

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16314

研究課題名(和文) HDAC阻害剤およびIMiDsのコンビネーション抗骨髄腫効果の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the combination effects of HDAC inhibitors and IMiDs

研究代表者

朝妻 知子 (Asatsuma, Tomoko)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：70732303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫においては、免疫調節薬(IMiDs)とヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤を併用することで優れた治療効果が得られることが臨床的に明らかとなってきたが、これら薬剤を併用することにより得られる特有の分子機構は不明である。本研究では、IMiDs特異的なCRL4CRBN分解基質であり、多発性骨髄腫の生存に必須因子であるKEYがHDAC阻害剤添加により更に減少することに着目し、KEYの減少に関わるHDACやその下流分子経路について明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IMiDsの抗多発性骨髄腫作用を担うCRBNの存在が明らかになってからは、その作用の中核を担うようなIMiDs依存的なCRL4CRBNの分解基質が解明されてきた一方で、他の薬剤との併用効果の分子機構については、解明が遅れている。今回、IMiDsとHDAC阻害剤の併用における下流経路の一端が明らかとなった。これらを標的としたHDAC阻害剤やIMiDsの新たなプロトコール改善や適応拡大、また、応用的な後続研究の礎となりえる。

研究成果の概要(英文)：Combined usage of immunomodulatory drugs (IMiDs) and histone deacetylase (HDAC) inhibitors provides beneficial therapeutic effects in multiple myeloma, but the specific molecular mechanisms underlying the combination of these drugs remain unclear. In this study, we focused on KEY, an IMiDs-specific CRL4CRBN degradation substrate and an essential factor for multiple myeloma survival, that is further reduced by the addition of HDAC inhibitors, and identified HDACs and their downstream molecular pathways involved in KEY reduction.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：HDAC阻害剤 多発性骨髄腫 IMiDs CRBN セレブロン HDAC

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫は B 細胞の最終分化過程における形質細胞の悪性腫瘍で深刻な難治疾患であるが、近年、プロテアソーム阻害剤や免疫調節薬(Immunomodulatory drugs, IMiDs)の開発により大幅に治療法が進歩した。

IMiDs はサリドマイドを基にした誘導体であり、強力な抗骨髄腫作用を有するため世界中で幅広く使用されている。中核標的因子としてセレブロン(cereblon, CRBN)が発見されてからは IMiDs の分子機構についての研究が大いに進んだ。CRBN はリガンド依存性ユビキチンリガーゼとして機能し、結合する薬剤の形状に応じて認識する基質が変換される。多発性骨髄腫細胞では、IMiDs 依存的に転写因子 Ikaros, Aiolos の分解が誘導され、この結果細胞死が引き起こされる。

一方、現実の多発性骨髄腫治療では、IMiDs はデキサメタゾンや HDAC 阻害剤との併用で使用されており、これらのコンビネーション効果の分子機構は未解明である。そこで本研究では、このコンビネーション抗骨髄腫効果の機構解明を目指した。研究代表者の所属グループは、IMiDs の中でもポマリドミド(pom)の抗骨髄腫作用におけるマイナーな基質である KEY を発見した。IMiDs の KEY への作用は弱く、また骨髄腫細胞における KEY の役割はほとんど解明されていないが、KEY に対する RNAi で骨髄腫細胞の増殖抑制が見られたことから、本因子は骨髄腫の生存に重要な働きを有すると考えられた。HDAC 阻害剤処理により、KEY は著しく減少し(図 1)、さらに IMiDs と HDAC 阻害剤の同時処理により片方の単独処理では達成できない程度の KEY のタンパク質量減少が見られた(図 2)ことから、これらコンビネーション効果に KEY が重要な役割を果たすと考えた。

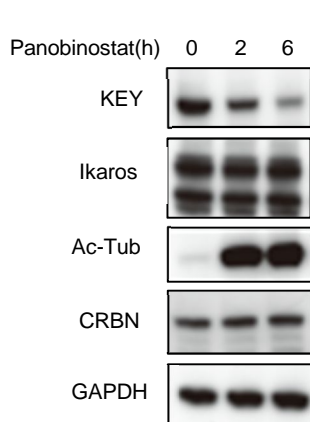


図 1 多発性骨髄腫細胞 MM1S での HDAC 阻害剤 Panobinostat による KEY の減少

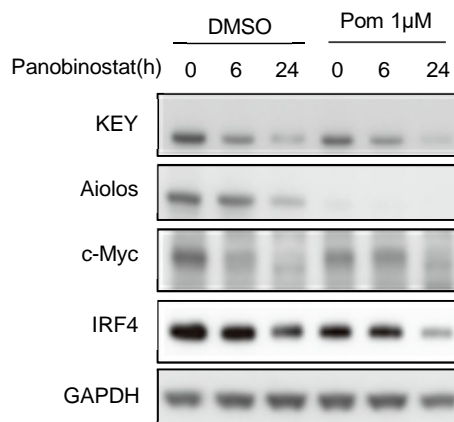


図 2 MM1S における Panobinostat 10 nM と pomalidomide の併用による KEY の減少

2. 研究の目的

IMiDs と HDAC 阻害剤のコンビネーション効果について、その分子機構を明らかにするために、KEY の減少に関わる HDAC を特定し、また、IMiDs と HDAC 阻害剤の下流因子・経路を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

HDAC 阻害剤による KEY の減少を担う HDAC を絞り込むため、多発性骨髄腫由来細胞株において各種 HDACs の RNAi によるノックダウンを行い、immunoblotting や細胞増殖アッセイで評価した。また、各種 HDAC 阻害剤を処理した多発性骨髄腫由来細胞株について、トランスクリプトーム解析を行い、時間依存的な遺伝子発現の変化や薬剤の違いによる差異を比較検討した。解析結果により見出された HDAC 阻害剤の下流因子群について、多発性骨髄腫由来細胞株を用いて再検証をおこなった。

4. 研究成果

(1)KEY のタンパク質量減少を引き起こす HDAC 阻害剤(panobinostat など)は pan-HDAC 阻害剤であることから、まず KEY の減少に関与する HDACs を絞り込むため、各種 HDACs の RNAi によるノックダウンによる多発性骨髄腫由来細胞株の細胞増殖アッセイを行った。この結果、HDAC6 および HDAC11 の発現量を減らすことで細胞増殖抑制が起きることが明らかとなった。

(図3)。また、これら HDAC のノックダウンにより既知の CRL4^{CRBN} 基質であり、多発性骨髄腫の生存に必須である転写因子 Ikaros (IKZF1)や Aiolos (IKZF3)は減少しない一方で、KEY が実際に減少していることをウェスタンブロットングにより見出した(図4)。

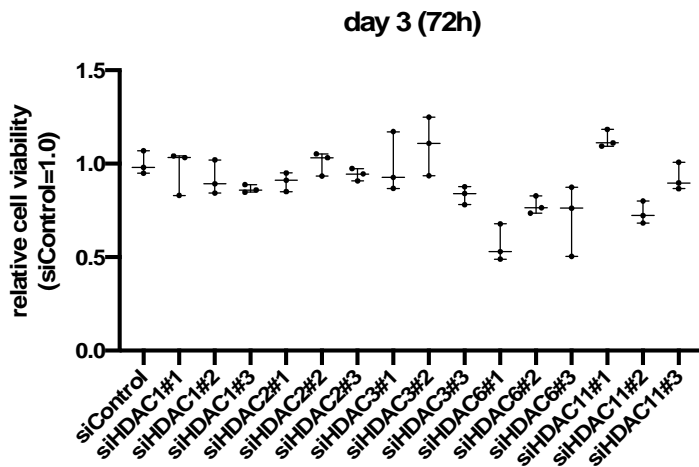


図3 多発性骨髄腫細胞 OPM2 に対する各種 HDACs のノックダウン下における細胞増殖アッセイ

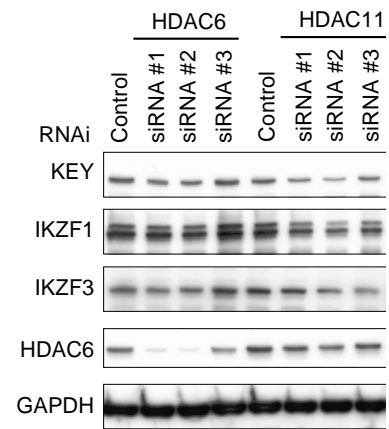


図4 多発性骨髄腫細胞 OPM2 における HDAC6 および 11 のノックダウンによる KEY の減少

また、CRBN をノックダウンした細胞を用いて検証を行った結果、HDAC 阻害剤による KEY の減少は CRBN 非依存的であることが明らかとなった(図5)。つまり、HDAC 阻害剤による減少は CRL4^{CRBN} による pom 依存的なタンパク質分解とは異なる経路によるものであり、そのために両薬剤の併用により、KEY はより効果的に減少することが示唆された。

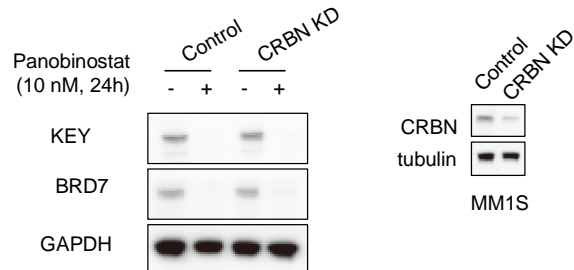


図5 多発性骨髄腫細胞 MM1S における CRBN の量と HDAC 阻害剤 panobinostat による KEY の減少の関係(KD=ノックダウン)

(2)続いて、HDAC 阻害剤による KEY 減少の分子機構やその下流因子の網羅的解析を行った。HDAC 阻害剤処理した OPM2 細胞を用いて検証を行った結果、HDAC 阻害剤による KEY の減少は mRNA レベルによることが明らかとなった(図6)。そこで、トランスクリプトーム解析を行い、変動した遺伝子群について調べた(図7)。

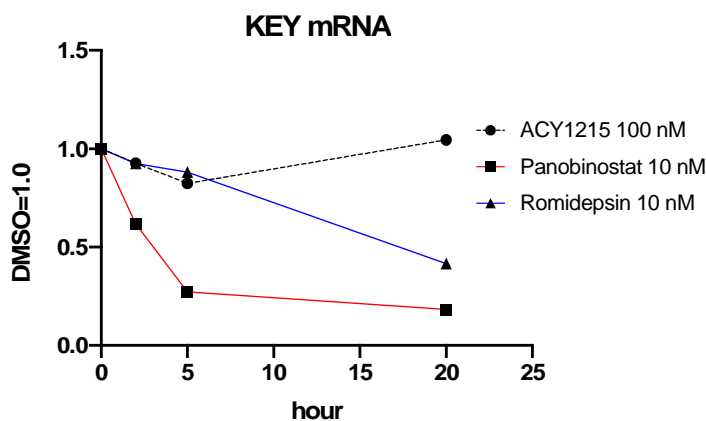


図6 多発性骨髄腫細胞 OPM2 における HDAC 阻害剤による KEY mRNA の経時変化

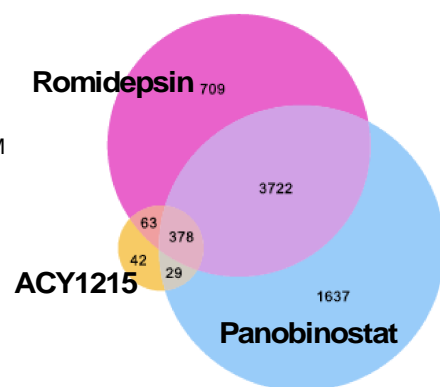


図7 多発性骨髄腫細胞 OPM2 において各種 HDAC 阻害剤により変動した遺伝子群のベン図

HDAC 阻害剤処理により上昇している遺伝子群について、Gene ontology および pathway でク

ラスタリングしたところ、Interferon-gamma pathway に関連する遺伝子群の enrichment score が優位に高く、これは KEY をロックダウンした際の結果と類似していた。更に、HDAC 阻害剤により減少する遺伝子群について解析を進めた結果、先立って c-myc が減少し(図 8)、その結果 myc の標的遺伝子群の発現も減少していることを見出した。c-myc の mRNA 量について、pom 処理により減少することが知られているが、それは既知の CRL4^{CRBN} の基質である Ikaros, Aiolos の減少ではなく、KEY の減少を主に介すことが既に判明している。以上より、HDAC 阻害剤は pom と併用することで KEY の効率的な減少を介し、それが結果として c-myc を減少させ、効果的な細胞増殖抑制効果を生じさせるという結論が得られた(図 9)。

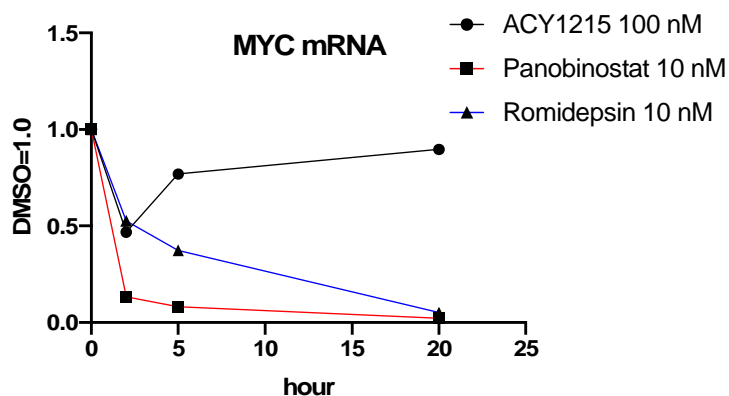


図 8 多発性骨髄腫細胞 OPM2 における HDAC 阻害剤による MYC mRNA の経時変化

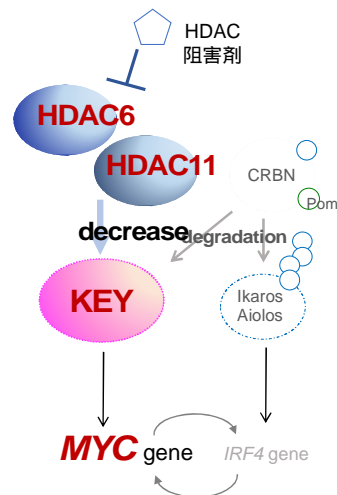


図 9 本研究で明らかとなった HDAC 阻害剤と pom の併用モデル図

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 伊藤拓水 朝妻知子 半田宏	4. 巻 53 (3)
2. 論文標題 Molecular Glue Degradar	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 月刊細胞	6. 最初と最後の頁 140-143
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu Nobuyuki, Asatsuma-Okumura Tomoko, Yamamoto Junichi, Yamaguchi Yuki, Handa Hiroshi, Ito Takumi	4. 巻 4
2. 論文標題 PLZF and its fusion proteins are pomalidomide-dependent CRBN neosubstrates	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1277-1277
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02801-y	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
---------	---------