

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08741

研究課題名（和文）デキサメタゾンとIMiDsの相乗的な抗骨髄腫作用の分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanism of synergistic anti-myeloma effects of dexamethasone and IMiDs

研究代表者

山本 淳一（Yamamoto, Junichi）

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：40748472

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：多発性骨髄腫株において、デキサメタゾン処理にตอบสนองしポマリドミド依存的にCRBNに結合するタンパク質群の網羅的な探索を行い、条件を満たすタンパク質を3つ同定した。そのうちの一つは、転写レベルでは2剤の影響を受けず、かつ多発性骨髄腫株の生存や増殖に重要で、デキサメタゾンとポマリドミド併用に特異的に発現が低下することが確認され、デキサメタゾンとポマリドミドの併用療法の薬効を媒介する基質であることが示唆された。また、トランスクリプトーム解析により、デキサメタゾンとポマリドミドの併用により発現変動に相互作用を示す標的遺伝子やパスウェイを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

デキサメタゾンと免疫調節薬の併用は、多発性骨髄腫の標準治療の一角を占めているが、その詳細な相乗効果の分子メカニズムは不明である。本研究で同定された、デキサメタゾン処理条件下で特異的に分解が誘導された標的タンパク質は、その薬効を媒介する有力な候補である。標的タンパク質の同定と作用機序の分子レベルの解明は、より効果的な治療薬の開発や適切な治療法の確立に寄与する。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed a comprehensive search for proteins that bind to CRBN in multiple myeloma cell lines in a pomalidomide-dependent manner in response to dexamethasone treatment and identified three proteins that met the criteria. One of these proteins was found to be unaffected by the two drugs at the transcriptional level and to be important for survival and growth of multiple myeloma lines, suggesting that it is a promising substrate for mediating the efficacy of dexamethasone and pomalidomide combination therapy. In addition, transcriptome analysis identified target genes and pathways where interactions were observed in expression changes upon the combination of dexamethasone and pomalidomide.

研究分野：分子生物学

キーワード：多発性骨髄腫 IMiDs デキサメタゾン CRBN

1. 研究開始当初の背景

サリドマイドの誘導体であるレナリドミドとポマリドミド(総称して Immunomodulatory drugs, IMiDs と呼ばれる)は多発性骨髄腫やマンツルリンパ腫、骨髄異形症候群に優れた治療効果を示すことから再評価されている。IMiDs の作用機序は長く不明であったが、2010 年に IMiDs の直接の標的としてユビキチンリガーゼ複合体である Cereblon (CRBN)が同定されたことで大きく進展した。一連の研究により、IMiDs は CRBN に結合し、その基質特異性を変化させることで薬効を発揮することが明らかとなった。多発性骨髄腫では、IMiDs が CRBN に結合すると多発性骨髄腫の生存に重要な転写因子 Ikaros と Aiolos、ARID2 などの転写因子群が新たに基質として認識され、これらが分解へと導かれることで抗骨髄腫作用を示すことが強く示唆されている。一方で、合成副腎皮質ホルモンであるデキサメタゾンも、古くから多発性骨髄腫の治療に用いられてきた薬剤の一つであり、デキサメタゾンとレナリドミドの併用は現在の標準治療の一角を占めている。さらにデキサメタゾンとポマリドミドの併用は、再発・難治性(多くはレナリドミドやプロテアソーム阻害剤に耐性になっている)多発性骨髄腫患者においても有効であり、ポマリドミド単剤よりも優れた治療効果を示した。しかし、デキサメタゾンの抗骨髄腫作用の詳細な作用機序は不明であり、なぜ IMiDs との併用において、それぞれの単剤よりも優れた治療効果を示すのかは全く分かっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、IMiDs の直接の標的である CRBN を起点とし、臨床的に優れた抗骨髄腫作用を示すデキサメタゾンと IMiDs の併用療法の作用機序を明らかにすることである。

一般的に複数の抗がん剤による相乗効果の詳細な作用機序を明らかにすることは非常に困難である。そもそも、臨床的に有効もしくは培養細胞レベルにおいて単剤より強い増殖抑制作用を示したとしても、それぞれの薬剤が独立に作用しているに過ぎず、相乗効果を引き起こす「新たな作用機序」は存在しない可能性もある。これまでは、相乗効果があることが確認できれば臨床的には十分に価値があると考えられてきたために、複数の薬剤の併用に関する基礎研究では、combination index 等により相乗効果の有無を評価することが重要視されており、相乗効果の詳細な分子メカニズムの解明に十分な注意を払ってきたとは言い難かった。一方で、多発性骨髄腫では導入化学療法として複数の薬剤を併用することはすでに一般的であり、その複数の薬剤に対して耐性となった再発・難治性患者に対する有効なサルベージ治療の確立こそ臨床的に重要な研究課題と言える。本研究では、再発・難治性多発性骨髄腫患者において優れた抗骨髄腫作用を示すデキサメタゾンと IMiDs の併用療法について、相乗効果の有無や強弱に留まらず、その詳細な分子メカニズムの解明を本研究の目的とした。乗効果のキーとなる標的分子の同定に成功すれば、より効果的なサルベージ治療を確立していく上で有用な知見となると考えられる。

3. 研究の方法

(1) デキサメタゾンとポマリドミド併用に依存した CRBN の相互作用因子の網羅的な探索

デキサメタゾンとポマリドミドの併用が増殖阻害において顕著な効果を示す多発性骨髄腫細胞株 (RPMI8226)を用いて、デキサメタゾン処理によってポマリドミド依存的に CRBN に結合するタンパク質群の量的な変化を網羅的に解析した。具体的には、未処理またはデキサメタゾン処理した RPMI8226 細胞株の細胞抽出液から、ポマリドミド添加もしくは未添加の条件で、CRBN に特異的に結合する細胞を免疫沈降し、SILAC-MS 法により網羅的に定量した。

(2) 同定されたタンパク質群の絞り込み

同定された標的タンパク質群の発現低下、が多発性骨髄腫細胞株の増殖に影響を与えるかどうかを、shRNA を用いたノックダウン実験によって確認した。

(3) トランスクリプトーム解析

デキサメタゾンとポマリドミドそれぞれの単剤処理にある程度の耐性を示す多発性骨髄腫細胞株 (RPMI8226 及び Most i-1)を用いて、デキサメタゾン、ポマリドミド及び 2 剤の共処理の条件下で、RNA-seq により遺伝子発現変化を比較することで下流の経路を推定した。

(4) デキサメタゾンとポマリドミド併用による増殖阻害の作用機序の解析

SILAC-MS で同定され、絞り込みにより多発性骨髄腫の増殖に関与することが示唆された少数の標的タンパク質について、個別に詳細な解析を行った。まず、IMiDs とデキサメタゾンの併用により分解されることを確認し、次に IMiDs 耐性変異の導入によるレスキュー実験でそのタンパク質が IMiDs とデキサメタゾンの併用による増殖阻害作用に寄与していることを証明することを目指した。次に、その因子がどのような経路を介して増殖阻害を引き起こすのかを RNA-seq の結果から推定し、ノックダウン実験により確認することを目指した。

4. 研究成果

(1) デキサメタゾンとポマリドミド併用の薬効を媒介するネオ基質の同定

ポマリドミド依存的に CRBN に結合するタンパク質群の量的な変化を SILAC 法により網羅的に比較した。その結果、ポマリドミド依存的に CRBN に結合したタンパク質が 150 程度同定され、デキサメタゾン処理によってポマリドミド依存的な結合が 2 倍以上高くなったタンパク質が、3 つ同定された。同定したデキサメタゾン処理によってポマリドミド存在下での CRBN への親和性が変化した候補因子群について、多発性骨髄腫細胞株 (RPMI8226) を用いて (a) 両剤併用によって細胞内でタンパク質分解が促進されるか、(b) その候補因子のノックダウンにより細胞株の増殖が阻害されるか、を検証した。その結果、候補因子群の中でタンパク質 X () のみが両方の条件を満たした。この結果はタンパク質 X が両剤併用による抗骨髄腫作用の主要な標的であることを示唆する。

(2) RNA-seq を用いた、デキサメタゾンとポマリドミド共処理による遺伝子発現変化の解析

モデル系である RPMI8226 株と Mosti-1 株について、ポマリドミド・デキサメタゾン単剤及び両剤併用の条件で RNA-sequence を行った。その結果、両株で共通して併用による相互作用があった遺伝子として 25 個が同定した。また GSEA (Hallmark) により、両株で共通して単剤処理の和集合と比べ併用で有意にエンリッチした (もしくはエンリッチしなくなった) 遺伝子セットを 7 つ同定した。また、SILAC-MS 解析によって同定された 3 つのデキサメタゾン・ポマリドミド併用の基質候補遺伝子は、デキサメタゾンやポマリドミド処理によっては転写レベルでは影響を受けないことを確認した。この結果は、単に薬剤処理によって発現量が変化したのではなく CRBN に対する親和性が変化したタンパク質を同定することに成功したことを示唆する。

(3) タンパク質 X の構造的デグロンの同定とレスキュー実験

ポマリドミドによって分解が促進される標的タンパク質の主要なグループは C2H2 ZNF モチーフを持つタンパク質であり、既知の構造的デグロンに変異を入れることでポマリドミドによる分解に耐性を持つ変異体を作製できる。タンパク質 X は C2H2 ZNF モチーフを複数含むため、それぞれの ZNF モチーフに変異を導入し薬剤耐性変異体の作製を目指した。しかし、各 ZNF に点変異を導入した変異体はいずれもポマリドミド耐性を示さなかった。また、タンパク質 X の各 ZNF を EGFP に連結したモデル系を用いた実験でも全ての ZNF で有意な分解は観察されなかった。そこで、複数の ZNF が関与している可能性を考慮し、2 つもしくは 3 つの ZNF の組み合わせについて点変異を導入し、薬剤による分解を検証した。しかし、いずれもポマリドミド耐性を示さなかった。この結果からタンパク質 X の分解は、未知のデグロンに基づくことが強く示唆された。

そこで、薬剤耐性変異体ではなく野生型の過剰発現によってレスキュー実験を行うこととした。多発性骨髄腫細胞株はトランスフェクションが困難なため、レンチウイルスベクターにより外来性のタンパク質 X を発現する細胞株を樹立したが、その発現量は内在性と同等程度であった。そこで、タンパク質 X と EGFP の融合タンパク質を発現する細胞株を樹立し、FACS により融合タンパク質の発現量が多い細胞を分離し解析に用いた。分離されたポリクローンは、内在性と比べ数倍の融合タンパク質を発現していたが、両剤併用に対して耐性を与えることはなかった。以上の結果より、(a) 融合タンパク質はタンパク質 X としての機能を喪失しているか、(b) 両剤併用の主要な標的がタンパク質 X だけでないか、(c) デキサメタゾン併用による薬効は、exogenous のタンパク質 X では再現されない何らかの制御を介したものであるか、などの可能性が示唆された。

上述のように、本研究によって見いだされたタンパク質 X は多発性骨髄腫細胞において、デキサメタゾンとポマリドミドの併用によって分解が誘導され、かつ多発性骨髄腫細胞の生存や増殖に重要なタンパク質であることが分かった。しかし、タンパク質 X が本当に 2 剤併用の薬効を媒介しているかどうかは、レスキュー実験が成功しなかったことで証明には至っていない。現在、本研究とは独立に内在性の基質候補に耐性変異を簡便に導入する実験法の樹立を試みているので、その成果を適用してレスキュー実験を行う予定である。その後、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

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------