

令和 5 年 4 月 21 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08734

研究課題名(和文) Dis3欠損骨髄腫モデルマウスの確立

研究課題名(英文) Establishment of Dis3-deficient myeloma model mouse

研究代表者

大口 裕人 (Ohguchi, Hiroto)

熊本大学・大学院先導機構・准教授

研究者番号：70451557

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)：多発性骨髄腫ではDIS3遺伝子の欠損や変異が高頻度に認められるが、DIS3の造血における生理学的機能やDIS3欠損の病理学的意義は不明である。本研究では、造血細胞特異的Dis3ノックアウトマウスを作製し、Dis3は造血に必須の遺伝子であることを明らかにした。一方で、晩期B細胞特異的Dis3ノックアウトマウスからは形質細胞性腫瘍は発症せず、DIS3欠損のみでは骨髄腫は発症しないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、これまで不明であった造血におけるDIS3の役割、とくに、造血幹細胞や造血前駆細胞の維持に必須であることを個体レベルで初めて明らかにすることができた。また、DIS3欠損のみでは多発性骨髄腫は発症しないというエビデンスを示した。今後、治癒不明の多発性骨髄腫の発症機序を理解していく上での一助になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：DIS3 deletions/mutations are frequently observed in patients with multiple myeloma; however, the physiological functions of DIS3 in hematopoiesis and the pathological significance of DIS3 deficiency remain poorly understood. In this study, we generated hematopoietic cell-specific Dis3 knockout mice and found that Dis3 is indispensable for hematopoiesis. On the other hand, late B cell-specific Dis3 knockout mice did not develop plasma cell neoplasm, suggesting that DIS3 deficiency is not sufficient for development of multiple myeloma.

研究分野：造血器悪性腫瘍における転写エピゲノム制御

キーワード：多発性骨髄腫 造血 モデルマウス

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 形質細胞性腫瘍である多発性骨髄腫は、造血器悪性腫瘍中約 10%の発症頻度を占めるが、未だに治癒不能であり、新規治療法開発に向けた病態解明が喫緊の課題である。病態解明には、個体レベルで解析を進めていく必要があるが、多発性骨髄腫では他の造血器腫瘍である急性白血病などと比較し、病態解析に適したヒト骨髄腫のアバターと言うべき理想的なマウスモデルに乏しく、個体レベルでの解析が大きく遅れているのが現状である。

(2) 多発性骨髄腫の発症進展は、遺伝学的変化により引き起こされる。免疫グロブリン遺伝子再構成に伴う B 細胞のゲノム不安定性を背景に、1 次的遺伝学的イベントとして、CCND1/3、MMSET、c-MAF などの脱制御を来す IGH 関連転座、あるいは高 2 倍性が起こり、これらが D 型サイクリン活性化を誘導することで良性なクローナルな形質細胞の増殖段階である Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (MGUS) が発症する。続いて、2 次的遺伝学的イベントである 13 番染色体欠失、1q21 コピー数増多などのコピー数変化、c-MYC 関連転座、MAPK 経路 (NRAS、KRAS、BRAF)、NFκB 経路 (LTB、TARF3、CYLD など) を活性化する点変異、DIS3 や FAM46C (TENT5C) の不活化変異などが加わり、骨髄腫へと進展していくと考えられている(1)。これら詳細は近年のゲノム解析の進歩により明らかにされてきた。しかしながら、こうした遺伝学的異常が実際に、骨髄腫を引き起こすのか、また、その場合、どのような機序で骨髄腫を引き起こすのかについては個体レベルでの検証は十分に行われていない。すなわち、ヒト遺伝学的変化に基づいた骨髄腫モデルマウスは c-MYC 過剰発現による Vκ\*MYC モデル(2)を除いてほとんど報告されておらず、各遺伝学的異常が骨髄腫発症に導く分子基盤はこれまでに十分に解明されていない。

(3) 骨髄腫患者検体の解析でがん種の中でも骨髄腫に特徴的な高頻度反復変異として DIS3 変異が見出された(3)。また、約 40%の骨髄腫患者では 13 番染色体長腕の欠失に伴って DIS3 遺伝子のヘテロ欠損が認められる(1)。これらの事実から骨髄腫細胞における DIS3 変異/欠損の意義を解明することは骨髄腫病態解明の鍵と考えられる。DIS3 は RNA エクソソーム複合体に含まれる RNase であり、様々な RNA の品質管理や加工に関わる(4)。これまで細胞株を用いた研究で DIS3 機能喪失は let7 miRNA の成熟を阻害して MYC、RAS などの翻訳を増強することが報告されているが(5)、さらに詳細な分子機序の解析や個体レベルで DIS3 の機能解析が行われた報告はない。すなわち、DIS3 の造血における生理的機能や骨髄腫における DIS3 欠損の意義は十分に理解されていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、DIS3 の造血における機能を明らかにするとともに、DIS3 欠損を含むヒト骨髄腫遺伝学的異常に基づく骨髄腫モデルマウスを確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

これまでの知見 ( DIS3 ローカスが位置する 13 番染色体長腕領域は骨髄腫細胞で最も高頻度に欠失していること 骨髄腫に認められる DIS3 変異の生化学的な解析では DIS3 変異は機能喪失型変異であること ) から、骨髄腫に見られる DIS3 変異は機能喪失型変異と想定されており(3)、DIS3 は骨髄腫においてがん抑制遺伝子として機能することが示唆されている。そこで、本研究では Dis3 遺伝子の条件付きノックアウトマウスを作製し解析した。

#### (1) 遺伝子改変マウスの作製

遺伝子編集システム CRISPR/Cas9 により Dis3 遺伝子の第 2 イントロンおよび第 4 イントロンに loxP 配列を挿入した Dis3-flox マウスを作製した。このマウスの細胞において、Cre リコンビナーゼが働くと Dis3 遺伝子がノックアウトされることを確かめるため、Dis3<sup>flox/flox</sup> マウスから樹立した初代培養肝細胞に Adeno-Cre を感染させ、Dis3 の発現を評価した。そして、設計通りに Cre-loxP システムにより Dis3 の発現が抑止されることを確認した。続いて、Mx-Cre マウス、あるいは Cre リコンビナーゼが免疫グロブリンガンマ 1 重鎖定常領域遺伝子の転写とともに誘導される Cgamma1-Cre マウス(6)と交配することで、造血細胞、あるいは胚中心 B 細胞以降の B 細胞で Dis3 をノックアウトできる条件付きノックアウトマウスを作製した。in vivo での Cre リコンビネーションを誘導するため、Mx-Cre を有するマウスでは Poly(I:C)、Cgamma1-Cre を有するマウスでは NP-CGG in alum 腹腔内投与を行った。さらに、t(14;16)を模したモデルマウス (c-Maf TG マウス) (7)と Dis3<sup>flox/flox</sup>;Cgamma1-Cre マウスを交配することで 2 つの遺伝学的変化を有するマウスを作製した。

#### (2) 骨髄中造血細胞の解析

マウス大腿骨から骨髄細胞を採取し、各種表面抗原特異的抗体で染色後、フローサイトメーターで解析した。

### (3) 生存期間の解析

遺伝子改変マウスの生存期間は Kaplan-Meier 法で評価した。

### 4. 研究成果

(1) まず、造血における Dis3 の機能を理解するため、Dis3-flox マウスを作製後、Mx-Cre マウスとの交配を行った。続いて、非造血細胞における Dis3 欠損の影響を除外するため、Dis3<sup>flox/flox</sup>;Mx-Cre マウスの全骨髄細胞を全身放射線照射後の CD45.1 マウスに移植した。生着を確認後、Poly(I:C)腹腔内投与により造血細胞特異的に Dis3 ノックアウトを行った。興味深いことに、Poly(I:C)投与 2 週間後には、造血細胞特異的 Dis3 ノックアウト(KO)マウスでは著しい汎血球減少を認めた(図 1)。汎血球減少の所見と矛盾せず、造血細胞特異的 Dis3KO マウスでは骨髄中有核細胞数の減少を認め、特に、骨髄球系細胞の割合が減少していた。フローサイトメーターによる解析では、LSK(Lin-sca1+c-kit+)、造血幹細胞(HSC)、多能性前駆細胞(MPPs)の頻度はいずれも低下しており、Dis3 は造血細胞全般の維持に必須であることが示された(図 2)。

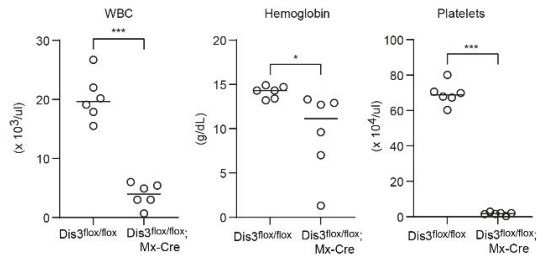


図1 造血細胞特異的Dis3KOマウスは汎血球減少を来す

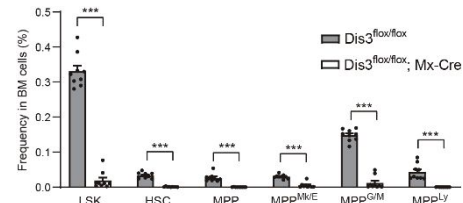


図2 造血細胞特異的Dis3KOマウスにおける造血幹細胞、造血前駆細胞の減少

(2) 続いて、Dis3-flox マウスと Cgamma1-Cre マウスを交配し、NP-CGG in alum で異種免疫を行うことで、晩期 B 細胞特異的 Dis3KO マウスを作製した。長期経過観察を行ったが、Dis3<sup>flox/flox</sup>;Cgamma1-Cre、Dis3<sup>flox/wt</sup>;Cgamma1-Cre いずれのマウスからも形質細胞性腫瘍は発症せず、野生型マウスと比較しても長期生存率に顕著な差は認めなかった(図 3)。さらに、晩期 B 細胞特異的 Dis3KO マウスに c-MAF-IGH 転座モデルマウスを掛け合わせたマウスも作製した。c-MAF-IGH 転座モデルマウスで報告されているように少数例で B 細胞性腫瘍を認めたが、形質細胞性腫瘍の発症は認めず、通常の c-MAF-IGH 転座モデルマウスと比較しても長期生存率に差を認めなかった(図 3)。

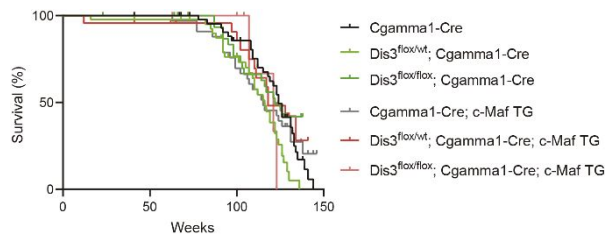


図3 晩期B細胞特異的Dis3KOマウスの生存曲線

本研究により、造血幹細胞や造血多能性前駆細胞の維持に DIS3 が必須の因子であることを明らかにすることができた。一方で、DIS3 単独欠損や c-MAF 転座との組み合わせのみでは骨髄腫発症には至らないことが示された。これらの知見は、多発性骨髄腫の発症機序を理解していく上での一助になることが期待される。

#### < 引用文献 >

1. Manier S, Salem KZ, Park J, Landau DA, Getz G, Ghobrial IM. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(2):100-13.
2. Chesi M, Robbiani DF, Sebag M, Chng WJ, Affer M, Tiedemann R, et al. AID-dependent activation of a MYC transgene induces multiple myeloma in a conditional mouse model of post-germinal center malignancies. *Cancer Cell*. 2008;13(2):167-80.
3. Lohr JG, Stojanov P, Carter SL, Cruz-Gordillo P, Lawrence MS, Auclair D, et al. Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer Cell*. 2014;25(1):91-101.
4. Houseley J, LaCava J, Tollervey D. RNA-quality control by the exosome. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(7):529-39.
5. Segalla S, Pivetti S, Todoerti K, Chudzik MA, Giuliani EC, Lazzaro F, et al. The ribonuclease DIS3 promotes let-7 miRNA maturation by degrading the pluripotency factor LIN28B mRNA. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(10):5182-93.
6. Casola S, Cattoretti G, Uyttersprot N, Koralov SB, Seagal J, Hao Z, et al. Tracking

germinal center B cells expressing germ-line immunoglobulin gamma1 transcripts by conditional gene targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(19):7396-401.

7. Morito N, Yoh K, Maeda A, Nakano T, Fujita A, Kusakabe M, et al. A novel transgenic mouse model of the human multiple myeloma chromosomal translocation t(14;16)(q32;q23). *Cancer Res.* 2011;71(2):339-48.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Ohguchi Yasuyo, Ohguchi Hiroto	4. 巻 24
2. 論文標題 DIS3: The Enigmatic Gene in Multiple Myeloma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4079 ~ 4079
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24044079	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 Harada Takeshi, Ohguchi Hiroto, Oda Asuka, Nakao Michiyasu, Teramachi Jumpei, Hiasa Masahiro, Sumitani Ryohei, Oura Masahiro, Sogabe Kimiko, Maruhashi Tomoko, Takahashi Mamiko, Fujii Shiro, Nakamura Shingen, Miki Hirokazu, Kagawa Kumiko, Ozaki Shuji, Sano Shigeki, Hideshima Teru, Abe Masahiro	4. 巻 7
2. 論文標題 Novel antimyeloma therapeutic option with inhibition of the HDAC1-IRF4 axis and PIM kinase	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 1019 ~ 1032
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2022007155	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 Ohguchi Yasuyo, Ohguchi Hiroto	4. 巻 14
2. 論文標題 Diverse Functions of KDM5 in Cancer: Transcriptional Repressor or Activator?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3270 ~ 3270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14133270	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 Ohguchi H, Park P, Wang T, Gryder B, Ogiya D, Kurata K, Zhang X, Li D, Pei C, Masuda T, Johansson C, Wimalasena V, Kim Y, Hino S, Usuki S, Kawano Y, Samur M, Tai YZ, Munshi N, Matsuoka M, Ohtsuki S, Nakao M, Minami T, Lauberth S, Khan J, Oppermann U, Durbin A, Anderson K, Hideshima T, Qi J	4. 巻 2
2. 論文標題 Lysine Demethylase 5A Is Required for MYC-Driven Transcription in Multiple Myeloma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood Cancer Discovery	6. 最初と最後の頁 370 ~ 387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2643-3230.BCD-20-0108	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 Ogiya Daisuke, Liu Jiye, Ohguchi Hiroto, Kurata Keiji, Samur Mehmet K., Tai Yu-Tzu, Adamia Sophia, Ando Kiyoshi, Hideshima Teru, Anderson Kenneth C.	4. 巻 136
2. 論文標題 The JAK-STAT pathway regulates CD38 on myeloma cells in the bone marrow microenvironment: therapeutic implications	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 2334 ~ 2345
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2019004332	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

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Hiroto Ohguchi
2. 発表標題 多発性骨髄腫においてIL-6-JAK-STAT3経路により駆動される転写サイン
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroto Ohguchi, Mitsuyoshi Nakao, Takashi Minami
2. 発表標題 IL-6-JAK-STAT3経路は骨髄腫を駆動する転写プログラムの頑強性に寄与する
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroto Ohguchi, Tingjian Wang, Berkley Gryder, Daisuke Ogiya, Takeshi Masuda, Shinjiro Hino, Mitsuyoshi Nakao, Takashi Minami, Kenneth C Anderson, Teru Hideshima, Jun Qi
2. 発表標題 KDM5AはRNAポリメラーゼIIリン酸化を促進し、MYC駆動性の転写を増強する
3. 学会等名 第15回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroto Ohguchi
2. 発表標題 IL-6-JAK-STAT3経路は骨髄腫を駆動する転写プログラムを支持する
3. 学会等名 第47回日本骨髄腫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroto Ohguchi, Daisuke Ogiya, Tingjian Wang, Berkley Gryder et al.
2. 発表標題 KDM5Aは多発性骨髄腫においてMYC標的遺伝子の維持に必要な因子である
3. 学会等名 第46回日本骨髄腫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ohguchi H, Park PMC, Wang T, Gryder BE, Ogiya D, Kurata K, Zhang X, Li D, Pei C, Masuda T, Johansson C, Wimalasena VK, Kim Y, Hino S, Usuki S, Kawano Y, Samur MK, Tai YT, Munshi NC, Matsuoka M, Ohtsuki S, Nakao M, Minami T, Lauberth S, Khan J, Oppermann U, Durbin AD, Anderson KC, Hideshima T, Qi J
2. 発表標題 KDM5Aは骨髄腫細胞においてRNAポリメラーゼIIリン酸化を制御し、MYC駆動性の転写を促進する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ohguchi H, Park PMC, Wang T, Gryder BE, Ogiya D, Kurata K, Zhang X, Li D, Pei C, Masuda T, Johansson C, Wimalasena VK, Kim Y, Hino S, Usuki S, Kawano Y, Samur MK, Tai YT, Munshi NC, Matsuoka M, Ohtsuki S, Nakao M, Minami T, Lauberth S, Khan J, Oppermann U, Durbin AD, Anderson KC, Hideshima T, Qi J
2. 発表標題 Lysine Demethylase 5A is Required for MYC Driven Transcription in Multiple Myeloma
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大口裕人
2. 発表標題 多発性骨髄腫増殖に関わる新規エピゲノム制御機構
3. 学会等名 第71回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2020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
研究協力者	指田 吾郎  (Sashida Goro)	熊本大学・国際先端医学研究機構・教授	
研究協力者	荒木 喜美  (Araki Kimi)	熊本大学・生命資源研究・支援センター・教授	

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