

令和 3 年 5 月 9 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08367

研究課題名（和文）B細胞性腫瘍のクローン性進展におけるSGO-1の機能的意義と制御による合成致死

研究課題名（英文）The role of SGO-1 in clonal evolution of B-cell malignancies

研究代表者

古林 勉（Kobayashi, Tsutomu）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・講師

研究者番号：00624793

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）：本研究では細胞分裂チェックポイント分子BUB1、SGO1の進行期の骨髄腫(MM)、B細胞性リンパ腫(BCL)の患者由来細胞における過剰発現を見出した。MM細胞やBCL細胞においてBUB1発現抑制によって染色体分配エラーが減少し、付加的染色体異常が減少した。また、BUB1発現抑制は微小管阻害剤に対する感受性を亢進し、コロニー形成能の低下をもたらした。一方、SGO1についてはこうした機能的意義は明確ではなかった。以上より、BUB1の異常な発現亢進はMMやBCLにおいて染色体不安定性を亢進し、染色体進展を促進すること、多段階発がん過程の抑止を目指すうえでの治療標的と成り得ることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

染色体不安定性に伴う染色体異常進展は、がんの病態悪化と治療抵抗性獲得を促進するダイナミックなメカニズムであるが、その制御戦略は未開発である。本研究では細胞分裂チェックポイント分子であり、本来、染色体分配異常を監視し、細胞分裂異常による染色体異常の獲得を抑止すべきBUB1やSGO1が骨髄腫細胞やB細胞性リンパ腫細胞で過剰発現しており、その発現レベルは病態悪化を示唆するバイオマーカーとして活用可能であることを見出した。さらに機能的解析によって、BUB1が多段階発がん過程の抑止を目指すうえでの創薬ターゲットとしての妥当性が示された点で、今後の応用が期待される研究成果と考える。

研究成果の概要（英文）：This study revealed that mitotic checkpoint-associated molecules, BUB1 and SGO1, were overexpressed in patient-derived multiple myeloma (MM) cells and B-cell lymphoma cells (BCLs), especially in patients in an advanced stage. In myeloma cells and BCL cells, BUB1 knockdown reduced the frequency of chromosome segregation errors in mitotic cells and reduced resultant variations in chromosome number compared to parent cells. BUB1 knockdown also led myeloma cells and BCL cells to be more sensitive to microtubule inhibitors. Finally, BUB1 overexpression was found to promote the clonogenic potency. In contrast, the functional roles of SGO1 knockdown varied among cells, and were not prominent compared with those induced by BUB1 knockdown. Collectively, enhanced BUB1 expression caused an increase in mitotic segregation errors and the resultant emergence of subclones with altered chromosome numbers and, thus, was involved in chromosome instability in MM and BCLs.

研究分野：血液内科学

キーワード：多発性骨髄腫 クローン進展 BUB1 SGO1 染色体分配異常

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

今世紀となって以後、抗体治療薬と化学療法剤や分子標的治療薬を取り入れた免疫化学療法の進歩によって B 細胞性非ホジキンリンパ腫(B-cell lymphoma: BCL)や多発性骨髄腫(multiple myeloma; MM)などの成熟 B 細胞性腫瘍の予後は遍く改善した。しかしながら、BCL では治療困難な予後不良症例が一部残されるほか、MM は未だに治療困難であり、これらに対する克服戦略の開発は喫緊の重要課題である。これらの高度に予後不良な B 細胞性腫瘍が形成される病態形成過程においては、いくつかの分子異常の関与が明らかになり、それらをピンポイントに標的とする分子標的治療戦略の開発が進められている一方、そうした特定の異常の関与が明確でない症例の方が実際には多数であり、これらに対する治療開発の突破口となる病態解明は喫緊の課題である。従前の研究から、我々はこうした難治病態形成の過程では非特異的で高度・複雑な付加的染色体異常や複数パターンの染色体異常の共存、ならびにそれに伴うランダムな癌遺伝子・癌抑制遺伝子の変異やコピー数変化を獲得したサブクローンの出現、すなわち「クローン性進展」の過程が高度の治療抵抗性獲得に果たす役割が大と考えている。実際、我々は BCL において、より多くの染色体サブクローンの存在や (Mizuno Y, Cancer Med 2018) より多くの遺伝子変異の存在そのものが治療抵抗性や生存予後不良に直結することを示してきた(Tsukamoto T, Sci Rep 2017)。しかし、本来、染色体不安定性に基づく染色体分配異常やゲノム不安定性は正常細胞では許容されない致死的細胞現象であり、翻ってリンパ腫・骨髄腫細胞ではその存在が許容されるのみならず、増殖優位性、細胞死刺激抵抗性の獲得を促進するという正常細胞とは正反対の腫瘍特異的現象を司る分子メカニズムは未解明である。そこで、本研究では成熟 B 細胞性腫瘍における難治病態成立に際するクローン性進展を導く染色体・ゲノム不安定性の獲得と維持のメカニズムの解明と、その標的治療戦略の確立を目指す研究を推進することとした。

2. 研究の目的

我々は予備的検討において、B 細胞腫瘍の分裂期細胞では高頻度に染色体の分配異常 (Bridge, Lagging, Break など)が認められること、正常造血細胞に比して細胞分裂チェックポイント分子である Shugoshin 1(SGO1)や Budding uninhibited by benzimidazoles 1 (BUB1)が過剰発現状態にあることを見出した。SGO1 は生理的状态で PP2A と複合体を形成しセントロメアに局在し姉妹染色分体の接着を担うことで細胞分裂に際する精緻な染色体整列を制御する一方、その過剰・欠失は共に染色体分配異常の原因となりうる。また、SGO1 は MYC により発現誘導され、MYC 誘導性の DNA 障害反応やゲノム不安定化による細胞死誘導からのエスケープを担うことも提唱されており、MYC が病態形成促進の中心的分子として機能する BCL や MM では、MYC 過剰による oncogenic cell death からの回避に SGO1 が機能している可能性がある。一方、Bub1 キナーゼは染色体の正確な分配に必要なタンパク質であるが、その変異は癌発症の誘因となることが知られている傍ら、過剰発現とがんの発症との関連も知られている。

また、Bub1 キナーゼによるヒストン H2A のリン酸化が、SGO1 のセントロメア局在を直接誘導していることが明らかになっており、両分子は高度の機能的関連を有する。そこで、本研究では難治性 B 細胞性腫瘍のクローン性進化における SGO1、BUB1 発現亢進の機能的意義を MYC との関連を含め明らかにし、それらの制御異常を標的とした新規治療戦略の開発を目指すこととした。

3 . 研究の方法

1. B 細胞性腫瘍における SGO1、BUB1 の *in vitro* での機能的意義の検討

複数の BCL 細胞株、MM 細胞株を限界希釈法でシングルセルクローニングし、染色体・遺伝子異常、SGO1、BUB1 発現が均一な細胞株亜群を選別した。これらにおける遺伝子発現抑制のために、それぞれ SGO1、BUB1 の shRNA 配列を挿入したレンチウイルスベクター-pLKO.puro を 293T 細胞に導入して非増殖性レンチウイルスを得、上記細胞株亜群に感染させ、安定的に SGO1、BUB1 が発現抑制状態にある数種の細胞株亜株を樹立した。次に SGO1、BUB1 発現低下と染色体分配異常、付加的染色体異常誘導の関連を明らかにするため、ウイルス感染後、SGO1、BUB1 の発現低下を核酸、蛋白レベルで確認し、経時的に染色体分配異常の種類、頻度、付加的染色体異常数の変化、染色体異常サブクローンの出現状態を検討した。さらに SGO1、BUB1 の細胞増殖、化学療法剤感受性、DNA 障害性細胞死からのエスケープ効果の関連を明らかにするため、ウイルス感染後の細胞株において細胞周期、細胞増殖の制御異常、ならびに各種の DNA 障害性抗がん剤等の化学療法剤への感受性に与える効果を検討した。

2. MYC 誘導性 B 細胞性腫瘍における SGO1、BUB1 の機能的意義

我々の研究室で樹立した患者由来 MYC/BCL2 高発現 BCL 細胞株 2 種 (Sasaki N, Exp Hematol 2011) において SGO1、BUB1 の発現抑制を行い、MYC 依存性腫瘍において特異的な SGO1、BUB1 の機能を上記 1.と同様に検討した。

3. BUB1 阻害剤のリード化合物の探索

化合物ライブラリー (東京大学創薬機構、大阪大学創薬推進研究拠点、理化学研究所天然化合物バンク・NPDepo、NPO 法人化合物活用センター、AMED 創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム等) を活用し、BUB1 発現・活性を制御する化合物をスクリーニングする。

4. BCL、MM における SGO1 発現の治療反応性・予後の予測因子としての臨床的意義

患者由来 BCL 細胞、MM 細胞における SGO1 発現と MYC 発現との相関、治療反応性、予後との相関を臨床的に検討する。

4 . 研究成果

MM 細胞株、BCL 細胞株の 10 種ずつについて、SGO1、BUB1 の発現状態を検討した結果、MM 細胞株において発生母地である形質細胞と比べ、いずれも約 8-50 倍、SGO1、BUB1 の発現上昇を認めることが定量的 RTPCR により明らかになり、タン

パクレベルでも同様の結果が確認された。次に MM 臨床検体計 54 検体で SGO1、BUB1 発現を検討したところ、患者由来初代細胞でも病初期からこれらの発現が概ね 3 倍程度に亢進し、さらに病期進行に伴って、患者間でのばらつきはあるものの最大 10 倍程度まで発現上昇することが明らかになった。また、両分子の発現には正の相関が認められた。これらのことから、SGO1、BUB1 過剰発現が病態悪化のサロゲートバイオマーカーとなることが示され、同時にその誘因となる可能性が示唆された。次に MM における SGO1、BUB1 の遺伝子発現抑制 MM 細胞株亜株を作成し、細胞増殖能、コロニー形成能、染色体分配異常、抗ガン剤感受性について検討を行ったところ、BUB1 発現抑制は複数の MM 由来細胞株において横断的に分裂期染色体分配不均衡の是正、染色体異常進展クローンの出現の抑止、コロニー形成能の低下、紡錘体形成障害への高感受性獲得をもたらし、MM では BUB1 発現亢進を認め、クローン性増殖能と染色体分配異常による染色体異常サブクローンの発生を同時に導くことで”karyotypic evolution”を促進する役割を果たしており、悪性形質転換の促進、治療抵抗性獲得クローンの出現を促進していることが明らかになった (Fujibayashi Y, Cancers 2021)。また、B 細胞リンパ腫細胞でも同様の結果を認めたが、染色体異常が高度な MM において、よりこうした分子効果の影響が大きいことが証明された (未発表データ)。ただし、BUB1 過剰発現のみでは新規の染色体異常を有するクローンの拡大にまでは至らず、BUB1 過剰発現は、karyotypic evolution の必要条件ではある十分条件とは言えず、さらに複数の分子異常の協調的関与が必要と考えられる。また、BUB1 の SGO-1 発現のパターン、c-Myc 発現状態への影響は細胞株間で不均一であり、恒常的な関連性を認めるには至らなかった。他方、SGO-1 過剰発現の機能的意義はいまだに不明確である。すなわち、SGO-1 発現抑制による分裂期染色体分配不均衡、コロニー形成能への影響は複数の細胞株間で不均一であり、まったく影響を及ぼさないものから、効果はあっても BUB1 発現抑制による程度に比べると有意に軽微であるものが殆どであり、確定的な分子効果を証明するには至らなかった。これらの結果は他の悪性腫瘍における諸家の既報とは異なる結果である。これらの結果から、染色体進展によるがんの多段階発がんの抑止を目指すうえで、BUB1 の発現・機能制御が治療標的として期待できると想定されることから、次に BUB1 発現低下・機能制御効果をもたらす低分子化合物、既存治療薬のスクリーニングを行った。まず第一に、日常診療における BCL、MM 治療薬である古典的薬療法剤、プロテアソーム阻害剤、免疫調節薬 (セレブロン調節薬) などの BUB1 発現・機能に与える効果を検討したが、いずれも否定的であり、既存治療薬による BUB1 制御は困難であることが示された。そこで化合物ライブラリーを用い、現在も BUB1 発現制御を可能にする小分子化合物のスクリーニングを現在も継続中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Nishiyama D, Kobayashi T. (15名中11番目)	4. 巻 113
2. 論文標題 EWSR1 overexpression is a pro-oncogenic event in multiple myeloma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Hematol.	6. 最初と最後の頁 381-394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-020-03027-0.	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 Fujibayashi Y, Kobayashi T. (16名中12番目)	4. 巻 12
2. 論文標題 Aberrant BUB1 Overexpression Promotes Mitotic Segregation Errors and Chromosomal Instability in Multiple Myeloma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2206-2220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12082206.	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 Kawahara-Ota S, Kobayashi T. (17名中13番目)	4. 巻 191
2. 論文標題 Lenalidomide and pomalidomide potently interfere with induction of myeloid-derived suppressor cells in multiple myeloma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Br J Haematol.	6. 最初と最後の頁 784-795
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.16881.	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 該当する
1. 著者名 Chinen Y, Kobayashi T. (14名中11番目)	4. 巻 84
2. 論文標題 Tumor-specific transcript variants of cyclin D1 in mantle cell lymphoma and multiple myeloma with chromosome 11q13 abnormalities.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Exp Hematol.	6. 最初と最後の頁 45-53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exphem.2020.02.004.	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 Shimura Y, TKobayashi T. (10名中7番目)	4. 巻 112
2. 論文標題 Toward further simplification of elotuzumab therapy by subcutaneous administration.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Hematol	6. 最初と最後の頁 427-428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-020-02942-6.	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 Matsumura-Kimoto Y, Kobayashi T. (15名中12番目)	4. 巻 9
2. 論文標題 Serine-227 in the N-terminal kinase domain of RSK2 is a potential therapeutic target for mantle cell lymphoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Med.	6. 最初と最後の頁 5185-5199.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.3136.	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 Matsumoto Y, Kobayashi T. (25名中2番目)	4. 巻 110
2. 論文標題 Combined rituximab, bendamustine, and dexamethasone chemotherapy for relapsed or refractory indolent B-cell non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma: a multicenter phase II study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Hematol.	6. 最初と最後の頁 77-85.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-019-02650-w.	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 Takimoto-Shimomura T, Kobayashi T. (13名中12番目)	4. 巻 37
2. 論文標題 Dual targeting of bromodomain-containing 4 by AZD5153 and BCL2 by AZD4320 against B-cell lymphomas concomitantly overexpressing c-MYC and BCL2.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Invest New Drugs	6. 最初と最後の頁 210-222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10637-018-0623-8.	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 Takimoto-Shimomura T, Kobayashi T. (14名中13番目)	4. 巻 15
2. 論文標題 Establishment and Characteristics of a Novel Mantle Cell Lymphoma-derived Cell Line and a Bendamustine-resistant Subline.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Genomics Proteomics.	6. 最初と最後の頁 213-223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/cgp.20080.	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 Mizuno Y, Kobayashi T. (19名中18番目)	4. 巻 7
2. 論文標題 Chromosomal abnormality variation detected by G-banding is associated with prognosis of diffuse large B-cell lymphoma treated by R-CHOP-based therapy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Med.	6. 最初と最後の頁 655-664.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.1342.	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 -

[学会発表] 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 藤林悠人
2. 発表標題 多発性骨髄腫における有糸分裂チェックポイントタンパクBUB1高発現の機能的意義.
3. 学会等名 第44回日本骨髄腫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤林悠人
2. 発表標題 多発性骨髄腫における有糸分裂チェックポイントタンパクBUB1の発現及び機能解析.
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤林悠人
2. 発表標題 FUNCTIONAL SIGNIFICANCE OF OVEREXPRESSION OF MITOTIC CHECKPOINT PROTEIN BUB1 IN MULTIPLE MYELOMA.
3. 学会等名 第24回欧州血液学会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古林 勉
2. 発表標題 濾胞性リンパ腫治療の現状と課題
3. 学会等名 第112回近畿血液学地方会（招待講演）
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

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