

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 22 日現在

機関番号：33920

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19561

研究課題名(和文) CRISPR/Cas9システムを利用した骨髄腫の悪性化に関わる分子機構の解明

研究課題名(英文) Uncovering malignant mechanisms in multiple myeloma cells using CRISPR/Cas9 system

研究代表者

太田 明伸(Ota, Akinobu)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：30438048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫(以下MM)は遺伝的背景の複雑な血液悪性腫瘍である。新規薬剤やそれらの併用治療が一定の治療成績の向上を達成しているが、根治には至らず難治性MMを克服できる治療法が切望されている。本研究では、CRISPR/Cas9システムによるゲノム編集技術を利用して、IL-6シグナル伝達経路に関わりをもつ細胞増殖関連分子の同定を試みた。その結果、IL-6刺激によって遺伝子発現の増加を示す新規キナーゼXを同定した。キナーゼXは、MM細胞株の一部で過剰発現し細胞増殖との関連性が示唆された。以上から、キナーゼXはMMの悪性化へ関与している可能性が高く新規治療薬の標的分子になりえると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Multiple myeloma (MM) is a hematopoietic malignancy with complex and/or different types of genetic background. Although novel therapeutic agents and their combination therapies are more effective than before, MM remains to be an incurable disease. Thus, development of novel molecular-targeted therapies is required to overcome malignant phenotype of MM. Here, the researcher tried to uncover the malignant mechanism of MM using CRISPR/Cas9 system. cDNA microarray analyses revealed that a novel interleukin-6 (IL-6)-inducible serine/threonine kinase X increased after IL-6 treatment in IL-6-dependent MM cell lines, ANBL-6 and FLAM-76. Both mRNA and protein expression of X kinase were detectable and were over-expressed in a subset of MM cell lines. CRISPR/Cas9-mediated gene disruption of gene X resulted in tumor suppression in MM cells. Collectively, these results suggest that novel IL-6-inducible kinase X might be a promising molecular target for MM therapy.

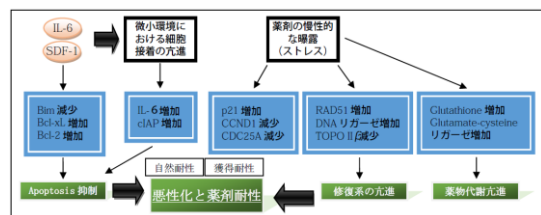
研究分野：癌の分子生物学

キーワード：多発性骨髄腫 悪性化 Interleukin-6 cDNAマイクロアレイ CRISPR/Cas9

1. 研究開始当初の背景

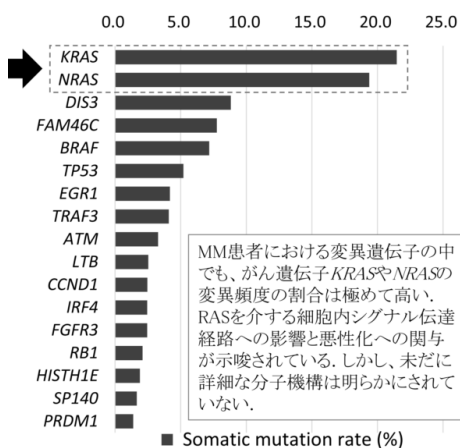
多発性骨髄腫 (Multiple myeloma, 以下 MM) は形質細胞性の血液悪性腫瘍である。本疾患は、同種造血幹細胞移植の有効性が示されていない。ゆえに、化学療法とその治療効果は患者の予後を左右する極めて重要な因子である。実際、MM の臨床症状は多彩であり治療やその効果の予測は難しい。新規治療薬であるプロテアソーム阻害剤、免疫調節剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の適用によって治療選択の幅は広がったものの、完全寛解に至る例は依然として少ない。また、多剤併用療法は重篤な副作用のリスクが高く生活の質を脅かす。この MM 治療における最大の障壁は、MM の悪性化と薬剤耐性化である。しかしながら、発症期から薬剤耐性化までに観察される様々な異常の中で、MM の悪性化に真に重要な因子は未だに明らかとなっていない。発症初期には、免疫グロブリン遺伝子座における染色体転座、染色体 13 番におけるゲノム欠失、高 2 倍体、TP53 や NRAS 遺伝子変異が観察される。さらに、進行期には Interleukin-6 (IL-6) と骨髄微小環境との相互作用や薬剤ストレス応答の関与が示唆されている<sup>1)</sup> (図 1)。

図 1 骨髄腫の悪性化・薬剤耐性機構<sup>2)</sup>



MM の発症は、形質芽球のクローン進化によって成立するが、無症候性 M タンパク血症 (MGUS)、くすぶり型 MM、MM、難治性 MM へと進展する過程において見出される染色体異常が近年明らかにされつつある。次世代シーケンス (Next Generation Sequence, 以下 NGS) 技術の発展により、全ゲノムまたはエクソン領域の塩基配列が解読された結果、KRAS や NRAS などが高頻度に変異していることが示された<sup>3)</sup> (図 2、矢印)。しかし、悪性化との関連はいまだ不明な点が多い。

図 2 MM 患者に見出された遺伝子変異リスト



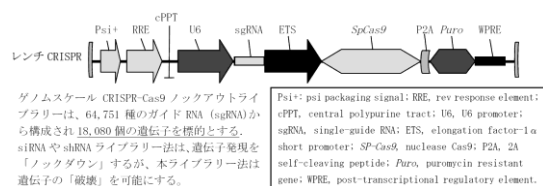
MM 治療の現状に目を向けると、新規薬剤の導入によって治療成績の飛躍的な向上がみられており、今後も抗体医薬をはじめ様々な新薬が上市されることが見込まれるが、再発・難治性の MM 患者に対する根治療法は存在しないのが現状である。分子病態に基づく新たな治療ストラテジーが切望されている。

臨床病態を考慮すると、MM の悪性化にはゲノム異常を伴う薬剤耐性化と、髄外への進展による形質細胞性白血病 (plasma cell leukemia) の発症が密接に関与する可能性が高い。その悪性化には、MM 発症初期の増殖・生存シグナル伝達経路とは異なる、代替経路の利用ないしは新規経路の獲得を介した分子機構の存在が示唆される。

2. 研究の目的

そこで今回、研究代表者は MM の分子病態を包括的に理解するため、遺伝子機能解析に決定的な結論を導くことのできる実験系を採用した。すなわち、レンチウイルス CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子破壊スクリーニング法を利用し<sup>4)</sup> (図 3)、MM の悪性化に関与する遺伝子を解明することを目的とした。将来的には、本研究成果を基盤とした MM の新たな診断、治療法への応用を目指す方針とした。

図 3 レンチウイルス CRISPR-Cas9 システム



以下に研究期間内に目標とした成果を記す。  
(i) MM 細胞の IL-6 「依存性」から「非依存性」への悪性転換に関わる遺伝子の探索

(ii) IL-6 による遺伝子発現様式の解明と MM 細胞の増殖に関連する IL-6 誘導性分子の同定

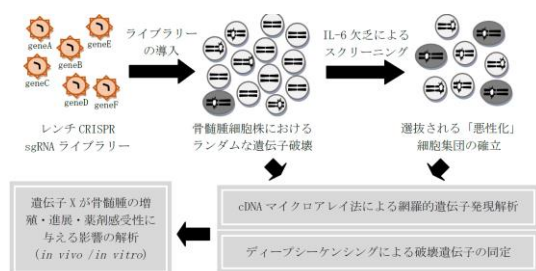
(iii) 薬剤耐性に関わるゲノム異常領域と責任分子の同定

3. 研究の方法

(i) MM 細胞の IL-6 「依存性」から「非依存性」への悪性転換に関わる遺伝子の探索

研究代表者らは、これまでにアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターによるゲノム編集システムを利用して、単一遺伝子破壊に関する新たな方法を確立した<sup>5), 6)</sup>。このゲノム編集技術を利用して、BRCA1 や KRAS 変異が正常体細胞に及ぼす影響を報告した<sup>7), 8)</sup> この手法は、精度は高いが網羅的解析に向いているとは言い難い。そのため、本研究では、図 4 に示される CRISPR/Cas9 システムによるゲノムワイドな遺伝子破壊スクリーニング法を採用し、IL-6 依存性の MM 細胞株から IL-6 非依存性の細胞株を作成することを試みた。

図 4 CRISPR ライブラリーシステムによるスクリーニングの概要



### (ii) IL-6 による遺伝子発現様式の解明と MM 細胞の増殖に関連する IL-6 誘導性分子の同定

IL-6 が MM 細胞の遺伝子発現様式に与える影響を解析し、MM 細胞の IL-6 シグナル伝達経路を介した増殖機構に関連する分子を見出すため、cDNA マイクロアレイ法と GSEA 解析法を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。また、同定された遺伝子の機能解析を行うために、CRISPR-Cas9 システムを利用した遺伝子破壊を試みた。

### (iii) 薬剤耐性に関わるゲノム異常領域と責任分子の同定

免疫調節剤レナリドミドの長期曝露による薬剤耐性株の樹立を行った。感受性と耐性株のゲノム一次構造と転写産物量を比較するために、高密度ゲノム解析法である 400K array-based comparative genomic hybridization 法 (以下 aCGH 法) と cDNA マイクロアレイ法を利用し解析を行った。

## 4. 研究成果

### (i) MM 細胞の IL-6 「依存性」から「非依存性」への悪性転換に関わる遺伝子の探索

IL-6 依存性 MM 細胞株 ANBL-6 を入手し、CRISPR ライブラリーシステムによるスクリーニングを行った。293T 細胞を用いて、ウイルスを含む培養上清を作成し、これをポリエチレングリコールで濃縮したのちに 8  $\mu$ g/mL のポリブレン存在下で ANBL-6 細胞に感染させた。ピューロマイシンによる薬剤選択後に IL-6 を 0.1  $\mu$ g/mL から段階的に除去して増殖の確認できた細胞を得た (ANBL-6i)。樹立した ANBL-6i と親株の IL-6 非存在下における細胞生存率を MTT アッセイ法により比較した結果、親株が増殖を示さなかった一方で ANBL-6i は約 10% の増殖を示した。以上の結果から、研究代表者は IL-6 依存性細胞株から非依存性増殖を示す亜株を樹立することに成功した。代表者が知る限り、同一細胞株から IL-6 非依存性の亜株を樹立したのはこれが世界で初めての事例である。樹立した細胞株において破壊された遺伝子やシグナル伝達経路の変化を調べるために、DNA シーケンシング、cDNA マイクロアレイ法、ウエスタンブロッティング法を利用して解析を行っている。

### (ii) IL-6 による遺伝子発現様式の解明と MM 細胞の増殖に関連する分子の同定

IL-6 依存性細胞株 ANBL-6 および FLAM-76 を用いて、IL-6 によって発現が誘導される遺伝子の同定を試みた。GSEA 解析の結果、興味深いことに抗 MM 治療薬であるプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブの標的であるプロテアソーム関連の遺伝子セットや、NGS 解析で最近変異が見出されているスプライソソーム関連遺伝子セットが、細胞周期の遺伝子セットとともに有意な遺伝子発現増加を認めた。研究代表者は、上位 20 位までの遺伝子の中で、これまで IL-6 に誘導されるとの報告がないキナーゼ X に着目した。定量 PCR やタンパク質量の解析の結果、MM 細胞株や MM 患者検体においてキナーゼ X の発現量の増加を確認した (図 5)。そこで、MM 細胞株に対して CRISPR/Cas9 システムによるキナーゼ X 遺伝子の破壊を試み、これに成功した。キナーゼ X が高発現している KMS-11 細胞では、*in vitro* および *in vivo* 解析の結果、キナーゼ X の遺伝子破壊は細胞増殖の顕著な抑制を示した。以上からキナーゼ X は新規 IL-6 誘導性因子として、骨髄腫細胞の増殖と密接にかかわる可能性が高い。

図 5 IL-6 によるキナーゼ X の発現増加

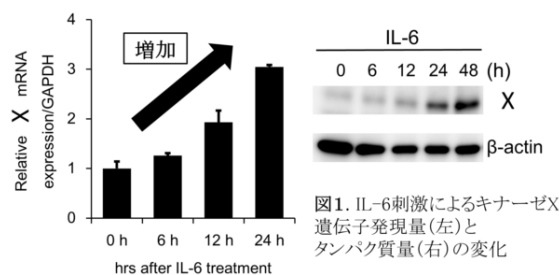


図 1. IL-6 刺激によるキナーゼ X 遺伝子発現量 (左) とタンパク質量 (右) の変化

### (iii) 薬剤耐性に関わるゲノム異常領域と責任分子の同定

MM 細胞株 U266 を用いて、MM 治療薬サリドマイド誘導体レナリドミド (以下 LEN) の薬剤耐性株の作成に着手した。U266 細胞に、長期の LEN 曝露を行い、徐々に濃度を増加させ 10  $\mu$ M の LEN 存在下で増殖可能な薬剤耐性株を樹立した。ゲノム一次構造と転写産物量を比較するために、高密度ゲノム解析法である aCGH 法と cDNA マイクロアレイ法を利用し解析を行った結果、耐性株において三箇所の染色体領域において微細な欠損を認めた。また cDNA マイクロアレイの解析から、欠損領域に存在する遺伝子の中で発現量の低下した候補分子を見出した。次に、候補遺伝子の破壊が LEN の感受性に与える影響を調べるために、CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子破壊を行っている。さらに、MM 細胞株ならびに MM 患者における候補遺伝子の発現や遺伝子変異の解析を行い、MM の LEN 耐性に関与する分子機構の解明を進めている。

以上 (i) ~ (iii) の結果より、本研究において MM の増殖に密接に関与する IL-6 誘導性キナーゼ X の同定に成功した。

[参考文献]

- 1) Damiano JS, Cress AE, Hazlehurst LA, Shtil AA, Dalton WS. Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood*, 93:1658-1667, 1999.
  - 2) 古川雄祐、菊池次郎リンパ球系 多発性骨髄腫における薬剤耐性機序. *Annual Review 血液*, 139-145, 2010.
  - 3) Manier S, Salem KZ, Park J, Landau DA, Getz G, Ghobrial IM. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol*, 14:100-113, 2017.
  - 4) Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen TS, Heckl D, Ebert BL, Root DE, Doench JG, Zhang F. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*, 343:84-87, 2014.
  - 5) Damdindorj L, Karnan S, Ota A, Hossain E, Konishi Y, Hosokawa Y, Konishi H. A comparative analysis of constitutive promoters located in adeno-associated viral vectors. *PLoS One*, 9:e106472, 2014.
  - 6) Karnan S, Konishi Y, Ota A, Takahashi M, Damdindorj L, Hosokawa Y, Konishi H. Simple Monitoring of Gene Targeting Efficiency in Human Somatic Cell Lines Using the PIGA Gene. *PLoS One*, 7: e47389, 2012.
  - 7) Konishi H, Mohseni M, Tamaki A, Garay JP, Croessmann S, Karnan S, Ota A, Wong HY, Konishi Y, Karakas B, Tahir K, Abukhdeir AM, Gustin JP, Cidado J, Wang GM, Cosgrove D, Cochran R, Jelovac D, Higgins MJ, Arena S, Hawkins L, Lauring J, Gross AL, Heaphy CM, Hosokawa Y, Gabrielson E, Meeker AK, Visvanathan K, Argani P, Bachman KE, Park BH. Mutation of a single allele of the cancer susceptibility gene BRCA1 leads to genomic instability in human breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108: 17773-8, 2011.
  - 8) Wang GM, Wong HY, Konishi H, Blair BG, Abukhdeir AM, Gustin JP, Rosen DM, Denmeade SR, Rasheed Z, Matsui W, Garay JP, Mohseni M, Higgins MJ, Cidado J, Jelovac D, Croessmann S, Cochran RL, Karnan S, Konishi Y, Ota A, Hosokawa Y, Argani P, Lauring J, Park BH. Single copies of mutant KRAS and mutant PIK3CA cooperate in immortalized human epithelial cells to induce tumor formation. *Cancer Res*, 73: 3248-61, 2013.
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 9 件)
- (1) Hatano S, Nagai N, Sugiura N, Tsuchimoto J, Isogai Z, Kimata K, Ota A, Karnan S, Hosokawa Y, Watanabe H. Versican A-subdomain is required for its adequate function in dermal development. *Connect Tissue Res*. 2017 doi: 10.1080/03008207.2017.1324432.
  - (2) Ota A, Nakao H, Sawada Y, Karnan S, Wahiduzzaman M, Inoue T, Kobayashi Y, Yamamoto T, Ishii N, Ohashi T, Nakade Y, Sato K, Itoh K, Konishi H, Hosokawa Y, Yoneda M. Delta40p53 suppresses tumor cell proliferation and induces cellular senescence in hepatocellular carcinoma cells. *J Cell Sci*. in press, doi: 10.1242/jcs.190736, 2016.
  - (3) Ito K, Ota A, Ono T, Nakaoka T, Wahiduzzaman Md, Karnan S, Konishi H, Furuhashi A, Hayashi T, Yamada Y, Hosokawa Y, Kazaoka Y. Inhibition of Nox1 induces apoptosis by attenuating the AKT signaling pathway in oral squamous cell carcinoma cell lines. *Oncol Rep*, 36:2991-8, 2016.
  - (4) Karnan S, Ota A, Konishi Y, Wahiduzzaman M, Hosokawa Y, Konishi H. Improved ribosome-skipping 2A peptide. *Nucleic Acids Res*, 244: e54, 2016.
  - (5) Mizuno S, Hanamura I, Ota A, Karnan S, Narita T, Ri M, Mizutani M, Goto M, Gotou M, Tsunekawa N, Shikami M, Iida S, Hosokawa Y, Miwa H, Ueda R, Nitta M, Takami A. Overexpression of salivary-type amylase reduces the sensitivity to bortezomib in multiple myeloma cells. *Int J Hematol*, 102:569-78, 2015.
  - (6) Tanaka M, Miura Y, Numanami H, Karnan S, Ota A, Konishi H, Hosokawa Y, Hanyuda M. Inhibition of NADPH oxidase 4 induces apoptosis in malignant mesothelioma: Role of reactive oxygen species. *Oncol Rep*, 34:1726-32, 2015.
  - (7) Ono T, Ota A, Ito K, Nakaoka T, Karnan S, Konishi H, Furuhashi A, Hayashi T, Yamada Y, Hosokawa Y, Kazaoka Y.

Plumbagin suppresses tumor cell growth in oral squamous cell carcinoma cell lines. *Oral diseases*, 21:501-11, 2015.

- (8) Asai A, Karnan S, Ota A, Takahashi M, Damdindorj L, Konishi Y, Hossain E, Konishi H, Nagata A, Yokoo K, Hosokawa Y. High-resolution 400K oligonucleotide array comparative genomic hybridization analysis of neurofibromatosis type 1-associated cutaneous neurofibromas. *Gene*, 558:220-6, 2015.
- (9) Hossain E, Ota A, Karnan S, Takahashi M, Mannan SB, Konishi H, Hosokawa Y. Lipopolysaccharide Augments the Uptake of Oxidized LDL by Up-regulating Lectin-like Oxidized LDL Receptor-1 in Macrophages. *Mol Cell Biochem*, 400:29-40, 2015.

[学会発表] (計 11 件)

- (1) Delta40p53 suppresses tumor cell proliferation in HepG2 cells. 太田 明伸、シバズンダラン カルナン、小西 裕之、細川 好孝 第 74 回日本癌学会学術総会 (名古屋) 2015. 10. 8.
- (2) 癌原性 KRAS 変異をノックインしたヒト気管支上皮細胞モデルの樹立と解析. 小西 裕之、シバズンダラン カルナン、太田 明伸、細川好孝 第 74 回日本癌学会学術総会 (名古屋) 2015. 10. 8.
- (3) バーシカンAサブドメインは細胞挙動の調節に不可欠である. 幡野 その子、シバズンダラン カルナン、太田 明伸、細川 好孝、木全 弘治、渡辺 秀人 第 74 回日本癌学会学術総会 (名古屋) 2015. 10. 8.
- (4) Establishment of a novel DLBCL cell line, AMU-ML-2, carrying HSR on 8q24 containing MYC and PVT1. 水野 昌平, 花村 一郎, 太田 明伸, Karnan Sivasundaram, 内野 かおり, , 水谷 元紀, 後藤 峰明, 高橋 美裕希, 後藤 麻友子, 山本 英督, 渡会 雅也, 爾見 雅人, 谷脇 雅史, 細川 好孝, 仁田 正和, 三輪 啓志, 上田 龍三, 高見 昭良 第 77 回日本血液学会学術会議 (金沢) 2015. 10. 16.
- (5) 口腔癌細胞株におけるプランバギンのプロオキシダント作用とアポトーシス誘導にはミトコンドリア遺伝子発現系が関与する. 太田 明伸、カルナン シバズンダラン、小西 裕之、細川 好孝 第 88 回日本生化学会大会 (神戸) 2016. 12. 1.

- (6) 400Kオリゴアレイ CGHを用いたNF1患者の皮膚神経線維腫の解析. シバズンダラン カルナン、太田 明伸、小西 裕之、細川 好孝 第 88 回日本生化学会大会 (神戸) 2016. 12. 1.
- (7) Combined arsenic trioxide-cisplatin treatment enhances apoptosis in leukemic cell lines. ムハマド ワヒドドジャマン、太田 明伸、シバズンダラン カルナン、ジャンナワジ マンナン、小西 裕之、細川 好孝 第 89 回日本生化学会大会 (仙台) 2016. 9. 25.
- (8) 肝がん細胞株における p53 アイソフォーム delta40p53 の解析. 太田 明伸、ムハマド ワヒドドジャマン、シバズンダラン カルナン、ジャンナワジ マンナン、小西 裕之、細川 好孝 第 89 回日本生化学会大会 (仙台) 2016. 9. 25.
- (9) 悪性中皮腫の早期診断の腫瘍マーカーの検討. シバズンダラン カルナン、太田 明伸、ムハマド ワヒドドジャマン、小西 裕之、細川好孝 第 89 回日本生化学会大会 (仙台) 2016. 9. 25.
- (10) NOX1 は AKT シグナルを介して口腔扁平上皮癌細胞の生存に寄与する. 太田 明伸、ムハマド ワヒドドジャマン、シバズンダラン カルナン、ジャンナワジ マンナン、小西 裕之、風岡 宜暁、細川 好孝 第 75 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2016. 10. 7.
- (11) Establishment of a Novel DLBCL Cell Line: AMU-ML2, derived from a Primary Refractory Patient Shows Homogeneous Staining Region of 8q24 Inducing High Expression of Long Non-Coding RNAs Encoded By PVT1 and Resistance to Vincristine. Shohei Mizuno, Ichiro Hanamura, Akinobu Ota, et al. 58th ASH Annual Meeting (San Diego) Dec 20, 2016.

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
太田 明伸 (OTA, Akinobu)  
愛知医科大学・医学部・生化学講座・講師  
研究者番号：30488048
- (2) 研究分担者  
なし。
- (3) 研究協力者  
シバズンダラン・カルナン  
(SIVASUNDARAM, Karnan)