

多発性骨髄腫における新規治療標的としての 特異的低酸素誘導性遺伝子同定への挑戦

池田 翔, 田川 博之

多発性骨髄腫は難治性の形質細胞腫瘍であり、その治療法について多くの研究者が精力的に検討を進めてきた。新たな治療標的として、骨髄微小環境の様々な要素が考慮される。この中で低酸素応答は細胞の恒常性を保つための重要なプロセスであり、多発性骨髄腫を含むがん一般的に治療標的として検討されている。骨髄の酸素分圧は 50 ~ 55 mmHg であるのに対し、低酸素ニッチは 10 mmHg 未満と想定されている。低酸素ニッチに適応する骨髄腫細胞は、低酸素誘導因子 HIF を介した遺伝子発現変化を起こし治療抵抗性を獲得している。ただし HIF の阻害は正常細胞や組織への悪影響が懸念され臨床応用はまだまだ困難であるため、その標的分子の機能解析が必要である。特に、低酸素応答が誘導する代謝経路の変化、播種、骨髄環境の悪性化などは有望な治療標的になりうる。今後、低酸素環境や低酸素誘導性遺伝子を標的とした治療薬の実用化が期待される。

Key words: 多発性骨髄腫, 低酸素応答, 低酸素, HIF

はじめに

形質細胞由来である多発性骨髄腫は、治療手段の増加により初発患者だけでなく再発・難治性患者の予後も改善している [1]。しかしながら、いまだすべての患者が良好な予後を得られることはなく、新しいメカニズムを持つ新薬開発への努力は継続して必要である。新たな治療標的として、微小環境の要素が注目されている。微小環境の要素には、ストロマ細胞や免疫細胞との接着や液性因子の授受を介したシグナル伝達だけでなく、低酸素、低栄養や低 pH といった代謝ストレスが含まれる [2]。代謝ストレスに対する反応のひとつである低酸素応答は、転写因子 HIF (hypoxia-inducible factor) の活性化を介してさまざまな細胞で恒常性の維持に寄与している [3]。2019 年には低酸素応答を制御する中心的転写因子 HIF を発見した功績により、Gregg Leonard Semenza, William G. Kaelin Jr., そして Sir Peter John Ratcliffe の 3 名の博士にノーベル生理学・医学賞が贈られた。低酸素応答の生物の恒常性維持における重要性とともに、今後の臨床応用にその理解が不可欠であることを意味している。HIF は、低酸素に応答し

てエリスロポエチンが産生されるメカニズムの研究の中で転写因子として発見された [4]。さらに、正常酸素下では HIF α タンパクがユビキチン化され、プロテアソームで絶えず分解されているが、低酸素環境では HIF α は分解されず蓄積し、HRE (hypoxia-response element) をもつ遺伝子の転写因子として活性を發揮することが明らかとなった [5,6]。これらの発見は細胞が酸素分圧を感知し、遺伝子の発現を調節して生存するメカニズムとして広く受け入れられた。今日では、HIF が制御する低酸素応答は腫瘍細胞の生存や治療抵抗性にも大いに関与すると考えられている [7,8]。多発性骨髄腫においても低酸素応答とその分子病態の関連について多くの報告がなされ、治療応用への道が探られてきた [9,10]。本稿では、低酸素応答の背景と実験手法をまとめ、さらに骨髄腫細胞内の低酸素応答により発現が上昇する遺伝子の機能に焦点を当てることで、将来の多発性骨髄腫に対する新しい治療法の糸口について検討したい。

骨髄微小環境の酸素分圧

低酸素とは酸素の要求量に対し酸素の供給量が少ない状態を指し、固形癌においては細胞が激しく増殖しているときや、新生血管が少ないときに起きるが、骨髄腫ではこれらの状況に加えて、骨髄内のニッチに細胞が存在しているときに起こりえる。骨髄内のニッチは乏血流により低酸素であると想定されているが、実際の酸素濃度や分圧を評価するのは困難である。大気中の酸素濃度は約 21% であり、その分圧を計算すると $760 \text{ mmHg} \times 21\% = \text{約 } 160 \text{ mmHg}$ である。一方、人間の動脈血と静脈血の酸素飽和度はそれ

受付：2020 年 3 月 11 日, 受理：2020 年 3 月 26 日
秋田大学大学院医学系研究科血液・腎臓・膠原病内科

Corresponding author：池田 翔
〒010-8543 秋田市本道一丁目 1 の 1
秋田大学大学院医学系研究科血液・腎臓・膠原病内科
E-mail: sikeda@med.akita-u.ac.jp

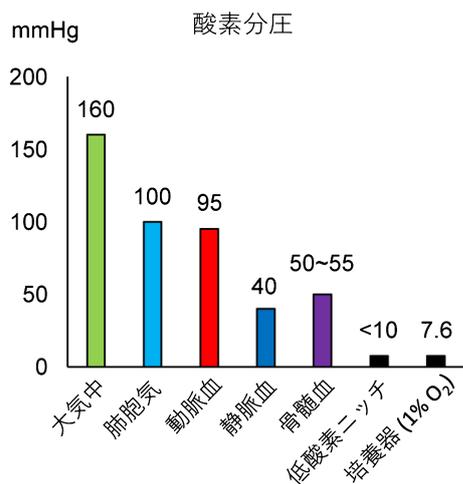


図1 大気中, 肺胞気または体内の各血液・骨髄液における酸素分圧。骨髄血の酸素分圧は, ガス分析によるとおおよそ50~55 mmHgと報告されている。しかし, 骨髄内の低酸素ニッチ(骨内膜ニッチ)は10 mmHg未満と想定されている。マルチガスインキュベータを1.0% O₂に設定した場合, 計算上7.6 mmHgとなる。(文献9, 18より作成)

それぞれ約95 mmHg, 40 mmHg程度である。しかし末梢血と異なり, 骨髄血は経皮的に酸素飽和度を測定できず, また貴重な骨髄検体のガス分析を行う機会もないため, 骨髄血の酸素分圧についてはあまり知られていない。Harrisonらは健常者について骨髄血を即座にガス分析し, 骨髄血の酸素分圧は平均54.9 mmHgであると報告した[11]。Collaらは, 健常者, MGUS, 無症候性骨髄腫, 症候性骨髄腫患者の4群について骨髄血のガス分析を行ったが, すべての群で平均50~55 mmHgであり有意な差はなかった[12]。しかし, ガス分析では骨内膜に存在する低酸素ニッチの酸素分圧は評価できず, ほかの手法が必要である。2-ニトロイミダゾール系化合物であるピモニダゾールは, 10 mmHg以下の酸素分圧で還元され生細胞に取り込まれる性質があり, 低酸素領域の検出に有用である[13]。Asosinghらは骨髄腫モデルマウスに対してピモニダゾールを投与し, 骨髄内の低酸素ニッチに適応する骨髄腫細胞が存在することを報告し, これがtumor-initiating cellsと想定されるとした[14]。骨髄内における酸素分圧の差は, 骨髄腫細胞の遺伝子発現や薬剤抵抗性の差を生み出すと考えられる(図1)。特に, 骨髄内低酸素ニッチに存在する骨髄腫細胞は, 低酸素応答によりHIFを介した様々な遺伝子の発現変化を起こし治療抵抗性を獲得していると考えられ, 再発・再燃を阻止するための治療標的として研究が行われている。

低酸素ストレスの実験手法

低酸素で発現が上昇する遺伝子を特定するためには, 骨髄腫細胞を低酸素ストレスに暴露する必要がある。マルチガスインキュベータは窒素ガスを充填させることで低酸素状態を作り出す。一方, 塩化コバルト(CoCl₂)は正常酸素

条件下でHIF-1 α やHIF-2 α を安定化することで, 低酸素ストレス環境を模倣する[15]。塩化コバルトを代替手段とした研究も多く発表されているが, 真の低酸素環境と塩化コバルトによって模倣された低酸素環境では活性化するシグナルは完全には重ならないことが示唆されている[16]。この違いはHIFの安定化に依存しない酸素分圧センサー機能の存在を示唆する。また, 実際の実験においては, 低酸素刺激を加える対象の細胞や培養時間の違いにも注意が必要である。我々の検討では, 低酸素ストレスに耐性の細胞株(KMS-11, U266など)や, 脆弱な細胞株(JJN3, RPMI-8226など)を認めている。一方, 骨髄検体の骨髄腫細胞は少なくとも48時間程度の低酸素暴露には耐性であることが多い。このように骨髄腫細胞による差異は大きく, その意義については重要な知見が含まれているとされている。また, 低酸素暴露時間については, 24時間までが急性低酸素, それ以降は慢性低酸素と考える場合が多く, それは長時間の低酸素ストレスにより, HIF-1 α からHIF-2 α に主要なHIF α のユニットが交代するためと考えられている[17]。それぞれのサブユニットで転写標的が異なることも示唆されており, 研究を解釈するときに注意を要する。

また, 生体内の低酸素領域は, 新生血管や腫瘍細胞の増減などによって酸素分圧が絶えず変化していると考えられている。インキュベータのプログラムによって酸素分圧を定期的に変動させる方法もあるが, 重要なのは, 適切な動物モデルの使用によって生体内の環境をできるだけ再現させることにあると考えられる。5TMMマウスやV κ *MYCマウスは骨髄腫を発症するマウスであり, 骨髄内の低酸素ニッチの存在が証明されており研究に有用である[18]。また, 免疫不全マウスに対する骨髄腫細胞株の皮下移植は簡便であるが, 骨髄内の環境を再現できないため, U266を用いた骨髄移植モデルも有用である[19]。骨髄環境をより再現した動物モデルでの研究は重要であり, 今後は体内の低酸素微小環境を模倣する実験モデルのさらなる発達が必要である。

エネルギー代謝

解糖系遺伝子の多くはHIFに制御され, がんの治療標的としても今後有望と考えられている[20]。がん細胞では酸素が存在する状態でも, TCAサイクルではなく解糖系にATP産生を依存している(ワールブルグ効果)が, 低酸素環境に置かれるとHIFの活性化によりさらに解糖系のはたらきが亢進することが知られている(パスツール効果)[21]。Maisoらは, 低酸素に暴露した骨髄腫細胞株MM.1Sにおいて蓄積する解糖系の代謝産物や, LDHAやHK2といった解糖系遺伝子に着目し, その機能解析を行った[22]。特にLDHAはプロテアソーム阻害薬耐性に寄与し, 有望な治療標的であることが報告された。一方HK2はグルコース代謝の第1ステップを触媒する重要な酵素で

あり、多発性骨髄腫の検査に重要な FDG-PET とのかかわりについて報告されている。FDG-PET で取り込まれる核種である ^{18}F -FDG は放射能で標識されたグルコースであり、total lesion glycolysis (TLG) や metabolic tumor volume (MTV) といった指標の重要性が報告されているように、解糖系の活性化と腫瘍の活動性は密接に関連している [23]。Rasche らは、HK2 の発現が比較的低い症例では FDG-PET-false negative (MRI 陽性だが FDG-PET で陰性となる症例) になり、高発現する症例では FDG-PET は陽性となることを報告した [24]。さらに我々は、HK2 低発現に関連する FDG-PET-false negative 症例は有意に予後良好であることを示した [25]。これらの報告は、HIF に制御される解糖系遺伝子 HK2 は骨髄腫においてがん促進的に働いている可能性を示唆している。一方、解糖系を統括する HIF は治療標的として興味深い、HIF 阻害薬はまだ実用化されていない。HIF は正常細胞にとっても重要な多くの遺伝子を制御しているため、がん細胞のみを標的にする治療薬の開発のためには HIF 下流の解糖系遺伝子を個別に機能解析することが必要と考えられる。

幹細胞性

多発性骨髄腫の幹細胞性を決定づける表現型はいまだ定まっていないが、骨髄腫幹細胞には増殖段階の分画と静止状態の分画があると想定されている [26]。前者は side population の表現型に似ていると考えられる [27,28]。一方、後者は低酸素微小環境に眠る分化の幼若な治療抵抗性分画である可能性がある。Kawano らは、低酸素ストレスは IRF4, BLIMP1, XBP1 といった形質細胞マーカーや CD138 や SLAMF7 といった表面抗原の発現を低下させる代わりに、BCL6, PAX5 といった B 細胞性マーカーを誘導することや、Oct-4, NANOG, SOX2 といった幹細胞マーカーを誘導することを明らかにした [29]。Muz らも、低酸素ストレスによる細胞周期停止と表面マーカーの幼若化を報告している [30]。これらの報告は、低酸素応答が幼若な骨髄腫幹細胞の静止期に寄与している可能性を示唆する。さらに、Kikuchi らは骨髄腫幹細胞様分画が再び増殖期に入るメカニズムのひとつを報告した [31]。低酸素刺激やストロマ細胞の作用で骨髄腫細胞に高発現する CD180 は、toll-like receptor-4 (TLR4) のリポポリサッカライド (Lipopolysaccharide : LPS) 受容を助け、細胞の再増殖を促す。CD180 は HIF ではなく主に Ikaros が転写しているため、この報告は、細菌感染が静止期の骨髄腫細胞が増殖する契機になりうることを示すと同時に、lenalidomide など iMiDs による Ikaros 抑制が再増殖の防止に有用であることを示唆している。これらの報告は低酸素誘導性遺伝子が幹細胞性の獲得に寄与している可能性を示唆し、その機能解析においては幹細胞様分画の静止期と増殖期の違いについて留意する必要があるかもしれない。

骨髄環境

新生血管、骨代謝といった骨髄の環境要因は骨髄腫の分子病態に大きな影響を及ぼしている。また、骨髄環境は液性因子の関与を介して骨髄腫細胞が別の骨髄へと播種するのに重要な働きをしていると考えられる [32]。骨髄腫細胞の播種にはケモタキシスの機序が想定されている。ケモタキシスとは、液性因子であるケモカインの濃度勾配に従って細胞が遊走するメカニズムであり、固形癌の転移だけでなく血液腫瘍の播種においても最も重要なプロセスのひとつである [33,34]。Azab らは、低酸素ストレスによる骨髄腫細胞のケモカインレセプター CXCR4 の発現上昇と、骨髄ストロマ細胞のケモカイン SDF-1 の発現低下による播種のメカニズムについて報告した [35]。腫瘍の増殖により酸素要求量が増大した低酸素骨髄に存在する骨髄腫細胞は HIF-1 α の蓄積により CXCR4 の発現上昇を起こす。一方、ストロマ細胞からの SDF-1 の放出は減少する。これらの変化によって CXCR4-SDF-1 の関連が阻害され、骨髄腫細胞はストロマ細胞から離れる。今度は SDF-1 を放出しているストロマ細胞をターゲットとして別の骨髄にホーミングし、骨髄腫細胞は全身の骨髄に播種する。Vandyke らは播種に関してケモカインレセプター CCR1 と HIF-2 α の関連を加えたもうひとつのモデルを示している [36]。慢性低酸素で活性化した HIF-2 α は骨髄腫細胞の CCR1 の発現を上昇させる。CCR1 はケモカイン CCL3 を受容し、その活性化によって骨髄内から骨髄腫細胞が放出し、別な骨髄にホーミングする。これら 2 つの播種モデルは、骨髄内の低酸素ストレスが骨髄腫細胞のケモタキシスを調節することで播種に強く関与していることを示唆している。

骨髄腫細胞から低酸素応答により放出される液性因子が、骨髄内の環境を悪性化させることが報告されている。骨髄内の血管新生は骨髄腫の分子病態において重要である [37]。骨髄腫における血管新生は HIF-1 α に誘導される VEGFA, bFGF や HGF の作用によるものと想定され、特に HIF-1 α や HIF-2 α に制御される VEGF の働きによる骨髄腫の悪性化は以前からよく研究されてきた [38]。Kocemba らは、血管新生に関与するアドレノメデュリン (AM) の機能について報告した [39]。低酸素により誘導され骨髄腫細胞から放出された AM は CALR や RAMP2 といったその受容体が発現する血管内皮細胞を刺激し、血管新生を誘導する。また、Zahoor らは、低酸素により誘導される炎症性サイトカイン IL-32 が破骨細胞を活性化させることを明らかにした [40]。HIF-1 α によって制御される IL-32 は、細胞外小胞によって骨髄腫細胞から放出され、破骨細胞に取り込まれその分化を促す。これらの報告は、低酸素ストレスにさらされた骨髄腫細胞から放出される液性因子が、周囲の破骨細胞や血管内皮細胞を刺激し、自らに都合の良い骨髄環境を作り出していることを示唆している。

ノンコーディング RNA

これまで低酸素で誘導されるコーディング遺伝子の働きについて概説したが、同様にノンコーディング RNA の報告もなされてきた [41]。ノンコーディング RNA の一種である小分子機能的 RNA, microRNA は生物の細胞やがんの分子病態にさまざまな影響を及ぼしている [42]。我々は低酸素誘導性 microRNA-210 がリボソーム RNA メチル化酵素の発現を制御し, IRF4 の発現を抑制することを報告した [43]。また Umezu らは低酸素ストレスによりエクソソームに含有された miR-135b が骨髄腫細胞内から血管内皮細胞に運搬され, HIF-1 α の転写活性を阻害する FIH-1 を抑制することで血管新生に寄与することを報告した [44]。これらの報告は, 低酸素誘導性 microRNA が, がん遺伝子の発現を調節したり, 血管新生をコントロールしたりすることで微小環境を調整していることを示唆している。

一方, 長鎖ノンコーディング RNA (long noncoding RNA: lncRNA) は蛋白をコードしない mRNA 様の長い RNA であり, 多様な機能によってがん細胞の生存に寄与しているという報告がなされている [45]。低酸素で発現が上昇したり, 低酸素環境で重要な役割をはたしたりする lncRNA について我々のグループを含めいくつかのグループが報告している。我々は骨髄腫の造腫瘍性に関与する lncRNA, MALAT1 が, 低酸素誘導性ヒストン修飾因子 KDM3A に制御されることを報告した [46]。KDM3A は Jumonji ド

メイン含有の H3K9 脱メチル化酵素であり, 低酸素環境では HIF-1 α に制御され, 低酸素誘導性遺伝子の発現に影響を及ぼすと想定される。低酸素下で KDM3A に制御される MALAT1 は HIF-1 α の発現を保護し, 解糖系遺伝子の発現を調節していると考えられる。また最近では Tong らは低酸素で発現が上昇する lncRNA, DARS-AS1 の機能について詳細に検討した [47]。HIF-1 α によって転写される DARS-AS1 は, RNA 結合モチーフタンパク質 39 (RBM39) のユビキチン化を阻害する。安定化した RBM39 は mTOR シグナルを活性化することで骨髄腫の造腫瘍性に寄与する。さらに lncRNA, H19 は低酸素および HIF-1 α 誘導性であり, CXCR4 や snail の発現を制御して播種に寄与する [48]。これらの報告は, 低酸素誘導性の lncRNA が骨髄腫のさまざまな病態に寄与するだけでなく, 新規治療標的としても検討する必要があることを示している。

薬剤耐性

低酸素ストレスに暴露された骨髄腫細胞におけるプロテアソーム阻害薬の効果について多くの検討が行われている。前述の通り HIF-1 α の分解はプロテアソームで行われるため, 一見プロテアソーム阻害薬は HIF-1 α の蓄積を促し, その転写標的の発現を上昇させるため, 治療効果は減弱するように思われる。一方で, プロテアソーム阻害薬ボルテゾミブは HIF-1 α の転写活性を低下させることが報告されている [49]。つまり, プロテアソーム阻害薬によ

表 1 低酸素誘導性遺伝子と実験手法

標的	カテゴリー	上流	細胞	酸素条件	培養時間	実験手法	文献
LDHA	代謝	HIF-1 α	細胞株 (MM.1S)	1%	24 時間	cDNA マイクロアレイ	22
Oct-4 NANOG SOX2	幹細胞性	N/A	細胞株 (KMS-12-BM, RPMI-8226)	1%	30 日間	RT-PCR, WB	29
CD180	幹細胞性	Ikaros	細胞株 (KMS-12-BM, RPMI-8226, KMS-21)	5%	48 時間	qRT-PCR, FCM	31
CXCR4	播種	HIF-1 α	細胞株 (MM.1S, H929, 5T33MMvt, LP1, RPMI-8226)	1%	24 時間	FCM, qRT-PCR	35
CCR1	播種	HIF-2 α	細胞株 (LP-1, RPMI-8226)	1% 未満	24~72 時間	qRT-PCR, FCM	36
AM	血管新生	HIF-1 α	細胞株 (L363, LME-1, UM-1, RPMI-8226, OPM-1, H929)	1% または CoCl ₂	16~48 時間	ELISA, RT-PCR	39
IL-32	骨病変	HIF-1 α	患者検体 (CD138+), 細胞株 (JJN3, H929, CAG)	2%	24~48 時間	WB, q-RT-PCR	40
miR-210	幹細胞性	HIF-1 α	患者検体 (CD38+), 細胞株 (MM.1S, RPMI-8226, KMS-12-BM, KMS-11 など)	1%	48 時間	cDNA マイクロアレイ, ノーザンブロット, q-RT-PCR	43
miR-135b	血管新生	HIF-1 α	細胞株 (RPMI-8226)	1%	~72 時間	q-RT-PCR	44
KDM3A	抗アポトーシス	HIF-1 α	患者検体 (CD38+), 細胞株 (MM.1S, RPMI-8226, KMS-12-BM, KMS-11 など)	1%	~48 時間	cDNA マイクロアレイ, qRT-PCR, WB	46
DARS-AS1	抗アポトーシス	HIF-1 α	患者検体 (CD38+), 細胞株 (LP-1, H929, U266, RPMI-8226)	1%	24 時間	RNA-seq, q-RT-PCR	47
H19	播種	HIF-1 α	細胞株 (RPMI-8226, H929, MM.1S)	1%	24 時間	qRT-PCR	48
ABCB1	薬剤耐性	HIF-1 α	細胞株 (OPM2, H929, MM.1S, U266)	1%	24 時間	FCM	51
TrxR1	薬剤耐性	HIF-1 α	細胞株 (RPMI-8226, U266)	1%	~24 時間	WB	52

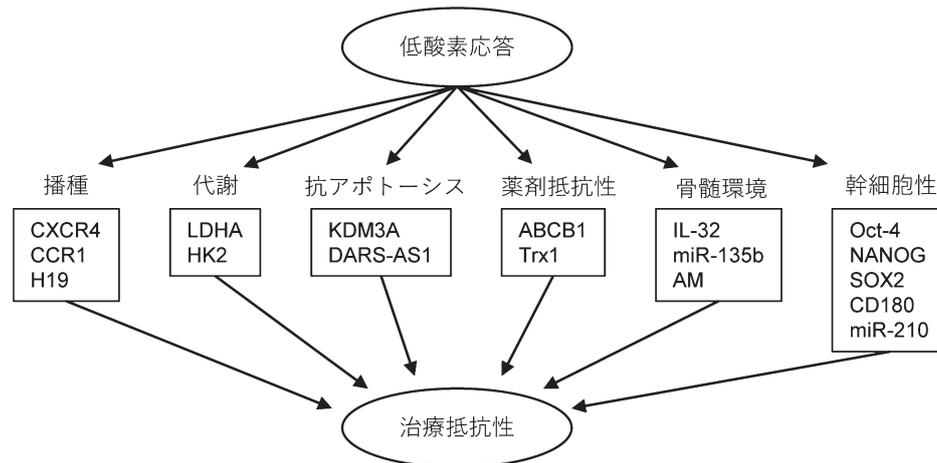


図2 多発性骨髄腫で報告されている低酸素誘導性遺伝子の機能。骨髄腫細胞(患者検体や細胞株)を低酸素に暴露し、発現が上昇する遺伝子とその機能解析が行われているものを図に示した。低酸素誘導性遺伝子は、さまざまな機序を介して治療抵抗性に寄与していると考えられる。

て HIF-1 α は蓄積するが転写活性は抑制されるということになるが、実際は *in vitro* において低酸素環境ではプロテアソーム阻害薬の効果が減弱することが多くの研究で実験的に示されている。ボルテゾミブは HIF-2 α の転写活性は抑制しないことが示唆されているため、部分的には HIF-2 α の標的因子が低酸素でのプロテアソーム阻害薬耐性に関与しているかもしれない [50]。また、低酸素応答による薬剤排泄トランスポーターである P 糖タンパク (*ABCB1*) の過剰発現がプロテアソーム阻害薬耐性に寄与しているという報告もある [51]。さらに、低酸素ストレスによって発現が上昇する TrxR1 (*TXNRD1*/thioredoxin reductase 1) は、NF κ B シグナルの活性化を介してプロテアソーム阻害薬耐性に寄与すると報告されている [52]。これらの報告は、低酸素応答により活性化する因子が複合的にプロテアソーム阻害薬抵抗性を惹起していることを示唆している。

おわりに

本稿では、主に低酸素ストレスにより発現が上昇する遺伝子の機能をまとめた(表1)。低酸素応答では主に HIF の活性化を介して、解糖系、播種、血管新生、幹細胞性に関与する遺伝子の発現が亢進する(図2)。これら低酸素誘導性遺伝子は、潜在的に難治性骨髄腫の治療標的となりうる。ただし実際の研究においては、*in vitro* と *in vivo*、細胞株や患者の遺伝子プロファイル、急性低酸素と慢性低酸素の違いなどについて注意を払うことが必要である。治療薬としての応用はすでに検討されており、実際に多発性骨髄腫において低酸素標的薬 evofosfamide (TH-302) の臨床試験が行われている [53]。低酸素環境で細胞障害性を発揮するプロドラッグ(hypoxia-activated prodrugs: HAPs)のひとつである evofosfamide は、造血器腫瘍だけでなく膀胱癌や軟部肉腫などの低酸素腫瘍についても臨床試験が進

められている [54]。このように低酸素環境を標的とした有望な治療薬が開発されつつあり、多発性骨髄腫における低酸素研究は、骨髄腫幹細胞を標的とする画期的な治療を生み出すことが期待される。

COI 開示

本論文に関し、開示すべき COI はありません。

文 献

- Mateos MV, Ludwig H, Bazarbachi A, Beksac M, Bladé J, Boccadoro M, et al. Insights on multiple myeloma treatment strategies. *Hemisphere* 2018;3:e163.
- Kawano Y, Moschetta M, Manier S, Glavey S, Görgün GT, Roccaro AM, et al. Targeting the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Immunol Rev* 2015;263:160-72.
- Semenza GL. Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *N Engl J Med* 2011;365:537-47.
- Wang GL, Semenza GL. Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood* 1993;82:3610-5.
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 2001;292:464-8.
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001;292(5516):468-72.
- Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 2006;441:437-43.
- Keith B, Simon MC. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell* 2007;129:465-72.
- Martin SK, Diamond P, Gronthos S, Peet DJ, Zannettino AC.

- The emerging role of hypoxia, HIF-1 and HIF-2 in multiple myeloma. *Leukemia* 2011;25:1533–42.
10. Borsi E, Terragna C, Brioli A, Tacchetti P, Martello M, Cavo M. Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factor 1 alpha in multiple myeloma. *Transl Res* 2015;165:641–50.
 11. Harrison JS, Rameshwar P, Chang V, Bandari P. Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers. *Blood* 2002;99:394.
 12. Colla S, Storti P, Donofrio G, Todoerti K, Bolzoni M, Lazzaretti M, et al. Low bone marrow oxygen tension and hypoxia-inducible factor-1 α overexpression characterize patients with multiple myeloma: role on the transcriptional and proangiogenic profiles of CD138(+) cells. *Leukemia* 2010;24:1967–70.
 13. Kizaka-Kondoh S, Konse-Nagasawa H. Significance of nitroimidazole compounds and hypoxia-inducible factor-1 for imaging tumor hypoxia. *Cancer Sci* 2009;100:1366–73.
 14. Asosingh K, De Raeve H, de Ridder M, Storme GA, Willems A, Van Riet I, et al. Role of the hypoxic bone marrow microenvironment in 5T2MM murine myeloma tumor progression. *Haematologica* 2005;90:810–7.
 15. Muñoz-Sánchez J, Cháñez-Cárdenas ME. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *J Appl Toxicol* 2019;39:556–70.
 16. Vengellur A, Phillips JM, Hogenesch JB, LaPres JJ. Gene expression profiling of hypoxia signaling in human hepatocellular carcinoma cells. *Physiol Genomics* 2005;22:308–18.
 17. Koh MY, Powis G. Passing the baton: the HIF switch. *Trends Biochem Sci* 2012;37:364–72.
 18. Hu J, Van Valckenborgh E, Menu E, De Bruyne E, Vanderkerken K. Understanding the hypoxic niche of multiple myeloma: therapeutic implications and contributions of mouse models. *Dis Model Mech* 2012;5:763–71.
 19. Iriuchishima H, Takubo K, Miyakawa Y, Nakamura-Ishizu A, Miyauchi Y, Fujita N, et al. Neovascular niche for human myeloma cells in immunodeficient mouse bone. *PLoS One* 2012;7:e30557.
 20. Abdel-Wahab AF, Mahmoud W, Al-Harizy RM. Targeting glucose metabolism to suppress cancer progression: prospective of anti-glycolytic cancer therapy. *Pharmacol Res* 2019;150:104511.
 21. Porporato PE, Dhup S, Dadhich RK, Copetti T, Sonveaux P. Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review. *Front Pharmacol* 2011;2:49.
 22. Maiso P, Huynh D, Moschetta M, Sacco A, Aljawai Y, Mishima Y, et al. Metabolic signature identifies novel targets for drug resistance in multiple myeloma. *Cancer Res* 2015;75:2071–82.
 23. Nanni C, Zamagni E. Therapy assessment in multiple myeloma with PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2017;44:111–7.
 24. Rasche L, Angtuaco E, McDonald JE, Buros A, Stein C, Pawlyn C, et al. Low expression of hexokinase-2 is associated with false-negative FDG-positron emission tomography in multiple myeloma. *Blood* 2017;130:30–4.
 25. Abe Y, Ikeda S, Kitadate A, Narita K, Kobayashi H, Miura D, et al. Low hexokinase-2 expression-associated false-negative ¹⁸F-FDG PET/CT as a potential prognostic predictor in patients with multiple myeloma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2019;46:1345–50.
 26. Yaccoby S. Two states of myeloma stem cells. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2018;18:38–43.
 27. Jakubikova J, Adamia S, Kost-Alimova M, Klippel S, Cervi D, Daley JF, et al. Lenalidomide targets clonogenic side population in multiple myeloma: pathophysiologic and clinical implications. *Blood* 2011;117:4409–19.
 28. Nara M, Teshima K, Watanabe A, Ito M, Iwamoto K, Kitabayashi A, et al. Bortezomib reduces the tumorigenicity of multiple myeloma via downregulation of upregulated targets in clonogenic side population cells. *PLoS One* 2013;8:e56954.
 29. Kawano Y, Kikukawa Y, Fujiwara S, Wada N, Okuno Y, Mitsuya H, et al. Hypoxia reduces CD138 expression and induces an immature and stem cell-like transcriptional program in myeloma cells. *Int J Oncol* 2013;43:1809–16.
 30. Muz B, de la Puente P, Azab F, Luderer M, Azab AK. Hypoxia promotes stem cell-like phenotype in multiple myeloma cells. *Blood Cancer J* 2014;4:e262.
 31. Kikuchi J, Kuroda Y, Koyama D, Osada N, Izumi T, Yasui H, et al. Myeloma Cells Are Activated in Bone Marrow Microenvironment by the CD180/MD-1 Complex, Which Senses Lipopolysaccharide. *Cancer Res* 2018;78:1766–78.
 32. Colombo M, Giannandrea D, Lesma E, Basile A, Chiaramonte R. Extracellular Vesicles Enhance Multiple Myeloma Metastatic Dissemination. *Int J Mol Sci* 2019;20:3236.
 33. Stuelten CH, Parent CA, Montell DJ. Cell motility in cancer invasion and metastasis: insights from simple model organisms. *Nat Rev Cancer* 2018;18:296–312.
 34. Ito M, Teshima K, Ikeda S, Kitadate A, Watanabe A, Nara M, et al. MicroRNA-150 inhibits tumor invasion and metastasis by targeting the chemokine receptor CCR6, in advanced cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 2014;123:1499–511.
 35. Azab AK, Hu J, Quang P, Azab F, Pitsillides C, Awwad R, et al. Hypoxia promotes dissemination of multiple myeloma through acquisition of epithelial to mesenchymal transition-like features. *Blood* 2012;119:5782–94.
 36. Vandyke K, Zeissig MN, Hewett DR, Martin SK, Mrozik KM, Cheong CM, et al. HIF-2 α promotes dissemination of plasma cells in multiple myeloma by regulating CXCL12/CXCR4 and CCR1. *Cancer Res* 2017;77:5452–63.
 37. Moschetta M, Kawano Y, Sacco A, Belotti A, Ribolla R, Chiarini M, et al. Bone Marrow Stroma and Vascular Contributions to Myeloma Bone Homing. *Curr Osteoporos Rep* 2017;15:499–506.
 38. Giatromanolaki A, Bai M, Margaritis D, Bourantas KL, Koukourakis MI, Sivridis E, et al. Hypoxia and activated VEGF/receptor pathway in multiple myeloma. *Anticancer Res* 2010;30:2831–6.
 39. Kocemba KA, van Andel H, de Haan-Kramer A, Mahtouk K, Versteeg R, Kersten MJ, et al. The hypoxia target adrenomedullin is aberrantly expressed in multiple myeloma and promotes angiogenesis. *Leukemia* 2013;27:1729–37.
 40. Zahoor M, Westhrin M, Aass KR, Moen SH, Misund K, Psonka-Antonczyk KM, et al. Hypoxia promotes IL-32 expression in myeloma cells, and high expression is associated

- with poor survival and bone loss. *Blood Adv* 2017;1:2656–66.
41. Peng X, Gao H, Xu R, Wang H, Mei J, Liu C. The interplay between HIF-1 α and noncoding RNAs in cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2020;39:27.
 42. Bartel DP. Metazoan microRNAs. *Cell* 2018;173:20–51.
 43. Ikeda S, Kitadate A, Abe F, Saitoh H, Michishita Y, Hatano Y, et al. Hypoxia-inducible microRNA-210 regulates the DIMT1-IRF4 oncogenic axis in multiple myeloma. *Cancer Sci* 2017; 108:641–52.
 44. Umezu T, Tadokoro H, Azuma K, Yoshizawa S, Ohyashiki K, Ohyashiki JH. Exosomal miR-135b shed from hypoxic multiple myeloma cells enhances angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1. *Blood* 2014;124:3748–57.
 45. Liu SJ, Horlbeck MA, Cho SW, Birk HS, Malatesta M, He D, et al. CRISPRi-based genome-scale identification of functional long noncoding RNA loci in human cells. *Science* 2017;355:aah7111.
 46. Ikeda S, Kitadate A, Abe F, Takahashi N, Tagawa H. Hypoxia-inducible KDM3A addiction in multiple myeloma. *Blood Adv* 2018;2:323–34.
 47. Tong J, Xu X, Zhang Z, Ma C, Xiang R, Liu J, et al. Hypoxia-induced long non-coding RNA DARS-AS1 regulates RBM39 stability to promote myeloma malignancy. *Haematologica* 2019. [Epub ahead of print]
 48. Corrado C, Costa V, Giavaresi G, Calabrese A, Conigliaro A, Alessandro R. Long non coding RNA H19: a new player in hypoxia-induced multiple myeloma cell dissemination. *Int J Mol Sci* 2019;20: E801.
 49. Shin DH, Chun YS, Lee DS, Huang LE, Park JW. Bortezomib inhibits tumor adaptation to hypoxia by stimulating the FIH-mediated repression of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 2008; 111:3131–6.
 50. Abd-Aziz N, Stanbridge EJ, Shafee N. Bortezomib attenuates HIF-1- but not HIF-2-mediated transcriptional activation. *Oncol Lett* 2015;10:2192–6.
 51. Muz B, Kusdono HD, Azab F, de la Puente P, Federico C, Fiala M, et al. Tariquidar sensitizes multiple myeloma cells to proteasome inhibitors via reduction of hypoxia-induced P-gp-mediated drug resistance. *Leuk Lymphoma* 2017;58: 2916–25.
 52. Raninga PV, Di Trapani G, Vuckovic S, Tonissen KF. TrxR1 inhibition overcomes both hypoxia-induced and acquired bortezomib resistance in multiple myeloma through NF- κ B inhibition. *Cell Cycle* 2016;15:559–72.
 53. Laubach JP, Liu CJ, Raje NS, Yee AJ, Armand P, Schlossman RL, et al. A Phase I/II study of evofosfamide, a hypoxia-activated prodrug with or without bortezomib in subjects with relapsed/refractory multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2019;25:478–86.
 54. Phillips RM. Targeting the hypoxic fraction of tumours using hypoxia-activated prodrugs. *Cancer Chemother Pharmacol* 2016;77:441–57.

Challenge for identifying specific hypoxia-inducible genes as novel therapeutic targets in multiple myeloma

Sho IKEDA and Hiroyuki TAGAWA

Department of Hematology, Nephrology, and Rheumatology, Akita University Graduate School of Medicine, Akita, Japan

Abstract

Multiple myeloma (MM) is a refractory hematological malignant neoplasm derived from plasma cells. It has been extensively studied in the quest to develop treatment strategies. Furthermore, several factors of the bone marrow microenvironment could be candidates for novel therapeutic targets. Among these, the hypoxic response is the most important factor maintaining cell homeostasis, and is generally considered as a therapeutic target for various cancers including MM. Although oxygen partial pressure of bone marrow is 50–55 mmHg, that of hypoxic niche is less than 10 mmHg. Myeloma cells adapting to the hypoxic niche exhibit changes in gene expression via activation of hypoxia-inducible factor (HIF), and subsequently acquiring treatment resistance. However, because of its negative effects on normal cells and tissues, HIF inhibitor is not used in medical practice. Hence, downstream targets of HIF should be investigated. In particular, changes induced by the hypoxic response, such as metabolic pathways, cell dissemination, and malignant bone marrow environment, may be promising therapeutic targets. Therefore, future studies should focus on identifying therapeutic drugs targeting hypoxic environments and hypoxia-inducible genes.

Key words: multiple myeloma, hypoxic response, hypoxia, HIF