

骨髓低酸素微小環境に適応する多発性骨髄腫細胞の 分子病態解明と治療標的分子探索

池田 翔

秋田大学大学院医学系研究科 血液・腎臓・膠原病内科学講座

(accepted 2 May 2022)

Exploring the molecular pathogenesis and therapeutic targets of multiple myeloma cells adapting to hypoxic bone marrow microenvironment

Sho Ikeda

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

Key words : Multiple myeloma, Hypoxia, KDM3A, miR-210, HK2

はじめに

多発性骨髄腫は、骨髓に集積する腫瘍性形質細胞が CRAB 症状（高カルシウム血症、腎不全、貧血、病的骨折）をはじめとする様々な症状を引き起こす難治性造血器腫瘍のひとつである。治療薬として、プロテアソーム阻害薬、セレブロンモジュレーター、新規抗体療法などが実用化され、その予後は改善してきている。若年患者に対しては寛解導入療法に引き続く大量化学療法併用自家造血幹細胞移植（自家移植）により深い寛解が得られ、自家移植非適応の高齢患者に対しても分子標的療法の発達により長期予後を獲得する例も多くなってきているが、ほとんどの症例で再発を繰り返し、最終的には致命的となる。この原因として、現在の微小残存病変検査で認知することのできないごく少数の治療抵抗性分画の残存が示唆される。このような分画の性質を明らかにするため、筆者らは骨髓微小環境における低酸素応答という観点から研究を継続し

てきた。

低酸素応答とは、低酸素誘導因子 HIF (hypoxia-inducible factor) の蓄積とその転写活性によりさまざまな遺伝子の発現変化を通じて、環境の酸素分圧の変化に適応し細胞の恒常性を保つ重要なプロセスである¹⁾。HIF は、Semenza により低酸素に応答してエリスロポエチンの発現を誘導するエンハンサーとして発見された²⁾。さらに、Ratcliffe と Kaelin により以下のような HIF 調節機構が明らかにされた。正常酸素下では HIF α タンパクのプロリンが水酸化され、そこに VHL (von Hippel-Lindau) タンパクが結合してユビキチン化され、プロテアソームで常に分解されるが、低酸素環境ではプロリンの水酸化が起こらず、HIF α は分解されず蓄積し、低酸素応答領域 HRE (hypoxia-response element) をもつ遺伝子の転写因子としての活性を発揮する (図 1A)^{3,4)}。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、2019 年にノーベル生理学医学賞受賞に至った。

さらに今日では、低酸素応答による遺伝子発現の変動は、正常細胞だけでなくさまざまながんにおいて重要な役割を果たし、治療抵抗性や予後不良と関連していることが明らかになってきている⁵⁾。多発性骨髄腫においても新規治療戦略を構築するため、筆者らを含む多数の研究グループが低酸素応答と骨髄腫細胞のか

Corresponding Author : Sho Ikeda
Department of Hematology, Nephrology and Rheumatology, Akita University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Hondo, Akita 010-8543, Japan
Tel : +81-18-884-6116
Fax : +81-18-836-2613
E-mail : siked@med.akita-u.ac.jp
令和 4 年 2 月 14 日 秋田医学会学術賞受賞記念講演

かわりについて研究を進めてきた。本稿では、骨髄微小環境における酸素分圧低下について解説したのち、筆者らが機能解析をした3つの低酸素誘導性分子の機能について論ずる。

1. 骨髄低酸素ニッチ

固形癌においては、新生血管の届かない腫瘍内部の酸素分圧は低下し、がん細胞の休眠、抗アポトーシス遺伝子の発現上昇といった変化が起こり、幹細胞性や抗がん剤への耐性が誘導されると考えられている⁶⁾。一方で造血器腫瘍においては、造血幹細胞が存在する骨内膜ニッチという低酸素環境に「がん幹細胞(様分画)」が存在し、再発・再燃の原因になると考えられ

ている⁷⁾。人間の動脈血と静脈血の酸素分圧はそれぞれ約 95 mmHg、40 mmHg 程度であることが知られており、骨髄血の酸素分圧は 50~55 mmHg と報告されている^{8,9)}。臓器としての骨髄の酸素分圧は動脈血と静脈血の間にあるということには納得がいく。しかし、ガス分析では骨内膜ニッチの酸素分圧は評価できない。この点については、2-ニトロイミダゾール系化合物であるピモニダゾールという 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を有する薬剤を使用し、骨髄腫モデルマウスにおいて酸素分圧 10 mmHg 以下の低酸素ニッチに生存適応する骨髄腫細胞が存在することが示されている¹⁰⁾(図 1B)。

では、低酸素ニッチに適応した骨髄腫細胞はどのようなふるまいをしているのだろうか。低酸素ストレス

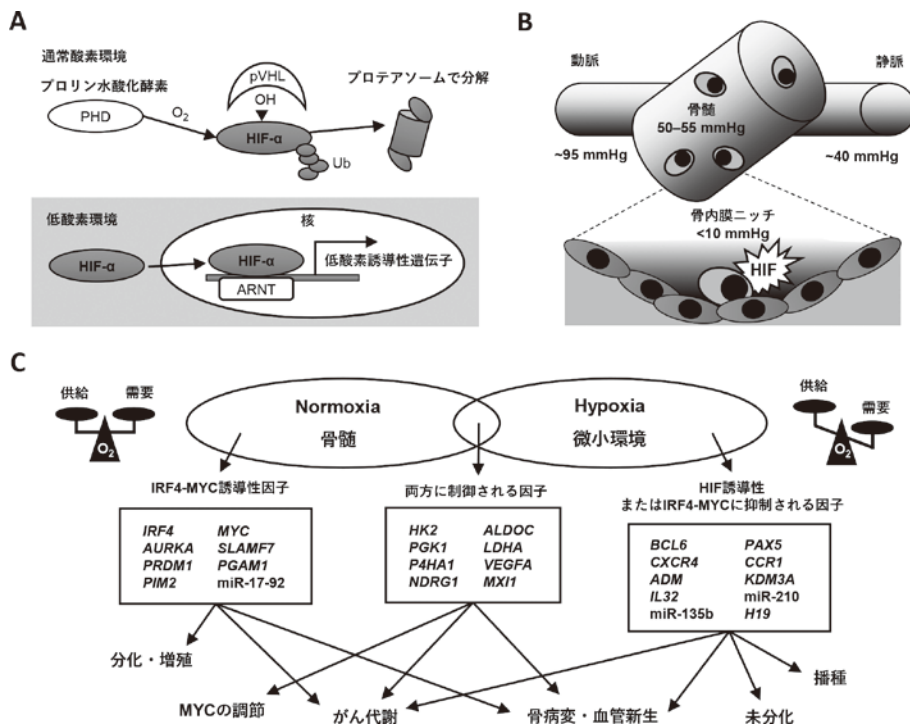


図 1. 多発性骨髄腫と低酸素

A 低酸素応答の模式図。正常酸素では低酸素誘導因子 HIF は絶えず分解されているが、低酸素環境では転写因子として機能し、特異的な遺伝子の発現を誘導する。

B 動脈血、骨髄、静脈血、および低酸素ニッチの酸素分圧。骨髄内は動脈と静脈の中間の酸素分圧を示す。骨髄内の低酸素ニッチは極めて低い酸素分圧であると考えられる。

C 正常酸素と低酸素では優位な転写因子が交代し、それぞれの環境に適した遺伝子の発現が強調されると考えられる。

(文献 13 より引用改変)

によって 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の低下, BCL6, PAX5 といった B 細胞性マーカーや Oct-4, NANOG, SOX2 といった幹細胞マーカーの誘導が起こることが報告されている^{11,12)}。これらは低酸素ストレスによる未分化形質の獲得を示唆している。また, CXCR4 や CCR1 といったケモカインレセプターの発現変動による細胞移動能の上昇, HIF 誘導性の解糖系遺伝子の発現亢進によるエネルギー代謝の変化, DKK-1 などの破骨細胞を活性化する液性因子の放出による骨病変の促進, そして VEGF による血管新生促進などさまざまな変化が認識されており, それぞれが治療抵抗性につながっている可能性がある¹³⁾ (図 1C)。これら多数の報告は, 骨髄腫細胞の低酸素応答に関する理解が今後の新規治療戦略の構築のために重要であることを意味している。筆者らは正常酸素または低酸素 (1% O₂) で培養した骨髄腫細胞株と患者検体について網羅的遺伝子発現解析を行い, 低酸素培養により発現が上昇する coding 遺伝子や microRNA を抽出した。これらの機能解析を通じて, 多発性骨髄腫のさらなる分子病態解明と新規治療標的探索を行い, 知見を蓄積してきた。以下, それらの報告を概説する。

2. ヒストン脱メチル化酵素 KDM3A¹⁴⁾

骨髄腫細胞株および患者検体に対する網羅的遺伝子発現解析結果に対する Gene Ontology 解析や Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) によって HIF-1 α の標的遺伝子や解糖系に関連する遺伝子の発現上昇が見出され, データの確度が確かめられた (図 2A)。その中で H3K9 脱メチル化酵素群の発現上昇がみられ, この群においてウエスタンブロットによるタンパク発現の検討で KDM3A の著明な発現上昇がみられたことから, 筆者らはこの分子に着目した (図 2BC)。KDM3A は jumonji ドメイン含有の脱メチル化酵素群のひとつであり, ヒストン H3 ヒストンテールの 9 番目のリジン (K9) を脱メチル化し標的遺伝子の発現をエピジェネティックに発現誘導することで, いくつかのがんにおいて腫瘍促進的に働くことが知られている¹⁵⁾。また KDM3A を含むいくつかの jumonji ドメイン含有ヒストンリジン脱メチル化酵素は HIF の制御下にあり, 低酸素刺激で発現が上昇し, 種々のがんや加齢性疾患の発症に関与しているとされる¹⁶⁾。しかしながら, 多発性骨髄腫において KDM3A の低酸素応答や低酸素微

小環境における役割については明らかではなかった。そこで筆者らは KDM3A を RNA 干渉によりノックダウンし機能解析を行ったところ, 低酸素条件での KDM3A のノックダウンにより有意なアポトーシス細胞の増加を認めた (図 2DE)。さらに KDM3A ノックダウン細胞株に対する網羅的遺伝子発現解析を各酸素条件で行い, 低酸素条件で特異的に KDM3A に制御される分子として noncoding RNA の MALAT1 に着目した。MALAT1 は正常細胞にも発現しているが, がんにおいてもストレスで誘導され, MAPK/ERK, PI3K/AKT, β -catenin/Wnt, Hippo といった様々な造腫瘍的経路を活性化し, 多発性骨髄腫においてもその高発現は予後不良因子となることが示されている^{17,18)}。筆者らの実験においては, 低酸素環境において MALAT1 は HIF-1 α の発現を保護し, そのノックダウンによってやはり低酸素培養下でのアポトーシス誘導効果が見られ, HIF に制御される解糖系遺伝子の抑制がみられた。これらの結果より, 低酸素微小環境で高発現した KDM3A が MALAT1 の働きを介して, HIF 誘導性の解糖系遺伝子の活性化に寄与しているのではないかと結論付けた (図 2F)。

3. 解糖系遺伝子 HK2¹⁹⁾

次に筆者らは低酸素応答で発現が上昇する解糖系遺伝子のなかで, 特に低酸素微小環境で骨髄腫細胞の生存や薬剤耐性に寄与する遺伝子の特定を試みた。がん細胞においてはワールブルグ効果によってエネルギー産生は解糖系に依存しているが, 解糖系遺伝子の多くは HIF によって転写が亢進し, 低酸素条件ではさらに発現が上昇することが知られている。骨髄腫細胞株の網羅的代謝産物測定を用いた既報では, いくつかの解糖系遺伝子のプロテアソーム阻害薬耐性への関与が示唆されていたが, その機序については明らかではなかった²⁰⁾。そこで筆者らは低酸素に暴露した患者検体の解析データより, 特に発現が上昇した解糖系遺伝子の中で, グルコース代謝の第一ステップを触媒する HK2/Hexokinase-2 に着目した。その理由は, 多発性骨髄腫に対する FDG-PET 検査と HK2 のかわりについて複数の報告がなされていたからである。MRI で骨病変が認められるにもかかわらず FDG-PET で有意な集積を認めない多発性骨髄腫の症例 (PET 偽陰性) が約 1 割存在し, それらの症例では HK2 の発現が低いことが示されており²¹⁾, さらに筆者らはこの

(24)

多発性骨髄腫と骨髄低酸素微小環境

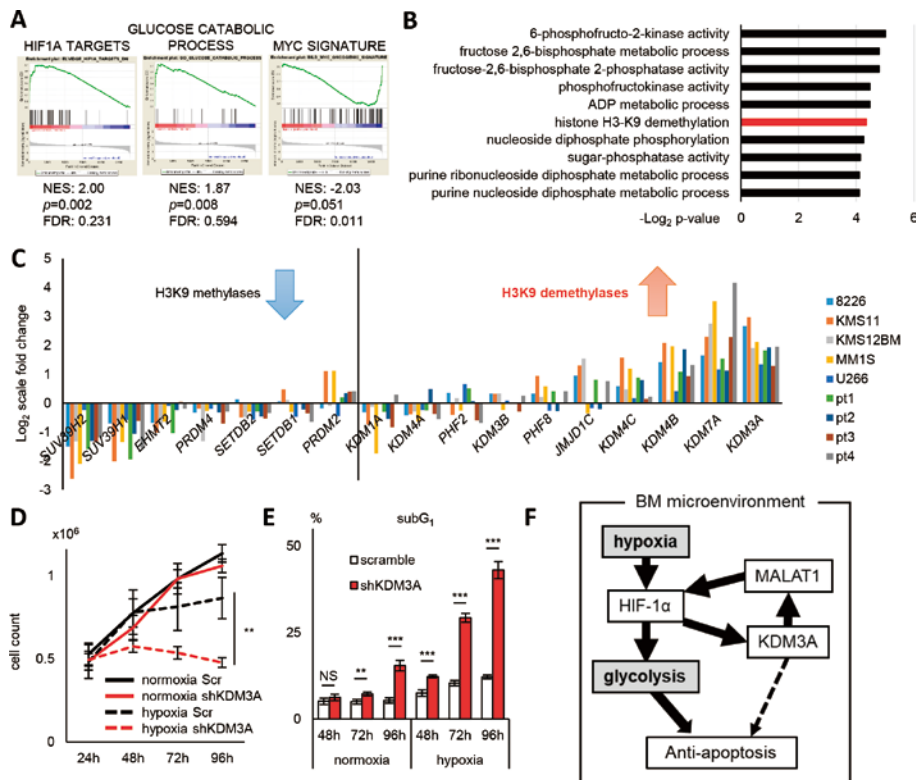


図2. 多発性骨髄腫における KDM3A の機能

A 骨髄腫細胞株・患者検体を低酸素に暴露し網羅的遺伝子発現解析を行い、GSEA 解析を行うと、低酸素誘導遺伝子、解糖系が亢進し、MYC 誘導性遺伝子の抑制が起こることが分かった。

B 同様に Gene Ontology 解析を行うと、解糖系だけでなくヒストン脱メチル化酵素の有意な発現上昇が見出された。

C H3K9 脱メチル化酵素のうち、KDM3A の明らかな発現上昇がみられた。

D 低酸素環境では KDM3A ノックダウン細胞の有意な増殖抑制がみられた。

E 低酸素環境では KDM3A ノックダウン細胞の有意な細胞死増加がみられた。

F さらに網羅的遺伝子発現解析により、KDM3A は long noncoding RNA である MALAT1 を介して解糖系を制御していることが示唆された。

(文献 14 より引用改変)

HK2 の低発現が関与する「PET 偽陰性症例」の予後は FDG-PET および MRI 陽性例 (HK2 高発現群) と比較し有意に良好であることを示した²²⁾。これらの報告より、HK2 が関与する解糖系の活性化は予後不良を導くことが示唆される。ここで筆者らは低酸素環境でさらに発現が亢進する HK2 の新規機能を探索することにした。まず HK2 を骨髄腫細胞株に対してノックダウンすると、解糖系が阻害され最終代謝産物の乳酸の産生が抑制され、さらに低酸素培養においてのみ有意に死細胞が増加した。HK2 阻害薬として試薬レベルで用いられる小分子 3-プロモピルビン酸

(3-BrPA) もまた、正常酸素より低酸素環境で有意に強くアポトーシスを誘導した。低酸素環境で HK2 の阻害による抗骨髄腫効果が高まる理由について、解糖系の阻害以外の観点から研究を進めた。HK2 はストレス環境において mTOR の働きを抑制し、結果オートファジーを誘導することが報告されている²³⁾。また、骨髄腫細胞において適切な程度のオートファジーの活性化は小胞体ストレスを軽減し、抗骨髄腫薬プロテアソーム阻害薬抵抗性を導くと考えられている²⁴⁾。そこで筆者らは骨髄腫細胞における HK2 とオートファジーの関連について検討した。オートファジー関連タ

ンパクの p62, LC3 の発現や電子顕微鏡の所見を検討した結果、低酸素暴露によりオートファジーは亢進するが、HK2 のノックダウンによりこの低酸素誘導性オートファジーは阻害されることがわかった (図 3A)。さらに、*in vitro* および *in vivo* で、HK2 の阻害とプロテアソーム阻害薬ボルテゾミブの併用効果について検討した。その結果、両者の併用時に最もアポトーシスは誘導され、免疫不全マウスに移植した骨髄腫細胞の著明な腫瘍形成抑制作用がみられた (図 3BC)。この結果は、低酸素環境における抗アポトーシスに、オートファジーに関与する HK2 の役割が重要であることを示唆するものであった (図 3D)。HK2 は古くから知られている酵素遺伝子であるが、このように新規機能が臨床的に注目されることもあり、今後の研究対象選定において深い示唆を与えるものとなった。

4. microRNA-210²⁵⁾

上記 2 つの低酸素誘導性因子についての機能解析は、環境の酸素分圧によって重要な抗アポトーシス遺伝子が異なり、適当な治療薬・治療標的も異なることを示唆している。ここで、正常酸素環境と低酸素環境で中心となる遺伝子制御因子の相違がなぜ起こってくるかについて、microRNA の発現変動から検討を行った。microRNA はタンパクをコードしない小分子 RNA であり、特異的な配列によりいくつかの特定の mRNA の 3'UTR (非翻訳領域) に結合し、その翻訳を阻害したり、mRNA 自体を分解したりするなどしてその遺伝子の発現を抑制する²⁶⁾。microRNA の作用によって生物の遺伝子発現は緻密に調節されているが、microRNA の発現が異常をきたすとき、炎症、免疫異常、発がんなどさまざまな疾患に関与することが明ら

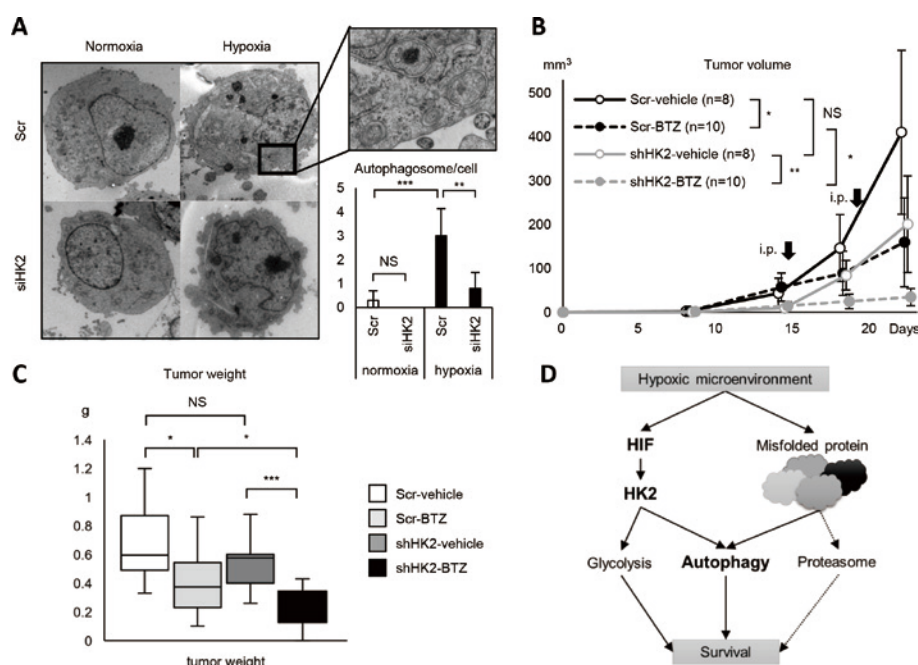


図 3. 多発性骨髄腫における hexokinase-2 (HK2) の機能

- A 低酸素誘導性の解糖系遺伝子 HK2 をノックダウンすると、低酸素で増加するオートファゴソームが減少した。
 B HK2 ノックダウン骨髄腫細胞株に抗骨髄腫薬のプロテアソーム阻害薬ボルテゾミブ (BTZ) を併用すると、免疫不全マウスの異種移植モデルにおいて有意な腫瘍抑制効果がみられた。
 C 摘出した腫瘍の重さにも、有意な減少がみられた。
 D 低酸素環境において、HK2 は解糖系の亢進だけでなくオートファジーを誘導することで、プロテアソーム阻害薬抵抗性に寄与していることが想定された。
 (文献 19 より引用改変)

かとなっている²⁶⁾。やはり cDNA マイクロアレイにより、骨髄腫細胞の低酸素応答で活性化する microRNA を網羅的に解析した。その結果、低酸素刺激により劇的な miR-210 の発現上昇が細胞株と患者検体の両方でみられた (図 4A)。miR-210 はプロモーターに HIF が結合する配列を持ち、低酸素刺激で発現が上昇することが知られている microRNA である²⁷⁾。しかしながら、多発性骨髄腫における標的遺伝子や機能はほとんど知られていなかった。miR-210 の低酸素環境における標的遺伝子を再び網羅的遺伝子発現解析により検討したところ、miR-210 結合配列が存在するリボソーム

RNA メチル化酵素 DMT1 がもっとも miR-210 導入により抑制を受けることがわかった (図 4BC)。さらに、DMT1 は低酸素刺激で抑制されることが分かった。したがって、低酸素刺激による DMT1 の低下は miR-210 の過剰発現が介在していると考えられた。DMT1 はがんにおいてほとんど機能は知られていなかったが、出版済みデータセットを解析してみると、多発性骨髄腫の進展とともに発現が上昇し、高発現群の予後は不良であったため、DMT1 はがん遺伝子としてふるまうことが予想された。DMT1 のノックダウンすることで、細胞周期停止、アポトーシスの誘導が起こ

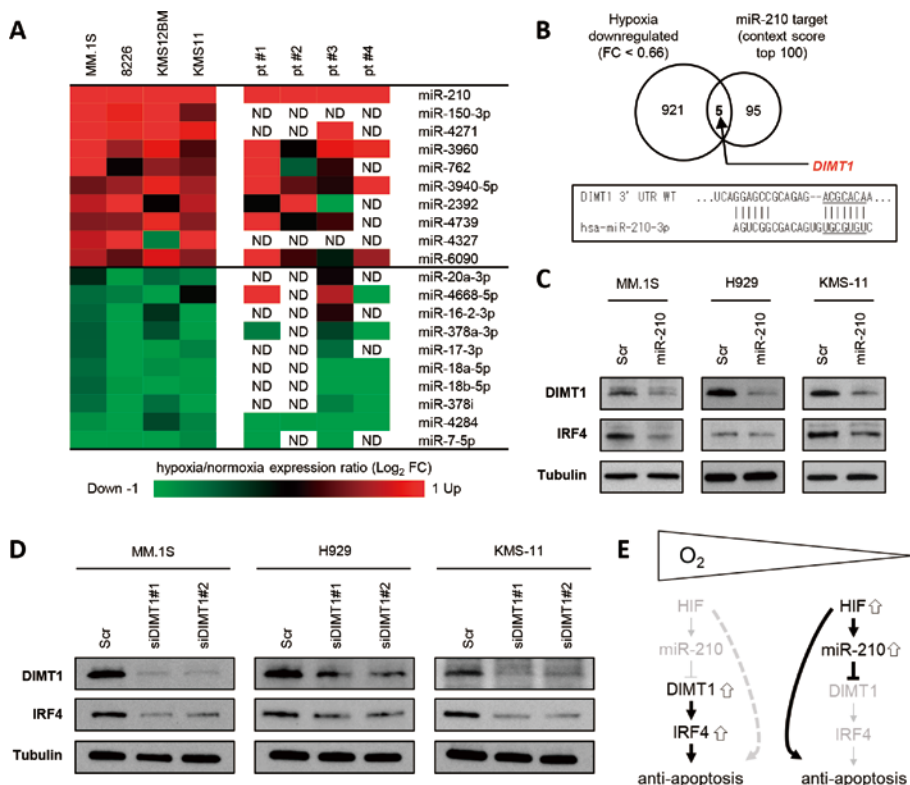


図 4. 多発性骨髄腫における microRNA 210 の機能

A 骨髄腫細胞株・患者検体を低酸素に暴露し網羅的 microRNA 発現解析を行ったところ、明らかに miR-210 の上昇が認められた。

B 低酸素により抑制を受ける遺伝子との共通部分に、*in silico* で miR-210 の標的と予測された遺伝子 DMT1 があった。

C miR-210 を骨髄腫細胞に導入すると、実際に DMT1 の抑制が確認できた。また、骨髄腫におけるがん遺伝子 IRF4 の抑制が起こった。

D DMT1 のノックダウンすることによっても、骨髄腫におけるがん遺伝子 IRF4 の抑制が起こった。

E 正常酸素では DMT1 が寄与する IRF4 や MYC などのがん遺伝子の活性化が起こるが、低酸素環境では miR-210 の発現増加に起因する抗アポトーシス経路の変更が起ることが予測された。

(文献 25 より引用改変)

り、骨髄腫マウスの皮下腫瘍の増大抑制を認めた。この原因を検討するため、miR-210 導入や DIMT1 のノックダウンによるがん遺伝子や抗アポトーシス遺伝子の変動を検討したところ、特異的に IRF4 の抑制が認められた (図 4CD)。IRF4 は骨髄腫細胞の正常対応細胞である形質細胞の分化・維持に必須の遺伝子である²⁸⁾。リボソーム RNA には遺伝子特異性があることが知られており、DIMT1 によるリボソームの修飾が IRF4 の翻訳に関与している可能性が考えられた。複数の患者検体データセットを解析すると DIMT1 と IRF4 の発現に有意な正の相関が認められたこともこの推測を支持するものである。さらに、IRF4 と MYC は positive feedback を形成するが²⁸⁾、この両者は低酸素刺激で低下することを認めた。低酸素環境では代謝調節のため HIF が MYC を抑制することも知られており、その結果、増殖も抑制されると考えられる²⁹⁾。まとめると、正常酸素環境では IRF4-MYC の活性化により増殖能と抗アポトーシスの形質を獲得し、低酸素環境では IRF4-MYC は miR-210 や HIF により抑制され、かわりに HIF が主たる調節因子となり抗アポトーシスに寄与することが示唆された (図 4E)。

5. 低酸素標的薬と相補的治療戦略

実際、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³⁰⁾。低酸素環境で活性化するプロドラッグ (hypoxia-activated prodrugs: HAPs) evofosfamide は、低酸素刺激により

アルキル化剤を分離し、細胞障害活性を発揮する薬剤である³¹⁾。この試験は evofosfamide とプロテアソーム阻害薬ボルテゾミブの併用で行われた。おそらくこの試験のコンセプトは、低酸素適応分画に対する治療と大多数を占める分画に対する治療を同時に行うことにあると考えられる。なぜならば、HAPs によって低酸素に適応した静止期の幹細胞様分画を殺したとしても、主たるクローンが低酸素ストレスなどの環境要因の働きで静止期の幹細胞様分画に変化することが想定されるからである³²⁾。基礎的な見地からこれらの薬剤の併用によって相乗的な細胞株に対するアポトーシス誘導の促進、骨髄腫モデルマウスの生存期間延長が報告されている^{33,34)}。従来の抗骨髄腫薬と低酸素標的薬との併用により、単一の細胞集団に対する相乗的効果だけでなく、異なる遺伝子発現集団に対する相補的な治療効果が期待される。さらに、細胞障害性抗がん剤だけでなく、低酸素誘導性因子に対する分子標的薬が放出されるような HAPs の開発も有望と考えられる。

おわりに

多発性骨髄腫の病態において、低酸素応答は微小環境へ適応し生存するために様々な遺伝子発現の変化を起こし、治療抵抗性や再発と関連していると考えられる。筆者らが機能解析を行った 3 つの低酸素誘導性分子 KDM3A, HK2, そして miR-210 はそれぞれが低酸素環境に適応した骨髄腫細胞に必須の働きをしてお

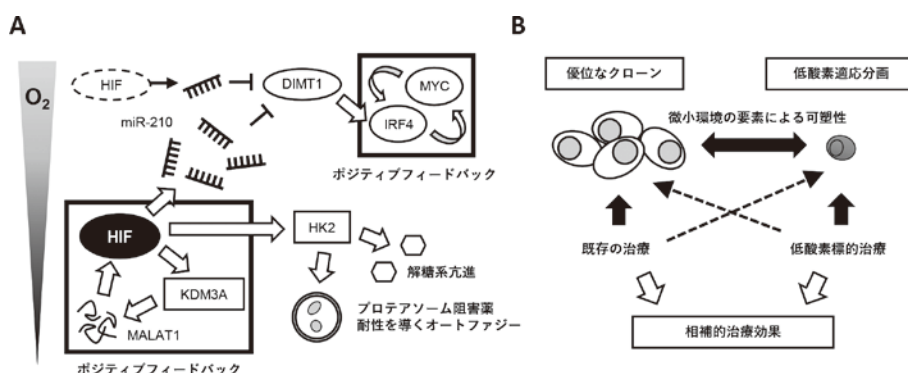


図 5. 低酸素環境における骨髄腫細胞のふるまいと低酸素標的治療の有用性

A 低酸素誘導因子 HIF の活性化に起因する KDM3A, HK2, そして miR-210 はそれぞれの機能を通じて骨髄腫細胞の悪性化や薬剤耐性に寄与していると考えられる。

B 大多数を占めるクローンに対する従来の治療だけでなく、低酸素環境に適応した少数の分画に対する治療を加えることで、再発リスクの低下、ひいては治癒への希望が開けると考えられる。

り、治療標的として検討できる (図 5A)。さらに、低酸素を標的とした治療と既存の治療を組み合わせ、相補的な効果を生み出すことで、「治癒」を目指した治療への道筋が開けると考えられる (図 5B)。低酸素応答は多発性骨髄腫だけでなくがん研究の重要な分野のひとつであり、今後様々ながんにおいて低酸素応答に関連した新規治療戦略が登場することが期待される。

謝 辞

大学院博士課程および卒後の研究の指導をいただいた田川博之先生、現在の研究の援助をいただいている高橋直人教授、血液・腎臓・膠原病内科および研究室技官の皆様に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Semenza, G.L. (2011) Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *N. Engl. J. Med.*, **365**, 537-547.
- 2) Wang, G.L. and Semenza, G.L. (1993) Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood*, **82**, 3610-3615.
- 3) Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S. and Kaelin, W.G. Jr. (2001) HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science*, **292**, 464-468.
- 4) Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., *et al.* (2001) Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, **292**, 468-472.
- 5) Jing, X., Yang, F., Shao, C., Wei, K., Xie, M., Shen, H. and Shu, Y. (2019) Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment. *Mol. Cancer*, **18**, 157.
- 6) Petrova, V., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Melino, G. and Amelio, I. (2018) The hypoxic tumour microenvironment. *Oncogenesis*, **7**, 10.
- 7) Méndez-Ferrer, S., Bonnet, D., Steensma, D.P., Hasserjian, R.P., Ghobrial, I.M., Gribben, J.G., Andreeff, M. and Krause, D.S. (2020) Bone marrow niches in haematological malignancies. *Nat. Rev. Cancer*, **20**, 285-298.
- 8) Harrison, J.S., Rameshwar, P., Chang, V. and Bandari, P. (2002) Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers. *Blood*, **99**, 394.
- 9) Colla, S., Storti, P., Donofrio, G., *et al.* (2010) 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*, **24**, 1967-1970.
- 10) Asosingh, K., de Raeve, H., de Ridder, M., Storme, G.A., Willems, A., van Riet, I., van Camp, B. and Vanderkerken, K. (2005) Role of the hypoxic bone marrow microenvironment in 5T2MM murine myeloma tumor progression. *Haematologica*, **90**, 810-817.
- 11) Kawano, Y., Kikukawa, Y., Fujiwara, S., Wada, N., Okuno, Y., Mitsuya, H. and Hata, H. (2013) Hypoxia reduces CD138 expression and induces an immature and stem cell-like transcriptional program in myeloma cells. *Int. J. Oncol.*, **43**, 1809-1816.
- 12) Muz, B., de la Puente, P., Azab, F., Luderer, M. and Azab, A.K. (2014) Hypoxia promotes stem cell-like phenotype in multiple myeloma cells. *Blood Cancer J.*, **4**, e262.
- 13) Ikeda, S. and Tagawa, H. (2021) Impact of hypoxia on the pathogenesis and therapy resistance in multiple myeloma. *Cancer Sci.*, **112**, 3995-4004.
- 14) Ikeda, S., Kitadate, A., Abe, F., Takahashi, N. and Tagawa, H. (2018) Hypoxia-inducible KDM3A addiction in multiple myeloma. *Blood Adv.*, **2**, 323-334.
- 15) Sui, Y., Gu, R. and Janknecht, R. (2021) Crucial Functions of the JMJD1/KDM3 Epigenetic Regulators in Cancer. *Mol. Cancer Res.*, **19**, 3-13.
- 16) Salminen, A., Kaarniranta, K. and Kauppinen, A. (2016) Hypoxia-Inducible Histone Lysine Demethylases: Impact on the Aging Process and Age-Related Diseases. *Aging Dis*, **7**, 180-200.
- 17) Goyal, B., Yadav, S.R.M., Awasthee, N., Gupta, S., Kunnumakkara, A.B. and Gupta, S.C. (2021) Diagnostic, prognostic, and therapeutic significance of long non-coding RNA MALAT1 in cancer. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*, **1875**, 188502.
- 18) Handa, H., Kuroda, Y., Kimura, K., *et al.* (2017) Long non-coding RNA MALAT1 is an inducible stress response gene associated with extramedullary

- spread and poor prognosis of multiple myeloma. *Bz. J. Haematol.*, **179**, 449-460.
- 19) Ikeda, S., Abe, F., Matsuda, Y., Kitadate, A., Takahashi, N. and Tagawa, H. (2020) Hypoxia-inducible hexokinase-2 enhances anti-apoptotic function via activating autophagy in multiple myeloma. *Cancer Sci.*, **111**, 4088-4101.
 - 20) Maiso, P., Huynh, D., Moschetta, M., Sacco, A., Al-jawai, Y., Mishima, Y., Asara, J.M., Roccaro, A.M., Kimmelman, A.C. and Ghobrial, I.M. (2015) Metabolic signature identifies novel targets for drug resistance in multiple myeloma. *Cancer Res.*, **75**, 2071-2082.
 - 21) Rasche, L., Angtuaco, E., McDonald, J.E., *et al.* (2017) Low expression of hexokinase-2 is associated with false-negative FDG-positron emission tomography in multiple myeloma. *Blood*, **130**, 30-34.
 - 22) Abe, Y., Ikeda, S., Kitadate, A., Narita, K., Kobayashi, H., Miura, D., Takeuchi, M., O'uchi, E., O'uchi, T. and Matsue, K. (2019) 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*, **46**, 1345-1350.
 - 23) Roberts, D.J., Tan-Sah, V.P., Ding, E.Y., Smith, J.M. and Miyamoto, S. (2014) Hexokinase-II positively regulates glucose starvation-induced autophagy through TORC1 inhibition. *Mol. Cell*, **53**, 521-533.
 - 24) Desantis, V., Saltarella, I., Lamanuzzi, A., Mariggiò, M.A., Racanelli, V., Vacca, A. and Frassanito, M.A. (2018) Autophagy : A New Mechanism of Prosurvival and Drug Resistance in Multiple Myeloma. *Transl. Oncol.*, **11**, 1350-1357.
 - 25) Ikeda, S., Kitadate, A., Abe, F., *et al.* (2017) Hypoxia-inducible microRNA-210 regulates the DIMT1-IRF4 oncogenic axis in multiple myeloma. *Cancer Sci.*, **108**, 641-652.
 - 26) Bartel, D.P. (2018) Metazoan MicroRNAs. *Cell*, **173**, 20-51.
 - 27) Chan, S.Y. and Loscalzo, J. (2010) MicroRNA-210 : a unique and pleiotropic hypoxamir. *Cell Cycle*, **9**, 1072-1083.
 - 28) Shaffer, A.L., Emre, N.C., Lamy, L., *et al.* (2008) IRF4 addiction in multiple myeloma. *Nature*, **454**, 226-231.
 - 29) Wong, W.J., Qiu, B., Nakazawa, M.S., Qing, G. and Simon, M.C. (2013) MYC degradation under low O2 tension promotes survival by evading hypoxia-induced cell death. *Mol. Cell Biol.*, **33**, 3494-3504.
 - 30) Laubach, J.P., Liu, C.J., Raje, N.S., *et al.* (2019) 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.*, **25**, 478-486.
 - 31) Phillips, R.M. (2016) Targeting the hypoxic fraction of tumours using hypoxia-activated prodrugs. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **77**, 441-457.
 - 32) Yaccoby, S. (2018) Two States of Myeloma Stem Cells. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.*, **18**, 38-43.
 - 33) Hu, J., Handisides, D.R., van Valckenborgh, E., *et al.* (2010) Targeting the multiple myeloma hypoxic niche with TH-302, a hypoxia-activated prodrug. *Blood*, **116**, 1524-1527.
 - 34) Hu, J., van Valckenborgh, E., Xu, D., *et al.* (2013) Synergistic induction of apoptosis in multiple myeloma cells by bortezomib and hypoxia-activated prodrug TH-302, in vivo and in vitro. *Mol. Cancer Ther.*, **12**, 1763-1773.