

令和 2 年 4 月 13 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06167・19K21276

研究課題名（和文）KDM5Aによる骨髄腫細胞増殖制御機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of myeloma cell growth induced by KDM5A

研究代表者

大口 裕人（Ohguchi, Hiroto）

熊本大学・大学院先導機構・准教授

研究者番号：70451557

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：多発性骨髄腫は、B細胞の最終分化段階である形質細胞の性質を有する血液がんである。本研究では、ヒストン脱メチル化酵素の一つであるKDM5Aが骨髄腫細胞増殖に寄与することを見出した。そして、KDM5AはゲノムワイドでMYCと共局在しており、協調的にMYC標的遺伝子の転写を活性化していることを明らかにした。また、新規KDM5阻害剤の有効性をin vitroおよびin vivo骨髄腫セノグラフトモデルで示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

KDM5Aは転写活性化に関わるヒストン修飾であるH3K4me3の脱メチル化酵素であるため、転写抑制因子として働くと考えられているが、本研究はKDM5AがMYCの共役因子として転写を活性化するという新たな機能を提示した。また、新規KDM5阻害剤がin vivoで有効であるとともに、十分な忍容性があることを示し、KDM5阻害剤を用いた骨髄腫新規治療法の可能性を提示した。

研究成果の概要（英文）：Multiple myeloma is a malignancy of terminally differentiated B cells (plasma cells). In this study, we showed that one of the histone demethylases KDM5A mediates myeloma cell growth. Mechanistically, KDM5A coexists with MYC across the genome, and KDM5A and MYC coordinately activate MYC target gene transcription. We also demonstrated that novel KDM5 inhibitor is effective in vitro and in vivo myeloma xenograft model.

研究分野：造血器腫瘍における転写エピゲノム制御

キーワード：多発性骨髄腫 エピゲノム ヒストン修飾 細胞増殖

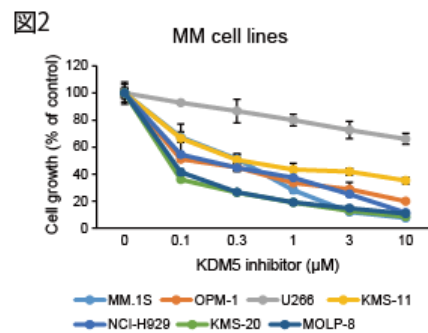
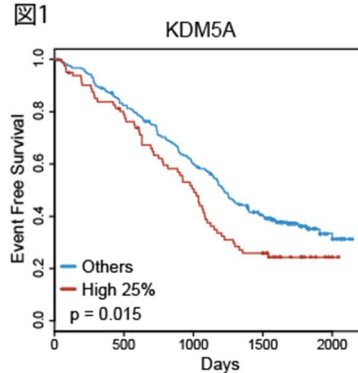
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 多発性骨髄腫は、B 細胞の最終分化段階である形質細胞の性質を有する悪性腫瘍であり、血液悪性腫瘍中 2 番目の発症頻度の疾患である。多発性骨髄腫の治療成績は、21 世紀に入り、プロテアソーム阻害薬、免疫調整薬 (IMiDs) など新規治療薬の導入により向上したが、未だに治療は期待できず、新規治療標的が模索されている。

(2) エピゲノムの安定性は、細胞の維持に重要な役割を果たしている。最近の研究により、エピゲノム制御異常が腫瘍の発症、進展に関わることが明らかになっている。多発性骨髄腫においても、ヒストンメチル化、あるいはアセチル化制御異常と病態との関与が示唆されている。こうした状況で、エピゲノム治療標的としてまずヒストン脱アセチル化酵素 HDACs が検討され、最近、汎 HDAC 阻害剤パノピノスタットが再発難治性多発性骨髄腫に対して認可された。しかしながら、HDAC 阻害剤の治療効果は、その副作用の影響もあり極めて限定的であり、新たなエピゲノム創薬の研究開発が急務である。

(3) H3K4 メチル化は転写活性化に関与するヒストン修飾である。ヒストン脱メチル化酵素 KDM5A は、十文字ドメイン含有脱メチル化酵素ファミリーに属し、H3K4 ジ、あるいはトリメチレーション (H3K4me2、H3K4me3) の脱メチル化を行う酵素である。KDM5A は正常細胞における機能の他、乳癌、頭頸部癌など固形癌での役割が報告されているが、多発性骨髄腫と KDM5A の関連についてはこれまで明らかにされていない。申請者は、KDM5A が骨髄腫細胞で高発現していること、また、その発現強度が予後と関係していることを見出した (図 1)。そして、KDM5A ノックダウンが骨髄腫細胞株増殖を抑制することを明らかにした。さらに、申請者は研究協力者と新規 KDM5 阻害剤を開発し、薬理的 KDM5 阻害でも骨髄腫細胞株増殖を抑制することを確認した (図 2)。



### 2. 研究の目的

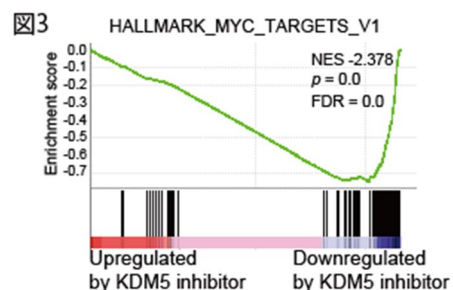
本研究は、(1) KDM5A が骨髄腫細胞増殖を促す分子機序の解明、(2) 多発性骨髄腫における新規 KDM5 阻害剤の有効性の検証を目的とする。本研究により、新規 KDM5 阻害剤の効果が前臨床段階で確認されれば、今後の臨床応用、つまり新規エピゲノム創薬への道が開かれる。また、KDM5A が骨髄腫細胞増殖を制御する機序を解明できれば、より効果的な他剤との併用療法の可能性を提示できる。

### 3. 研究の方法

- (1) 多発性骨髄腫細胞株において、KDM5A をノックダウン後、あるいは KDM5 阻害剤で処理後、遺伝子発現解析を行う。
- (2) 多発性骨髄腫細胞株において、KDM5A、H3K4me3 抗体を用いて ChIP-seq 解析を行う。
- (3) 上記で見出した KDM5A 標的遺伝子のプロモーター領域を用いてプロモーターレポーターアッセイを行い、KDM5A が標的遺伝子の転写に与える影響を検証する。
- (4) 骨髄腫細胞株を骨髄間質細胞と共培養した条件下で、KDM5 阻害剤を添加し、骨髄腫細胞株増殖を抑制できるかを検証する。
- (5) ルシフェラーゼ遺伝子を導入した骨髄腫細胞株を免疫不全マウスに静注し、パイオイメージングで腫瘍生着を確認後、KDM5 阻害剤投与を開始し、継時的に腫瘍量の変化を測定する。

### 4. 研究成果

(1) 骨髄腫細胞株を KDM5 阻害剤で処理後に RNA-seq によりトランスクリプトーム解析を行った。その結果、1450 遺伝子の発現が上昇し、1253 遺伝子の発現が低下していた。そして、Gene Set Enrichment Analysis により、KDM5 阻害剤で MYC 標的遺伝子が低下していることを見出した (図 3)。続いて、KDM5A ノックダウン、あるいは KDM5A ノックアウトでも同様に MYC 標的遺伝子が低下することを確認した。一方で、同じ KDM5 ファミリーメンバーの KDM5B ノックダウンでは MYC 標的遺



伝子の低下は認められず、MYC 標的遺伝子は KDM5A 抑制に依存して低下していることが示唆された。

(2) 続いて、KDM5A 抗体を用いた ChIP-seq により、ゲノムワイドでの KDM5A 結合領域を検証した。KDM5A は H3K4me3 の局在と概ね一致していた。一方で、抑制性のメチルマークである H3K27me3 の局在とは一致しなかった。興味深いことに KDM5A はゲノムワイドで MYC と共局在していた(図 4)。また、KDM5A と MYC は、主に転写開始点近傍で共局在しており、転写マシナリー構成因子である CDK7、CDK9 や RNA polymerase II (RNAPII) と共局在していた(図 5)。

図 4

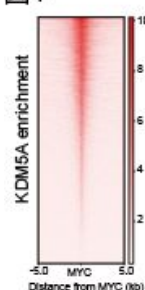
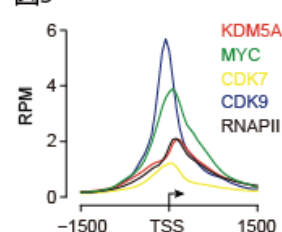


図 5



(3) KDM5A は H3K4me3 の脱メチル化酵素であるため、転写抑制因子と考えられているが、上記の知見より MYC 標的遺伝子の転写を活性化しているのではないかと考えた。そこで、代表的 MYC 標的遺伝子のひとつ CDK4 遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、レポータープラスミドに挿入しプロモーターレポーターアッセイを行った。そして、KDM5A は CDK4 遺伝子の転写を活性化すること、そして、MYC と相

図 6

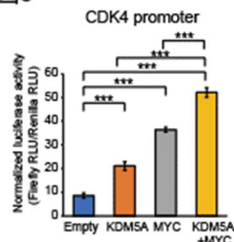
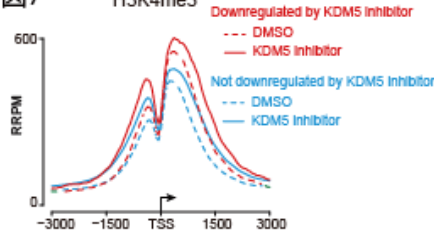


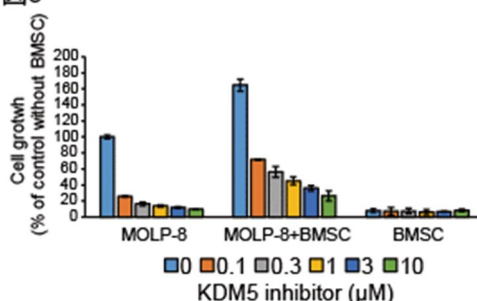
図 7



加的にその転写を促進することを明らかにした(図 6)。興味深いことに、CDK4 を始め KDM5 阻害剤により発現が低下した MYC 標的遺伝子の転写開始点近傍は元々高いレベルの H3K4me3 で修飾されていたが、この修飾レベルは KDM5 阻害剤でさらに上昇していた(図 7)。この結果は、過剰な H3K4me3 レベルは逆説的に転写を阻害する可能性を示唆した。

(4) 続いて、新規 KDM5 阻害剤の有効性を in vitro 骨髄微小環境モデルで検証した。骨髄微小環境は骨髄腫細胞維持や薬剤耐性に重要な役割を果たしているが、骨髄微小環境に存在し骨髄腫細胞増殖や薬剤耐性に関わるサイトカイン IL6、あるいは骨髄間質細胞存在下においても新規 KDM5 阻害剤が骨髄腫細胞株増殖抑制効果を示すことを確認した(図 8)。

図 8



(5) さらに、新規 KDM5 阻害剤の効果を骨髄腫細胞株 in vivo ゼノグラフトモデルを用いて検証した。腫瘍生着後、3 週間の KDM5 阻害剤投与群とコントロール群で腫瘍増殖を比較したところ、KDM5 阻害剤投与群において優位な腫瘍量の減少および全生存期間の延長を認めた(図 9、10)。この間、コントロール群と比べ、KDM5 阻害剤投与群において明らかな体重減少や副作用は確認されなかった。これらの結果は、KDM5 阻害剤は in vivo でも有効であるとともに、十分な忍容性があることを示した。そして、今後の KDM5 阻害剤を用いた多発性骨髄腫新規治療法開発の可能性を示唆した。

図 9

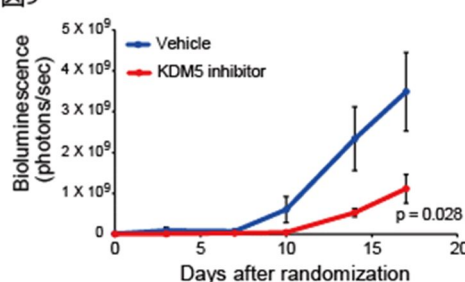
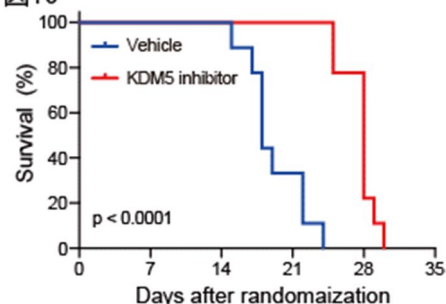


図 10



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nagai Nao, Ohguchi Hiroto, Nakaki Ryo, Matsumura Yoshihiro, Kanaki Yasuharu, Sakai Juro, Aburatani Hiroyuki, Minami Takashi	4. 巻 14
2. 論文標題 Downregulation of ERG and FLI1 expression in endothelial cells triggers endothelial-to-mesenchymal transition	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1007826
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1371/journal.pgen.1007826	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大口 裕人
2. 発表標題 ヒストン脱メチル化酵素を介する骨髄腫増殖分子基盤
3. 学会等名 第42回タンパク質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroto Ohguchi, Daisuke Ogiya, Paul Park, Shinjiro Hino, Shingo Usuki, Mehmet Samur, Yu-Tzu Tai, Nikhil Munshi, Mitsuyoshi Nakao, Takashi Minami, Jun Qi, Teru Hideshima, Kenneth C. Anderson
2. 発表標題 KDM5A reinforces MYC transcriptional program and promotes myeloma cell growth
3. 学会等名 17th International Myeloma Workshop（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroto Ohguchi, Daisuke Ogiya, Paul Park, Cheng-Kui Pei, Shinjiro Hino, Shingo Usuki, Mehmet K. Samur, Yu-Tzu Tai, Nikhil C. Munshi, Mitsuyoshi Nakao, Takashi Minami, Jun Qi, Teru Hideshima, Kenneth C. Anderson
2. 発表標題 KDM5Aは多発性骨髄腫におけるMYC転写プログラムを補強する
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	キ ジュン  (Qi Jun)		
研究協力者	秀島 輝  (Hideshima Teru)		
研究協力者	アンダーソン ケネス  (Anderson Kenneth)		