

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16118

研究課題名（和文）骨髄腫細胞のメタボリックシフトに及ぼすHDAC1/3の役割と新規治療戦略の創出

研究課題名（英文）Roles of HDAC1/3 effecting on metabolic shift in myeloma cells; Development of a novel treatment strategy targeting metabolic shift

研究代表者

原田 武志（HARADA, Takeshi）

徳島大学・病院・特任助教

研究者番号：10618359

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、多発性骨髄腫におけるクラスI ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）の治療標的としての意義を検討した。骨髄腫細胞において、未治療群またはHDAC3抑制群と比較して、HDAC1抑制では、骨髄腫細胞の生存増殖においてマスター転写因子IRF4と代謝調節因子PIM2の発現低下に繋がることを明らかにした。PIM2の構成的な発現にはHDAC1-IRF4経路が重要であること、腫瘍微小環境からの外的因子により、内在的経路とは別にPIM2は一層発現を高めること、これらの制御機構を標的とするクラスI HDAC阻害薬とPIM阻害薬の併用療法がin vitroおよびin vivoで有効であることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HDACは遺伝子発現抑制に働くエピゲノム因子として知られているが、骨髄腫細胞では、HDAC1が高発現しているにも関わらず、腫瘍では種々の遺伝子が高発現している。本研究では、骨髄腫細胞でHDAC1によるIRF4およびPIM2の発現維持機構の一端を解明し、HDAC1による遺伝子発現制御に関する新たな知見を提唱した点に学術的意義がある。また、骨髄腫に対するクラスI HDACとPIMを標的とする併用療法の開発を行い、HDACアイソフォームの役割を明らかにしながらメタボリックシフトを標的とする治療法の開発に繋がった本研究は、他の悪性疾患にも応用可能な研究であり、社会的意義を有すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We here investigated the biological significance of class-I histone deacetylases (HDACs), especially HDAC1 and HDAC3 in multiple myeloma (MM). We first revealed the downregulation of IRF4 and PIM2, which are the master transcription factor and the regulator of tumor metabolism, respectively, in the HDAC1-knockdown MM cells compared to control cells or HDAC3-knockdown cells. In addition, we delineated the mechanisms of constitutively high expression of PIM2 by the intrinsic HDAC1-IRF4 axis in MM cells. Furthermore, PIM2 was upregulated by the extrinsic myeloma-related microenvironmental factor such as IL-6. Finally, we developed the novel treatment strategy of combination of class-I HDAC inhibitor MS-275 with the PIM inhibitor SMI-16a in vitro and in vivo analysis. Taken together, our findings suggested that MM cell metabolism is regulated by PIM2, which are governed by the HDAC1-IRF4 intrinsic pathway and the myeloma niche-related extrinsic one.

研究分野：血液内科学

キーワード：血液腫瘍学 腫瘍メタボリズム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腫瘍細胞には、腫瘍特異的な代謝様態の変化(メタボリックシフト)が生じており、正常細胞と比較して自律的および微小環境からの外的作用による細胞分裂が加速している。腫瘍細胞で起こっているメタボリックシフトを統治する制御機構を標的とする治療法の開発は、新たな治療戦略の可能性を有している。多発性骨髄腫(multiple myeloma: MM)は、B細胞の終末分化段階である形質細胞由来の造血器悪性疾患であり、骨髄間質細胞や破骨細胞と相互作用しながら、腫瘍の増殖進展に好都合な微小環境(骨髄腫ニッチ)を形成しながら治療抵抗性を獲得する難治性疾患である。ニッチ因子である IL-6 は、MM 細胞の生存増殖を一層加速させる作用を引き起こすことから、MM 細胞は骨髄腫ニッチでメタボリックシフトが起こっていると考えられる。

これまでに我々は、セリンスレオニンキナーゼ PIM2 が MM 細胞の生存増殖や骨髄腫ニッチの形成に重要な破骨細胞の活性化において枢軸的役割を担っていることを明らかにしてきた。他の悪性疾患と比較して、MM 細胞では PIM2 が高発現している上に、IL-6 でさらに発現が増強されることから、MM 細胞のメタボリックシフトの調節因子と考えられる。しかしながら、PIM2 の高発現がどのように MM 細胞で維持されているかについては明らかにされていない。

エピゲノム因子であるヒストン脱アセチル化酵素(histone deacetylase: HDAC)は MM に対する治療標的として魅力的であり、既に汎 HDAC 阻害薬が臨床応用されている。しかしながら、HDAC には複数のアイソフォームがあり、広範な HDAC 阻害による副作用も問題視されている。このような問題点を克服するために、我々は HDAC アイソフォームの役割について検討し、その中でクラス I および II HDAC が MM 細胞の治療標的として有用であることを見出してきた。本研究では、メタボリックシフトの枢軸的因子 PIM2 の発現制御機構の同定とメタボリックシフトを標的とする新規治療法の開発を中心に検討を進めた。

2. 研究の目的

本研究では、MM 細胞におけるメタボリックシフトの枢軸的因子 PIM2 の発現制御機構を明らかにし、エピゲノムの観点から腫瘍メタボリズムを標的とする新規治療法の開発を目的とした。そのために、研究代表者は、MM 細胞での HDAC1 と HDAC3 の遺伝子発現制御の相違点を抽出しながら、HDAC が関与する MM 細胞に特異的な制御機構を同定し、その制御機構を標的とする新規治療戦略の創出を試みた。

3. 研究の方法

遺伝子発現抑制/過剰発現: 本研究では shRNA レンチウイルスベクターシステム、MSCV レトロウイルスベクターシステムを用いた。レンチウイルスは、293T 細胞に pCMV-dvpr、VSV-G、pLKO.1 プラスミドをトランスフェクションすることで作製した。レトロウイルスでは、pMD-MLV、VSV-G、pMSCV プラスミドを用いた。MM 細胞株にウイルスベクターを導入し、薬剤選択した後、各遺伝子の発現が抑制/過剰発現していることを確認しながら、それぞれの実験に使用した。

RNA シークエンス(RNA-Seq)解析: MM 細胞株から抽出した DNase 処理後の全 RNA を、クオリティチェックし、ライブラリ作製後、HiSeq 2000 を用いて 50 bp シングルリードでシーケンスを行った。得られたシーケンシングリードはヒトゲノムリファレンス配列(GRCh37/hg19)にマップピングし、遺伝子発現量解析は DESeq を用いて行った。

クロマチン免疫沈降(ChIP)-qPCR 解析: 各実験条件下で処理した MM 細胞株を、1%ホルムアルデヒドを含む PBS で室温固定し、MNase によってクロマチン断片化を行い、超音波破砕機で核抽出液を回収した。クロマチン断片化を確認後、核抽出液と抗体を反応させ、磁気ビーズを用いて洗浄し、熱処理による脱クロスリンクを行った。ChIP アッセイにより得られたサンプルは、real time PCR (qPCR) で定量化した。PCR に使用するプライマーは転写開始点を基準に、あるいは転写因子結合領域を中心に設計した。

骨髄腫動物モデルを用いた実験: ルシフェラーゼ遺伝子を導入した MM 細胞株 RPMI 8226 を SCID マウスに皮下投与し作成する骨髄腫マウスモデルを用いた。RPMI 8226 移植後、腫瘍の生着を確認し、クラス I HDAC 阻害薬 MS-275 や PIM 阻害薬 SMI-16a をそれぞれ経口と腹腔内投与し、腫瘍径を測定しながら、IVIS を用いて腫瘍増殖抑制効果について評価した。

4. 研究成果

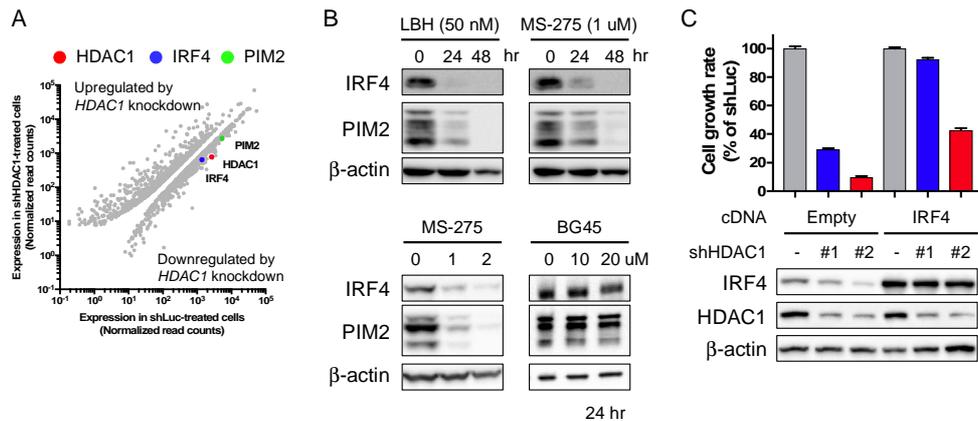
(1) 骨髄腫細胞における HDAC1 が制御する標的因子の同定

MM 細胞におけるクラス I HDAC の役割を明らかにする目的で、MM 細胞株 RPMI 8226 を用いて HDAC1 または HDAC3 を発現抑制し、RNA-Seq 解析を行った(図 1A)。有意な遺伝子発現変化群(adjp<0.05, LogFC>0.5)の中でも、特に MM 細胞のマスター転写因子 IRF4 と腫瘍メタボリズムと骨髄腫関連骨病変形成に重要なセリンスレオニンキナーゼ PIM2 の発現低下を HDAC1 遺伝子発現抑制細胞で同定した。これらの発現低下は、qPCR およびウエスタンブロット法を用いて確認も行った。MM 細胞株 MM.1S と U266 においても HDAC1 発現抑制は IRF4 と PIM2 の発現低下を認めた。汎 HDAC 阻害薬 LBH589 (panobinostat) と HDAC1 と HDAC3 を中心に阻害するクラス I HDAC 阻害薬 MS-275 (entinostat) では IRF4 と PIM2 の発現低下を認めたが、HDAC3 選択的阻害薬 BG45

ではいずれの発現低下も認めなかった(図1B)。以上から、MM細胞において、クラスI HDACの中でもHDAC1がIRF4やPIM2の発現制御を行っていることが明らかとなった。

次に、HDAC1を治療標的とした場合、IRF4が重要な因子であるかを検証するために、IRF4を過剰発現させたRPMI 8226を用いて、HDAC1発現抑制を行ったところ、IRF4過剰発現RPMI 8226ではHDAC1発現抑制による腫瘍増殖抑制効果が認められなかった(CCK-8アッセイ)(図1C)。PIM2過剰発現細胞株では、HDAC1発現抑制による増殖抑制効果の阻止は認められなかった。このことから、MM細胞において、HDAC1が制御する標的因子としてはIRF4が重要であることが明らかとなった。

図1. MM細胞のHDAC1発現抑制/阻害はIRF4とPIM2の発現を低下させる。



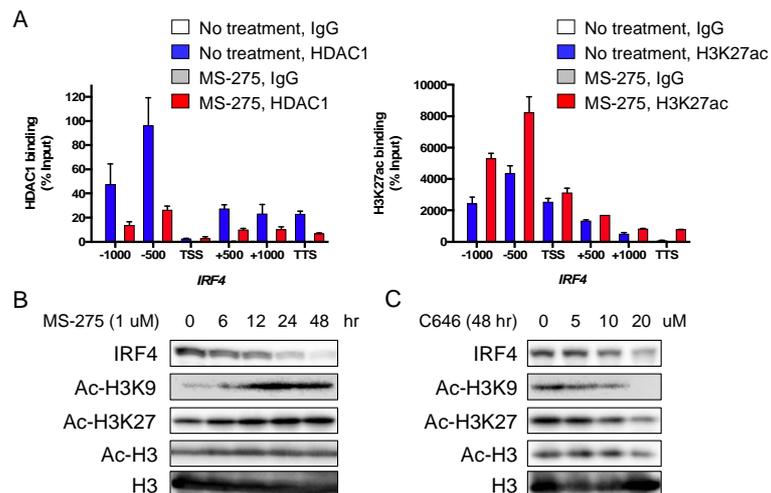
(2) HDAC1によるIRF4発現制御機構の解明

一般的に、HDACは遺伝子発現抑制を司る酵素群とされているが、我々の検討結果では、HDAC阻害は一部の遺伝子群の発現を抑制することが明らかとなった。そこで、公表されているMM.1SでのChIP-Seqデータを再解析し、HDAC1、HDAC2、HDAC3のH3K27アセチル化領域およびRNA polymerase II結合領域付近への結合を解析したところ、HDAC2やHDAC3と比較して、プロモーター領域へのHDAC1の有意な結合を確認した。さらに、IRF4のプロモーター領域へのHDAC1の作用も確認できた。

次に、RPMI 8226において、クラスI HDAC阻害薬MS-275で処理後のIRF4プロモーター領域付近へのHDAC1結合とH3K27アセチル化をChIP-qPCRで確認した(図2A)。HDAC1阻害により、IRF4プロモーター領域付近のH3K27アセチル化は増加していたが、HDAC1の結合は低下していた。

また、RPMI 8226において、MS-275処理はアセチル化を高めながら、IRF4の発現低下を来していた(図2B)。さらに、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ阻害薬C646の処理では、MM細胞のアセチル化を低下させながら、IRF4は発現低下を来した(図2C)。以上から、MM細胞で、一部の遺伝子群においては、HDAC1はアセチル化/脱アセチル化のバランスをとることで、遺伝子発現レベルを調節していることが考えられた。

図2. MM細胞のIRF4プロモーター領域のヒストンアセチル化/脱アセチル化の調節変化はIRF4発現低下を来す。



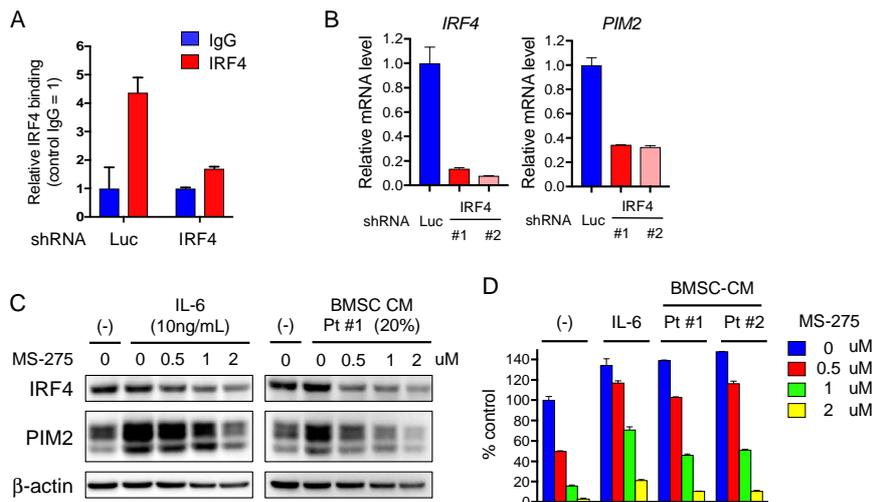
(3) 骨髄腫細胞の代謝変様因子PIM2の内在的および外的因子による発現制御機構の解明

IRF4はMM細胞の遺伝子発現調節においてマスター転写因子である。IRF4はPIM2プロモーター領域に結合することをChIP-Seq(公表済みデータの再解析)とChIP-qPCR法(図3A)で確認した。また、RPMI 8226においてIRF4発現抑制は、PIM2のmRNAとタンパクレベルで共に発現低下を来し(図3B)、IRF4はPIM2の転写制御因子であることを確認した。これらの結果から、MM細胞においてPIM2は、HDAC1-IRF4-PIM2の内在的経路により発現レベルが維持されていると考えられた。IL-6(10 ng/mL)や骨髄間質細胞の上清(bone marrow stromal cell conditioned medium: BMSC CM)(20%)を添加した条件下では、MM細胞のIRF4の発現に変化は認めないもの

の PIM2 発現レベルがさらに高まることを確認し (図 3C) PIM2 発現制御では JAK2-STAT3 を中心とする骨髄腫ニッチ因子からの外的経路による発現も重要であると考えられた。

クラス I HDAC 阻害薬 MS-275 処理では、MM 細胞の増殖抑制効果を認めるが、IL-6 存在下では腫瘍増殖抑制効果が非存在下と比較すると、低下する傾向であった (図 3D)。そのため、PIM2 は特に骨髄腫ニッチで MM 細胞の増殖において重要な役割を果たしており、MM メタボリズムの枢軸的因子 PIM2 を標的とする HDAC 阻害薬と PIM 阻害薬による併用療法が有効であることが示唆された。

図3. MM細胞のPIM2はIRF4による内在的制御とIL-6などの骨髄微小環境因子からの外的制御により発現が高まっている。

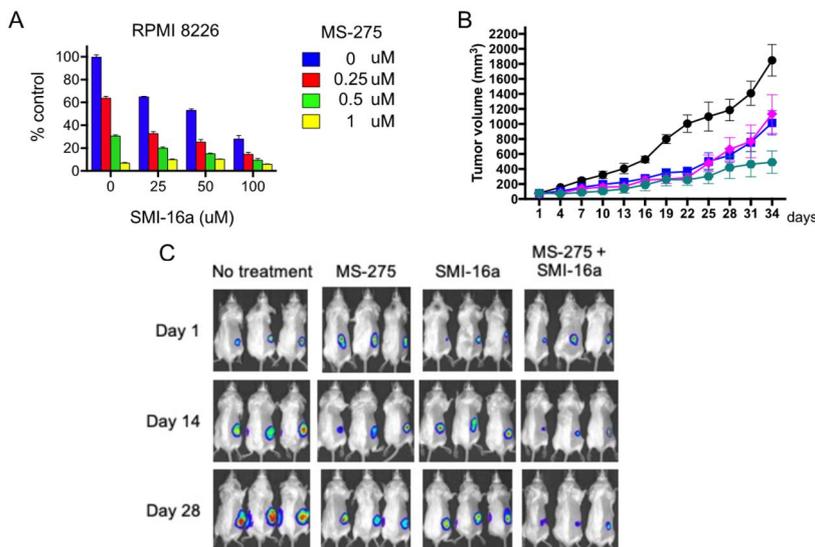


(4) クラス I HDAC 阻害薬と PIM 阻害薬の併用による治療効果と安全性の検討

クラス I HDAC 阻害薬 MS-275 と PIM 阻害薬 SMI-16a の併用療法の有効性を検討する目的で、まず骨髄腫細胞株に、MS-275 (0、0.5、1、2 μM) と SMI-16a (0、25、50、100 μM) を組み合わせて細胞増殖抑制効果を CCK-8 アッセイで検討したところ、PIM 阻害薬の増殖抑制効果に MS-275 はさらに上乗せ効果を発揮した (図 4A)。また、IL-6 や BMSC-CM 存在下での同様の検討においても、併用療法はそれぞれ単剤と比較して強力な細胞増殖抑制効果を発揮した。

次に、併用療法の生体内での有効性と安全性を検証するために、骨髄腫マウスモデルを用いて、コントロール群、MS-275 単剤群、SMI-16a 単剤群、併用群で腫瘍サイズの計測を行った。単剤群はコントロール群と比較して、腫瘍増殖抑制効果を確認できたが、併用療法ではさらに顕著な増殖抑制効果を認めた (図 4B、4C)。また、薬剤投与群においても有意な体重減少は認めず、本併用療法は骨髄腫に対して有効な治療法であることが示唆された。

図4. クラスI HDAC阻害薬とPIM阻害薬の併用療法はMM細胞の増殖抑制効果を発揮する。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Bat Erdene Ariunzaya, Nakamura Shingen, Oda Asuka, Iwasa Masami, Teramachi Jumpei, Ashtar Mohannad, Harada Takeshi, Miki Hirokazu, Tenshin Hirofumi, Hiasa Masahiro, Fujii Shiro, Sogabe Kimiko, Oura Masahiro, Udaka Kengo, Kagawa Kumiko, Yoshida Sumiko, Aihara Ken ichi, Kurahashi Kiyoe, Endo Itsuro, Abe Masahiro	4. 巻 185
2. 論文標題 Class 1HDACandHDAC6 inhibition inversely regulatesCD38 induction in myeloma cells via interferon andATRA	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 British Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 969 ~ 974
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.15673	査読の有無 有
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 Miki Hirokazu, Nakamura Shingen, Oura Masahiro, Hamano Hirofumi, Ikuta Kenji, Okada Naoto, Okamoto Yasunobu, Sogabe Kimiko, Takahashi Mamiko, Iwasa Masami, Udaka Kengo, Harada Takeshi, Kurahashi Kiyoe, Fujii Shiro, Yoshida Sumiko, Kagawa Kumiko, Endo Itsuro, Aihara Ken-ichi, Abe Masahiro	4. 巻 186
2. 論文標題 Correlation between high serum alkaline phosphatase levels and denosumab-related hypocalcemia in patients with multiple myeloma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 British Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 355 ~ 358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.15837	査読の有無 有
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 Iwasa Masami, Harada Takeshi, Oda Asuka, Bat-Erdene Ariunzaya, Teramachi Jumpei, Tenshin Hirofumi, Ashtar Mohannad, Oura Masahiro, Sogabe Kimiko, Udaka Kengo, Fujii Shiro, Nakamura Shingen, Miki Hirokazu, Kagawa Kumiko, Ozaki Shuji, Abe Masahiro	4. 巻 10
2. 論文標題 PD-L1 upregulation in myeloma cells by panobinostat in combination with interferon-	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 1903 ~ 1917
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.26726	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 -

1. 著者名 Ozaki Shuji, Harada Takeshi, Yagi Hikaru, Sekimoto Etsuko, Shibata Hironobu, Shigeakiyoshi Toshio, Fujii Shiro, Nakamura Shingen, Miki Hirokazu, Kagawa Kumiko, Abe Masahiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Polyclonal Immunoglobulin Recovery after Autologous Stem Cell Transplantation Is an Independent Prognostic Factor for Survival Outcome in Patients with Multiple Myeloma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 12 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12010012	査読の有無 有
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 Ho Matthew, Chen Tianzeng, Liu Jiye, Dowling Paul, Hideshima Teru, Zhang Li, Morelli Eugenio, Camci-Unal Gulden, Wu Xinchun, Tai Yu-Tzu, Wen Kenneth, Samur Mehmet, Schlossman Robert L., Mazitschek Ralph, Kavanagh Emma L., Lindsay Sinead, Harada Takeshi, McCann Amanda, Anderson Kenneth C., O'Gorman Peter, Bianchi Giada	4. 巻 34
2. 論文標題 Targeting histone deacetylase 3 (HDAC3) in the bone marrow microenvironment inhibits multiple myeloma proliferation by modulating exosomes and IL-6 trans-signaling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 196 ~ 209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-019-0493-x	査読の有無 有
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 該当する

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Harada T, Oda A, Teramachi J, Bat-Erdene A, Iwasa M, Maeda Y, Nakamura S, Oura M, Fujii S, Miki H, Kagawa K, Hideshima T, Anderson KC, Abe M
2. 発表標題 HDAC1/3 inhibition disrupts the IRF4-Pim-2 pathway to induce effective myeloma cell death
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Japanese Society of Myeloma
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Harada T, Oda A, Teramachi J, Bat-Erdene A, Iwasa M, Oura M, Nakamura S, Kagawa K, Okamoto Y, Sogabe K, Fujii S, Miki H, Ozaki S, Hideshima T, Anderson KC, Abe M
2. 発表標題 Selective inhibition of class-I HDAC induces myeloma cell death through targeting IRF4-Pim-2 axis
3. 学会等名 The 9th JSH International Symposium 2018 in Kyoto
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Harada T
2. 発表標題 Roles of HDAC1 and HDAC3 as therapeutic targets against myeloma cells
3. 学会等名 The 80th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Harada T, Oda A, Grondin Y, Teramachi J, Bat-Erdene A, Iwasa M, Oura M, Nakamura S, Kagawa K, Okamoto Y, Sogabe K, Fujii S, Miki H, Ozaki S, Hideshima T, Anderson KC, Abe M
2. 発表標題 The critical role of the HDAC1-IRF4-Pim-2 axis in myeloma cell growth and survival: therapeutic impacts of targeting the HDAC1-IRF4-Pim-2 axis
3. 学会等名 The 60th ASH Annual Meeting & Exposition (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Harada T, Oda A, Tenshin H, Teramachi J, Oura M, Sogabe K, Iwasa M, Fujii S, Nakamura S, Miki H, Kagawa K, Hideshima T, Anderson KC, Abe M
2. 発表標題 The novel therapeutic strategy targeting the HDAC1-IRF4-PIM2 pathway in myeloma cells
3. 学会等名 The 44rd Annual Meeting of the Japanese Society of Myeloma
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Harada T, Oda A, Tenshin H, Teramachi J, Oura M, Sogabe K, Fujii S, Nakamura S, Miki H, Kagawa K, Ozaki S, Hideshima T, Anderson KC, Abe M
2. 発表標題 Targeting myeloma metabolisoms regulated by HDAC1-IRF4 axis can be a novel therapeutic strategy
3. 学会等名 The 17th International Myeloma Workshop (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田武志
2. 発表標題 多発性骨髄腫におけるHDACアイソフォームの役割とその選択的阻害による治療法の開発
3. 学会等名 The 81th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Harada T, Oda A, Ohguchi H, Grondin Y, Tenshin H, Hiasa M, Teramachi J, Oura M, Sogabe K, Fujii S, Nakamura S, Miki H, Kagawa K, Ozaki S, Hideshima T, Anderson KC, Abe M
2. 発表標題 Novel therapeutic rationale for targeting HDAC1 and PIM2 in multiple myeloma
3. 学会等名 The 61th Annual Meeting of the American Society of Hematology (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----