

令和元年6月10日現在

機関番号：34521

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08983

研究課題名(和文) M蛋白ユビキチン化に着目した多発性骨髄腫新規バイオマーカーの探索と臨床的有用性

研究課題名(英文) Evaluation of M-protein related ubiquitin enzyme as a new biomarker for Multiple Myeloma

研究代表者

炬口 真理子 (Mariko, Takenokuchi)

姫路獨協大学・薬学部・准教授

研究者番号：10379430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫においてプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ治療時の効果を予測、病勢を反映するバイオマーカーを探索し、臨床検査に応用することを目的とした。当初多発性骨髄腫細胞が産生するM蛋白の特異的ユビキチン化酵素に着目したが検出できなかった。次に、ボルテゾミブ感受性及び耐性細胞株を用いた質量分析による比較解析を行い、両者で有意差があるユビキチン化蛋白を31見出した。特に顕著に減少したHistone H4について、ボルテゾミブによりユビキチン化Histone H4が蓄積することを確認した。現在、Histone H4またはそのユビキチン化酵素についてバイオマーカーとしての可能性の検討を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性骨髄腫の治療成績は、新薬を含む9剤の承認により劇的に改善している反面、各薬剤の最大効果を引き出すために最適な治療レジメンを患者毎に適宜選択する必要がある。本研究は、第一選択薬であるプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブの治療効果を予測するバイオマーカーを同定する研究であり、今回Histone H4がマーカーとなる可能性を見出した。今後、マーカーとしての有用性を示すことにより治療成績の向上、患者の身体的・経済的負担軽減に貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：Although the proteasome inhibitor bortezomib has been used worldwide as a treatment for multiple myeloma (MM), there are no biomarkers of treatment response to bortezomib in MM patients. The aim of this study was to investigate a new biomarker focused on M-protein and to apply it in clinical application. We initially could not detect M-protein-specific ubiquitinated enzymes due to their molecular polymorphism. Next, to compare ubiquitinated proteins between bortezomib-sensitive cell line and -resistant cell line, MS-based methods for identification of protein ubiquitination sites was utilized. We found 31 ubiquitinated proteins with a significant difference, out of which Histone H4 was markedly decreased. Bortezomib significantly increased ubiquitinated Histone H4 in MM cell lines. We focus on Histone H4 and are studying the possibility of a new biomarker for MM patients.

研究分野：検査血液学

キーワード：多発性骨髄腫 ユビキチン-プロテアソーム系 プロテアソーム阻害剤 M蛋白

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

生体内には生命維持のために蛋白質の品質管理機能があり、その一つはユビキチン-プロテアソーム系 (UPS) で行われる。UPS は DNA 修復、翻訳調節、シグナル伝達など様々な生命現象に重要な役割を果たしている。ユビキチン化にはユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2) 及びユビキチンリガーゼ (E3) の 3 つの酵素が関与しており、これらは蛋白質固有であり、疾患により疾患関連蛋白質の E2、E3 が変化する。近年、E2、E3 をターゲットとした創薬が注目を集めている。

多発性骨髄腫 (Multiple Myeloma :MM) は腫瘍性形質細胞の異常増殖により、異常免疫グロブリンである M 蛋白質 (monoclonal immunoglobulin) が産生され、隣接する骨組織を破壊する難治性疾患である。現在、治療薬としてプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブが第一選択薬として用いられている。

ボルテゾミブの MM に対する抗腫瘍効果の機序は明らかでなく、疾患特異的バイオマーカーもない。作用機序については、細胞増殖因子である NF- κ B の阻害因子 I- κ B の分解を阻害する、細胞周期に関与するサイクリン B の分解を阻害する、などが報告されている。しかし我々は、『ボルテゾミブは、本来異常蛋白質としてプロテアソームで分解されるべき M 蛋白質の分解を阻害して蓄積させる。これにより ER (小胞体) ストレスが過度に高まり、小胞体ストレス応答が破綻し、細胞死が誘導される。その結果として、M 蛋白質特異的 E2、E3 が細胞外に逸脱する』(仮説)と考えた。その証明として我々は、急性前骨髄性白血病 (APL) におけるボルテゾミブの効果予測マーカーとして疾患特異的ユビキチン結合酵素 (E2) を同定し、バイオマーカーとしての可能性を報告している¹⁾。

本研究は、APL についての研究を MM について発展させるものである。現状、APL へのプロテアソーム阻害剤の使用は未だ少ないが、ボルテゾミブが汎用される MM についての本研究の成果は大きいと考える。

2. 研究の目的

多発性骨髄腫において異常産生される M 蛋白質の特異的 E2、E3 を同定して上記仮説を検証する。そして、E2 または E3 がボルテゾミブ使用時の効果予測、病勢を反映する疾患特異的バイオマーカーとして有用であるかどうかを検討し、臨床検査への応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) M 蛋白質特異的 E3、E2 の同定

① E3 (ユビキチンリガーゼ) の同定

MM 患者検体から M 蛋白質を抽出・精製し、Ubiquitin Protein Microarray (LifeSensors 社製) を用いて M 蛋白質に対する E3 候補を数種類選り出す。

[方法] 約 1000 種類のリコンビナント E3 を固相したマイクロアレイに、基質 (M 蛋白質) と試薬 (ユビキチン他) を添加した後、蛍光標識抗体を入れ、基質を添加しないアレイをコントロールにして蛍光強度を測定する。強度の差が $p < 0.05$ であるものを選び出す。

② E2 (ユビキチン結合酵素) の同定

E2 Profiling kit (LifeSensors 社製) を用いて、①で同定した E3 に対する E2 を検索する。

[方法] ポリユビキチン化結合試薬が固相されたプレートに M 蛋白質、同定 E3、試薬 (E1、ユビキチン他) と 34 種類の E2 を添加後、ビオチン標識ポリユビキチン化結合試薬を添加して化学発光強度を測定する。強度の差が $p < 0.05$ であるものを選び出す。

(2) ショットガン解析によるユビキチン化蛋白質の比較解析

ボルテゾミブ (BTZ) 感受性多発性骨髄腫 (MM) 細胞株 KMS-11 と耐性株 KMS-11/BTZ を用いて、ショットガン解析によるユビキチン化蛋白質の比較解析を行う。

[原理・方法] ユビキチン化蛋白質をトリプシン処理すると、標的蛋白質のユビキチン化部位はトリプシンで切断されず、またそのペプチドのリジン残基にユビキチンの C 末端の 2 つのグリシン (GlyGly) がイソペプチド結合した T 字型ペプチドを形成し、質量が変化する。これを質量分析計 (LC-MS/MS) で検出する。

(3) BTZ 感受性株と耐性株で有意に差が認められたユビキチン化蛋白質についての検討

① 3 種の細胞株 KMS-11、RPMI8226 (感受性)、KMS-11/BTZ に BTZ を添加したときの (2) で同定したユビキチン化蛋白質の変化を免疫沈降 (IP)-ウエスタンブロット (WB) 法を用いて検討する。

② E2 (ユビキチン結合酵素) の同定

E2 Profiling kit (LifeSensors 社製) を用いて E2 を検索する。

③ 3 種の細胞株に BTZ を添加し、細胞と培養上清中のユビキチン化蛋白質、E2、E3 を IP- WB 法を用いて検出する。

4. 研究成果

(1) 3種の患者検体からカラムゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーにてM蛋白を精製し、Ubiquitin Protein MicroarrayにてM蛋白と反応するE3を検索したところ、3検体共に対照に対して有意な差を認めるE3は検出されなかった。M蛋白には、IgG・IgA・IgD(重鎖)に加え κ ・ λ (軽鎖)など種類が多く、それぞれのM蛋白について異なるE3が結合する可能性があり、M蛋白特異的E3をUbiquitin Protein Microarrayにて同定するのは困難であると考えた。

一方で、BTZ感受性及び耐性MM細胞株を用いて、BTZ投与により細胞死が誘導され、蛋白電気泳動法によりM蛋白量が減少することを確認した。しかし、M蛋白がユビキチン化され、プロテアソームで分解されることを確認することができなかった。

(2) (1)においてM蛋白特異的E3が同定されなかったため、BTZ感受性細胞株KMS-11と耐性株KMS-11/BTZの蛋白質のMS/MSデータについて、Swiss-Protデータベース内で修飾としてユビキチンをトリプシン処理した際に生じるGlyGlyを指定して検索した。感受性株と比較して耐性株で減少したユビキチン化蛋白質11、増加したユビキチン化蛋白質20を得た。これらの中から減少が最も顕著であり、そのE3がCUL4-DBB-ROC1複合体であることが報告されているHistone H4に注目した。

(3) KMS-11、RPMI8226細胞株(BTZ感受性)にBTZを0, 10, 100nMの濃度で添加し、48時間後のユビキチン化Histone H4(Ub-H4)をIP法-WB法で調べたところ、BTZ濃度依存的に細胞中のUb-H4が著しく増加した。一方、KMS-11/BTZ(BTZ耐性)では変化は認められなかった。この結果から、Histone H4はユビキチン化を受けプロテアソームで分解されるが、BTZにより分解が阻害されて細胞内に蓄積する。BTZ耐性株ではユビキチン化を受けにくくなっているため蓄積しないと考えられた。また、Histone H4のE3がCUL4-DBB-ROC1複合体であることが報告されているので、E2 Profiling kitを用いてE3に対するE2の検索が可能であり、今後Histone H4及びそのユビキチン化酵素(E2、E3)についてバイオマーカーとしての可能性を検討する。

まとめ

多発性骨髄腫の治療成績は、新薬を含む9剤の承認により劇的に改善している反面、各薬剤の最大効果を引き出すために最適な治療レジメンを患者毎に適宜選択する必要がある。本研究は、第一選択薬であるプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブの治療効果を予測するバイオマーカーを同定する研究であり、今回Histone H4がマーカーとなる可能性を見出した。今後、マーカーとしての有用性を示すことにより治療成績の向上、患者の身体的・経済的負担軽減に貢献できると考える。

<引用文献>

1) Takenokuchi M, Miyamoto K, Saigo K, Taniguchi T. Bortezomib Causes ER Stress-related Death of Acute Promyelocytic Leukemia Cells Through Excessive Accumulation of PML-RARA. *Anticancer Res.* 2015 Jun;35(6):3307-16

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

- ① Takenokuchi M, Kadoyama K, Yoshida D, Takaki S, Yamamoto R, Saigo K, Taniguchi T. Evaluation of Absorbability of Macromolecular Substances in the Oral Mucosa and Skin using a Three-Dimensional Tissue Culture Model. *Biol Med.* 10(5):488, 2018 doi:10.4172/0974-8369.100044 [査読有]
- ② 大淵絢子、河野麻理、炬口真理子、井本しおん、西郷勝康 鉄キレート療法の多彩な効果 兵庫県医師会医学雑誌、60(2)、30-35、2018 [査読有]
- ③ Ohbuchi A, Kono M, Takenokuchi M, Imoto S, Saigo K. Acetate moderately attenuates the generation of neutrophil extracellular traps (letter). *Blood Res.* 53(2):177-180, 2018 doi: 10.5045/br.2018.53.2.177 [査読有]
- ④ Ohbuchi A, Kono M, Kitagawa K, Takenokuchi M, Imoto S, Saigo K. Quantitative analysis of hemin-induced neutrophil extracellular trap formation and effects of hydrogen peroxide on this phenomenon. *Biochem Biophys Rep.* 24:11:147-153, 2017 doi:10.1016/j.bbrep.2017.07.009 [査読有]
- ⑤ Kono M, Saigo K, Yamamoto S, Shirai K, Iwamoto S, Uematsu T, Takahashi T, Imoto S, Hashimoto M, Minami Y, Wada A, Takenokuchi M, Kawano S. Iron-chelating agent, deferasirox, inhibits neutrophil activation and extracellular trap formation. *Clin*

[学会発表] (計5件)

- ① 大淵絢子、河野麻里、炬口真理子、井本しおん、西郷勝康、山本直樹. アセテートによる好中球細胞外トラップ形成の阻害 日本薬学会第139年会 2019年 幕張メッセ (千葉県千葉市)
- ② 大淵絢子、河野麻里、炬口真理子、井本しおん、西郷勝康. ヘミン誘導性 NET 形成の定量的評価と酸化ストレス誘導剤併用の効果. 第67回日本薬学会近畿支部総会大会. 2017年. 兵庫医療大学 (兵庫県・神戸市)
- ③ 木瀬 歩、川村昌子、奥田智之、大淵絢子、炬口真理子、西郷勝康. ヘム分子による好中球細胞外トラップ形成の定量的評価. 第66回日本薬学会近畿支部総会大会. 2016年. 大阪薬科大学 (大阪府・高槻市)
- ④ 炬口真理子、宮本和英、西郷勝康、谷口泰造. プロテアソーム阻害剤の治療効果を反映する疾患特異的ユビキチン化酵素測定の有用性. 第63回日本臨床検査医学会学術集会. 2016年. 神戸国際会議場、神戸国際展示場、神戸ポートピアホテル (兵庫県・神戸市)
- ⑤ Takenokuchi M, Miyamoto K, Saigo K, Taniguchi T. Bortezomib causes ER stress-related cell death in APL cells through excessive accumulation of PML-RARA. 4th Biotechnology World Congress. 16-18 Feb. 2016. (University of Sharjah, UAE)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：宮本 和英

ローマ字氏名：(MIYAMOTO, kazuhide)

所属研究機関名：姫路獨協大学

部局名：薬学部医療薬学科

職名：准教授

研究者番号 (8桁)：10415317

(~2017年3月)

研究分担者氏名：西郷 勝康

ローマ字氏名：(SAIGO, katsuyasu)

所属研究機関名：姫路獨協大学

部局名：看護学部看護学科

職名：教授

研究者番号 (8桁)：20304107

研究分担者氏名：谷口 泰造

ローマ字氏名：(TANIGUCHI, taizo)

所属研究機関名：甲南大学

部局名：フロンティアサイエンス学部

職名：研究員

研究者番号 (8桁)：7034625

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。