

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461430

研究課題名(和文)ChIPSeqによる多発性骨髄腫に対するBCL9関連新規治療標的分子の網羅的探索

研究課題名(英文)Identifying novel therapeutic target molecules in multiple myeloma using BCL9-ChIPSeq

研究代表者

高田 弘一 (Takada, Kohichi)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：90398321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫は、難治性腫瘍の一つであり、未だ治癒を期待できる治療法は確立されていない。申請者らは、これまでBCL9という分子が多発性骨髄腫の細胞増殖、転移・浸潤、腫瘍血管新生に重要であることを見出している。本研究では、多発性骨髄腫に対する新規治療標的分子を同定する目的でBCL9分子に結合し、多発性骨髄腫の病態にかかわっている分子をクロマチン免疫沈降シークエンス法も用いて探索した。その結果、CYBRD1という鉄代謝関連分子が治療標的分子になりうる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Multiple myeloma (MM) is characterized by clonal proliferation of long-lived plasma cells within the bone marrow. Despite recent advances in its treatment, MM remains an incurable disease, underlining the need to continue exploring its molecular characteristics. We have identified that BCL9 has a pivotal role in MM pathogenesis. In this study, we found that CYBRD1, which is a iron regulating molecule, as a novel therapeutic target in MM using BCL9-Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)-Sequence (Seq) (ChIPSeq).

研究分野：多発性骨髄腫

キーワード：BCL9

1. 研究開始当初の背景

本邦では高齢化に伴い、多発性骨髄腫(MM)の発生率は増加の一途にあり、年間死亡者数は約4,200人以上にもものぼる。本疾患の治療成績はサリドマイド、ボルテゾミブ、レナリドミドの導入により向上してきている。しかしながら、未だ治癒を期待できる治療法はなく、予後不良な疾患である。よって、より効果的な新規治療法の開発が待たれている。多くのMMでは、Wnt/ β -カテニンシグナルが活性化され、細胞増殖能を亢進させていることから、MM治療において同シグナルは分子標的薬のターゲットとして極めて重要である(Takada K et al, Leukemia 2012)。一方、同シグナルは骨髄幹細胞をはじめとする様々な幹細胞の維持や創傷治癒の制御に必須である。したがって、Wntシグナル抑制剤投与により重篤な合併症を誘発する危険性がある。実際に、TCF/ β -カテニン複合体拮抗剤として開発されたPKF115-584をMM担癌マウスに投与すると高度な骨髄抑制と体重減少が惹起された。これらの知見より、MM治療の標的となり得る新たなWntシグナル分子の同定が待たれていた。申請者らは、 β -カテニンのco-factorであるBCL9がMMで高発現していることを見出した。一方、BCL9はMMの発生母地である形質細胞には発現していないことを証明している。さらに、MM担癌マウスにおいて、shRNAを用いてMMのBCL9の発現を抑制することによりWntシグナルの下流遺伝子群の発現が低下し、MMの増殖、転移・浸潤および腫瘍血管新生が抑制され、その結果としてMM担癌マウスの生存率を有意に向上させることを明らかにしている(Takada K et al, Cancer Res 2009)。以上より、BCL9はMM治療の標的として理想的な分子であることが推定された。BCL9は β -カテニンに結合し、Wntシグナルを正に制御する転写因子として機能している。結晶構造の

解析結果からBCL9は、 α -Helixを形成するHD2ドメインを介して β -カテニン表面のgrooveに結合する。申請者らは、HD2の構造を模倣したStabilized α -Helix of BCL9 peptide (SAH-BCL9)を設計・合成し、SAH-BCL9がWnt/ β -カテニン転写活性を特異的かつ効果的に阻害し、MM細胞に対して抗腫瘍効果ならびに腫瘍血管新生抑制作用を示すことを明らかにした(Takada K et al, Sci Transl Med 2012)。以上の検討結果より、BCL9転写複合体がMM治療の標的として有望であることを明らかにしている。

2. 研究の目的

前述のごとく、BCL9転写複合体がMM治療の標的として有用であるが、BCL9の標的遺伝子群およびその発現調節機構は不明である。本研究の目的は、Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)-Sequence (Seq) (ChIPSeq)法を用いてMMにおけるBCL9による転写制御ネットワーク機構を解明し、MMに特異的な新規治療標的分子を同定することである。

3. 研究の方法

(1) sh-cont および sh-BCL9 細胞の樹立

MM1S細胞にレンチウイルスシステムを用いてsh-cont-GFPまたはsh-BCL9-GFPを感染させ、GFP陽性細胞をflow cytometerでsortingした。

(2) BCL9抗体を用いたChIPSeqによるBCL9下流遺伝子のゲノムワイドシーケンス

(1)で樹立したsh-contおよびsh-BCL9細胞を用いてChIPSeqのライブラリ作製を行う。同細胞を1% formaldehyde処理し、蛋白とDNAのcrosslinkを行った。細胞ペレットをlysis bufferで可溶化し、Bioruptor®を用いてDNAを断片化し、BCL9抗体を用いてChIPを行った。適切なライブラリ10ngをプロトコール

に従い SOLiD™ Fragment Library Barcoding Kit Module 1-16 を用いてバーコーディングを行った。前述のライブラリ DNA を End-repair し、個々のライブラリ DNA に Barcode adaptors (1-16) (Life Technology) を ligation する。さらに、Nick translate を行い、emulsion PCR (ePCR) でライブラリを増幅した。ePCR 後のライブラリを SOLiD™ Library TaqMan® Quantification Kit を用いて定量した後に、ライブラリを SOLiD™ sequencer でシークエンスした。

(3) ChIPSeq の解析

シークエンスデータを Bowtie package を用いて Human genome browser (GRCh37/hg19) へマッピングし、同 Bowtie マップから MACS と SPP software により BCL9 結合領域同定を行った。シークエンスの 1 次解析は *ChIPpeakAnno* bioconductor package と ENSEMBL database で行う。次に BCL9 結合領域の転写開始点からの距離とその分布を算出する。

(4) ChIPSeq と GEP の統合解析

抽出された BCL9 標的遺伝子候補を、GEP (Takada K et al, *Cancer Res*, 2009) と統合し、BCL9 標的遺伝子候補を抽出した。

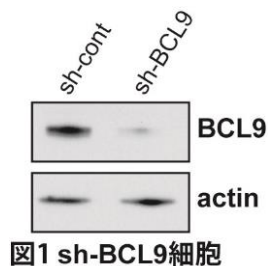


図1 sh-BCL9細胞

4. 研究成果

(1) sh-cont および sh-BCL9 細胞

既報に準じて sh-cont, sh-BCL9 細胞を樹立し、図 1 に示すように BCL9 抗体を用いた Western blot 法で評価した。

(2) BCL9 ChIPSeq

ChIPpeakAnno bioconductor package と ENSEMBL database でシークエンスの解析を行い、BCL9 結合領域の分布と転写開始点からの距離を算出した(図 2A)。sh-BCL9 においては

BCL9 結合領域が 68 %減少しており、sh-BCL9 で検出されなかった遺伝子が BCL9 標的遺伝子候補である (図 2B)。

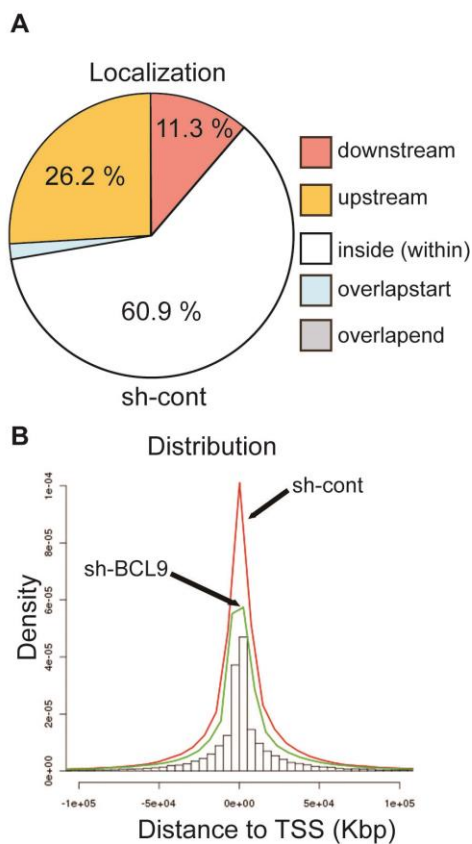


図2 BCL9 ChIPSeq 解析

(3) ChIP-qPCR

ChIPSeq と GEP の統合解析結果から、BCL9 の標的遺伝子の一つとして *CYBRD1* を同定した。sh-cont および sh-BCL9 細胞を用いて ChIP-qPCR を行ったところ sh-BCL9 で有意にプロモーター領域の enrichment は低下していた (図 3)。

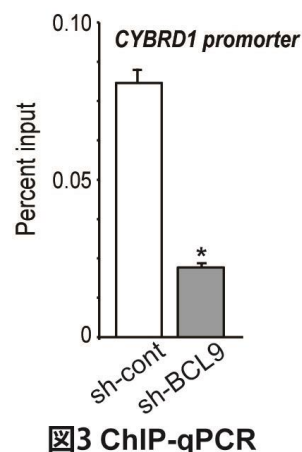


図3 ChIP-qPCR

(4) *CYBRD1* が MM 患者の予後に与える影響

MAQC-II Project MM data set (publicly available gene expression data set) を用

いて CYBRD1 が予後に影響を与える影響を解析した。CYBRD1 高発現群の全生存期間が有意に良好であった。

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. Osuga T, Takimoto R, Ono M, Hirakawa M, Yoshida M, Okagawa Y, Uemura N, Arihara Y, Sato Y, Tamura F, Sato T, Iyama S, Miyanishi K, Takada K, Hayashi T, Kobune M, Kato J. Relationship Between Increased Fucosylation and Metastatic Potential in Colorectal Cancer. **J Natl Cancer Inst.** **2016** 13;108(8). doi: 10.1093/jnci/djw038. 査読あり
2. Hashimoto A, Sato T, Iyama S, Yoshida M, Ibata S, Tatekoshi A, Kamihara Y, Horiguchi H, Murase K, Kawano Y, Takada K, Miyanishi K, Kobune M, Ichimiya S, Kato J. Narrow-Band Ultraviolet B Phototherapy Ameliorates Acute Graft-Versus-Host Disease of the Intestine by Expansion of Regulatory T Cells. **PLoS One.** **2016** 31;11(3):e0152823. doi: 10.1371/journal.pone.0152823. 査読あり
3. Horiguchi H, Kobune M, Kikuchi S, Yoshida M, Murata M, Murase K, Iyama S, Takada K, Sato T, Ono K, Hashimoto A, Tatekoshi A, Kamihara Y, Kawano Y, Miyanishi K, Sawada N, Kato J. Extracellular vesicle miR-7977 is involved in hematopoietic dysfunction of mesenchymal stromal cells via poly(rC) binding protein 1 reduction in myeloid neoplasms. **Haematologica.** **2016** 101(4):437-47. doi: 10.3324/haematol.2015.134932. 査読あり
4. Hoki T, Miyanishi K, Tanaka S, Takada K, Kawano Y, Sakurada A, Sato M, Kubo T,

- Sato T, Sato Y, Takimoto R, Kobune M, Kato J. Increased duodenal iron absorption through up-regulation of divalent metal transporter 1 from enhancement of iron regulatory protein 1 activity in patients with nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology.** **2015** Sep;62(3):751-61. doi: 10.1002/hep.27774. 査読あり
5. Iyama S, Murase K, Sato T, Hashimoto A, Tatekoshi A, Horiguchi H, Kamihara Y, Ono K, Kikuchi S, Takada K, Kawano Y, Hayashi T, Miyanishi K, Sato Y, Takimoto R, Kobune M, Mori S, Kato J, Yamashita T, Kato J. Narrowband ultraviolet B phototherapy ameliorates acute graft-versus-host disease by a mechanism involving in vivo expansion of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. **Int J Hematol.** **2014** Apr;99(4):471-6. doi: 10.1007/s12185-014-1530-1. 査読あり
 6. Ono K, Sato T, Iyama S, Tatekoshi A, Hashimoto A, Kamihara Y, Horiguchi H, Kikuchi S, Kawano Y, Takada K, Hayashi T, Miyanishi K, Sato Y, Takimoto R, Kobune M, Kato J. A novel strategy inducing autophagic cell death in Burkitt's lymphoma cells with anti-CD19-targeted liposomal rapamycin. **Blood Cancer J.** **2014** Feb 7;4:e180. doi: 10.1038/bcj.2014.2. 査読あり
 7. Zhao JJ, Lin J, Zhu D, Wang X, Brooks D, Chen M, Chu ZB, Takada K, Ciccarelli B, Admin S, Tao J, Tai YT, Treon S, Pinkus G, Kuo WP, Hideshima T, Boussein M, Munshi N, Anderson K, Carrasco R. miR-30-5p functions as a tumor suppressor and novel therapeutic tool by targeting the oncogenic Wnt/ β -catenin/BCL9 pathway. **Cancer Res.** **2014** Mar 15;74(6):1801-13. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3311-T. 査読あり

8. Gatt ME, Takada K, Mani M, Lerner M, Pick M, Hideshima T, Carrasco DE, Protopopov A, Ivanova E, Sangfelt O, Grandér D, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr, Anderson KC, Carrasco DR. TRIM13 (RFP2) downregulation decreases tumour cell growth in multiple myeloma through inhibition of NF Kappa B pathway and proteasome activity. **Br J Haematol.** 2013 Jul;162(2):210-20. doi: 10.1111/bjh.12365. 査読あり

9. Hirakawa M, Takimoto R, Tamura F, Yoshida M, Ono M, Murase K, Sato Y, Osuga T, Sato T, Iyama S, Miyanishi K, Takada K, Hayashi T, Kobune M, Kato J. Fucosylated TGF- β receptors transduces a signal for epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells. **Br J Cancer.** 2014 Jan 7;110(1):156-63. doi: 10.1038/bjc.2013.699. 査読あり

〔学会発表〕（計 1 件）

高田弘一

多発性骨髄腫における鉄代謝異常および鉄キレート剤による抗腫瘍効果の解析
第 40 回 日本骨髄腫学会学術集会
2015. 5. 16-17 くまもと森都心プラザ（熊本
県熊本市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 弘一 (TAKADA KOHICHI)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：90398321

(2) 研究分担者

神原 悠輔 (KAMIHARA YUSUKE)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：10624421

加藤 淳二 (KATO JUNJI)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：20244345

小船 雅義 (KOBUNE MASAYOSHI)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90336389