生存率は、Cell Counting Kit-8 (#341-08001, FUJIFILM) を用いてプロトコルに従い測定した。5 x 10³ 個の MM 細胞 (KMS21、KMS27、KMS34、KMS21R、KMS27R、KMS34R) を 96 ウェルプレートに播種し、100 μL の 2mM の L-グルタミンと 1% Antibiotic-Antimycotic (#15240096, Gibco) を添加した無血清の Advanced RPMI1640 培地 (#12633012, Gibco) で培養した。同時に各濃度の Len を添加した。72 時間後、各ウェルに CCK-8 試薬を 10 μL ずつ添加した。2 時間、37 °C でインキュベート後、450 nm の吸光度を EnVision Multilabel Plate Reader (PerkinElmer) および SpectraMax iD3 プレートリーダー (Molecular Devices) を用いて測定した。細胞を播種せずにメEDIUMのみを加えたウェルのシグナルをバックグラウンドとして補正した。

2-8. カスパーゼ活性確認試験

カスパーゼ活性は、Caspase-Glo® 3/7 Assay System (#G8093, Promega, Wisconsin, USA) を用い、Promega 社のプロトコルに従い、測定した。5 x 10³ 個の MM 細胞 (KMS21、KMS27、KMS34、KMS21R、KMS27R、KMS34R) を

96 ウェルプレートに播種し、各濃度の Len を添加した。72 時間後、Caspase-Glo 3/7 substrate と Caspase-Glo Buffer を混合した後に、各ウェルに 100 μ L ずつ添加し、プレート振とう機を用いて十分に混合した。混合液を 100 μ L ずつホワイトプレート (#136101, Thermo Fisher)に移し、30 分インキュベートした。インキュベート後、EnVision Multilabel Plate Reader (PerkinElmer) および SpectraMax iD3 plate reader (Molecular Devices) を用いて発光を測定した。

2-9. RNA 抽出

QIAzol 試薬 (#79306, Qiagen)と miRNeasy Mini Kit (#217084, Qiagen) を用いて、培養細胞から total RNA を抽出した。細胞を回収し、500 μ L の QIAzol を加え激しくボルテックスをした。室温で 5 分静置し、100 μ L のクロロホルムを加えた。さらに激しくボルテックスをし、しっかりと懸濁させた。数分静置した後で 14,000 x g、15 分、4°Cで遠心する。遠心後、水層のみを別のチューブに移し 1.5 倍量の 100%エタノールを加え、混合した。抽出用カラムに水層とエタノールの混合液を加え、8,000 x g、1 分で遠心。上清を捨て、RWT Buffer を 700 μ L 加え、8,000 x g、1 分で遠心。上清を捨て、RPE Buffer を 500 μ L 加え、8,000 x g、1 分で遠心後、上清を捨てる。これを 2 回繰り返した。次に空のチューブにカラムを移して 14,000 x g、2 分でカラムに残ったエタノールを完全に乾かした。最後に 30 μ L の Nuclease free water をカラムに加え、5 分静置後、8,000 x g、1 分で RNA を抽出。RNA の量と質は、NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher) と Agilent bioanalyzer (Agilent Technologies, California, USA) を用いて測定した。

2-10. Len 耐性関連因子の探索

2-10-1. GSEA 解析

MM 細胞 (KMS21、KMS27、KMS34、KMS21R、KMS27R、KMS34R) の total RNA を用いて RNA シークエンスを行なった (北海道サイエンス)。親株 (KMS21、KMS27) と Len 耐性株 (KMS21R、KMS27R) を比較してそれぞれ遺伝子の発現量が 1.5 倍以上で $p < 0.05$ のものを選んで遺伝子リストを作成した。KMS34 細胞については親株の段階で Len に対して耐性を示すため、この解析では除外した。Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) アプリケーションソフト Ver. 4.1.0 を <https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp> よりダウンロード (2020/7/30) し、解析に使用した。Len 耐性株でエンリッチされている遺伝子セットを Gene Ontology (<http://geneontology.org>)、KEGG pathway (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) について解析した。その中で $p < 0.05$ 、 $FDR-q < 0.25$ である遺伝子セットを抽出した。それぞれの MM 細胞での発現量は Morpheus-Broad Institute (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>) を用いてヒートマップを作成した。

2-10-2. IPA 解析

上記で作成した遺伝子リストを使用してパスウェイ解析ソフトウェア (IPA) (Qiagen) によるパスウェイ解析を行なった。RNA シークエンスのデータより Len 耐性株で亢進している分子、パスウェイ、表現型の関連性を可視化した。また、Upstream Regulator Analysis によってデータセットの発現変動を起こしている miRNA や転写因子などを含む上流調節分子を探索し、それらの活性化状態を予測した。

2-11. MM 細胞の細胞接着能試験

2-11-1. FN コーティングプレートを用いた試験

12 ウェルプレートに FN コーティングガラス (#GG-18-FIBRONECTIN, Neuvitro corporation) を静置し、その上に 2×10^4 cells の MM 細胞を播種した。1 週間培養後、上清をアスピレートし、PBS(-) (#14249-95, NACALAI TESQUE) を用いて 5 回洗浄した。洗浄後の FN コーティングガラスをピンセットで取り出し、4%パラホルムアルデヒドで固定後、0.1% Triton-100x で透過処理を行なった。RFP 標識した CD138 抗体 (#347193, BD Biosciences, California, USA) (希釈倍率 1:500)、1 時間、室温でインキュベートし、Hoechst 33342(1:1000) (346-07951, FUJIFILM) で核を染色後、蛍光をキーエンス蛍光顕微鏡 (KEYENCE, Osaka, Japan) で確認した。

2-11-2. BMSC との共培養試験

12 ウェルプレートに BMSC : MM 細胞=5:1 となるように播種した。1 週間共培養した後で、上記の FN コーティングガラスを用いた実験と同様に CD138 抗体 (#347193, BD Biosciences) を用いて MM 細胞の BMSC への接着能を確認した。

2-12. トランズウェルを用いた共培養試験

0.4 μm 孔径のトランズウェル (#353095, Corning, New York, USA) を用いた共培養システムを使用した。上側のチャンバーに Len 耐性細胞を播種し、下側のチャンバーにそれぞれ対応する感受性細胞を播種した。これらの細胞を 1 週間共培養した。1 週間後、親株を播種した下のチャンバーを PBS(-) (#14249-95,

NACALAI TESQUE)で洗浄し、非接着細胞を除き、その数を計測した。次いで、プレートに接着した細胞数をカウントし、全体の細胞数と接着細胞、非接着細胞の割合を算出した。この際、培養上清中の液性因子の影響を考え、超遠心した後の上清を EV 除去培地として使用し、EV によって細胞接着能が亢進することを示した。また、回収した共培養後の親株を新たに 96 ウェルプレート (non-coating プレートと FN-coating プレート) にそれぞれ 5×10^3 細胞ずつ播種し、Len 添加後、72 時間後の薬剤感受性を CCK-8 で確認した。FN-coating には FN (#10838039001, Roche) を使用した。

2-13. 超低吸着プレートを用いた Len 感受性試験

プレートへの細胞接着能が薬剤感受性に与える影響を確認するため、 5×10^3 個の MM 細胞 (KMS21、KMS27、KMS34、KMS21R、KMS27R、KMS34R) を 96 ウェルプレート (non-coating プレートと超低吸着プレート) に播種し、各濃度のレナリドミドを添加した。72 時間後、各ウェルに CCK-8 試薬を $10 \mu\text{L}$ ずつ添加した。2 時間、 37°C でインキュベート後、 450nm の吸光度を EnVision Multilabel Plate Reader (PerkinElmer) および SpectraMax iD3 プレートリーダー (Molecular Devices) を用いて測定した。細胞を播種せずにメディウムのみを加えたウェルのシグナルとバックグラウンドとして補正した。

2-14. 定量的 PCR

上記の QIAzol 試薬 (#79306, Qiagen) と miRNeasy Mini Kit (#217084, Qiagen) を用いて、培養細胞から total RNA を抽出した。RNA の量は、NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher) を用いて測定した。High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (#4368814, Applied Biosystems, Massachusetts,

USA)を用いて、total RNA から cDNA を合成した。定量的 PCR のデータは StepOne Software v2.3 (Applied Biosciences) を用いて収集・解析した。すべての mRNA 定量データは、*β-actin* の発現データに対して補正を行なった。*, p<0.05。SORT1 (#Hs00361760_m1 SORT1)、LAMP2 (#Hs00174474 m1 LAMP2) および *β-actin* (#Hs01060665_g1 ACTB) の TaqMan プローブは (Applied Biosystems) から購入した。CRBN と *β-actin* のプライマーは Eurofins 社 (Luxembourg, LU) から購入した。それぞれの Forward 鎖と Reverse 鎖の配列は以下の通りである。

CRBN forward: TGTGTTGCCTTCAACCATGT (#1728097-2)

CRBN reverse: AGCGAGGCCATGAAGTTAGA (#1728097-1)

β-actin forward: GGAGGAGCTGGAAGCAGCC (#1784554-5)

β-actin reverse: GCTGCTACGTCGCCCTG (#1784554-6)

2-15. SORT1、LAMP2 siRNA の導入

siRNA のトランスフェクションには、Thermo Fisher 社の Neon System を使用した。最適化は Thermo Fisher 社のプロトコルに従った。1×10⁶ 個の MM 細胞に各 siRNA を最終濃度 50 nM になるように E バッファーに再懸濁した。エレクトロポレーションは Pulse voltage = 1100 V, Pulse width = 20 ms, Pulse number = 1 の条件で行った。

2-16. SORT1、LAMP2 発現量と CRBN 発現量との相関

SORT1 と LAMP2 遺伝子の発現量と CRBN の発現量の相関性を確認した。MM 細胞株については RNA シークエンスのデータを用いた。公共データベース上のデータを用いた解析には GSE136324 のデータセットを用いた (n=282) (37)。X

軸に *SORT1*、*LAMP2* の発現量を Y 軸にはそれぞれ対応する *CRBN* の発現量をプロットした。R²は相関係数を示している。

2-17. レンチウイルスを用いた *SORT1*、*LAMP2*、*CRBN* のノックダウン株の作成

それぞれの遺伝子の shRNA は Santa Cruz 社から購入した (*CRBN* sh-RNA, #sc-78528-SH; sh-*LAMP2*, #sc-29390-SH; sh-*SORT1*, #sc-42119-SH; Texas, USA)。1×10⁶ 個の MM 細胞に対して、このプラスミド (6 µg) を Neon system (Thermo Fisher) を用いて pLP1 (3 µg)、pLP2 (3 µg)、pVSV-G (1.5 µg) プラスミドと共にエレクトロポレーションで導入した。48 時間後、Puromycin (#A1113803, Thermo Fisher) を 1 µg/ml の濃度で添加し、遺伝子が導入されていない細胞を除き、Puromycin (#A1113803, Thermo Fisher) 存在下で安定して生存できる細胞株を樹立した。

2-18. *CRBN* ノックダウンによる細胞接着能への影響

樹立した sh-*CRBN*-KMS27R 細胞株のノックダウン効率をウエスタンブロットで確認した。得られたシグナルの蛍光強度はアプリケーションソフト FIJI (<https://imagej.net/software/fiji/downloads>) (2019/10/28 ダウンロード)によって定量した。ウエスタンブロットで *CRBN* 発現量の低下を確認した 2 クローン (sh-*CRBN*-KMS27R#1、sh-*CRBN*-KMS27R #2) を、6 ウェルプレートに播種後、その細胞形態や細胞接着能の変化を確認した。

2-19. *SORT1*、*LAMP2* ノックダウンによる表現系の変化

2-19-1. Len 感受性の変化

樹立した sh-SORT1、sh-LAMP2 細胞株 (KMS21R、KMS27R) を 96 ウェルプレート (non-coating プレートと FN-coating プレート) に播種し、各濃度のレナリドミドを添加した。72 時間後、CCK-8 試薬を添加し、細胞生存率を計測した。

2-19-2. EV 分泌量

樹立した sh-SORT1、sh-LAMP2 細胞株 (KMS21R、KMS27R) を 96 ウェルプレートに 1%グルタミンおよび 1%Antibiotic-Antimycotic (#15240096, Gibco)を添加した無血清 Advanced RPMI1640 培地 (#12633012, Gibco) を用いて播種した。48 時間後、培養上清を用いて、ExoScreen 法を行い、EV 分泌量を測定した。

2-19-3. 細胞接着能

樹立した sh-SORT1、あるいは sh-LAMP2 導入細胞株 (sh-SORT1/sh-LAMP2-KMS21R、sh-SORT1/sh-LAMP2-KMS27R、sh-SORT1/sh-LAMP2-KMS34R) をそれぞれ 6 ウェルプレート (non-coating プレートと FN-coating プレート) に播種し、1 週間後にその細胞形態と細胞接着能を確認した。接着した細胞は Hoechst33342 (1:1000) (346-07951, FUJIFILM) で核を染色した後で、キーエンス蛍光顕微鏡を用いてその細胞数を計測した。

2-20. 公共データベースを用いた解析

2-20-1. *SORT1*、*LAMP2* 遺伝子発現量の相関

SORT1 発現量と *LAMP2* 発現量の相関性を確認した。MM 細胞株については RNA シークエンスのデータを用いた。公共データベース上のデータを用いた解析は Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) - Broad Institute (<https://sites.broadinstitute.org/ccle/>) に登録されている MM 細胞株の発現量のデータを用いた (2021/2/11 ダウンロード)。X 軸に *SORT1* の発現量を Y 軸にはそれぞれ対応する *LAMP2* の発現量をプロットした。R は相関係数を示している。

2-20-2. シングルセルデータベースを用いた発現解析

薬剤耐性に関連するシグネチャー遺伝子の発現解析には、Gene Expression Omnibus (GEO) データベースに登録されている シングルセル RNA シークエンスデータセット (GSE106218 および GSE110499) (38) を用いた。シングルセル RNA シークエンス解析には、R バージョン 3.6.1 の 'Seurat' を使用した (2021/1/26 ダウンロード) (39)。対数正規化は、R バージョン 3.6.1 上で Seurat の関数 'NormalizeData' を用いて行った。サンプルは対数正規化し、遺伝子数とミトコンドリアリード数の割合でスケーリングした。その後、主成分分析 (PCA) による次元削減と Seurat による単一細胞のクラスタリングを行った。次元削減された細胞クラスタリングデータは、Seurat の関数 'runUMAP' で生成された UMAP プロットとして表示した。モジュール解析は、PC1/PC2 シグネチャー遺伝子を用いて、関数 'AddModuleScore' を用いて行った。シングルセル RNA シークエンスで得られたそれぞれのシングルセルのデータは患者背景をもとに生存期間 2 年以上か 2 年未満で分類した。生存期間の長さで細胞を分類し、EV 分泌に関わる遺伝子や PC2 シグネチャーに含まれている遺伝子に関してヴァイオ

リンプロットを作成した。

2-20-3. 予後解析

MM患者の臨床マイクロアレイデータセットは、GEOデータベース (GSE19784 および GSE136324) からダウンロードした (37, 40)。マイクロアレイ解析とRMA正規化は、R ver.3.6.1の 'affy' パッケージを使用して行った。臨床データセットを生存分析に用いて、生存曲線は、R ver.3.6.1の 'ggplot2'、'survminer' 及び 'survival' パッケージを用いて行なった (41-42)。

2-21. データ登録

当研究のRNAシーケンスにおけるGEO accession numberはGSE165557であり、以下のサイトからダウンロード可能である (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi>) (2021/1/27 登録)

2-22. 解析コードの利用方法

発現解析や、シングルセルRNAシーケンス解析に使用した解析コードはGitHub (<https://github.com/JunNakayama/MM-project>) で公開している。

2-24. 統計処理

本論文で示されたデータは、少なくとも3つの独立した実験の平均 \pm s.d.である。2群間の統計解析はStudentのt検定で行い、 $p < 0.05$ を統計的に有意であるとみなした。多重比較では、one-way ANOVA with Dunnett's post hoc testを用いて分析した。生存分析におけるlog-rank検定は、フリーソフトR ver.3.6.1に含まれる「survminer」パッケージを使用して行った。

3. 結果

3-1. Len 耐性株の性状比較

我々は、Len を MM 細胞株に長期低濃度曝露させることにより、4 種類の Len 耐性 MM 細胞株、KMS21R、MUM24R、KMS27R および KMS34R を樹立した (34、43) (2017 年卒業 山口高史氏 修士論文引用)。まずは樹立された Len 耐性 MM 細胞株 (KMS21R、KMS27R および KMS34R) の Len に対する IC₅₀ を算出した。Len 耐性 MM 細胞株の Len への感受性を細胞増殖アッセイで算出した (表 1)。それぞれ対応する親株と耐性株の様々な Len 濃度における細胞生存率を (図 2A) に示す。KMS21 については親株の 0.27 μ M に対し KMS21R 細胞における Len の IC₅₀ は、128 μ M であり、親細胞株である KMS21 のその約 400 倍であった (図 2A、左図)。KMS27R は、Len に対して中程度の感度を有する細胞株である KMS27 に由来する (図 2A、中図)。KMS34 は、もともと Len に対して耐性であり、KMS34R 細胞も Len に対して高い耐性を示した (図 2A、右図)。また、Len によってアポトーシスが起きているのかを検討したところ、KMS21R、KMS27R の耐性株は親株と比較してアポトーシスが抑制されていることが確認できた (図 2B)。KMS34R については有意な差は確認できなかった。

興味深いことに、この樹立された耐性細胞 (KMS27R、KMS34R) は non-coating プレートに接着する能力を獲得していた (図 2C)。KMS21R に関しても親株と比較してわずかに細胞接着能が亢進しており、顕微鏡写真において樹状突起のようなものが確認できた。MM 細胞では生体内では細胞外マトリックスや BMSC と結合して生理作用を示すことが知られている。そこで、これら MM 細胞株を FN-coating プレート上、および、生理的に骨髄環境に近い

BMSC との共培養を検討した (図 2D-E)。いずれの条件でも、耐性細胞だけでなく、親株の一部もディッシュに接着していた。3 日間培養後にプレートを PBS (-) で 5 回洗浄し、ディッシュ底面に残った細胞数をカウントした。(図 2F)。

表 1. 親株と樹立した Len 耐性株の Len 感受性の比較

細胞株	親株/耐性株	IC ₅₀ (μM)	Rel. resistance
KMS21	Parental	0.27	1
KMS21R	Resistant	128	474.3
KMS27	Parental	59	1
KMS27R	Resistant	N.E.	N.E.
KMS34	Parental	N.E.	N.E.
KMS34R	Resistant	N.E.	N.E.

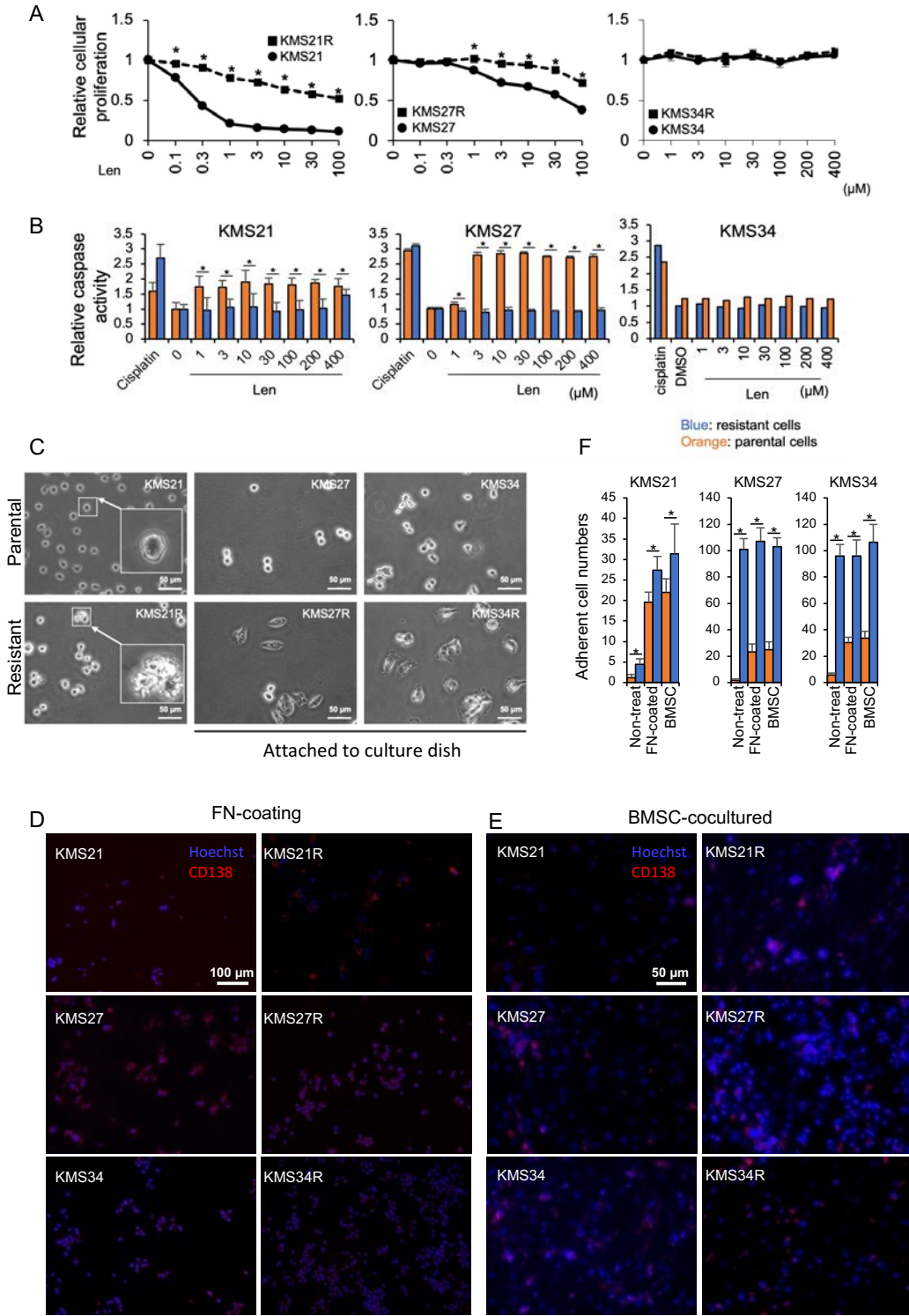


図 2. 樹立した Len 耐性株の細胞形態や性状の比較

A. MM 細胞株の各 Len 濃度における 72 時間後の細胞生存率の比較。エラーバーは s.d. 値を示し、*, $p < 0.05$ を統計学的に有意とした。B. MM 細胞株の各 Len 濃度におけるアポトーシスを起こしている細胞の割合の比較した。陽性コントロールとしてシスプラチンを用い、72 時間培養後に測定した。*, $p < 0.05$ を統計学的に有意とした。C. MM 細胞株の顕微鏡写真 (Scale bar = 50 μm)。D. MM 細胞株の FN-coating プレートを用いた際の顕微鏡写真 (Scale bar = 100 μm)。青 : nucleus = Hoechst33342、赤 : CD138 を示す。CD138 陽性細胞を MM 細胞としてカウントした。E. MM 細胞株(親株と耐性株) の BMSC と共培養した際の顕微鏡写真 (Scale bar = 50 μm)。青 : nucleus = Hoechst33342、赤 : CD138 を示す。CD138 陽性細胞を MM 細胞としてカウントした。F. MM 細胞株の FN-coating プレートで培養および BMSC と共培養した際のディッシュに接着した細胞数を数え、*, $p < 0.05$ を統計学的に有意とした。

次に、Len 耐性に関わる遺伝子を同定するために、全トランスクリプトーム解析を行なった。この際、KMS34、KMS34R 細胞株については親株の段階で耐性となっている点や、図 2A-F のように親株と耐性株で大きく変化がなかったためこの解析では除外した。親株と耐性株 (KMS21、KMS27、KMS21R、KMS27R) との発現比較では、耐性細胞で 521 個の遺伝子の発現が亢進し、89 個の遺伝子発現が減少していた (図 3A)。Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) により、「Interferon (IFN) α response」、「IFN γ response」、「Mitotic spindle」、「Cell adhesion」など、これまで MM の悪性化と関連があると報告されている遺伝子セットがエンリッチされていた (44) (図 3B)。例えば、IFN シグナルは、Fas を誘導することでアポトーシスを制御し、MM の悪性化に寄与することが知られている (44)。MM において細胞接着が薬剤耐性に重要であることが広く言われているが、我々が樹立した長期低濃度薬剤に暴露することで誘導した薬剤耐性株においても同様に細胞接着能の亢進が確認できた。細胞接着能が耐性株で亢進していることが 3-1 の検討でわかったため、細胞接着に関連する遺伝子のそれぞれの MM 細胞株での発現量をヒートマップに示した (図 3C)。KMS34R 細胞においても細胞接着関連因子の発現亢進が確認できた。これら結果より、耐性株では MM の悪性化に関わる既知のパスウェイが亢進しており、トランスクリプトームレベルでも細胞接着能が亢進していることが確認できた。

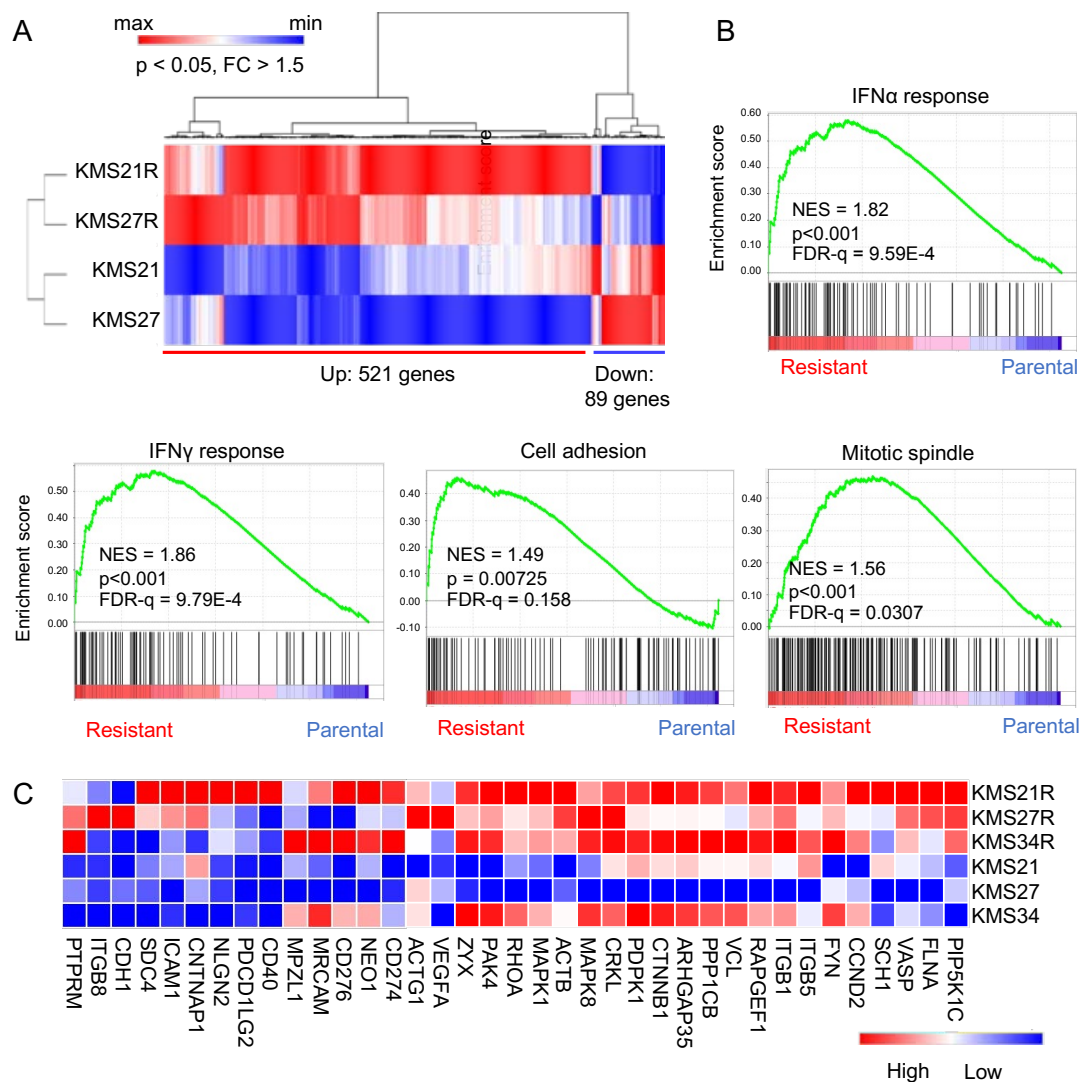


図 3. Len 耐性株において発現が上昇している遺伝子群の探索

A. Len 耐性細胞株と親株における遺伝子発現を示すヒートマップ。Len 耐性株において発現量が 1.5 倍以上、かつ、p 値が 0.05 以下の遺伝子を抽出した。B. 親株と耐性株 (KMS21、KMS27、KMS21R、KMS27R) における GSEA 解析の結果。NES: normalized enrichment score、FDR: False Discovery Rate。C. MM 細胞株における細胞接着関連遺伝子の発現量をヒートマップで示した。

3-2. 耐性株における EV (Extracellular Vesicles) の分泌促進

上記、既知の MM の薬剤耐性関連経路に加えて、「Snare interaction in vesicular transport」の遺伝子セットが耐性細胞で有意にエンリッチされていることが分かった (図 4A-B)。この遺伝子セットは EV 分泌と密接に関連しており、EV 分泌は薬剤の感受性を調節することがよく知られている (27、45)。SNAP23 や VAMP3 といった EV 分泌に重要な遺伝子は、耐性細胞において非常に高い発現量を示した。そこで Len 耐性と EV の関連を調査するために、まずはそれぞれの細胞株における EV の性状や分泌量等を確認した。EV の検出には EV 表面のタンパク質マーカーに対する抗体を用いて行う ExoScreen 法とブラウン運動を利用して溶液中の EV の粒子濃度を測るナノサイト を利用した NTA 法の 2 種類の方法で行なった。ExoScreen 法で検出するために、まずは EV を超遠心法で回収し、EV 表面のマーカータンパク質をウエスタンブロット法にて確認した (図 4C)。その結果、一般的に EV に広く発現している CD9、CD63 の発現がどの MM 細胞株でも確認できた。そこで、CD63 抗体を用いた ExoScreen 法で EV を検出したところ、親株と比較して耐性株において EV の分泌量が増加していることがわかった (図 4D、左)。それに加えて、実際の粒子の濃度も増加していた (図 4D、右)。また、既知の EV による薬剤耐性の論文 (27) と同様に耐性株より分泌される EV は有意にそのサイズが小さくなっていることが確認できた (図 4E-F)。

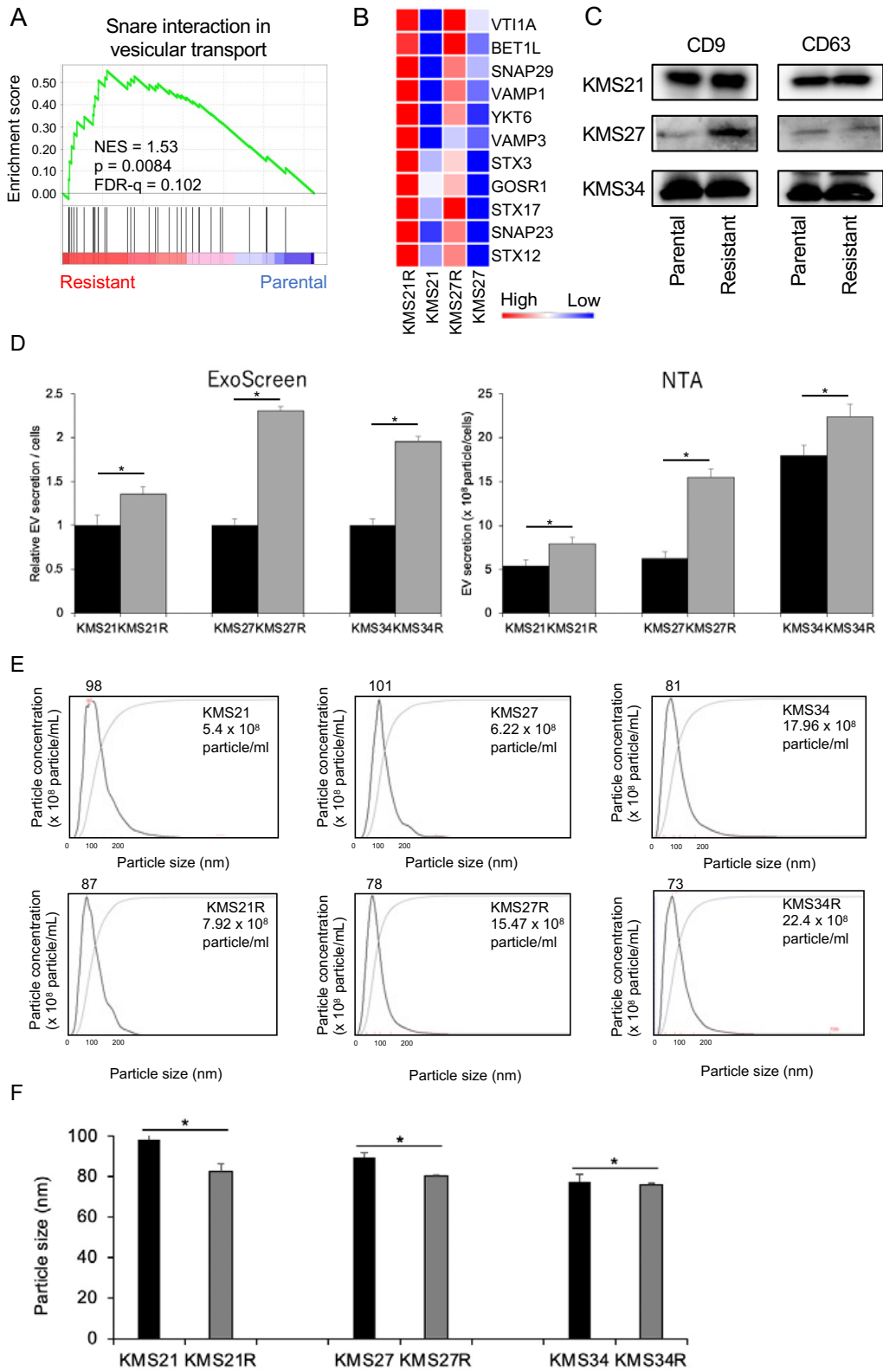


図 4. Len 耐性株における EV 分泌に関する検討

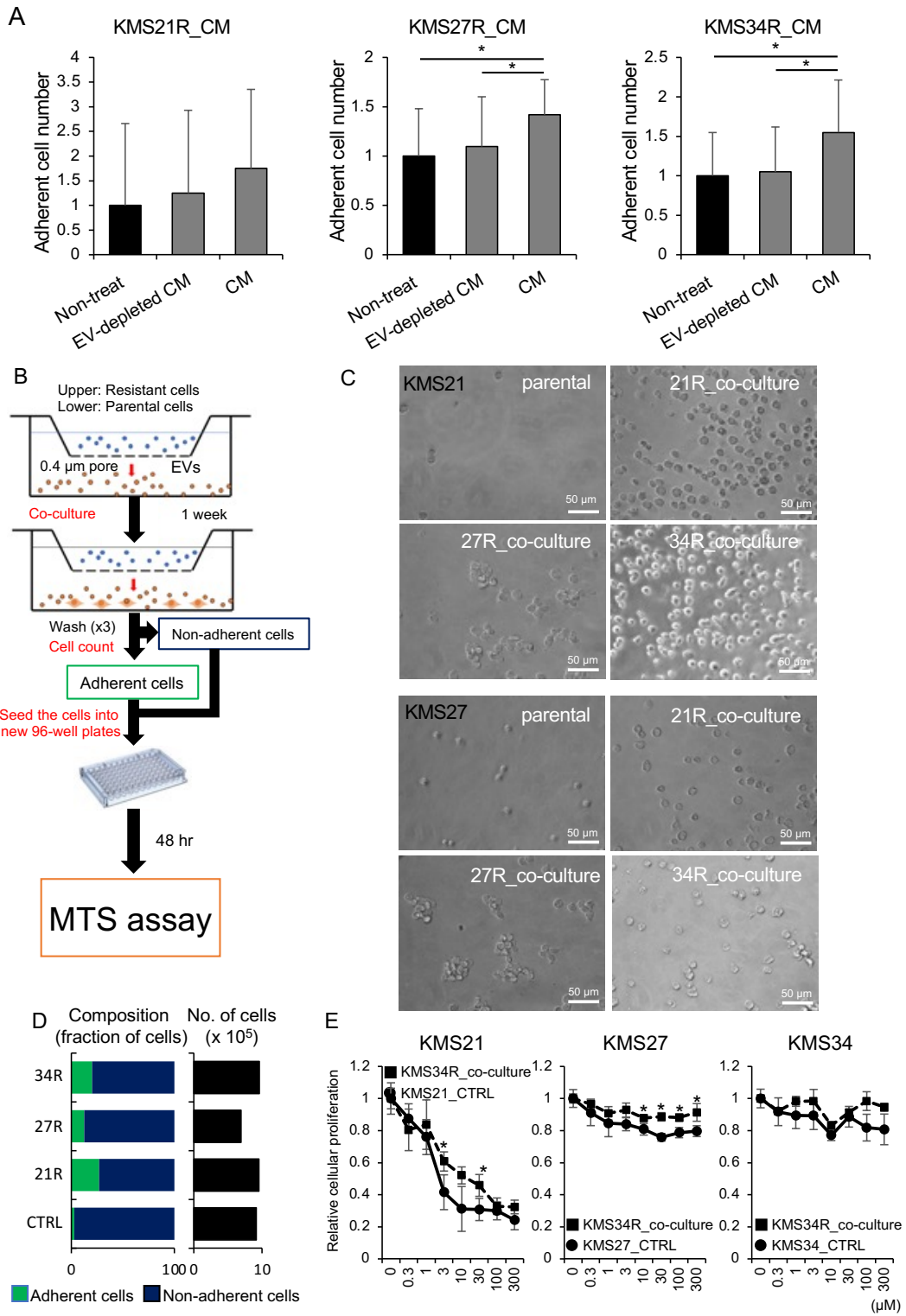
A. 親株と耐性株 (KMS21、KMS27、KMS21R、KMS27R) の GSEA 解析による、Len 耐性株において発現がエンリッチしている EV 生合成関連経路。NES: normalized enrichment score、FDR: False Discovery Rate。B. Snare interaction in vesicular transport 関連遺伝子の発現量を示したヒートマップ。C. MM 細胞由来の EV に含まれる代表的な EV マーカータンパク質のウエスタンブロット解析。検討には 500 ng の EV を使用した。D. (左) ExoScreen 法による EV 分泌量の測定。細胞を 72 時間インキュベートした後にシグナルを測定し、シグナルは細胞増殖率によって補正した。(右) Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) によって EV の分泌量を比較した。エラーバーは s.d. 値を示し、*, $p < 0.05$ を統計学的に有意とした。E. NTA 法による Len 耐性株と親株の EV 粒子の分布と最頻径 (nm) を示す。F. Len 耐性株と親株における EV 最頻径の比較。*, $p < 0.05$ を統計学的に有意とした。

3-3. Len 耐性 MM 細胞株由来 EV の Len 感受性株の細胞接着に対する影響の検討

次に、Len 耐性 MM 細胞が分泌する EV が Len 感受性の親株に与える影響について検討した。まずは超遠心法により耐性株由来 EV を回収し、それぞれ対応する親株に添加した。その際、EV 添加によって親株の Len 耐性と細胞接着能に変化があるのか確認した (図 5A)。超遠心法では液性因子のコンタミネーションの可能性が除くことができない。そのため、液性因子の影響を除くために、超遠心後の上清を EV 不含有な培地として使用した。この結果より、KMS27R、KMS34R 由来 EV を親株に添加すると、わずかではあるが有意に細胞接着を亢進することが示された。また、EV を除いた培地では細胞接着の亢進は見られなかったことから、培養液中の EV が重要であると示唆された。しかし、EV 添加では著明な細胞接着の亢進は認められなかった。その理由として、一時的な EV 添加では十分な EV が取り込まれず、持続的な EV の取り込みが重要ではないかと考えた。これを証明するために孔径 0.4 μm のトランズウェルを用いた共培養システムを使用した (図 5B)。このシステムでは、上側のチャンバーにいる Len 耐性細胞は下側のチャンバーに移動できず、可溶性タンパク質と EV のみが下側のチャンバーに移動することが可能である。まずは最も耐性の高い細胞株 KMS34R 細胞を上側のチャンバーに、感受性の高い細胞株 KMS21、KMS27、KMS34 を下側のチャンバーに播種した。1 週間の共培養後、PBS (-) で洗浄し、PBS (-) に含まれる非接着細胞とディッシュに接着した細胞数をそれぞれ数え、その細胞比を算出した (図 5C-D)。その後、回収した接着細胞と非接着細胞を再び混合し、新たに 96 ウェルに播種し、Len 存在下で 48 時間後に生存する細胞数を測定した (図 5E)。図 5C-D の結果より、Len 感受性株は Len 耐性株由来 EV

にさらされることで、細胞接着能が亢進した。しかしながら、細胞増殖は亢進しなかった。さらに、Len 感受性株 (KMS21、KMS27) は KMS34R 由来 EV にさらされることで、Len に対する抵抗性を獲得する傾向が見られた。一方、KMS34 細胞を KMS34R 細胞と共培養した場合は、親株が Len に対して耐性であったため、薬剤感受性に明確な変化は見られなかった (図 5E、右)。EV による Len 抵抗性獲得はそれぞれ親株に対応する耐性株と共培養した時、および、FN-coating したプレートを使用した同様の実験でも接着能の亢進、Len 抵抗性の獲得が確認できた (図 5F)。以上の結果から、Len 耐性株由来の EV には Len 感受性株の細胞接着能を亢進することが可能であり、その細胞接着能の亢進が Len 耐性獲得に重要である可能性が示唆された。

次に MM において細胞接着と薬剤耐性の関係がすでに報告がある (9-10)、MM 細胞の Len 耐性に対する細胞接着の影響を検討した (図 5G-H)。Non-coating プレートと超低接着プレートの 2 条件でそれぞれ耐性株の Len 感受性を比較解析したところ、KMS27R および KMS34R 細胞は超低接着条件下で Len に対する感受性が有意に回復し、Len 耐性において、細胞接着が重要であることがわかった (図 5H、中、右図)。一方、接着力が非常に弱い KMS21R 細胞の Len 感受性は、超低接着条件下でも変わらなかった (図 5H、左図)。



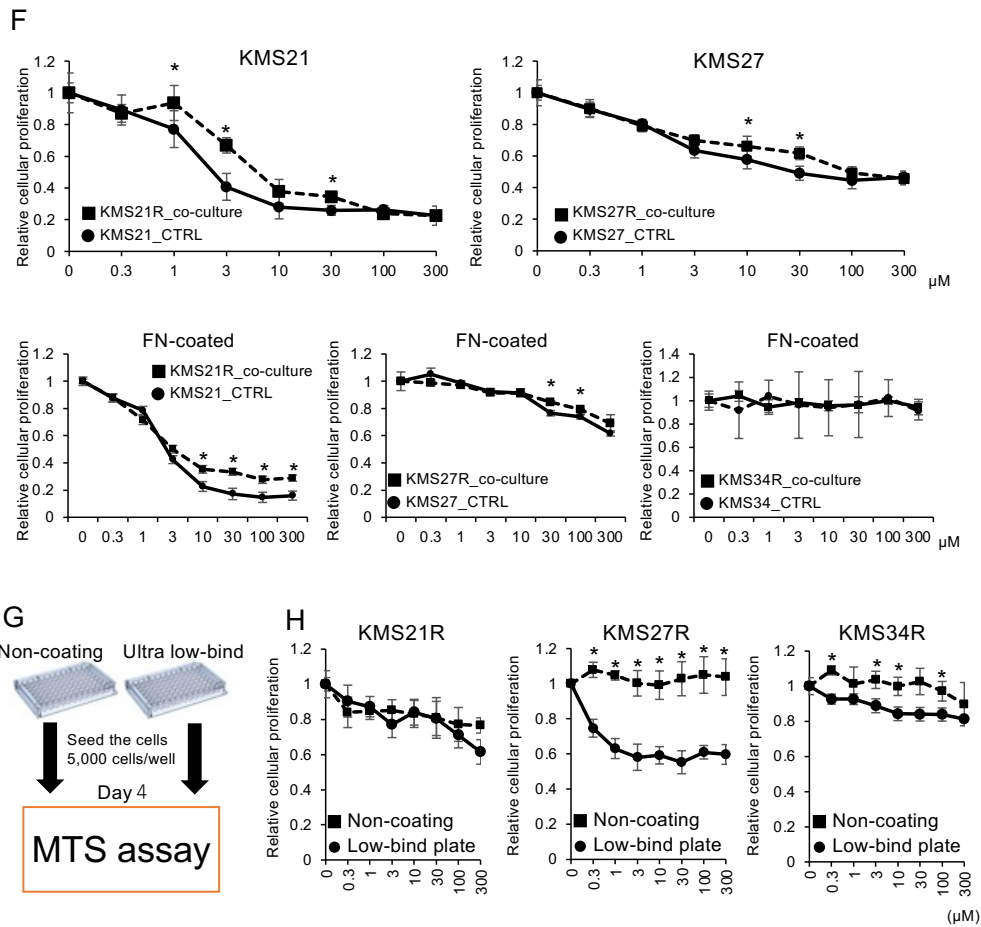


図 5. トランズウェルを用いた Len 耐性と細胞接着との関連の検討

A. Len 耐性株由来 EV 添加による親株の細胞接着能の変化を確認した。親株を播種後、それぞれ対応する耐性株由来 EV を 10 μg 添加した。48 時間後、接着した細胞数を数え、*, $p < 0.05$ を統計学的に有意とした。この際、液性因子の影響を見るため EV を除いた培地をコントロールとして使用した。B. トランズウェルを用いた共培養実験の説明図。上側チャンバーに耐性株、下側のチャンバーに親株を播種した。1 週間の共培養後、接着細胞と非接着細胞の数を測定した。細胞数測定後、細胞を新しい 96 ウェルプレートに再播種し、48 時間後に Len 感受性を測定した。C. Len 耐性株と共培養後の KMS21 および KMS27 細胞の顕微鏡写真 (Scale bar = 50 μm)。D. Len 耐性株と共培養後の KMS21 細胞株の接

着・非接着細胞の割合(左)。各耐性株を共培養した後の総細胞数を数えた(右)。

E. 親株(KMS21、KMS27、KMS34)を、KMS34R 細胞と共培養後に、親株の Len に対する感受性を確認した。エラーバーは s.d.値を示し、*, $p<0.05$ を統計学的に有意とみなした。F. 親株をそれぞれ対応する耐性株と共培養した後に細胞生存率アッセイを行った。Non-coating プレート(上)、FN-coating プレート (下)の結果を示す。*, $p<0.05$ を統計学的に有意とみなした。G. 超低吸着プレートを用いた実験手順。Len 耐性株を non-coating プレートと超低接着プレートに播種し、次いで Len を添加し、96 時間後の細胞生存率を測定した。H. 超低吸着プレートを用いた細胞生存率アッセイ。エラーバーは s.d.値を示し、*, $p<0.05$ を統計学的に有意とみなした。

3-4. Len 耐性株由来 EV を介した薬剤耐性と CRBN との関係性の検討

これまでの研究で、Len 耐性化機構は CRBN やその下流因子の遺伝子変異が重要だと報告されている (6-7)。そこで今回樹立された Len 耐性株における CRBN やその下流因子である IKZF1 や IKZF3 の薬剤耐性に対する寄与を検討した。まずは RNA シーケンスのデータより Len 耐性株 3 株で亢進している分子、パスウェイ、表現型の関連性をパスウェイ解析ソフトウェア (IPA) を使い、可視化した (図 6A)。さらに上流解析を行い、Len 耐性株において発現が亢進している、もしくは発現が抑制されている遺伝子を抽出した。その結果、耐性株で最も抑制されている遺伝子として IKZF1 や IKZF3 が確認できた (図 6B)。また Len を投与した際に発現が亢進する遺伝子を調べると、いずれも耐性株において発現が亢進していた (図 6C)。これは Len が樹立された耐性株においても作用していることを示しており、CRBN とは別の経路を介した薬剤耐性化機構の存在が示唆された。また、KMS27R 細胞株に対してレンチウイルスを用いて CRBN をノックダウンした sh-CRBN 株を作成した (図 6D-E)。作成した sh-CRBN 株を播種し、細胞形態や細胞接着能の変化を確認した (図 6E)。コントロールの KMS27R 細胞株と比較して、sh-CRBN 株の 2 株では細胞形態、および細胞接着能に有意な差はなかった。この結果もまた、樹立された Len 耐性株に CRBN とは別の経路を介した薬剤耐性機構がある可能性を示している。

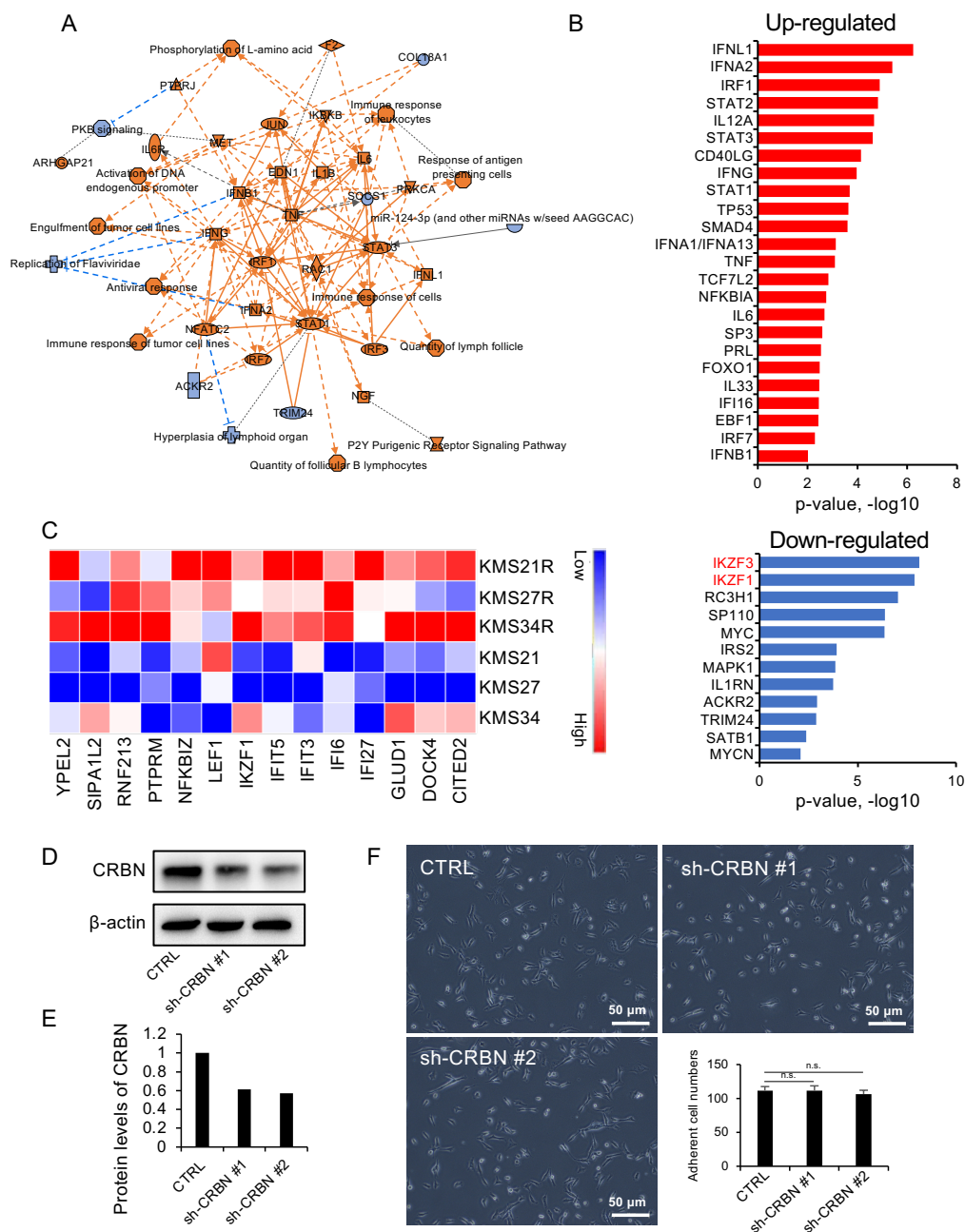


図 6. CRBN やその下流因子と薬剤耐性株との関連性の検討

A. IPA 解析による 3 種の耐性株で発現が亢進している遺伝子やパスウェイ。耐性株で発現量が 1.5 倍以上で p 値が 0.05 以下のものを抽出し、それら抽出された遺伝子を用いて解析をした。B. IPA 解析より、耐性株で発現が上昇、または発

現が抑制されている遺伝子。 $-\log_{10}(\text{p-value})$ の値をそれぞれグラフにした。 C. Len 投与により発現が変動する遺伝子群。 それぞれの遺伝子の発現量をヒートマップにした。 D. KMS27R 細胞にレンチウイルスを用いて作成した CRBN ノックダウン株の CRBN 発現量をウエスタンブロットで確認した。 検討にはタンパク質は 15 μg を使用した。 E. 上記 D における CRBN 発現量を定量化した。 発現量はコントロールの値で補正した。 F. 作成した CRBN ノックダウン株の細胞形態や接着能の変化を確認した (Scale bar = 50 μm)。 エラーバーは s.d.値を示す (n.s. = not significant)。

3-5. EV を介した細胞接着能の亢進による薬剤耐性獲得機構の探索

ここまで Len 耐性に細胞接着と EV が関わっていることが証明された。次にこれら EV を介した細胞接着を引き起こす責任遺伝子の探索を行なった。親株 (KMS21、KMS27、KMS34) と Len 耐性株 (KMS21R、KMS27R、KMS34R) の RNA シークエンスデータを比較して、それぞれ遺伝子の発現量が 1.5 倍以上、かつ $p\text{-value} < 0.01$ のものを選んで遺伝子リストを作成した (図 7A)。15,293 個の遺伝子から 118 個の遺伝子に絞った。これら 118 個の遺伝子に対して、Gene name and Exosome/Extracellular Vesicles/Endosome の単語を用いた Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>) での文献調査により、最終的にエンドソーム経路など、EV 分泌に関わる遺伝子 13 個を抽出した。KMS27R 細胞に対して、13 個の遺伝子の siRNA を用いて遺伝子のノックダウンを行なった。その際、Len 感受性、カスパーゼ活性、EV 分泌量をそれぞれ確認した (図 7B-E)。ノックダウンによって Len 感受性が回復し、アポトーシスを起こした遺伝子が 8 個に絞られた。それら 8 個の遺伝子 (*SORT1*、*LAMP2*、*USP25*、*RAD51AP1*、*PRTFDC1*、*AASS*、*CASP7*、*CLSTN3*) をプラスミドベクターを用いてノックダウンした際の EV 分泌量を ExoScreen で確認したところ、*SORT1*、*LAMP2* の 2 つの遺伝子の EV 分泌の減少、Len に対する感受性の回復、アポトーシスの誘導が認められた。実際、Len 耐性株において *SORT1*、*LAMP2* の発現量はタンパク質レベル (図 7F)、mRNA レベル (図 7G) どちらでも上昇していた。

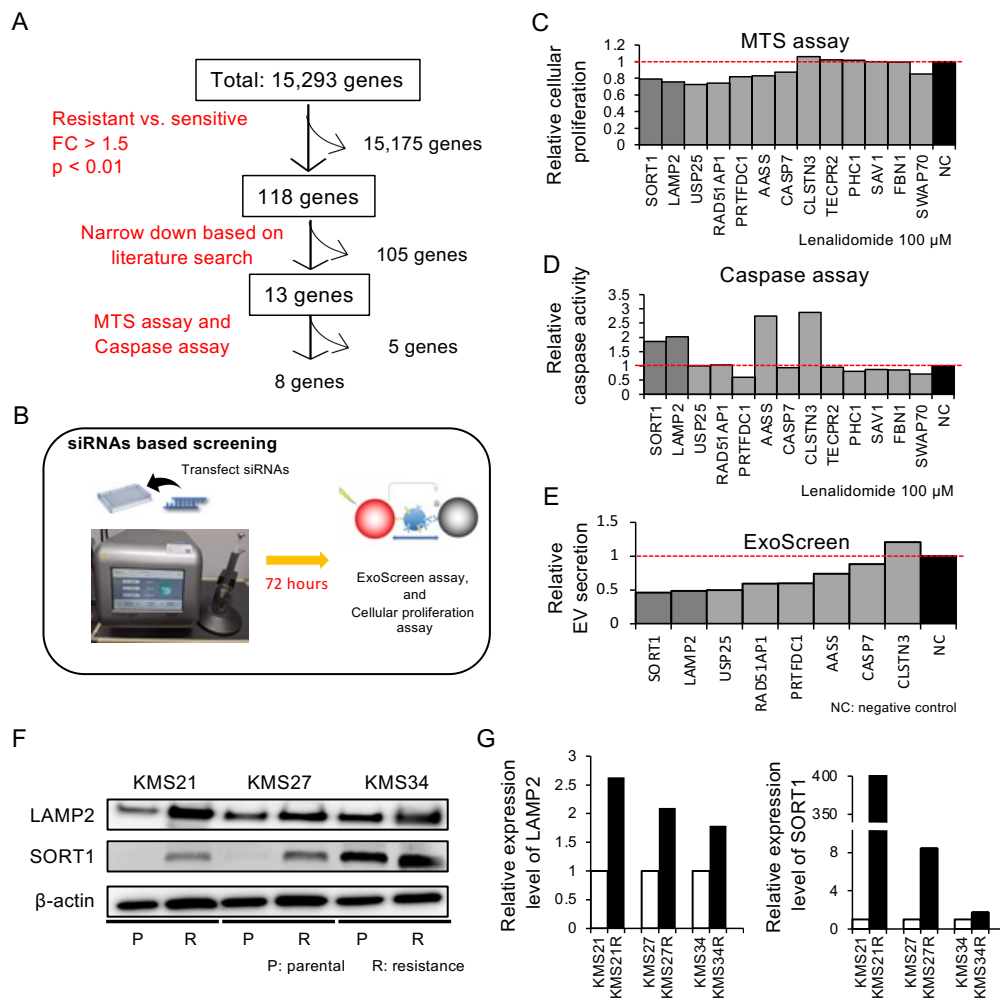
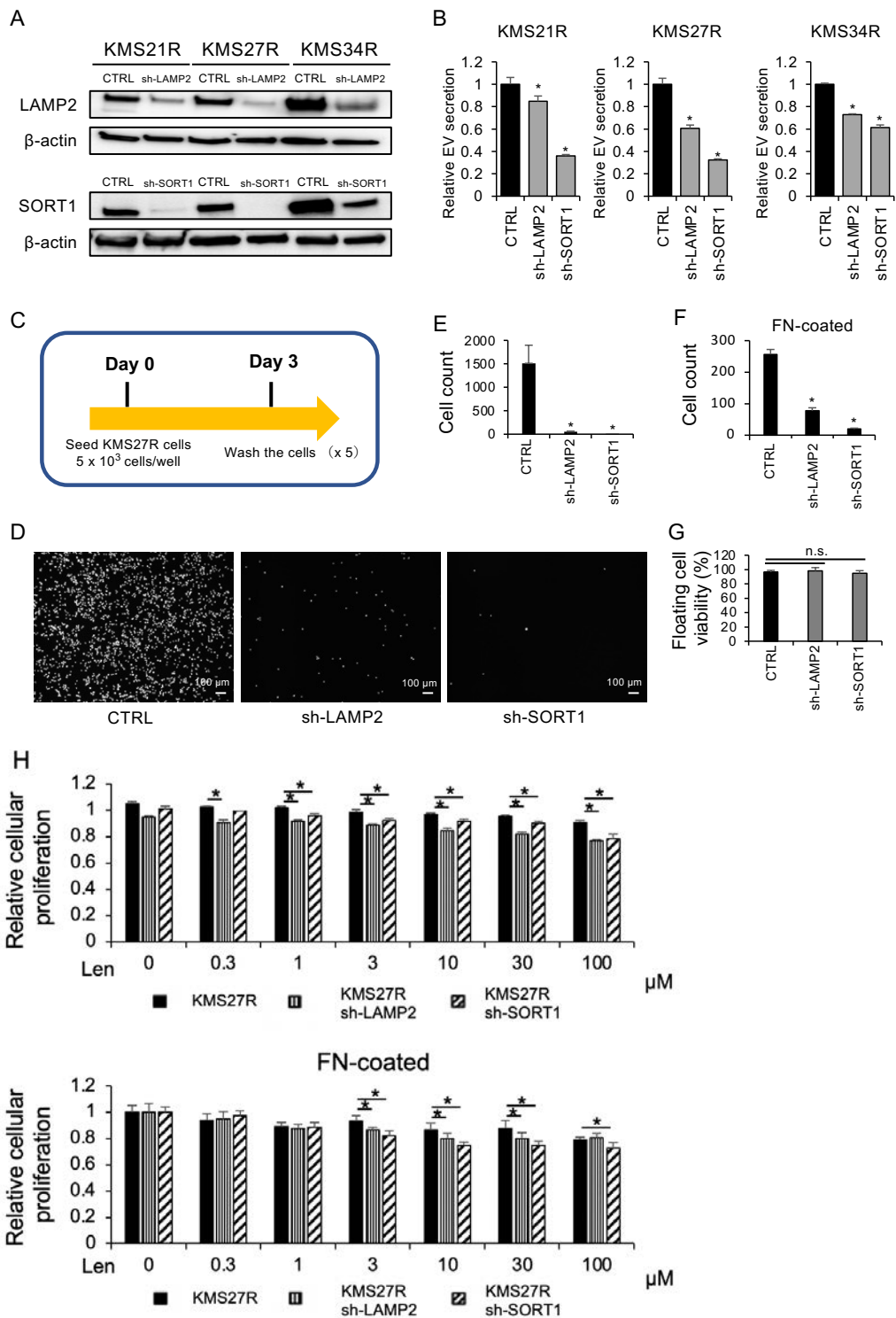


図 7. Len 耐性株において EV 分泌を促進する責任遺伝子の探索

A. Len 耐性株において EV 分泌を促進する責任遺伝子を、図に示す基準で絞った。発現量 1.5 倍以上、p 値が 0.01 以下を満たさない遺伝子を除外し、そこから文献検索によって絞り込みをした。最後にノックダウンした際の Len 感受性、カスパーゼの活性、EV の分泌量を確認した。B. MM 細胞へのエレクトロポレーション法による遺伝子導入。エレクトロポレーションは Pulse voltage = 1100 V, Pulse width = 20, Pulse number = 1 の条件で行った。siRNA を用いて一過性に遺伝子をノックダウンし、同時に Len を加え、72 時間後の細胞生存率、カスパーゼの活性、EV 分泌量を確認した。C-E. KMS27R 細胞に siRNA を遺伝子導入、

100 μ M の Len を添加し、72 時間後の細胞生存率 (C)、カスパーゼ活性 (D)、EV の分泌量 (E) をそれぞれ確認した。F-G. SORT1、LAMP2 の発現量をウエスタンブロット(F)と RT-PCR (G) で確認した。F. ウエスタンブロットでは 15 μ g のタンパク質を用いて検討を行った。G. 両遺伝子の発現量は親株の SORT1、LAMP2 の発現量で補正した。

そこで次にレンチウイルスベクターを用いて耐性株における *SORT1*、*LAMP2* のノックダウン株を作成した。ノックダウン効率はウエスタンブロットで確認した (図 8A)。作成したノックダウン株の EV 分泌量を ExoScreen 法で確認したところ、*SORT1*、*LAMP2* ノックダウン株どちらにおいても EV 分泌量が減少していた (図 8B)。さらに興味深いことにノックダウン株では耐性株における細胞接着能が減弱していることがわかった (図 8C-F)。なお、*SORT1*、*LAMP2* ノックダウンにより接着能を失った細胞の生存率は変化なかった (図 8G)。最後に *SORT1*、*LAMP2* ノックダウン株の Len 感受性を non-coating プレートと FN-coating プレートで確認した。KMS27R 細胞では *SORT1*、*LAMP2* をノックダウンすることで Len への感受性が有意に回復した。FN-coating したプレートでは non-coating プレートと比較して、より高い Len 濃度でのみ、感受性が回復した (図 8H、上 : non-coating プレート、下 : FN-coating プレート)。KMS21R についても同様に Len 感受性が一部回復した (図 8I、上 : non-coating プレート、下 : FN-coating プレート)。



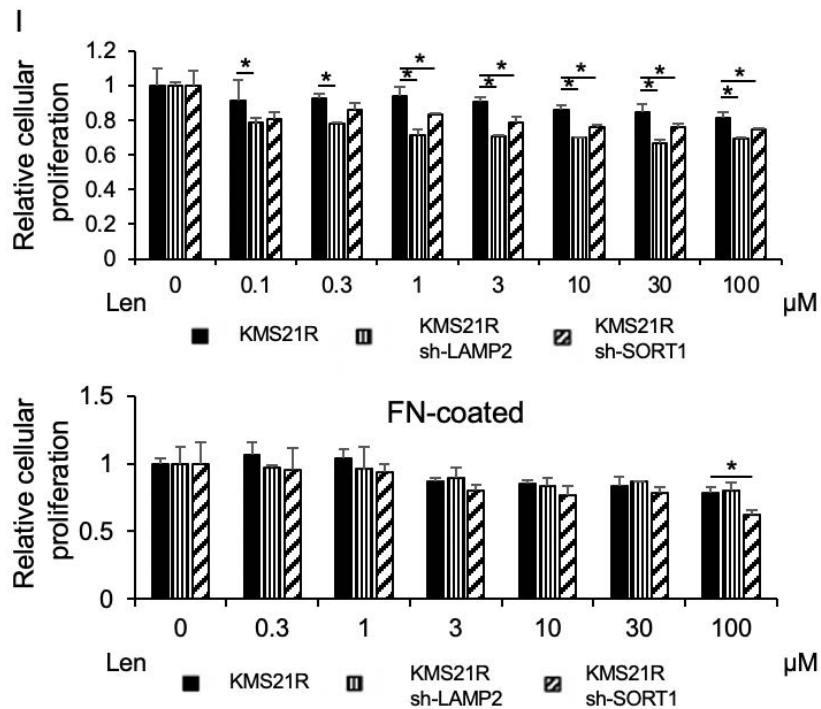


図 8. 恒常的な *SORT1*、*LAMP2* ノックダウン株の EV 分泌や細胞接着に関する検討

- A. 恒常的な *SORT1*、*LAMP2* ノックダウン株における *SORT1*、*LAMP2* の発現量をウエスタンブロットで確認した。検討には 15 μg のタンパク質を用いた。
- B. 恒常的な *SORT1*、*LAMP2* ノックダウン株における EV 分泌量を ExoScreen 法で確認した。エラーバーは s.d. 値を示し、*, p < 0.05 を統計学的に有意とみなした。
- C. 恒常的な *SORT1*、*LAMP2* ノックダウン株の細胞接着能を検討した。KMS27R 細胞株を用いて作成した *SORT1*、*LAMP2* ノックダウン株を播種し、72 時間後に PBS でプレート洗浄した後で、核を Hoechst33342 を用いて染色し、それぞれ数を数えた。
- D. non-coating プレートを用いた際の接着している細胞の顕微鏡写真を示す (Scale bar = 100 μm)。
- E. non-coating プレートを用いた際の接着している細胞の数を定量化した。エラーバーは s.d. 値を示し、*, p < 0.05

を統計学的に有意とみなした。F. FN-coating プレートを用いた際の接着している細胞の数を定量化した。エラーバーは s.d. 値を示し、*, $p < 0.05$ を統計学的に有意とみなした。G. *SORT1*、*LAMP2* を恒常的にノックダウンしたことで細胞接着能を失った細胞における細胞生存率を測定した (n.s. = not significant)。H-I. KMS27R (H)、KMS21R (I) 細胞株の恒常的 *SORT1*、*LAMP2* ノックダウン株の Len に対する感受性を non-coating プレートと FN-coating プレートを用いて確認した。エラーバーは s.d. 値を示し、*, $p < 0.05$ を統計学的に有意とみなした。

3-6. SORT1、LAMP2 と CRBN、既知の薬剤関連因子との関連性の検討

3-5 における検討により、SORT1、LAMP2 が MM の Len 耐性において EV 分泌を介して細胞接着を誘導し、Len 耐性を獲得させることがわかった。まずは同定した SORT1、LAMP2 が Len の標的分子である CRBN の発現量と相関するのかデータベース (GSE136324) を用いた解析を行なった (37)。データベースを用いた 300 人規模の解析では LAMP2 は CRBN と一定の相関が確認された (図 9A)。そこで、実際に SORT1、LAMP2 ノックダウンした Len 耐性株において CRBN の発現量を確認したが、発現量に変化は確認できなかったことから、SORT1 および LAMP2 は CRBN とは別の経路を介して薬剤耐性を誘導している可能性が考えられた (図 9B)。それに加えて、図 6B において Len 耐性株で STAT3 の発現亢進が確認できている。これまでに STAT3 シグナルは MM において薬剤耐性を誘導することが報告されている (46)。また、VLA-4 も MM の薬剤耐性に重要であると言われている (47)。そこで、これら薬剤耐性関連遺伝子と SORT1、LAMP2 との関連性を検討した。次に親株と Len 耐性株を用いて、Len 耐性との関連性について報告のある VLA-4、STAT3、p-STAT3 の発現量をウェスタンブロットによって確認した (図 9C)。VLA-4 の発現は Len 耐性株との関連性は見られなかったが、STAT3 は耐性株にて発現上昇し、それに伴って、p-STAT3 の発現上昇も確認できた。さらに SORT1、LAMP2 ノックダウン株にて STAT3、p-STAT3 の発現低下が見られた (図 9B)。これより、Len の長期低濃度暴露によって樹立された耐性株では SORT1、LAMP2 遺伝子の発現亢進に加え、STAT3 シグナルを介した薬剤耐性機構が関与していることが示唆された。

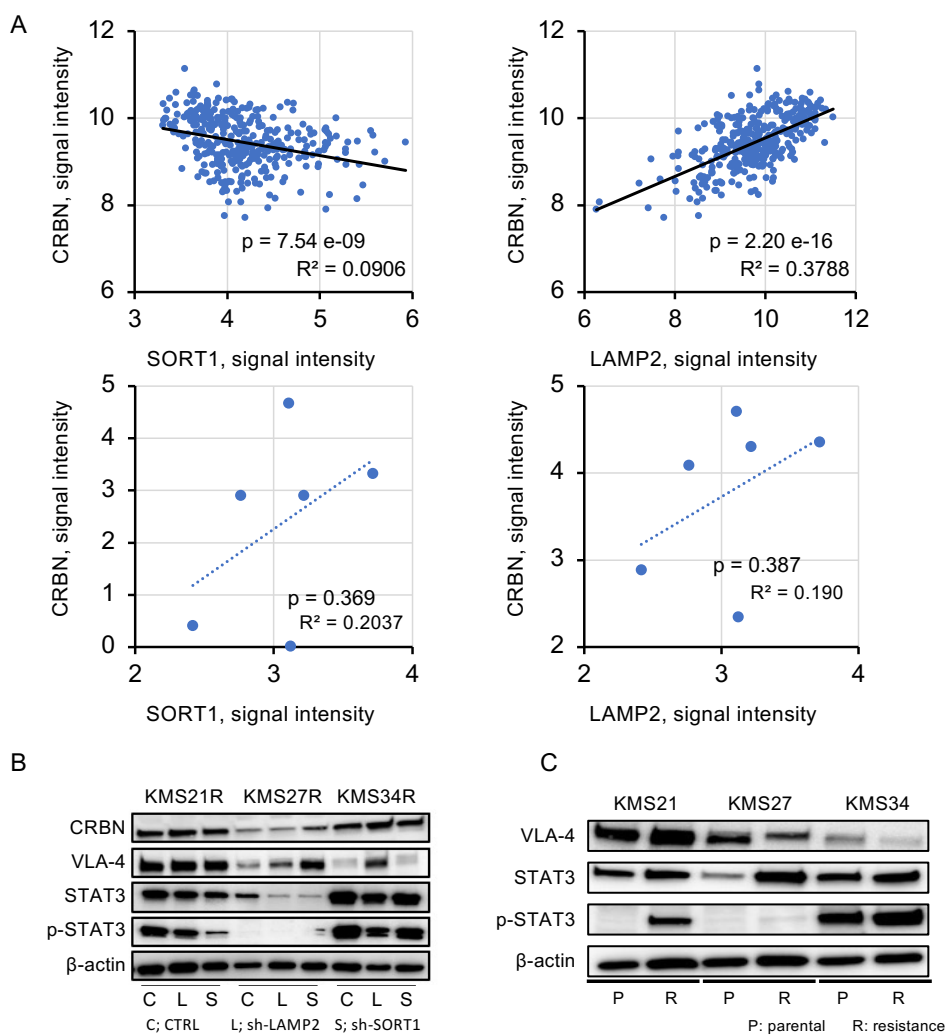


図 9. SORT1、LAMP2 と CRBN との関連性の検討

A. GSE136324 のデータセット (上) と我々の細胞株 (下) における SORT1、LAMP2 と CRBN の遺伝子発現量の相関性を確認した。R² は相関係数を示す。

B. SORT1、LAMP2 を恒常的にノックダウンした耐性株における CRBN、VLA-4、STAT3、p-STAT3、 β -actin の発現量をウエスタンブロットで確認した。検討にはタンパク質は 15 μ g を使用した。C. 親株と耐性株における VLA-4、STAT3、p-STAT3、 β -actin の発現量をウエスタンブロットで確認した。検討にはタンパク質は 15 μ g を使用した。

3-7. 遺伝子発現データベース解析を用いた *SORT1*、*LAMP2* の発現と予後の検討

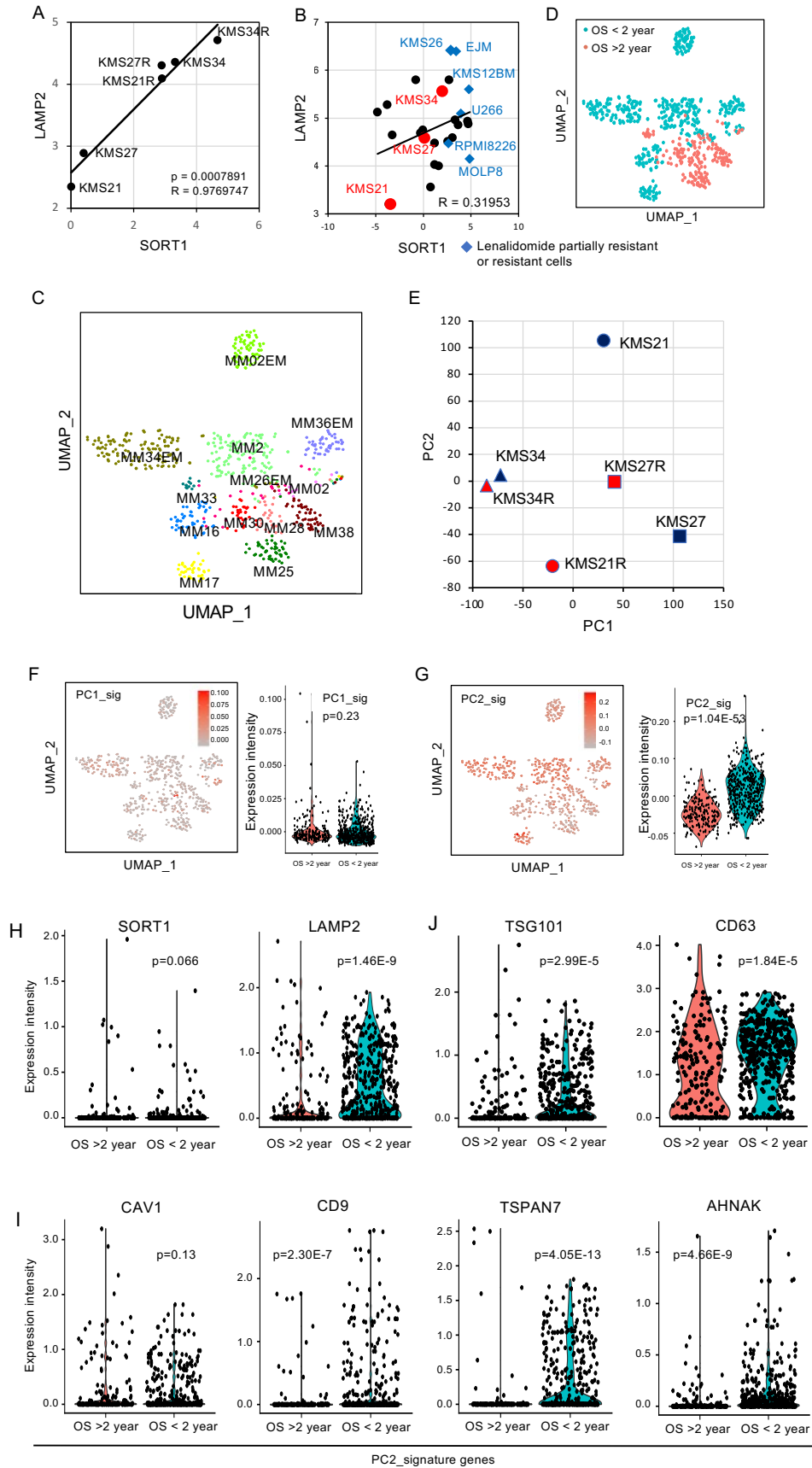
SORT1 遺伝子と *LAMP2* 遺伝子発現レベルに相関性が報告されていることから (48)、本研究で用いた細胞株では *SORT1* 遺伝子と *LAMP2* 遺伝子の発現量の相関性を検討した。その結果、有意な相関性があることが判明した (図 10A : $R = 0.98$ 、 p 値 ; $p < 0.001$)。次に、各種 MM 細胞株における両遺伝子発現を Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) データベースで検討したところ、一定の相関性が観察された (図 10B)。Len に耐性であるという報告がある細胞株では (図 10B 中の◆) (8, 49)、*SORT1* および *LAMP2* 遺伝子の発現量が高い傾向が認められた (図 10B)。

次に、公開されている MM データセット (38) のシングルセルトランスクリプトームプロファイルを解析し、EV 分泌と細胞接着が MM 患者の予後と関連しているかどうかを検討した。このデータセットには、9 名の患者の骨髄 (BM) および 4 名の患者の髄外病変部位 (EM) 由来の骨髄腫細胞が含まれている (図 10C)。13 名の患者を、発症してから予後 2 年未満の 7 名と予後 2 年以上の 6 名の 2 群に分けた (図 10D)。本研究で使用した 6 つの MM 細胞株の RNA-seq データを、主成分分析 (PCA プロット) した。その結果、PC1 は細胞株の種類で値が近いことから、PC1 シグネチャーが細胞株間の違いを表し、PC2 シグネチャーが Len に対して高い感受性を持つ KMS21 のみ高く、他の細胞と値が離れていることから、PC2 シグネチャー薬剤感受性の違いを表している可能性が示唆された (図 10E)。PC1 および PC2 のシグネチャー遺伝子を表 2 に示す。そこで、MM 患者のシングルセル RNA-seq データで PC1 と PC2 のシグネチャー遺伝子群 (図 10F-G) の発現量を観察したところ、全生存期間 (OS) < 2 年の患者では PC2 のシグネチャー遺伝子群が有意に濃縮されていたが (図 10G、

右)、PC1 のシグネチャー遺伝子群では有意差は見られなかった (図 10F、左)。PC2 シグネチャーには EV 分泌と細胞接着に関連する遺伝子が含まれていたため (表 2、下)、この結果は、PC2 シグネチャーに含まれる遺伝子の発現上昇が MM 患者の予後不良に関連している可能性を示唆している。さらに、LAMP2 は、OS が 2 年未満の患者において有意に発現が上昇していたが、(図 10H、右)、SORT1 の発現レベルは有意な差は認められなかった (図 10H、左)。PC2 シグネチャーでは、CAV1、CD9、TSPAN7、AHNAK などの EV 分泌に関わる遺伝子が OS が 2 年未満の患者に高発現していた (図 10I)。加えて、PC2 シグネチャーに含まれない代表的な EV マーカー遺伝子である CD63 と TSG101 も、OS < 2 年の患者で有意に上昇していた (図 10J)。CD44 などの細胞接着に関わる遺伝子も OS が 2 年未満の患者に高発現していた (図 10K)。

表 2. 主成分分析による **PC1**、**PC2** シグネチャー遺伝子

PC1_signature gene	<i>CGB7</i>	<i>PEG3-AS1</i>	<i>CELP</i>	<i>NOS1</i>	<i>CHL1</i>
	<i>CLDN22</i>	<i>PHYHIPL</i>	<i>ECE2</i>	<i>DCHS2</i>	<i>PDE11A</i>
	<i>CYP2A6</i>	<i>PKD2L2</i>	<i>PCNA-AS1</i>	<i>SLC1A2</i>	<i>SHC3</i>
	<i>FUT6</i>	<i>PLGLA</i>	<i>OCM</i>	<i>LAMA3</i>	<i>GPR26</i>
	<i>KCNIP4</i>	<i>RIMS4</i>	<i>LOC440895</i>	<i>PTGER3</i>	<i>PRAMEF14</i>
	<i>LYPD1</i>	<i>SPATA22</i>	<i>USP17L5</i>	<i>GABRA4</i>	<i>FBN3</i>
	<i>NBPF14</i>	<i>SPRR2B</i>	<i>GRIN2B</i>	<i>CR1</i>	<i>COL6A5</i>
	<i>OR1E1</i>	<i>SPRR2E</i>	<i>TMEM155</i>	<i>MXRA5</i>	<i>ADAM12</i>
	<i>OR2T12</i>	<i>TP53TG5</i>	<i>LONRF2</i>	<i>NCR3</i>	<i>KCNK10</i>
	<i>PCDHB8</i>	<i>TSSK2</i>	<i>MUC21</i>	<i>ADAMTS5</i>	<i>PARVA</i>
PC2_signature gene	<i>ITM2C</i>	<i>EYA2</i>	<i>TMSB15A</i>	<i>SULF1</i>	<i>PFKP</i>
	<i>CTHRC1</i>	<i>ITM2A</i>	<i>CAV1</i>	<i>JUP</i>	<i>IGF2BP3</i>
	<i>CD9</i>	<i>PTP4A3</i>	<i>FGFR3</i>	<i>FUCA2</i>	<i>CD44</i>
	<i>HES6</i>	<i>CA2</i>	<i>GPAT2</i>	<i>TSPAN7</i>	<i>RASSF4</i>
	<i>ANXA1</i>	<i>PEG10</i>	<i>CDH2</i>	<i>TUBB3</i>	<i>PFN2</i>
	<i>IDH2</i>	<i>AHNAK</i>	<i>TUBB2B</i>	<i>LRIG1</i>	<i>DSG2</i>
	<i>ITGB7</i>	<i>GPRC5D</i>	<i>CYB5A</i>	<i>CLU</i>	<i>MAF</i>
	<i>GAS6</i>	<i>MEST</i>	<i>PLD4</i>	<i>TMEM173</i>	<i>AP1S2</i>
	<i>MCAM</i>	<i>AGT</i>	<i>CST3</i>	<i>PDLIM1</i>	<i>PDE3B</i>
	<i>MARCKSL1</i>	<i>PTPRCAP</i>	<i>RCN1</i>	<i>TIMP2</i>	<i>SLC16A14</i>



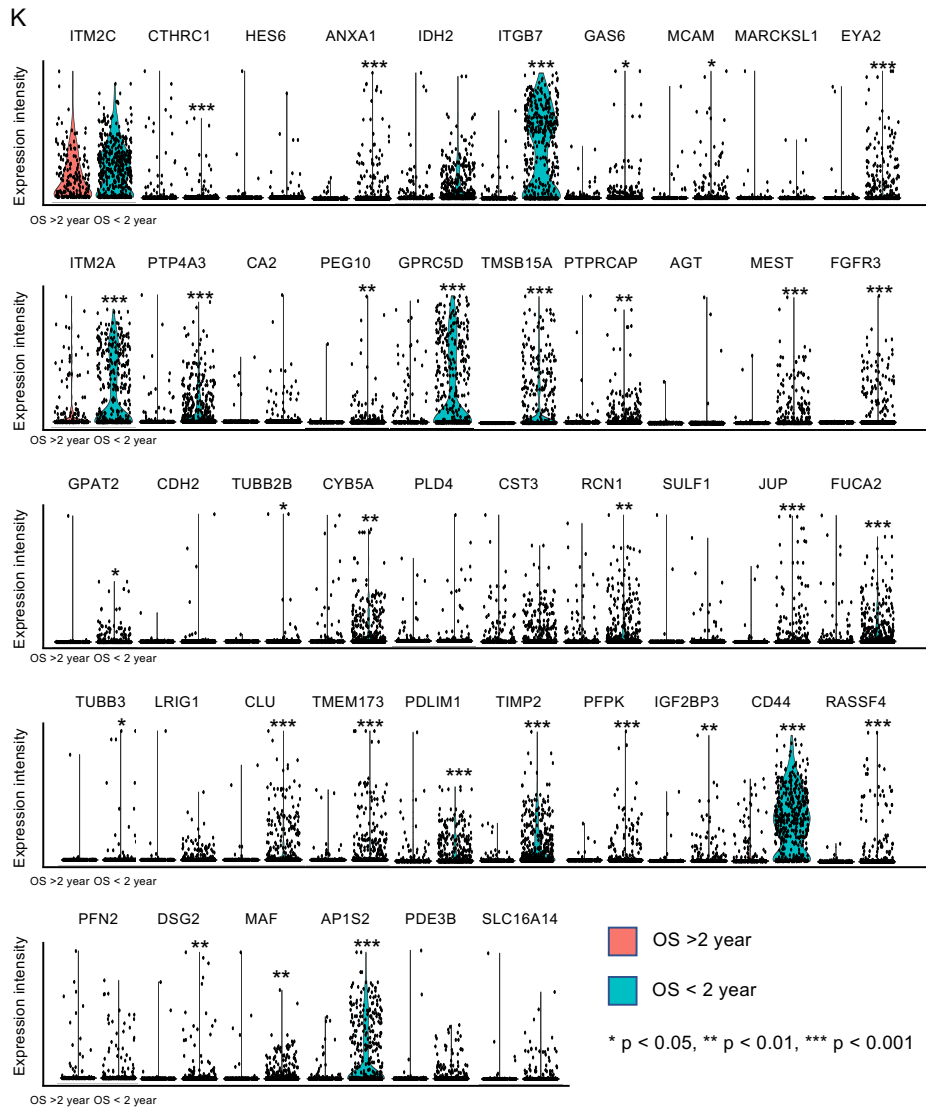


図 10. 遺伝子発現データベース解析を用いた *SORT1*、*LAMP2* の発現の検討

A-B. 我々の細胞株のデータ(A)と CCLE 上に存在する MM 細胞株のデータ(B)における *SORT1* と *LAMP2* の発現量の相関性を確認した。R は相関係数を示す。

B. 赤い●は我々の細胞株を表し、◆は Len に対して耐性を持つと報告がある細胞株を示している。C. UMAP プロット。それぞれのドットは細胞を表し、患者ごとに色を分けた。EM: derived from extramedullary sites。D. MM 患者由来の細胞を全生存期間の長さで分類した UMAP プロット。それぞれのドットは細胞

を表し、全生存期間が 2 年以上と 2 年未満で分類した。E. 我々の細胞株のデータを用いて PCA 解析を行い、PC1 シグネチャーと PC2 シグネチャーをそれぞれプロットした。F-G. PC1/PC2 シグネチャーの発現量によって分類した UMAP プロット (左) とそれぞれの細胞を予後 2 年以上か 2 年未満で分けた時の PC1/PC2 シグネチャーの発現量をヴァイオリンプロット (右) で検討した。H-I. それぞれの細胞を予後 2 年以上か 2 年未満で分けた時の *SORT1*、*LAMP2* の発現量 (H)、PC2 シグネチャーに含まれる EV 関連遺伝子の発現量 (I)、PC2 シグネチャーには含まれていないが、一般的な EV 生合成に関わる遺伝子の発現量をヴァイオリンプロットで検討した。K. それぞれの細胞を予後 2 年以上か 2 年未満で分けた時の *CD44* などの細胞接着因子を含む PC2 シグネチャー遺伝子の発現量をヴァイオリンプロットで検討した。

さらに、新規に MM と診断された患者約 300 人を含むマイクロアレイデータセット (GSE19784) を解析した (図 11A-B) (39)。 Kaplan-Meier 解析の結果、*LAMP2* の高発現プロファイルは、OS (図 11A、右図) と無増悪生存期間 (PFS) (図 11B、右図) の両方において予後不良と有意に相関していることが示された。一方、*SORT1* が高発現している患者では、予想に反して OS および PFS が延長していた (図 11A-B、右図)。この原因として GSE19784 で用いたデータセットには Len を投与された患者が含まれていなかったことが考えられた。そのため、Len を投与された 200 名以上の患者 (TT3b, TT4, TT5) を含む GSE136324 を解析した (37)。*SORT1* の高発現は、予後不良と有意に相関していた (図 11C)。このことより、*SORT1* の発現レベルが、患者の Len 抵抗性に直接関係している可能性を示唆している。このように、データベース解析からも、*SORT1* と *LAMP2* が介在すると思われる EV 分泌と細胞接着が、Len 耐性を導き、Len を含むレジメンによる治療を受けた MM 患者の予後不良と関連していることが明らかになった。

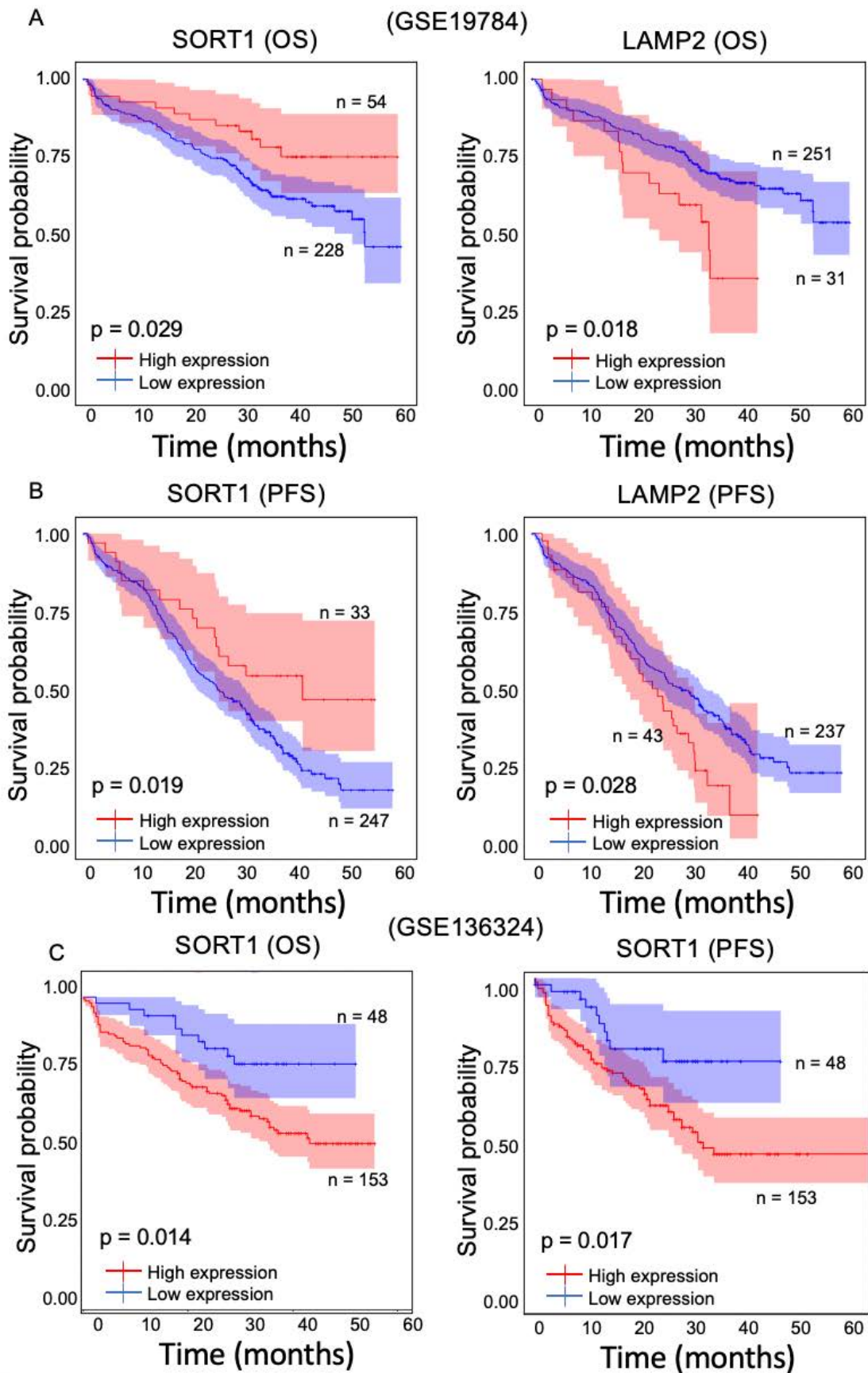


図 11. SORT1、LAMP2 遺伝子発現と予後との検討

A-B. SORT1 および LAMP2 の発現プロファイルを使用して (GSE19784)、全生存期間 (OS) (A) および無増悪生存期間 (PFS) (B) における生存曲線を作成した。SORT1 の発現は ROC 曲線を書き、最も有意差がつく、OS (高発現群 : n=54、低発現群 : n=228) および PFS (高発現群 : n=33、低発現群 : n=247) で分けた。LAMP2 の発現も、ROC 曲線を書き、最も有意差がつく、OS (高発現群 : n=31、低発現群 : n=251) および PFS (高発現群 : n=43、低発現群 : n=237) で分けた。

C. GSE136324 データセットの SORT1 発現プロファイルを用いて全生存期間 (OS) (左) および無増悪生存期間 (PFS) (右) における生存曲線を作成した。SORT1 の発現は、OS (高発現群 : n=153、低発現群 : n=48) および PFS (高発現群 : n=153、低発現群 : n=48) で分けた。

4. 考察

EV を標的とする、がんの新たな治療戦略の可能性を示唆する証拠が近年、蓄積されている (50)。がん細胞における EV の分泌機構を理解することは、この戦略を成功させる上で重要である。しかし、がん細胞における EV の生合成のメカニズムは、由来する細胞によって分泌経路が異なると考えられているため、依然として不明な点が多い (51)。一般に、がん細胞は正常細胞よりも多くの EV を分泌する (52)。この特徴は、がん細胞由来の EV を標的とした治療法が理にかなっていることを示している。本研究では、Len 耐性細胞株で高発現し、MM 細胞株における EV 分泌と細胞接着を促進する EV 分泌関連遺伝子 *SORT1*、*LAMP2* を新たに同定した。この結果は、Len 耐性 MM 細胞由来の EV が、感受性 MM 細胞株に対して部分的に耐性を付与していることを示している。EV が内包する様々な生理活性物質の効果を考慮すると、EV 内または EV 上に存在するどのような分子が MM 細胞における Len 抵抗性に関与しているかが、重要である。例えば、*Safaei* らは、以下の報告をしている。卵巣がん細胞にライソゾームタンパク質が異常に蓄積し、シスプラチントランスポーターが EV に搭載される (53)。すると EV 内にシスプラチンが取り込まれ、がん細胞からシスプラチンが排出されることでシスプラチンへの耐性を示す。さらに、EV で輸送された含有物は腫瘍微小環境の遺伝子変化を誘発するため、薬剤耐性を持つがん細胞はこの機構を乗っ取って感受性細胞に耐性を付与する(27, 53)。EV を介した薬剤耐性については固形がんでは多く報告されている (54-58)。また、別の例として口腔扁平上皮がんでは *Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)* のシグナルが亢進している。そのため、セツキシマブは *EGFR* を標的とした分子標的薬として口腔扁平上皮がんの治療に使われている (59)。しかし、セツキシ

マブによる抗腫瘍効果は部分的なもので、一部のがん細胞が生き残る。生き残った細胞は、正常細胞よりも多くの EGFR を発現する EV を分泌することがわかっている。この EGFR を発現した EV がデコイとしてセツキシマブと作用し、セツキシマブ耐性を獲得する。この場合は単純に EV の分泌を止めるのみでセツキシマブへの感受性が回復した。このように、がん治療を考える際には、がん細胞だけでなく、がん細胞から分泌される EV についても、考慮することが重要である。

本研究には大きく 2 つの限界がある。一つは、SORT1 と LAMP2 経路による EV 分泌を抑制することが、薬剤耐性に重要なのか、もしくは単純に EV 分泌抑制のみで Len の感受性を回復させることが可能であるかを検討できなかったことである。これは、MM 細胞における EV 分泌を効率的に抑制する方法がないためである。我々は、EV の分泌抑制に広く使用されている nSMase2 阻害剤 GW4869 を試した。しかし、GW4869 投与による MM 細胞の EV 分泌抑制効果は多くても 20%程度であり、EV 分泌抑制による Len の感受性回復効果を十分に評価することができなかった。SORT1 と LAMP2 が MM の EV 分泌を正に制御していることがわかったが、我々は、薬剤耐性を感受性細胞に伝播させる重要な因子を含んでいると思われる耐性細胞の EV の内容物は検討できていない。したがって、EV を介した薬剤耐性の鍵となる分子の同定は重要であり (60-61)、これが次の課題の一つである。これらを解明するためには、まずは耐性株由来 EV が受け手細胞に何を伝えているのか、EV の含有物の検討が必須の課題である。これにより、単なる EV の分泌阻害で Len 耐性株が感受性に戻るのか、SORT1、LAMP2 といった特定の経路から分泌される EV の分泌を止めることが重要なかが明らかとなる。また、耐性株由来 EV の内容物を理解することは、どのようなシグナルが受け手細胞で活性化するのかを知る上でも重要である。

また、KMS27R と KMS34R 細胞では、円形から紡錘形への形態変化も観察された。MM では、BMSC など骨髄微小環境内との細胞接着が薬剤耐性獲得に重要である (62-64)。EV を介した細胞間コミュニケーションでは、受け手細胞を考えることも重要である。細胞接着は、骨髄微小環境における他の細胞への EV の効率的な移動に寄与していると考えられている。Kohmo らは、肺がん細胞が CD9 を高レベルで発現し、細胞接着能の増大が薬剤耐性を高めることを示した(65)。我々の耐性細胞由来 EV やデータベース解析において予後不良の症例にて、CD9 が高発現していることが確認された。これらの結果から、耐性細胞由来の EV が受け手である薬剤感受性細胞に移行し、Len 感受性細胞膜表面への CD9 発現につながった可能性が示唆された。このように、がん細胞由来 EV は様々な細胞に作用し、薬剤耐性を引き起こすこともわかっている (66-67)。例えば、代謝のリプログラミングは、がんの大きな特徴の一つである。Tumor-associated macrophage (TAM) が、骨髄内特異的な long non-coding RNA である HIF-1 α -stabilizing long noncoding RNA (HISLA) を EV を介して伝達することが報告されている (66)。HISLA は乳がん細胞の好氣的な解糖とアポトーシス抵抗性を高める。逆に、腫瘍細胞から放出される乳酸は、マクロファージの HISLA 発現を上昇させ、TAM と腫瘍細胞の間で相互に作用しあう。EV から伝達される HISLA をブロックすると、*in vivo* で乳癌の解糖と化学療法抵抗性が阻害される。臨床的にも、TAM における HISLA の高発現は、乳がん患者の解糖、化学療法への反応性低下、生存期間の短縮と関連している。他にも、神経膠芽腫は致死的ながんである。その理由として腫瘍の遺伝的およびエピジェネティックな変異が複雑であり、MM 細胞同様に、すべての腫瘍細胞を根絶する治療法の開発は困難だからである (67)。神経膠芽腫は脳周囲の他の細胞とのコミュニケーションをとることで、周囲の細胞の性質を作り変えることが可能であり、これが腫瘍の進

行と治療への耐性を誘導する。神経膠芽腫細胞は自然免疫細胞を動員し、腫瘍の成長をサポートするようにその表現型を変化させ、適応免疫応答を抑制する。神経膠芽腫はまた、内皮細胞、ニューロン、アストロサイトなどの正常な脳細胞を破壊し、腫瘍の成長に有利な微小環境を作り出す。この神経膠芽腫による脳の正常細胞を自身に都合よく作り変える能力は、ケモカインやサイトカインなどの可溶性因子、細胞間の直接接触、EV (エクソソームやマイクロベシクルを含む) など、複数のコミュニケーションが関与している。腫瘍とその周囲の細胞との多次元的なコミュニケーションを理解することで、新たな治療法の開発につながる可能性がある。つまり、今回同定した **SORT1**、**LAMP2** に関してもがん細胞同士ではなく、受け手となる細胞についても考え、動物実験や **BMSC**・免疫細胞との高度な *in vitro* での共培養系での実験など、さらなる検討が必要である。今回の実験は全て *in vitro* でされたものであり、理想的には、**MM** 細胞の *in vivo* イメージング等により、**MM** において耐性細胞がどのように存在し、感受性細胞が薬剤耐性細胞へと移り変わるのかについて、より深い研究が必要である。

SORT1 は、エンドソームと関連していることが知られている。他に、転移性がん患者の循環内皮細胞で **SORT1** 遺伝子が高発現していることが報告されており (68)、**SORT1** は転移にも関連している可能性がある。**MM** では、通常、**MM** 細胞は骨髄で増殖するが、一部の症例では、**MM** 細胞が骨髄外に髄外病変 (**EMD**) を形成することがあり、**MM** の予後不良と密接に関連している (38)。**EMD** 発生の分子機構はほとんど解明されていない (69)。シングルセル解析の結果では、**EMD** から採取された細胞で **PC2** シグネチャーの高発現が確認された。これは **EV** 分泌に関連する遺伝子が **EMD** の細胞で高発現していることを示している。また、転移先のがん細胞は原発巣のがん細胞と比較してより多くの **EV** を分泌していることがわかっている (70)。今回、**MM** 細胞において **SORT1** が **EV**

分泌を促進していることが示されたので、**SORT1** の高発現は **EMD** と関連している可能性も考えられる。

一方、**LAMP2** は、シャペロンを介したオートファジー経路のキータンパク質として知られ、その発現は乳癌組織で上昇していることが報告されている (71)。*Qadir* らは、**LAMP2** と **EV** の関係を明らかにした (72)。**EV** は早期エンドソームから後期エンドソーム (**Multivesicular body; MVB**) を経て、細胞膜と膜融合することで分泌される (15)。**MVB** には他にもリソソームと融合し、オートファジーによって **EV** 内のものを分解することも可能である。正常細胞では **MVB** 内の不要なものがリソソームと融合することで分解される。頸部扁平上皮がん細胞株では、正常細胞由来の **EV** ではなく、がん細胞由来の **EV** が特異的に **LAMP2** の発現を調節することが示されており、オートファジーが抑制されるとその代償として細胞膜との融合が起き、**EV** 分泌が増えるとされている (73)。つまり、**MM** 細胞では **LAMP2** を介してオートファジーが抑制されることで、**EV** 分泌が増えている可能性も考えられる。しかしながら、今回の検討では **SORT1** と **LAMP2** が **EV** の生成の過程もしくは分泌の過程どちらに関与するのか確定できていない。例えば、**Acute myeloid leukemia (AML)** の患者の多くは、化学療法後に再発すると言われている。これは **MM** と同じく、主に薬剤耐性が原因である (70)。**AML** 細胞由来の **EV** は、抗アポトーシスタンパク質や耐性遺伝子を受け手の細胞に送達することにより、白血病の薬剤耐性に重要な役割を果たす。**EV** 分泌量は、診断時から **AML** 患者の血漿中で上昇し、化学療法後の完全寛解に至った症例でも **EV** 分泌量は増加したままであった。これはシタラビンやデシタビンに暴露された **AML** 細胞では、コレステロールとコレステロール合成メバロン酸経路の律速酵素である **HMGCR (3-ヒドロキシ 3-メチルグルタリル-コエンザイム A 還元酵素)** の細胞内濃度が著しく増加していることが原因である。

これはコレステロールなどの脂質が EV の合成に必要不可欠であり、コレステロール合成が促進したことによって、EV の素材が増え、結果として合成される EV の量が増えたと考えられる。HMGCR 阻害剤のシンバスタチンや HMGCR を標的とした siRNA の投与は、化学療法による AML 細胞の EV 分泌の亢進を阻害し、細胞内のコレステロールを低下させ、AML 細胞の増殖を抑制した。つまり、HMGCR の阻害は、AML のコレステロール駆動型薬剤抵抗性をもたらす EV シグナルを阻害することが治療につながる可能性を示している (70)。この場合のように SORT1、LAMP2 による EV の分泌促進は EV の合成が亢進しているのか、それとも細胞内から外に分泌する機構が亢進しているのか理解をすることが必要である。つまり、もう一つの限界は、EV、細胞接着、薬剤感受性の 3 者の関係について、正確な分子メカニズムを理解できていないことである。これまでの研究で、後天的に薬剤耐性を獲得した MM 細胞は、VLA-4、STAT3、p-STAT3 または CD44 の高発現と関連していることが既に示されている(46、47、74)。我々のデータでは、すべての耐性細胞株で STAT3、p-STAT3 などの薬剤耐性関連遺伝子が高発現しており、LAMP2 や SORT1 のサイレンシングにより STAT3 や p-STAT3 の発現が減少していることが確認された。つまり、Len の長期曝露により、JAK/STAT 経路が活性化されていることが確認された。EV による薬剤耐性を解明するためには、JAK/STAT 経路が治療標的の一つとなる可能性があり、さらに正確な分子メカニズムの解明が必要である。

以上より、MM 細胞株の Len 耐性・感受性株の比較解析と全トランスクリプトーム解析により、新規 EV 分泌制御因子である SORT1 と LAMP2 が、細胞接着と Len 耐性を制御していることを初めて明らかにした (図 12)。最後に、SORT1、LAMP2 の臨床応用を考えると、EV の生合成を抑制する、あるいは分泌された EV を特定の抗体でブロックすることは、MM における薬剤耐性の獲得

を防ぐための有効なアプローチの一つになる可能性がある。

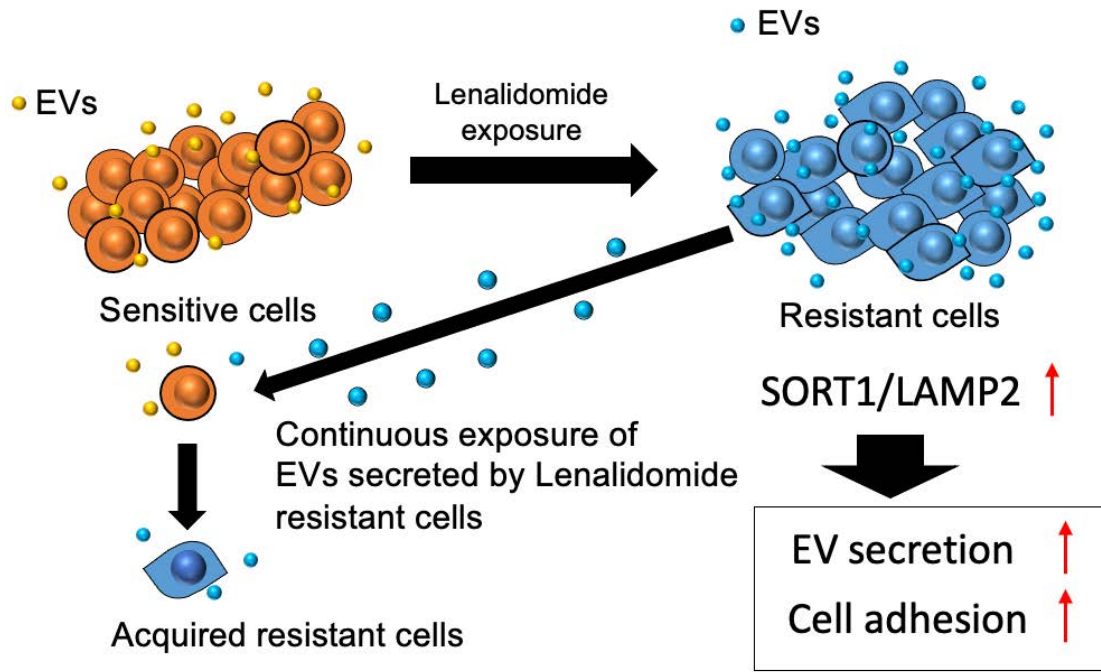


図 12. 本研究の概念図

5.引用文献

1. Charlotte Pawlyn and Faith E. Davies. Toward personalized treatment in multiple myeloma based on molecular characteristics. *Blood*. 133, 7 ,2019.
2. Sonneveld P, Avet-Loiseau H, Lonial S, Usmani S, Siegel D, Anderson KC, Chng WJ, Moreau P, Attal M, Kyle RA, Caers J, Hillengass J, San Miguel J, van de Donk NW, Einsele H, Bladé J, Durie BG, Goldschmidt H, Mateos MV, Palumbo A, Orłowski R. Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: a consensus of the International Myeloma Working Group. *Blood*. 127:2955-62. doi: 10.1182/blood-2016-01-631200, 2016.
3. Manier S, Salem KZ, Park J, Landau DA, Getz G, Ghobrial IM. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nat Rev Cancer*. 12;12:335-48, 2012.
4. Lohr JG, Stojanov P, Carter SL, Cruz-Gordillo P, Lawrence MS, Auclair D, Sougnez C, Knoechel B, Gould J, Saksena G, Cibulskis K, McKenna A, Chapman MA, Straussman R, Levy J, Perkins LM, Keats JJ, Schumacher SE, Rosenberg M; Multiple Myeloma Research Consortium, Getz G, Golub TR. Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer Cell*. 25 :91-101, 2014.
5. Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, Van Loo P, et al., Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat Commun*. 5:2997, 2014.
6. Eichner R, Heider M, Fernández-Sáiz V, van Bebbber F, Garz AK, Lemeer S, Rudelius M, Targosz BS, Jacobs L, Knorn AM, Slawska J, Platzbecker U,

Germing U, Langer C, Knop S, Einsele H, Peschel C, Haass C, Keller U, Schmid B, Götze KS, Kuster B, Bassermann F. Immunomodulatory drugs disrupt the cereblon-CD147-MCT1 axis to exert antitumor activity and teratogenicity. *Nat Med.* 22:735-43, 2016.

7. Bjorklund CC, Lu L, Kang J, Hagner PR, Havens CG, Amatangelo M, Wang M, Ren Y, Couto S, Breider M, Ning Y, Gandhi AK, Daniel TO, Chopra R, Klippel A, Thakurta AG. Rate of CRL4(CRBN) substrate Ikaros and Aiolos degradation underlies differential activity of lenalidomide and pomalidomide in multiple myeloma cells by regulation of c-Myc and IRF4. *Blood Cancer J.* 2;5 :e354, 2015.

8. Dimopoulos K, Søgaard Helbo A, Fibiger Munch-Petersen H, Sjö L, Christensen J, Sommer Kristensen L, Asmar F, Hermansen NEU, O'Connell C, Gimsing P, Liang G, Grønbaek K. Dual inhibition of DNMTs and EZH2 can overcome both intrinsic and acquired resistance of myeloma cells to IMiDs in a cereblon-independent manner. *Mol Oncol.* 12:180-195, 2018.

9. Yamamoto J, Suwa T, Murase Y, Tateno S, Mizutome H, Asatsuma-Okumura T, Shimizu N, Kishi T, Momose S, Kizaki M, Ito T, Yamaguchi Y, Handa H. ARID2 is a pomalidomide-dependent CRL4 CRBN substrate in multiple myeloma cells. *Nat Chem Biol.* 16:1208-1217, 2020.

10. Caceres G, McGraw K, Yip BH, Pellagatti A, Johnson J, Zhang L, Liu K, Zhang LM, Fulp WJ, Lee JH, Al Ali NH, Basiorka A, Smith LJ, Daugherty FJ, Littleton N, Wells RA, Sokol L, Wei S, Komrokji RS, Boultonwood J, List AF. TP53 suppression promotes erythropoiesis in del(5q) MDS, suggesting a targeted therapeutic strategy in lenalidomide-resistant patients. *Proc Natl Acad Sci USA.*

110:16127-32, 2013.

11. Liu J, Hideshima T, Xing L, Wang S, Zhou W, Samur MK, Sewastianik T, Ogiya D, An G, Gao S, Yang L, Ji T, Bianchi G, Wen K, Tai YT, Munshi N, Richardson P, Carrasco R, Cang Y, Anderson KC. ERK signaling mediates resistance to immunomodulatory drugs in the bone marrow microenvironment. *Sci Adv.* 7:eabg2697, 2021.

12. Kikuchi J, Koyama D, Wada T, Izumi T, Hofgaard PO, Bogen B, Furukawa Y. Phosphorylation-mediated EZH2 inactivation promotes drug resistance in multiple myeloma. *J Clin Invest.* 125:4375-90, 2015.

13. Kobune M, Chiba H, Kato J, Kato K, Nakamura K, Kawano Y, Takada K, Takimoto R, Takayama T, Hamada H, Niitsu Y. Wnt3/RhoA/ROCK signaling pathway is involved in adhesion-mediated drug resistance of multiple myeloma in an autocrine mechanism. *Mol Cancer Ther.* 6:1774-84, 2007.

14. 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.* 28:231-42, 2009.

15. Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J, Colás E, Cordeiro-da Silva A, Fais S, Falcon-Perez JM, Ghobrial IM, Giebel B, Gimona M, Graner M, Gursel I, Gursel M, Heegaard NH, Hendrix A, Kierulf P, Kokubun K, Kosanovic M, Kralj-Iglic V, Krämer-Albers EM, Laitinen S, Lässer C, Lener T, Ligeti E, Linē A, Lipps G, Llorente A, Lötvall J, Manček-Keber M, Marcilla A, Mittelbrunn M, Nazarenko I,

Nolte-'t Hoen EN, Nyman TA, O'Driscoll L, Oliven M, Oliveira C, Pállinger É, Del Portillo HA, Reventós J, Rigau M, Rohde E, Sammar M, Sánchez-Madrid F, Santarém N, Schallmoser K, Ostefeld MS, Stoorvogel W, Stukelj R, Van der Grein SG, Vasconcelos MH, Wauben MH, De Wever O. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 4:27066, 2015.

16. Tominaga N, Kosaka N, Ono M, Katsuda T, Yoshioka Y, Tamura K, Lötvall J, Nakagama H, Ochiya T. Brain metastatic cancer cells release microRNA-181c-containing extracellular vesicles capable of destructing blood-brain barrier. *Nat Commun*. 6:6716, 2015.

17. Rodrigues G, Hoshino A, Kenific CM, Matei IR, Steiner L, Freitas D, Kim HS, Oxley PR, Scandariato I, Casanova-Salas I, Dai J, Badwe CR, Gril B, Tešić Mark M, Dill BD, Molina H, Zhang H, Benito-Martin A, Bojmar L, Ararso Y, Offer K, LaPlant Q, Buehring W, Wang H, Jiang X, Lu TM, Liu Y, Sabari JK, Shin SJ, Narula N, Ginter PS, Rajasekhar VK, Healey JH, Meylan E, Costa-Silva B, Wang SE, Rafii S, Altorki NK, Rudin CM, Jones DR, Steeg PS, Peinado H, Ghajar CM, Bromberg J, de Sousa M, Pisapia D, Lyden D. Tumour exosomal CEMIP protein promotes cancer cell colonization in brain metastasis. *Nat Cell Biol*. 21:1403-1412, 2019.

18. Faict S, Muller J, De Veirman K, De Bruyne E, Maes K, Vrancken L, Heusschen R, De Raeve H, Schots R, Vanderkerken K, Caers J, Menu E. Exosomes play a role in multiple myeloma bone disease and tumor development by targeting osteoclasts and osteoblasts. *Blood Cancer J*. 8:105, 2018.

19. Frassanito MA, Desantis V, Di Marzo L, Craparotta I, Beltrame L, Marchini S, Annese T, Visino F, Arciuli M, Saltarella I, Lamanuzzi A, Solimando AG, Nico B, De Angelis M, Racanelli V, Marigliò MA, Chiacchio R, Pizzuti M, Gallone A, Fumarulo R, D'Incalci M, Vacca A. Bone marrow fibroblasts overexpress miR-27b and miR-214 in step with multiple myeloma progression, dependent on tumour cell-derived exosomes. *J Pathol.* 247:241-253, 2019.
20. Ho M, Chen T, Liu J, Dowling P, Hideshima T, Zhang L, Morelli E, Camci-Unal G, Wu X, Tai YT, Wen K, Samur M, Schlossman RL, Mazitschek R, Kavanagh EL, Lindsay S, Harada T, McCann A, Anderson KC, O'Gorman P, Bianchi G. Targeting histone deacetylase 3 (HDAC3) in the bone marrow microenvironment inhibits multiple myeloma proliferation by modulating exosomes and IL-6 trans-signaling. *Leukemia.* 34:196-209, 2020.
21. Li B, Xu H, Han H, Song S, Zhang X, Ouyang L, Qian C, Hong Y, Qiu Y, Zhou W, Huang M, Zhuang W. Exosome-mediated transfer of lncRUNX2-AS1 from multiple myeloma cells to MSCs contributes to osteogenesis. *Oncogene.* 37:5508-5519, 2018.
22. Kumar B, Garcia M, Weng L, Jung X, Murakami JL, Hu X, McDonald T, Lin A, Kumar AR, DiGiusto DL, Stein AS, Pullarkat VA, Hui SK, Carlesso N, Kuo YH, Bhatia R, Marcucci G, Chen CC. Acute myeloid leukemia transforms the bone marrow niche into a leukemia-permissive microenvironment through exosome secretion. *Leukemia.* 32:575-587, 2018.
23. Peng D, Wang H, Li L, Ma X, Chen Y, Zhou H, Luo Y, Xiao Y, Liu L. miR-34c-5p promotes eradication of acute myeloid leukemia stem cells by

inducing senescence through selective RAB27B targeting to inhibit exosome shedding. *Leukemia*. 32:1180-1188, 2018.

24. Paggetti J, Haderk F, Seiffert M, Janji B, Distler U, Ammerlaan W, Kim YJ, Adam J, Lichter P, Solary E, Berchem G, Moussay E. Exosomes released by chronic lymphocytic leukemia cells induce the transition of stromal cells into cancer-associated fibroblasts. *Blood*. 126:1106-17, 2015.

25. Javidi-Sharifi N, Martinez J, English I, Joshi SK, Scopim-Ribeiro R, Viola SK, Edwards DK 5th, Agarwal A, Lopez C, Jorgens D, Tyner JW, Druker BJ, Traer E. FGF2-FGFR1 signaling regulates release of Leukemia-Protective exosomes from bone marrow stromal cells. *Elife*. 8:e40033, 2019.

26. Durán R, Gil M, Sicco E, Irigoien V, Oliver C, Landoni AI, Gabus R, Dighiero G, Oppezzo P. S100-A9 protein in exosomes from chronic lymphocytic leukemia cells promotes NF- κ B activity during disease progression. *Blood*. 130:777-788, 2017.

27. Samuel P, Mulcahy LA, Furlong F, McCarthy HO, Brooks SA, Fabbri M, Pink RC, Carter DRF. Cisplatin induces the release of extracellular vesicles from ovarian cancer cells that can induce invasiveness and drug resistance in bystander cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 373:20170065, 2018.

28. Prieto-Vila M, Usuba W, Takahashi RU, Shimomura I, Sasaki H, Ochiya T, Yamamoto Y. Single-Cell Analysis Reveals a Preexisting Drug-Resistant Subpopulation in the Luminal Breast Cancer Subtype. *Cancer Res*. 79:4412-4425, 2019.

29. Faict S, Oudaert I, D'Auria L, Dehairs J, Maes K, Vlummens P, De Veirman K, De Bruyne E, Fostier K, Vande Broek I, Schots R, Vanderkerken K,

- Swinnen JV, Menu E. The Transfer of Sphingomyelinase Contributes to Drug Resistance in Multiple Myeloma. *Cancers (Basel)*. 11:1823, 2019.
30. Bandari SK, Purushothaman A, Ramani VC, Brinkley GJ, Chandrashekar DS, Varambally S, Mobley JA, Zhang Y, Brown EE, Vlodaysky I, Sanderson RD. Chemotherapy induces secretion of exosomes loaded with heparanase that degrades extracellular matrix and impacts tumor and host cell behavior. *Matrix Biol*. 65:104-118, 2018.
31. Tang JX, Chen Q, Li Q, He YH, Xiao D. Exosomal mRNAs and lncRNAs involved in multiple myeloma resistance to bortezomib. *Cell Biol Int*. 45:965-975, 2021.
32. Rodrigues-Junior DM, Pelarin MFA, Nader HB, Vettore AL, Pinhal MAS. MicroRNA-1252-5p Associated with Extracellular Vesicles Enhances Bortezomib Sensitivity in Multiple Myeloma Cells by Targeting Heparanase. *Onco Targets Ther*. 14:455-467, 2021.
33. Xu H, Han H, Song S, Yi N, Qian C, Qiu Y, Zhou W, Hong Y, Zhuang W, Li Z, Li B, Zhuang W. Exosome-Transmitted PSMA3 and PSMA3-AS1 Promote Proteasome Inhibitor Resistance in Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res*. 25:1923-1935, 2019.
34. Hattori Y, Futo T, Uozaki R, Ichikawa D, Yamaguchi T, Yamamoto T, Matsushita M, Hirao M. Integrin $\beta 5$ and $\beta 7$ expression in lenalidomide-resistant multiple myeloma cells. *Int. J Hematol*. In press.
35. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, Antoniou A, Arab T, Archer F, Atkin-Smith GK, Ayre DC, Bach JM, Bachurski D, Baharvand H, Balaj L, Baldacchino S, Bauer NN, Baxter

AA, Bebawy M, Beckham C, Bedina Zavec A, Benmoussa A, Berardi AC, Bergese P, Bielska E, Blenkiron C, Bobis-Wozowicz S, Boilard E, Boireau W, Bongiovanni A, Borràs FE, Bosch S, Boulanger CM, Breakefield X, Breglio AM, Brennan MÁ, Brigstock DR, Brisson A, Broekman ML, Bromberg JF, Bryl-Górecka P, Buch S, Buck AH, Burger D, Busatto S, Buschmann D, Bussolati B, Buzás EI, Byrd JB, Camussi G, Carter DR, Caruso S, Chamley LW, Chang YT, Chen C, Chen S, Cheng L, Chin AR, Clayton A, Clerici SP, Cocks A, Cocucci E, Coffey RJ, Cordeiro-da-Silva A, Couch Y, Coumans FA, Coyle B, Crescitelli R, Criado MF, D'Souza-Schorey C, Das S, Datta Chaudhuri A, de Candia P, De Santana EF, De Wever O, Del Portillo HA, Demaret T, Deville S, Devitt A, Dhondt B, Di Vizio D, Dieterich LC, Dolo V, Dominguez Rubio AP, Dominici M, Dourado MR, Driedonks TA, Duarte FV, Duncan HM, Eichenberger RM, Ekström K, El Andaloussi S, Elie-Caille C, Erdbrügger U, Falcón-Pérez JM, Fatima F, Fish JE, Flores-Bellver M, Försonits A, Frelet-Barrand A, Fricke F, Fuhrmann G, Gabrielsson S, Gámez-Valero A, Gardiner C, Gärtner K, Gaudin R, Gho YS, Giebel B, Gilbert C, Gimona M, Giusti I, Goberdhan DC, Görgens A, Gorski SM, Greening DW, Gross JC, Gualerzi A, Gupta GN, Gustafson D, Handberg A, Haraszti RA, Harrison P, Hegyesi H, Hendrix A, Hill AF, Hochberg FH, Hoffmann KF, Holder B, Holthofer H, Hosseinkhani B, Hu G, Huang Y, Huber V, Hunt S, Ibrahim AG, Ikezu T, Inal JM, Isin M, Ivanova A, Jackson HK, Jacobsen S, Jay SM, Jayachandran M, Jenster G, Jiang L, Johnson SM, Jones JC, Jong A, Jovanovic-Talisman T, Jung S, Kalluri R, Kano SI, Kaur S, Kawamura Y, Keller ET, Khamari D, Khomyakova E, Khvorova A, Kierulf P, Kim KP, Kislinger T, Klingeborn M, Klinke DJ 2nd, Kornek M, Kosanović MM, Kovács

ÁF, Krämer-Albers EM, Krasemann S, Krause M, Kurochkin IV, Kusuma GD, Kuypers S, Laitinen S, Langevin SM, Languino LR, Lannigan J, Lässer C, Laurent LC, Lavieu G, Lázaro-Ibáñez E, Le Lay S, Lee MS, Lee YXF, Lemos DS, Lenassi M, Leszczynska A, Li IT, Liao K, Libregts SF, Ligeti E, Lim R, Lim SK, Linē A, Linnemannstöns K, Llorente A, Lombard CA, Lorenowicz MJ, Lörincz ÁM, Lötvall J, Lovett J, Lowry MC, Loyer X, Lu Q, Lukomska B, Lunavat TR, Maas SL, Malhi H, Marcilla A, Mariani J, Mariscal J, Martens-Uzunova ES, Martin-Jaular L, Martinez MC, Martins VR, Mathieu M, Mathivanan S, Maugeri M, McGinnis LK, McVey MJ, Meckes DG Jr, Meehan KL, Mertens I, Minciacchi VR, Möller A, Møller Jørgensen M, Morales-Kastresana A, Morhayim J, Mullier F, Muraca M, Musante L, Mussack V, Muth DC, Myburgh KH, Najrana T, Nawaz M, Nazarenko I, Nejsum P, Neri C, Neri T, Nieuwland R, Nimrichter L, Nolan JP, Nolte-'t Hoen EN, Noren Hooten N, O'Driscoll L, O'Grady T, O'Loghlen A, Ochiya T, Olivier M, Ortiz A, Ortiz LA, Osteikoetxea X, Østergaard O, Ostrowski M, Park J, Pegtel DM, Peinado H, Perut F, Pfaffl MW, Phinney DG, Pieters BC, Pink RC, Pisetsky DS, Pogge von Strandmann E, Polakovicova I, Poon IK, Powell BH, Prada I, Pulliam L, Quesenberry P, Radeghieri A, Raffai RL, Raimondo S, Rak J, Ramirez MI, Raposo G, Rayyan MS, Regev-Rudzki N, Ricklefs FL, Robbins PD, Roberts DD, Rodrigues SC, Rohde E, Rome S, Rouschop KM, Rughetti A, Russell AE, Saá P, Sahoo S, Salas-Huenuleo E, Sánchez C, Saugstad JA, Saul MJ, Schiffelers RM, Schneider R, Schøyen TH, Scott A, Shahaj E, Sharma S, Shatnyeva O, Shekari F, Shelke GV, Shetty AK, Shiba K, Siljander PR, Silva AM, Skowronek A, Snyder OL 2nd, Soares RP, Sódar BW, Soekmadji C, Sotillo J, Stahl PD, Stoorvogel W, Stott SL, Strasser

EF, Swift S, Tahara H, Tewari M, Timms K, Tiwari S, Tixeira R, Tkach M, Toh WS, Tomasini R, Torrecilhas AC, Tosar JP, Toxavidis V, Urbanelli L, Vader P, van Balkom BW, van der Grein SG, Van Deun J, van Herwijnen MJ, Van Keuren-Jensen K, van Niel G, van Royen ME, van Wijnen AJ, Vasconcelos MH, Vechetti IJ Jr, Veit TD, Vella LJ, Velot É, Verweij FJ, Vestad B, Viñas JL, Visnovitz T, Vukman KV, Wahlgren J, Watson DC, Wauben MH, Weaver A, Webber JP, Weber V, Wehman AM, Weiss DJ, Welsh JA, Wendt S, Wheelock AM, Wiener Z, Witte L, Wolfram J, Xagorari A, Xander P, Xu J, Yan X, Yáñez-Mó M, Yin H, Yuana Y, Zappulli V, Zarubova J, Žėkas V, Zhang JY, Zhao Z, Zheng L, Zheutlin AR, Zickler AM, Zimmermann P, Zivkovic AM, Zocco D, Zuba-Surma EK. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 7:1535750, 2018.

36. Yoshioka Y, Kosaka N, Konishi Y, Ohta H, Okamoto H, Sonoda H, Nonaka R, Yamamoto H, Ishii H, Mori M, Furuta K, Nakajima T, Hayashi H, Sugisaki H, Higashimoto H, Kato T, Takeshita F, Ochiya T. Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. *Nat Commun*. 5:3591, 2014.

37. Danziger SA, McConnell M, Gockley J, Young MH, Rosenthal A, Schmitz F, Reiss DJ, Farmer P, Alapat DV, Singh A, Ashby C, Bauer M, Ren Y, Smith K, Couto SS, van Rhee F, Davies F, Zangari M, Petty N, Orlowski RZ, Dhodapkar MV, Copeland WB, Fox B, Hoering A, Fitch A, Newhall K, Barlogie B, Trotter MWB, Hershberg RM, Walker BA, Dervan AP, Ratushny AV, Morgan

- GJ. Bone marrow microenvironments that contribute to patient outcomes in newly diagnosed multiple myeloma: A cohort study of patients in the Total Therapy clinical trials. *PLoS Med.* 17:e1003323, 2020.
38. Ryu D, Kim SJ, Hong Y, Jo A, Kim N, Kim HJ, Lee HO, Kim K, Park WY. Alterations in the Transcriptional Programs of Myeloma Cells and the Microenvironment during Extramedullary Progression Affect Proliferation and Immune Evasion. *Clin Cancer Res.* 26:935-944, 2020.
39. Stuart T, Butler A, Hoffman P, Hafemeister C, Papalexi E, Mauck WM 3rd, Hao Y, Stoeckius M, Smibert P, Satija R. Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell.* 177:1888-1902.e21, 2019.
40. Kuiper R, Broyl A, de Knecht Y, van Vliet MH, van Beers EH, van der Holt B, el Jarari L, Mulligan G, Gregory W, Morgan G, Goldschmidt H, Lokhorst HM, van Duin M, Sonneveld P. A gene expression signature for high-risk multiple myeloma. *Leukemia.* 26:2406-13, 2012.
41. Han Y, Nakayama J, Hayashi Y, Jeong S, Futakuchi M, Ito E, Watanabe S, Semba K. Establishment and characterization of highly osteolytic luminal breast cancer cell lines by intracaudal arterial injection. *Genes Cells.* 25:111-123, 2020.
42. Kuroiwa Y, Nakayama J, Adachi C, Inoue T, Watanabe S, Semba K. Proliferative Classification of Intracranially Injected HER2-positive Breast Cancer Cell Lines. *Cancers (Basel).* 12:1811, 2020.
43. 2017年卒業 山口高史氏 修士論文
44. Dimberg LY, Dimberg AI, Ivarsson K, Strömberg T, Osterborg A, Nilsson K, Oberg F, Jernberg Wiklund H. Ectopic and IFN-induced expression of Fas

overcomes resistance to Fas-mediated apoptosis in multiple myeloma cells. *Blood*. 106:1346-54, 2005.

45. Qu L, Ding J, Chen C, Wu ZJ, Liu B, Gao Y, Chen W, Liu F, Sun W, Li XF, Wang X, Wang Y, Xu ZY, Gao L, Yang Q, Xu B, Li YM, Fang ZY, Xu ZP, Bao Y, Wu DS, Miao X, Sun HY, Sun YH, Wang HY, Wang LH. Exosome-Transmitted IncARSR Promotes Sunitinib Resistance in Renal Cancer by Acting as a Competing Endogenous RNA. *Cancer Cell*. 29:653-668, 2016.

46. Yingchun L, Huihan W, Rong Z, Guojun Z, Ying Y, Zhuogang L. Antitumor Activity of Asiaticoside Against Multiple Myeloma Drug-Resistant Cancer Cells Is Mediated by Autophagy Induction, Activation of Effector Caspases, and Inhibition of Cell Migration, Invasion, and STAT-3 Signaling Pathway. *Med Sci Monit*. 25:1355-1361, 2019.

47. Fontana F, Scott MJ, Allen JS, Yang X, Cui G, Pan D, Yanaba N, Fiala MA, O'Neal J, Schmieder-Atteberry AH, Ritchey J, Rettig M, Simons K, Fletcher S, Vij R, DiPersio JF, Lanza GM. VLA4-Targeted Nanoparticles Hijack Cell Adhesion-Mediated Drug Resistance to Target Refractory Myeloma Cells and Prolong Survival. *Clin Cancer Res*. 27:1974-1986, 2021.

48. Vázquez CL, Rodgers A, Herbst S, Coade S, Gronow A, Guzman CA, Wilson MS, Kanzaki M, Nykjaer A, Gutierrez MG. The proneurotrophin receptor sortilin is required for Mycobacterium tuberculosis control by macrophages. *Sci Rep*. 6:29332, 2016.

49. Zhu YX, Braggio E, Shi CX, Kortuem KM, Bruins LA, Schmidt JE, Chang XB, Langlais P, Luo M, Jedlowski P, LaPlant B, Laumann K, Fonseca R, Bergsagel PL, Mikhael J, Lacy M, Champion MD, Stewart AK. Identification of

cereblon-binding proteins and relationship with response and survival after IMiDs in multiple myeloma. *Blood*. 2014 124:536-45, 2014.

50. Kosaka N, Yoshioka Y, Fujita Y, Ochiya T. Versatile roles of extracellular vesicles in cancer. *J Clin Invest*. 126:1163-72, 2016.

51. Denzer K, Kleijmeer MJ, Heijnen HF, Stoorvogel W, Geuze HJ. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci*. 113 Pt 19:3365-74, 2000.

52. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem*. 285:17442-52.

53. Safaei R, Larson BJ, Cheng TC, Gibson MA, Otani S, Naerdemann W, Howell SB. Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells. *Mol Cancer Ther*. 4:1595-604, 2005.

54. Dong X, Bai X, Ni J, Zhang H, Duan W, Graham P, Li Y. Exosomes and breast cancer drug resistance. *Cell Death Dis*. 11:987, 2020.

55. Guo C, Liu J, Zhou Q, Song J, Zhang Z, Li Z, Wang G, Yuan W, Sun Z. Exosomal Noncoding RNAs and Tumor Drug Resistance. *Cancer Res*. 80:4307-4313, 2020.

56. Salehi M, Vafadar A, Khatami SH, Taheri-Anganeh M, Vakili O, Savardashtaki A, Negahdari B, Naeli P, Behrouj H, Ghasemi H, Movahedpour A. Gastrointestinal cancer drug resistance: the role of exosomal miRNAs. *Mol Biol Rep*. doi: 10.1007/s11033-021-07007-3, 2021.

57. Słomka A, Mocan T, Wang B, Nenu I, Urban SK, Gonzales-Carmona M,

Schmidt-Wolf IGH, Lukacs-Kornek V, Strassburg CP, Spârchez Z, Kornek M. EVs as Potential New Therapeutic Tool/Target in Gastrointestinal Cancer and HCC. *Cancers (Basel)*. 12:3019, 2020.

58. Barok M, Puhka M, Yazdi N, Joensuu H. Extracellular vesicles as modifiers of antibody-drug conjugate efficacy. *J Extracell Vesicles*. 10:e12070, 2021.

59. Fujiwara T, Eguchi T, Sogawa C, Ono K, Murakami J, Ibaragi S, Asaumi JI, Okamoto K, Calderwood SK, Kozaki KI. Anti-EGFR antibody cetuximab is secreted by oral squamous cell carcinoma and alters EGF-driven mesenchymal transition. *Biochem Biophys Res Commun*. 503:1267-1272, 2018.

60. Shedden K, Xie XT, Chandaroy P, Chang YT, Rosania GR. Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles. *Cancer Res*. 63:4331-7, 2003.

61. Asare-Werehene M, Nakka K, Reunov A, Chiu CT, Lee WT, Abedini MR, Wang PW, Shieh DB, Dilworth FJ, Carmona E, Le T, Mes-Masson AM, Burger D, Tsang BK. The exosome-mediated autocrine and paracrine actions of plasma gelsolin in ovarian cancer chemoresistance. *Oncogene*. 39:1600-1616, 2020.

62. Sevilla-Movilla S, Arellano-Sánchez N, Martínez-Moreno M, et al., Upregulated expression and function of the $\alpha 4\beta 1$ integrin in multiple myeloma cells resistant to bortezomib. *J Pathol*. 2020 5.

63. Federico C, Alhallak K, Sun J, Duncan K, Azab F, Sudlow GP, de la Puente P, Muz B, Kapoor V, Zhang L, Yuan F, Markovic M, Kotsybar J, Wasden K, Guenther N, Gurley S, King J, Kohnen D, Salama NN, Thotala D, Hallahan DE, Vij R, DiPersio JF, Achilefu S, Azab AK. Tumor microenvironment-targeted

nanoparticles loaded with bortezomib and ROCK inhibitor improve efficacy in multiple myeloma. *Nat Commun.* 11:6037, 2020.

64. Neri P, Ren L, Azab AK, Brentnall M, Gratton K, Klimowicz AC, Lin C, Duggan P, Tassone P, Mansoor A, Stewart DA, Boise LH, Ghobrial IM, Bahlis NJ. Integrin β 7-mediated regulation of multiple myeloma cell adhesion, migration, and invasion. *Blood.* 117:6202-13, 2011.

65. Kohmo S, Kijima T, Otani Y, Mori M, Minami T, Takahashi R, Nagatomo I, Takeda Y, Kida H, Goya S, Yoshida M, Kumagai T, Tachibana I, Yokota S, Kawase I. Cell surface tetraspanin CD9 mediates chemoresistance in small cell lung cancer. *Cancer Res.* 70:8025-35, 2010.

66. Chen F, Chen J, Yang L, Liu J, Zhang X, Zhang Y, Tu Q, Yin D, Lin D, Wong PP, Huang D, Xing Y, Zhao J, Li M, Liu Q, Su F, Su S, Song E. Extracellular vesicle-packaged HIF-1 α -stabilizing lncRNA from tumour-associated macrophages regulates aerobic glycolysis of breast cancer cells. *Nat Cell Biol.* 21:498-510, 2019.

67. Broekman ML, Maas SLN, Abels ER, Mempel TR, Krichevsky AM, Breakefield XO. Multidimensional communication in the microenvirons of glioblastoma. *Nat Rev Neurol.* 14:482-495, 2018.

68. Smirnov DA, Foulk BW, Doyle GV, Connelly MC, Terstappen LW, O'Hara SM. Global gene expression profiling of circulating endothelial cells in patients with metastatic carcinomas. *Cancer Res.* 66:2918-22, 2006.

69. Stessman HA, Mansoor A, Zhan F, Janz S, Linden MA, Baughn LB, Van Ness B. Reduced CXCR4 expression is associated with extramedullary disease in a mouse model of myeloma and predicts poor survival in multiple myeloma

patients treated with bortezomib. *Leukemia*. 27:2075-7, 2013.

70. Hong CS, Jeong E, Boyiadzis M, Whiteside TL. Increased small extracellular vesicle secretion after chemotherapy via upregulation of cholesterol metabolism in acute myeloid leukaemia. *J Extracell Vesicles*. 9:1800979, 2020.

71. Han Q, Deng Y, Chen S, Chen R, Yang M, Zhang Z, Sun X, Wang W, He Y, Wang F, Pan X, Li P, Lai W, Luo H, Huang P, Guan X, Deng Y, Yan J, Xu X, Wen Y, Chen A, Hu C, Li X, Li S. Downregulation of ATG5-dependent macroautophagy by chaperone-mediated autophagy promotes breast cancer cell metastasis. *Sci Rep*. 7:4759, 2017.

72. Qadir F, Aziz MA, Sari CP, Ma H, Dai H, Wang X, Raithatha D, Da Silva LGL, Hussain M, Poorkasrey SP, Hutchison IL, Waseem A, Teh MT. Transcriptome reprogramming by cancer exosomes: identification of novel molecular targets in matrix and immune modulation. *Mol Cancer*. 17:97, 2018.

73. Babuta M, Furi I, Bala S, Bukong TN, Lowe P, Catalano D, Calenda C, Kodys K, Szabo G. Dysregulated Autophagy and Lysosome Function Are Linked to Exosome Production by Micro-RNA 155 in Alcoholic Liver Disease. *Hepatology*. 70:2123-2141, 2019.

74. Bjorklund CC, Baladandayuthapani V, Lin HY, Jones RJ, Kuyatse I, Wang H, Yang J, Shah JJ, Thomas SK, Wang M, Weber DM, Orlowski RZ. Evidence of a role for CD44 and cell adhesion in mediating resistance to lenalidomide in multiple myeloma: therapeutic implications. *Leukemia*. 28:373-83, 2014.

6.謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御懇篤なる指導、御鞭撻を賜りました、服部豊 教授に深甚なる感謝の意を表します。

また、私を温かく受け入れてくれ、厳しい中にも優しくご指導くださった東京医科大学医学総合研究所分子細胞治療研究部門の落谷孝広教授、国立がん研究センター研究所病態情報学ユニット山本雄介先生に深甚なる感謝の意を表します。

本論文の副査をしていただきました、有田誠教授、杉本芳一教授に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、有益な助言を賜りました慶應義塾大学病態生理学講座の松下麻衣子准教授、及び、市川大樹助教に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、公共データベースを利用した解析方法についてご指導賜りました国立がん研究センター研究所病態情報学ユニット中山淳先生に深く感謝致します。

本研究に際し、様々な助言、ご協力をいただき、非常に有意義な研究生活を提供していただきました、慶應義塾大学病態生理学講座の皆様には深く感謝致します。

本研究は私の力のみでは到底なし得ることはできませんでした。支えてくださった家族ならびにご支援くださった全ての方々に深く感謝致します。