

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18418

研究課題名(和文) 多発性骨髄腫の“アキレス腱”であるIRF4とMYCの転写制御因子の網羅的探索

研究課題名(英文) An investigation of the molecular mechanisms of IMiDs induced IRF4 and MYC downregulation in multiple myeloma

研究代表者

山本 淳一 (Yamamoto, Junichi)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：40748472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：IRF4とMYCは、多発性骨髄腫細胞の生存と増殖に必須な“アキレス腱”であると考えられているが、これまでにこれらを直接の標的とした薬剤は開発されてこなかった。Immunomodulatory drugs (IMiDs)は多発性骨髄腫を含む悪性腫瘍に著効であり、その薬効の少なくとも一部はIRF4やMYCを標的としていると考えられている。

本研究はIMiDsの薬効に関連してIRF4やMYCの発現を制御する因子を網羅的に探索し、その分子メカニズムの解明を目指した。その結果として本研究によって同定された5つの遺伝子が実際にIMiDsによるIRF4やMYC制御に関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：IRF4 and MYC are known as essential genes for survival of multiple myeloma cells. Immunomodulatory drugs (IMiDs) promote the downregulation of IRF4 and MYC expression in multiple myeloma cells. However, the underlying mechanisms are not entirely clear. The purpose of this study was to elucidate the molecular mechanisms of IMiDs induced IRF4 and MYC downregulation. In this study, I attempted to identify protein factors that regulate transcription of IRF4 and MYC. Our results suggest that five genes identified in this study are involved in the expression of IRF4 and MYC and/or IMiDs induced growth inhibition in multiple myeloma cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：多発性骨髄腫 IMiDs IRF4 MYC 転写因子 がん

1. 研究開始当初の背景

(1) 特定の腫瘍細胞の生存や増殖が、単一の oncogenic pathway やがん遺伝子に過度に依存している現象を oncogene addiction と呼び、治療の標的として有望な腫瘍細胞の“アキレス腱”であると考えられている。転写因子 IRF4 と MYC は多発性骨髄腫の代表的な“アキレス腱”に当たる遺伝子であることが知られている。しかし、現在の所 IRF4 や MYC を分子標的にした薬剤は開発されておらず、構造的に低分子化合物の直接の標的には成り難いと考えられている。

(2) サリドマイドやその誘導体であるレナリドミド、ポマリドミドは Immunomodulatory drugs (IMiDs) と呼ばれ多発性骨髄腫を含む B 細胞の悪性腫瘍に著効である。IMiDs は多発性骨髄腫細胞株において IRF4 や MYC の発現を抑制することから、少なくとも薬効の一部はこの“アキレス腱”を標的としたものであると考えられている。しかしながら、IMiDs が IRF4 や MYC の発現を制御する分子メカニズムの全貌はよく分かっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、多発性骨髄腫細胞の生存と増殖に必須な“アキレス腱”遺伝子である IRF4 と MYC の発現を IMiDs が制御する分子メカニズムの全体像を明らかにすることである。IRF4 と MYC は多発性骨髄腫の重要な分子標的でありながら、構造的に低分子化合物の直接の標的になり難く有効な分子標的薬は開発されていない。

本研究では、多発性骨髄腫において IRF4 や MYC の転写を抑制する薬剤である IMiDs を起点とし、IRF4 や MYC の発現制御に関する因子群を最新の質量分析技術と逆遺伝学的スクリーニングを組み合わせることで網羅的に探索し、IMiDs が IRF4 と MYC の発現を制御する分子メカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 実験系の構築と改良

本研究では、IRF4 や MYC 遺伝子のプロモーター領域に結合する因子群を免疫沈降によって精製し、質量分析によって網羅的に探索するが、IRF4 や MYC の発現を制御する遺伝子特異的な転写因子を効率よく検出するために次の2点の工夫を行う。

一点目は、SILAC 法による相対定量の利用である。SILAC 法は比較対照の細胞をそれぞれ質量数の異なる安定同位体で代謝的にラベルし、同時に質量分析を行うことで極めて定量性の高い質量分析を実現する実験法である。二点目は、現所属先の独自技術である磁性ナノ粒子 (FG beads) の利用である。FG beads は現所属先で開発された Styrene と GMA からなる磁性微粒子で、タンパク質の非特異的な吸着が極めて少ないビーズである。抗体を直接固定化することで従来法にあった ProteinG に由来する非特異的な吸着がな

く、固定化に使用するリンカーや官能基を自由に選択することで本研究に適した担体を作製し、実験に用いることができる。

(2) 多発性骨髄腫細胞株における IMiDs 処理による MYC と IRF4 の発現制御に関する転写因子の網羅的探索

多発性骨髄腫細胞株 OPM2 を用いて、IRF4・MYC 遺伝子のプロモーター領域に結合するタンパク質を精製する。IMiDs は MYC や IRF4 の発現を減少させることから、IMiDs 処理によって変動したタンパク質は IMiDs の作用機序に関与している可能性がある。

(3) 同定された因子群の絞り込み

(2) で同定された大量の候補因子群から、IMiDs の作用機序に関与する真の標的遺伝子を絞り込む必要がある。そこで、本研究では snRNA library screening による網羅的なノックダウン実験によって候補因子の絞り込みを行う。各 shRNA を区別するためのバーコード配列を組み込んだプール型レンチウイルス shRNA ライブラリーを多発性骨髄腫細胞株 OPM2 に感染させ、IMiDs 処理を行った後にゲノム DNA を回収し、次世代シーケンサーによってゲノムに組み込まれたバーコード配列を解析する。あるバーコード配列のリード数は、その shRNA が組み込まれた細胞の数を反映しているために、その因子のノックダウンが IMiDs による OPM2 の増殖抑制に与えた影響を調べることができる。

(4) IMiDs による IRF4、MYC の発現抑制の詳細な分子メカニズムの解明

(3) で絞り込んだ遺伝子について、詳細な分子メカニズムを解析する。各遺伝子のノックダウンによる IRF や MYC の遺伝子発現の変化。各遺伝子のノックダウンによる、多発性骨髄腫細胞の増殖の変化。各遺伝子のノックダウンによる IMiDs 感受性の変化。IMiDs 処理による各遺伝子の IRF4、MYC 遺伝子のリクルートの変化、等を検証する。

4. 研究成果

(1) 抗体を固定化した磁性ナノ粒子 (FG beads) の作製と評価

当研究室で開発された FG beads はタンパク質の非特異的吸着が少なく、タンパク質精製の有用なツールとしてこれまで多くの成果を報告しているが、それは主にリガンドとして低分子化合物を固定化したものであり、抗体のような高分子を固定化した場合の実施例は少ない。そこで抗 FLAG 抗体を固定化した FG beads を作製し、免疫沈降法・クロマチン免疫沈降法により機能評価を行った。図 1 に示すように市販の抗 FLAG magnetic beads と比べ、優れた S/N 比を示すことが確認できた。

(2) IRF4 と MYC のプロモーター領域に結合しているタンパク質の同定

多発性骨髄腫細胞株 OPM2 において、IRF4、MYC 遺伝子のプロモーター領域に結合する転

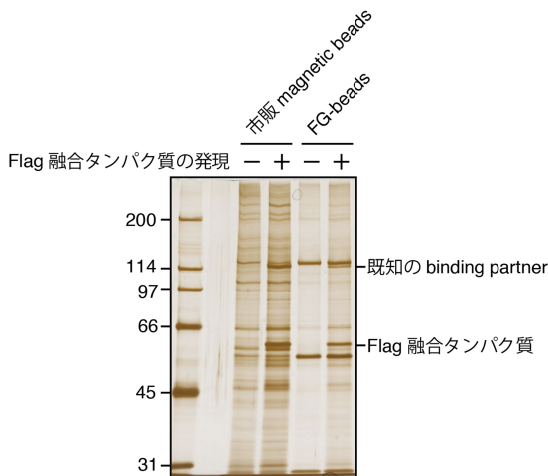


図 1. FG beads を用いた Flag 融合タンパク質の精製

写因子の中で、IMiDs 処理により変動する因子群の網羅的同定を試みた。質量分析により極めて多数のタンパク質が同定された。IMiDs 処理によって結合量が変化した (DMSO 処理群と Pomalidomide 処理群のペプチド数の比が 2 倍以上、もしくは 1/2 倍以下) タンパク質も極めて多数であり、事前の予想よりもずっと多いという結果であった。

(3) 同定された因子群の絞り込み

同定された多数の因子の中から、IMiDs の薬効に關与する真の標的を絞り込むために、shRNA library screening による網羅的なノックダウン実験を行った。当初の実験計画においては(2)で同定された因子群を対象とした Focused shRNA library screening を行う予定であったが、候補因子が極めて多数であったことから、計画を変更し、全遺伝子を対象としたスクリーニングを行った。その結果、IMiDs の直接の標的である CRBN を含む遺伝子リストを得た。しかし、これらの遺伝子に対して個別ノックダウンによるバリデーションを行った所、ノックダウンが致死である遺伝子が多く、IMiDs の薬効との関わりを個別の実験により確認することが困難な遺伝子が大半を占めていた。この結果から、(2)で得た候補因子群から、shRNA library screening により IMiDs の薬効に關与する因子だけを絞り込み、IMiDs による MYC、IRF4 発現制御に關わる遺伝子の信頼できる包括的なリストを作製するという目標は、残念ながら現在の所、達成されていない。

(4) IMiDs による IRF4、MYC の発現抑制の詳細な分子メカニズムの解明

現時点で、IRF4、MYC の発現を制御する信頼性の高い包括的な遺伝子リストは得られていないが、同定された因子の中には、興味深い転写関連因子が複数含まれていた。そこで、これらの因子について個別に IRF4 や MYC の発現への關与、IMiDs の薬効への關与を検証した。

本研究では、図 2 以降に示す 5 つの転写関連因子 (個別に解析した因子の具体的な遺

伝子名等は国際学術誌への報告まで控えさせて頂く)について個別の解析を行った。

まず各転写関連因子が、本当に MYC あるいは IRF4 の発現に關与しているかどうか、個別にノックダウンを行い、RT-PCR により MYC と IRF4 の発現レベルを確認した。図 2 に IRF4 の RT-PCR の結果を示す。各因子のノックダウンにはそれぞれ、3 種類の shRNA 配列を用いて解析したが、図中ではその内の 1 つの結果のみを示す。因子 1~4 のノックダウンによって IRF4 の発現が減少することが確認できた。MYC の発現についてもほぼ同様の結果であった (データ示さず)。

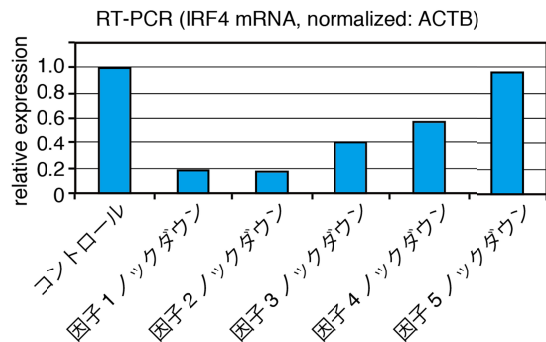


図 2. IRF4 の発現に対するノックダウンの影響

次に各因子のノックダウンが多発性骨髄腫細胞株の増殖に与える影響を解析した。その結果を図 3 に示す。因子 1~4 のノックダウンによって多発性骨髄腫細胞株の増殖が抑制された。因子 5 のノックダウンについては述べた IRF4・MYC の発現変化と同様に影響が見られなかった。

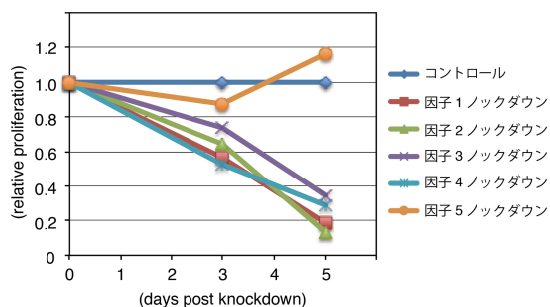


図 3. 各因子のノックダウンの細胞増殖への影響

最後に各因子が IMiDs 感受性に与える影響を解析した。因子 1~4 については、ノックダウンが増殖を強く阻害してしまうために解析ができなかった。因子 5 をノックダウンし、IMiDs による抗骨髄腫作用の変化を解析した結果を図 4 に示す。図 2・3 で示したように、因子 5 のノックダウンは IRF4 の発現や多発性骨髄腫細胞株の増殖に大きな影響を与えなかった。一方で図 4 に示すように、IMiDs の抗骨髄腫作用を弱めるという結果が得られた。この結果から、因子 5 は直接 MYC や IRF4 の発現を制御しているのではないが、IMiDs による制御を仲介していることが示唆

された。

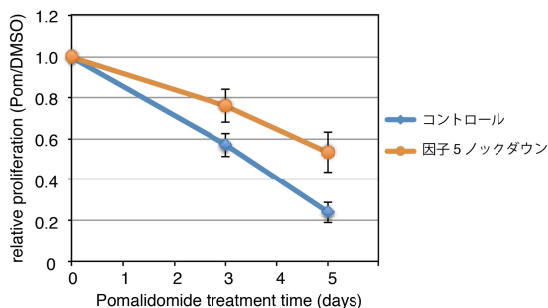


図4. 因子5のノックダウンのIMiDs感受性への影響

上述のように、本研究によって見いだされた5つの転写関連因子を個別に解析した結果、5つのうち4つは直接MYCやIRF4の発現に影響を与えていることが示唆され、残りの一つはIMiDsの下流においてその感受性を仲介していることが示唆された。現在、その分子メカニズムについて詳細な解析を進めており、近い将来、投稿論文として国際学術誌に投稿する予定である。

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 2件)

伊藤拓水, 山本淳一, 半田宏. 免疫調節薬 (immunomodulatory drug: IMiDs) による抗骨髄腫効果の作用機序. 日本臨牀 2016 74 巻 増刊号 5 152-157. 査読無

Cao QF, Yamamoto J, Isobe T, Tateno S, Murase Y, Chen Y, Handa H, Yamaguchi Y. Characterization of the Human Transcription Elongation Factor Rtf1: Evidence for Nonoverlapping Functions of Rtf1 and the Paf1 Complex. Mol Cell Biol. 2015 Oct 35(20):3459-70. 査読有

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0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 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
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

山本 淳一 (YAMAMOTO, Junichi)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：40748472

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()