

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591379

研究課題名(和文)多発性骨髄腫の発症・進展におけるAIDとMMSETの役割

研究課題名(英文)Role of AID and MMSET in progression of multiple myeloma

研究代表者

滝沢 牧子(Takizawa, Makiko)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70613090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫(MM)は終末分化したB細胞である形質細胞が腫瘍化したものと考えられているが、悪性化の背景に、腫瘍細胞におけるゲノム不安定性が存在していると考えられている。MMにおいて、DNA損傷応答とゲノム不安定性との関連を明らかにした報告はなく、この点に着目して研究をおこなった。胚中心B細胞に発現する転写抑制因子BCL6がMMにおいても発現していること、AIDは発現していないことを明らかにした。また、BCL6によってATMの転写が抑制され、DNA損傷認識が阻害され、ゲノム不安定性に関与している可能性が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Multiple myeloma (MM) is plasma cell neoplasm, which is a tumor of terminally differentiated B cell. Though genomic instability is considered as one of the underlying mechanisms of the tumor progression, its molecular mechanisms remains to be elucidated. AID and BCL6 has been reported to play a pivotal role in B cell tumors but its role in MM has not been studied. In this study, we showed an abundant expression level of BCL6 in myeloma cells but not AID. We evaluated the role of BCL6 in DNA damage responses. BCL6 negatively regulated the expression of ATM and therefore inhibited the formation of gamma H2AX upon X irradiation, which can lead to genomic instability in the myeloma cell treated with anti cancer drugs and irradiation.

研究分野：血液内科

キーワード：ゲノム不安定性 多発性骨髄腫 BCL6

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫 (MM) は終末分化した B 細胞である形質細胞が腫瘍化したものと考えられているが、前がん状態である monoclonal gammopathy with undermined significance (MGUS) から年間 1% 程度が MM へと悪性化し、初期には治療反応性の MM が次第に治療抵抗性になることが知られている。このような現象を引き起こす背景に、腫瘍細胞におけるゲノム不安定性が存在していると考えられている。一方、胚中心 B 細胞では免疫多様性をもたらすのに必要なゲノム改変が AID という酵素を介して行われるが、B 細胞の生存を担保するために ATR, p53, p21, Chk1 などの DNA 損傷応答 (DDR) 遺伝子の抑制が BCL6 を介して起きていると言われている。マウスモデルの解析から胚中心における遺伝子変異が MM の起源であるとの説が注目されている。しかし、MM において、胚中心 B 細胞で発現する各種蛋白 (AID/BCL6 など) の働きとゲノム不安定性との関連を明らかにした報告はなく、この点に着目して研究をおこなった。また、MMSET の転座を有する細胞では DNA 損傷応答が抑制されるとの報告があり、注目されている。

2. 研究の目的

胚中心 B 細胞で発現する AID および BCL6 の発現を定量的に評価し、MM におけるその役割を明らかにする。

特に MM 細胞において DNA 損傷応答におけるその役割を明らかにする。MMSET 転座を有する細胞において DNA 損傷応答の変化を検討する。

3. 研究の方法

(1) 骨髄腫患者の骨髄中の CD138 陽性骨髄腫細胞における AID, BCL6 の発現量を定量的に評価する。

(2) 細胞株における BCL6 の発現およびプロモーター領域の点突然変異の有無を解析する。また、患者骨髄腫細胞においても点突然変異を解析する。

(3) BCL6 の強制発現株を作成し、その DNA 損傷応答における役割を検討する。

(4) 細胞株を用いて MMSET 転座を有する細胞株および有さない細胞株 (KMS11, KMS12) を用いて X 線照射後の H2AX・53BP1 の foci 形成を定量的に評価した。

4. 研究成果

(1) 患者骨髄腫細胞 (40 症例) および骨髄腫細胞株 (7 種) において AID の発現はほとんど見られなかった。しかし、細胞株を末梢血より単離し分化させた樹状細胞と共培養すると、AID の発現が見られるようになった。これらのことから、骨髄環境微小環境における骨髄腫細胞では AID が一定の条件で発現している可能性がある。一方 BCL6 について発現量を定量的に評価すると、骨髄腫細胞でも高発現している患者と低発現の患者とが存在することが明らかになった。しかし、その

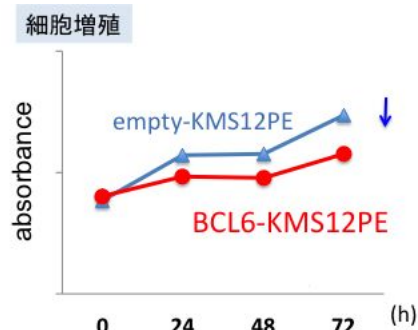
発現量と病期・MMSET を含む染色体転座との関連は今回検討した症例では明らかでなかった。長期的な経過との関連を今後検討する予定である。

(2) MMSET 転座を有する細胞では DNA 損傷部位にクロマチン変化が起きにくく、DNA 損傷部位における 53BP1 の集積が起きにくいと報告されているが、X 線照射後に KMS11 (MMSET 転座陽性) と KMS12 (転座陰性) の免疫染色をおこなった結果では 53BP1 の集積、H2AX の集積ともに差を認めず、報告は追試できなかった。

(3) BCL6 のプロモーター領域は AID による点突然変異が高頻度に行き起こることが知られており、AID が働いたフットプリントとして確認できる。そのような変異が BCL6 の発現に影響を与える可能性を検討した。細胞株においては変異が見られたが、BCL6 の高発現患者および低発現患者のプロモーター領域をシークエンスにて確認したところ、両者ともに点突然変異は認められず、BCL6 の発現調節において AID による変異が関与している可能性は低いと考えられた。

(4) 次に胚中心 B 細胞において BCL6 が転写を抑制的に行っていることが既知の DDR 遺伝子 (ATR, p53, p21, Chk1) について骨髄腫細胞における発現量を調べた。BCL6 の発現と DDR 遺伝子との間に発現量の相関を認めず、骨髄腫細胞では BCL6 がこれらの転写を抑制しておらず、胚中心 B 細胞とは異なる制御を行っていると考えられた。

(5) BCL6 が骨髄腫細胞で高発現していることの意義を明らかにするため、細胞株を用いて実験を行った。骨髄腫細胞株の BCL6 発現量は患者サンプルに比べて著しく低かったが、報告されているように IL6 を添加して培養すると BCL6 の発現が誘導された。このことは骨髄環境中においてサイトカインなどの外的液性因子を介して BCL6 の発現が誘導されることを示唆しており、患者ごとに高発現と低発現が見られる原因の一つと考えられた。骨髄腫細胞株 7 種類 (KMS12PE, KMS12BM, KMS11, KMS26, RPMI8226, KMS18, ARH77) では KMS12PE において低いながらも BCL6 の発現がみられた。そこで、KMS12PE に BCL6 をレトロウイルスにより強制発現し、さらなる解析を行った。BCL6 の強制発現により KMS12PE 細胞に増殖抑制がみられた。

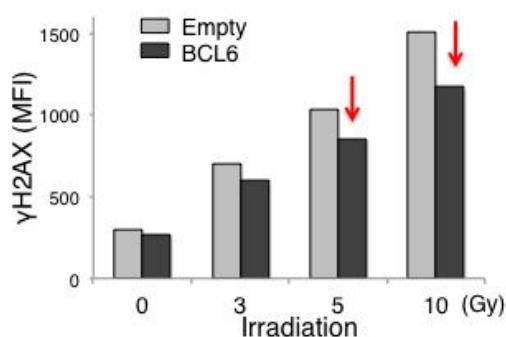


胚中心由来の B 腫瘍では BCL6 は増殖促進的

に働くことから、骨髄腫においては BCL6 の役割が異なることが示唆された。また、この細胞株を用いて DDR 遺伝子の発現も定量的に評価したが、いずれも抑制されておらず、胚中心由来の B 細胞とは異なる制御を受けていると考えられた。BCL6 がこれらの遺伝子のプロモーターに結合しているかを調べるために CHIP アッセイを行ったところ、BCL6 はこれらの既知の遺伝子のプロモーター上に結合しており、BCL6 が結合することが直接転写抑制に結びつかない原因として転写抑制因子（コリプレッサー）の働きが細胞毎に異なる可能性が考えられた。

(6) 次に、骨髄腫における BCL6 が DNA 損傷応答にどのような役割を果たしているかを明らかにするために放射線照射および抗がん剤暴露による DNA 損傷時の応答を調べた。照射後の DNA 損傷部位を認識する H2AX 形成を定量的に評価すると、BCL6 強制発現骨髄腫細胞株においては H2AX の形成が抑制されていた。

γH2AX定量



このことは損傷が起きた DNA が正常に認識されていないことを示唆し、ゲノム不安定性をもたらすものと考えられる。H2AX 形成は DNA 損傷によって ATM が活性化することに依存しているため ATM の発現量を RNA レベル、蛋白レベルで解析した。すると、BCL6 強制発現株においては ATM の転写レベル、蛋白レベルともに抑制されていることが明らかとなった。これらの結果より骨髄腫細胞に発現させた BCL6 は ATM の転写抑制を介しての DNA 損傷応答における最初の損傷を認識するステップを抑制し、ゲノム不安定性をもたらしている可能性が示唆された。このことは現在の骨髄腫治療において用いられている DNA 損傷をおこす抗がん剤治療や放射線治療によって BCL6 発現細胞においてはゲノム不安定性による病期進展につながる可能性を示唆する重要な知見と考えられる。

(7) 次に、BCL6 による ATM の転写抑制がその直接的な作用かを検討するために BCL6 と転写抑制因子（コリプレッサー）との結合阻害剤を添加して培養した細胞を用いて ATM の転写抑制が解除されるかを検討したが、ATM の転

写抑制は解除されず、コリプレッサーを介した転写抑制ではないと考えられた。

(8) また、BCL6 強制発現株と非発現株を比較し、現在網羅的に RNA 発現解析をおこなっており、データ解析をおこなっている。主たるパスウェイとしてサイトカインシグナル、接着分子のパスウェイが抽出されてきており、今後さらに詳細に検討する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Kenichi Tahara, Makiko Takizawa, et.al.,

BCL6 does not negatively regulate DNA damage response genes in Multiple Myeloma Cells

56th American Society of Hematology Annual Meeting, 2014.12.6, San Francisco, USA.

滝沢牧子, 他

BCL6 は多発性骨髄腫の DNA 損傷応答を抑制的に制御し、S 期停止を引き起こす。第 40 回日本骨髄腫学会学術集会、2015.5.16、「くまもと森都心プラザ（熊本県・熊本市）」

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

滝沢 牧子 (Makiko Takizawa)・医学部附属病院・助教

研究者番号：70613090

(2) 研究分担者

半田 寛 (Hiroshi Handa)・医学部附属病院・講師

研究者番号：90282409

(3) 連携研究者

山根有人 (Yamane Arito)・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：60701323