

平成30年6月5日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461427

研究課題名(和文) 多発性骨髄腫及びホジキンリンパ腫のPU.1発現誘導を利用した治療応用の基礎研究

研究課題名(英文) Treatment strategy with PU.1 induction in multiple myeloma and Hodgkin lymphoma

研究代表者

奥野 豊 (Okuno, Yutaka)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授

研究者番号：80363539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：PU.1を成熟B細胞から形質細胞の分化段階でノックアウトしたマウスは18ヶ月齢を越えると70%にびまん大細胞B細胞リンパ腫が発症することを我々は見出した。従って、PU.1は成熟B細胞で腫瘍抑制因子として働き、PU.1低下がDLBCLの発症につながるということがわかった。PU.1を骨髄腫細胞株に発現させると細胞増殖停止と細胞死が起こる。今回、骨髄腫細胞株においてPU.1が直接IRF4のプロモーターに結合して発現を抑えることがわかった。PU.1によるIRF4の発現低下がIRF7の発現低下を解除してIRF7の発現を上げ、その結果IFN γ の発現を上昇させアポトーシスを引き起こしていることを突き止めた。

研究成果の概要(英文)：We generated conditional knockout of PU.1 by crossing C₁-Cre and PU.1-loxP mice. 75% of the aged knockout mice emerged diffuse large B cell lymphoma, indicating that PU.1 acts as tumor suppressor in B cells. PU.1 expression induces cell cycle arrest and apoptosis in myeloma cells. We uncovered that PU.1 binds to IRF4 promoter and suppresses IRF4 expression. It was previously reported that IRF4 suppresses IRF7 expression by direct binding to its promoter. Indeed, we found that decreased IRF4 expression subsequently induces IRF7 expression that induces IFN γ expression. IFN γ is expressed in myeloma cells after PU.1 expression and knockdown of IFN γ partially prevent myeloma cells from apoptosis. In conclusion, PU.1 induces apoptosis in myeloma cells by suppression of IRF4 expression and subsequent up-regulation of IRF7 and IFN γ .

研究分野：血液内科学

キーワード：PU.1 tumor suppressor 悪性リンパ腫 多発性骨髄腫 IRF4 IRF7 IFN γ 細胞死

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫は高齢化に伴いその発症率は年々増加傾向にある。近年、bortezomib, lenalidomide, thalidomide などの新規薬剤の登場により、その平均生存期間は6-7年に延長したといわれているが、現在に至るまで治癒を見込めない疾患である。一方、悪性リンパ腫においては分子標的薬によって長期生存や治癒が多くの症例で期待できるようになっている。多発性骨髄腫においても、その発症機序の解明が真に有効な分子標的療法薬の開発に必須であると考えられるが、現在までその発症機序は解明されていない。一方、造血に必須の転写因子 PU.1 の発現に重要である-14 kb のエンハンサーを knockout したマウスにおいては PU.1 の発現が骨髄細胞及び B 細胞で wild type マウスに比べて 20% のレベルまで低下し、急性骨髄性白血病や B-CLL を引き起こすことが報告されている (Rosenbauer F et al. *Nat Genet.* 2004;36:624-630)。従って、骨髄細胞や B 細胞において PU.1 が腫瘍抑制遺伝子として働いていることが示唆される。我々は、正常の形質細胞において PU.1 は発現しているのに対して、多発性骨髄腫の多くの細胞株で強く発現低下しており、また多くの患者の骨髄腫細胞において PU.1 が様々なレベルで発現低下していることを報告した。これら PU.1 の発現低下している骨髄腫細胞株に PU.1 を発現させると完全にその細胞増殖が停止し細胞死が引き起こされた (Tatetsu H et al. *Cancer Res.* 2007;67:5328-5336)。従って、PU.1 の発現の低下は多発性骨髄腫細胞においてその細胞増殖及び生存に必須であり、PU.1 にとって腫瘍抑制遺伝

子であることが示唆された。我々は Classical Hodgkin lymphoma 細胞においても PU.1 が腫瘍抑制遺伝子である可能性を報告した (Yuki H et al. *Blood.* 2013; 121:962-970)。古典的ホジキンリンパ腫細胞においてはもともと PU.1 の発現が強く抑制されていることが報告されている。我々は Classical Hodgkin Lymphoma 細胞株に PU.1 を発現させるとその細胞増殖が完全に停止し細胞死が誘導され、また患者由来の Hodgkin lymphoma 細胞に lentivirus の系を用いて PU.1 を発現させると細胞死が誘導されることから古典的ホジキンリンパ腫細胞においても PU.1 が腫瘍抑制因子であることが示された。古典的ホジキンリンパ腫細胞における PU.1 発現低下も PU.1 のプロモーター及び-17 kb URE のメチル化により起こっていること、脱メチル化剤である 5-aza-2-deoxycytidine や HDAC inhibitor である TSA で古典的ホジキンリンパ腫細胞を処理すると PU.1 の発現が誘導されることを報告し、治療への応用が可能であることが示唆された。

2. 研究の目的

PU.1 を post germinal center B cell から plasma cell において conditional に knockout したマウスを作製して現在表現型の解析を行っている。post germinal center B cell から plasma cell において Cre 遺伝子を発現する C γ 1-Cre マウスと PU.1-loxP マウスを交配して PU.1 の conditional knockout mice を作製した。

我々は PU.1 によって引き起こされる細胞増殖停止及び細胞死のメカニズムについても解析中である。我々はこれまで PU.1 発現前後で発現変化の大きな遺伝子群の中から、多発性骨髄腫細胞では TRAIL の発

現上昇が細胞死に関わっており、一方細胞増殖停止においてはU266 骨髄腫細胞株においてp21の発現上昇が関わっていることを示した (Ueno S et al. *Oncogene* 2009;28:4116–4125)。しかしながら、p21の発現上昇はKMS12PE 骨髄腫細胞株にPU.1を発現させても見られないこと、PU.1で細胞増殖停止と細胞死を引き起こすClassical Hodgkin lymphoma 細胞株においてはPU.1発現なしでもTRAILの発現が高く、PU.1によってそれ以上の発現上昇が見られなかったため、PU.1によって引き起こされる細胞増殖停止及び細胞死のメカニズムについては、他の機序も関わっている可能性が高いと考えている。現在、そのメカニズムを解析中である。

3. 研究の方法

共同研究者であり留学先であったボストンのハーバード大学医学部ハーバード幹細胞研究所のDaniel G Tenen先生の研究室で作製されたPU.1-loxPマウスと、形質細胞のみでPU.1のknockoutを達成するためのCre蛋白を形質細胞でのみ発現するIg γ 1 constant region gene segment C γ 1-CreマウスをHarvard Medical SchoolのKlaus Rajewsky教授より入手し交配することによりPU.1を形質細胞でのみ欠失させたC γ 1-Cre PU.1 conditional knockout mouseを作成して現在そのphenotypeを解析中である。これらの一部のマウスでは脾臓の腫大を認め、骨髄及び脾臓においてB細胞と形質細胞の増多を認め、 κ chainにモノクローナルに染まっていることからこれらの増加しているB細胞ないしは形質細胞がモノクローナルな増殖であることを見出している。これらの一部のマウスの骨髄細胞や脾臓細胞は免疫不全マウス(Rag2^{-/-}Jak3^{-/-}bulb/c)に移植可能であり、レシピエントマウスは1ヶ月以内に全例死

亡した。これらの細胞は多発性骨髄腫というよりもpost GC typeのB細胞リンパ腫に近い細胞であった。

我々はさらにPU.1によって引き起こされる多発性骨髄腫及びホジキンリンパ腫の細胞増殖停止と細胞死のメカニズムを明らかにするために研究を進めている。多発性骨髄腫及びホジキンリンパ腫細胞株にtet-offの系を用いてPU.1発現させる細胞系を用いて研究を進めているが、これらの細胞株でのPU.1の発現前後の遺伝子発現変化を、共同研究者の九州大学医学大学院病態修復内科学・赤司教授との共同研究としてDNA microarray analysisを行って進めてきた。その結果、細胞死を引き起こす遺伝子群ではTRAILが多発性骨髄腫株U266とKMS12PEにおいてPU.1によって直接transactivateされて発現上昇することを示した (Ueno S et al. *Oncogene* 2009;28:4116–4125)。我々はp21とTRAIL以外の遺伝子も関わっている可能性が高いと考えている。これらの遺伝子群を同定するために現在PU.1をtet-offで発現したday 1において骨髄腫細胞株U266, ホジキンリンパ腫細胞株L-428細胞でPU.1と転写因子複合体を形成している他の転写因子や転写制御因子を同定するためにこれらの細胞でPU.1の抗体を用いて免疫沈降し、沈降物の二次元電気泳動やShotgun sequenceでの蛋白の同定を進めた。また、多発性骨髄腫細胞株U266とKMS12PEの2つの細胞株にPU.1をtet-offで発現した細胞でPU.1抗体を用いてChiP-Sequenceを行ってPU.1が直接結合して発現レベルを上げている遺伝子群を同定する。これらのデータと先述のDNA micriarrayのデータを合わせてPU.1によって引き起こされる細胞増殖停止及び細胞死に関わる他の遺伝子群の同定を進めた。同定ができればその蛋白も含め、PU.1を標的にした分子標的療法の開発を

検討、実行する。

4. 研究成果

我々はこれまで PU.1 が古典的ホジキンリンパ腫や多発性骨髄腫の腫瘍抑制因子であることを示してきた。我々は更に PU.1 を post germinal B 細胞から形質細胞の分化段階でノックアウトしたマウスは 18 ヶ月齢を越えると 75% にびまん大細胞 B 細胞リンパ腫が発症することを見出した。従って、PU.1 は成熟 B 細胞で腫瘍抑制因子として働き、PU.1 が発現していないと DLBCL 用のリンパ腫が発症することがわかった。我々はこの DLBCL 細胞を 3 匹分と、コントロール群として PU.1-loxP マウス 2 匹分の脾臓 B 細胞とで RNA-seq を施行して、腫瘍化のメカニズムを探っている。発現上昇していた遺伝子群は主に細胞周期に関わる遺伝子群であり、一方発現低下していたのは免疫に関わるサイトカインや炎症に関わる遺伝子群であった。また免疫グロブリンの可変領域をみると特定の可変領域の配列が増幅しており、この DLBCL 細胞がモノクローナルな腫瘍であることが証明された。

これまで PU.1 での多発性骨髄腫の腫瘍抑制因子としての機能を解明してきた。PU.1 を骨髄腫細胞株に発現させると細胞増殖停止と細胞死が起こる。今回、6 つの骨髄腫細胞株全てにおいて PU.1 が IRF4 の発現を低下させることを示した。更に PU.1 が直接 IRF4 のプロモーターに結合していることを確認した。そしてこの PU.1 の結合が IRF4 のプロモーター活性を抑えること、それが IRF4 プロモーターの二つの PU.1 binding site に依存していることがわかった。また IRF4 が IRF7 promoter に結合してその発現を抑えていることが判明し、PU.1 による IRF4 の発現低下が IRF7 の発現低下を解除して IRF7 の発現を上げ、

その結果 IFN の発現を上昇させアポトーシスを引き起こしていることを突き止めた。

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 14 件)

Ueno, N., Nishimura, N., Ueno, S., Endo, S., Tatetsu, H., Hirata, S., Hata, H., Matsuoka, M., Mitsuya, H., and Okuno, Y. (2017). PU.1 acts as tumor suppressor for myeloma cells through direct transcriptional repression of IRF4. *Oncogene* 36, 4481-4497. 査読有り

Nishimura, N., Endo, S., Ueno, S., Ueno, N., Tatetsu, H., Hirata, S., Hata, H., Komohara, Y., Takeya, M., Mitsuya, H., and Okuno, Y. (2017). A xenograft model reveals that PU.1 functions as a tumor suppressor for multiple myeloma in vivo. *Biochemical and biophysical research communications* 486, 916-922. 査読有り

Komohara, Y., Ma, C., Yano, H., Pan, C., Horlad, H., Saito, Y., Ohnishi, K., Fujiwara, Y., Okuno, Y., Nosaka, K. Shimosaki S, Morishita K, Matsuoka M, Wakayama T, Takeya M. (2017). Cell adhesion molecule-1 (CADM1) expressed on adult T-cell leukemia/lymphoma cells is not involved in the interaction with macrophages. *J Clin Exp Hematop.* 査読有り

Goto, H., Kariya, R., Kudo, E., Okuno, Y., Ueda, K., Katano, H., and Okada, S. (2017). Restoring PU.1 induces apoptosis and modulates viral transactivation via interferon-stimulated genes in primary effusion lymphoma. *Oncogene.* 査読有り

Horlad, H., Ma, C., Yano, H., Pan, C., Ohnishi, K., Fujiwara, Y., Endo, S., Kikukawa, Y., Okuno, Y., Matsuoka, M., Takeya M, Komohara Y. (2016). An IL-27/Stat3 axis induces expression of programmed cell death 1

ligands (PD-L1/2) on infiltrating macrophages in lymphoma. *Cancer science* 107, 1696-1704. 査読有り

Endo, S., Amano, M., Nishimura, N., Ueno, N., Ueno, S., Yuki, H., Fujiwara, S., Wada, N., Hirata, S., Hata, H., Mitsuya H, Okuno Y. (2016).

Immunomodulatory drugs act as inhibitors of DNA methyltransferases and induce PU.1 up-regulation in myeloma cells. *Biochemical and biophysical research communications* 469, 236-242. 査読有り

Wada, N., Kawano, Y., Fujiwara, S., Kikukawa, Y., Okuno, Y., Tasaki, M., Ueda, M., Ando, Y., Yoshinaga, K., Ri, M., Iida, S., Nakashima T, Shiotsu Y, **Mitsuya H**, Hata H. (2015). Shikonin, dually functions as a proteasome inhibitor and a necroptosis inducer in multiple myeloma cells. *Int J Oncol* 46, 963-972. 査読有り

Nagoshi, H., Taki, T., Chinen, Y., Tatekawa, S., Tsukamoto, T., Maegawa, S., Yamamoto-Sugitani, M., Tsutsumi, Y., Kobayashi, T., Matsumoto, Y., Horiike S, Okuno Y., Fujiwara S, Hata H, Kuroda J, Taniwaki M. (2015). Transcriptional dysregulation of the deleted in colorectal carcinoma gene in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Genes, chromosomes & cancer* 54, 788-795. 査読有り

Kikukawa, Y., Yuki, H., Hirata, S., Ide, K., Nakata, H., Miyakawa, T., Matsuno, N., Nosaka, K., Yonemura, Y., Kawaguchi, T., Hata H, Mitsuya H, Okuno Y. (2015). Combined use of bortezomib, cyclophosphamide, and dexamethasone induces favorable hematological and organ responses in Japanese patients with amyloid light-chain amyloidosis: a single-institution

retrospective study. *International journal of hematology* 101, 133-139. 査読有り

Fujiwara, S., Wada, N., Kawano, Y., Okuno, Y., Kikukawa, Y., Endo, S., Nishimura, N., Ueno, N., Mitsuya, H., and Hata, H. (2015). Lactate, a putative survival factor for myeloma cells, is incorporated by myeloma cells through monocarboxylate transporters 1. *Experimental hematology & oncology* 4, 12. 査読有り
〔学会発表〕(計 11 件)

遠藤慎也

Deletion of Sfp1 in the lineages from post GC B cells to plasma cells induces B cell malignancies

日本血液学会 2014年11月02日

西村直

PU.1 is a tumor suppressor in multiple myeloma cells in xenograft models

日本血液学会 2014年10月31日

Shinya Endo, Hiromichi Yuki, Yoshihiro Komohara, Shikiko Ueno, Nao Nishimura, Niina Ueno, Hiro Tatetsu, Motohiro Takeya, Hiroyuki Hata, Seiji Okada, Daniel G

Tenen, Hiroaki Mitsuya, and Yutaka Okuno

Conditional knockout of Sfp1 in post germinal center B and plasma cells induces B cell lymphoma and plasma cell neoplasm

アメリカ血液学会 2014年12月06日

Nao Nishimura, Eri Fuji, Shinya Endo, Niina Ueno, Hironori Hayashi, Masayuki Amano, Hiroyuki Hata, Hiroaki Mitsuya, and Yutaka Okuno

OSSL_325096 Induces Apoptosis in Multiple Myeloma Cells through VCP inhibition

日本血液学会 2015年10月16日石川県立音楽堂 地下1階 交流ホール

Niina Ueno, Shikiko Ueno, Shinya Endo, Nao Nishimura, Hiro Tatetsu, Kisato Nosaka, Shinya Hirata, Hiroaki Mitsuya, and Yutaka Okuno

PU.1-induced IRF4 down-regulation and subsequent IRF7 up-regulation in myeloma cells

日本血液学会 2015年10月18日ホテル金沢

Shinya Endo, Masayuki Amano, Nao Nishimura, Shikiko Ueno, Niina Ueno, Hiromichi Yuki, ShihoFujiwara, Naoko Wada, Shinya Hirata, Hiroyuki Hata, Hiroaki Mitsuya, and Yutaka Okuno

IMiDs up-regulate PU.1 expression in myeloma cell through demethylation of the PU.1 promoter

日本血液学会 2015年10月18日ホテル金沢

Niina Ueno, Shikiko Ueno, Shinya Endo, Nao Nishimura, Hiro Tatetsu, Shinya Hirata, Hiroaki Mitsuya, and Yutaka

Okuno

PU.1-Induced IRF4 Down-Regulation and Subsequent IRF7 up-Regulation in Myeloma Cells

アメリカ血液学会 (国際学会) 2015年12月06日Orange County Convention Center, Orland, USA

Nao Nishimura, Shinya Endo, Eri Fuji, Niina Ueno, Shikiko

Ueno, Hiromichi Yuki, Hiroyuki Hata, Yutaka
Okuno

ALアミロイドーシス患者における免疫グロブリン軽鎖遺伝子可変領域選択性

日本骨髄腫学会 あわぎんホール 2016年05月28日 ~ 2016年05月29日

Nao Nishimura, Shinya Endo, Eri Fuji, Niina Ueno, Shikiko

Ueno, Hiromichi Yuki, Hiroyuki Hata, Yutaka
Okuno

日本血液学会 2016年10月13日パシフィコ横浜

Shinya Endo, Nao Nishimura, Shikiko Ueno, Yutaka Okuno

Preference usage of certain V regions in AL amyloidosis patients

Serum KL-6 elevation is associated with aggressive phenotype of multiple myeloma

日本血液学会 2016年10月13日パシフィコ横浜

奥野 豊

PU.1 is tumor suppressor for 奥野 豊 B cell Malignancies

リンパ網内系学会(招待講演)

2016年09月02日 ホテル日航熊本

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

奥野 豊 (Okuno Yutaka)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号 : 80363539

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :

(4)研究協力者

()