

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08401

研究課題名(和文)免疫調節薬(IMiDs)耐性を誘導するIKZF転写因子複合体の探索

研究課題名(英文) Exploration of IKZF transcription factor complexes that induce immunomodulatory drugs (IMiDs) resistance.

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫治療においてlenalidomide (Len)は重要な役割を果たしている。臨床的にもその耐性化は喫緊の課題となっているが、その耐性化機序は不明である。本研究では、1) activator protein-1 (AP-1)ファミリー転写因子であるc-FosがIKZF1と複合体を形成し、骨髄腫細胞の増殖に必須の遺伝子の転写を活性化させること、2) LenによりIKZF1発現が低下しても、c-Fosが残存することでLen耐性が誘導される機序を見出した。さらにAP-1阻害剤とLenの併用は、In vitroおよびIn vivoにて優位な増殖抑制効果と生存期間の延長をもたらすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者が見出したc-Fosは、AP-1ファミリー転写因子群(c-Fos/FosB/c-Jun/JunB/BATF)に属している。最近AP-1ファミリーは、多発性骨髄腫(MM)において多剤耐性獲得と再発にかかわっていることが次々と報告されている。本研究結果は、MMにおけるAP-1阻害剤の効果を明らかにした世界初の報告である。今後、新たな治療戦略の開発を介してMMの予後を改善する効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Lenalidomide (Len) plays an important role in the treatment of multiple myeloma. Clinically, resistance to Len is an urgent issue, but the mechanism of resistance remains unclear. In this study, we found that 1) c-Fos, a transcription factor of the activator protein-1 (AP-1) family, forms a complex with IKZF1 and activates transcription of genes essential for myeloma cell growth, and 2) residual c-Fos in the IKZF1 complex induces Len resistance. Furthermore, we show that the combination of AP-1 inhibitor and Len resulted in excellent growth inhibition and prolonged survival in vitro and in vivo.

研究分野：血液学、腫瘍内科学

キーワード：多発性骨髄腫 Lenalidomide耐性 AP-1ファミリー ChIP-Seq

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 (MM) は、形質細胞が腫瘍化した難治性の血液がんである。その予後は極めて不良であったが、2000 年代になって認可されたプロテアソーム阻害剤やサリドマイド及びその誘導体であるレナリドマイド (Len) とポマリドマイド (Pom) (これらは総称して免疫調節薬 (IMiDs) と呼ばれる) が、その予後を大きく改善した。Len は初発例及び再発例に対する多くのレジメンに加え、維持療法にも用いられる最も重要な治療薬である。したがって、Len に対する感受性低下と耐性獲得は、再発と予後悪化に直結するため、鍵分子を含む機序の解明は治療成績向上に向けた重要な研究課題である。

2. 研究の目的

IKZF ファミリーは造血系で広く発現しており、血液細胞の増殖と分化に関与する多種多様な遺伝子の転写調節を介して恒常性を維持している。このうち、IKZF1 は、ヌクレオソームリモデリングおよび脱アセチル化酵素 (NuRD) 複合体およびポリコム複合体 (PRC2) と連携して NOTCH1 等の oncogene を転写抑制することにより、腫瘍抑制因子として機能する。私たちは、Len の標的遺伝子である IKZF1 をノックダウンしても、MM 細胞における IRF4 の発現は必ずしも抑制されないとの報告から (Fedele et al. Blood, 132: 2166, 2018)、MM 細胞では IKZF1 が正常リンパ球とは異なる複合体を形成し、この複合体形成によって IKZF1 が転写活性化因子として働くのではないかと推測した。本研究では、1) IKZF1 の転写能を負から正へと変換させる転写複合体構成因子の同定、2) Len 耐性克服に有効な治療薬のスクリーニングを進め、予後の改善を目指す。

3. 研究の方法

- (1) Len 感受性骨髄腫細胞株 MM.1S を用い、IKZF1 のゲノム上への結合部位を chromatin immunoprecipitation with high-throughput DNA sequencing (ChIP シークエンス: 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 IKZF1 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) Len 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 IKZF1 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、IKZF1 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 (IP-western) や chromatin immunoprecipitation assay により IKZF1 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。
- (8) 複合体構成因子に対する阻害剤と Len の併用効果について検証する。
- (9) マウスモデルを用いて候補薬剤の有効性を検証する。

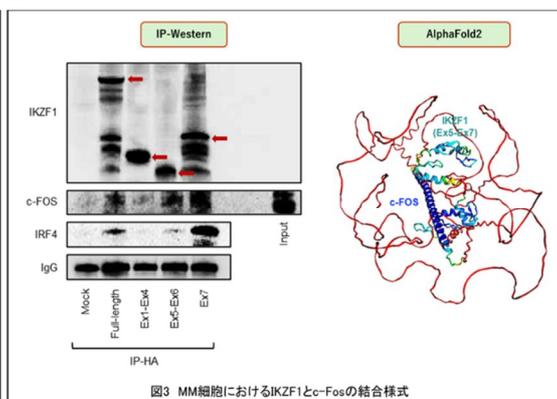
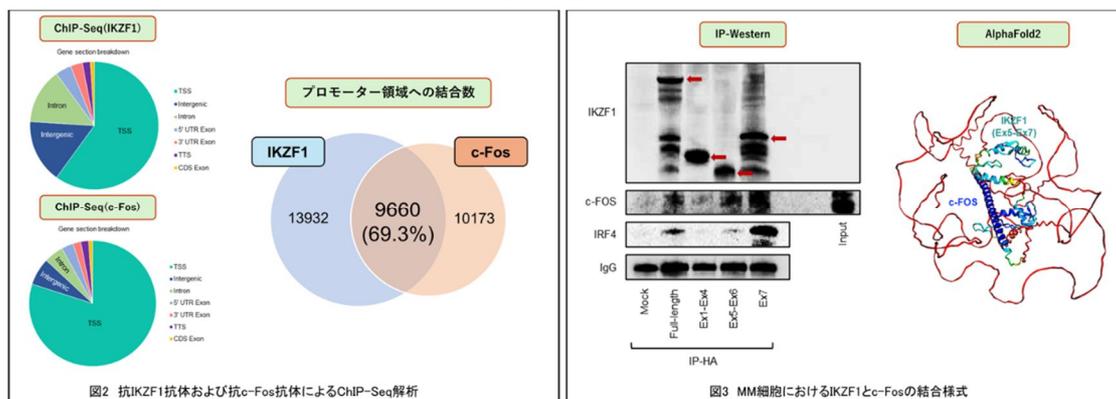
4. 研究成果

- (1) 抗 IKZF1 抗体による ChIP-Seq から転写開始点 (TSS) 付近に IKZF1 が結合する遺伝子を複数同定した。
- (2) Len 作用時の遺伝子発現パターン変化を cDNA microarray にて解析した。1. の結果とまとめると、IKZF1 結合が見られても、Len により発現が低下しない遺伝子が存在することが明らかとなった。そこでこれら遺伝子の TSS 付近の配列情報を解析した結果、Len で発現低下がみられた遺伝子の TSS 付近には、AP-1 ファミリー転写因子 c-Fos が結合する配列が特異的に存在することが判明した (図 1)。

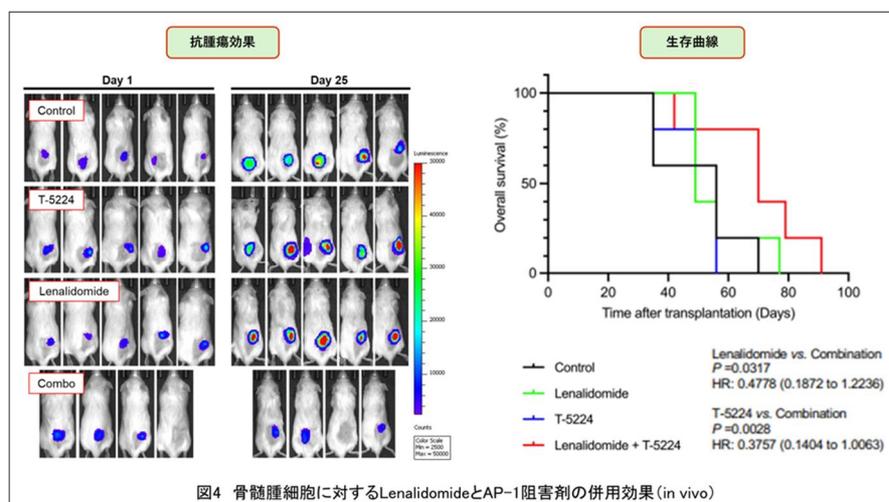
Gene	IKZF1 binding	Lenalidomide	FOS binding site
<i>IRF4</i>	+	▼	+
<i>ISG20</i>	+	▼	+
<i>SLAMF7</i>	+	▼	+
<i>BSG</i>	+	-	-
<i>CD48</i>	+	-	-
<i>ICAM1</i>	+	-	-
<i>TIGIT</i>	+	-	-

図1 抗IKZF1抗体によるChIP-SeqとLen処理による遺伝子発現解析

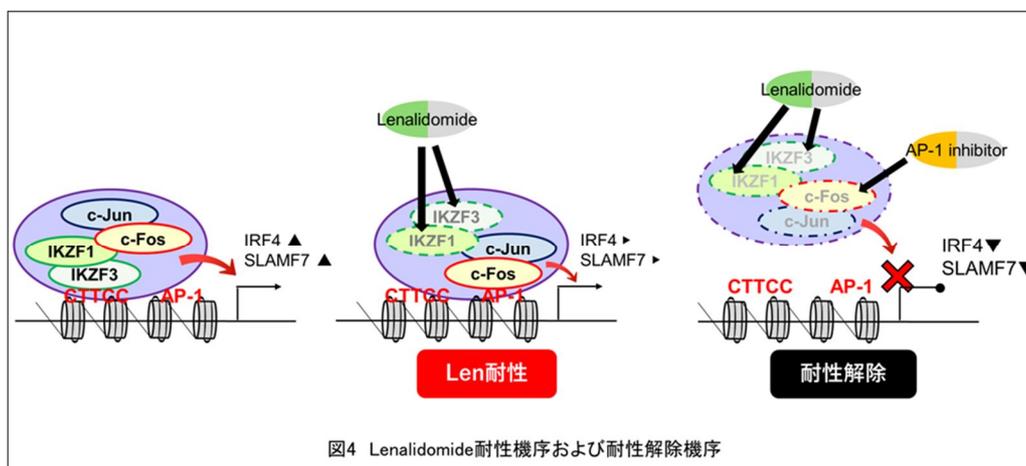
- (3) 抗 c-Fos 抗体による ChIP-Seq を実施したところ、IKZF1 同様に TSS 付近によく結合していた。抗 IKZF1 抗体および抗 c-Fos 抗体による ChIP-Seq データを統合解析すると、多くの遺伝子が共通ターゲットとなっていることが明らかとなった (図 2)。そこで MM における c-Fos の機能を明らかにするため、c-Fos の knockdown(KD)を実施した。その結果、c-Fos KD は結合配列を持つ IRF4 および SLAMF7 の発現を低下させた一方で、結合配列を持たない BSG や CD48 などの発現には影響を与えなかった。また、c-Fos の過剰発現は、IRF4 発現の増加とそれに伴って Len 耐性が誘導された。
- (4) これまでの結果から IKZF1 と c-Fos が複合体を形成していることが考えられる。そこで IP-western および立体構造予測ソフト AlphaFold2 を用いて検討を行い、IKZF1 と c-Fos が複合体形成していることを明らかにした (図 3)。



- (5) AP-1 阻害剤と Len の併用は、*in vitro* およびマウスモデルを用いた *in vivo* で優れた増殖抑制効果を示すなど有効であった (図 4)。



以上より、Len 耐性化のメカニズムとその耐性克服に AP-1 阻害剤が有効であることを明らかにした (図 5) (Osada N. et al. Clin Transl Med. 13(8):e1364, 2023)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Osada Naoki, Kikuchi Jiro, Iha Hidekatsu, Yasui Hiroshi, Ikeda Sho, Takahashi Naoto, Furukawa Yusuke	4. 巻 13
2. 論文標題 c FOS is an integral component of the IKZF1 transactivator complex and mediates lenalidomide resistance in multiple myeloma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clinical and Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 e1364
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ctm2.1364	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長田直希、菊池次郎、松岡紗恵、安井寛、池田翔、高橋直人、仲宗根秀樹、古川雄祐
2. 発表標題 AP-1ファミリー転写因子は多剤耐性獲得を介して予後を悪化させる
3. 学会等名 第48回骨髄腫学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 長田直希、菊池次郎、松岡紗恵、安井寛、池田翔、高橋直人、仲宗根秀樹、古川雄祐
2. 発表標題 c-FOS転写因子はIKZF1標的遺伝子の転写活性化を介して免疫調節薬耐性を誘導する
3. 学会等名 第85回日本血液学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長田直希、菊池次郎、松岡紗恵、安井寛、池田翔、高橋直人、仲宗根秀樹、古川雄祐
2. 発表標題 c-FOS転写因子はIKZF1標的遺伝子の転写活性化を介して免疫調節薬耐性を誘導する
3. 学会等名 第82回癌学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長田直希、菊池次郎、松岡紗恵、安井寛、池田翔、高橋直人、仲宗根秀樹、古川雄祐
2. 発表標題 c-FOS転写因子はIKZF1標的遺伝子の転写活性化を介して免疫調節薬耐性を誘導する
3. 学会等名 第48回骨髄腫学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長田直希、菊池次郎、安井寛、古川雄祐
2. 発表標題 c-FOS mediates IMiDs resistance by acting as a co-activator of IKZF1-target genes in multiple myeloma.
3. 学会等名 第47回日本骨髄腫学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長田直希、菊池次郎、安井寛、池田翔、高橋直人、古川雄祐
2. 発表標題 c-FOS転写因子はIKZF1標的遺伝子の転写活性化を介して免疫調節薬耐性を誘導する
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
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
---------	---------