

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09003

研究課題名(和文) DNA修復に着眼した多発性骨髄腫の耐性機構の解明と新たな治療法の開発

研究課題名(英文) Drug resistance in multiple myeloma using DNA damage repair

研究代表者

齋藤 貴之 (SAITOH, TAKAYUKI)

群馬大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号：80375542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫のDNA修復遺伝子の発現を検討した。塩基除去修復遺伝子：OGG1、APE1、MUTYH、POLB、PARP1、XRCC1の蛋白質の発現は総じて高値であった。一部薬剤耐性細胞株でDNA修復遺伝子発現の上昇がみられた。OGG1とAPE1をknockdownすることで細胞増殖が低下した。APE1knockdown細胞株はDNA二本鎖損傷の値の増加が見られ、増殖低下の機序として、DNA修復との関連が示唆された。MethoxyamineとE3330によるAPE1の阻害剤でも細胞増殖が抑制された。これらよりDNA修復特にAPE1が多発性骨髄腫の治療標的になる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究でDNA修復の塩基除去修復の遺伝子が多発性骨髄腫の治療標的になる可能性が示された。特にAPE1はDNA修復と転写因子を制御する多機能遺伝子で今回の研究ではDNA修復の関与が示唆された。しかしながら、転写因子を制御するAPE1阻害剤の有効性を示すデータもあり、APE1のDNA修復系以外の役割を果たしている可能性もある。現在、多発性骨髄腫は予後は改善されているが殆どの患者は再発する難治性疾患である。DNA修復系の阻害剤により骨髄腫の治療効果改善が期待される。

研究成果の概要(英文)：We examined the expression of DNA repair genes, including base excision repair (BER) genes of multiple myeloma (MM) cell lines. The expression of OGG1, APE1, MUTYH, POLB, PARP, and XRCC1 in BER of MM cells was higher than peripheral blood mononuclear cell. We have made several BER knockdown MM cells using lentivirus. OGG1 knockdown and APE1 knockdown (KD) cells showed decreased proliferation. APE1 KD cells showed higher level of double strand DNA breaks compared to control, suggesting the role of APE1 for anti-myeloma effect by DNA repair system. Furthermore, APE1 inhibitor; Methoxyamine and E3330 showed decreased proliferation of MM cell lines. Thus, APE1 may be a target gene of MM therapy.

研究分野：多発性骨髄腫

キーワード：多発性骨髄腫 DNA修復 塩基除去修復 OGG1 APE1

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(MM)は、治療早期は薬剤に感受性があるが、ほとんどの症例は薬剤耐性になり、その克服が社会的にも求められている。私たちは DNA 修復の一連の研究で、薬剤耐性時に DNA 修復遺伝子の発現が上昇し、その阻害薬は薬剤感受性を回復させることを見出した。本研究では、これらの成果を発展させて、薬剤耐性における DNA 修復の分子機構を明らかにし、DNA 修復機構を応用した治療につなげる研究をする。

2. 研究の目的

DNA 修復と MM の関係を明らかにすることにし、治療標的を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- 1) MM 細胞株と臨床検体を用いて、DNA 修復遺伝子の発現を検討した。
9 種の細胞株 : KMM-1、U266、RPMI 8226、KMS-12-PE、KMS-12-BM、KMS-11、KMS-11/BTZ、OPM-2、OPM-2/BTZ と MM 患者検体を用いて検討した。
- 2) DNA 修復遺伝子の候補を選び、knockdown 細胞を作成し、機能解析を行った。
OGG1 遺伝子と APE1 遺伝子に対して、lentivirus を用いて、knockdown 細胞株を作成。細胞周期、細胞増殖、DNA 損傷について検討した。
- 3) DNA 修復遺伝子の阻害剤を細胞増殖の影響を検討し、MM の治療に応用できるか検討した。
APE1 阻害剤や PARP 阻害剤の影響を検討した。

4. 研究成果

1) MM の DNA 修復遺伝子の塩基除去修復遺伝子の発現を検討した。MM 細胞株の塩基除去修復遺伝子 : OGG1、MUTYH、APE1、XRCC1、POLB、PARP1、MTH1 の蛋白質の発現は正常単核球に比較して総じて高値であった。MM 患者由来の形質細胞は、正常形質細胞に比べて OGG1、MTH1、APE1、XRCC1、PARP1 mRNA 発現が高かった。

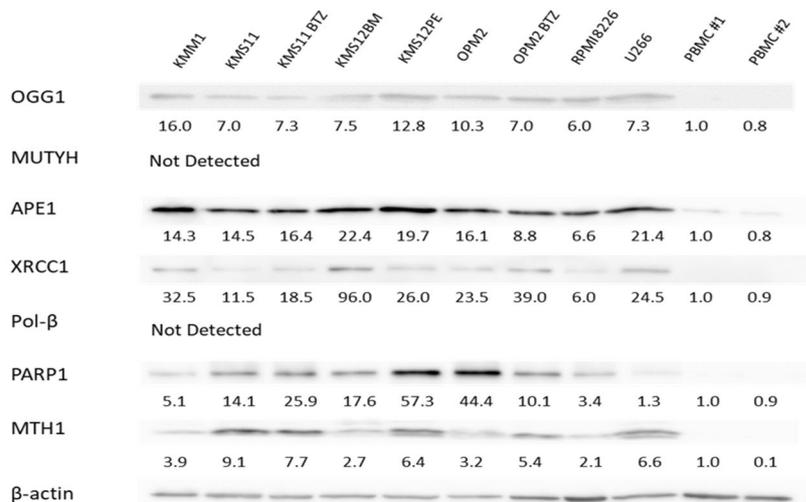


図 1 多発性骨髄腫細胞株の DNA 修復遺伝子の蛋白発現

2) DNA 修復遺伝子の OGG1 と APE1 遺伝子を選択し、OGG1 と APE1 の KD 細胞株を作成した。

- ・ KMS-11 と KMM-1 を用いて、OGG1 の KD により細胞増殖が軽度抑えられた(図 2)。
- ・ KMM-1 を用いて、APE1 の KD により細胞増殖が軽度抑えられた(図 2)。

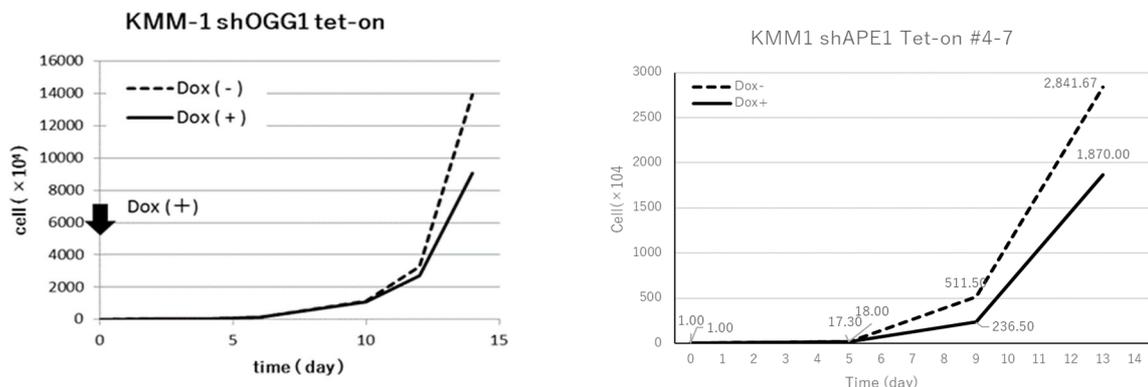


図 2 多発性骨髄腫細胞株の OGG1 と APE1 knockdown 細胞株の増殖

OGG1 knockdownでは8-oxoguanineの上昇は明らかでなかった。一方、APE1 knockdown細胞株はDNA二本鎖損傷(H2AX)の値は増加が見られ(図3)、増殖低下の機序として、DNA修復との関連が示唆された。

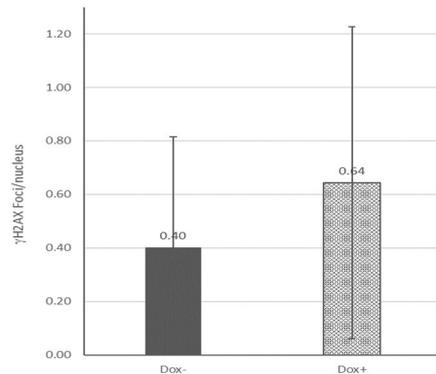


図3 APE1 knockdown MM細胞株 (KMM-1 shAPE1 Tet-on #4-7)を用いて、H2AXのFoci数を比較

3) MM細胞株5種(U266、RPMI 8226、KMS-11、OPM-2、KMM-1)に対し、APE1阻害剤2種(methoxyamine: DNA修復: 転写制御、E3330)を検討した。Methoxyamineでは4つすべての細胞で増殖が抑えられた(IC50(μM): U266 = 14.9、RPMI 8226 = 13.1、KMS-11 = 9.9、OPM-2 = 15.5)。E3330ではKMS-11、OPM-2で増殖が抑えられた(IC50(μM): KMS-11 = 124.4、OPM-2 = 15.5)。

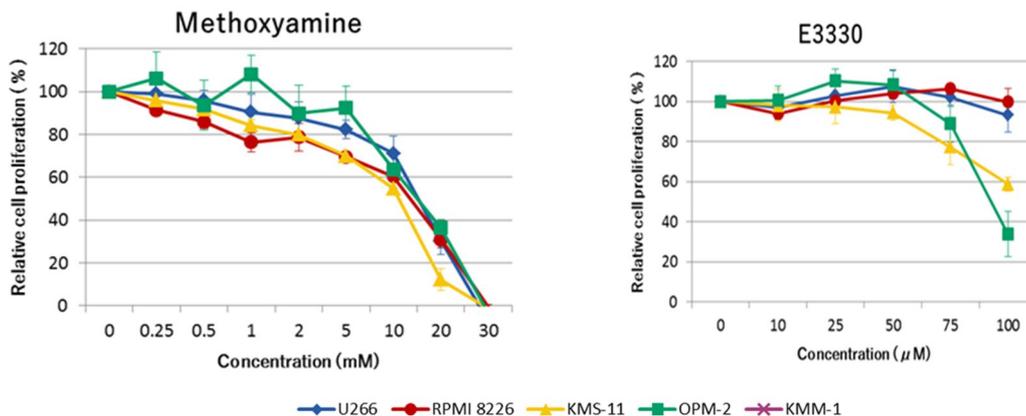


図4 MM細胞株のAPE1阻害剤(MethoxyamineとE3330)の増殖の影響

(考察)

APE1 knockdownにより細胞増殖が抑制された原因として、DNA損傷の増加が主体であると考えられた。しかし、転写因子制御に関与するE3330が一部のMM細胞株で増殖が抑えられたことは、APE1のRef-1活性による転写因子の制御の影響も部分的に関与している可能性も考えられた。今回の研究でDNA修復の塩基除去修復の遺伝子が多発性骨髄腫の治療標的になる可能性が示された。特にAPE1はDNA修復と転写因子を制御する多機能遺伝子で今回の研究ではDNA修復の関与が示唆された。しかしながら、転写因子を制御するAPE1阻害剤の有効性を示すデータもあり、APE1のDNA修復系以外の役割を果たしている可能性もある。現在、多発性骨髄腫の予後は改善されているが殆どの患者は再発する難治性疾患である。DNA修復系の阻害剤により骨髄腫の治療効果改善が期待され、臨床応用につなげる基盤的研究を行った。

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
研究分担者	村上 博和 (MURAKAMI HIROKAZU) (40166260)	群馬大学・その他部局等・特別教授 (12301)	
研究分担者	笠松 哲光 (KASAMATSU TETSUHIRO) (60737542)	群馬大学・大学院保健学研究科・助教 (12301)	
研究分担者	後藤 七海 (GOTOH NANAMI) (80782482)	群馬大学・大学院保健学研究科・助教 (12301)	