

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07351

研究課題名(和文) 多発性骨髄腫で転写因子IKAROSの不安定化を促進する新規化合物の開発

研究課題名(英文) Development of an agent promoting IKAROS protein destabilization in Multiple myeloma cells

研究代表者

落合 恭子(Ochiai, Kyoko)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10455785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫では、増悪因子である転写因子IKAROSの分解を誘導する抗がん剤レブラミドが効果的な治療法の1つとして用いられる。本研究では、レブラミド使用が正常リンパ球細胞分化におけるIKAROS機能障害を招き、感染症を引き起こす問題の改善を目的とし、クロマチン制御因子PC4がレブラミドの作用機序とは異なる分子機構でIKAROSの安定化にはたらくことに着目した。そして、転写因子IRF4がPC4遺伝子を活性化すること、IRF4によるPC4遺伝子活性化にはIRF4蓄積制御機構が関与することを見出した。今後は、同制御機構を活用したIKAROS不安定化戦略の確立を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性骨髄腫は抗体を産生する形質細胞が異常増殖する血液細胞の癌で、抗がん剤による化学療法が治療選択に挙げられる。一方、抗がん剤の腫瘍治療有効濃度は感染症など重篤な副作用を伴うため、作用機序の異なる抗がん剤を組み合わせることで各薬剤の副作用を最小限に留めることが望ましい。転写因子IKAROSは多発性骨髄腫の治療標的分子として有効で、本研究で既存の薬剤標的であるIKAROSタンパク質分解誘導の分子機構とは異なる分子機構を見いだすことで、IKAROS機能阻害を目的とした新たな薬剤の開発に繋がる。そして、既存の薬剤との組み合わせにより効果的かつ副作用を減らした治療戦略に発展することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Transcription factor (TF) IKAROS is one of effective target molecules in the treatment of Multiple myeloma (MM), and Lenalidomide, an anticancer agent, promotes IKAROS protein degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. However, Lenalidomide treatment reduces IKAROS in not only MM cells but also normal lymphoid progenitors, resulted in infectious diseases caused by the reduced number of lymphoid cells. To improve the issue, we focused on our finding that a non-histone chromatin protein PC4 stabilizes IKAROS by the ubiquitin-proteasome pathway independent manner. We found that the expression of PC4 is induced by TF IRF4, which contributes to MM cell proliferation. Importantly, the IRF4-mediated induction of PC4 involves IRF4 accumulation. Therefore, the IRF4-PC4 axis could be an additional effective target for reducing IKAROS protein in MM cells.

研究分野：B細胞分化制御

キーワード：多発性骨髄腫 転写因子IKAROS クロマチン制御因子PC4 転写因子IRF4

### 1. 研究開始当初の背景

転写因子 IKAROS は、特異的な遺伝子発現ネットワーク形成によりリンパ球初期分化、B 細胞の形質細胞分化を制御する。近年、形質細胞腫である多発性骨髄腫の治療では新規抗がん剤レブラミドの有効性が示され、その作用機序は IKAROS タンパク質のユビキチン分解を促進した細胞増殖停止であることが明らかとなった。しかし、IKAROS 機能の重要性から、生体へのレブラミド投与は腫瘍治療効果だけでなく、B 細胞・T 細胞・NK 細胞など正常リンパ球数の減少も引き起こし、免疫機能低下による感染症などの重篤な副作用が問題になる。

そこで、私たちは IKAROS と結合パートナー PC4 (Positive coactivator 4) との関係性に着目した。ユビキタスに発現するクロマチン制御因子 PC4 は、遺伝子発現制御や DNA 損傷修復など多様な機能がある。重要なことに、PC4 は成熟 B 細胞で IKAROS と結合すること、IKAROS タンパク質を安定化することが分かった。さらに、“PC4 による IKAROS タンパク質安定化機構”は多発性骨髄腫細胞にも共通した分子機構だった。このことから、多発性骨髄腫細胞ではレブラミド投与時に“PC4 による IKAROS 安定化機構”と“レブラミドによる IKAROS 分解機構”の双方が介在している。そこで、“PC4 による IKAROS 安定化機構”を阻害すれば腫瘍細胞内の IKAROS 量が減少するため、レブラミド量を減らしても十分な治療効果が得られると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究は、多発性骨髄腫の治療薬レブラミドと併用する組合せ化合物の開発を目的とする。腫瘍治療にはレブラミドのように効果的な抗がん剤使用が不可欠だが、その反面、生体に腫瘍治療に有効な濃度を投与したときの副作用が問題で、レブラミド投与の副作用はリンパ球数全体の減少に伴う感染症などが挙げられる。本研究では申請者が新たに見いだした“PC4 による IKAROS 安定化機構”を標的にした化合物を開発する。

### 3. 研究の方法

レブラミド作用の妨げとならないよう「PC4 側の IKAROS 結合領域」を標的とした“PC4-IKAROS 結合阻害剤”を開発する。

(1) PC4-IKAROS 結合様式の決定：大腸菌発現系を用いて GST タグ付ヒト PC4 と His タグ付ヒト IKAROS を精製し、GST pull down assay をおこない両者の結合が直接か間接か調べる。間接結合の場合は(2)で詳細を解析する。直接結合の場合、PC4 および IKAROS の種々の領域欠損株を作成して GST pull down assay をおこない、PC4-IKAROS 結合に必要なそれぞれのアミノ酸領域を同定する。

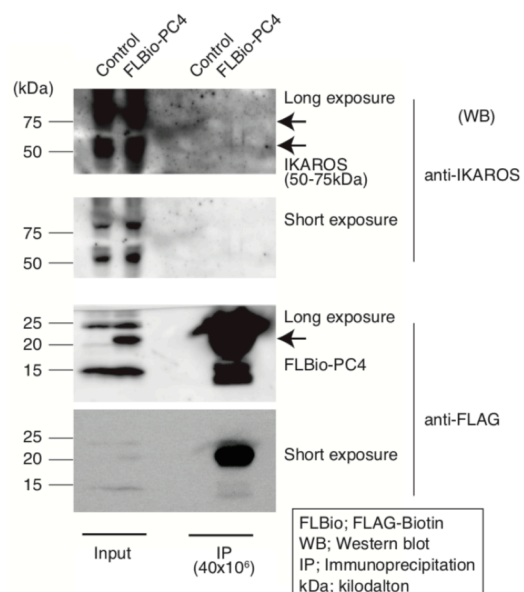
(2) 免疫沈降法を用いたタンパク質結合領域決定：種々領域を欠損した FLAG タグ付ヒト PC4 発現レトロウイルスベクターを構築する。各 PC4 発現ベクターを内在性 IKAROS が発現するヒト多発性骨髄腫株 KMS12PE に過剰発現させ、FLAG タグを用いた免疫沈降により内在性 IKAROS の沈降を調べ、IKAROS 結合に必要な PC4 アミノ酸領域を決定する。

(3) 化合物の設計と評価：IKAROS 結合に必要な PC4 タンパク質アミノ酸領域を標的とした薬剤候補化合物を設計し、疾患用ペプチド化合物を合成する。得られる化合物について、PC4-IKAROS 結合への影響と腫瘍細胞への影響を調べ、細胞特異性と毒性の評価を行う。

### 4. 研究成果

(1) PC4 による IKAROS 安定化は両者の結合に依存しない:GST-pulldown assay に先立ち、PC4-IKAROS 間の結合の有無を確認した。FLAG-Biotin タグ付ヒト PC4 発現ベクター(レトロウイルス)を構築し、マウス形質細胞株 X63/0 に発現導入して安定発現細胞株を樹立した。同細胞全抽出液を Streptavidin beads で免疫沈降し、PC4 と内在性 IKAROS の沈降をウェスタンブロットで調べた。その結果、FLAG-Biotin-PC4 の沈降は認められたが IKAROS の沈降は認められなかった(図 1)。また、線維芽細胞 293T やヒト多発性骨髄腫株 KMS12PE を用いた過剰発現系でも同様に PC4 と IKAROS の結合が認められなかった。このことから、PC4 による IKAROS 安定化は両者の結合に依存しないことがわかった。

そのため、当初の計画を変更し、PC4 遺伝子発現制御機構の観点から IKAROS 不安定化の糸口を模索した。



(図 1) PC4-IKAROS 間の結合解析 (免疫沈降-ウェスタンブロット)

(2) 転写因子 IRF4 による PC4 遺伝子発現制御：並行して行っていた解析から、転写因子 IRF4 による PC4 の遺伝子制御機構を見出した。IRF4 は形質細胞分化に不可欠で、IKAROS と複合体を形成して B 細胞遺伝子群を抑制する (Ochiai K. et al, Blood Advances 2018)。さらに、形質細胞分化誘導したマウス B 細胞では、IRF4 が PC4 をコードする *Sub1* 遺伝子領域に結合して活性化誘導することを明らかにした (Cell Reports 2020)。IRF4 は、多発性骨髄腫で IKAROS と同様に治療標的因子の 1 つとして挙げられている。

そこで、多発性骨髄腫株 KMS12PE を用いた IRF4 ChIP-sequence を遂行し、MEME (Multiple Em for Motif Elicitation) により結合 DNA モチーフ解析をおこなった。すると、IRF4 の結合 DNA モチーフ ISRE (Interferon-stimulated response elements) が高頻度で検出され (図 2A)、PC4 をコードする *SUB1* 遺伝子領域に ISRE を含む IRF4 結合ピークを検出した (図 2B)。このことから、多発性骨髄腫細胞においても、IRF4 による *SUB1* 遺伝子活性化制御が存在することが示唆された。

(3) IRF4 アミノ酸修飾による IRF4 機能制御：IRF4 は、ISRE モチーフに IRF4 タンパク質が蓄積することで結合して形質細胞遺伝子群を活性化する (Ochiai et al. Immunity 2013)。重要なことに、形質細胞分化誘導したマウス B 細胞から精製した IRF4 複合体を LC-MS/MS 質量分析で解析したところ、IRF4 アミノ酸修飾を検出した。さらに、形質細胞分化誘導したマウス B 細胞に同アミノ酸変異体を発現導入したところ、IRF4 タンパク質が減少した。このことから、同アミノ酸修飾は B 細胞における IRF4 機能制御に関与する可能性がある。

ヒトとマウスの IRF4 のアミノ酸相同性は 92.4% と高く、マウス B 細胞で検出された IRF4 アミノ酸修飾部位を含むアミノ酸領域周辺はヒトとマウスで保存されている。そこで、多発性骨髄腫株 KMS12PE で IRF4 複合体を精製し (図 3)、LC-MS/MS 質量分析装置によりアミノ酸修飾を調べたところ、ヒト IRF4 でも同アミノ酸修飾を検出した。このことから、IRF4 の同アミノ酸修飾はヒト多発性骨髄腫細胞とマウス活性化 B 細胞に共通して認められ、IRF4 の ISRE モチーフへの結合に重要である可能性が示唆された。

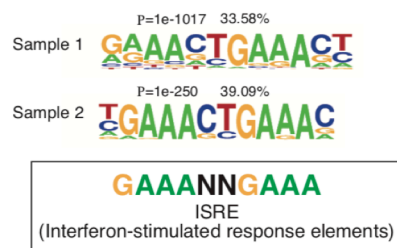
今後は、IRF4 の同アミノ酸修飾阻害剤の開発を視野に入れ、*SUB1* 遺伝子発現制御における同アミノ酸修飾の役割を明らかにする。そして、IRF4 による *SUB1* 遺伝子活性化の阻害により、PC4 量を減らして IKAROS を不安定化させる戦略の有効性を検討する。

#### <引用文献>

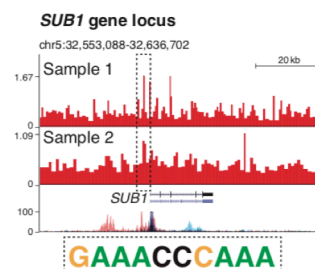
Ochiai K., Kondo H., Okamura Y., Shima H., Kurokochi Y., Kimura K., Funayama R., Nagashima T., Nakayama K., Yui K., Kinoshita K., Igarashi K. “Zinc finger-IRF composite elements bound by Ikaros/IRF4 complexes function as gene repression in plasma cell” Blood Advances, 2018 Apr 24;2(8):883-894

Ochiai K., Maienschein-Cline M., Simonetti G., Chen J., Rosenthal R., Brink R., Chong A.S., Klein U., Dinner A.R., Singh H., Sciammas R. “Transcriptional regulation of germinal center B and plasma cell fates by dynamical control of IRF4” Immunity, 2013 May 23;38(5):918-29

(A) 検出された IRF4 結合モチーフ

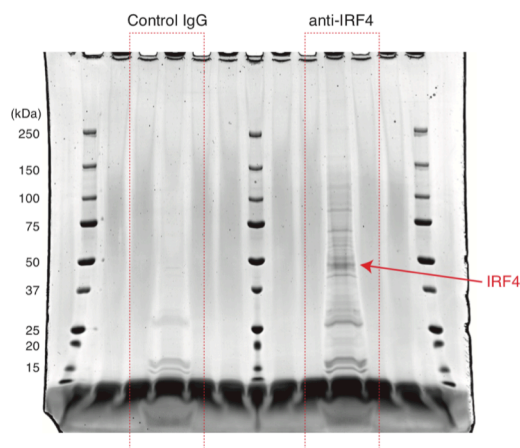


(B) PC4 をコードする SUB1 遺伝子上の IRF4 結合



SUB1 遺伝子上の IRF4 結合領域に存在する ISRE モチーフ

(図 2) 多発性骨髄腫株 KMS12PE における IRF4 ChIP-sequence



(図 3) 多発性骨髄腫株 KMS12PE における IRF4 複合体精製 (クマシー染色)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kyoko Ochiai, Mari Yamaoka, Amrutha Swaminathan, Hiroki Shima, Hitoshi Hiura, Mitsuyo Matsumoto, Daisuke Kurotaki, Jun Nakabayashi, Ryo Funayama, Keiko Nakayama, Takahiro Arima, Tomokatsu Ikawa, Tomohiko Tamura, Roger Sciammas, Philippe Bouvet, Tapas K Kundu, Kazuhiko Igarashi	4. 巻 33(12)
2. 論文標題 Chromatin Protein PC4 Orchestrates B Cell Differentiation by Collaborating with IKAROS and IRF4	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.108517	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 Kyoko Ochiai, Hiroki Shima, Tsuyoshi Ikura, Marissa C Franke, Evelyn P Sievert, Roger Sciammas, Kazuhiko Igarashi	4. 巻 2
2. 論文標題 Protocol for in vitro BCR-mediated plasma cell differentiation and purification of chromatin-associated proteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR protocols	6. 最初と最後の頁 100633-100600
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.100633	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 Kyoko Ochiai, Kazuhiko Igarashi	4. 巻 Dec 27
2. 論文標題 Exploring novel functions of BACH2 in the acquisition of antigen-specific antibodies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxac065	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kyoko Ochiai and Kazuhiko Igarashi
2. 発表標題 The regulation of B cell chromatin by a non-histone chromatin protein PC4 and its interacting transcription factors
3. 学会等名 日本免疫学会
4. 発表年 2022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			
米国	University of California, Davis			
インド	JNCASR			
フランス	Universite de Lyon			