

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：32202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23895

研究課題名（和文）多発性骨髄腫におけるIkaros複合体の機能解析と新規治療標的の探索

研究課題名（英文）Functional analyses of the Ikaros complex in multiple myeloma to identify novel therapeutic targets.

研究代表者

長田 直希 (Osada, Naoki)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：60840858

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：多発性骨髄腫治療のキードラッグである lenalidomide に対する耐性獲得機序の解明は重要な課題である。本研究では、ChIPシーケンズとChIP-Atlas softwareによるゲノムワイドなスクリーニングから、1) Ikarosの新規標的となりうる因子を複数同定したこと、2) Ikarosの転写活性化に働くパートナー候補として転写因子Fosを見出したこと、3) Fosをノックダウンしたところ、IRF4とSLAMF7発現が低下すること、を明らかにした。これら研究結果は、lenalidomide耐性を克服しうる併用療法の開発を進めていくうえで貴重な情報と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性骨髄腫の標準治療に lenalidomide は必須の薬剤であり、初発時から再発再燃時まで広く用いられている。このため、lenalidomide耐性は治療上の重要な課題となっており、そのメカニズムの解明はさらなる治療の進歩に不可欠である。本研究は、lenalidomideに対する耐性獲得機序におけるFosの役割を明らかにした初めての報告である。この結果から、Fos発現阻害に働く薬が lenalidomideに対する耐性を解除する可能性が考えられ、臨床的にも大きな意義のある研究内容と言える。

研究成果の概要（英文）：Elucidation of the mechanism of resistance acquisition against lenalidomide, a key drug in the treatment of multiple myeloma (MM), is an important issue. In this study, we performed genome-wide screening with ChIP-sequencing and ChIP-Atlas software, and identified 1) multiple factors that could be new downstream targets of Ikaros and 2) the transcription factor Fos as a candidate of transcriptional co-activator of Ikaros. In fact, Fos knockdown reduced the expression of IRF4 and SLAMF7, known targets of Ikaros, in MM cells. These results may provide valuable information for the development of combination therapies that could overcome lenalidomide resistance in MM.

研究分野：血液腫瘍学

キーワード：多発性骨髄腫 免疫調節薬 薬剤耐性 Ikaros複合体 転写制御 エピジェネティクス ChIP-Atlas

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫はBリンパ球分化の最終段階に位置する形質細胞が腫瘍化した疾患で、造血障害・骨破壊・異常免疫グロブリン(Mタンパク)の沈着による腎障害などを発症する。発症頻度は全人口では10万人当たり約2名であるが、70歳代では10万人当たり20名近くに増加するため、超高齢化社会を迎える我が国での医療ニーズは今後大きく増大することが懸念される。また骨折や腎不全など患者の苦痛が極めて大きく、治療費も高額であるため、疾患克服の社会的意義は非常に大きい。90年代までは予後不良疾患の代表であったが、2000年代になって効果的な新薬が臨床応用されるようになり治療成績は改善された。それでも5年生存率は約50%で、さらなる治療戦略の向上が必要とされている。予後の改善に大きく貢献しているのがthalidomide誘導体の1つlenalidomideである。LenalidomideはCRL4^{CRBN} ubiquitin ligase複合体に結合し、IKZFファミリー転写因子のIkarosとAiolosをリクルートする。リクルートされたIkaros/AiolosはCRL4^{CRBN}によってユビキチン化され、プロテアソーム依存性に分解される。Ikaros/Aiolosは骨髄腫細胞の生存に必須の転写因子であるIRF4やc-Mycの発現を維持しており、IRF4とc-Mycの抑制がlenalidomideの抗骨髄腫効果の本態と考えられている。しかしながらこの機序ではlenalidomideの薬理作用は完全には説明できず、とくに臨床的に問題となっている耐性機序との関連が不明である。したがってlenalidomideの抗骨髄腫機構の充分な理解、とくに真のエフェクター分子の同定は学術的にも臨床的にも重要な課題といえる。

2. 研究の目的

最近、骨髄腫細胞においてIkaros/AiolosをknockdownしてもIRF4やc-Mycの発現は必ずしも抑制されないとの報告がされた(Fedele et al. Blood 132: 2166, 2018)。この際、細胞死や増殖抑制は誘導されているので、lenalidomideの作用においてIkaros/Aiolosの下流に他のエフェクター分子が存在する可能性が示唆される。Ikarosファミリー転写因子は、造血幹細胞をはじめとした血球細胞とくにリンパ球系細胞に強く発現する。Ikarosの変異や欠損は造血幹細胞およびリンパ球系前駆細胞の減少や機能低下・B細胞の完全欠損とT細胞の過剰増殖・ヘルパーT細胞系列への優先的な分化など、多岐にわたる造血異常を引き起こす。またIkarosのドミナントネガティブ変異をヘテロに持つマウスは、ほぼ100% T細胞性リンパ腫を発症することから、Ikarosはリンパ腫発症抑制因子と考えられている。Ikarosによるリンパ腫抑制機構として、Notch1とその下流遺伝子の抑制が報告されている。(Heizmann et al. Curr Opin Immunol. 51:14, 2018; Demarest et al. Oncogene 27: 5082, 2008)。具体的なメカニズムとして、IkarosがNuRD複合体やポリコム複合体(PRC2)などと結合し、Notch1やその下流にある遺伝子の転写を抑制してがん抑制に働くことが示された(Kim et al. Immunity 10: 345, 1999; Ross et al. Mol Cell Biol. 32: 3624, 2012; Oravecz et al. Nat Commun. 6: 8823, 2015)。骨髄腫細胞では対照的に、Ikarosが転写活性化因子として細胞増殖や生存維持に働いているが、転写促進に働く複合体の構成分子は未解明である。本課題では骨髄腫細胞におけるIkarosの転写標的を網羅的に探索し、Ikaros複合体の下流にある未知のエフェクターを同定する。

3. 研究の方法

Genome-wideなクロマチン解析をスクリーニング法として、多発性骨髄腫におけるIkaros複合体の構成分子と標的遺伝子を同定し、腫瘍化のメカニズムとlenalidomideの作用機序・耐性機構を解明する。

(1) 代表的な多発性骨髄腫細胞株であるMM.1Sを用い、Ikarosのゲノム上への結合部位をchromatin immunoprecipitation with high-throughput DNA sequencing (ChIP-Seq)にて網羅的に解析する。

(2) 得られたデータをChIP-Seq databaseと対比し、ゲノム上でIkarosとco-localizeする分子をスクリーニングする。解析には、ChIP-Atlas software(Oki et al. EMBO Rep. 19: e46255, 2018)を用いる。

(3) Lenalidomide作用時の遺伝子発現パターン変化をcDNA microarrayにより解析する。

(4) 発現変化の見られた遺伝子について、ChIP-Seqデータ上でプロモーター領域のIkaros結合を確認し、ChIP-Atlas解析からco-localizeする分子を同定する。

(5) 得られた構成分子の過剰発現やknockdownを行い、Ikaros標的遺伝子の発現や細胞増殖・生存への影響を解析して、その生物学的意義を明らかにする。

(6) Immunoprecipitation-immunoblottingやchromatin immunoprecipitation assayによりIkarosとの相互作用や標的遺伝子プロモーター領域への結合様式を解析する。

(7) 上記で得られた結果をMM.1S細胞以外の細胞株や患者由来の骨髄腫細胞で確認する。

4. 研究成果

(1) Lenalidomide感受性骨髄腫細胞株MM.1Sを用いて抗Ikaros抗体によるChIPシーケンズからゲノム上のIkaros結合部位を網羅的に同定すると共に、Lenalidomide作用時の遺伝子発現パターン変化をcDNA microarrayにて解析し、Ikarosの新規標的となりうる因子を複数同定した。

(2) 得られたデータと既存の ChIP シークエンスデータベース上のデータを ChIP-Atlas software を用いて、特定の遺伝子座において任意の転写因子(例えば Ikaros)と共局在する転写因子を網羅的に解析できる Colocalization ツールと、その転写因子が強く結合するゲノム領域を探索する Target Genes ツールにより解析した。その結果、Ikaros/Aiolos の転写活性化に働くパートナー候補として転写因子 Fos や Blimp-1 を、その標的遺伝子としてこれまでに報告されている IRF4 や c-Myc に加えて新たに Bcl-2 等を見出した。

(3) 既知の Ikaros 標的因子 IRF4 および SLAMF7 と、今回新たに同定した CD147 (BSG) および CD48 の配列情報を解析した結果、Ikaros の転写活性化に働くパートナー候補として転写因子 Fos を見出した。

(4) Fos の knockdown は、IRF4 および SLAMF7 の発現を低下させた。次に Fos の knockdown と共に Lenalidomide を作用させると、これら因子の発現がさらに低下することが明らかとなった。

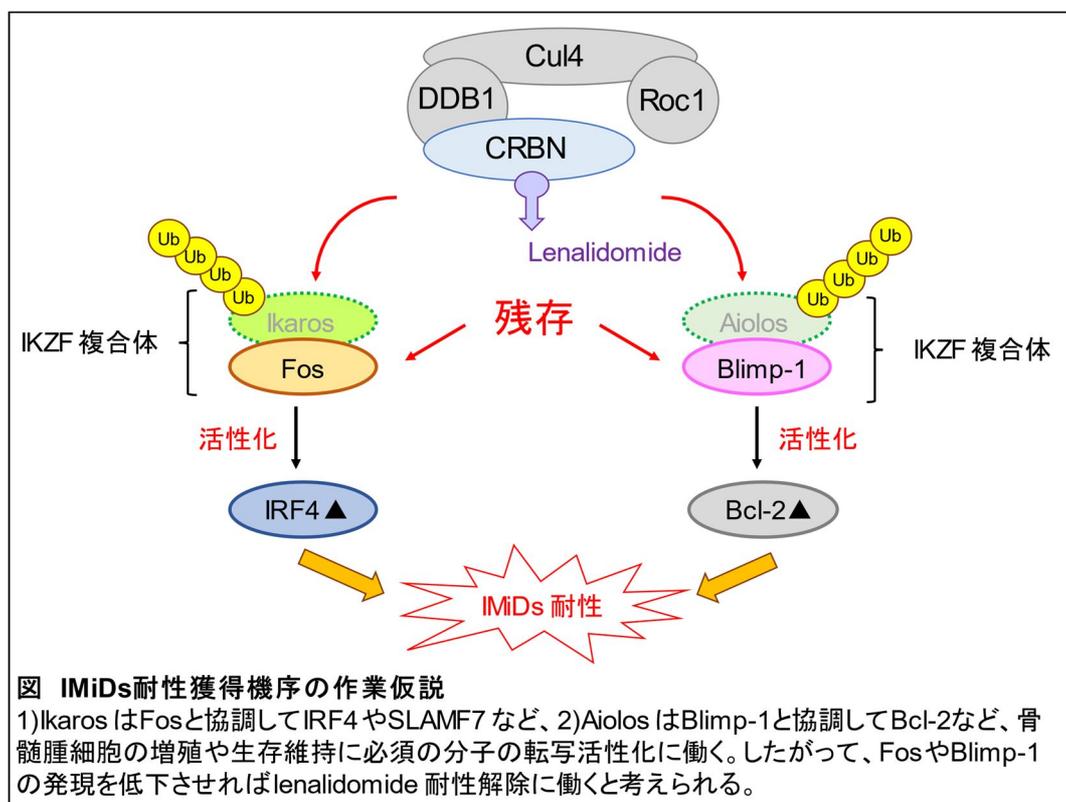
(5) Lenalidomide に Fos 阻害剤を加えると優位な抗骨髄腫効果が認められた。

(6) Aiolos や Blimp-1 をロックダウンしたところ、Bcl-2 発現の低下が見られた。

転写因子 Fos は骨髄腫細胞の生存に必須の役割のほか(Leukemia,31:2661,2017)、難治性骨髄腫患者のシングルセルトランスクリプトーム解析では Fos を強発現する細胞集団の存在が報告されている(Clin Cancer Res,26:935,2020)。しかしながら、Lenalidomide 耐性獲得における役割は未解明である。

一方、転写因子 Blimp-1 は、骨髄腫細胞において Aiolos と強調して生存維持に働くとの報告があるが(Cell Death Differ,23:1175,2016)、Aiolos 特異的な標的分子は解明が進んでいない。

本研究は、Ikaros/Aiolos の転写活性化に働くパートナー候補として転写因子 Fos や Blimp-1 を、その標的遺伝子としてこれまでに報告されている IRF4 や c-Myc に加えて新たに Bcl-2 等を見出した初めての報告であると共に(図) 臨床上大きな問題となっている lenalidomide 耐性例への耐性解除に有効な可能性を示唆するなど、臨床的に意義のある研究内容と言える。



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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------