

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08342

研究課題名(和文) PBKが骨髄腫の悪性化に寄与する作用機序の解明と治療標的分子としての可能性の検討

研究課題名(英文) Investigation of molecular mechanism by which PBK contributes to tumorigenesis in myeloma cells

研究代表者

太田 明伸(Ota, Akinobu)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：30438048

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)：難治性腫瘍である多発性骨髄腫(以下MM)は、治療成績の向上がみられるものの根治できる治療法は無く、分子病態に基づく新たな治療戦略の構築が望まれている。代表者は、Interleukin-6に誘導される遺伝子の網羅的解析からPBKを見出し、その発現レベルがMM患者の予後不良因子であること、PBKの喪失がMM細胞の造腫瘍性を弱めること、PBKの発現がMM細胞のアポトーシス抵抗性に密接にかかわること、PBK阻害剤がMMの増殖を強力に阻害することを明らかにした。また、分担研究者とともにPBKノックアウトマウスの樹立に成功した。以上より、PBKはMMの新規治療標的分子になる可能性が強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、多発性骨髄腫(以下MM)の発症から悪性化に至る過程に関わる分子機構の解明を目指して行われた。MMは、血液細胞の1種である形質細胞の異常が原因となって起こる。MM細胞はインターロイキン6(IL-6)によって生存・増殖がサポートされる。代表者はこの点に着目して、IL-6の刺激がMM細胞に与える影響を解析した結果、リン酸化酵素PBKの発見に至った。また、PBKの遺伝子量が多いMM患者の生存率は有意に低下すること、PBK遺伝子の欠失はMM腫瘍増殖能の低下をきたすことを発見した。本研究結果は、PBKを標的とした難治性MMに対する新たな分子病態を明らかとしたもので、創薬につながる可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：Multiple myeloma (MM) is a complex plasma cell neoplasm, accounting for approximately 10% of all hematological malignancies. Novel molecular-targeted therapy based on their genomic abnormalities in the patients with MM is really wanted to improve their clinical outcome. In this study, we identified that interleukin-6 readily increases PBK expression. Kaplan-Meier analysis showed that the MM patients with higher expression of PBK have a significant shorter survival time compared with those with moderate/lower expression of PBK. Knockout of PBK dramatically suppressed in vivo tumor growth in MM cells. Mechanistically, loss of PBK increased the number of apoptotic cells with concomitant decrease in the phosphorylation level of Stat3. A novel PBK inhibitor OTS514 significantly decreased KMS-11-derived tumor growth. These findings highlight the novel oncogenic role of PBK in tumor growth of myeloma, and it might be a novel therapeutic target for the treatment of patients with MM.

研究分野：がんの分子生物学

キーワード：多発性骨髄腫 分子標的薬 キナーゼ 造腫瘍性

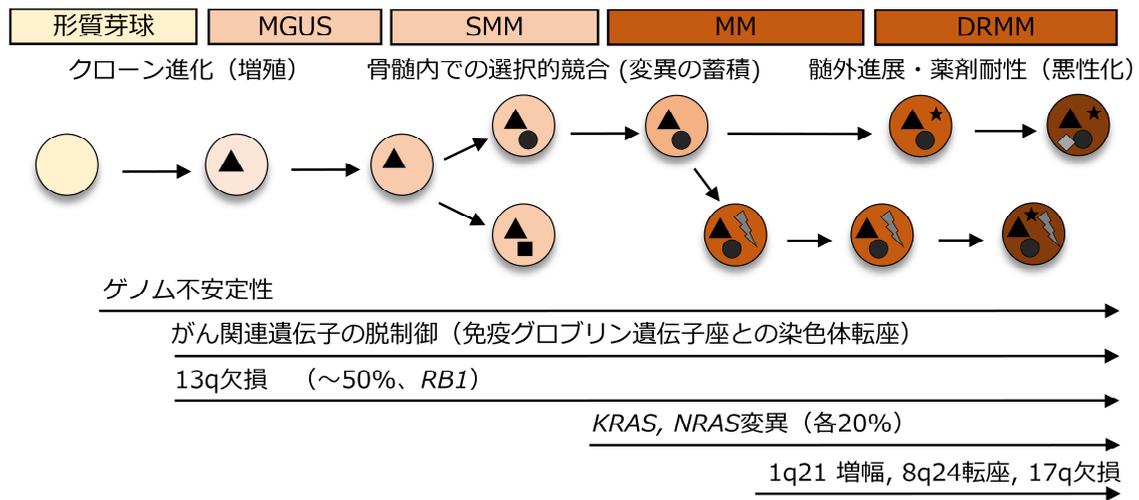
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 疾患の背景

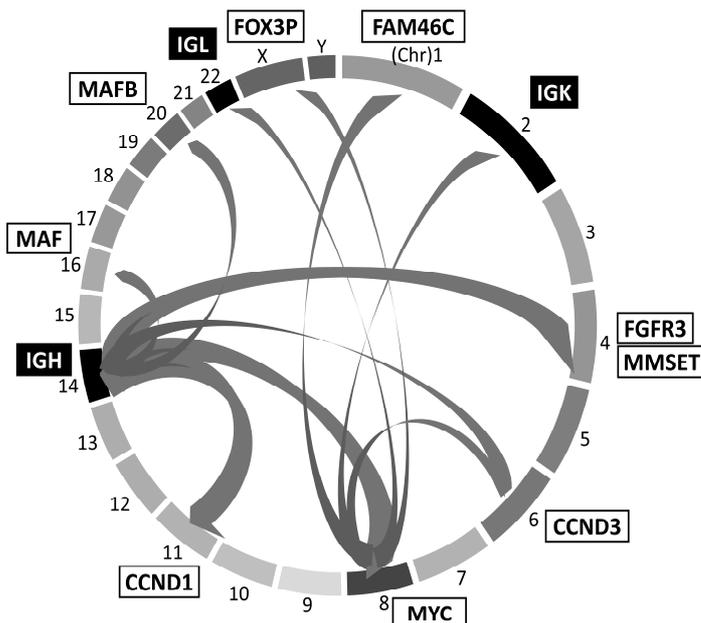
多発性骨髄腫 (Multiple myeloma, 以下 MM) は形質細胞性の血液悪性腫瘍である。本疾患は、同種造血幹細胞移植の有効性が示されていない。ゆえに、化学療法とその治療効果は患者の予後を左右する極めて重要な因子である。実際、MM の臨床症状は多彩であり治療やその効果の予測は難しい。MM は、B 細胞から終末分化した形質細胞 (PC) が悪性形質転換した難治性血液腫瘍である。MM は、軽度の単クローン性 PC 増多症である monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), smoldering MM (くすぶり型 MM; SMM) を経て、段階的に悪性化するものと考えられている (図 1, 文献 1-2)。

図 1. 想定される骨髄腫発症と進展の機序



asymptomatic MM (無症候性 MM) である MGUS や SMM の段階において、骨髄内に存在する MM 細胞には hyperdiploid (高二倍体) や免疫グロブリン遺伝子 - がん遺伝子間の相互染色体転座などのジェネティックな異常が一定の頻度に見られ、これらは MM 発症につながる初期の重要なイベントである (図 2、文献 3-4)。

図 2. MM 患者に関連する染色体転座の図



(2) 骨髄腫とゲノム異常

近年の次世代ゲノムシーケンス (Next generation sequence: NGS) 技術の発展により, MM に見られる平均的な遺伝子異常の数は 1 Megabase (Mb) 当たりおよそ 1.6 個と推定された (文献 5) MGUS や SMM を引き起こす初期のイベントに, 複数のドライバー変異がパッセンジャー変異を伴いながら蓄積し, MM へと進展していくものと思われる。また, 遺伝子解析技術の目覚ましい進展は, 腫瘍内 MM 細胞に見られるゲノム構造の不均一性をも明らかにした。しかしながら, 再発・難治性 MM (DRMM) の病態に関わる分子機構には不明な点が多く, DRMM の根治は難しい。したがって, ゲノム, トランスクリプトーム, エピゲノムなどの統合的な情報と臨床病態・予後との関連性の解析や, それに基づく細胞生物学的な基礎的研究によって MM の悪性化に関わる分子病態を明らかにし, 新たな治療戦略を構築する必要性が高まっている。

### (3) MM の治療

MM の治療戦略に目を向けると, 新規治療薬であるプロテアソーム阻害剤, 免疫調節剤, ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤や抗体医薬の適用によって治療選択の幅は大きく広がった。しかし, 完全寛解に至る例は依然として少なく, 薬剤耐性を有する DRMM へと進展する。発症期から薬剤耐性化までに観察される様々な異常の中で, MM の悪性化に真に重要な因子は未だに明らかとなっていない。発症初期には, 免疫グロブリン遺伝子座における染色体転座, 染色体 13 番におけるゲノム欠失, 高 2 倍体, *TP53* や *NRAS* 遺伝子変異が観察される。さらに, 進行期には Interleukin-6 (IL-6) と骨髄微小環境との相互作用や薬剤ストレス応答の関与が示唆されている (文献 6)。

### (4) 研究開始前までの経過

代表者は, 科研費若手 (B) 15K19561 において, インターロイキン-6 (以下 IL-6) 依存性 MM 細胞株 ANBL-6 および FLAM-76 を用いて, IL-6 によって発現が誘導される遺伝子の同定を試みた。代表者は, 発現誘導比率が上位 20 位までの遺伝子の中から, MM 患者の新しい予後不良因子として PDZ binding kinase を発見した。

## 2. 研究の目的

そこで代表者は, MM 細胞の生存・増殖経路への PBK の関与を明らかにするために, ゲノム編集技術を用いて生化学的, 分子生物学的な解析をおこなった。また, PBK に対する阻害剤を用いて, PBK が MM の新たな治療標的になりうるのかを検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養

ヒト骨髄腫細胞株 (KMS-11, RPMI8226, KMM1 と FLAM-76) は国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンクより入手した。また, IL-6 依存性細胞株である ANBL-6 は, Dr. Diane F. Jelinek 氏 (Mayo Clinic) より供与された。ANBL-6 は 20% 血清, 抗生物質 (ペニシリン・ストレプトマイシン, 和光純薬) および IL-6 (5 ng/mL, R&D systems) を含む RPMI 1640 培地を用いて維持・継代した。その他の細胞株の維持・継代には, 10% 血清と抗生物質を含む RPMI 1640 培地を用いた。

### (2) cDNA マイクロアレイ解析

IL-6 依存性の MM 細胞株 (ANBL-6 および FLAM-76) を用いて, IL-6 を欠乏した培地で 48 時間培養し, その後 IL-6 を添加して 0, 6, 12, 24 時間培養した。経時的に細胞から NucleoSpin RNA (TaKaRa Bio) を用いてトータル RNA を精製した。各群のトータル RNA を 200 ng ずつ用いて, Agilent Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies Inc.) の手順どおりに蛍光ラベル化 cRNA を作成した。このラベル化した cRNA を Whole Human Genome DNA マイクロアレイ 4x44K v2 (Agilent Technologies) にハイブリダイゼーションした。洗浄後, 専用のスキャナーで蛍光とその強度を読み取った。

### (3) ゲノム編集

組み換え DNA 実験については, 当大学の組換え DNA 実験安全委員会において 2016 年度に承認を得た (承認番号: 16-2-2) Addgene 社をとおして, Dr. Feng Zhang より, pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) および lentiCRISPR v2 ベクターを入手した。CRISPR/Cas9 システムは, 過去の論文のとおり標的配列をデザインし, ベクターを構築した (文献 7-8)。PBK に対する single guide RNA (以下 sgRNA) の候補配列は, Optimized CRISPR Design (<http://crispr.mit.edu/>) に標的配列を入力し, オフターゲット作用の低い配列を選抜した。PBK の Exon-3 および Exon-5 に対して, それぞれ 5' - GAGGCCGGGATATTTATAGT (Exon 3) 5' - CGCTATCTGAGCAGCGCTCA (Exon-5) の sgRNA を選抜し, 各プラスミドに挿入した。KMS-11 細胞に対しては, レンチウイルスを用いて, OCI-My5 に対しては Nucleofection 法 (Lonza Japan) を用いて遺伝子導入をおこなった。その後, シングルセルクローニング法を用いて遺伝子破壊または遺伝子改変細胞を樹立した。

### (4) ウェスタンブロット (WB) 解析

WB 解析は従来から行ってきた方法に基づいて行った (文献 10)。細胞または腫瘍組織に対して

可溶化緩衝液 (RIPA buffer, 和光純薬) を加え細胞溶解液を得た。遠心後に上清を回収しポリ  
アクリルアミド電気泳動法と WB 解析をおこなった。

#### (5) 細胞増殖アッセイ

骨髄腫細胞を  $1 \times 10^4$  cells/well となるように 96 穴プレートに巻き込み、細胞培養をおこ  
なった。72 時間後に、Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) 試薬 (SIGMA) を加え、翌  
日まで 37 °C でインキュベーションした。SpectraMAX M5 分光光度計 (Molecular Devices,  
Sunnyvale, CA, USA) を用いて 545 nm の吸光度を測定した。

#### (6) コロニー形成能試験

KMS-11 細胞を 200 個/well となるように 6-well plate に巻き込み 14 日間培養した。培養後  
に、グルタルアルデヒドで細胞を固定しクリスタルバイオレット (SIGMA) を用いて染色をおこ  
なった。写真を撮影してコロニー数をカウントした。

#### (7) アポトーシスの解析

骨髄腫細胞を  $1 \times 10^5$  cells/well となるように 6 穴プレートに巻き込み、細胞培養をおこな  
った。48 時間後に、細胞を回収して Annexin V-FITC (MBL, Nagoya, Japan) と propidium iodide  
(PI, 10  $\mu$ g/mL) を添加して室温で 10 分静置した。その後、FACSCantoII (BD, Franklin Lakes,  
NJ, USA) を用いて。解析をおこなった。

#### (8) Xenograft 実験

雌の 6~8 週齢の SCID マウス (C.B-17/1cr-scid/scidJcl mice, 日本クレア) を用いて、ヒ  
ト MM 細胞株を皮下移植する異種移植 (Xenograft) 実験を行った。本実験は当大学動物実験委員  
会への承認を得ている (2017-62)。KMS-11 または OPM-2 細胞 ( $2 \times 10^7$  個/マウス) をマウス  
背部の皮下へ移植した。腫瘍径と体積は、定法に従って長径  $\times$  (短径)<sup>2</sup> の計算式を用いて求め  
た。マウスへの苦痛軽減のために、腫瘍体積がマウス体重の 10% を超えた時点で、推奨される  
手法を用いて安楽死の処置を行った。

#### (9) 統計解析

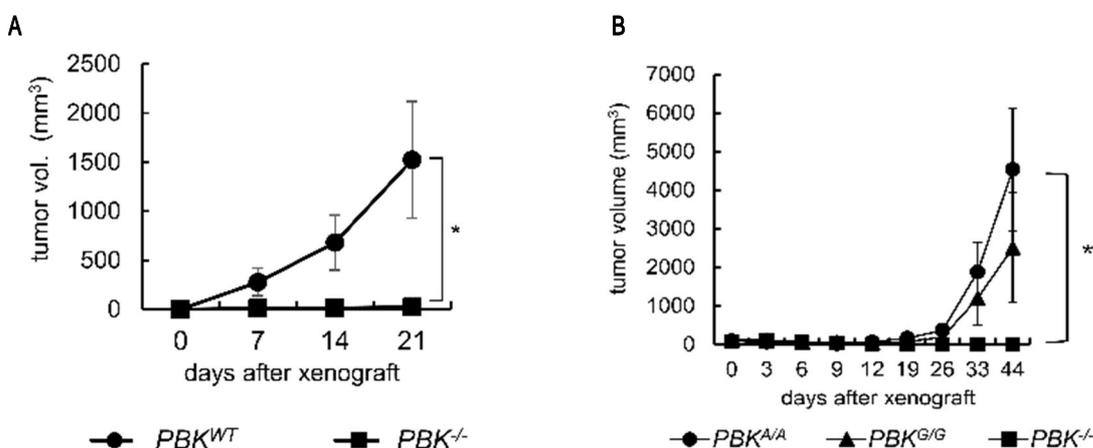
実験結果は、平均値  $\pm$  SE (標準誤差) で表した。統計学的有意差の検定には、Student の t-  
test を用いた。統計解析は、SPSS 23.0 program (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA) と EZR  
(Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan) を用いた (文献 11)。

### 4. 研究成果

#### (1) PBK 発現と造腫瘍性について

cDNA マイクロアレイを用いた解析では、IL-6 刺激により、IL-6 依存性 MM 細胞株 ANBL-6 と  
FLAM-76 において、PBK の遺伝子発現レベルが有意に増加した。ウエスタンブロット解析におい  
ても、IL-6 非依存性 MM 細胞株において PBK タンパク質を検出した (GSE115558 にてデータ公開  
中)。次に、公共データベースから、MM 患者の遺伝子発現データ (GSE19784, N = 290) を入手  
して、MM 細胞株 KMS-11 と RPMI8226 を用いて、IL-6 signal transducer (CD130/IL6ST) の発現  
が、PBK と関連するかどうかを検討した結果、PBK と CD130/IL6ST の発現の間には、大きな相関  
は認められなかったが、複数のプローブで軽微な負の相関 ( $P = 0.03, 0.049$ ) が認められた。  
次に、MM 細胞株 KMS-11 から PBK 破壊細胞 ( $PBK^{-/-}$ ) を、OCI-My5 を用いて PBK の遺伝子多型  
rs3779620 バリエントをノックインした  $PBK^{N107}$ ,  $PBK^{N107S}$  各クローンと  $PBK^{-/-}$  クローンを樹  
立した。樹立した細胞を免疫不全マウスに移植して造腫瘍性を解析した結果、KMS-11, OCI-Ly5  
細胞共に野生型 PBK を発現するクローンに比べ  $PBK^{-/-}$  クローンでは、腫瘍の増生が著しく低下し  
た。 $PBK^{N107}$ ,  $PBK^{N107S}$  では、 $PBK^{N107}$  クローンの方が腫瘍体積が大きい傾向にあったが、有意差はな  
かった (図 3)。

図 3 Xenograft 試験 (A.KMS-11 B.OCI-My5)



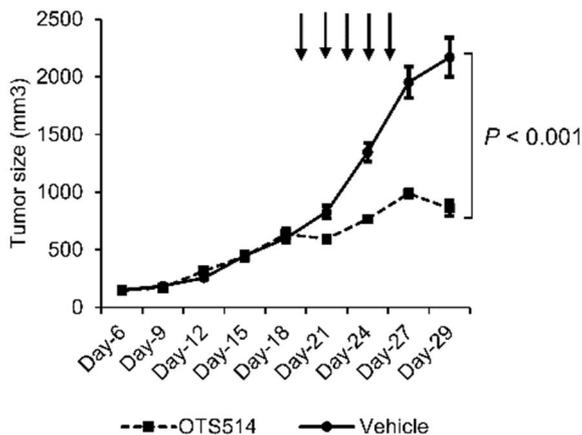
( 2 ) PBK 発現と細胞死について

次に、各クローンにおける細胞死の割合を比較したところ、KMS-11 と RPMI8226 より樹立した *PBK*<sup>-/-</sup>クローンにおいて、AnnexinV/PI 陽性細胞数の割合が有意に増加した。さらに、RPMI8226 と OCI-My5 由来の *PBK*<sup>-/-</sup>クローンにおいて、Caspase-3/7 活性の有意な増加を認めた。

( 3 ) PBK 阻害剤の抗腫瘍効果について

KMS-11 を免疫不全マウスに異種移植し、PBK 阻害剤 OTS514 の抗腫瘍効果を検証した。その結果、OTS514 の腹腔内投与によって、腫瘍体積が有意に減少した。また、治療によって軽微な体重減少が認められたものの、対照群に比べて有意な差はなかった。以上の結果から、OTS514 は MM の新規治療薬として有望である可能性が示唆された。

図 4. OTS514 投与による抗腫瘍効果の解析 (Xenograft 試験)



( 3 ) PBK-KO マウスの樹立について

CRISPR/Cas9 法によって、受精卵に PBK 破壊の処置を施した。移植後に得られた産仔から、遺伝子型の解析を行った結果、PBK-KO マウスを 2 系統得た。PBK の発現は、正常個体では精巣に局限される (NCBI GENE 参照)。そこで、精巣組織からタンパク質を得て、ウエスタンブロット法を行うと、PBK に相当するシグナルが PBK-KO マウス由来の精巣では消失していた。DNA 塩基配列の解析から、*Pbk*-KO マウスの *Pbk* 遺伝子座のゲノム欠失を確認した。驚くべきことに、樹立したノックアウトマウスには、目立った表現型がなく、精巣における *Pbk* の欠失は産仔数など繁殖に影響を与えなかった。

[参考文献]

- 1) Kuehl W, et al. Nat Rev Cancer. 2:175-187. 2002.
- 2) Bergsagel P, et al. J Clin Oncol. 23:6333-8, 2005.
- 3) 古川 雄佑, 他. Phama Medica, 33:9-13, 2015.
- 4) 花村 一郎, 他. Int J Myeloma. 3: 35-46, 2013.
- 5) Alexandrov L, et al. Nature. 500: 415-21, 2013.
- 6) 太田 明伸, 他. BioClinica. 34:648-54, 2019.
- 7) Sanjana NE, et al. Nat Methods. 11:783-84, 2014.
- 8) Ran FA, et al. Nat Protoc. 8:2281-308, 2013.
- 9) Ota A, et al. J Cell Sci, 130:614-25, 2017.
- 10) Takahashi M, et al. Cancer Sci. 104:165-70, 2013.
- 11) Kanda Y. 2013. BM Transplant. 48:452-58, 2013.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 9件）

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>太田 明伸, 花村 一朗                 | 4. 巻<br>34(6)         |
| 2. 論文標題<br>多発性骨髄腫の進展に関わる分子機構とPBKの関与    | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>BIO Clinica                  | 6. 最初と最後の頁<br>86 - 92 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし         | 査読の有無<br>無            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

|   |                    |
|---|--------------------|
| 1. 著者名<br>太田 明伸, 細川好孝                   | 4. 巻<br>45(9)      |
| 2. 論文標題<br>ゲノム編集法を用いた骨髄腫の悪性化に関わる分子機構の解析 | 5. 発行年<br>2019年    |
| 3. 雑誌名<br>Medical Science Digest        | 6. 最初と最後の頁<br>8-11 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし          | 査読の有無<br>無         |
| オープンアクセス<br>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<br>-          |

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>太田明伸, 花村一朗, 細川好孝                  | 4. 巻<br>34(13)      |
| 2. 論文標題<br>多発性骨髄腫におけるPBK 発現の意義と 治療標的としての可能性 | 5. 発行年<br>2019年     |
| 3. 雑誌名<br>BIO Clinica                       | 6. 最初と最後の頁<br>65-69 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし              | 査読の有無<br>無          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Li Y, Iida H, Kimata K, Zhuo L, Ota A, Kimura S, Yin X, Deie M, Ushida T.   | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>Establishment of a mouse model for injury-induced scar formation and the accompanying chronic pain: Comprehensive microarray analysis of molecular expressions in fibrosis and hyperalgesia. | 5. 発行年<br>2019年 |
| 3. 雑誌名<br>Molecular Pain  | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1177/1744806919892389  | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Wahiduzzaman M, Ota A, Hosokawa Y.  | 4. 巻<br>20(2)         |
| 2. 論文標題<br>Novel mechanistic insights into the anti-cancer mode of arsenic trioxide | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>Current Cancer Drug Targets   | 6. 最初と最後の頁<br>115-129 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.2174/1568009619666191021122006                       | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Hyodo T, Rahman ML, Karnan S, Ito T, Toyoda A, Ota A, Wahiduzzaman M, Tsuzuki S, Okada Y, Hosokawa Y, Konishi H | 4. 巻<br>30(4)           |
| 2. 論文標題<br>Tandem Paired Nicking Promotes Precise Genome Editing with Scarce Interference by p53                          | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Cell Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>1195-1207 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.celrep.2019.12.064  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Kondo S, Ota A, Ono T, Karnan S, Wahiduzzaman M, Hyodo T, Lutfur Rahman M, Ito K, Furuhashi A, Hayashi T, Konishi H, Tsuzuki S, Hosokawa Y, Kazaoka Y | 4. 巻<br>9(8)            |
| 2. 論文標題<br>Discovery of novel molecular characteristics and cellular biological properties in ameloblastoma   | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Cancer Medicine   | 6. 最初と最後の頁<br>2904-2917 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/cam4.2931   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>Kanasugi J, Hanamura I, Ota A, Karnan S, Vu LQ, Mizuno S, Wahiduzzaman M, Rahman ML, Hyodo T, Konishi H, Tsuzuki S, Hosokawa Y, Takami A | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>Bi-allelic loss of FAM46C triggers tumor growth with concomitant activation of Akt signaling in multiple myeloma cells                  | 5. 発行年<br>2020年 |
| 3. 雑誌名<br>Cancer Science   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/cas.14386  | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>Maenaka A, Kenta I, Ota A, Miwa Y, Ohashi W, Horimi K, Matsuoka Y, Ohnishi M, Uchida K, Kobayashi T                                  | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>Interferon- $\gamma$ -induced HLA Class II expression on endothelial cells is decreased by inhibition of mTOR and HMG-CoA reductase | 5. 発行年<br>2020年 |
| 3. 雑誌名<br>FEBS Open Bio  | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/2211-5463.12854  | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>太田明伸、花村一朗                    | 4. 巻<br>451         |
| 2. 論文標題<br>多発性骨髄腫の進展に関わる分子機構とPBKの関与    | 5. 発行年<br>2019年     |
| 3. 雑誌名<br>BIO Clinica                  | 6. 最初と最後の頁<br>86-92 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし         | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Mizuno S, Hanamura I, Ota Akinobu, Karnan S, Kanasugi J, Nakamura A, Takasugi S, Uchino Ki, Horio T, Goto, Murakami S, Gotou M, Yamamoto H, Watarai M, Shikami M, Hosokawa Y, Miwa H, Taniwaki M, Ueda R, Nitta M, Takami A | 4. 巻<br>8                 |
| 2. 論文標題<br>Establishment and characterization of a novel vincristine-resistant diffuse large B-cell lymphoma cell line containing the 8q24 homogeneously staining region  | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>FEBS Open Bio   | 6. 最初と最後の頁<br>1977 ~ 1991 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/2211-5463.12538   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Wahiduzzaman Md, Karnan Sivasundaram, Ota Akinobu, Hanamura Ichiro, Murakami Hideki, Inoko Akihito, Rahman Md Lutfur, Hyodo Toshinori, Konishi Hiroyuki, Tsuzuki Shinobu, Hosokawa Yoshitaka   | 4. 巻<br>110           |
| 2. 論文標題<br>Establishment and characterization of CRISPR/Cas9-mediated NF2(-/-) human mesothelial cell line: Molecular insight into fibroblast growth factor receptor 2 in malignant pleural mesothelioma | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>Cancer Science   | 6. 最初と最後の頁<br>180-193 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/cas.13871  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

|   |                             |
|---|-----------------------------|
| 1. 著者名<br>Tezuka Takehiko, Ota Akinobu, Karnan Sivasundaram, Matsuura Katsuhiko, Yokoo Kazuhisa, Hosokawa Yoshitaka, Vigetti Davide, Passi Alberto, Hatano Sonoko, Umezawa Kazuo, Watanabe Hideto | 4. 巻<br>293                 |
| 2. 論文標題<br>The plant alkaloid conophylline inhibits matrix formation of fibroblasts   | 5. 発行年<br>2018年             |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Biological Chemistry   | 6. 最初と最後の頁<br>20214 ~ 20226 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1074/jbc.RA118.005783  | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する                |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Takao Akiko, Yoshikawa Kazuhiro, Karnan Sivasundaram, Ota Akinobu, Uemura Hirotosugu, De Velasco Marco, Kura Yurie, Suzuki Susumu, Ueda Ryuzo, Nishino Tokiko, Hosokawa Yoshitaka | 4. 巻<br>40              |
| 2. 論文標題<br>Generation of PTEN-knockout (-/-) murine prostate cancer cells using the CRISPR/Cas9 system and comprehensive gene expression profiling  | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>Oncology Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>2455-2466 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3892/or.2018.6683  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Wahiduzzaman Md, Ota Akinobu, Karnan Sivasundaram, Hanamura Ichiro, Mizuno Shohei, Kanasugi Jo, Rahman Md Lutfur, Hyodo Toshinori, Konishi Hiroyuki, Tsuzuki Shinobu, Takami Akiyoshi, Hosokawa Yoshitaka | 4. 巻<br>433             |
| 2. 論文標題<br>Novel combined Ato-C treatment synergistically suppresses proliferation of Bcr-Abl-positive leukemic cells in vitro and in vivo  | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>Cancer Letters  | 6. 最初と最後の頁<br>117 ~ 130 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.canlet.2018.06.027  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Kitamoto Kazumasa, Miura Yuji, Karnan Sivasundaram, Ota Akinobu, Konishi Hiroyuki, Hosokawa Yoshitaka, Sato Keiji           | 4. 巻<br>15              |
| 2. 論文標題<br>Inhibition of NADPH oxidase 2 induces apoptosis in osteosarcoma: The role of reactive oxygen species in cell proliferation | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>Oncology Letters  | 6. 最初と最後の頁<br>7955-7962 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3892/ol.2018.8291  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Hatano Sonoko, Nagai Naoko, Sugiura Nobuo, Tsuchimoto Jun, Isogai Zenzo, Kimata Koji, Ota Akinobu, Karnan Sivasundaram, Hosokawa Yoshitaka, Watanabe Hideto | 4. 巻<br>59              |
| 2. 論文標題<br>Versican A-subdomain is required for its adequate function in dermal development   | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>Connective Tissue Research  | 6. 最初と最後の頁<br>178 ~ 190 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1080/03008207.2017.1324432   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>太田明伸、花村一郎、Karnan Sivasundaram、高見昭良、細川好孝          |
| 2. 発表標題<br>骨髄腫細胞におけるPBZ binding kinaseの腫瘍促進作用と治療標的分子としての可能性 |
| 3. 学会等名<br>第44回日本骨髄腫学会学術総会                                  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Jo Kanasugi, Ichiro Hanamura, Akinobu Ota, Sivasundaram Karnan, Lam Quang Vu, Yoshitaka Hosokawa, Akiyoshi Takami                 |
| 2. 発表標題<br>Biallelic Loss of FAM46C Promotes the Proliferation of Multiple Myeloma Cells with Concomitant Upregulation of P13K-AKT Signaling |
| 3. 学会等名<br>第10回日本血液学会 (JSH) 国際シンポジウム   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>兵頭寿典、Md Lutfur Rahman、豊田敦、Sivasundaram Karnan、太田明伸、都築忍、細川好孝、小西裕之 |
| 2. 発表標題<br>CRISPR/Cas9 nickase によるサイレント変異不要のノックイン                           |
| 3. 学会等名<br>第4回日本ゲノム編集学会   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>兵頭寿典、Md Lutfur Rahman、Sivasundaram Karnan、太田明伸、都築忍、細川好孝、小西裕之 |
| 2. 発表標題<br>CRISPR/Cas9 nickaseによるノックインはp53を活性化しない                       |
| 3. 学会等名<br>第4回日本ゲノム編集学会   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Md Lutfur Rahman, Toshinori Hyodo, Sivasundaram Karnan, Akinobu Ota, Shinobu Tsuzuki, Yoshitaka Hosokawa, Hiroyuki Konishi |
| 2. 発表標題<br>Experimental conditions permitting efficient targeted knock-in using CRISPR/Cas9 nickase                                   |
| 3. 学会等名<br>第4回日本ゲノム編集学会   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Sivasundaram Karnan, Akinobu ota, Ichiro Hanamura, Hideki Murakami, Toshinori Hyodo, Wahiduzzanan Md, Hiroyuki Konishi, Shinobu Tsuzuki, Yoshitaka Hosokawa |
| 2. 発表標題<br>CRISPRCas9を用いたNF2及びCDKN2Aノックアウトヒト中皮腫細胞株の樹立と分子生物学的解析   |
| 3. 学会等名<br>第92回日本生化学会大会  |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>シバスダラン カルナン、太田明伸、花村一朗、村上秀樹、兵頭寿典、小西裕之、都築忍、細川好孝 |
| 2. 発表標題<br>p16/NF2遺伝子の欠損により発現の誘導される悪性中皮腫特異的分子の同定         |
| 3. 学会等名<br>第78回日本癌学会学術総会                                 |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名  |
| Aki Yanagi, Naohiro Tsuyama, Misaki Sugai, Yu Abe, Yukari Yanai, Akinobu Ota, Karnan Sivasundaram, Lobna Alkebsi, Moe Muramatsu, Tomonari Shigemura, Megumi Sasatani, Yuko Hashimoto, Kenji Kamiya, Ichiro Hanamura, Takayuki Ikezoe, Masafumi Onodera, Akira Sakai. |
| 2. 発表標題  |
| Chromosomal translocation t(11;14) and p53 deletion in B cell-derived iPS cells by CRISPR/Cas9   |
| 3. 学会等名  |
| 第81回日本血液学会学術集会   |
| 4. 発表年   |
| 2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名   |
| Toshinori Hyodo, Md Lutfur Rahman, Atsushi Toyoda, Sivasundaram Karnan, Akinobu Ota, Shinobu Tuzuki, Yoshitaka Hosokawa, Hiroyuki Konishi |
| 2. 発表標題   |
| Tandem paired nicking using Cas9 nickases permits targeted knock-in without significant inhibition by p53                                 |
| 3. 学会等名   |
| Frontiers in Genome Engineering 2019 (国際学会)   |
| 4. 発表年  |
| 2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名  |
| 兵頭寿典、Md Lutfur Rahman、豊田敦、Sivasundaram Karnan、太田明伸、都築忍、細川好孝、小西裕之                         |
| 2. 発表標題  |
| DNA二重鎖切断を介さない変異ノックイン法 (Targeted knock-in without introducing double-stranded DNA breaks) |
| 3. 学会等名  |
| 第42回日本分子生物学会年会   |
| 4. 発表年   |
| 2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名  |
| Yanagi A, Tsuyama N, Sugai M, Abe Y, Azami Y, Yanai Y, Ota A, Sivasundaram K, Muramatsu M, Shigemura T, Sasatani M, Hashimoto Y, Kamiya K, Hanamura I, Ikezoe T, Onodera M, Sakai A. |
| 2. 発表標題  |
| Introduction of Chromosomal Translocation t(11; 14) and a p53 Deletion into Normal B Cell-derived iPSCs to Elucidate the Cellular Origin of Myeloma Cells.                           |
| 3. 学会等名  |
| 61th ASH Annual Meeting (国際学会)   |
| 4. 発表年   |
| 2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>S.Kondo, A.Ota, T.Ono, S.Karnan, M.Wahiduzzaman, T.Hyodo, M.L.Rahman, K.Ito, A.Furuhashi, T.Hayashi, H.Konishi, S.Tuzuki, Y.Hosokawa, Y.Kazaoka |
| 2. 発表標題<br>Identification of Genome-wide Molecular Characteristics in Ameloblastoma:Role of Tlr2 in Ameloblastoma Cells                                    |
| 3. 学会等名<br>ASCB/EMBO 2019 Meeting (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>太田明伸, 花村一朗, KARNAN Sivasundaram, 高見昭良, 細川好孝 |
| 2. 発表標題<br>骨髄腫細胞のレナリドマイド耐性に関連する付加的ゲノム異常と遺伝子発現変化の基礎的検討  |
| 3. 学会等名<br>第43回日本骨髄腫学会                                 |
| 4. 発表年<br>2018年～2019年                                  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>太田明伸, 花村一朗, KARNAN Sivasundaram, 高見昭良, 細川好孝   |
| 2. 発表標題<br>Role of PBK in multiple myeloma cell growth: implication of PBK in novel molecular targets for anti-myeloma therapy |
| 3. 学会等名<br>第44回日本骨髄腫学会   |
| 4. 発表年<br>2019年～2020年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>太田明伸, 花村一朗, シバスングラン カルナン、小西裕之、都築忍、細川好孝 |
| 2. 発表標題<br>多発性骨髄腫の腫瘍増殖におけるPDZ binding kinaseの関与   |
| 3. 学会等名<br>第77回日本癌学会学術総会                          |
| 4. 発表年<br>2018年～2019年                             |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>太田明伸、山地 雅之、ワヒドゥジャマン ムハマド、シバズングラン カルナン、兵頭 寿典、小西 裕之、都築 忍、羽生田 正行、細川 好孝 |
| 2. 発表標題<br>悪性中皮腫細胞の増殖を特異的に抑制するAkt阻害剤の探索と同定                                     |
| 3. 学会等名<br>第91回日本生化学会大会  |
| 4. 発表年<br>2018年～2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>シバズングラン カルナン、太田明伸、花村一朗、村上秀樹、ムハマド ワヒドゥジャマン、兵頭寿典、小西裕之、都築忍、細川好孝 |
| 2. 発表標題<br>P16/NF2 遺伝子の欠損により発現の誘導される悪性中皮腫特異的分子の同定                       |
| 3. 学会等名<br>第77回日本癌学会学術総会  |
| 4. 発表年<br>2018年～2019年   |

〔図書〕 計1件

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>Ota Akinobu, Wahiduzzaman Md, Hosokawa Yoshitaka   | 4. 発行年<br>2018年 |
| 2. 出版社<br>IntechOpen   | 5. 総ページ数<br>22  |
| 3. 書名<br>Current Understanding of Apoptosis: Arsenic-Based Anticancer-Combined Therapy: Novel Mechanism Inducing Apoptosis of Cancer Cells |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|           | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                    | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)             | 備考 |
|-----------|--|-----------------------------------|----|
| 研究<br>分担者 | 武井 則雄<br><br>(Norio Takei)<br><br>(50523461) | 北海道大学・医学研究院・助教<br><br><br>(10101) |    |

## 6. 研究組織（つづき）

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                    | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)            | 備考 |
|-------|--|----------------------------------|----|
| 研究分担者 | 花村 一郎<br>(Hanamura Ichiro)<br><br>(70440740) | 愛知医科大学・医学部・教授<br><br><br>(33920) |    |

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                               | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|-------|---|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 稲熊 真吾<br>(Inaguma Shingo)<br><br>(80410786)             |                       |    |
| 研究協力者 | カルナン シバスンダラン<br>(Karnan Sivasundaram)<br><br>(30557096) |                       |    |
| 研究協力者 | 兵頭 寿典<br>(Hyodo Toshinori)<br><br>(40710645)            |                       |    |
| 研究協力者 | 都築 忍<br>(Tsuzuki Shinobu)<br><br>(00342965)             |                       |    |
| 研究協力者 | 小西 裕之<br>(Konishi Hiroyuki)<br><br>(20344335)           |                       |    |
| 研究協力者 | 細川 好孝<br>(Hosokawa Yoshitaka)<br><br>(60229193)         |                       |    |

## 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 |
|---------|---------|
|---------|---------|