

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	遺伝学的スクリーニングを用いたCRBNの細胞内局在が多発性骨髄腫に対する抗がん剤pomalidomideの薬理作用に与える影響の解析
Title(English)	
著者(和文)	舘野峻平
Author(English)	Shunpei Tateno
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11544号, 授与年月日:2020年5月31日, 学位の種別:課程博士, 審査員:山口 雄輝,川上 厚志,立花 和則,白木 伸明,小倉 俊一郎,田川 陽一
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11544号, Conferred date:2020/5/31, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

博士論文

遺伝学的スクリーニングを用いた CRBN の細胞内局在が
多発性骨髄腫に対する抗がん剤 pomalidomide の薬理作用に
与える影響の解析

東京工業大学大学院生命理工学研究科

生命情報専攻

舘野 峻平

指導教員 山口 雄輝 教授

目次

遺伝子名一覧	4
略語一覧	21
第 1 章 背景	23
1-1 thalidomide	23
1-2 thalidomide 標的タンパク質 CRBN	23
1-3 thalidomide 誘導体	23
1-4 pomalidomide による多発性骨髄腫に対する抗がん活性	24
1-5 thalidomide 誘導体による CRBN のユビキチン化基質の制御	24
1-6 低分子を用いたタンパク質分解技術	26
1-7 shRNA ライブラリスクリーニング	26
1-8 本研究の目的	27
第 2 章 実験方法	36
2-1 細胞培養	36
2-2 shRNA ライブラリスクリーニング (1st スクリーニング)	38
2-3 実験に用いた plasmid の作製	41
2-4 focused ライブラリスクリーニング	44
2-5 ウェスタンブロッティング	46
2-6 免疫沈降	48
2-7 蛍光免疫染色 (免疫染色)	49
2-7 quantitative reverse transcriptase PCR (qRT-PCR)	50
第 3 章 shRNA ライブラリスクリーニング	62
3-1 諸言	62
3-2 shRNA ライブラリスクリーニングの条件の決定	62
3-3 shRNA ライブラリスクリーニング	63
3-4 shRNA ライブラリスクリーニング結果の解析	64
3-5 変動遺伝子に含まれる既知の CRBN 関連遺伝子	65
3-6 個別 KD による shRNA ライブラリスクリーニングの validation	66
3-7 HTS による focused ライブラリスクリーニング (2nd スクリーニング)	67
3-8 qPCR による focused ライブラリスクリーニング (3rd スクリーニング)	68
3-9 変動遺伝子が多発性骨髄腫の細胞増殖に与える影響の解析 (4th スクリ	

ーニング)	69
3-10 pomalidomide 標的遺伝子の個別 KD による細胞増殖への影響	70
3-11 GFP/RFP を用いた pomalidomide 標的遺伝子の個別 KD による細胞増殖への影響	70
3-12 個別遺伝子の KD が CRBN の下流因子に与える影響	71
3-13 まとめ	72
第 4 章 インポーチンが pomalidomide 感受性に与える影響の解析	92
4-1 諸言	92
4-2 GO 解析による変動遺伝子の機能解析	92
4-2 インポーチンのノックダウン	93
4-3 Flag-HA-CRBN 発現細胞の作製	93
4-4 OPM-2 細胞においてインポーチンの KD が CRBN や Aiolos の細胞内分布に与える影響の解析	94
4-5 293T 細胞においてインポーチンの KD が CRBN や Aiolos の細胞内局在に与える影響の解析	95
4-6 OPM-2 細胞においてインポーチンの KD が IRF4 の細胞内分布に与える影響の解析	96
4-7 KPNB1 と CRL4 ^{CRBN} の相互作用の解析	97
4-7 まとめ	97
第 5 章 CRBN の細胞内局在が pomalidomide 感受性に与える影響の解析	109
5-1 諸言	109
5-2 NLS、NES 融合 CRBN 発現 OPM-2 細胞の作製	109
5-3 NLS、NES 融合 CRBN 発現 OPM-2 細胞の CRBN の細胞内局在	110
5-4 CRBN の細胞内局在が pomalidomide 依存的 Aiolos の分解に与える影響	110
5-5 NLS、NES 融合 CRBN 発現 293T 細胞の作製	111
5-6 293T 細胞において CRBN の細胞内局在が pomalidomide 依存的 Aiolos の分解に与える影響	111
5-7 293T 細胞において CRBN の細胞内局在が CC-885 依存的な GSPT1 の分解に与える影響	112
5-8 まとめ	113
第 6 章 考察	120

6-1	実験結果のまとめ	120
6-2	過去に報告された genome-wide screening との比較	120
6-3	KPNB1 が担う CRBN の細胞内局在制御	122
6-4	CRBN の細胞内分布が CRBN modulator の薬効に与える影響	122
6-5	変動遺伝子が pomalidomide 感受性に与える影響	123
	参考文献	128
	謝辞	132

遺伝子名一覧

Gene Symbol	Description
ABCB7	ATP binding cassette subfamily B member 7
ABCC12	ATP binding cassette subfamily C member 12
ACCN3	Amiloride-sensitive cation channel 1, neuronal isoform MDEG1
ACTC1	actin, alpha, cardiac muscle 1
ADAD1	adenosine deaminase domain containing 1
ADAMTS4	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 4
AKR7A2	aldo-keto reductase family 7 member A2
AMER2	APC membrane recruitment protein 2
AMN	amnion associated transmembrane protein
AMPK α	AMP-activated protein kinase α subunit
ANG	angiogenin
APCDD1L	APC down-regulated 1 like
AQR	aquarius intron-binding spliceosomal factor
ARCN1	archain 1
ARL8B	ADP ribosylation factor like GTPase 8B
ARRB1	arrestin beta 1
ASIC3	acid sensing ion channel subunit 3
ASNSD1	asparagine synthetase domain containing 1
ASTL	astacin like metalloendopeptidase
ATHL1	Acid Trehalase-Like 1
ATXN7L2	ataxin 7 like 2
BBOF1	basal body orientation factor 1
BCAS3	BCAS3, microtubule associated cell migration factor
BEND6	BEN domain containing 6
BEND7	BEN domain containing 7
BEX1	brain expressed X-linked 1
BIRC6	baculoviral IAP repeat containing 6
BLMH	bleomycin hydrolase
BMI1	BMI1 proto-oncogene, polycomb ring finger

(次ページへ続く)

遺伝子名一覧

Gene Symbol	Description
BRD4	bromodomain containing 4
BRD8	bromodomain containing 8
BTNL9	butyrophilin like 9
C1D	C1D nuclear receptor corepressor
C1QTNF9	C1q and tumor necrosis factor related protein 9
C6ORF48	chromosome 6 open reading frame 48
CAPNS1	calpain small subunit 1
CASP10	caspase 10
CAV3	caveolin 3
CC170/CCDC170	Coiled-Coil Domain Containing 170
CCNB1IP1	cyclin B1 interacting protein 1
CCNB3	cyclin B3
CCR5	C-C motif chemokine receptor 5
CCT4	chaperonin containing TCP1 subunit 4
CD164	CD164 molecule
CD83	CD83 molecule
CDC42BPG	CDC42 binding protein kinase gamma
CDK11A	cyclin dependent kinase 11A
CEMIP	cell migration inducing hyaluronan binding protein
CHD4	chromodomain helicase DNA binding protein 4
CILP2	cartilage intermediate layer protein 2
CK1 α / CSNK1A1	casein kinase 1 alpha 1
CKLF	chemokine like factor
CLC1/CLCN1	chloride voltage-gated channel 1
CLDN10	claudin 10
CLDN11	claudin 11
CMTM3	CKLF like MARVEL transmembrane domain containing 3
CNOT4	CCR4-NOT transcription complex subunit 4
COL6A6	collagen type VI alpha 6 chain

(次ページへ続く)

遺伝子名一覧

Gene Symbol	Description
COPB1	coatamer protein complex subunit beta 1
COPB2	coatamer protein complex subunit beta 2
COPS1 / GPS1	COP9 signalosome subunit 1 / G protein pathway suppressor 1
COPS2	COP9 signalosome subunit 2
COPS3	COP9 signalosome subunit 3
COPS4	COP9 signalosome subunit 4
COPS5	COP9 signalosome subunit 5
COPS6	COP9 signalosome subunit 6
COPS7A	COP9 signalosome subunit 7A
COPS8	COP9 signalosome subunit 8
COPZ1	coatamer protein complex subunit zeta 1
CORO1A	coronin 1A
COX15	COX15, cytochrome c oxidase assembly homolog
COX5B	cytochrome c oxidase subunit 5B
CPN2	carboxypeptidase N subunit 2
CPNE8	copine 8
CRBN	cereblon
CRNKL1	crooked neck pre-mRNA splicing factor 1
CRYBB3	crystallin beta B3
CRYGA	crystallin gamma A
CSNK1G3	casein kinase 1 gamma 3
CUL4A	cullin 4A
CUL4B	cullin 4B
DAPK1	death associated protein kinase 1
DDB1	damage specific DNA binding protein 1
DDB2	damage specific DNA binding protein 2
DDX41	DEAD-box helicase 41
DDX47	DEAD-box helicase 47
DDX54	DEAD-box helicase 54

(次ページへ続く)

遺伝子名一覧

Gene Symbol	Description
DHX15	DEAH-box helicase 15
DNAJA2	DnaJ heat shock protein family 2
DOPEY1	dopey family member 1
DPF2	double PHD fingers 2
DSC2	desmocollin 2
DYNC1H1	dynein cytoplasmic 1 heavy chain 1
DYRK4	dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 4
EBF2	early B-cell factor 2
EFS	embryonal Fyn-associated substrate
EIF2S2	eukaryotic translation initiation factor 2 subunit beta
EIF3B	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B
EIF3D	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D
EIF4A3	eukaryotic translation initiation factor 4A3
EIF4G2	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2
EIF4G3	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3
ELMSAN1	ELM2 and Myb/SANT domain containing 1
ERRFI1	ERBB receptor feedback inhibitor 1
ESRRB	estrogen related receptor beta
EVI2A	ecotropic viral integration site 2A
EXOC6B	exocyst complex component 6B
EYA2	EYA transcriptional coactivator and phosphatase 2
FAM188A	family with sequence similarity 188 member A
FAM53B	family with sequence similarity 53 member B
FAM76B	family with sequence similarity 76 member B
FBN1	fibrillin 1
FECH	ferrochelatase
FFAR1	free fatty acid receptor 1
FFAR2	free fatty acid receptor 2
FGD1	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 1

(次ページへ続く)

遺伝子名一覧

Gene Symbol	Description
FKTN	fukutin
FLJ42709	Full-Length Long Japan 42709 / Nuclear Receptor Subfamily 2
/ NR2F1-AS1	Group F Member 1 antisense RNA 1
FLJ44635	Full-Length Long Japan 42709, Tumor Protein, Translationally- Controlled 1-like protein
FMR1	fragile X mental retardation 1
FOXL1	forkhead box L1
FRMD1	FERM domain containing 1
G2E3	G2/M-phase specific E3 ubiquitin protein ligase
GABRR1	gamma-aminobutyric acid type A receptor rho1 subunit
GALNT3	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3
GART	phosphoribosylglycinamide formyltransferase
GAS2L1	growth arrest specific 2 like 1
GCSAM	germinal center associated signaling and motility
GH2	growth hormone 2
GLUL	glutamate-ammonia ligase
GNB5	G protein subunit beta 5
GOLGA8G	golgin A8 family member G
GOLIM4	golgi integral membrane protein 4
GPANK1	G-patch domain and ankyrin repeats 1
GPD1L	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like
GPR84	G protein-coupled receptor 84
GPSM2	G-protein signaling modulator 2
GSE1	Gse1 coiled-coil protein
GSPT1	G1 to S phase transition 1
GSTZ1	glutathione S-transferase zeta 1
GTPBP2	GTP binding protein 2
GUCY2F	guanylate cyclase 2F, retinal
HACD1	3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 1

(次ページへ続く)

遺伝子名一覧

Gene Symbol	Description
HEG1	heart development protein with EGF like domains 1
HERPUD1	homocysteine inducible ER protein with ubiquitin like domain 1
HEXIM1	hexamethylene bisacetamide inducible 1
HIST1H2BG	histone cluster 1 H2B family member g
HIST1H4I	histone cluster 1 H4 family member i
HIST3H2A	histone cluster 3 H2A
HLF	HLF, PAR bZIP transcription factor
HMCEs	5-hydroxymethylcytosine
HMGN2	high mobility group nucleosomal binding domain 2
HNRNPAB	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B
HNRNPC	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C
HNRNPK	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
HOXA11	homeobox A11
HOXB13	homeobox B13
HOXD10	homeobox D10
HPS1	HPS1, biogenesis of lysosomal organelles complex 3 subunit 1
HTR1B	5-hydroxytryptamine receptor 1B
IFNA6	interferon alpha 6
IFNB1	interferon beta 1
IGF2BP3	insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 3
IGHMBP2	immunoglobulin mu binding protein 2
IK	IK cytokine, down-regulator of HLA II
IKZF1	IKAROS family zinc finger 1
IKZF3	IKAROS family zinc finger 3
IL17REL	interleukin 17 receptor E like
IMPG2	interphotoreceptor matrix proteoglycan 2
IPO11	importin 11
IQSEC1	IQ motif and Sec7 domain 1
IRF4	interferon regulatory factor 4

(次ページへ続く)

遺伝子名一覧

Gene Symbol	Description
IRX2	iroquois homeobox 2
ISCU	iron-sulfur cluster assembly enzyme
ITGA2	integrin subunit alpha 2
ITIH4	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family member 4
JAG1	jagged 1
KBTBD4	kelch repeat and BTB domain containing 4
KCNMA1	potassium calcium-activated channel subfamily M alpha 1
KCTD2	potassium channel tetramerization domain containing 2
KCTD9	potassium channel tetramerization domain containing 9
KIAA0892 / MAU2	KIAA0892 / MAU2 Sister Chromatid Cohesion Factor
KIAA1109	KIAA1109
KIAA2022	KIAA2022
KIF11	kinesin family member 11
KIF20B	kinesin family member 20B
KIN	Kin17 DNA and RNA binding protein
KLK10	kallikrein related peptidase 10
KLK3	kallikrein related peptidase 3
KNSTRN	kinetochore localized astrin/SPAG5 binding protein
KPNB1	karyopherin subunit beta 1
KRT9	keratin 9
KXD1	KxDL motif containing 1
L3HYPDH	trans-L-3-hydroxyproline dehydratase
LAIR1	leukocyte associated immunoglobulin like receptor 1
LAX1	lymphocyte transmembrane adaptor 1
LCE3C	late cornified envelope 3C
LDB1	LIM domain binding 1
LDHC	lactate dehydrogenase C
LFNG	LFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase
LGR4	leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 4

(次ページへ続く)

遺伝子名一覧

Gene Symbol	Description
LHFP	lipoma HMGIC fusion partner
LILRA3	leukocyte immunoglobulin like receptor A3
LIMA1	LIM domain and actin binding 1
LINC01139	long intergenic non-protein coding RNA 1139
LIPM	lipase family member M
LNK1	ligand of numb-protein X 1
LPAR2	lysophosphatidic acid receptor 2
LPIN3	lipin 3
LRRK1	leucine rich repeat kinase 1
LRSAM1	leucine rich repeat and sterile alpha motif containing 1
LVRN	laeverin
MACROD2	MACRO domain containing 2
MAF1	MAF1 homolog, negative regulator of RNA polymerase III
MAP3K19	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 19
MAU2	MAU2 sister chromatid cohesion factor
MBD1	methyl-CpG binding domain protein 1
MBD6	methyl-CpG binding domain protein 6
MCM7	minichromosome maintenance complex component 7
MCOLN2	mucolipin 2
MED11	mediator complex subunit 11
MEIS2	Meis homeobox 2
METTL7A	methyltransferase like 7A
MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
MIR503HG	MIR503 host gene
MMP16	matrix metalloproteinase 16
MRAS	muscle RAS oncogene homolog
MRC1	mannose receptor, C type 1
MRPL48	mitochondrial ribosomal protein L48
MRPS31	mitochondrial ribosomal protein S31

(次ページへ続く)

遺伝子名一覧

Gene Symbol	Description
MS4A13	membrane spanning 4-domains A13
MS4A2	membrane spanning 4-domains A2
MSLN	mesothelin
MSR1	macrophage scavenger receptor 1
MT1M	metallothionein 1M
MT1X	metallothionein 1X
MTNR1A	melatonin receptor 1A
MTO1	mitochondrial tRNA translation optimization 1
MTTP	microsomal triglyceride transfer protein
MYC / c-Myc	cellular myelocytomatosis
MYL1	myosin light chain 1
MYO5B	myosin VB
NEDD8	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8
NEK6	NIMA related kinase 6
NEK8	NIMA related kinase 8
NHP2L1	NHP2-like protein 1
NIPA1	non imprinted in Prader-Willi/Angelman syndrome 1
NLRP3	NLR family pyrin domain containing 3
NMD3	NMD3 ribosome export adaptor
NME4	NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 4
NOS1	nitric oxide synthase 1
NOTCH1	notch 1
NPPC	natriuretic peptide C
NPTX2	neuronal pentraxin 2
NR1D1	nuclear receptor subfamily 1 group D member 1
NRK	Nik related kinase
NRXN1	neurexin 1
NSUN2	NOP2/Sun RNA methyltransferase family member 2
NT5E	5'-nucleotidase ecto

(次ページへ続く)

遺伝子名一覧

Gene Symbol	Description
NUDT2	nudix hydrolase 2
NUDT9	nudix hydrolase 9
NUP133	nucleoporin 133
OBSCN	obscurin, cytoskeletal calmodulin and titin-interacting RhoGEF
OGT	O-linked N-acetylglucosamine
OR10A7	olfactory receptor family 10 subfamily A member 7
OR10G2	olfactory receptor family 10 subfamily G member 2
OR13C9	olfactory receptor family 13 subfamily C member 9
OR13G1	olfactory receptor family 13 subfamily G member 1
OR4A15	olfactory receptor family 4 subfamily A member 15
OR4C11	olfactory receptor family 4 subfamily C member 11
OR51T1	olfactory receptor family 51 subfamily T member 1
OR5B12	olfactory receptor family 5 subfamily B member 12
OR5H6	olfactory receptor family 5 subfamily H member 6
OR6B3	olfactory receptor family 6 subfamily B member 3
OR6C6	olfactory receptor family 6 subfamily C member 6
OR7G1	olfactory receptor family 7 subfamily G member 1
OR7G3	olfactory receptor family 7 subfamily G member 3
OR9Q2	olfactory receptor family 9 subfamily Q member 2
P4HA2	prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 2
PABPN1	poly (A) -Binding Protein. Nuclear I
PAF1	polymerase associated factor 1
PAM16	presequence translocase associated motor 16 homolog
PARD6A	par-6 family cell polarity regulator alpha
PBOV1	prostate and breast cancer overexpressed 1
PCDH18	protocadherin 18
PEX14	peroxisomal biogenesis factor 14
PEX2	peroxisomal biogenesis factor 2
PFAS	phosphoribosylformylglycinamide synthase

(次ページへ続く)

遺伝子名一覧

Gene Symbol	Description
PGAM2	phosphoglycerate mutase 2
PGGHG	protein-glucosylgalactosylhydroxylysine glucosidase
PGR	progesterone receptor
PHF19	PHD finger protein 19
PHF5A	PHD finger protein 5A
PIGO	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class O
PIM2	Pim-2 proto-oncogene, serine/threonine kinase
PKN3	protein kinase N3
PLA1A	phospholipase A1 member A
PLIN1	perilipin 1
PLOD3	procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3
PLPPR1	phospholipid phosphatase related 1
PNISR	PNN interacting serine and arginine rich protein
PNPLA6	patatin like phospholipase domain containing 6
POLR2A	RNA polymerase II subunit A
POMGNT1	protein O-linked mannose N-acetylglucosaminyltransferase 1
POU3F2	POU class 3 homeobox 2
PPEF1	protein phosphatase with EF-hand domain 1
PPFIA3	PTPRF interacting protein alpha 3
PPM1L	protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent 1L
PPP1R1C	protein phosphatase 1 regulatory inhibitor subunit 1C
PRADC1	protease associated domain containing 1
PRAME	preferentially expressed antigen in melanoma
PRDM2	PR/SET domain 2
PSCA	prostate stem cell antigen
PSMA1	proteasome subunit alpha 1
PSMA2	proteasome subunit alpha 2
PSMA3	proteasome subunit alpha 3
PSMA5	proteasome subunit alpha 5

(次ページへ続く)

遺伝子名一覧

Gene Symbol	Description
PSMA6	proteasome subunit alpha 6
PSMC6	proteasome 26S subunit, ATPase 6
PSMD1	proteasome 26S subunit, non-ATPase 1
PTPMT1	protein tyrosine phosphatase, mitochondrial 1
PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type C
PWP2	PWP2 periodic tryptophan protein homolog
RABEP2	rabaptin, RAB GTPase binding effector protein 2
RAD21	RAD21 cohesin complex component
RBM3	RNA binding motif
RBX1 / ROC1	ring-box 1
REEP4	receptor accessory protein 4
RESP18	regulated endocrine specific protein 18
RFPL4B	ret finger protein like 4B
RFTN1	raftlin, lipid raft linker 1
RGS6	regulator of G-protein signaling 6
RGSL1	regulator of G-protein signaling like 1
RIPK3	receptor interacting serine/threonine kinase 3
RND3	Rho family GTPase 3
RNF14	ring finger protein 14
RPGRIP1	retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1
RPL10	ribosomal protein L10
RPL14	ribosomal protein L14
RPL23	ribosomal protein L23
RPL23A	ribosomal protein L23a
RPL30	ribosomal protein L30
RPL31	ribosomal protein L31
RPL32	ribosomal protein L32
RPL35	ribosomal protein L35
RPL36	ribosomal protein L36

(次ページへ続く)

遺伝子名一覧

Gene Symbol	Description
RPL36P14	ribosomal protein L36 pseudogene 14
RPL37A	ribosomal protein L37a
RPL5	ribosomal protein L5
RPL6	ribosomal protein L6
RPL7	ribosomal protein L7
RPL8	ribosomal protein L8
RPS11	ribosomal protein S11
RPS13	ribosomal protein S13
RPS14	ribosomal protein S14
RPS26	ribosomal protein S26
RPS45 / TESSP5	Serine protease 45 / Testis serine protease 5
RPUSD3	RNA pseudouridylate synthase domain containing 3
RRM1	ribonucleotide reductase catalytic subunit M1
RSF1	remodeling and spacing factor 1
RSPO4	R-spondin 4
RTF1	RTF1 homolog, Paf1/RNA polymerase II complex component
RTN4IP1	reticulon 4 interacting protein 1
SALL4	spalt like transcription factor 4
SAR1B	secretion associated Ras related GTPase 1B
SEC22C	SEC22 homolog C, vesicle trafficking protein
SETX	senataxin
SF3A1	splicing factor 3a subunit 1
SF3A3	splicing factor 3a subunit 3
SHCBP1	SHC binding and spindle associated 1
SHROOM4	shroom family member 4
SKIV2L2	Ski2 like RNA helicase 2
SKP1	S-phase kinase associated protein 1
SLC25A30	solute carrier family 25 member 30
SLC4A11	solute carrier family 4 member 11

(次ページへ続く)

遺伝子名一覧

Gene Symbol	Description
SLC7A5P2	solute carrier family 7 member 5 pseudogene 2
SLF2	SMC5-SMC6 complex localization factor 2
SLU7	SLU7 homolog, splicing factor
SMARCC2	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin subfamily c member 2
SMPD1	sphingomyelin phosphodiesterase 1
SNAI3	snail family transcriptional repressor 3
SNRNP200	small nuclear ribonucleoprotein U5 subunit 200
SNRPD1	small nuclear ribonucleoprotein D1 polypeptide
SNRPD2	small nuclear ribonucleoprotein D2 polypeptide
SNRPD3	small nuclear ribonucleoprotein D3 polypeptide
SNRPE	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide E
SNRPG	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G
SNU13	SNU13 homolog, small nuclear ribonucleoprotein
SNURF	SNRPN upstream reading frame
SNX19	sorting nexin 19
SNX32	sorting nexin 32
SOHLH1	spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 1
SON	SON DNA binding protein
SOX8	SRY-box 8
SPG20	spastic paraplegia 20
SPHK1	sphingosine kinase 1
SPN	sialophorin
SPOCK2	SPARC/osteonectin, cwcv and kazal like domains proteoglycan 2
SRCAP	Snf2 related CREBBP activator protein
SRP19	signal recognition particle 19
SRPK1	SRSF protein kinase 1
SS18	SS18, nBAF chromatin remodeling complex subunit
SSH2	slingshot protein phosphatase 2

(次ページへ続く)

遺伝子名一覧

Gene Symbol	Description
STIL	SCL/TAL1 interrupting locus
STK4	serine/threonine kinase 4
STMN2	stathmin 2
SUMF1	sulfatase modifying factor 1
SUPV3L1	Suv3 like RNA helicase
SYTL2	synaptotagmin like 2
TAB1	TGF-beta activated kinase 1
TAS2R1	taste 2 receptor member 1
TAS2R19	taste 2 receptor member 19
TCEB1	transcription elongation factor B subunit 1
TFE3	transcription factor binding to IGHM enhancer 3
THBS3	thrombospondin 3
THNSL1	threonine synthase like 1
TIE1	tyrosine kinase with immunoglobulin like and EGF like domains 1
TJP1	tight junction protein 1
TMEM144	transmembrane protein 144
TMEM151B	transmembrane protein 151B
TMEM230	transmembrane protein 230
TMEM263	transmembrane protein 263
TMEM59	transmembrane protein 59
TMOD1	tropomodulin 1
TMPRSS2	transmembrane protease, serine 2
TNIP1	TNFAIP3 interacting protein 1
TNNT3	troponin T3, fast skeletal type
TPGS1	tubulin polyglutamylase complex subunit 1
TRIM62	tripartite motif containing 62
TRIM68	tripartite motif containing 68
TRMT5	tRNA methyltransferase 5
TRMT61B	tRNA methyltransferase 61B

(次ページへ続く)

遺伝子名一覧

Gene Symbol	Description
TTL4	tubulin tyrosine ligase like 4
TUBA1B	tubulin alpha 1b
TWSG1	twisted gastrulation BMP signaling modulator 1
TXNDC15	thioredoxin domain containing 15
TYMP	thymidine phosphorylase
U2AF2	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 2
UBE2D1	ubiquitin conjugating enzyme E2 D1
UBE2N	ubiquitin conjugating enzyme E2 N
UBR5	ubiquitin protein ligase E3 component n-recogin 5
UGDH	UDP-glucose 6-dehydrogenase
ULK3	unc-51 like kinase 3
USE1	unconventional SNARE in the ER 1
USP16	ubiquitin specific peptidase 16
USP39	ubiquitin specific peptidase 39
USP49	ubiquitin specific peptidase 49
USP5	ubiquitin specific peptidase 5
USP9X	ubiquitin specific peptidase 9, X-linked
UVSSA	UV stimulated scaffold protein A
VAMP1	vesicle associated membrane protein 1
VAMP3	vesicle associated membrane protein 3
VIPAS39	VPS33B interacting protein, apical-basolateral polarity regulator, spe-39 homolog
VNN3	vanin 3
WDR3	WD repeat domain 3
WDR76	WD repeat domain 76
WNK4	WNK lysine deficient protein kinase 4
WNT2B	Wnt family member 2B
WNT7B	Wnt family member 7B
WTAP	Wilms tumor 1 associated protein

(次ページへ続く)

遺伝子名一覧

Gene Symbol	Description
WTH3DI	RAB6C-like
WWTR1	WW domain containing transcription regulator 1
YPEL3	yippee like 3
ZBED3	zinc finger BED-type containing 3
ZC3H12B	zinc finger CCCH-type containing 12B
ZCCHC11	zinc finger CCHC-type containing 11
ZFP37	ZFP37 zinc finger protein
ZFP91	ZFP91 zinc finger protein
ZKSCAN1	zinc finger with KRAB and SCAN domains 1
ZNF557	zinc finger protein 557
ZNF587	zinc finger protein 587
ZNF790	zinc finger protein 790
ZNFX1	zinc finger NFX1-type containing 1
ZRANB2	zinc finger RANBP2-type containing 2
ZRANB2	zinc finger RANBP2-type containing 2

略語一覧

Abbreviation	Description
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CRL4 ^{CRBN}	cullin-RING ubiquitin ligase
CSN	Constitutive photomorphogenesis 9 (COP9) Signalosome
DLBCL	diffuse large B-cell lymphoma
ECL	Electrochemiluminescence
FC	fold change
FDA	Food and Drug Administration
FDR	false discovery rate
gDNA	genomic DNA
GFP	green fluorescent protein
GO	gene ontology
GST	glutathione S transferase
HTS	high-throughput DNA sequencing
IMiDs	Immunomodulatory drugs
KD	knockdown
KO	knockout
Len	Lenalidomide
NES	nuclear export signal
NLS	nuclear localization signal
NRP	New Rank Product
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
Pom	pomalidomide
PROTAC	proteolysis targeting chimeras
qPCR	quantitative PCR
qRT-PCR	quantitative reverse transcriptase PCR
RFP	red fluorescent protein
RNAi	RNA interference
RP	Rank Product

(次ページへ続く)

略語一覽

Abbreviation	Description
RPM	read per million
SD	standard deviation
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	short interfering RNA

第1章 背景

1-1 thalidomide

thalidomide は 1950 年代に西ドイツのグリュネンタール社によって開発され、当初は副作用のない安全な睡眠薬として販売されたが、妊婦が服用すると胎児に重大な奇形を引き起こすことが発覚し thalidomide は市場から撤退した¹。しかし、その後も研究は続けられ、thalidomide はハンセン病 (Leprosy) や多発性骨髄腫 (Multiple Myeloma) といった難治性疾患に対して治療効果を示すなど、複数の薬効を持つことが明らかにされた^{2,3} (図 1-1)。そして thalidomide はアメリカの FDA により、1998 年に erythema nodosum leprosum への治療薬として、2006 年に多発性骨髄腫に対する治療薬として認可された。

1-2 thalidomide 標的タンパク質 CRBN

cereblon (CRBN) は当研究室により thalidomide の催奇形性に関わる標的として同定された細胞性タンパク質であり、その後の研究で thalidomide とその誘導体の様々な薬理活性にも必須であることが報告された^{1,4,5}。CRBN は DNA damage binding protein 1 (DDB1)、cullin 4 A/B (CUL4A/B)、Ring box 1 (RBX1/ROC1) とともに E3 ユビキチンリガーゼ複合体 CRL4^{CRBN} を形成し、CRBN はユビキチン化基質を認識するサブユニットとして働く (図 1-2)。CRL4^{CRBN} によってポリユビキチン化された基質は 26S プロテアソームに運ばれ分解される⁶。また、CRL4^{CRBN} を含む Cullin-base ユビキチンリガーゼ複合体の活性は Neural precursor cell Expressed Developmentally Down-regulated protein 8 (NEDD8) の修飾 (neddylation) によって調節されており、onstitutive photomorphogenesis 9 signalosome (COP9 signalosome/CSN) によって脱 NEDD8 修飾 (deneddylation) が行われている^{7,8}。

1-3 thalidomide 誘導体

thalidomide の多岐にわたる有用性が注目され、最近では複数の thalidomide 誘導体が開発されている (図 1-3)。lenalidomide は 2000 年代に多発性骨髄腫や 5q-deletion associated myelodysplastic syndrome (5q-syndrome) の治療薬として認可され、pomalidomide は 2013 年に多発性骨髄腫に対する治療薬として認可された。

また、CC-885 や CC-122 は最近新しく開発された thalidomide 誘導体で、CC-885 は血液性がんだけでなく上皮性がんに対しても抗がん活性を持つことが報告され、CC-122 は diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) に対する治療効果が期待されている⁹。このように thalidomide 誘導体の薬理学的価値は高まっており、更なる拡がりも期待されている。

1-4 pomalidomide による多発性骨髄腫に対する抗がん活性

pomalidomide は形質細胞のがんである多発性骨髄腫に対して治療効果が認められている。形質細胞は免疫グロブリンを産生する。しかし、がん化した形質細胞は M タンパクとよばれる正常に機能しない異常なグロブリンを産出し、正常な免疫グロブリンの産生が低下する¹⁰。多発性骨髄腫は 60 歳以上で発病するケースが多く、骨病変、腎臓の機能低下などの症状が現れる。代表的な治療法はメルファランとプレドリンの併用療法であり、再発した患者に対してボルテゾミブと lenalidomide や pomalidomide を組み合わせた併用投与がなされている^{2,11}。多発性骨髄腫細胞に pomalidomide を処理すると、pomalidomide が結合した CRL4^{CRBN} によって転写因子 Aiolos がポリユビキチン化、分解される¹²⁻¹⁴(図 1-4)。そしてその下流では多発性骨髄腫細胞の生存に必須な転写因子 cellular myelocytomatosis (c-Myc) や interferon regulatory factor 4 (IRF4) の発現が抑制され、多発性骨髄腫細胞の増殖が阻害されることによって pomalidomide は抗がん活性を発揮する¹⁵。

1-5 thalidomide 誘導体による CRBN のユビキチン化基質の制御

様々な thalidomide 誘導体の多岐に渡る薬理作用はすべて CRBN を介して発現すると考えられている。興味深いことに、thalidomide ならびにその誘導体は CRL4^{CRBN} の基質認識レセプターである CRBN に結合し、その基質特異性を変化させることによって薬効を発揮していることが分かっている¹⁵(図 1-5)。すなわち、thalidomide ならびにその誘導体は CRL4^{CRBN} の機能阻害と機能獲得を同時に引き起こし、CRL4^{CRBN} の「天然基質」への結合を阻害してそれらのユビキチン化とタンパク質分解を阻害するとともに、通常は CRL4^{CRBN} の基質とならない「ネオ基質」への結合を誘導してそれらのユビキチン化とタンパク質分解を誘導する。

詳細な生化学的解析によって thalidomide や基質タンパク質との結合に重要な CRBN のアミノ酸残基や、基質タンパク質側の degron 配列が同定されており、さらに X 線結晶構造解析によって CRBN/thalidomide 誘導体/ネオ基質タンパク質の 3 者複合体構造が原子レベルで明らかとなっている¹⁶⁻¹⁸。thalidomide は phthalimide 基と glutarimide 基という 2 つの分子団からなるが、CRBN との結合には glutarimide 基が重要であり、phthalimide 基は CRBN から突き出すような形で CRBN の thalidomide 結合ポケットにはまり込む。さらに、突出した phthalimide 基はネオ基質の degron 配列とコンタクトし、thalidomide が酵素と基質を橋渡ししていることが 3 者複合体の X 線結晶構造から明らかとなっている。このことから、thalidomide は molecular glue すなわち分子糊として働くと言われている。これまでに開発された様々な thalidomide 誘導体は主に phthalimide 側が改変されている (図 1-3)。phthalimide 側の分子構造の違いによって、異なる thalidomide 誘導体は異なるネオ基質を CRL4^{CRBN} 複合体上へとリクルートし、それらのユビキチン化と分解を誘導することが分かってきている。そしてこのことが、thalidomide 誘導体の多様な薬理作用の根底にあると考えられている。

thalidomide 誘導体が存在しない場合の CRBN の天然基質の一つとして Homeobox protein Meis2 (MEIS2) が知られており、thalidomide 誘導体の存在下では MEIS2 の分解が抑えられる¹⁶。一方で lenalidomide や pomalidomide の存在下では転写因子 Ikaros family zinc finger protein 1 (IKZF1/Ikaros) や Ikaros family zinc finger protein 3 (IKZF3/Aiolos) がネオ基質となる¹²⁻¹⁴。Ikaros や Aiolos は血球細胞の分化や多発性骨髄腫細胞の生存に必須であるため、lenalidomide や pomalidomide 処理による Ikaros や Aiolos の分解によって多発性骨髄腫に対する抗がん活性を引き起こす。また、lenalidomide 特異的に casein kinase 1 alpha 1 (CK1α) がネオ基質としてユビキチン化、分解され、lenalidomide による CK1α の分解は lenalidomide の 5q-syndrome に対する治療効果に関与している¹⁹。そして CC-885 の存在下では翻訳因子 G1 to S phase transition 1 (GSPT1) が CRBN のネオ基質としてユビキチン化、分解され、このことが CC-885 の抗がん作用に関わっている⁹。また、CC-122 に特異的なネオ基質は見つかっていないが、DLBCL への治療効果に CRBN が重要であることが示されている。

かつて thalidomide 誘導体は免疫調整作用から Immunomodulatory drugs (IMiDs) と呼ばれていたが、それぞれの thalidomide 誘導体が CRBN のユビキチ

ン化基質を変化させることで様々な薬理活性を引き起こすため、最近では CRBN modulator と呼ばれている。

1-6 低分子を用いたタンパク質分解技術

近年、細胞内タンパク質の分解を誘導する化合物として Proteolysis Targeting Chimeras (PROTAC) が注目されている。PROTAC は E3 ユビキチンリガーゼ複合体に結合する部位と標的タンパク質に結合する部位を持つ低分子化合物で、PROTAC を介して標的タンパク質と E3 ユビキチンリガーゼ複合体が結合し、標的タンパク質のユビキチン化・分解が誘導される²⁰ (図 1-6)。具体例として、Bromodomain-containing protein 4 (BRD4) という創薬標的タンパク質に特異的に結合する化合物 JQ1 を thalidomide の phthalimide 側に付加したキメラ化合物を合成し、細胞に処理したところ、BRD4 の分解が誘導された²¹。最近このような成功例が多数報告されており、細胞内の CRBN を標的とした PROTAC が新たな創薬アプローチとして有望視されている。従来の低分子医薬や抗体医薬ではヒトのタンパク質のうち 20-25%程度しか治療標的とすることができなかったが、PROTAC を用いることで標的タンパク質の拡がり期待されている。こういったことから、thalidomide 系の化合物 (CRBN modulator) によって引き起こされる薬理作用の分子メカニズムを詳細に明らかにすることは重要である。

1-7 shRNA ライブラリスクリーニング

short hairpin RNA (shRNA) ライブラリスクリーニングは shRNA による RNA interference を利用したノックダウン (KD) 手法とレンチウイルスベクターシステム、そして次世代シーケンス (High throughput sequence: HTS) の技術を組み合わせた画期的な手法で、ゲノムワイドな KD 表現型の解析を一度にすることができる (図 1-7)。それまでの siRNA のトランスフェクションの実験系では siRNA は複製されないため一過的な KD を行うことしかできないが、shRNA 発現レンチウイルスベクターの実験系を用いると、shRNA 発現配列が宿主細胞のゲノムに組み込まれるため、恒常的な KD を行うことができる。また、siRNA ライブラリでは 384 well plate を複数枚使用しての実験であるため、金銭的、技術的な面での障害が大きい。しかし shRNA ライブラリ系では 1 つの dish 上での実験となり低コストかつ少人数での実験が可能である。そして各 shRNA ク

ローン存在量の定量にはあらかじめ導入した、各 shRNA にユニークなバーコード配列 (barcode) を HTS により検出することで定量の正確性が高く、セルソーティングを組み合わせること等で幅広い実験系に応用が可能である。

1-8 本研究の目的

CRBN modulators の薬理作用の詳細を明らかにする上で、薬理作用の中心となる CRBN の制御機構を明らかにすることは極めて重要だが、これまでの研究は研究手法は生化学的解析手法が中心であり、CRBN modulator によって新たにユビキチン化、分解を受ける CRBN の基質の発見に留まっている。そこで本研究では多発性骨髄腫に対する pomalidomide の抗増殖作用を指標とした遺伝学的アプローチである shRNA ライブラリスクリーニングによって CRBN modulator の薬理作用の中心となる CRBN の関与する分子機構の全容解明を目指した (図 1-8)。

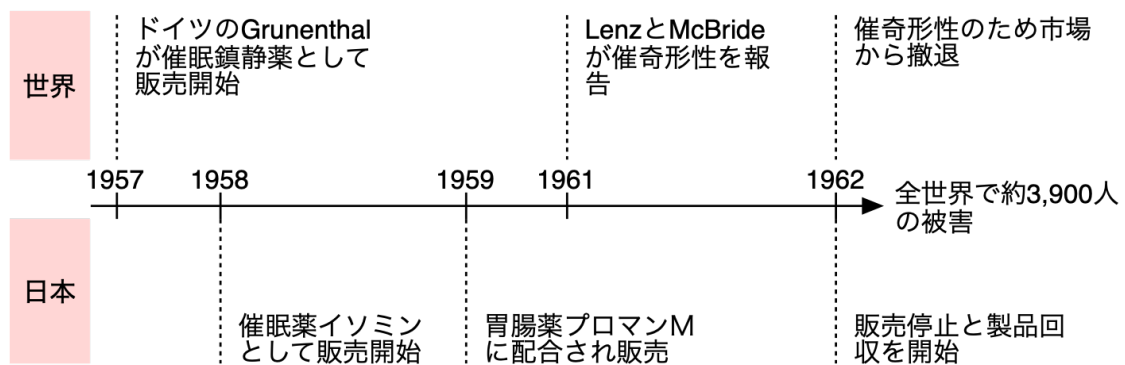


図 1-1 thalidomide の開発と市場からの撤退

Thalidomide は 1957 年にドイツの Grunenthal が開発、催眠鎮静薬として販売が解されたが、催奇形性のため 1962 年に日本を含む世界中で市場から撤退を開始した。

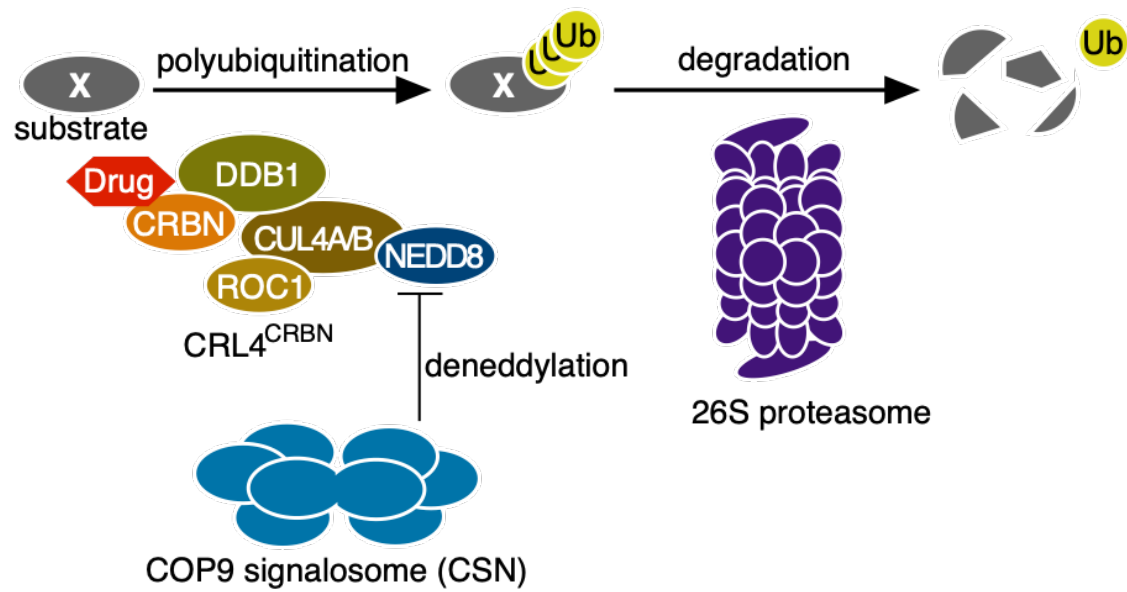


図 1-2 CRBN を中心とした分子経路

CRBN は CUL4、DDB1、ROC1 とともに E3 ユビキチンリガーゼ複合体 CUL4^{CRBN} を形成する。CUL4^{CRBN} の活性は NEDD8 修飾により調節され、COP9 signalosome によって NEDD8 が外される (deneddylation)。CUL4^{CRBN} は基質のポリユビキチン化を行い、ポリユビキチン化された基質は 26S プロテアソームにより分解される。

A

1950s~1960s

- ・催眠鎮静効果
- ・催奇形性
- ・ENLに対する治療効果

1990s

- ・TNF α 産生阻害による抗炎症作用
- ・血管新生阻害効果
- ・多発性骨髄腫 (MM) に対する治療効果

2000~

- ・MMや5q(del) MDSに対する治療効果 (lenalidomide)
- ・MMに対する治療効果 (pomalidomide)
- ・DLBCLに対する治療効果 (CC-122)
- ・AMLに対する治療効果 (CC-885)

B

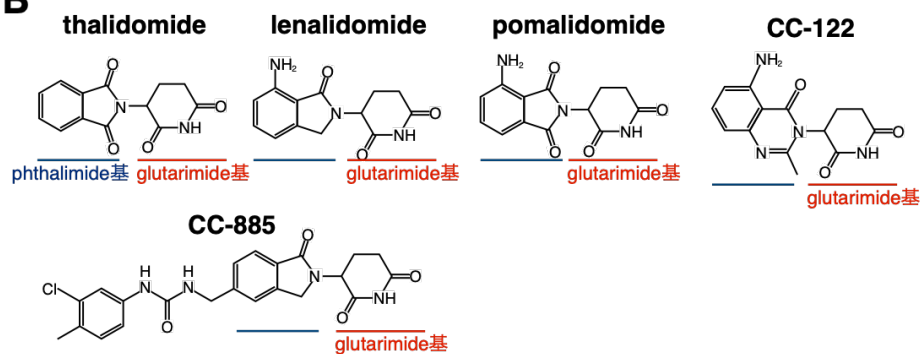


図 1-3 thalidomide と CRBN modulators

(A) thalidomide の期待効果。

(B) thalidomide や thalidomide 誘導体 (pomalidomide、lenalidomide、CC-885、CC-122) の構造式。thalidomide 誘導体で共通の glutarimide 基が CRBN の thalidomide ポケットに入り、多様な構造を有する phthalimide 基側が基質タンパク質の degron 配列と相互作用する。

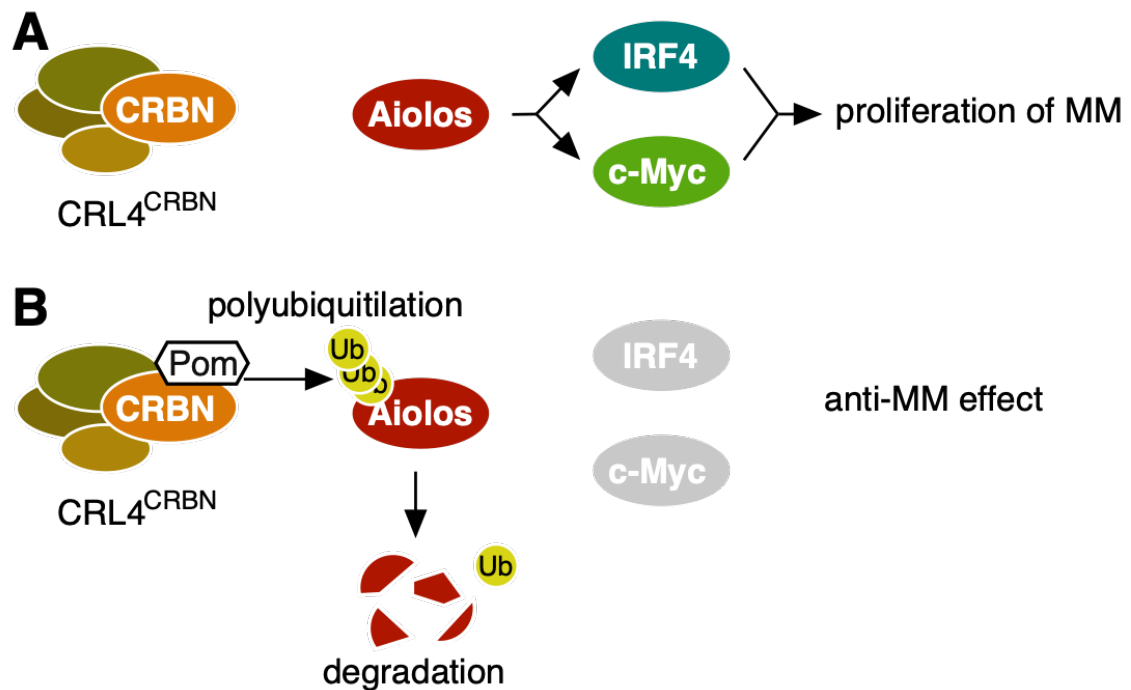


図 1-4 pomalidomide の抗がん活性に関する CRBN を中心とした分子経路

(A) pomalidomide 非存在下では CRL4^{CRBN} は Aiolos を分解しない。Aiolos の存在下では多発性骨髄腫 (multiple myeloma, MM) の生存に必須な IRF4 や c-Myc がよく発現している。

(B) pomalidomide 存在下では CRL4^{CRBN} によって Aiolos が分解され、IRF4 と c-Myc の発現が低下、多発性骨髄腫細胞の細胞増殖が阻害される。

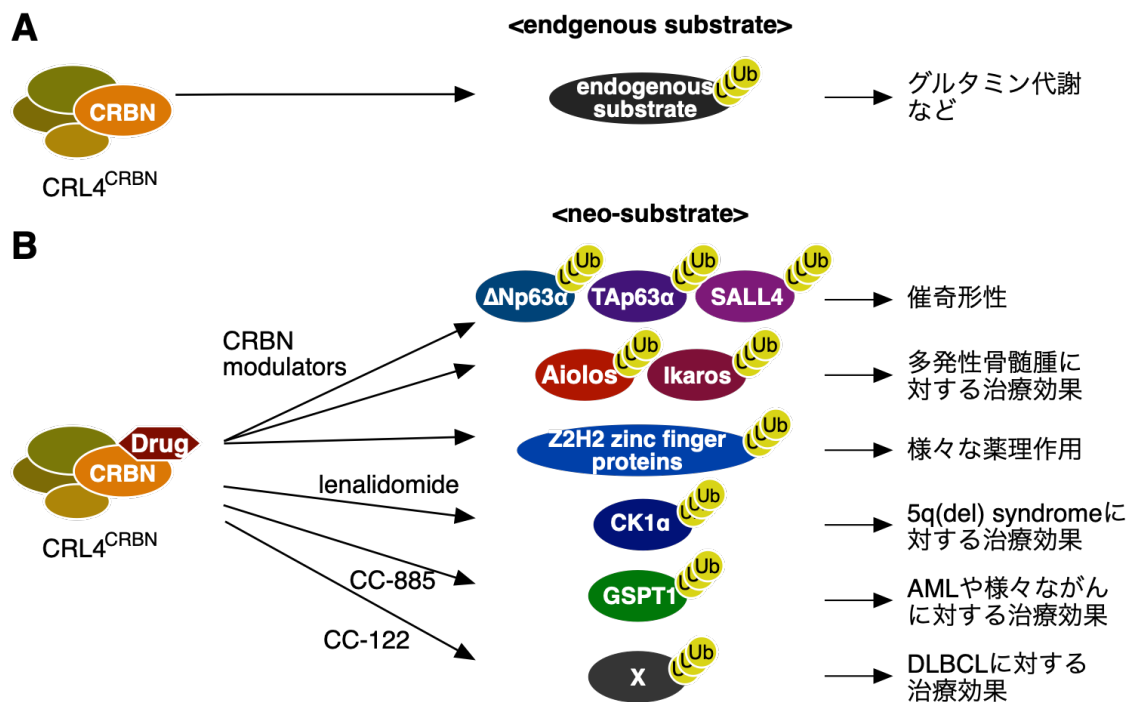


図 1-5 CRBN の thalidomide 誘導体依存的な基質

(A) CRL4^{CRBN} は CRBN modulator がいない場合、天然基質 (endogenous substrate) のユビキチン化・分解を誘導する。

(B) CRL4^{CRBN} は CRBN modulator がある場合、天然基質ではなくネオ基質 (neo-substrate) のユビキチン化・分解を誘導する。CRBN modulator によって様々な基質が分解され、種々の薬理作用を発揮する。

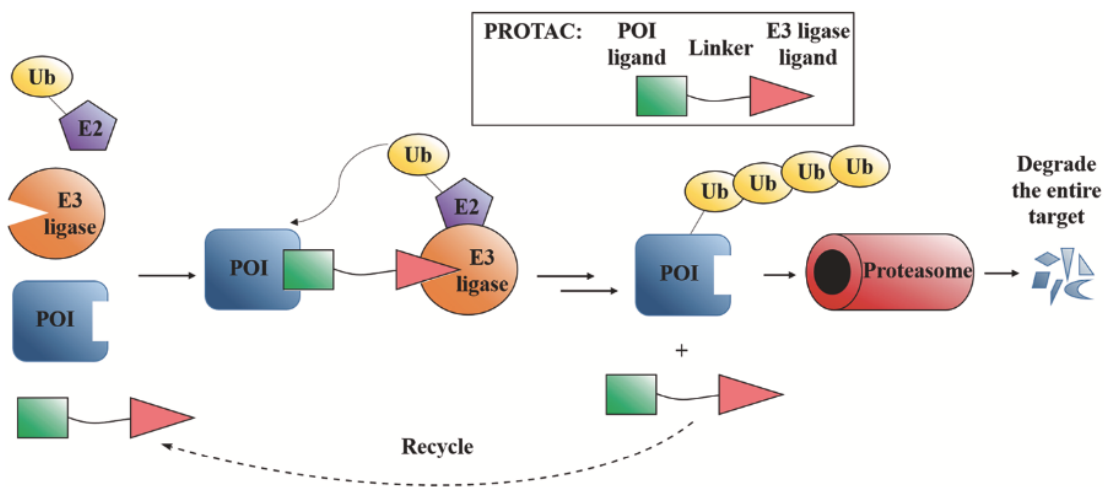


図 1-6 PROTAC の概要

低分子化合物 PROTAC は標的タンパク質 (Protein of interest: POI) と E3 ユビキチンリガーゼ複合体を架橋し、標的タンパク質の分解を誘導する²⁰。

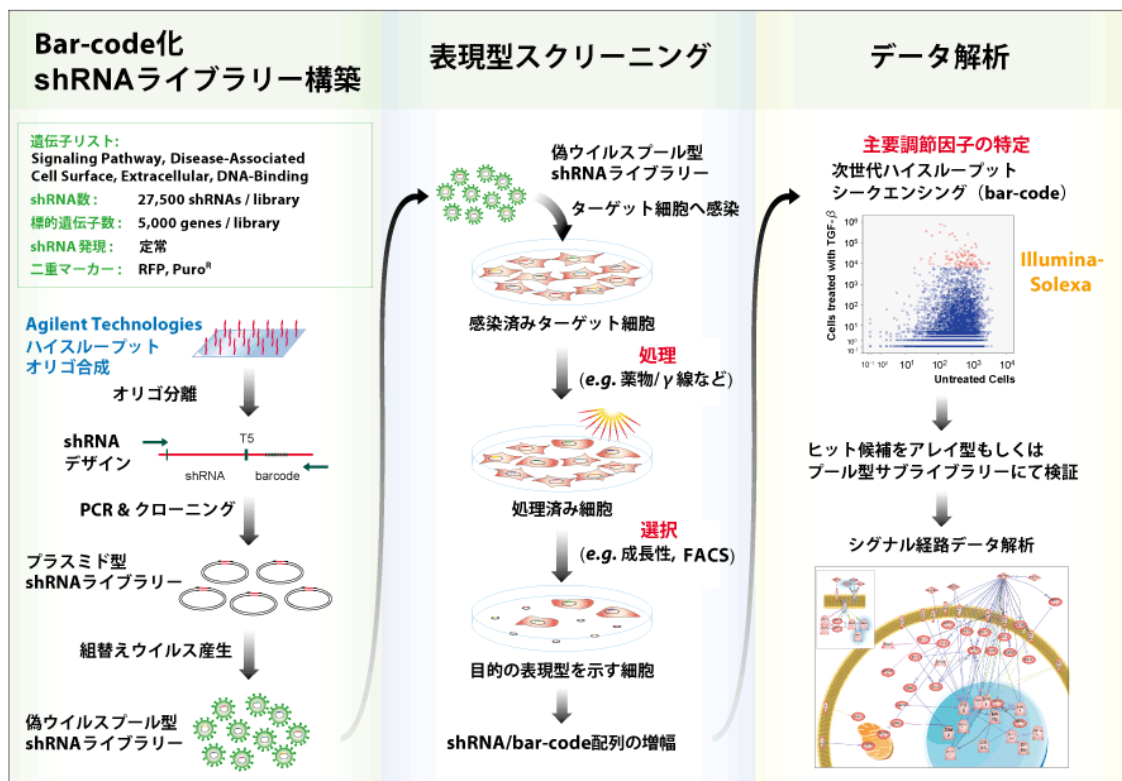


図 1-7 shRNA library screening の概要

(http://www.cosmobio.co.jp/product/detail/decipher-shrna-libraries.asp?entry_id=8048)

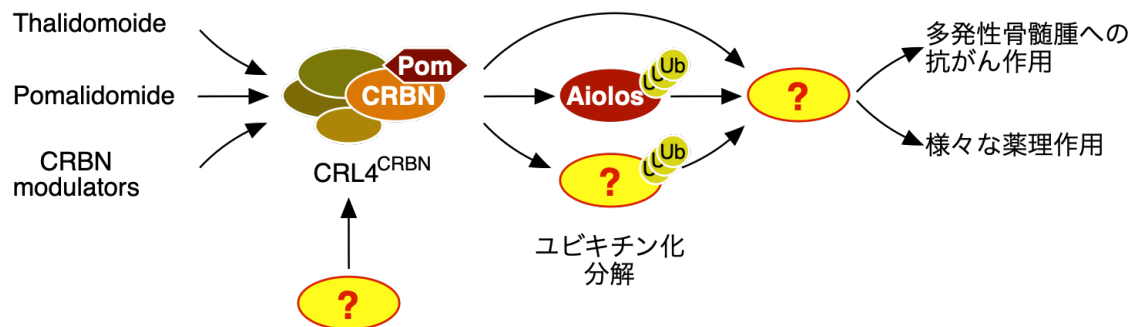


図 1-8 本研究の目的

thalidomide や pomalidomide、CRBN modulators は CRBN に直接結合し、抗がん活性や様々な薬理作用を発揮する。しかし CRBN 下流の分子機構は未だ不明である。本研究では CRBN の分子経路に携わる遺伝子を shRNA library screening により同定することを目的とした。

第2章 実験方法

2-1 細胞培養

2-1-1 材料

1) 25x phosphate-buffered saline (PBS) [pH 7.6]

3.425 M NaCl、67.5 mM KCl、250 mM Na₂HPO₄、45 mM KH₂PO₄ を作製し、オートクレーブした。

2) PBS (-)

20 ml の 25xPBS と 480 ml の純水を混合し、オートクレーブした。

3) 7.5 % Sodium bicarbonate (Bica)

7.5% (w/v) NaHCO₃ を Streicup-GV 0.22 µm bottle top filter (0.22 µm filter, Millipore, Cat.# SCGVU01RE)で濾過した。

4) Roswell Park Memorial Institute media (RPMI) 10% Fetal Bovine Serum (FBS)

RPMI1640 Medium (Life Technologies, Cat. #23400-021) 5 袋を 1 リットルの水に溶かし、1 N HCl を 25 ml 加えた。さらにペニシリン (明治製菓ファルマ)、ストレプトマイシン (明治製菓ファルマ) をそれぞれ 1 ユニット加え 0.22 µm filter で濾過し、5xRPMI を作製した。380 ml の純水をオートクレーブし、5xRPMI 100 ml、7.5% Bica 20 ml、FBS 100 ml を加えた。

5) Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 10% FBS

DMEM (Life Technologies, Cat. # 12160-061) を 1 リットルの水に溶かし、ペニシリン (明治製菓ファルマ)、ストレプトマイシン (明治製菓ファルマ) をそれぞれ 1 ユニット加え 0.22 µm filter で濾過し、5xDMEM を作製した。380 ml の純水をオートクレーブし、5xDMEM 100 ml、7.5% Bica 25 ml、1 N 塩酸 5 ml、FBS 100ml を加えた。

6) 6 mg/ml Polybrene

Polybrene (Nacalai Tesque, Cat. # 17736-44) を PBS に 6 mg/ml で溶かし、-20°C

で保存した。

8) 400 mg/ml G418

G418 (Nacalai Tesque, Cat. # 09380-86) を PBS (-) に 400 mg/ml で溶かし、4℃で保存した。

9) 1 mg/ml Puromycin

Puromycin (SIGMA, Cat. # P8833-25MG) を PBS (-) に 1 mg/ml で溶かし、-20℃で保存した。

10) 10 mg/ml Blasticidin

Blasticidin (InvivoGen, Cat. # ant-bl-05) を使用した。

11) pomalidomide

pomalidomide (Sigma-Aldrich, Cat. # P0018-5MG) を Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Nacalai Tesque, Cat. # 13406-55) に 100 mM もしくは 5 mM で溶かし、-20℃で保存した。

12) CC-885

CC-885 (東京医科大学伊藤拓水准教授より分与) を DMSO に 100 mM もしくは 5 mM で溶かし、-20℃で保存した。

2-1-2 細胞の継代

本研究においては多発性骨髄腫細胞株として OPM-2、MM.1S、H929 細胞 (ともに東京医科大学伊藤拓水准教授より分与) を用いた。また、蛍光免疫染色ではヒト胎児由来腎臓上皮細胞の 293T 細胞を、レンチウイルスの 293FT (Life Technologies, Cat.# 700-07) を用いた。OPM-2、MM.1S、H929 の培地には RPMI 10% FBS を用いた。293T、293FT の培地には DMEM 10% FBS に G418 を終濃度 500 µg/ml となるように加えた DMEM 10% FBS を用いた。これらの細胞は 37℃、5% CO₂ の条件下で培養した。

2-1-3 レンチウイルスベクターの作製

pLenti6 及び pRSI9 をベースとしたレンチウイルスベクターのパッケージングは Virapower (Life Technologies, Cat# K4975-00) のプロトコルに従った。感染価の高いレンチウイルスベクターの濃縮液は超遠心分離機 (Beckman Coulter, Cat.# XL-100)を用いて、レンチウイルス液を濃縮することで作製した。10 ml のレンチウイルスベクター溶液を、SW41Ti (Beckman coulter, Cat.# 331336) をローターとして用いて 25 Krpm で 2 時間遠心し、1 ml の RPMI 10% FBS に再懸濁した。

2-1-4 レンチウイルスベクターの感染

OPM-2 細胞への感染実験では、細胞液にレンチウイルスベクター液を加え、さらに終濃度が 6 $\mu\text{g/ml}$ となるように Polybrene を加え、24 時間後、新しい培地に交換した。このとき培地中の細胞濃度が 5×10^5 cells/ml、レンチウイルスベクター液が全容量の半分以下となるようにした。

pRSI9 ベクターを用いたレンチウイルスベクターでは Red fluorescent protein (RFP) が発現する。感染後 3 日目の細胞を蛍光顕微鏡で U-MWIG2 ユニット (Olympus、励起波長 520 nm ~ 550 nm、吸収波長 580 nm ~) を用いて観察することで、レンチウイルスの感染効率の確認と感染価の推定を行った。

レンチウイルスベクターが感染した細胞のセレクションにはベクターが持つ抗生物質耐性遺伝子を利用した。pRSI9 ベクターを用いたレンチウイルスベクターでは Puromycin 耐性遺伝子が発現し、pLenti6 ベクターを用いたレンチウイルスベクターでは Blasticidin 耐性遺伝子が発現する。これらを利用してレンチウイルス感染から 24 時間後から 0.5 $\mu\text{g/ml}$ の Puromycin もしくは 1 $\mu\text{g/ml}$ の Blasticidin 含む培地を使用しセレクションをした。

2-1-5 生細胞数測定

OPM-2 細胞 100 μl を 96-well flat bottom plate (Iwaki, Cat.# 3860-096) に移し 10 μl の生細胞数測定試薬 SF (Nacalai Tesque, Cat.#07553-15) を加え、1 時間後に Glomax (Promega Cat.# E6501)で 480 nm の吸光度を測定した。トリパンブルー染色により計測した細胞数と吸光度を比較し、生細胞数を算出した。

2-2 shRNA ライブラリスクリーニング (1st スクリーニング)

2-2-1 材料

1) shRNA library

Cellecta が提供する Cellecta Pooled Bar-coded Lentiviral shRNA Libraries (Cellecta Cat.# DHPAC-M1-P, DHDAC-M2-P, DHCS-C-M3-P)を用いた。library は3つの library に分かれており、それぞれ約 5,000 遺伝子を標的にした 27,500 shRNA を有する (図 2-1)。

2) 10x Tris-Borate-EDTA (TBE) buffer

Trizma-base 108 g、ホウ酸 55 g、0.5M EDTA [pH8.0] 40 ml を1リットルの純水に溶かした。

3) TBE

10xTBE buffer を純水で10倍希釈した。

4) Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)-Elution Buffer

0.5 M ammonium acetate、10 mM magnesium acetate、1 mM EDTA [pH 8.0]、0.1 % (w/v) SDS

2-2-2 shRNA ライブラリスクリーニング

本研究において shRNA ライブラリは Cellecta Pooled Bar-Coded Lentiviral shRNA Libraries (Cellecta) を採用した (図 2-1)。ライブラリは約 5000 遺伝子を標的とした 27,500 shRNA 毎に3つに分かれており (図 2-1B)、shRNA ライブラリスクリーニングはそれぞれのライブラリごとに行った。パッケージングしたライブラリを OPM-2 細胞に multiplicity of infection (多重感染度; M.O.I.) が0.3 程度になるように感染させた (図 2-2)。感染させてから3日後、細胞を分けて1 μ M pomalidomide で5日間処理した。その後、shRNA library のマニュアルに従ってゲノム DNA (genomic DNA: gDNA)を抽出、2段階の polymerase chain reaction (PCR) によって各 shRNA クローンにユニークなバーコード配列を増幅した。PCR 条件は以下のとおりである。

1st round PCR

primer

FwdHTS, 5'-TCTCTGGCAAGCAAAAGACGGCATA-3'

RevHTS, 5'-TGCCATTTGTCTCGAGGTCGAGAA-3'

試薬

Titanium Taq DNA polymerase (Takara, Cat. # 639242)

PCR program

- 1) 94°C 3 分
- 2) 94°C 30 秒
- 3) 65°C 10 秒
- 4) 72°C 20 秒
- 2) ~ 4) を 16 cycle
- 5) 69°C 2 分

2nd round PCR

primer

FwdGex, 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGA-3'

RevGex, 5'-AATGATACGGCGACCACCGAGA-3'

試薬

KAPA SYBR FAST ABI Prism (KAPA, Cat. # KK4605)

PCR program

- 1) 94°C 3 分
- 2) 94°C 30 秒
- 3) 60°C 20 秒
- 2) ~ 3) を 12cycle
- 4) 72 °C 20 秒

PCR 産物を Molecular Cloning (CSHL Press, Joseph Sambrook 著) の Chapter 5 protocol 12 に従い、PAGE 精製をした。精製した産物は GexSeqN を primer としてバーコード配列を Hiseq 2000 で High-throughput Sequencing (HTS) することで、各 shRNA 発現クローンの定量を行った (図 2-2B)。

GexSeqN, 5'-ACAGTCCGAAACCCCAAACGCACGAA-3'

2-2-3 シーケンスデータの統計学的解析

HTS リードは Barcode Deconvoluter (Cellecta, <http://www.decipherproject.net/>) を用いて各バーコード配列のリード数 (各 shRNA クローン量に相当する) に変換した。次に各バーコード配列のリード数を Read Per Million (RPM) つまり 100 万リード当たりのリード数、RPM リードに変換した。このデータを以下の 2 種類

の方法で解析した。

max Fold Change (maxFC) に基づく方法では、まず pomalidomide 処理または未処理での RPM リード数の比を fold change (FC) の値とした。今回使用したライブラリには各遺伝子に対する shRNA が複数デザインされている。そこで同一遺伝子内で最大の FC を maxFC とした。maxFC が 3.0 を超えた遺伝子、もしくは 1/3 を下回った遺伝子を変動遺伝子とした。

New Rank Product (NRP) はマイクロアレイにおいて発現変動遺伝子を検出する方法である RankProduct (RP) を基にした解析手法である²²。RP の計算方法は 3 つ (Original phase・Simulation phase・Significant level phase) に分けられる (図 2-3A)。Original phase では replicate の総当りで FC を計算し、Ranking の幾何平均 (RP) を遺伝子ごとに算出する。次に Simulation phase では元のデータをランダムに並び替えて、RP を遺伝子ごとに算出する操作を 100 回繰り返す。Significant level phase では Simulation phase で算出された 100 個の RP のうち Original phase の RP よりも低い値を示したものの割合を求めることで、この現象の発生頻度 (percentage of false positive prediction; pfp 値) を算出している。NRP では shRNA コンストラクトの RP 統計量を遺伝子ごとに幾何平均して得られた値を新しい RP 統計量 (false discovery rate, FDR) として用いた (図 2-3B)。FDR が 0.1 を下回った遺伝子を変動遺伝子とした。

2-2-4 Gene Ontology 解析

maxFC、NRP で変動遺伝子として検出された 445 遺伝子について、Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/summary.jsp>) により、Molecular Function、Biological Process の 2 項目について Gene Ontology 解析 (GO 解析)を行った。

2-3 実験に用いた plasmid の作製

2-3-1 プラスミドの増幅と精製

プラスミドの増幅には、大腸菌 DH5α 株、もしくは Stbl3 株を用いた。大腸菌の培養には 100 µg/ml の Ampicillin を含む Lysogeny Broth (LB) 培地を用いた。大腸菌からのプラスミド DNA の抽出には Wizard Plus SV minipreps DNA purification Systems (Promega, Cat.# A1470)、QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen, Cat.# 12145) を用いた。

2-3-2 pRSI9_shRNA

1) pRSI9_unknown

shRNA ライブラリ 1 ng を DH5 α に形質転換し、1 クローンを単離、pRSI9_unknown を精製した。

2) pRSI9_mU6、pRSI9_mU6_shCRBN#610 の作製

shRNA ライブラリから単離した pRSI_unknown を ClaI (Clontech-Takara, Cat.#1034A)、Klenow (Toyobo, Cat.# PLA-111)、XhoI (Toyobo, Cat.# XHO-101) の順で処理し、Wizard (Promega, Cat.# A2981)のプロトコルに従い、1 %アガロースゲルで精製をした。次に pBS_mU6 と pBS_mU6_shCRBN#610 (東京医科大学伊藤拓水教授より分与) を NotI (Toyobo, Cat.# NOT-111X)、Klenow、XhoI の順で添付のプロトコルに従って処理し、Wizard (Promega, Cat.# A2981) のプロトコルに従い 1 %アガロースゲルで精製を行った。これらを Ligation High ver. 2 (Toyobo, Cat. # LGK-201) でライゲーション反応を行い、stb13 に形質転換し、pRSI9_mU6 と pRSI9_mU6_shCRBN を作製した。

3) pRSI9_ΔABC を用いた pRSI9_shRNA の作製

shRNA library の pRSI9 プラスミドを鋳型に、下記の FwdU6 と rev_XhoI の primer を使用し KOD Plus (Toyobo, Cat.# KOD-201) を用いて PCR を行った。PCR 産物と pRSI9 プラスミドを ClaI と XhoI で処理し、Ligation High ver. 2 を用いてライゲーション反応を行い、stb13 に形質転換し、pRSI9_ΔABC を作製した (図 2-4A)。

FwdU6, 5'-CAAGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAA-3'

rev_XhoI,

5'-

GTCTCGAGAAACAGTCTTCATTGAAGACCCCGGTGTTTCGTCCTT-3'

表 2.1 で示した組み合わせの配列をもつオリゴヌクレオチドを 10 mM Tris-HCl [pH 7.9] でアニーリングした (図 2-4B、表 2.1)。これと pRSI9_ΔABC を BbsI (NEB, Cat.# R0539S) で処理したものを、Ligation High ver. 2 を用いてライゲーション反応を行い、DH5 α に形質転換し、pRSI9_shXXX (XXX は shRNA の標的遺伝子名)を作製した。その後 PureYield Plasmid Miniprep System (Promega, Cat.# A1220) を用いてプラスミドを精製した。

2-3-2 pLenti6 ベースの発現ベクターの作製

1) pLenti6_Flag-HA-CRBN (pLenti6_FH-CRBN)

pLenti6_FH-CRBN (東京医科大学伊藤拓水准教授より分与) は BamHI、XhoI で処理した pLenti6/V5GW/LacZ に Flag-HA-CRBN (FH-CRBN) を導入して作製された。

2) FH-NLS-CRBN

pLenti6_FH-CRBN の FH タグと CRBN の間に SV40 large T antigen の nuclear localization signal (NLS) 配列を PCR を用いて導入した²³。導入した NLS 配列は以下の通りである。

5'-GATCCTAAGAAGAAGCGTAAGGTAGACCCCAAAAAGAAGAGGAAGGTT...
...GATCCGAAGAAGAAACGGAAAGTT-3'

3) FH-NES-CRBN

pLenti6_FH-CRBN の FH と CRBN の間に HIV の rev protein の nuclear export signal (NES) 配列を PCR を用いて導入した²⁴。導入した NES 配列は以下の通りである。

5'-CTGCAACTACCTCCTCTAGAGAGACTGACCCTGGAC...
...CTACAGCTTCCACCTCTAGAACGACTCACACTTGAT-3'

2-3-4 その他

1) pcDNA3.1_Aiolos

東京医科大学伊藤拓水准教授より分与されたものを使用した。

2) pX330_CRBN

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) -Cas9 システムは、ゲノム中で任意の領域を切断できる遺伝子改変ツールで、切断したい標的塩基配列に相補的な配列を含む guide RNA (crRNA : tracrRNA) と DNA 切断酵素 Cas9 タンパク質により、ゲノム上の任意の配列を切断する。pX330 (Addgene) は guide RNA を導入する配列と Cas9 遺伝子をもつ²⁵。CRBN の第一エクソンを標的とする guide RNA 配列と BbsI 処理をした pX330 の二つで Ligation 反応を行

い、pX330_CRBN を作製した。

2-4 focused ライブラリスクリーニング

2-4-1 focused ライブラリの作製

overlap 遺伝子に対する pRSI9_ΔABC_shXXX プラスミドを等しい重量ずつ混ぜ、focused ライブラリを作製した。focused ライブラリは ViraPower のプロトコルに従ってパッケージングを行い、レンチウイルスライブラリを作製した。

2-4-2 focused ライブラリスクリーニング (2nd スクリーニング)

2-4-1 で作製した focused ライブラリを用い 2-2-2 の 1st スクリーニングと同様の方法で行った (図 2-5A、2-6A)。1st スクリーニングとは違い、focused ライブラリに用いた pRSI9_ΔABC にはバーコード配列がないため、shRNA の配列を増幅し、Ion Proton により shRNA 配列を HTS することにより、各 shRNA 発現クローンの相対量比を定量した (図 2-5B)。shRNA 配列は 2 回の PCR で増幅させた。1 回目の PCR では loop-fwd と rev_dBC を primer として用い、2 回目の PCR では fA1-fwd (#1~#6)、ftrP1-rev を用いた。PCR 条件は以下のとおりである。

1st round PCR

primer

loop-fwd, 5'-CGATGTTAATATTCATAGC-3'

rev_dBC, 5'-GCTGTCCCTGTAATAAACCCGAA-3'

試薬

KOD FX neo (Toyobo, Cat.# KFX-201)

PCR program

- 1) 94°C 2 分
 - 2) 98°C 10 秒
 - 3) 55°C 30 秒
 - 4) 68°C 20 秒
- 2) ~ 4) を 16 cycle

2nd round PCR

primer

primer は fA1-fwd#N (N は 1~6) のうちの 1 つと ftrP1-rev を用いた。

fA1-fwd#1,

5'-

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAAGGTAACGATGTTAATATTC
ATAGC-3'

fA1-fwd#2, 5'-

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGGAGAACGATGTTAATATTC
ATAGC-3'

fA1-fwd#3, 5'-

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGAGGATTCGATGTTAATATTC
ATAGC-3'

fA1-fwd#4, 5'-

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACCAAGATCGATGTTAATATTCA
TAGC-3'

fA1-fwd#5 5'-

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAGAAGGAACGATGTTAATATTC
ATAGC-3'

fA1-fwd#6, 5'-

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGCAAGTTCGATGTTAATATTC
ATAGC-3'

ftrP1-rev, 5'-GGAGAGATACCCGTCAGCCACTAAGAAAGGGGACGTGACAT-3'

試薬

KOD FX neo

PCR program

- 1) 94°C 2 分
 - 2) 98°C 10 秒
 - 3) 55°C 30 秒
 - 4) 68°C 20 秒
- 2) ~ 4) を 24 cycle

PCR 産物は shRNA ライブラリスクリーニングと同様に PAGE 精製し、Ion PI Template OT2 200 kit v3 (Life Technologies, Cat.# 4488318)、Ion PI Sequencing 200 kit v3 (Life Technologies, Cat.# 4488315)のプロトコルに従い、Ion PI Chip v2 (Life Technologies, Cat.# 4482321) で HTS を行った。HTS リードから各 shRNA クローン量を定量し、RPM 補正した。

2-4-3 quantitative PCR (qPCR) による各 shRNA クローン量の定量

KAPA SYBR FAST ABI prism (KAPA, Cat. # KK4605) のプロトコルに従い、StepOnePlus (Life Technologies) を用いて qPCR を行った。HTS サンプルの qPCR には各 shRNA 配列に相補的な fwd_sh と trP1-rev を primer として用いた (図 2-5C、表 2.2)。ゲノム DNA の qPCR には各 shRNA 配列に相補的な fwd_sh と rev_dBC を primer として用いた (図 2-5D、表 2.2)。

A1-fwd, 5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTC-3'

trP1-rev, 5'-CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT-3'

2-4-4 focused ライブラリスクリーニング (3rd スクリーニング)

2nd スクリーニングと同様の手順でスクリーニングを行い、qPCR で各 shRNA クローン量を定量した (図 2-6A)。

2-4-5 focused ライブラリスクリーニング (4rd スクリーニング)

3rd スクリーニングと同様に focused ライブラリを感染させてから、3 日後と 8 日後に細胞を回収し、qPCR で各 shRNA クローン量を定量した (図 2-6B)。

2-5 ウェスタンブロッティング

2-5-1 材料

1) High Salt Lysis Buffer (HSB)

150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl [pH 7.9]、1% NP40

2) HSB (+)

終濃度 1%の Protease inhibitor cocktail (Nacalai Tesque, Cat.# 2955-11) を含む HSB を調製した。

3) 4x sodium dodecyl sulfate (SDS) sample Buffer (4x dye)

200 mM Tris-HCl [pH6.8]、500 mM 2-mercaptoethanol、8% (w/v) SDS、0.4% bromophenole blue (BPB)、40% (v/v) glycerol

4) Sol A

292 g/L Acrylamide、8 g/L N,N'-methylenebisacrylamide を 0.22 µm bottle top filter

で濾過した。

5) Sol B

1.5 M Tris-HCl [pH 8.8]、0.4% (w/v) SDS を 0.22 μ m bottle top filter で濾過した。

6) Sol C

0.5 M Tris-HCl [pH 6.8]、0.4% (w/v) SDS を 0.22 μ m bottle top filter で濾過した。

7) SDS-PAGE Running Buffer

Tris(hidroximetil)aminometano 2.4 g、glycine (Nacalai Tesque, Cat.# 17141-95) 11.54 g、SDS (Nacalai Tesque, Cat.# 02873-75) 0.8 g を純水 800 ml に溶かした。

8) Transfer Buffer

TrizmaBase 2.7 g、glycine 14.4 g を純水 800 ml に溶かし、MeOH 200ml を加えた。

9) 20x tris buffered saline buffer (TBS)

TrizmaBase 23.6 g、Tris-HCl 127 g、NaCl 174 g を純水 1 L に溶かした。

10) TBS-T

20x TBS 50 ml、10% Tween20 10 ml を脱イオン水 965 ml と混合した。

11) 3% bovine serum albumin (BSA) /TBS (3% BSA)

20x TBS 25 ml、BSA (Nacalai Tesque, Cat.# 01863-48) 15 g、10% NaN₃ 1 ml を 465 ml の純水に溶かした。

12) 5 % milk/TBS (5% milk)

20x TBS 25ml、スキムミルク (森永乳業) 25 g、10% NaN₃ 1 ml を 465 ml の純水に溶かした。

2-5-2 細胞内タンパク質の回収

回収した細胞を PBS で 2 回洗浄後、細胞ペレットの 2 倍量の HSB (+) に懸濁

した。懸濁液を Biorupter (コスモバイオ、Cat.# UCW-201) を用いて超音波処理した。超音波処理は強さ"H"、ON 15 秒/OFF 15 秒で合計 5 分間行った。その後、20,000 x g で 30 分間遠心し、上清を回収した。回収した上清をプロテインアッセイ CBB 溶液 (Nacalai Tesque, Cat.#29449-15) のプロトコルに従い、既知濃度の BSA を基準として検量線を作製し、タンパク質濃度を算出した。

2-5-4 ウェスタンブロット

sol A、sol B を用いて separating gel を、sol A、sol C を用いて stacking gel を作製した。重合開始剤には Ammonium Peroxodisulfate (APS, Nacalai Tesque, Cat.# 02627-21) と tetramethylethylenediamine (TEMED, Nacalai Tesque, Cat.#33401-72) を用いた。タンパク質濃度を揃えた溶液に 1/3 量の 4xSB を加え、5 分間 98°C で加熱し、作製したゲルで SDS-PAGE を行った。タンク式の方法で SDS-PAGE 泳動したタンパク質をメンブレン (Immobilon-P, Millipore, Cat.# IPvH00010) へ転写後、Blocking One (Nacalai Tesque, Cat.# 03953-95) を用いて Blocking、一次抗体標識、二次抗体標識、Hyperfilm ECL (GE Healthcare, Cat.# 28-9068-37) への現像を行った。ウェスタンブロットに用いた抗体は表 2-3 に示した。

2-6 免疫沈降

2-6-1 材料

1) 1% (w/v) Nonidet P-40 Lysis Buffer (1% NP40 buffer)

1% (w/v) Nonidet P-40、150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl [pH 7.6]

2-6-2 Flag 免疫沈降

細胞を PBS で 2 回戦場した後、Protease Inhibitor cocktail を含む 1% NP40 buffer を用いて細胞抽出液を調製した。10 μ l の Flag M2 agarose (Sigma) を 1% NP40 buffer で平衡化した後 1 mg の細胞抽出液を加え、ローテーターを用いて 4°C で 2 時間インキュベーションした。400 μ l の 1% NP40 buffer で 5 回洗浄した後、20 μ l の Elution buffer (0.1 mg/ml Flag peptide を含む 1% NP40 buffer) で 3 回溶出を行った。

2-6-3 glutathione s transferase (GST) pull-down assay

大腸菌を PBS で 2 回洗浄した後、大腸菌の培養液 1ml あたり 200 μ l の PBS に

懸濁し、液が半透明になるまで sonication を行った。その後 20,000 x g で 10 分間遠心し、上清を細胞抽出液として回収した。20 μ l の細胞抽出液と PBS 180 μ l、PBS で平衡化した GL4B を混合し、2 時間 4 度でインキュベートした。その後 1% NP40 buffer で 5 回洗浄した後、40 μ l の 2x dye を加え、98 度で 5 分間加熱することでビーズに固定化されたタンパク質の溶出を行った。

2-6-4 昆虫細胞内タンパク質の回収

High Five insect cells に MOI-3.0 で baculo virus を感染し、3 日後に細胞を回収した。回収した細胞は PBS で 2 回洗浄後、1% NP-40 buffer に懸濁、Bioruptor で 10 分間 sonication を行い、20,000 x g で 10 分間遠心し、上清を細胞抽出液として回収した。

2-7 蛍光免疫染色 (免疫染色)

2-7-1 材料

1) PBS-T

25x PBS 40 ml、10% Tween20 10 ml を脱イオン水 950 ml と混合した。

2) 0.2% Nonidet P-40 / PBS (0.2% NP-40/PBS)

25x PBS 4 ml、10% Nonidet P-40 2 ml を脱イオン水 94 ml と混合した。

3) 4% (w/v) Paraformaldehyde/PBS (4% PFA/PBS)

2 g の Paraformaldehyde (PFA)、25 ml の純水、400 μ l の 1N NaOH を混合し、PFA を 65°C で完全に溶かしたのち、25x PBS を 2 ml 加え、1N HCl を用いて pH を 7.5 程度に調製し、純水で 50 ml にメスアップした。

2-7-2 方法

293T 細胞はあらかじめ 15 mm のカバーガラス上で培養し、カバーガラスに接着した。OPM-2 細胞は 2000 x g で 10 分間遠心することでカバーガラスに接着した。カバーガラスに接着した細胞は、4% PFA/PBS 処理を 15 分間行い固定化した。固定化した細胞は PBS で 3 回洗浄し、0.2% NP-40/PBS で 10 分間処理、PBS-T で 3 回洗浄し、Blocking One を室温で 1 時間処理した。続いて 1 次抗体、2 次抗体処理を行い、DAPI mounting solution を用いて DAPI 染色した。蛍光免疫染

色に用いた抗体は表 2-3 に示した。

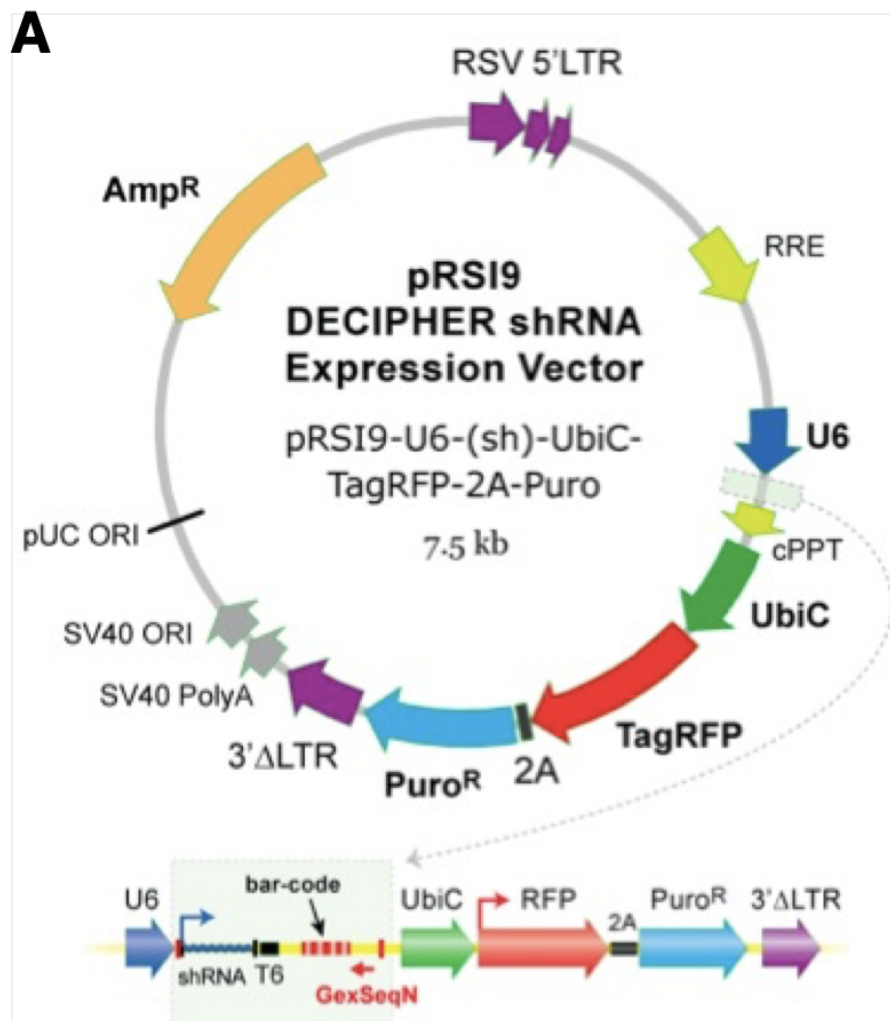
2-7 quantitative reverse transcriptase PCR (qRT-PCR)

2-7-1 total RNA の回収

Sepasol-RNA I Super G (Nacalai Tesque, Cat. # 09379-84) のプロトコルに従い、細胞から total RNA を回収した。

2-7-2 qRT-PCR

One Step SYBR Primer Script Plus RT-PCR kit (Clontech Takara, Cat. # RR096B) のマニュアルに従い、StepOnePlus を用いて 100 ng の total RNA を qRT-PCR をした。



B

Library	# mRNA	# shRNA
Module 1: Signaling Pathways	5,043	27,500
Module 2: Disease-Associated	5,412	27,500
Module 3: Cell Surface, Extracellular, DNA Binding	4,922	27,500

図 2-1 shRNA ライブラリ

(A) 本研究で採用した shRNA ライブラリに使用されているプラスミドベクターのベクターマップを示した。

(B) ライブラリに含まれる標的遺伝子数と shRNA 数を示した。

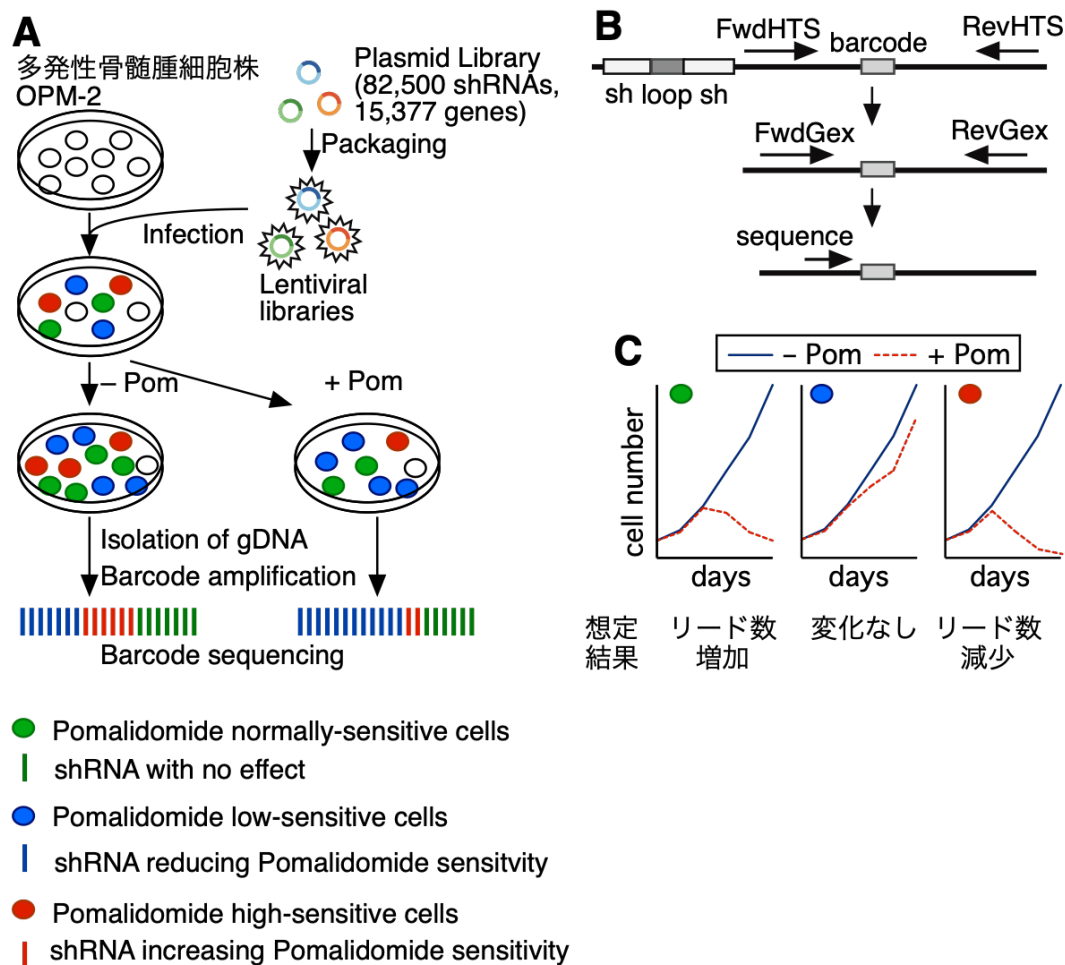


図 2-2 shRNA ライブラリスクリーニング (1st screening)

(A) shRNA ライブラリスクリーニングの概略。多発性骨髄腫細胞 OPM-2 に shRNA ライブラリをレンチウイルスベクターとして感染、pomalidomide 処理した。青色が pomalidomide の感受性を低下させる shRNA とその shRNA 発現細胞である。赤色が pomalidomide の感受性を促進する shRNA とその shRNA 発現細胞である。緑色が pomalidomide の感受性に影響を与えない shRNA とその shRNA 発現細胞である。

(B) 回収した genomic DNA は shRNA 特異的な barcode 配列を 2 回の PCR で増幅し、HTS により定量した。

(C) それぞれの shRNA が導入された際に考えられる細胞増殖曲線の概要とリード数変化の想定結果。ほとんどの遺伝子の KD は pomalidomide 感受性に影響がないためリード数が増加しないが、pomalidomide 感受性が低下する場合はリード数が増加、pomalidomide 感受性が増加する場合はリード数が減少する。

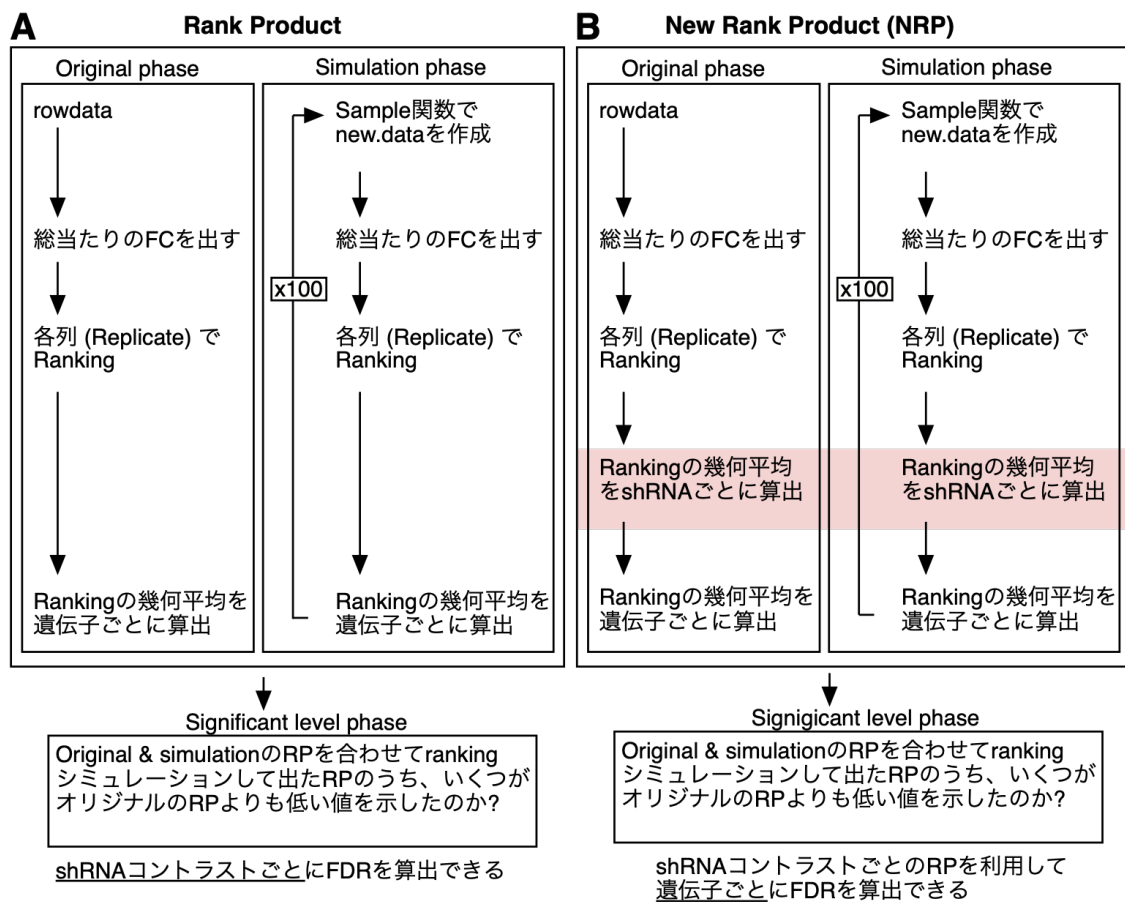


図 2-3 New Rank Product

(A) Rank Product (RP) の概要を示した。RP では shRNA コンストラクト毎に FDR を算出した。

(B) 本研究で採用した New Rank Product (NRP) の概要を示した。NRP では遺伝子毎に FDR を算出した。

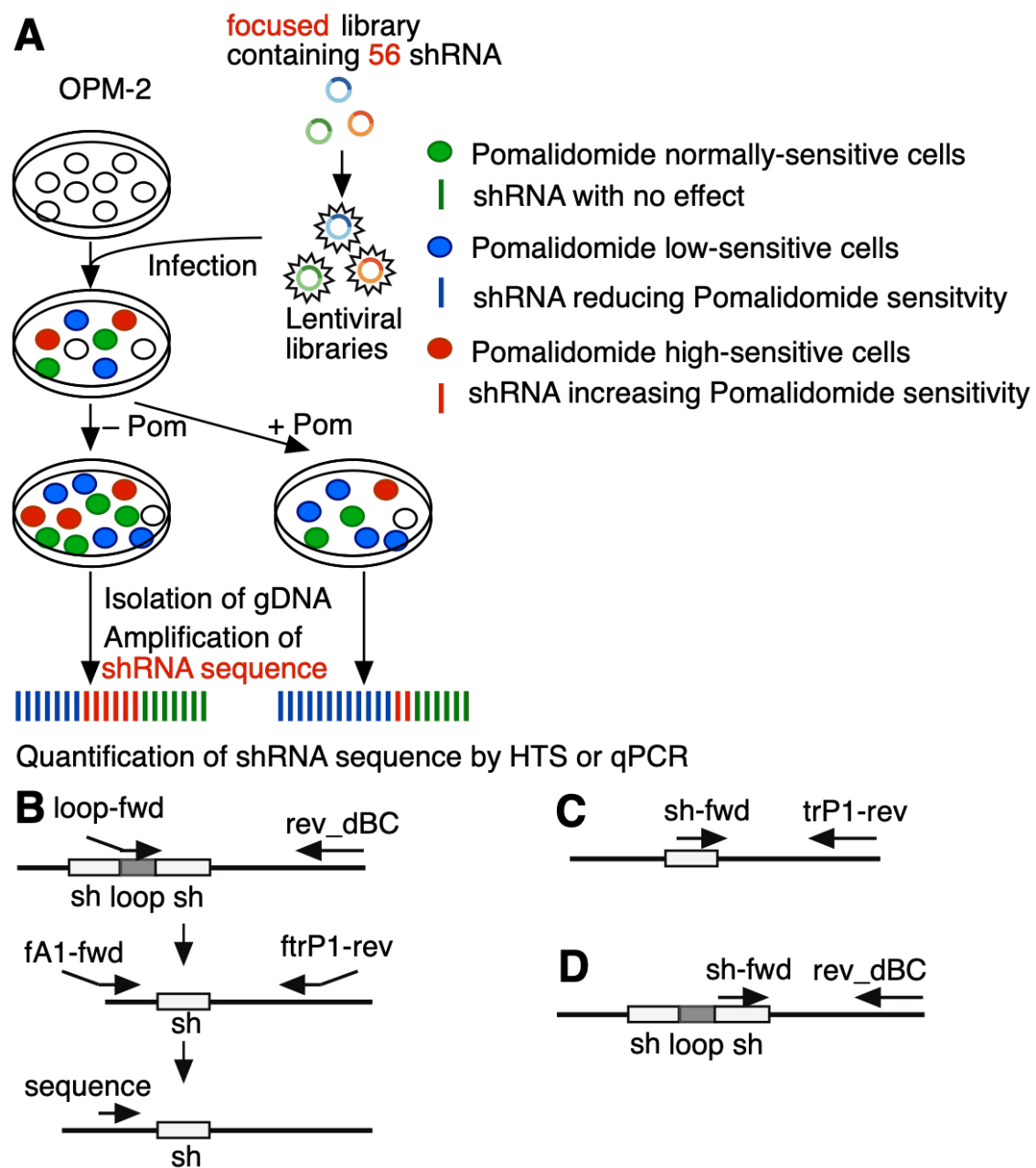


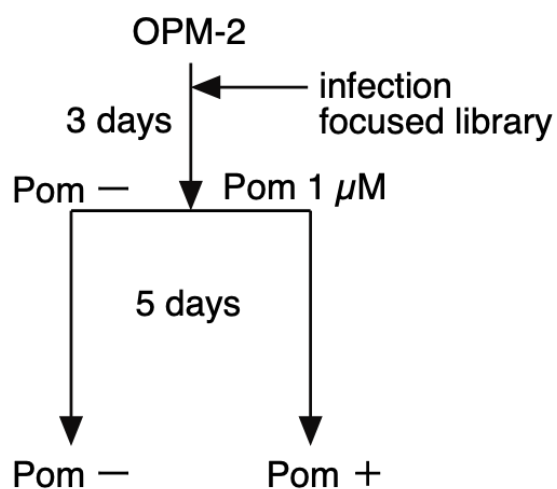
図 2-5 focused library を用いた screening

(A) 2nd screening の概要を示した。1st screening からの主な変更点を赤字で示した。

(B) HTS 用のサンプル調製の手順を示した。shRNA の配列を 2 回の PCR で増幅し、shRNA 配列を HTS で定量した。

(C, D) 2nd screening サンプルの qPCR に用いた primer を示した。

A 2nd/3rd screening



B 4th screening

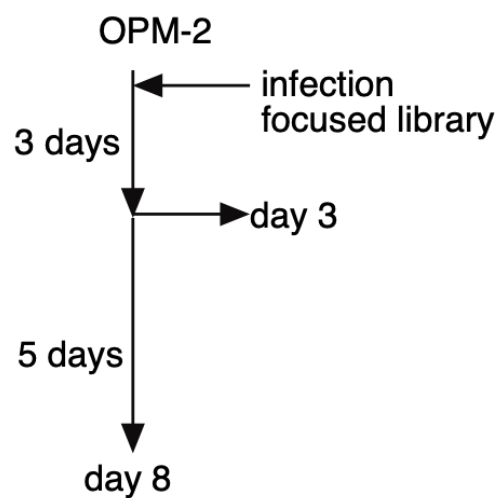


図 2-6 focused library screening を用いた screening の概要

(A) 2nd screening 及び 3rd screening の概要を示した。focused library レンチウイルスベクターとして感染後、3 日目に細胞を分けて pomalidomide を 5 日間処理した。

(B) 4th screening の概要を示した。focused library をレンチウイルスベクターとして感染後、3 日後と 8 日後で細胞を回収した。

表 2-1 shRNA 配列

target gene	shRNA target sequence (5' > 3')	target gene	shRNA target sequence (5' > 3')
ABCC12	GCGATGTTACTAGCAGCAGAA	LRSAM1	GCAGATCAGGAGCCAGATTAA
ACCN3	GACAAGGTCCTGGGATATTT	MACROD2	AGAATCGCAGAGCTCATATAT
ARL8B	GTGGCTTATTCAGCATTCAAA	MEN1	GCTGTACCTGAAAGGATCATA
ATHL1	TGTGGACCCTGCCTCTGAATA	MGMT	TCTTACCAGCAATTAGCAGCC
C6orf48	CCTGTTCTCCTTCCTTGCTAT	MSR1	GCAGTTCTCATCCCTCTCATT
CCNB3	GCGCAGATATGCTAGGTGTAT	MT1X	GCTGTGCTCTCAGATGTAAAT
CCR5	GCTTCTGCAAATGCTGTTCTA	MTNR1A	GCTGCCTCAATGCCATTATAT
CCX15	GTGAAGGAAGTAGGGATATTT	NHP2L1	CGTTCAGCAGTCATGTAATA
CD164	GCTATTGTTACATAAATCAA	NRXN1	CGCACGCATTTCATAAAGCAAA
CD83	ACAGAGTATCTTCCCAGATTT	OR5B12	GTCTACCAAGCCCAATATTTG
CMTM3	CCATCGTGTTTGCAACTGATT	OR7G3	CACCCACTGAGGTACCAATGTC
COL6A6	GCCAGAACTCAAGCAACAGTT	PGR	GCTGCACAATTACCCAAGATA
COPS2	GCAGAAATTCTCTCACAATA	PHF5A	TGTGTGATTTGTGACTCCTAT
COPS3	CCATCCTGAGCTAAACAAGAG	POMGNT1	CCAGACAACAAGGTCCTCAAT
COPS4	CGAGCATCGTTGCTTCAGAAT	POU3F2	GAGGTGGTGAGAGTTTGGTTT
COPS5	CCAGACTATTCCACTTAATAA	PSMA1	GCAGAGTGGTGGAATGCTATG
COPS6	CAGTTTGTGAACAAGTTCAAT	PSMA3	CCCTGGATTATACATACTGTC
COPS7	CCCGGAATCTTCCCTCCACTAA	PSMA5	TGGGCTAATTGCTGATGCTAA
COPS8	CCTGGATGTTTCCTTTAACAA	PSMC6	GCATGACAGATGTTGGCTTAT
CRBN	GCTTGCAACTTGAATCTGATA	PTPRC	GCTGCACATCAAGGAGTAATT
CUL4	CCAGAATATCTTAACCATGTA	PWP2	GAACCACTATAACATGCAGTA
DDB1	CCTATCACAATGGTGACAAAT	ROC1	CTGCATCTCTCGCTGGCTCAA
EBF2	GCTTGTATGGAGCGAGCTAAT	RPL37A	GAGACATCACTGGCCTATAAT
EIF4A3	GCAGTACTATTCCACTCAGAT	RPS26	GCTGTATGTGAAGCTACATTA
ELK4	GCTTCTCTTACACCAGCATTT	SETX	CGTCTCATAAATCACTTTGAA
EVI2A	GCCCTACCTATACTAGCTAGA	SF3A3	CGAGACACTGAAAGGAACAAA
FLJ44635	GCCCAAATCCAAATCACTTCA	SLC25A30	CAGATTCAAGGCCAGACGAAT
GOLPH4	GCAGTTGCTGAGAAATCACAT	SLU7	CACAGGAGATACCATTTCAT
GSTZ1	ACAGCGGGCATATACTGTGTA	SMARCC2	GCCTAACAGAGGCATGCATTT
HMG2	AGGGAGATAAAGCAAAGGTGA	SNRPD3	GCTCATTGAAGCAGAGACAAA
HOXA11	CTGCTCCTCTAACATGTATTT	TAS2R1	TAGCAAATATGTAGGGTTTGT
IGF2BP3	CGGTGAATGAACTTCAGAATT	TMEM59	CCTGCCATGATACTGTCAGTT
IK	CCAGAGATGCTCCACAAGGAT	TMPD1	GCGTGATTAAACCCACACAAT
IKZF3	CCACTGCTTTGATGTCAACTA	TTLL4	GCCTATTATCTGACCCAGAAA
IPO11	GCTGAGATGAAGAAATCACTT	UBE2F1	GCCATTAGTCACCATTAGTTA
ITIH4	CGCTGAATTTATCACTTGCTT	USP16	GCGAATAAACTGCTTTGTGAA
KIAA0892	CCACAGGGAGAGTAACAACAT	USP9X	CGCCTGATTCTTCCAATGAAA
KIAA1109	TGTAGGAGCTGGCTCATATTT	VAMP1	GCTGGAAGAAAGCAGTCAGTA
KIAA2022	ATGAGCACTTTAGGCAATAAC	WDR1	CTGTCTAAGGAGCCTAGTAAT
KIF11	GCGTACAAGAACATCTATAAT	ZCCHC11	GCAACAGACATGTACAGATAA
KPNB1	CCAGTGTAGTTGTTTCGAGATA	ZNF587	GCCTCCCAAGTTCAACTGATT

表 2-2 qPCR に用いた fwd_sh 配列

target genes	sh_fwd sequence (5'>3')
ABCC12	TTCTGCTGCTAGTAACATCG
ACCN3	GAAATATCCCAGGACCTTG
ARL8B	TTTGAATGCTGAATAAGCC
ATHL1	TATTCAGAGGCAGGGTCCA
C6ORF48	ATAGCAAGGAAGGAGAACA
CCNB3	ATACACCTAGCATATCTGCG
CCR5	TAGAACAGCATTTGCAGAA
CD164	TTGAGTTATGTGAACAATA
CD83	AAATCTGGGAAGATACTCT
CLDN11	ATGCAGGGAAGAACAGTCA
CMTM3	AATCAGTTGCAACACGAT
COL6A6	AACTGTTGCTTGAGTTCTGG
COPS1	AAATACTGGATGAGGGCAC
COPS6	ATTGAACTTGTTCAAACT
COX15	AAATATCCCTAGTTCCTTCA
DDB1	ATTTGTCAACATTGTGATAG
EBF2	ATTAGCTCGCTCCATACAAG
EIF4A3	ATCTGAGTGGAATAGTACT
EVI2A	TCTAGCTAGTATAGGTAGG
FECH	ATACTGTGTGAAAGCAATA
FLJ44635	TGAAGTGATTTGGATTTGGG
GOLPH4	ATGTGATTTCTCAGCAACTG
GSTZ1	TACACAGTATATGCCCCGTG
HMGN2	TCACCTTTGCTTTATCTCCC
HOXA11	AAATACATGTTAGAGGAGC
IGF2BP3	AATTCTGAAGTTCATTCACC
IK	ATCCTTGTTGGAGCATCTCTG
IKZF1	ATGACCTTAATGATTGATAG
IKZF3	TAGTTGACATCAAAGCAGT
IPO11	AAGTGATTTCTTCATCTCAG
ITIH4	AGGCAAGTGATAAATTCAG
KCNMA1	AATGCTTCGCAATACTTCGG
KIAA0892	ATGTTGTTACTCTCCCTGTG
KIAA1109	AAATATGAGCCAGCTCCTA
KIAA2022	GTTATTGCCTAAAGTGCTCA
KIF11	ATTATAGATGTTCTTGACG
KPNB1	TATCTCGAACAACACTACTG

target genes	sh_fwd sequence (5'>3')
LRSAM1	TTAATCTGGCTCCTGATCTGC
MACROD2	ATATATGAGCTCTGCGATTCT
MGMT	GGCTGCTAATTGCTGGTAAGA
MSR1	AATGAGAGGGATGAGAACTG
MT1X	ATTTACATCTGAGAGCACAGC
MTNR1A	ATATAATGGCATTGAGGCAGC
NHP2L1	TAGTTACATGACTGCTGAACG
OR5B12	CAAATATTGGGCTTGGTAGAC
OR7G3	GACATTGTACCTCAGTGGGTG
PGR	TATCTTGGGTAATTGTGCAGC
PHF5A	ATAGGAGTACAAATACACA
POMGNT1	ATTGAGGACCTTGTGTCTGG
POU3F2	AAACCAAACCTCTACCACCTC
PSMA1	CATAGCATTCCACCACTCTGC
PSMA3	GACAGTATGTATAATCCAGGG
PSMA5	TTAGCATCAGCAATTAGCCCA
PSMC6	ATAAGCCAACATCTGTCTATGC
PWP2	TACTGCATGTTATAGTGGTTC
RPL37A	ATTATAGGCCAGTGATGTCTC
RPS26	TAATGTAGCTTCACATACAGC
SETX	ATGTTAGGACAATAATCTGGG
SF3A3	TTTGTTCCTTTCAGTGTCTCG
SKP1A	AGAAGAAACTTGCCGTAAG
SLC25A30	ATTCGCTCTGGCCTTGAATCTG
SLU7	ATTGAAATGGTATCTCCTGTG
SMARCC2	AAATGCATGCCTCTGTTAGGC
SNRPD3	TTGTCCTCTGCTTCAATGAGC
TAS2R1	AAACCCTGCATATTTGCTATG
TMEM59	AACTGACAGTATCATGGCAGG
TMOD1	ATTGTGTGGGTTTAATCACGC
TTL4	TTTCTGGGTCAGATAATAGGC
UBE2D1	TAACTAATGGTGACTAATGGC
USP16	TTCACAAAGCAGTTTATTCGC
VAMP1	TACTGACTGCTTTCTTCCAGC
ZCCHC11	TTATCTGTACATGTCTGTTGC
ZNF587	AATCAGTTGAACTTGGGAGGC

表 2-3 本研究で用いた抗体

標的	製品名	メーカー	Cat.#	用途
Aiolos	anti-Aiolos (O-21)	Santa Cruz	sc-101982	WB* ¹ 、蛍光免疫
□-actin	anti-beta actin (AC-15)	Abcam	ab6276	WB
CRBN	CRBN#65	東京医科大学伊藤拓水准教授より分与		WB
CUL4A	anti-Cullin 4a	Abcam	ab72548	WB
DDB1	anti-DDB1	Abcam	ab97522	WB
Flag	anti-Flag M2	Sigma	F1804	WB
GSPT1	anti-eRF3/GSPT1	Abcam	ab49878	WB
GST	GST (B-14)	Santa Cruz	sc-128	WB
HA	anti-HA.11	BioLegend	901501	蛍光免疫染色
IRF4	IRF4 (M-17)	Santa Cruz	sc-6059	WB、蛍光免疫染
c-Myc	c-Myc 抗体 (9E10)	Santa Cruz	sc-40	WB
Ikaros	anti-Ikaros	Abcam	ab26083	WB
KPNB1	karyopherin □1 antibody (H-7)	Santa Cruz	sc-1919	WB
mouse IgG	Anti-mouse IgG HRP linked	CST* ²	7076	WB の二次抗体
rabbit IgG	Anti-rabbit IgG HRP linked	CST	7074	WB の二次抗体
rat IgG	Anti-rat IgG HRP linked	CST	7077	WB の二次抗体
mouse IgG	Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	Thermo Fisher* ³	A11029	蛍光免疫染色の二 次抗体
rabbit IgG	Goat anti-rabbit IgG (H+L) Highly Cross-adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	Thermo Fisher	A11034	蛍光免疫染色の二 次抗体
rabbit IgG	Goat anti-rabbit IgG (H+L) Highly Cross-adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	Thermo Fisher	A11011	蛍光免疫染色の二 次抗体

*1 WB: Western Blotting

*2 CST: Cell Signaling Technology

*3 Thermo Fisher: Thermo Fisher Scientific

表 2-4 qRT-PCR に用いた primer 配列

Target gene	Forward primer (5' > 3')	Reverse primer (5' > 3')
<i>ABCB7</i>	TTTGGCAAGGTAGCCCAGAAT	ACACCACTGACAAGCATCACT
<i>ALP1</i>	GATCAATTCCGAAGTGCAGCT	CTTGACTGCAAAGGGAATGT
<i>AMIGO2</i>	CAACACAGAGCTCCCTATTGT	CAGGTCCAGTCTCTTAATCAG
<i>AQP1</i>	TGTGGGATTAACCCTGCTCG	CAGCTTGTCAGAGTGTCTAC
<i>ASS1</i>	CTGAAGGAACAAGGCTATGAC	CAGGGAGCAATGACCTTTATC
<i>ATHL1</i>	AATGGGAGCCGTGAGGAATGC	GGACTCCGTAAATGTCTCAG
<i>ATOX1</i>	ACGAGTTCTCTGTGGACATGA	AATAGGACAACTGAGGGTCTC
<i>BCAR3</i>	AACTCATTACCTTGCCACAG	AGCAGTGGGACTGATACATTG
<i>BTBD3</i>	CTGCTTTTCTCGCTATGCTGA	GTCGTTGGCATTCTACTTCAG
<i>C6orf48</i>	CTGCACTAATCTGAGTGAAGG	TTCTTAGGATATGCCAGCAC
<i>CCL1</i>	CATGCAGATCATCACCACAG	CAGAAGGAATGGTGTAGGGC
<i>CCL7</i>	CTACAGAAGGACCACAGTAG	ACCCACCAAAATCCATGGAAG
<i>CD164</i>	TTCTGTTCCGCTAAACCCACA	TTCACGGATGATGCTCCCAA
<i>CD4</i>	CCTAAGCTGATGCTGAGTTTG	TGTCTCTGAAACCGGTGAGG
<i>CD83</i>	CTTGCTCCGAAGATGTGGACT	TGCACGGCTACAGAGTATCTT
<i>CD84</i>	ATTCGGAAGTGCAGTTTGCTG	TCAGAAGGGAGTCATTTACAGG
<i>CDA</i>	GGAGAATCTTCAAAGGGTGCA	GGACCGTCATGACAATATACG
<i>CDC2L2</i>	TCATAGCCATTGAGCAGAAGG	TTCCGGTATGTGCAGACACTT
<i>CENPF</i>	GAACAAGAGGTGACTCCAAGT	CTTTCTCCAGTTGGAGTTGGA
<i>CLDN11</i>	TACTGCTGCTGACTGTTCTTC	ACACTGTGACGAGCAAACCTA
<i>CMTM3</i>	CTACCATCGTGTTTGCAACTG	ACGCAGCGTGGTCAACAGTGC
<i>c-Myc</i>	TGCACTGGAACCTTACAACACC	AGGTCATAGTTCCCTGTTGGTG
<i>COPS5</i>	TGACCAAGCACACAGATCTTC	GTCTTGAACCTTGCTGTGCTG
<i>COPS6</i>	TGACCAAGCACACAGATCTTC	TGCTGTGCTATCAGGTGTTCA
<i>CSF2</i>	TGAACCTGAGTAGAGACACTG	CAGAAAGTCCTTCAGGTTCTC
<i>CUL4A</i>	CAGATTGATGCTGCTATCGTC	GGATTGTCTTTGTCTCTCTCC
<i>DDB1</i>	TTCAGATGGCTATCCTGACAG	ATAAGTAGGTTGTGCACCTCC
<i>DUSP1</i>	ATACGAAGCGTTTTCGGCTTC	GTCTATGAAGTCAATGGCCTC
<i>FEMP1</i>	CACCGAAGAAACCATCAGTA	TTCCGCCGGATGACAAAGTTA
<i>EIF4A3</i>	GCTGCTCAAAGAGGAAGACAT	ACTGAGACTGTGCGATGACAT
<i>EPHA2</i>	AAGTGGTACTGCTGGACTTTG	AATCTTGGTGAACAGGCGCTT
<i>FAM43A</i>	AACTTACACCGTGCTCTACCT	TTGAGGCGTTTAAATTCCGCC
<i>GPLIM4</i>	AACAGCACAGTGACTTGGAAG	GTGGTCTTCCAAAGTCACTAC
<i>GRC5A</i>	GGATTATCCTGTTGAGGATGC	ACTCTTCAGGACAGAGTTAGC
<i>COPS1</i>	TGCCGGTTCAGGTGTTAACT	AAAGGTTCTCTGCACGAAGGA
<i>HES1</i>	GAAATGACAGTGAAGCACCTC	GTAGGTCATGGCATTGATCTG
<i>HOXA</i>	CGGCAACTTCAAGTTCGGACA	ACGATCAGTGAGGTTGAGCAT
<i>HSPA4</i>	GATCAAGAACTCGAGCCATTG	AAATCACACAGTCAGCCACTG
<i>ID2</i>	CACTATTGTCAGCCTGCATCA	CCATTCAACTTGTCTCCTTG
<i>IER3</i>	TCCGGTCCTGAGATCTTCACC	CAGAAGACGATGGTGAGCAGC
<i>IGF2BP3</i>	ACCACTCCATACTGGACTAGT	ATATCGGAAACCTCAGCGAGA
<i>IK</i>	AGACAGTTGATCCAGGAGTCC	ATCAGCCTTGCTGCGGATAAG
<i>IL8</i>	CTGTGTGAAGGTGCAGTTTTG	GCTTGAAGTTTCACTGGCATC
<i>INSL4</i>	CTCCTTAGAGAAAGCCTAGCA	TGGATCAAATCTGTGACGTCC
<i>IPO11</i>	ATAGTTTGAGGCCATGCACTG	GCATGGGTCTTAAGTCAGACT
<i>IRF4</i>	GCTGATCGACCAGATCGACAG	GATGCCTTCTCGGAACCTTCC
<i>ITIH4</i>	CACCTGGCAGAATAAGACCAA	TGAGGTCATCCAGGACTTTGA
<i>KCNMA1</i>	AGGAGGCCCAGAAGATTAACA	AACACGTTGAAAGCCATGTCC
<i>KIAA0232</i>	CTCTCCAGAGGCAGAATTATC	GGGTACTTCACTGCTTCTTTC

(次ページに続く)

表 3-4 qRT-PCR に用いた primer 配列 (続き)

Target gene	Forward primer (5' > 3')	Reverse primer (5' > 3')
<i>KIAA1109</i>	AGTCATGCTTGTTCCTAGTCC	GCAAGGATCTGTCTTGGTCTC
<i>KPNB1</i>	TTCTGACTGCCATAATCCAGG	AGCCACCTCATCAATGTCACT
<i>LIF</i>	ATACGCCACCCATGTCACAAC	CTTCTGGAAGACATCCTTACC
<i>LRSAM1</i>	TCCACACGAATCACCTCACTT	CTGGATCTCGTTTCCACTGAT
<i>LYPD3</i>	CCGAACAAGATGAAGACAGTG	GGTATGCACTCTCATTACCTG
<i>MAP3KIP7</i>	ACCCTGCTAGTGAGGAACTTT	AAGTCCACATAGGGCTCAACA
<i>METTL7A</i>	TCAAGAGCATTGCAGAGAACC	GTTGCACCCATCAAACAGAAG
<i>MSR1</i>	AAGTCCTTCAAAGCTGCACTG	TATTGCATTCCCATGTCCCTG
<i>MT2A</i>	CTCCTGCAAATGCAAAGAGTG	GGAATATAGCAAACGGTCACG
<i>MTNR1A</i>	TTCACCATCGTGGTGGACATC	AGACTGTGGCAGATGTAGCAG
<i>NEDD8</i>	TCTACAGTGGCAAGCAGATGA	AGGACTGCAAACATAACACCCA
<i>NHP2L1</i>	CTCGTTCAGCAGTCATGTAAC	GGATTGGATCTGCTGTTTCAG
<i>NNMT1</i>	GATCTTGAAGGGAACAGAGTC	GAGAACTTCTGCTCACCAATC
<i>NR2F1</i>	CTTAACTTACACATGCCGTGC	GATGCCCATAATGTTGTTGGG
<i>NT5E</i>	CACTATCTGGTTCACCGTGTA	CCGAATGTCCAGTGCAATAA
<i>NUCK</i>	GGCAGCGATGAAGATTTCTTA	AATCTCTCCCCAGACCATCAT
<i>OLFM1</i>	TGAGGAGAGCTGGCAGGTGTA	GCCTGGCCAGGTGTTGCTTAT
<i>p21</i>	AAGACCATGTGGACCTGTCAC	AGACTAAGGCAGAAGATGTAG
<i>PGR</i>	AATCGGGTAAGCCTTGTTGT	CAAACCTCGTGCATGCTGTGAA
<i>PHLDA1</i>	CACCTCCAACCTCTGCCTGAAA	ACAGTACATCATCGCTCCTAG
<i>PLAUR</i>	TGCATGCAGTGTAAGACCAAC	CAAGTCTAACCACACACAAC
<i>POMGNT1</i>	CTTGTACAAGGAGGAGCTTGA	TCAGACTGTCCACATTCTCTGA
<i>POU3F2</i>	AAGTAACTGTCAAATGCGCGG	TGTTGCTGTTGCTGCTGCTGA
<i>PPP1R15</i>	GGATATCGACCTGGAAAAGAG	GAAATGGACAGTGACCTTCTC
<i>PSMA1</i>	GCACCTCCTTGATTCTCAGTT	AGTCTAGCATCAGCAGTAAGC
<i>PSMA5</i>	AGACACAGAACCACTGGTTCA	TGTTGCATTACAGCTTCTCCTC
<i>PSMC6</i>	GGTGAAAGTGCTCGTTTGATC	TTTGTAATGGGACCTGCATGG
<i>RHOC</i>	CAGGAAGACTATGATCGACTG	TGAGCACTCAAGGTAGCCAAA
<i>PND3</i>	CAAGATAGTTGTGGTGGGAGA	TCCTGGATTTACACCTTCCAC
<i>RPL37</i>	GCCAAGTACACTTGCTCTTTC	TAGGCCAGTGATGTCTCAAAG
<i>RPS26</i>	TATTCGCTGCACTAAGTGTGC	CAGCTCCTTACATGGGCTTTG
<i>rRNA total</i>	GTAACCCGTTGAACCCCAT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
<i>SI00A6</i>	GAATGTGCGTTGTGTAAGCCA	GCCTTGCAATTTACAGCATCCT
<i>SAT1</i>	GAAGGACACAGCATTGTTGGT	CTCCTTGTCGATCTTGAACAG
<i>SERPINE1</i>	CATCTGTACAAGGAGCTCATG	GTTGAAGTAGAGGGCATTACAC
<i>SF3A3</i>	AGATGCTCACCAAGAAGTCCA	ACGACCATATCCCTCTTCATC
<i>SKP1</i>	TAACACCGAACACCATGCCTT	AAACTGTGTGCTACCTACCTG
<i>SLU7</i>	AGCAGTTCAGCTCATCTGGAG	GGAGTTTCTGGGCTTTCAATG
<i>SMARCC2</i>	AATGGGTACGACCAGTCATGA	TTCACCTCATCTGTCAGTGTC
<i>SMOC1</i>	GTGATCAAGGACTCCAAACTG	CAGTAGGCTGGTGATAAACTC
<i>SNRPD3</i>	ATGAACTGCCAGATGTCCAAC	ATATGCACAAGCACCCACTCC
<i>STX1A</i>	AAGTTTGTGGAGGTCATGTCG	GTCCATGAACATGTGCGTGTAG
<i>TMEM59</i>	CTCTCGGTGATGGTATTGCTT	ACAATCCCAAACATCCACCTC
<i>TMPD1</i>	CTAAGCAGAAGCCACTGGATC	GCGTTTCCTCTACGTCTGTTG
<i>TNFAIP2</i>	GCACCGATACACACTGGAAAT	CCGTTTCAACAAATTCCTGAG
<i>TTLL4</i>	TCAGGCTGAGACTGAAGATAC	CCAATGGTCTGCTTGACAATG
<i>UBE2D1</i>	GCATATCAAGGTGGAGTCTTC	GCTCTCATCAGCTCTTAAGG
<i>USP16</i>	CCTGTGTGCAGACATTAGA	ATCAACCACTTGACCCAACCTG
<i>ZNF587</i>	CCTTTGAAGATGTGGCTGTGA	TCAGCTTCTGCTTGTGATGAG

第3章 shRNA ライブラリスクリーニング

3-1 諸言

thalidomide 誘導体である CRBN modulator はいずれも CRBN に直接結合 CRL4^{CRBN} のユビキチン化基質を変化させることで多岐に渡る薬理作用を発揮するが、CRBN を中心とした分子経路は未だ不明な点が多い。例えば、pomalidomide は CRBN を介して Aiolos のユビキチン化・分解を誘導し、抗がん活性を発揮するが、CRBN の活性を調整する因子や CRBN の下流因子などは詳細が不明である。そこで本研究では多発性骨髄腫に対する pomalidomide の抗増殖作用を指標とした shRNA ライブラリスクリーニングにより CRBN 経路に関わる pomalidomide 標的遺伝子の網羅的探索を目的とした。今回採用したライブラリには約 15,000 のヒト遺伝子を標的とした約 82,500 shRNA が含まれているため、ヒトの大部分の遺伝子を対象としたスクリーニングを行なったことになる (図 2-1B)。

3-2 shRNA ライブラリスクリーニングの条件の決定

shRNA ライブラリスクリーニングにおいて pomalidomide 標的遺伝子を効率よく同定するには、pomalidomide の薬効が顕著にみられ、かつ標的因子の KD で pomalidomide の薬効に変化がみられなくなることが重要である。すなわち、pomalidomide の細胞増殖阻害効果が適度かつ十分に見られることと、既知の pomalidomide 標的因子 CRBN の KD によって pomalidomide の細胞増殖阻害効果が大きく抑制されることの 2 点が重要である。

多発性骨髄腫細胞株 OPM-2 細胞に pomalidomide を処理し生細胞数の測定を行ったところ、pomalidomide を 1 μ M で 5 日間処理したときに細胞増殖阻害効果が顕著に見られ、pomalidomide により生細胞数の差が約 100 倍に開いた (図 3-1A)。次に、CRBN を標的とする shRNA 発現ベクター (shCRBN) をパッケージングしたレンチウイルスベクターを用いて pomalidomide 標的因子の CRBN を KD し、qRT-PCR により mRNA 発現量を定量し KD の確認をした (図 3-1C)。CRBN の mRNA 発現量を比較すると、shRNA を発現しないコントロールベクターを用いた細胞 (Control) と比較して、CRBN KD 細胞 (shCRBN) では CRBN の mRNA 発現量が 20%程度に低下が見られ、CRBN の KD が効率よくできていることが

分かった。CRBN を KD した OPM-2 細胞に pomalidomide を 1 μ M で 5 日間処理したところ、pomalidomide による細胞数の差が 3 倍程度となり、pomalidomide による細胞増殖阻害効果が顕著に抑制された (図 3-1B)。そこで、この条件をスクリーニングに採用することに決定した。

3-3 shRNA ライブラリスクリーニング

今回用いた Collecta Pooled Bar-Coded Lentiviral shRNA Libraries には約 15,000 のヒト遺伝子を標的とした 82,500 種類の shRNA 配列 (1 遺伝子あたり 5 shRNA 以上) がレンチウイルスベクター DNA に組み込まれており (図 2-1A)、それらはライブラリの複雑度を下げるため、それぞれ 27,500 の shRNA からなる 3 つの module として提供されている (図 2-1B)。まず、各 module のプラスミドライブラリをそれぞれパッケージング用の DNA とともに 293FT 細胞に co-transfection し、各 module の組換えレンチウイルス溶液を調製した (図 2-2A)。次に、多重感染がほぼ起きない条件でそれらを OPM-2 細胞に感染させた。レンチウイルスに感染した各細胞は 27,500 shRNA のいずれか 1 つを発現していると考えられる。その後、感染細胞をスプリットし、先の実験で決定した条件 (1 μ M で 5 日間) を用いて pomalidomide 処理を行なった (pomalidomide 未処理 (Pom -) と pomalidomide 処理 (Pom +) をそれぞれ duplicate) (図 2-2A)。

Pom -/+ の各細胞集団から gDNA を抽出し、各 shRNA 配列に紐づけられたユニークなバーコード配列を PCR で増幅して、それらを HTS で定量した。なお、gDNA の PCR は、バーコードの量比を歪めないよう必要最小限のサイクル数で行った。各 module には 27,500 shRNA が含まれるため、各 shRNA に対応するバーコード配列のリード数は計算上、 10^6 リードあたり平均約 37 リードとなる。私が採用した条件ではディッシュ中の各細胞は 1 種類の shRNA を発現し、1 コピーのバーコード配列がゲノムに組み込まれていると考えられるので、これはディッシュ中の 10^6 細胞あたり各 shRNA を発現する細胞が約 37 個あるというのと同義である。(実際には、ライブラリ中の各 shRNA クローンの存在量比は等しくないなので、 10^6 リードあたりのリード数は shRNA クローンごとにまちまちだが、話を単純化するため平均値を用いる。) ほとんどの shRNA は pomalidomide の薬効に影響せず、shRNA 発現細胞は等しく pomalidomide の増殖阻害効果を受けるため、Control 条件でも pomalidomide 処理条件でも 10^6 リードあたりのリード数は変化せず、37 リード程度になると考えられる (図 2-2 緑)。

しかし、CRBN の様に KD が pomalidomide 感受性を低下する遺伝子を標的とする shRNA を導入した細胞は、pomalidomide 処理条件で他の細胞の増殖が阻害される中で順調に細胞増殖するため、 10^6 細胞あたりの細胞数が増加し、Control 条件では 37 程度だったリード数が数倍に増加することが期待される (図 2-2 青)。反対に、KD が pomalidomide 感受性を増加する遺伝子を標的とする shRNA を導入した細胞では、pomalidomide 処理によって細胞死がより強く誘導されるため、 10^6 細胞あたりの細胞数が減少し、pomalidomide 処理条件でリード数が減少することが期待される (図 2-2 赤)。

3-4 shRNA ライブラリスクリーニング結果の解析

変動遺伝子 (KD によって pomalidomide 感受性が変化する遺伝子) の抽出は max fold change (maxFC) と false discovery rate (FDR) という 2 種類の統計値を用いた (図 2-3B)。maxFC と FDR は、各遺伝子に対応する複数の shRNA の中に KD 効率の高いものと低いものが混在していると考えられる状況で、shRNA の効果を異なる観点から評価した統計値である。maxFC は、ある遺伝子を KD して得られた効果の中から最大のものを代表値として選ぶという観点で評価した統計値で、1 遺伝子に対応する複数の shRNA のリード数比 (Pom +/-) うち、2 を底とする対数の絶対値が最大となる値を採用する。例えばある遺伝子に対して 5 つの shRNA があり、それぞれのリード数比 (Pom +/-) が 0.5、0.8、0.9、1.3、4.0 の場合は $|\log_2(0.5)|=1.0$ 、 $|\log_2(4.0)|=2.0$ などと計算されるので maxFC は 4.0 となり、リード数比 (Pom +/-) が 0.25、0.6、1.0、1.4、2.0 の場合は $|\log_2(0.25)|=2.0$ 、 $|\log_2(2.0)|=1.0$ などと計算されるので maxFC は 0.25 となる。前述したように、pomalidomide 感受性に影響しない大多数の遺伝子は maxFC が 1 程度となり、KD が pomalidomide 耐性を与える遺伝子は maxFC が 1 より大きくなり、KD が pomalidomide 高感受性を与える遺伝子は maxFC が 1 より小さくなるはずである。一方、偽陽性率 FDR は、1 遺伝子に対応する複数の shRNA のうち 1 つだけで観察された効果はオフターゲット効果である可能性を排除できないので、全 shRNA の効果を統合的に評価するというという観点で求めた統計値である。ノンパラメトリックな統計手法である NRP 法 (2-2-3 参照) を用いて各遺伝子に対応する FDR を計算した (図 2-3B)。

HTS で得られた各バーコードのリード数を、サンプル間補正するため 10^6 リードあたりリード数 (RPM) に変換した後、maxFC と FDR を用いて変動遺伝子

を抽出した (表 3-1、表 3-2)。maxFC が $|\log_2(\text{maxFC})| > \log_2(3)$ 、つまり KD によって pomalidomide 感受性が 3 倍より大きく変化した遺伝子は 141 個あった (図 3-2A、B、表 3-1、表 3-2)。一方、FDR < 0.1 となった遺伝子は 360 個あった (表 1、2、5、6)。maxFC、FDR いずれかの指標で検出された遺伝子は 445 個あり、両方法で検出された遺伝子は 56 個あった。いずれかの指標で検出された 445 遺伝子を変動遺伝子、両方法で検出され、より信頼性が高い 56 遺伝子を overlap 遺伝子とそれぞれ呼ぶことにした。

3-5 変動遺伝子に含まれる既知の CRBN 関連遺伝子

変動遺伝子には CRBN を中心としたユビキチンプロテアソーム経路の遺伝子が複数含まれていた (図 3-3A)。具体的には CRBN と E3 ユビキチンリガーゼ複合体を形成する ROC1 や DDB1、CRBN 複合体の活性に重要な NEDD8 修飾に関わる neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 8 (NEDD8) や CSN のサブユニット COP9 signalosome complex subunit 1 (COPS1/GPS1)、COP9 signalosome complex subunit 2 (COPS2)、COP9 signalosome complex subunit 4 (COPS4)、COP9 signalosome complex subunit 5 (COPS5)、COP9 signalosome complex subunit 6 (COPS6) が変動遺伝子として得られた。また、ポリユビキチン化された基質を分解する 26S proteasome のサブユニットの Proteasome 20S Subunit Alpha 1 (PSMA1)、Proteasome 20S Subunit Alpha 2 (PSMA2)、Proteasome 20S Subunit Alpha 3 (PSMA3)、Proteasome 20S Subunit Alpha 5 (PSMA5)、Proteasome 20S Subunit Alpha 6 (PSMA6)、26S proteasome regulatory subunit S10B (PSMC6)、26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 (PSMD1) も含まれていた。これらの遺伝子のうち CRBN、ROC1、DDB1、COPS1、COPS6、PSMA1、PSMA2、PSMA3、PSMA5、PSMC6 は overlap 遺伝子にも含まれていた。

同定された因子が pomalidomide の薬効に関わることを確認するため、CRBN を中心とするユビキチンプロテアソーム経路に関与する遺伝子を OPM-2 細胞で KD し、10 nM もしくは 100 nM の pomalidomide を 6 時間処理することで Aiolos 分解への影響を調べた (図 3-4)。通常状態 (control) では 100 nM の pomalidomide によって Aiolos の発現量が明確に低下する。PSMC6 のノックダウンでは pomalidomide 依存的な Aiolos の分解が見られたが、COPS1、COPS6、NEDD8、PSMA1、PSMA3、PSMA5 のノックダウンによって pomalidomide 依存的な Aiolos の発現量低下が抑えられた。以上の結果から、変動遺伝子に含まれたこれら因子

の多くは Aiolos 分解の上流で pomalidomide の感受性に関与することが確認された。

3-6 個別 KD による shRNA ライブラリスクリーニングの validation

shRNA ライブラリスクリーニングが新規の因子を同定できているかを検証するため、変動遺伝子の個別 KD を行い、pomalidomide の細胞増殖阻害効果に与える影響を調べた。個別 KD を行う遺伝子は、overlap 遺伝子から CRBN を含む 11 遺伝子と overlap 遺伝子としては検出されなかったが、pomalidomide 感受性に影響を与えることが期待された 14 遺伝子 (1st スクリーニングで $\text{maxFC} > 2$ 、あるいは複数の shRNA でリード数比 ($\text{Pom} +/ -$) > 1.5) を選択した。この 14 遺伝子には CRBN と相互作用し、CRBN modulator に依存しないユビキチン化基質である potassium channel, calcium activated large conductance subfamily M alpha, member 1 (KCNMA1)²⁶、CUL4A の修飾である NEDD8 などが含まれている。shRNA 発現レンチウイルスを感染後、3 日目から pomalidomide を $1 \mu\text{M}$ で 5 日間処理し、生細胞数測定によって pomalidomide 感受性に与える影響を調べた (図 3-5)。

本節では、KD を行わない Control 細胞に比べ、pomalidomide 未処理細胞の細胞数が $1/2$ 以下 (図 3-5A Pom - が 0.5 未満) となったものを「KD が細胞増殖に影響有り」と判定した。細胞増殖への悪影響が大きいと正確な生細胞数測定が困難となり、pomalidomide による細胞数の変化を正確に捉えることが困難である。ゆえに、KD が細胞増殖にあまり影響しない遺伝子のうち、pomalidomide 感受性が Control 細胞の半分以下 (図 3-5A の Pom - が 0.5 以上で、図 3-5B が Control 細胞の 0.3 の 2 倍である 0.6 以上) となったものを pomalidomide 感受性が低下したと判定した (図 3-5A, B)。

図 3-5 において 11 個の overlap 遺伝子のうち、CRBN から senataxin (SETX) までの 9 遺伝子は 1st スクリーニングで pomalidomide 感受性が低下した遺伝子である。反対に neurexin 1 (NRXN1) と progesterone receptor (PGR) は 1st スクリーニングでは pomalidomide 感受性が上がった遺伝子である。overlap 遺伝子のうち、細胞増殖に影響が小さかったのは CRBN と cluster of differentiation 164 (CD164) のみで、残り 9 遺伝子では細胞増殖に影響があった (図 3-5A Pom -)。CRBN と CD164 の個別 KD では pomalidomide 感受性が低下した (図 3-5B)。一方、overlap 遺伝子ではない遺伝子では 14 遺伝子中 13 遺伝子で細胞増殖に影響があり、細胞増殖に影響の少ない Cell Division Cycle 2-Like 2 (CDC2L2) では pomalidomide

感受性低下がみられなかった (図 3-5A, B)。

今回個別 KD を行った 25 遺伝子中 22 遺伝子で、KD の細胞増殖への悪影響が見られ、pomalidomide 感受性に関しては判定することができなかった。変動遺伝子 445 個全ての個別 KD を行うことは困難であるため、focused ライブラリを用いた更なるスクリーニングにより、pomalidomide 感受性に関与することがより確からしく、かつ KD の細胞増殖への悪影響が小さい遺伝子を絞り込む事にした。

3-7 HTS による focused ライブラリスクリーニング (2nd スクリーニング)

変動遺伝子のうち、pomalidomide の薬効に関与するもの絞り込むために focused library を用いた screening を行った (図 2-5A、2-6A)。focused library には 56 の overlap 遺伝子と、過去の報告などから CRBN の機能に関わりがありそうな 24 遺伝子、合計 80 遺伝子を標的とした shRNA を含めた (表 2-1)。focused library には pRSI9_ΔBC をベースとした shRNA 発現プラスミドを用い、1st スクリーニングと同条件で screening を行った。

2nd スクリーニングでは pomalidomide 未処理 (Control) と pomalidomide 処理 (pomalidomide) をそれぞれ 3 サンプル、triplicate で実験をしたが、2nd スクリーニングでは Control と pomalidomide で綺麗にグループ分けすることができず、むしろ Control_2 と pomalidomide_2 の方が近い分布になった (図 3-6A、表 3-4)。さらに各 shRNA に対する 10^6 リードあたりのリード数相対比 [Pom +/-] を 2nd FC [Pom +/-] と定義して計算したところ、CRBN の KD ですら 2nd FC [Pom +/-] -1.0 で Control と pomalidomide でリード数変化がなく変動遺伝子として検出できなかった。shRNA library では標的遺伝子の 97%以上が pomalidomide 感受性に関係ない遺伝子であることに対して、focused library の標的遺伝子は 89%が感受性を低下させる遺伝子である。よって全体的に同一の方向に動いてしまうことが、2nd スクリーニングで CRBN が検出できなかった原因の一つと考えられた。もしくは gDNA から HTS サンプルを調製する段階で、各 shRNA 発現クローンの量が均等に増幅されなかった可能性も考えられた。

2nd スクリーニングが上手くいかなかった原因を明らかにするため、HTS サンプルと HTS サンプル調製に使用した gDNA の両方を qPCR で定量し、各 shRNA クローン相対比を求めた (図 2-5C,D、図 3-6B-D)。HTS サンプルの qPCR では

HTS と同様の結果が得られ、HTS と qPCR という定量方法の違いは定量結果に影響しないことが分かった (図 3-6B, C)。しかしながら total DNA 量で標準化した上で gDNA を鋳型に用いて qPCR で直接、標的配列を定量したところ、CRBN の KD で相対比 [Pom +/-] が 2.7 となり、pomalidomide 感受性の低下を捉えることができた (図 3-6D)。

そこで、1st スクリーニングで pomalidomide 感受性が低下した遺伝子群のうち、2nd スクリーニングでも感受性が低下した High Mobility Group Nucleosomal Binding Domain 2 (HGMN2, maxFC=2.5、2nd FC [Pom +/-] =1.9)、2nd スクリーニングでは感受性が増加した NEDD8 (maxFC=2.8、2nd FC [Pom +/-] =0.1)、2nd スクリーニングでは感受性に影響がなかった ROC1 (maxFC=4.5、2nd FC [Pom +/-] =1.0) についても同様に qPCR を行った。その結果、NEDD8 の KD は相対比 [Pom +/-] が 1 に近く、pomalidomide 感受性への影響は認められなかったが、HGMN2 と ROC1 の KD は両方とも相対比 [Pom +/-] が 2 以上であり、pomalidomide 感受性が低下することが確認された (図 3-6D)。

focused ライブラリスクリーニングでは HTS 用のライブラリ調製の過程で shRNA クローンの相対量比が変化してしまうことがわかった。total DNA 量で標準化した上で gDNA から直接 qPCR で定量する方法は、総細胞数で補正をかけるのと同じで定量法として妥当と考えられるため、この方法で改めて focused ライブラリスクリーニングを行うことにした。

3-8 qPCR による focused ライブラリスクリーニング (3rd スクリーニング)

2nd スクリーニングと同条件でサンプル調製を行い、細胞から調製した gDNA を total DNA 量で標準化して直接 qPCR で定量し、focused ライブラリスクリーニングを行った (図 2-5、2-6A、3-7A、表 3-4)。各サンプルを比較するための補正は、2nd スクリーニングでは各サンプルのリード数により補正を行ったが、3rd スクリーニングでは gDNA 量で補正した。

3rd スクリーニングではサンプル間の誤差が小さく、2nd スクリーニングとは違い、6 サンプルを Control と pomalidomide で綺麗にグループ分けすることができた (図 3-7A)。qPCR により定量された各 shRNA クローン相対量比 (Pom +/-) を 3rd FC [Pom +/-] と定義して計算し、3rd FC [Pom +/-] > 1.5 を変動遺伝子とみなしたところ、2nd スクリーニングとは異なり CRBN が変動遺伝子として検出さ

れた (3rd FC [Pom+/-] = 2.4)。よって 3rd スクリーニングは成功していると考えた。また、focused library に含まれる 80 遺伝子中、41 遺伝子の KD が pomalidomide 感受性を低下させた。overlap 遺伝子に絞ると、56 遺伝子中 27 遺伝子の KD が 3rd FC [Pom+/-] > 2.0 となり pomalidomide 感受性を低下させたが、1st と 3rd の両方で pomalidomide 感受性を低下させたのはそのうち 25 遺伝子であった。一方、3rd スクリーニングで pomalidomide 高感受性を与えた変動遺伝子 (3rd FC [Pom+/-] < 0.66) は 5 つあったが、全て 1st スクリーニングとは反対の結果となった。1st と 3rd の両方で pomalidomide 高感受性を与えた遺伝子はなかった。

以上をまとめると、1st と 3rd スクリーニングの両方の実験系で KD が pomalidomide 耐性を与える遺伝子として検出された 25 遺伝子は、pomalidomide の薬効に関与することが強く示唆された。一方、KD が pomalidomide 高感受性を与える遺伝子として確度の高いものは見つからなかった。

3-9 変動遺伝子が多発性骨髄腫の細胞増殖に与える影響の解析 (4th スクリーニング)

これまでの解析では、Pomalidomide 未処理、処理を比較する事で各 shRNA が Pomalidomide の感受性に及ぼす影響のみを調べてきた。個別 KD 解析をするにあたっては KD 自体が細胞増殖に与える影響が小さい事が望ましい (図 3-4)。そこで次に、overlap 遺伝子に対する各 shRNA が多発性骨髄腫の増殖に与える影響を focused ライブラリスクリーニングにより調べた。focused library を OPM-2 細胞に感染後、3 日後 (Day 3) と 8 日後 (Day 8) に細胞を回収し、3rd スクリーニングと同様に qPCR を行った (表 3-4、図 2-5、2-6B、3-7B)。4th スクリーニングでは shRNA 発現クローンの相対比 (Day 8/Day 3) を 4th FC [Day8/3] と定義して計算した。4th FC [Day8/3] < 1.0、すなわち相対比が day 8 で減少すれば、その遺伝子の KD 自体が多発性骨髄腫細胞の増殖を抑えたと解釈できる。

CRBN は 4th FC [Day8/3] が 0.6 となり、OPM-2 細胞では CRBN の KD は細胞の増殖にあまり影響を与えないことが分かった。CRBN を単独で KD した時、何も KD しない細胞と比較してほとんど細胞増殖に影響がなかった結果と一致したため、4th スクリーニングは成功していると考えられた (図 3-1A、B、図 3-5A、図 3-7B)。

3-10 pomalidomide 標的遺伝子の個別 KD による細胞増殖への影響

3-6 で個別 KD を行っていない遺伝子を中心に 23 遺伝子を個別に KD し、1st、3rd、4th スクリーニングの検証実験を行った。KD には focused library に含まれていた shRNA 発現レンチウイルスベクターを用いた。それぞれの遺伝子を KD するレンチウイルスベクターを作製し、OPM-2 に感染後 2 日目から 5 日間 pomalidomide を 1 μ M で処理し、生細胞数を数えた (図 3-8A、B)。

本節では 3-6 と同様に、KD を行わない Control 細胞に比べ、pomalidomide 未処理細胞の細胞数が 1/2 以下 (図 3-8A Pom - が 0.5 未満) となったものを「KD が細胞増殖に影響有り」と判定した。また、KD が細胞増殖にあまり影響しない遺伝子のうち、pomalidomide 感受性が Control 細胞の半分以下 (図 3-8A の Pom - が 0.5 以上で、図 3-8B が Control 細胞の 0.22 の 2 倍である 0.44 以上) となったものを pomalidomide 感受性が低下したと判定した (図 3-8A, B)。

4th スクリーニングで KD 自体の細胞増殖阻害効果が小さかった (4th FC [Day8/3] > 0.2) となった 19 遺伝子中 11 遺伝子では個別 KD による細胞増殖への影響が小さく、9 遺伝子で pomalidomide 感受性が低下した。一方、4th スクリーニングで細胞増殖阻害効果が大きかった (4th FC [Day8/3] < 0.2) 5 遺伝子では全ての遺伝子で KD による細胞増殖に影響があった (図 3-8A pomalidomide -)。また、図 3-5 と図 3-8 の結果を合わせると、1st スクリーニングで overlap 遺伝子として検出された 56 遺伝子中、35 遺伝子の個別 KD を行い約 3 割の 10 遺伝子 (29%) で pomalidomide 感受性が低下した。しかしながら本実験系ではサンプル間の誤差が大きく SD が大きいため、データの信頼性が低いと考えられた。

3-11 GFP/RFP を用いた pomalidomide 標的遺伝子の個別 KD による細胞増殖への影響

個別 KD の実験では KD による細胞増殖阻害が起きてしまうため、そこにさらに pomalidomide 処理を行って生細胞数をただ計測するだけでは pomalidomide 感受性の変化を正しく捉えるのが難しいことが、ここまでの解析から分かってきた。OPM-2 のような浮遊細胞では培養液中の細胞濃度が細胞増殖に影響するので、KD による細胞増殖への悪影響が特に出やすいと考えられる。そこで、GFP 陽性のコントロール細胞と RFP 陽性の KD 細胞を用意してそれらを混合し、同一の培養液中で 2 種類の細胞の pomalidomide 感受性を調べることによって、KD の細胞増殖への悪影響を排除しようと考えた。

本研究で KD に用いた pRSI9 は元々 RFP を発現するベクターなので、KD 細胞は RFP 陽性となる。そこで pRSI9 の RFP を GFP に置き換えた pRSI9_GFP_Control を作製し、レンチウイルスベクターとして OPM-2 に感染させることで GFP 陽性のコントロール細胞を作製した。GFP 陽性のコントロール細胞と RFP 陽性の KD 細胞を等量混合し、pomalidomide 未処理の細胞 (Pom -) と、1 μ M で pomalidomide を 6 日間処理した細胞 (Pom +) に調製した。これらを Tali image cytometer にかけて GFP 陽性細胞 (Control cells) と RFP 陽性細胞 (Knockdown cells) を計測し、shRNA による pomalidomide 感受性の低下を示す指標 Resistance index を計算した (図 3-9A)。

29 遺伝子の KD を行い Resistance index を計測したところ、RFP 陽性のコントロール KD 細胞 (Control) を用いた際の Resistance index (理論上 1) がほぼ 1 だったのに対して、調べた 29 遺伝子の KD の多くで Resistance index が増加した (図 3-9B)。特に CRBN や ROC1 といった CRL4^{CRBN} の構成因子の KD で Resistance index が顕著に増加しており、3-4 や 3-8 の実験と比較して信頼の置ける結果が得られたと考えられた。

図 3-9 の結果が OPM-2 細胞に特異的でないことを確認するため、pomalidomide への感受性を示す他の多発性骨髄腫患者由来の細胞株である MM1.S 細胞と H929 細胞でも同様の実験を行なった。OPM-2 細胞で KD を行なった 29 遺伝子のうち、CRL4^{CRBN} 複合体の構成因子 ROC1 と DDB1 やその他のユビキチンプロテアソーム経路に関わる 9 遺伝子を除く 20 遺伝子について KD を行なった (図 3-10)。その結果、OPM-2 細胞の実験結果と同様に多くの遺伝子の KD で Resistance index が増加した。

以上の結果から、変動遺伝子の KD によって OPM-2 だけでなく複数の骨髄腫細胞株で pomalidomide の感受性が確かに減少したことが確認された。

3-12 個別遺伝子の KD が CRBN の下流因子に与える影響

pomalidomide を多発性骨髄腫細胞に処理すると転写因子 Aiolos が分解され、c-Myc や IRF4 の発現が低下し細胞増殖が阻害される^{5,12-14}。そしてこれらの影響は CRBN を KD すると見られなくなる (図 3-11)。そこで変動遺伝子についても同様に KD を行い Aiolos、c-Myc、IRF4 へ影響を与えるか調べた。

293T 細胞で overlap 遺伝子を中心に変動遺伝子の KD を行い Aiolos の分解に与える影響を調べた。293T 細胞は Aiolos を発現しないため、shRNA の発現ベク

ターと Aiolos の発現ベクターを co-transfection した。transfection の 60 時間後から 1 μ M の pomalidomide を 12 時間処理し、ウエスタンブロットで Aiolos の発現量を比較した (図 3-12)。OPM-2 細胞の結果と同様に、Aiolos の上流で pomalidomide の感受性に関与する CRL4^{CRBN} や CSN の構成因子や NEDD8 の KD では Aiolos の分解が見られなくなった。またユビキチン化経路に関係する Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 D1 (UBE2D1)、Ubiquitin Specific Peptidase 16 (USP16) や、ケモカイン CKLF like MARVEL transmembrane domain containing 3 (CMTM3) やスプライシング因子 SLU7 Homolog, Splicing Factor (SLU7) の KD でも Aiolos の分解が見られなくなり、これらの因子も Aiolos の上流で pomalidomide 感受性に関与することが示唆された。

次に OPM-2 細胞において変動遺伝子を個別に KD し、pomalidomide による IRF4、c-Myc の発現量低下に影響を与えるかどうか調べた。shRNA を発現するレンチウイルスベクターを OPM-2 細胞に感染し、2 日後から 1 μ M の pomalidomide を 2.5 日間処理した後 total RNA を回収し、qRT-PCR により *IRF4* と *c-Myc* の mRNA 発現量を定量し、GAPDH で遺伝子発現量を標準化後に pomalidomide 処理による相対比 (fold change [Pom +/-]) を算出した。(図 3-13)。

shRNA を発現しない細胞 (Control) では pomalidomide によって IRF4 の発現量は約 0.4 倍に、c-Myc の発現量は約 0.3 倍に低下した。3-10 で示した KD による Aiolos 分解への影響と同様に、pomalidomide の感受性に関与する CRL4^{CRBN} や COP9 signalosome の構成因子や NEDD8 の KD では pomalidomide 依存的な IRF4 や c-Myc の発現量低下は抑えられた。また、3-10 で KD により Aiolos の分解がみられなくなった CMTM3 の KD でも IRF4 や c-Myc の発現量低下が抑えられ、Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A3 (EIF4A3) などのスプライシング因子の KD でも pomalidomide 依存的な発現量の低下が抑えられた。

3-13 まとめ

本 shRNA ライブラリスクリーニングによって pomalidomide の感受性に関与する 445 の変動遺伝子が同定され、遺伝子リストには CRBN や DDB1、ROC1 が含まれていた。数々の個別ノックダウン実験の結果から shRNA ライブラリスクリーニングの結果は validate され、CMTM3 や SLU7 が Aiolos の上流に、EIF4A3 や UBE2D1 などが IRF4 や c-Myc の上流で pomalidomide の感受性に関与することが示唆された。

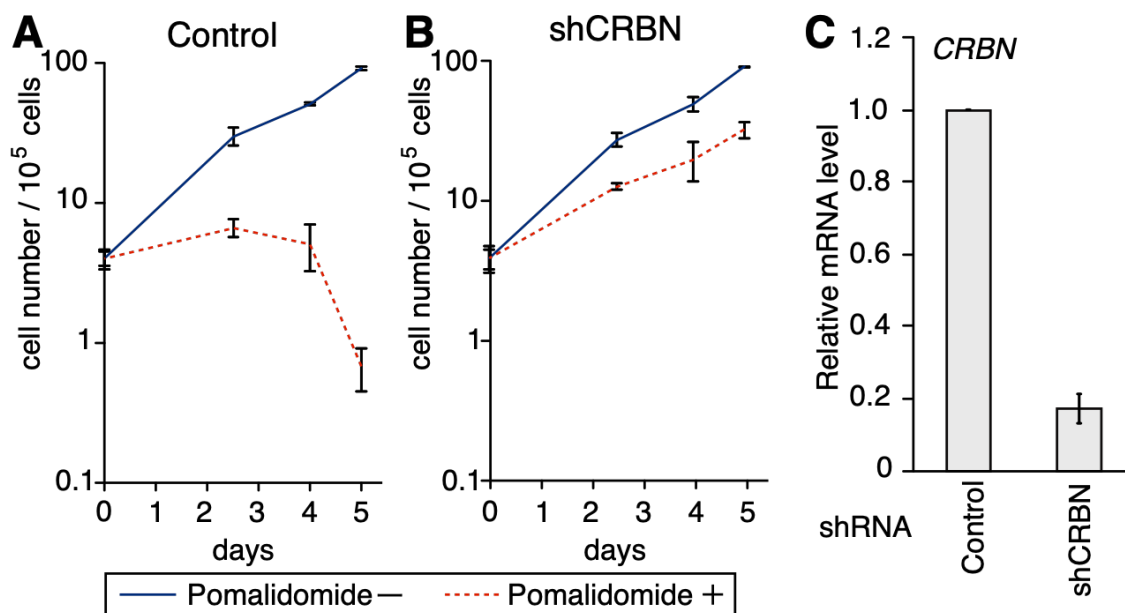


図 3-1 多発性骨髄腫細胞株 OPM-2 細胞は CRBN 依存的に pomalidomide 性を示す。

(A, B) 多発性骨髄腫細胞株 OPM-2 細胞にコントロール (Control, A) もしくは *CRBN* を標的とする shRNA (shCRBN, B) を発現するレンチウイルスベクターを M.O.I = 0.3 条件で感染させ、3 日後から 0 もしくは 1 μ M の pomalidomide 条件で培養し、SF assay により細胞数を求めた。横軸は pomalidomide 処理日数を、縦軸は生細胞数を log 化して示した。エラーバーは SD (n=3) を示した。

(C) OPM-2 細胞に M.O.I. = 3.0 条件でレンチウイルスベクターを感染させ、3 日後に total RNA を回収し、qRT-PCR により *CRBN* の mRNA 発現量を定量した。エラーバーは SD (n=3) を示した。

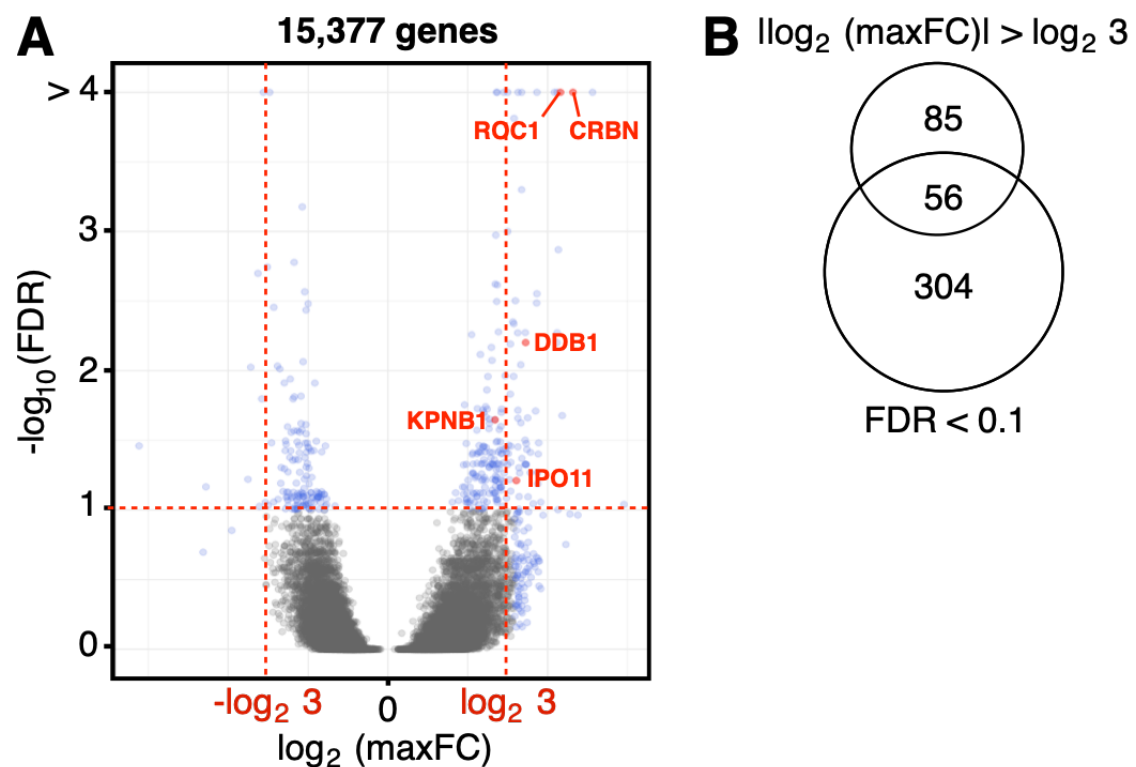


図 3-2 shRNA library screening の結果

(A, B) shRNA library screening の結果を示した。各遺伝子について maxFC と FDR をプロットした (A)。横軸は maxFC の値を底を 2 として log 化した値、縦軸は NRP により求めた FDR を底を 10 として log 化した値とした。

$|\log_2(\text{maxFC})| < 3$ 、もしくは $\text{FDR} < 0.1$ のいずれかを満たす遺伝子を変動遺伝子として青色で示し、そのうち $\text{CRL4}^{\text{CRBN}}$ の構成因子 (CRBN、ROC1、DDB1) とインポーチン (KPNB1、IPO11) を赤色で示した。また、FDR、maxFC それぞれの基準で同定された遺伝子数をベン図で示した (B)。

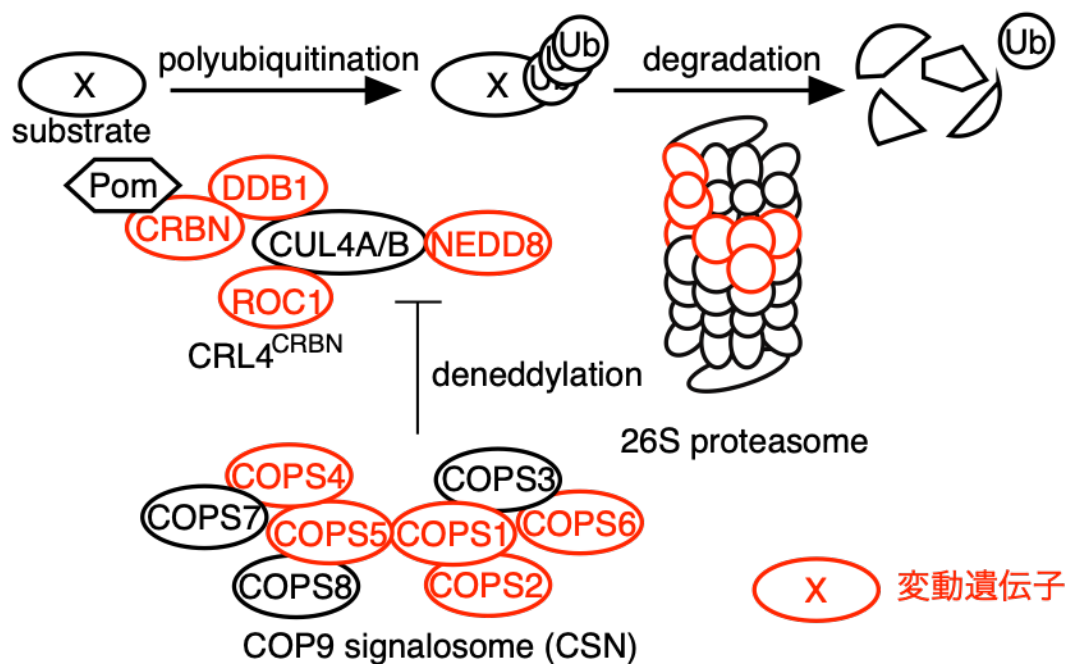


図 3-3 CRBN が関与するユビキチンプロテアソーム経路と変動遺伝子

CRL4^{CRBN} が関与するユビキチンプロテアソーム経路を示した。CRL4^{CRBN} は CRBN、DDB1、CUL4A/B、ROC1 から成り CUL4A/B は NEDD8 修飾 (neddylation) を受ける。COPS1-8 で構成される COP9 signalosome (CSN) は CUL4A/B から NEDD8 を外す (deneddylation) を行う。変動遺伝子に含まれた因子を赤色で示した。CRBN は pomalidomide (Pom) に結合し、pomalidomide 依存的なネオ基質 (X) をユビキチン化する。ユビキチン化された基質は 26S proteasome によって分解される。shRNA library screening によって変動遺伝子として同定された因子は赤色で示した。

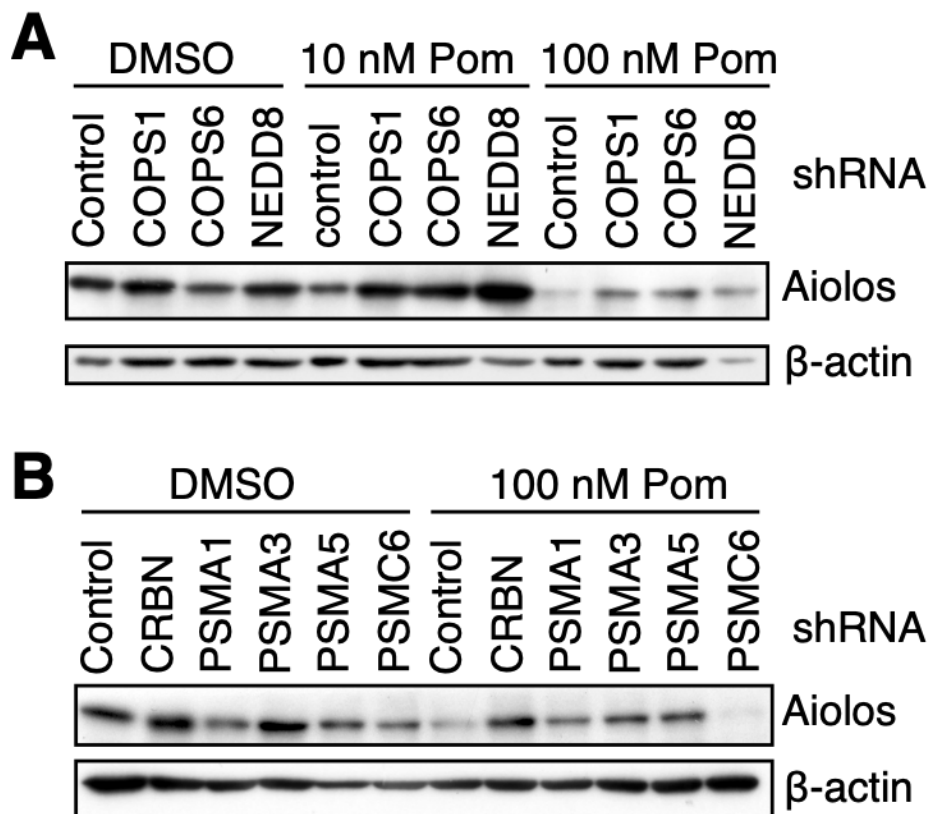


図 3-4 変動遺伝子に含まれる CRBN 関連遺伝子の KD による Aiolos 分解の変化

(A) CUL4 の neddylation に関わる NEDD8 と COP9 signalosome のサブユニットを標的とする shRNA 発現レンチウイルスを OPM-2 細胞に感染後 3 日後に 0、10、100 nM の pomalidomide で 6 時間処理し、ウエスタンブロットで Aiolos の発現量を調べた。

(B) ユビキチン化された基質の分解をうける 26S Proteasome のサブユニットを標的とする shRNA 発現レンチウイルスを OPM-2 細胞に感染後 3 日後に 0、100 nM の pomalidomide で 6 時間処理しウエスタンブロットで Aiolos の発現量を調べた。

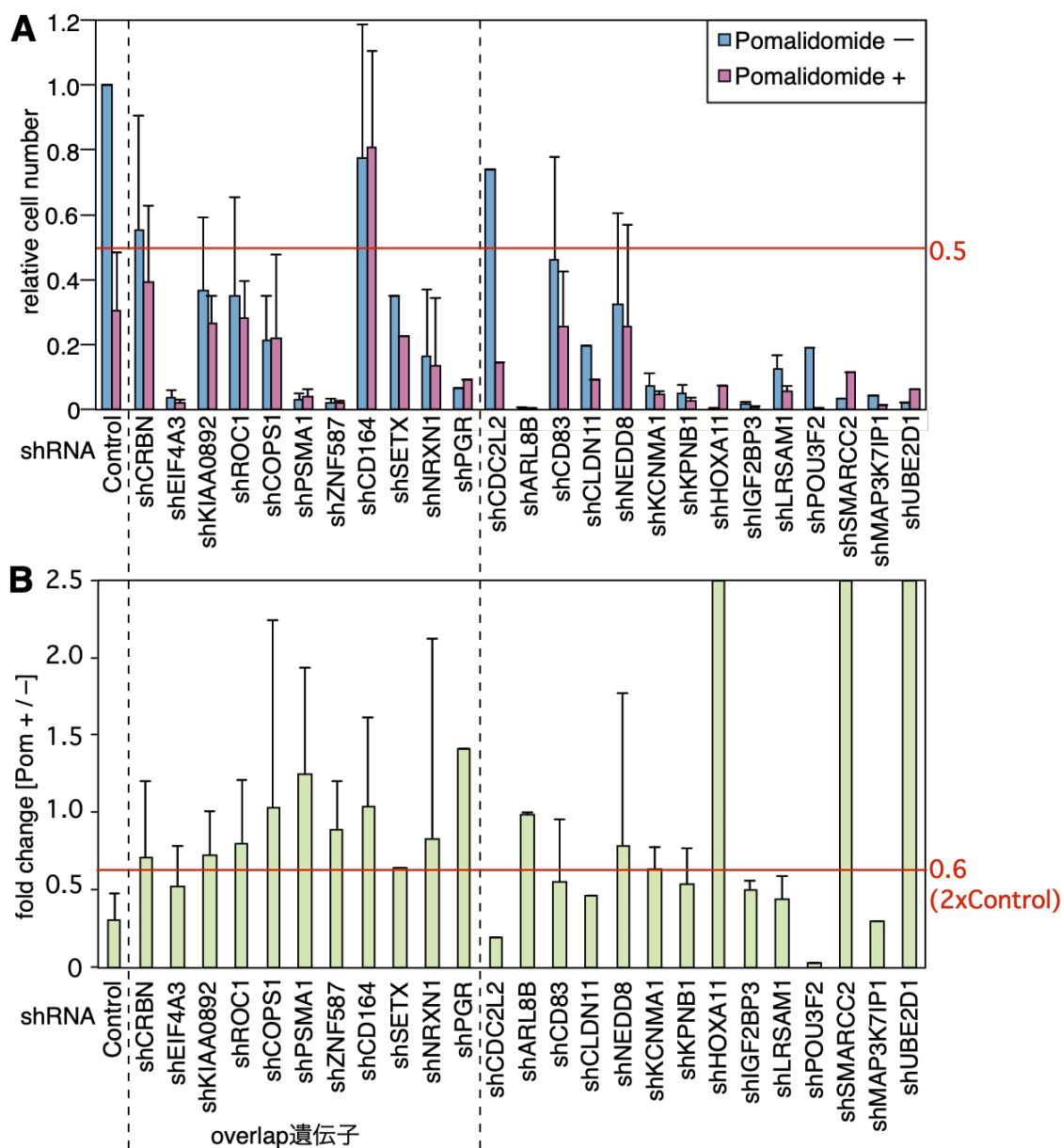


図 3-5 変動遺伝子を KD した時の pomalidomide の感受性

(A, B) OPM-2 細胞にそれぞれの shRNA を発現するレンチウイルスベクターを感染後 3 日後から 0 もしくは 1 μ M の pomalidomide を処理し、5 日後に SF assay により生細胞数を測定した。Control shRNA の pomalidomide 未処理条件の細胞数を 1 とした時の細胞数と (A)、各 KD 条件において pomalidomide 処理の細胞数の相対比 (fold change [Pom +/-]) を示した (B)。(A) で 0.5、(B) で 0.6 を超えた場合に pomalidomide 感受性が低下したとみなした。サンプルはエラーバーは SD (n=3)。

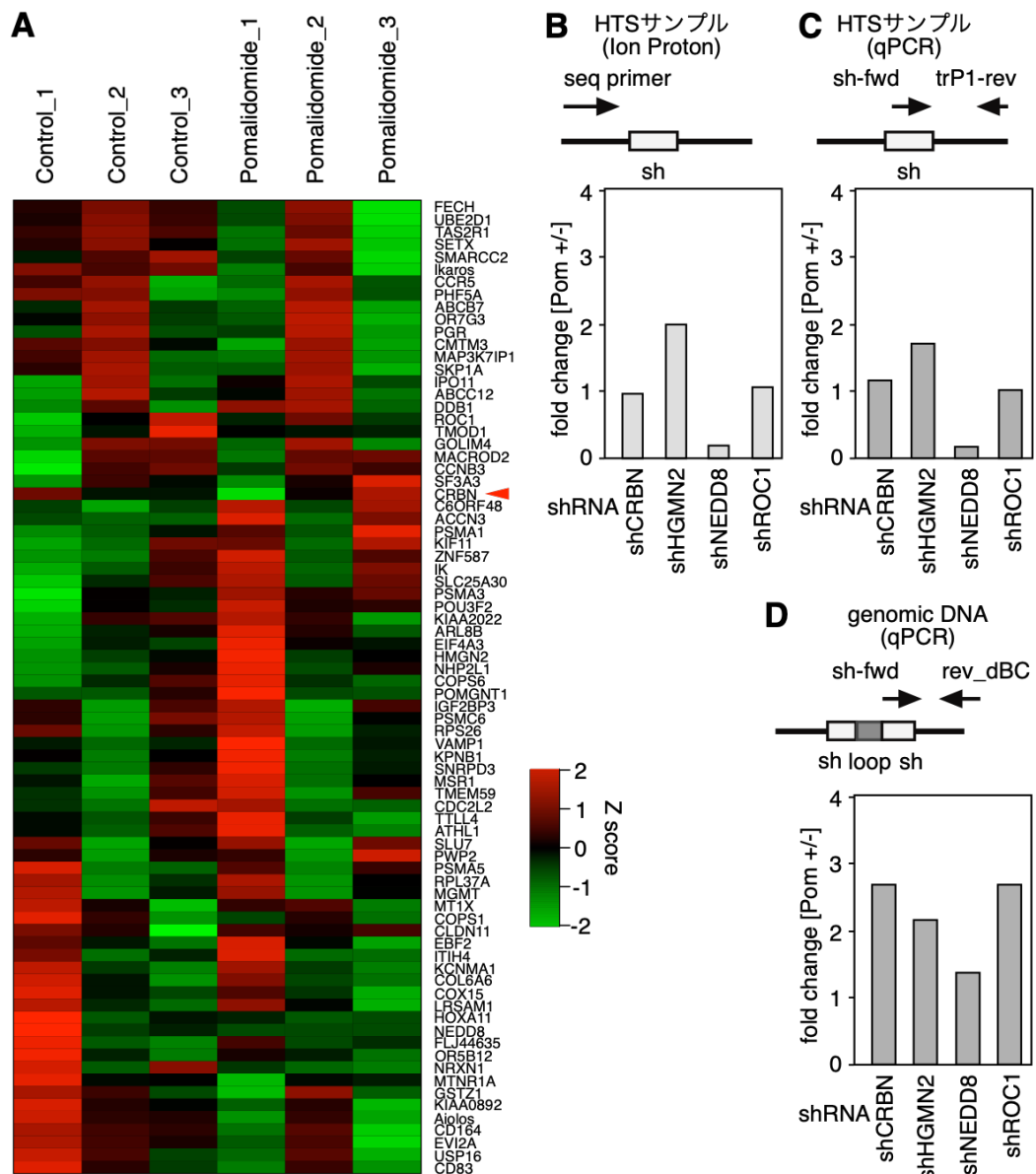


図 3-6 HTS による shRNA library screening (2nd screening)

(A) focused library を用いた 2nd screening の結果を、各行（各遺伝子）ごとに算出した Z 値を用いてヒートマップを作成し、CRBN を赤印 (▲) で示した。

(B-D) 2nd screening における HTS サンプルの HTS 定量結果 (B)、qPCR 定量結果 (C)、HTS サンプル調製前の genomic DNA を直接 qPCR した定量結果 (D) の pomalidomide 処理による相対変化量 (fold change [Pom +/-]) と定量に用いた primer を示した。

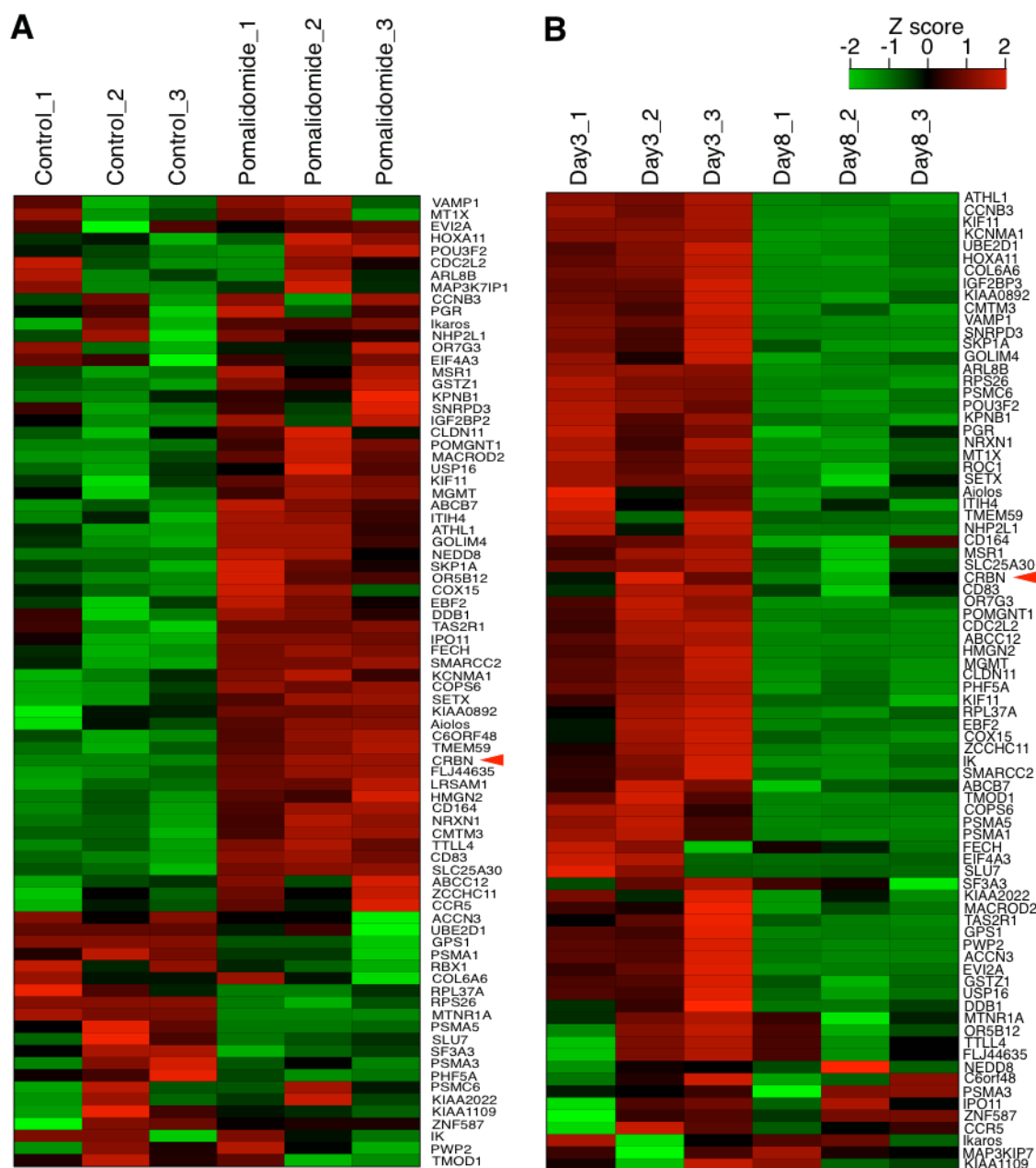


図 3-7 qPCR による focused library screening (3rd screening と 4th screening)

focused library を用いた qPCR による screening の結果を、各行ごとに算出した Z 値を用いてヒートマップを作成し、CRBN を赤印 (◄) で示した。

(A) pomalidomide の感受性を調べるために pomalidomide 未処理条件と 1 μ M 条件で比較した 3rd screening の結果を示した。

(B) shRNA による細胞増殖阻害効果を調べるために shRNA 発現レンチウイルスを感染後 3 日後と 8 日後で比較した 4th screening の結果を調べた。

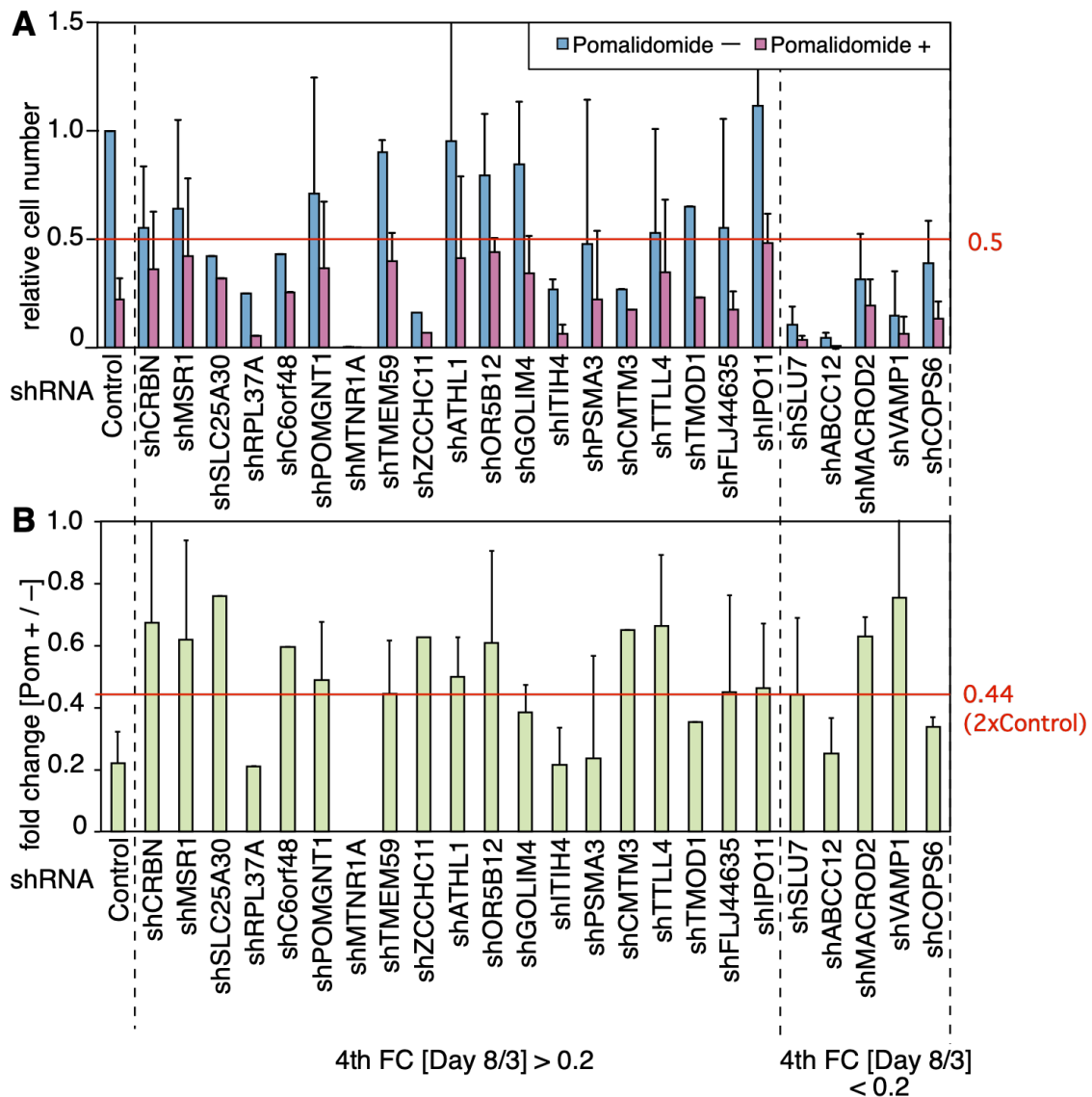


図 3-8 変動遺伝子の個別 KD による細胞増殖と pomalidomide 感受性への影響と focused library screening の結果の比較

(A) Control レンチウイルスベクターもしくは shRNA 発現レンチウイルスベクターを OPM-2 に感染させ、2 日後から 1 μ M の pomalidomide で 5 日間処理した後の細胞数を測定した。細胞数は Control の pomalidomide 未処理を基準値とした。グラフは 4th screening の結果 (4th FC[Day8/3]) をもとに区切った。エラーバーは SD (n=3)。

(B) (A) の結果から、pomalidomide 処理による細胞増殖阻害効果 fold change [Pom + / -] を算出した。エラーバーは SD (n=3)。

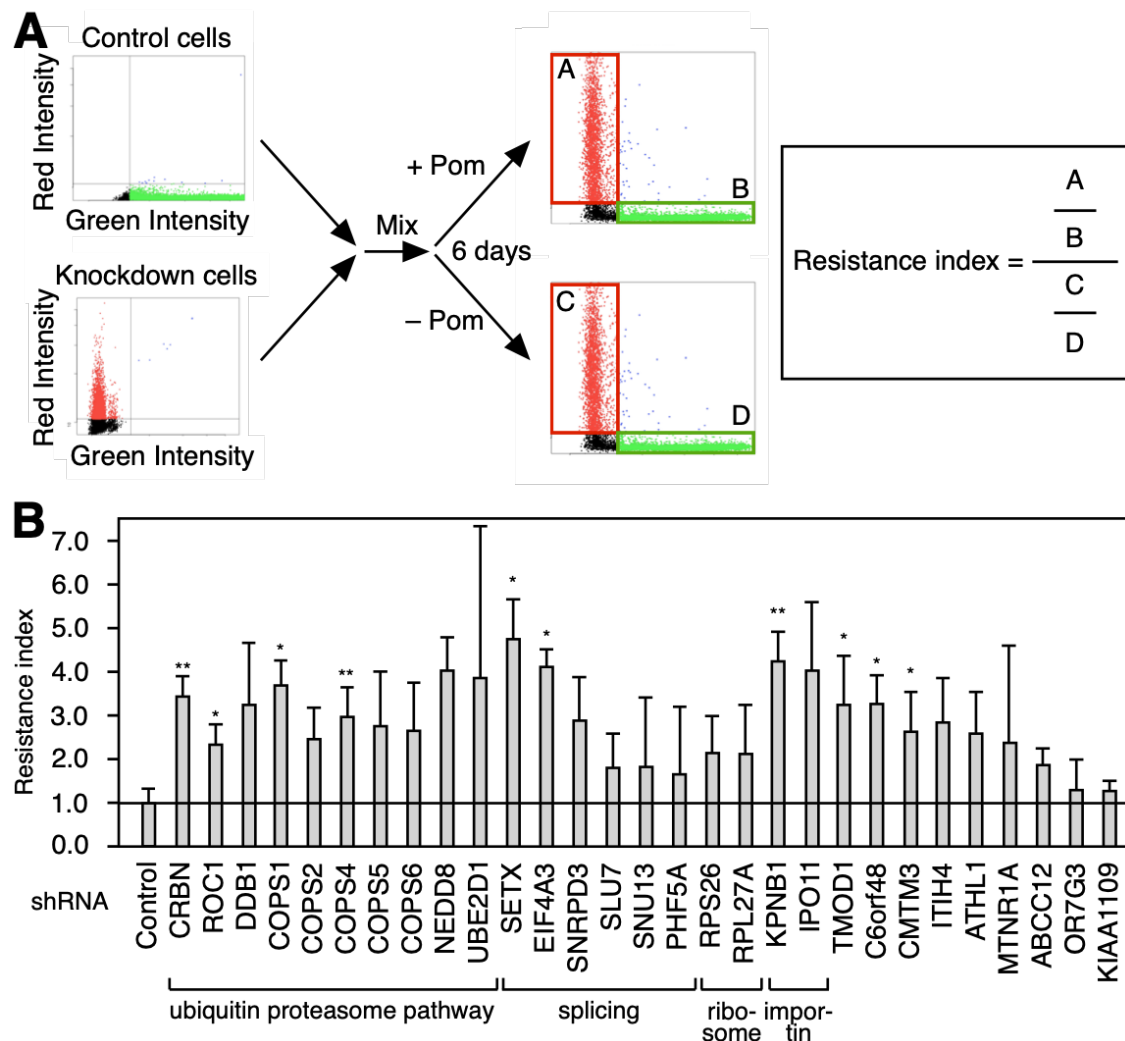


図 3-9 RFP/GFP を用いた shRNA library screening の validation

(A) Resistance index を計算する方法の概略図。shRNA を発現しない GFP 陽性のコントロール細胞 (Control cells) と shRNA を発現する RFP 陽性のノックダウン細胞 (Knockdown cells) を当量まぜ、0 もしくは 1 μ M の pomalidomide 条件で培養し、6 日後に image cytometer を用いて GFP 陽性細胞 (Control cells) と RFP 陽性細胞 (Knockdown cells) の細胞数を計測した。求めた数字をもとに図で示した式によって Resistance index を計算した。

(B) 変動遺伝子をノックダウンした時の Resistance Index を示した。Resistance index を 1 とした水平線を引いた。エラーバーは SD (n=3) であり、*は $P < 0.05$ 、**は $P < 0.01$ を示した (student's t-test)。

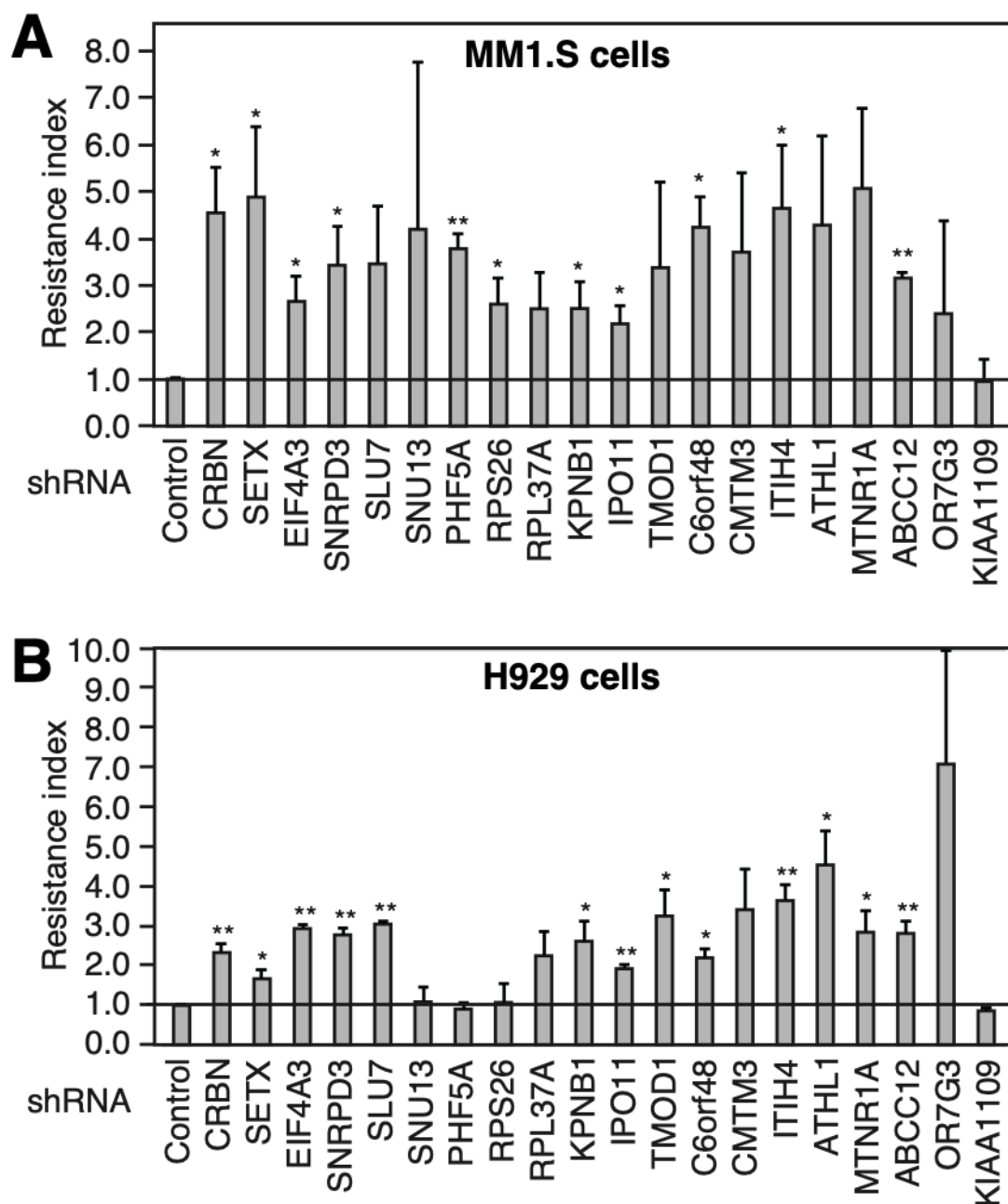


図 3-10 MM1.S、H929 細胞を用いた shRNA library screening の validation
(A, B) MM1.S (A) と H929 (B) 細胞を用いて変動遺伝子をノックダウンし pomalidomide を処理した時の Resistance Index を示した。Resistance index を 1 と
して水平線を引いた。エラーバーは SD (n=3) であり、*は $P < 0.05$ 、**は $P < 0.01$ を示した (student's t-test)。

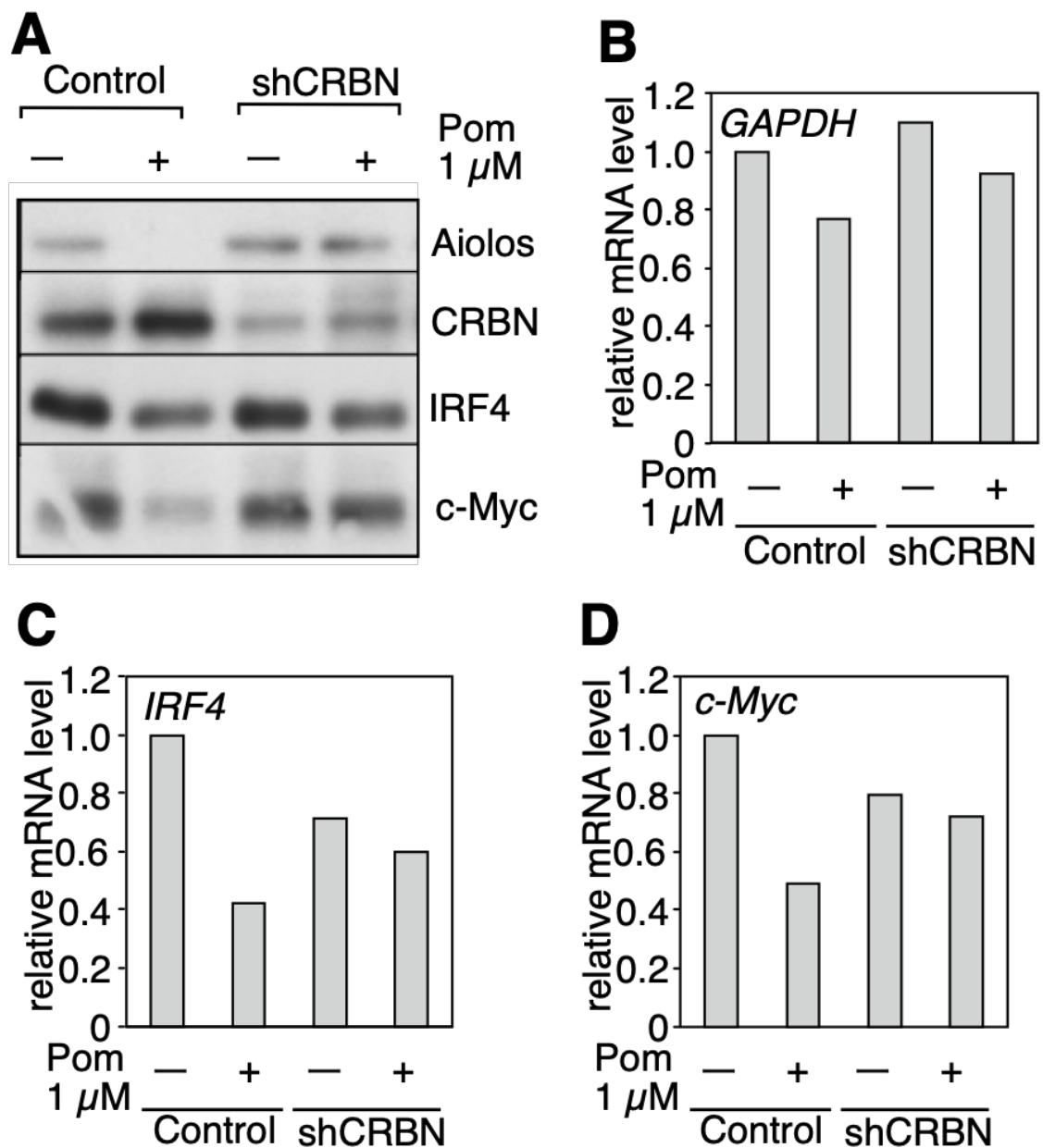


図 3-11 CRBN のノックダウンによる pomalidomide 感受性変化

CRBN を標的とする shRNA 発現レンチウイルスベクターを OPM-2 細胞に感染後、2 日後から 5 日間 pomalidomide を処理した。

(A) pomalidomide 処理 5 日後に細胞を回収し、ウェスタンブロッティングを行った。

(B-D) pomalidomide 処理 2.5 日後に total RNA を回収し、qRT-PCR により GAPDH (B)、IRF4 (C)、c-Myc (D) の mRNA 発現量を定量した。GAPDH を qRT-PCR のコントロールとした。

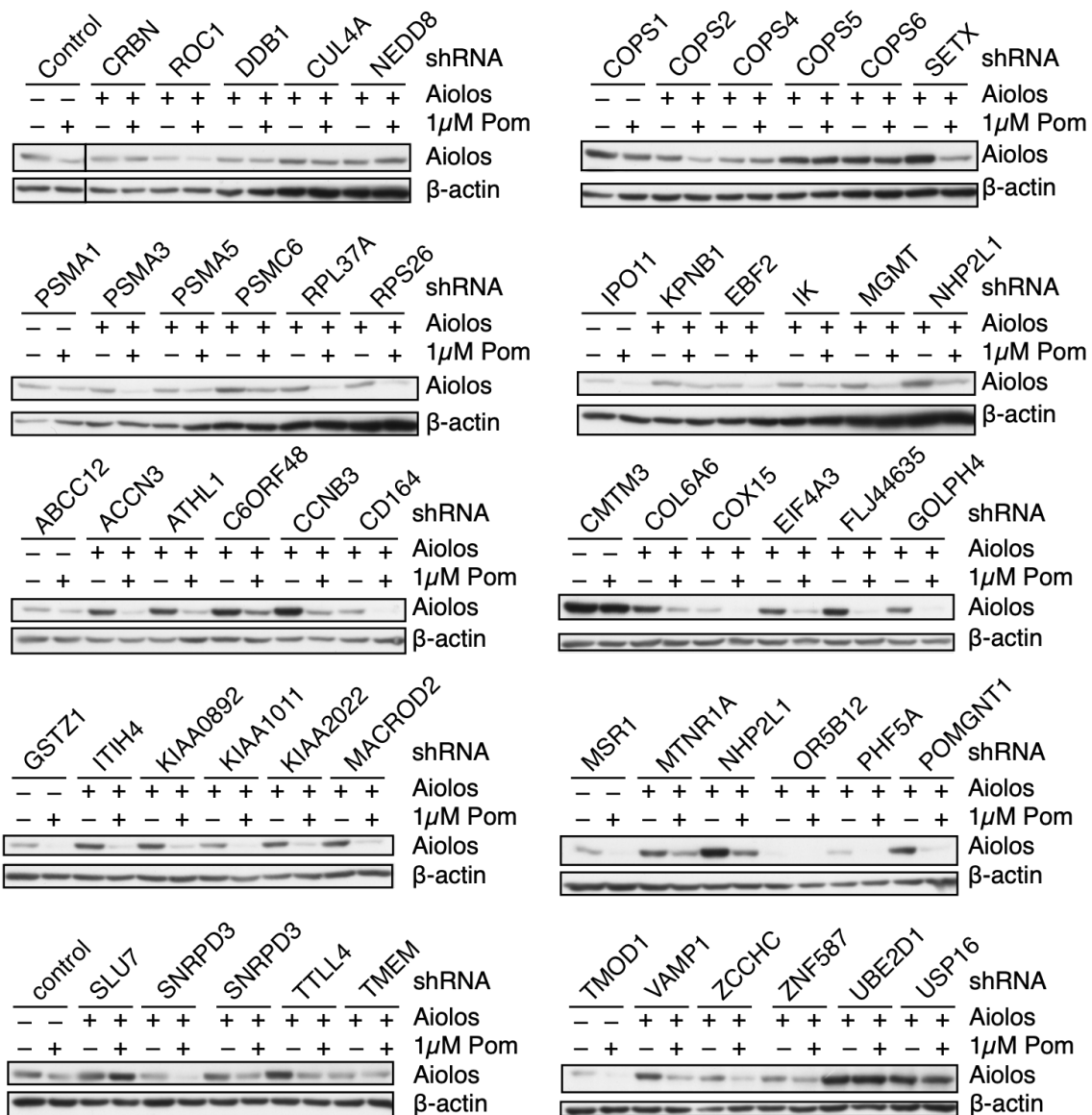


図 3-12 293T 細胞において変動遺伝子の KD による Aiolos 分解の変化

変動遺伝子を標的とする shRNA 発現ベクターと Aiolos 発現ベクターを 293T 細胞にトランスフェクションし、60 時間後から 12 時間 1 μM の pomalidomide を処理し、ウェスタンブロットで Aiolos の発現量を比較した。

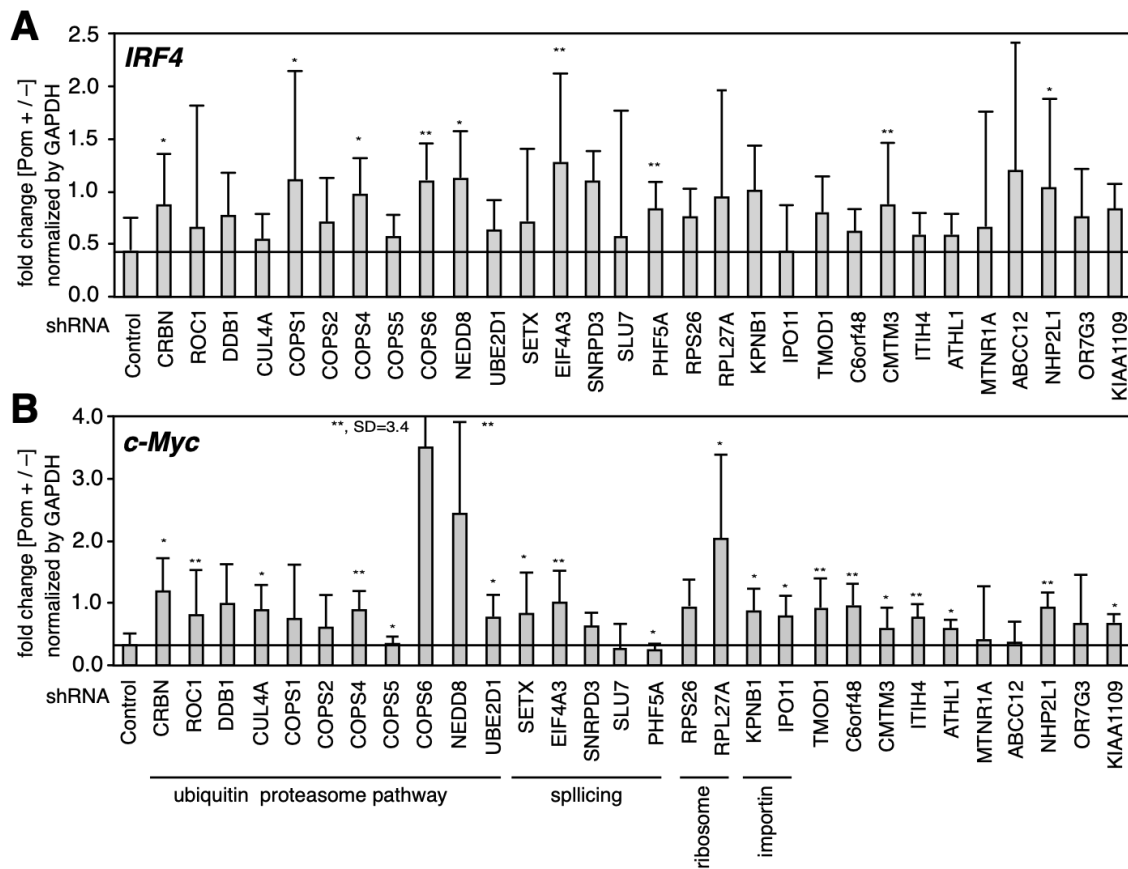


図 3-13 OPM-2 細胞の変動遺伝子 KD による *IRF4*、*c-Myc* の発現量の変化
 (A,B) 変動遺伝子を標的とする shRNA 発現レンチウイルスベクターを OPM-2 細胞に感染後、2 日後から pomalidomide 処理し、2.5 日後に total RNA を回収し、qRT-PCR により *IRF4* (A)、*c-Myc* (B) の mRNA 発現量を定量し、GAPDH を qRT-PCR のコントロールとして標準化後に pomalidomide 処理による相対比 (fold change [Pom +/-]) を算出した。エラーバーは SD (n=3) であり、*は $P<0.05$ 、**は $P<0.01$ を示した (student's t-test)。

表 3-1 変動遺伝子 (overlap 遺伝子)

Gene Symbol	$-\log_{10}[\text{FDR}]$	$\log_2[\text{maxFC}]$	Type
PWP2	2.50	1.60	overlap
IPO11	1.21	1.61	overlap
COPS6	2.27	1.63	overlap
TMOD1	1.45	1.63	overlap
KIAA1109	1.66	1.63	overlap
SNU13	1.71	1.63	overlap
ASIC3	3.00	1.63	overlap
FLJ44635	1.30	1.64	overlap
MGMT	1.01	1.64	overlap
ABCC12	1.10	1.64	overlap
SETX	1.27	1.65	overlap
TTL4	2.04	1.66	overlap
CD164	1.63	1.67	overlap
CMTM3	3.00	1.67	overlap
PSMA3	3.00	1.68	overlap
IK	1.37	1.68	overlap
ITIH4	1.50	1.72	overlap
MTNR1A	1.33	1.72	overlap
COX15	2.27	1.72	overlap
GOLIM4	1.33	1.72	overlap
DDB1	2.20	1.73	overlap
GSTZ1	1.33	1.73	overlap
OR5B12	1.33	1.73	overlap
VAMP1	1.48	1.73	overlap
PGGHG	1.43	1.74	overlap
PSMC6	1.66	1.75	overlap
TMEM59	1.09	1.76	overlap
ZNF587	1.27	1.78	overlap
KIAA2022	1.41	1.79	overlap
POMGNT1	1.04	1.82	overlap
C6ORF48	1.71	1.85	overlap
PSMA5	2.49	1.86	overlap
GPS1	2.55	1.87	overlap
PSMA1	3.00	1.87	overlap
MACROD2	1.27	1.87	overlap
MAU2	1.19	1.88	overlap
SLC25A30	1.40	1.88	overlap
MSR1	1.48	1.89	overlap
RPL37A	1.06	1.91	overlap
EIF4A3	>3.00	2.09	overlap
COL6A6	2.20	2.12	overlap
ZCCHC11	2.27	2.12	overlap
SLU7	>3.00	2.12	overlap
CCNB3	1.00	2.13	overlap
RPS26	2.87	2.13	overlap
ROC1	>3.00	2.16	overlap
SNRPD3	1.68	2.18	overlap
CRBN	>3.00	2.32	overlap
PHF5A	>3.00	2.56	overlap
EBF2	1.04	2.96	overlap

Gene Symbol	$-\log_{10}[\text{FDR}]$	$\log_2[\text{maxFC}]$	Type
PGR	1.46	-3.11	overlap
CCR5	1.17	-2.28	overlap
OR7G3	1.22	-1.75	overlap
TAS2R1	2.03	-1.72	overlap
EVI2A	2.70	-1.63	overlap
NRXN1	1.03	-1.61	overlap

表 3-2-A 変動遺伝子

Gene Symbol	$-\log_{10}[\text{FDR}]$	$\log_2[\text{maxFC}]$	Type	Gene Symbol	$-\log_{10}[\text{FDR}]$	$\log_2[\text{maxFC}]$	Type
LPAR2	0.70	-2.31	maxFC	SMARCC2	0.16	1.68	maxFC
BEND7	0.85	-1.95	maxFC	LGR4	0.53	1.69	maxFC
LNK1	0.81	1.59	maxFC	ZKSCAN1	0.63	1.70	maxFC
FRMD1	0.24	1.59	maxFC	RPL35	0.85	1.70	maxFC
EIF4G2	0.63	1.59	maxFC	NMD3	0.44	1.71	maxFC
UVSSA	0.94	1.59	maxFC	ADAD1	0.38	1.71	maxFC
SYTL2	0.65	1.59	maxFC	EFS	0.35	1.72	maxFC
WNT7B	0.59	1.59	maxFC	SPOCK2	0.73	1.72	maxFC
SRP19	0.33	1.60	maxFC	LVRN	0.55	1.72	maxFC
TMEM151B	0.31	1.60	maxFC	GPR84	0.56	1.73	maxFC
RGS1	0.60	1.60	maxFC	PIGO	0.19	1.74	maxFC
G2E3	0.51	1.60	maxFC	GOLGA8G	0.68	1.74	maxFC
POLR2A	0.51	1.60	maxFC	HTR1B	0.29	1.75	maxFC
MRPS31	0.68	1.61	maxFC	KRT9	0.58	1.75	maxFC
CKLF	0.16	1.61	maxFC	NLRP3	0.77	1.76	maxFC
BBOF1	0.85	1.61	maxFC	ELMSAN1	0.47	1.76	maxFC
LINC01139	0.97	1.61	maxFC	RSPO4	0.87	1.76	maxFC
ULK3	0.32	1.61	maxFC	RFTN1	0.55	1.76	maxFC
DAPK1	0.53	1.62	maxFC	MTIM	0.99	1.76	maxFC
ANG	0.53	1.63	maxFC	HEG1	0.64	1.76	maxFC
WWTR1	0.55	1.63	maxFC	SLF2	0.60	1.78	maxFC
RPGRIP1	0.99	1.63	maxFC	CNOT4	0.52	1.79	maxFC
CHD4	0.42	1.63	maxFC	SNX19	0.63	1.82	maxFC
ZNF790	0.45	1.63	maxFC	TAS2R19	0.68	1.82	maxFC
IL17REL	0.98	1.63	maxFC	PAF1	0.61	1.83	maxFC
ZBED3	0.76	1.63	maxFC	LPIN3	0.59	1.84	maxFC
MS4A2	0.32	1.63	maxFC	LILRA3	0.66	1.86	maxFC
SKP1	0.91	1.63	maxFC	LAIR1	0.65	1.88	maxFC
PRADC1	0.63	1.63	maxFC	P4HA2	0.56	1.88	maxFC
CASP10	0.39	1.63	maxFC	MT1X	0.63	1.88	maxFC
PPP1R1C	0.37	1.64	maxFC	DNAJA2	0.45	1.89	maxFC
MTTP	0.59	1.64	maxFC	SF3A1	0.63	1.90	maxFC
SS18	0.34	1.64	maxFC	ARL8B	0.44	1.91	maxFC
TIE1	0.37	1.64	maxFC	DOPEY1	0.96	1.94	maxFC
IFNA6	0.29	1.64	maxFC	NT5E	0.75	2.23	maxFC
EIF4G3	0.99	1.65	maxFC	KIF11	0.97	2.28	maxFC
REEP4	0.18	1.65	maxFC	PLA1A	0.96	2.38	maxFC
U2AF2	0.93	1.65	maxFC	TYMP	1.80	-1.58	FDR
L3HYPDH	0.44	1.66	maxFC	HMG2	>3.00	-1.56	FDR
HACD1	0.65	1.66	maxFC	MT01	1.06	-1.53	FDR
SNRPD2	0.76	1.67	maxFC	OR13G1	2.74	-1.51	FDR
IMPG2	0.27	1.67	maxFC	SPHK1	1.03	-1.50	FDR
KXD1	0.75	1.67	maxFC	OR13C9	>3.00	-1.48	FDR
HMCE5	0.51	1.67	maxFC	NUP133	1.48	-1.46	FDR
PAM16	0.47	1.68	maxFC	PLOD3	1.06	-1.43	FDR
ITGA2	0.31	1.68	maxFC	NRK	2.46	-1.43	FDR
HIST1H2BG	0.66	1.68	maxFC	GH2	2.03	-1.38	FDR
LHFP	0.26	1.68	maxFC	SUMF1	1.08	-1.37	FDR

(次ページへ続く)

表 3-2-B 変動遺伝子 (前ページの続き)

Gene Symbol	$-\log_{10}[\text{FDR}]$	$\log_2[\text{maxFC}]$	Type
ASNSD1	2.01	-1.35	FDR
AMN	1.19	-1.34	FDR
POU3F2	1.30	-1.34	FDR
NOTCH1	1.13	-1.31	FDR
FMR1	1.91	-1.30	FDR
CLDN10	1.30	-1.30	FDR
KCTD2	1.43	-1.28	FDR
MRC1	1.01	-1.28	FDR
USP16	1.50	-1.28	FDR
WNK4	1.09	-1.27	FDR
PNISR	1.47	-1.27	FDR
LRRK1	1.13	-1.27	FDR
FOXL1	1.10	-1.26	FDR
MRAS	1.60	-1.26	FDR
BLMH	1.07	-1.25	FDR
JAG1	1.27	-1.25	FDR
CRYBB3	1.03	-1.25	FDR
RND3	1.13	-1.25	FDR
GTPBP2	1.38	-1.23	FDR
HIST1H4I	1.94	-1.22	FDR
TMPRSS2	1.42	-1.22	FDR
OR6B3	1.56	-1.21	FDR
STMN2	1.08	-1.21	FDR
EYA2	1.01	-1.20	FDR
PGAM2	1.09	-1.20	FDR
ATXN7L2	1.36	-1.19	FDR
TJP1	1.80	-1.18	FDR
TCEB1	1.13	-1.18	FDR
SLC7A5P2	2.78	-1.17	FDR
ADAMTS4	1.57	-1.17	FDR
PRAME	1.81	-1.17	FDR
NUDT9	1.10	-1.17	FDR
SHROOM4	1.00	-1.17	FDR
OR5H6	1.01	-1.16	FDR
CPNE8	1.36	-1.16	FDR
BTNL9	1.03	-1.15	FDR
WTH3DI	1.01	-1.15	FDR
NOS1	1.19	-1.15	FDR
APCDD1L	1.07	-1.14	FDR
PKN3	1.49	-1.13	FDR
KLK3	1.01	-1.13	FDR
GPD1L	1.57	-1.13	FDR
SRPK1	1.03	-1.13	FDR
NIPA1	1.01	-1.13	FDR
GLUL	1.05	-1.13	FDR
TFE3	1.12	-1.12	FDR
TRIM68	1.36	-1.12	FDR
MMP16	1.10	-1.12	FDR

Gene Symbol	$-\log_{10}[\text{FDR}]$	$\log_2[\text{maxFC}]$	Type
C1QTNF9	1.46	-1.11	FDR
EXOC6B	1.09	-1.11	FDR
TMEM144	1.41	-1.11	FDR
VAMP3	1.56	-1.10	FDR
CCNB1IP1	1.27	-1.10	FDR
FBN1	1.11	-1.10	FDR
OR51T1	1.82	-1.09	FDR
HEXIM1	1.62	-1.09	FDR
UGDH	1.13	-1.08	FDR
PIM2	1.58	-1.08	FDR
PPFIA3	3.00	-1.07	FDR
FFAR1	1.10	-1.07	FDR
RPUSD3	1.03	-1.07	FDR
DYNC1H1	1.12	-1.06	FDR
OR7G1	1.03	-1.06	FDR
HERPUD1	2.06	-1.06	FDR
GPANK1	1.10	-1.06	FDR
COX5B	1.10	-1.05	FDR
TMEM230	1.15	-1.05	FDR
ZNF1	1.05	-1.05	FDR
DPF2	1.22	-1.04	FDR
NME4	1.37	-1.04	FDR
TPGS1	2.57	-1.04	FDR
ESRRB	1.03	-1.04	FDR
USP5	1.48	-1.03	FDR
HLF	1.61	-1.03	FDR
RSF1	2.44	-1.02	FDR
TRIM62	1.31	-1.02	FDR
HIST3H2A	1.55	-1.02	FDR
SOX8	1.06	-1.02	FDR
RFPL4B	1.04	-1.02	FDR
CDC42BPG	1.25	-1.02	FDR
CORO1A	1.41	-1.02	FDR
PCDH18	1.11	-1.01	FDR
FAM53B	1.48	-1.01	FDR
KIN	1.33	-1.01	FDR
BCAS3	1.45	-1.00	FDR
DYRK4	1.05	-1.00	FDR
VIPAS39	2.48	-1.00	FDR
ZRANB2	1.30	-0.99	FDR
TRMT61B	1.01	-0.99	FDR
SOHLH1	1.19	-0.99	FDR
HPS1	1.01	-0.98	FDR
SAR1B	1.44	-0.98	FDR
RABEP2	1.13	-0.97	FDR
CILP2	1.05	-0.96	FDR
FKTN	1.42	-0.96	FDR
RPS45	1.12	-0.96	FDR

(次ページへ続く)

表 3-2-C 変動遺伝子 (前ページの続き)

Gene Symbol	$-\log_{10}[\text{FDR}]$	$\log_2[\text{maxFC}]$	Type
ACTC1	1.23	-0.95	FDR
NEK6	1.09	-0.95	FDR
USE1	1.01	-0.95	FDR
STK4	1.09	-0.94	FDR
PAR6A	1.43	-0.93	FDR
TRMT5	1.05	-0.92	FDR
PPM1L	1.91	-0.91	FDR
KLK10	1.49	-0.89	FDR
LFNG	1.13	-0.89	FDR
METTL7A	1.08	-0.89	FDR
GUCY2F	1.09	-0.88	FDR
GPSM2	1.09	-0.88	FDR
SMPD1	1.09	-0.87	FDR
NUDT2	1.12	-0.87	FDR
OR10A7	1.10	-0.87	FDR
PNPLA6	1.09	-0.86	FDR
RBM3	1.00	-0.86	FDR
HOXB13	1.12	-0.85	FDR
OR9Q2	1.09	-0.84	FDR
NEK8	1.05	-0.84	FDR
BEX1	1.11	-0.83	FDR
FFAR2	1.13	-0.83	FDR
OGT	1.42	-0.83	FDR
PEX14	1.11	-0.80	FDR
IRX2	1.11	-0.80	FDR
OBSCN	1.00	-0.79	FDR
ZC3H12B	1.03	-0.78	FDR
FGD1	1.46	-0.78	FDR
NPPC	1.08	-0.77	FDR
BRD8	1.04	-0.77	FDR
SLC4A11	1.03	-0.66	FDR
MED11	1.06	0.81	FDR
OR4C11	1.12	0.85	FDR
CC170	1.07	0.89	FDR
OR10G2	1.16	0.94	FDR
RPL5	1.32	0.95	FDR
BMI1	1.11	0.95	FDR
EIF3B	1.16	0.96	FDR
RPL36P14	1.75	0.96	FDR
RPL8	1.05	0.98	FDR
RGS6	1.48	0.98	FDR
MSLN	1.33	0.98	FDR
STIL	1.07	0.98	FDR
GABRR1	1.08	0.99	FDR
FLJ42709	1.12	0.99	FDR
COPB2	1.05	1.00	FDR
FAM188A	1.21	1.00	FDR
RPL10	1.06	1.02	FDR
WNT2B	1.01	1.03	FDR

Gene Symbol	$-\log_{10}[\text{FDR}]$	$\log_2[\text{maxFC}]$	Type
GAS2L1	1.16	1.03	FDR
PLIN1	1.07	1.04	FDR
COPB1	2.26	1.05	FDR
IFNB1	1.26	1.06	FDR
COPS5	1.40	1.06	FDR
MRPL48	1.41	1.06	FDR
RPL23	1.27	1.06	FDR
SNURF	1.33	1.07	FDR
WDR3	1.12	1.07	FDR
RPS14	1.26	1.07	FDR
C1D	1.12	1.08	FDR
KIF20B	1.05	1.08	FDR
NPTX2	1.23	1.09	FDR
PSMA6	1.24	1.10	FDR
PTPRC	1.12	1.11	FDR
TXNDC15	1.10	1.11	FDR
RPL7	1.57	1.11	FDR
LAX1	1.33	1.12	FDR
DSC2	1.10	1.12	FDR
NSUN2	1.40	1.12	FDR
RTF1	1.73	1.12	FDR
TNNT3	1.24	1.13	FDR
RESP18	1.42	1.13	FDR
IGHMBP2	1.01	1.13	FDR
ASTL	1.04	1.14	FDR
RPL36	1.46	1.14	FDR
PFAS	1.41	1.15	FDR
THNSL1	1.12	1.16	FDR
HNRNPK	2.12	1.16	FDR
USP9X	1.41	1.16	FDR
RPL6	1.33	1.17	FDR
GNB5	1.26	1.17	FDR
PPEF1	1.21	1.18	FDR
DDX47	1.01	1.18	FDR
RPL23A	1.33	1.18	FDR
SHCBP1	1.01	1.19	FDR
PRDM2	1.45	1.19	FDR
THBS3	1.72	1.19	FDR
CSNK1G3	1.22	1.19	FDR
TMEM263	1.12	1.19	FDR
EIF3D	1.46	1.20	FDR
RAD21	1.70	1.20	FDR
DDX54	1.36	1.20	FDR
MYO5B	1.07	1.20	FDR
CCT4	1.45	1.21	FDR
LIMA1	1.23	1.21	FDR
SNAI3	1.34	1.21	FDR
SUPV3L1	1.16	1.21	FDR
LDB1	1.02	1.22	FDR

(次ページへ続く)

表 3-2-D 変動遺伝子 (前ページの続き)

Gene Symbol	$-\log_{10}[\text{FDR}]$	$\log_2[\text{maxFC}]$	Type
ARCN1	1.42	1.22	FDR
MS4A13	1.21	1.22	FDR
AKR7A2	1.74	1.22	FDR
MCM7	1.67	1.23	FDR
GART	1.45	1.23	FDR
SKIV2L2	1.06	1.24	FDR
VNN3	1.86	1.24	FDR
KNSTRN	1.72	1.24	FDR
MBD1	1.96	1.25	FDR
RIPK3	1.58	1.27	FDR
TWSG1	1.31	1.27	FDR
LDHC	1.31	1.27	FDR
WTAP	1.12	1.27	FDR
SNX32	1.62	1.27	FDR
LRSAM1	1.65	1.27	FDR
MYL1	1.42	1.28	FDR
MAP3K19	1.32	1.28	FDR
SNRPG	1.37	1.29	FDR
EIF2S2	2.17	1.30	FDR
PTPMT1	1.33	1.30	FDR
PSMD1	2.07	1.30	FDR
CAPNS1	1.14	1.30	FDR
DHX15	1.33	1.31	FDR
CAV3	1.41	1.31	FDR
OR4A15	1.22	1.31	FDR
PSCA	1.32	1.32	FDR
KCTD9	1.33	1.32	FDR
AMER2	1.12	1.32	FDR
SSH2	1.36	1.33	FDR
LIPM	1.12	1.34	FDR
RPS13	1.12	1.34	FDR
ZFP37	1.65	1.34	FDR
KPNB1	1.65	1.34	FDR
SNRPD1	2.62	1.34	FDR
USP39	1.22	1.35	FDR
TAB1	1.17	1.35	FDR
CLDN11	1.21	1.35	FDR
MAF1	1.24	1.35	FDR
HNRNPC	2.97	1.35	FDR
CPN2	1.10	1.35	FDR
UBE2N	1.07	1.36	FDR
IQSEC1	1.21	1.36	FDR
GSE1	1.49	1.36	FDR
PBOV1	1.29	1.36	FDR
PSMA2	3.00	1.36	FDR
GALNT3	1.33	1.36	FDR
HNRNPK	2.50	1.36	FDR
USP49	1.07	1.37	FDR
OR6C6	1.24	1.37	FDR
PHF19	1.05	1.37	FDR

Gene Symbol	$-\log_{10}[\text{FDR}]$	$\log_2[\text{maxFC}]$	Type
SON	2.62	1.37	FDR
RPL31	3.00	1.37	FDR
DDX41	1.49	1.37	FDR
PABPN1	1.07	1.38	FDR
RRM1	1.33	1.38	FDR
SPN	1.42	1.38	FDR
MIR503HG	2.28	1.38	FDR
GCSAM	1.29	1.39	FDR
WDR76	1.58	1.39	FDR
HNRNPAB	1.16	1.39	FDR
LCE3C	1.19	1.40	FDR
SNRPE	1.43	1.40	FDR
HOXD10	1.33	1.41	FDR
YPEL3	1.49	1.41	FDR
CEMIP	1.22	1.41	FDR
COPS2	1.16	1.41	FDR
KBTBD4	1.16	1.41	FDR
RNF14	1.60	1.41	FDR
RTN4IP1	1.14	1.42	FDR
UBR5	1.70	1.42	FDR
CRYGA	1.17	1.42	FDR
COPZ1	1.40	1.42	FDR
SNRNP200	1.72	1.43	FDR
SPG20	1.41	1.43	FDR
FAM76B	1.03	1.44	FDR
ISCU	1.21	1.44	FDR
TUBA1B	1.44	1.45	FDR
MBD6	1.34	1.45	FDR
AQR	3.00	1.45	FDR
TNIP1	1.26	1.45	FDR
RPL14	1.96	1.47	FDR
ERRFI1	1.44	1.48	FDR
SRCAP	1.41	1.48	FDR
BIRC6	1.08	1.49	FDR
COPS4	3.00	1.50	FDR
CRNKL1	1.33	1.50	FDR
NEDD8	3.00	1.50	FDR
ARRB1	1.41	1.51	FDR
NR1D1	1.46	1.51	FDR
ZNF557	1.22	1.52	FDR
PLPPR1	1.83	1.53	FDR
BEND6	2.19	1.53	FDR
MCOLN2	1.14	1.54	FDR
PEX2	1.46	1.54	FDR
SEC22C	1.34	1.54	FDR
RPL32	2.35	1.57	FDR
RPS11	1.96	1.57	FDR
DNAJC13	2.34	1.58	FDR
RPL30	3.00	1.58	FDR

表 3-4 focused library screening の結果

#	gene symbol	log ₂ (FC)			
		[Pom +/-]			[Day 8/3]
		1st	2nd	3rd	4th
1	ABCC12	2.0	0.1	1.3	0.1
2	ACCN3	1.8	0.8	-0.2	0.1
3	ATHL1	1.8	0.1	0.5	0.5
4	C6ORF48	1.9	0.1	0.9	0.9
5	CCNB3	2.1	0.2	0.3	0.0
6	CCR5	0.9	0.0	0.4	1.0
7	CD164	1.7	-0.4	0.9	0.6
8	CMTM3	1.7	-0.3	0.6	0.5
9	COL6A6	2.0	0.0	-0.1	0.1
10	COPS6	1.6	0.5	1.8	0.1
11	COX15	1.8	-0.4	1.0	0.1
12	CRBN	2.4	-0.1	1.3	0.6
13	DDB1	1.7	0.3	1.2	0.3
14	EBF2	4.1	0.0	0.7	0.1
15	EIF4A3	2.1	0.6	1.0	0.3
16	EVI2A	-1.7	-0.4	1.5	0.4
17	FLJ44635	1.6	-0.1	1.6	0.9
18	GOLIM4	1.7	-0.1	1.0	0.4
19	GPS1	1.9	-0.3	-0.4	0.2
20	GSTZ1	1.7	-0.1	1.1	0.2
21	IK	1.7	0.4	0.1	0.2
22	IPO11	1.6	0.3	0.4	1.1
23	ITIH4	1.7	0.0	2.4	0.5
24	KIAA0892	1.9	-0.2	1.3	0.4
25	KIAA1109	1.7	N/A	0.0	1.1
26	KIAA2022	1.8	0.3	0.7	0.1
27	MACROD2	1.9	0.2	1.6	0.1
28	MGMT	1.7	0.0	0.6	0.1
29	MSR1	1.9	0.1	1.2	0.5
30	MTNR1A	1.8	-0.5	-1.2	0.8
31	NHP2L1	1.6	1.1	0.3	0.1
32	OR5B12	1.7	-0.3	2.6	0.9
33	OR7G3	-1.8	-0.1	0.2	0.5
34	PGR	-3.1	-0.1	0.2	0.7
35	PHF5A	3.9	-0.2	-0.8	0.1
36	POMGNT1	1.8	0.1	1.1	0.2
37	PSMA1	1.8	1.8	-0.4	0.2
38	PSMA3	1.7	0.9	-0.5	0.9
39	PSMA5	1.9	-0.1	-0.7	0.0
40	PSMC6	1.8	0.0	0.2	0.1
41	PWP2	1.7	0.4	-0.1	0.1
42	RBX1	1.9	0.0	-0.8	0.4
43	RPL37A	1.9	0.1	-0.4	0.4
44	RPS26	1.9	0.1	-0.8	0.2
45	SETX	1.3	-0.2	1.5	0.6
46	SLC25A30	1.9	0.1	1.2	0.5
47	SLU7	2.2	0.1	-0.7	0.1
48	SNRPD3	2.4	0.4	0.4	0.1
49	TAS2R1	-1.7	-0.7	1.1	0.5
50	TMEM59	1.8	0.3	1.1	0.2
51	TMOD1	1.6	-0.2	-0.5	0.2
52	TTLL4	1.7	0.1	2.1	0.9
53	VAMP1	1.8	0.3	0.6	0.1
54	ZCCHC11	1.8	N/A	0.7	0.2
55	ZNF587	1.8	0.2	0.6	1.7

#	gene symbol	log ₂ (FC)			
		[Pom +/-]			[Day 8/3]
		1st	2nd	3rd	4th
56	IKZF1	-0.3	-0.7	1.7	N/A
57	IKZF3	0.0	-1.1	1.5	N/A
58	KCNMA1	1.4	0.0	0.7	N/A
59	KPNB1	1.3	0.5	1.1	N/A
60	NEDD8	1.5	-2.3	0.8	N/A
61	NRXN1	-1.6	-1.0	0.0	N/A
62	CDK11A	1.3	1.0	1.5	N/A
63	ABCB7	-1.4	-0.3	-0.4	N/A
64	ARL8B	2.0	-0.1	0.0	N/A
65	CD83	1.1	-0.1	2.0	N/A
66	CLDN11	1.4	-0.2	0.9	N/A
67	FECH	1.1	0.0	0.2	N/A
68	HMG2	-1.6	-0.5	1.4	N/A
69	HOXA11	1.2	0.3	0.4	N/A
70	IGF2BP3	1.5	-0.2	1.6	N/A
71	KIF11	0.6	1.1	0.7	N/A
72	LRSAM1	1.3	0.1	0.4	N/A
73	MT1X	1.9	-0.2	0.4	N/A
74	POU3F2	-1.3	-0.3	0.1	N/A
75	SF3A3	1.5	0.3	0.6	N/A
76	SKP1	1.6	0.3	1.0	N/A
77	SMARCC2	1.7	0.2	0.1	N/A
78	TAB1	0.5	0.1	0.0	N/A
79	UBE2D1	1.3	-0.5	1.1	N/A
80	USP16	-1.3	-0.3	0.8	N/A

第4章 インポーチンが pomalidomide 感受性に与える影響の解析

4-1 諸言

shRNA ライブラリスクリーニングにより pomalidomide の感受性に関与する 445 の変動遺伝子が同定された。変動遺伝子には CRBN を始めとするユビキチンプロテアソーム経路の因子が含まれていたが、その他の遺伝子の機能は多岐にわたるため、どういった機能を持つ遺伝子が濃縮されているか解析が必要である。そこで特定の遺伝子リストに濃縮されている細胞内機能を特定する手法である Gene Ontology (GO) 解析を用いて、変動遺伝子で濃縮される細胞内機能を特定し、pomalidomide 感受性に重要な細胞内機能を明らかにすることを目的とした。

4-2 GO 解析による変動遺伝子の機能解析

変動遺伝子として同定された 445 遺伝子の機能を、GO 解析ツール DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) を用いて調べた (表 4-1)。GO:Biological Process のカテゴリでは、proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process (GO:0043161) などのタンパク質の分解に関わる GO term も濃縮されたが、より上位に translational initiation (GO:0003723) や mRNA splicing (GO:0008380) を始めとする遺伝子発現に関わる GO term が濃縮された。CRBN が関与するタンパク質の分解系とは対局に位置する遺伝子発現系の GO term が濃縮された事は予想外であった。

P-value が 0.01 未満 ($-\log_{10}[\text{P-value}] > 2.0$) の GO term を 3 つのグループに分類した (図 4-1)。1 つ目は pomalidomide の感受性に関わることが予想されていたユビキチン・分解関連 GO term 群である。ユビキチン・分解関連 GO term 群には CRL4^{CRBN} の構成因子 (CRBN、DDB1、ROC1) や CSN の構成因子 (COPS1、COPS5 など)、Proteasome の構成因子 (PSMA1、PSMC6 など) が含まれる。2 つ目は遺伝子発現関連 GO term 群で、spliceosome 構成因子 (Small Nuclear Ribonucleoprotein D1 Polypeptide (SNRPD1)、SLU7 など) やリボソーム構成因子 (Ribosomal Protein S26 (RPS26)、Ribosomal Protein L27a (PL27A) など) が含ま

れる。遺伝子発現関連 GO term 群に含まれる遺伝子は、CRBN やその下流因子である Aiolos や IRF4 や c-Myc、もしくは更にその下流因子の遺伝子発現に関与することが想定された。3 つ目は核内輸送関連 GO term 群で、インポーチン (Karyopherin Subunit Beta 1 (KPNB1)、Importin 11 (IPO11)) が含まれる。CRBN は細胞株によって細胞内局在が異なり、CRBN のユビキチン化基質も転写因子 Aiolos は核内、翻訳因子 GSPT1 は細胞質といった具合に細胞内局在が様々であるため、CRBN modulators の多岐に渡る薬理作用には CRBN の細胞内局在が重要である可能性がある (図 4-2)。そこで3つ目の GO term 群に含まれるインポーチンがCRBNやユビキチン化基質の細胞内局在をコントロールし、pomalidomide 感受性を調整するという仮説を立て、検証を行なった。

4-2 インポーチンのノックダウン

まず、変動遺伝子に含まれた2つのインポーチン遺伝子がCRBNやAiolosの細胞内局在に与える影響や、Aiolosのpomalidomide依存的な分解に与える影響を調べた。

KPNB1 と IPO11 ノックダウンは pRSI9 をベースとしたプラスミドを使用した。shRNA の配列は shRNA ライブラリスクリーニングで pomalidomide 感受性を実際に低下させた配列を用いた。pRSI9_ctrl (Control)、pRSI9_shKPNB1 (shKPNB1)、pRSI9_shIPO11 (shIPO11)のプラスミドベクターをパッケージングし、レンチウイルスベクターを調製した。次に調製したレンチウイルスベクターを多発性骨髄腫細胞 OPM-2 細胞に感染させ、puromycin によりセクションを行った。感染4日後に total RNA を回収、qRT-PCR により *GAPDH*、*KPNB1*、*IPO11* の mRNA 発現量を比較することでノックダウン効率を確認した (図 4-3)。発現量に変動しないコントロールである *GAPDH* の mRNA 発現量は全てのサンプルで変化しなかったが、shKPNB1 発現細胞では *KPNB1* の mRNA 発現量が半分以下まで低下した。また、shIPO11 発現細胞では *IPO11* の mRNA 発現量が半分以下まで低下した。qRT-PCR の結果から shRNA の発現による KPNB1 と IPO11 のノックダウンが確認された。

4-3 Flag-HA-CRBN 発現細胞の作製

免疫染色により CRBN と Aiolos の細胞内局在を調べるために、内在性の CRBN を KO し、その後 Flag-HA-CRBN を導入することで Flag-HA タグがついた CRBN

(FH-CRBN) を発現する細胞を作製した。

CRBN の KO は、CRISPR-Cas9 システムを用いた。まず pX330 ベクター²⁵ に CRBN の第 1 エクソンを標的とする guide RNA 配列を導入した。次に作製したプラスミドを OPM-2 細胞に Nucleofector を用いて導入し、CC-885 によって CRBN を発現しない細胞をセクションすることで内在性の CRBN を KO した細胞 (CRBN KO) を作製した。作製した細胞からタンパク質を調製しウエスタンブロットにより CRBN の発現量を確認した (図 4-4A)。pX330 を導入していない親株 (parental) と、pX330 を導入した細胞 (CRBN KO) を比較すると CRBN KO 細胞では CRBN のタンパク質発現が検出できなかったため、CRBN の KO が確認された。

次に pLenti6 ベクターに FH-CRBN 配列を導入した pLenti6_FH-CRBN を作製し、パッケージングを行い、FH-CRBN 発現レンチウイルスベクターを作製した。FH-CRBN 発現レンチウイルスベクターを CRBN KO OPM-2 細胞に感染し、blasticidin により 1 週間セクションを行った。生き残った細胞からタンパク質を回収し、ウエスタンブロットにより FH-CRBN の発現量を調べた (図 4-4A)。CRBN KO 細胞では CRBN の発現が検出できなかったが、FH-CRBN を導入した細胞では FH-CRBN 発現していることを確認した。また、wildtype と比較すると内在性の CRBN と近い発現量で FH-CRBN の発現することを確認した。また、これらの細胞に 0.1、もしくは 1 μ M の pomalidomide を処理し、Aiolos の発現量を調べた。wildtype 細胞では 0.1 μ M で Aiolos が全く検出できなくなったが、CRBN KO 細胞では pomalidomide を加えても Aiolos の発現量は低下しなかった。一方で FH-CRBN 発現細胞では、wildtype ほどではないが pomalidomide 依存的に Aiolos の発現量が低下した。この結果から、CRBN の機能をもった FH-CRBN を発現する OPM-2 細胞を作製できたことが確認された。

4-4 OPM-2 細胞においてインポーチンの KD が CRBN や Aiolos の細胞内分布に与える影響の解析

インポーチンの KD が CRBN や Aiolos の細胞内局在に影響を与えるかどうか、作製した FH-CRBN 発現 OPM-2 細胞を用いた蛍光免疫染色により調べた (図 4-4B)。

FH-CRBN 発現 OPM-2 細胞に KD レンチウイルスを感染し、4 日後に細胞を固定化し蛍光免疫染色を行った。DAPI は核を可視化するために使用し、 α -HA 抗

体を用いて CRBN を、 α -Aiolos 抗体を用いて Aiolos の局在を可視化した。通常状態の OPM-2 細胞 (Control) では CRBN は核と細胞質の両方に存在していたが、KPNB1 を KD した OPM-2 細胞 (shKPNB1) では核内の CRBN が減少した。しかし IPO11 を KD した OPM-2 細胞 (shIPO11) では CRBN の細胞内分布は変化しなかった。一方で Aiolos の局在について、通常状態の OPM-2 細胞 (Control) では Aiolos は核に存在し、KPNB1、IPO11 どちらの KD した状態の OPM-2 細胞 (shKPNB1、shIPO11) でも細胞内分布に変化は無く Aiolos は核に局在した。よって OPM-2 細胞において IPO11 ではなく KPNB1 が CRBN の核移行に重要な役割を担うが、Aiolos の核局在には影響しないことがわかった。

次に FH-CRBN 発現 OPM-2 細胞について、KPNB1 と IPO11 を標的とする KD レンチウイルスベクターを感染し、4 日後に 1 μ M の pomalidomide を 12 時間処理し、タンパク質を回収してウェスタンブロットにより β -Actin と KPNB1、Aiolos のタンパク質発現量を比較した (図 4-4C)。全ての細胞で発現量が変動しないコントロールである β -Actin のタンパク質発現量は揃っていたが、通常状態 (Control)、IPO11 KD 状態 (shIPO11) に対して KPNB1 KD 状態 (shKPNB1) では KPNB1 のタンパク質発現量が低下し KPNB1 の KD が確認できた。また、通常状態や IPO11 KD 状態では pomalidomide 依存的に Aiolos の発現量が低下したが、KPNB1 KD 状態では pomalidomide 依存的には Aiolos の発現量は低下しなかった。

以上の結果から OPM-2 細胞においては、CRBN と Aiolos の細胞内分布が核で一致する通常状態や IPO11 KD 状態では pomalidomide 依存的に Aiolos が分解され、CRBN と Aiolos の細胞内分布が一致しなくなる KPNB1 KD 状態では Aiolos が分解されなくなることが示唆された。

4-5 293T 細胞においてインポーチンの KD が CRBN や Aiolos の細胞内局在に与える影響の解析

KPNB1 KD による CRBN の局在変化と pomalidomide 依存的な Aiolos 分解への影響が OPM-2 細胞に特異的な現象であるか確認するため、293T 細胞を用いて同様の実験を行った。

OPM-2 細胞と同様に pX330 をベースとする CRISPR-Cas9 system により内在性の CRBN を KO した 293T 細胞を作製した。293T 細胞は OPM-2 と違って Aiolos を発現していないため、Aiolos を発現する pcDNA3.1_Aiolos と FH-CRBN を発現

する pLenti6_FH-CRBN を Lipofectamine 2000 を用いて導入し、ウエスタンブロットにより CRBN と Aiolos の発現量を調べた (図 4-5A)。FH-CRBN や Aiolos を発現しない CRBN KO 細胞では CRBN や Aiolos の発現が全く確認できなかったのに対し、FH-CRBN 発現細胞では CRBN と Aiolos の発現が検出された。これらの細胞に 0.1、もしくは 1 μ M の pomalidomide を 24 時間処理すると、OPM-2 細胞と同様に FH-CRBN と Aiolos 発現細胞では pomalidomide 依存的に Aiolos の発現量が低下することが確認できた。

この細胞を用いて蛍光免疫染色により CRBN と Aiolos の細胞内局在を調べた (図 4-5B)。CRBN KO 細胞に pLenti6_FH-CRBN と pcDNA3.1_Aiolos、pRSI9_shRNA ベクターを transfection し、4 日後に細胞を固定化し蛍光免疫染色を行った。OPM-2 細胞の結果と同様に、通常状態で核と細胞質の両方に CRBN は存在したが、IPO11 KD では変化はなく、KPNB1 KD で核内の CRBN が減少した。また、Aiolos の細胞内分布は通常状態の 293T 細胞では核に局在し、KPNB1、IPO11 の KD による影響はなかった。

次にトランスフェクション 3 日後に 0.1 もしくは 1 μ M の pomalidomide を 24 時間処理し、タンパク質を回収してウエスタンブロットにより β -Actin と Aiolos のタンパク質発現量を比較した (図 4-5C)。OPM-2 細胞と同様に、293T 細胞を用いても通常状態 (Control) や IPO11 KD 状態 (shIPO11) では pomalidomide 依存的に Aiolos の発現量は低下したが、KPNB1 KD 状態 (shKPNB1) では pomalidomide 依存的には Aiolos の発現量は低下しなかった。

以上の結果から OPM-2 細胞だけでなく 293T 細胞においても、CRBN と Aiolos の細胞内局在が核で一致通常状態や IPO11 KD 状態では Aiolos が分解され、CRBN と Aiolos の細胞内局在が一致しなくなる KPNB1 KD 状態では Aiolos が分解されなくなることが示唆された。

4-6 OPM-2 細胞においてインポーチンの KD が IRF4 の細胞内分布に与える影響の解析

KPNB1 が CRBN の核内輸送に関与することで pomalidomide 感受性に影響を与えることを更に確認するため、Aiolos 分解後に発現量が低下する転写因子 IRF4 の細胞内局在が KPNB1 KD で影響を受けるか、作製した FH-CRBN 発現 OPM-2 細胞を用いた蛍光免疫染色により調べた (図 4-6)。

FH-CRBN 発現 OPM-2 細胞に KD レンチウイルスを感染し、4 日後に細胞を固

定化し蛍光免疫染色を行った。DAPI は核を可視化するために使用し、 α -IRF4 抗体を用いて IRF4 の局在を可視化した。通常状態の OPM-2 細胞 (Control) では IRF4 は核に局在し、KPNB1 を KD しても大きな変化が確認されなかった。よって OPM-2 細胞において KPNB1 は IRF4 の細胞内局在に影響をほとんど与えないことがわかった。

4-7 KPNB1 と CRL4^{CRBN} の相互作用の解析

インポーチンは積荷タンパク質の NLS を認識し結合して積荷タンパク質を核内へ輸送する²⁷。そこで KPNB1 が CRL4^{CRBN} と結合して CRBN を核内輸送しているか調べるために GST-KPNB1 をもちいた GST pull-down assay を行った。大腸菌 BL21 株に pGEX-コントロール (GST-Control) と pGEX_KPNB1 (GST-KPNB1) を形質転換し培養、大腸菌を可溶化することで GST-KPNB1 を調製した。調製した GST-KPNB1 と OPM-2 細胞の細胞抽出液を混合し、GST pull-down を行い、ウェスタンブロットにより精製効率の確認をした (図 4-7A)。しかしながら GST-Control や GST-KPNB1 といった GST 融合タンパク質は効率よく回収できたにも関わらず、CRBN や CUL4A の共沈降は確認できなかった。OPM-2 細胞の細胞抽出液を用いたため、内因性の CRL4^{CRBN} では各構成因子の発現量が低かったため相互作用が確認できなかった可能性が考えられた。

次に昆虫細胞で CRL4^{CRBN} の構成因子を個別に過剰発現し、GST pull-down assay を行ない、ウェスタンブロットによりタンパク質の発現量を確認した (図 4-7B)。CRBN、CUL4A、ROC1 は GST pull-down assay により精製されたが、DDB1 は精製されなかった。また、CRBN は CUL4A、ROC1 と比較し、強く相互作用が見られたことから KPNB1 による核内輸送には CRBN が重要である可能性が高い (図 4-7C)。

4-7 まとめ

445 遺伝子に対する GO 解析によって既知のユビキチン、プロテアソームが関与するタンパク質分解経路だけでなく、スプライシングや翻訳といった遺伝子発現に関する経路、そしてインポーチン経路が pomalidomide の抗がん活性に関与することが示唆された。また、コントロール条件では CRBN が細胞質と核に存在するが、変動遺伝子に含まれるインポーチン KPNB1 の KD により CRBN が細胞質に局在し、pomalidomide 処理時の Aiolos 分解が抑制され、GST pulldown

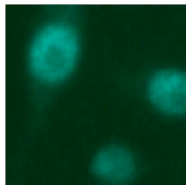
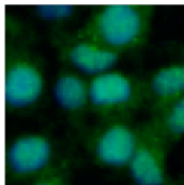
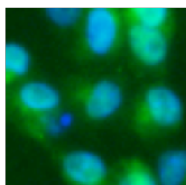
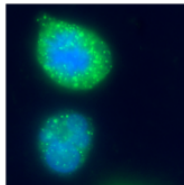
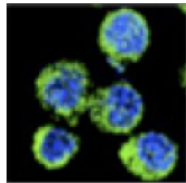
assay から CRL4^{CRBN} と KPNB1 の相互作用が確認された (図 4-7,8)。このことから、KPNB1 が CRL4^{CRBN} と相互作用し CRBN を核内に輸送することで pomalidomide 感受性に影響を与えることが示唆された。

グループ	含まれる GO term数	主な遺伝子	pomalidomide感受性に 与える影響 (仮説)
ユビキチン化 ・分解関連	22	CRL4CRBN構成因子 (CRBN、DDB1、ROC1) COP9 signalosome構成因子 (COPS1、COPS6など) Proteasome構成因子 (PSMA1、PSMC6など) ユビキチン化経路因子 (UBE2D1、USP16など)	基質のユビキチン化・分解に関わ る
遺伝子発現関連	15	Spliceosome構成因子 (SNRPD1、SLU7など) Ribosome構成因子 (RPS26、RPL27Aなど)	CRBNやその下流因子の発現量を 調整する
核内輸送関連	1	Importinβ (KPNB1、IPO11)	CRBNや下流の転写因子を核内に 輸送する

図 4-1 GO 解析結果のグルーピング

P-value が 0.01 未満 ($-\log_{10}[\text{P-value}] > 2.0$) の GO term を 3 つのグループに分類した。1 つめは pomalidomide の感受性に関わることが予想されていたユビキチン・分解関連の GO term である。2 つめは遺伝子発現関連の GO term で CRBN やその下流因子 AioloS や IRF4、c-Myc、もしくは更にその下流因子の遺伝子発現に関与することが想定された。3 つめは核内輸送関連で、インポーチン (KPNB1、IPO11) が含まれる GO term である。

A

細胞内局在	細胞株			
核	HeLa		293T	
核と細胞質	HepG2		OPM-2	
細胞質	DF15			

B

細胞内局在	neo-substrate	endogenous substrate
核	Aiolos Ikaros SALL4	MEIS2
核と細胞質	p63 (Δ Np63 α , TAp63 α) ZFP91	AMPK α
細胞質	GSPT1 CK1 α	glutamine synthetase
細胞膜		KCMNA1/CLC1 SLO1

図 4-2 CRBN とそのユビキチン化基質の細胞内局在

(A) 細胞株の CRBN の細胞内局在を示した。青色は DAPI、緑色は CRBN。

(B) CRBN のユビキチン化基質を CRBN modulator 依存的なネオ基質 (neo-substrate) と内因性の天然基質 (endogenous substrate) に分けて細胞内局在を示した。

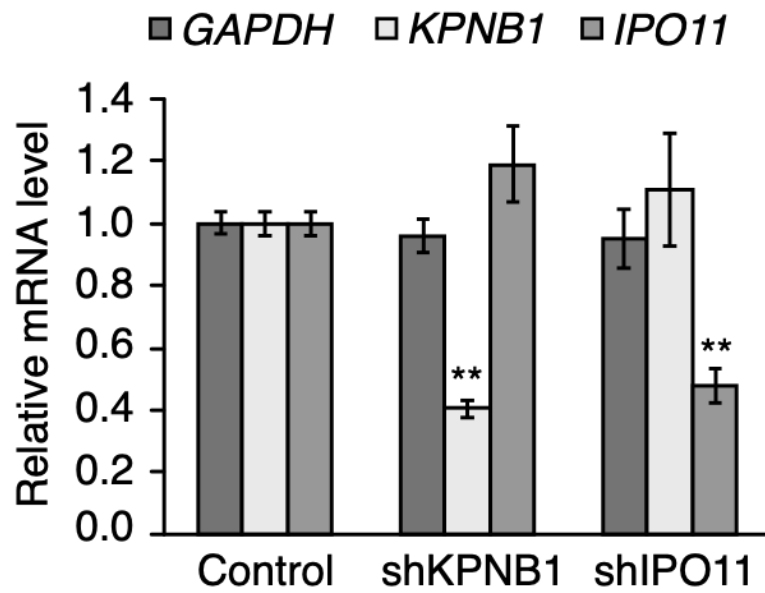


図 4-3 OPM-2 細胞における KPNB1 と IPO11 のノックダウン

OPM-2 細胞に shRNA 発現レンチウイルスを感染 4 日後に total RNA を回収して qRT-PCR によって KPNB1、IPO11 の発現量を定量した。GAPDH は内部標準として定量した。エラーバーは SD (n=3) であり、**は $P < 0.01$ を示した (student's t-test)。

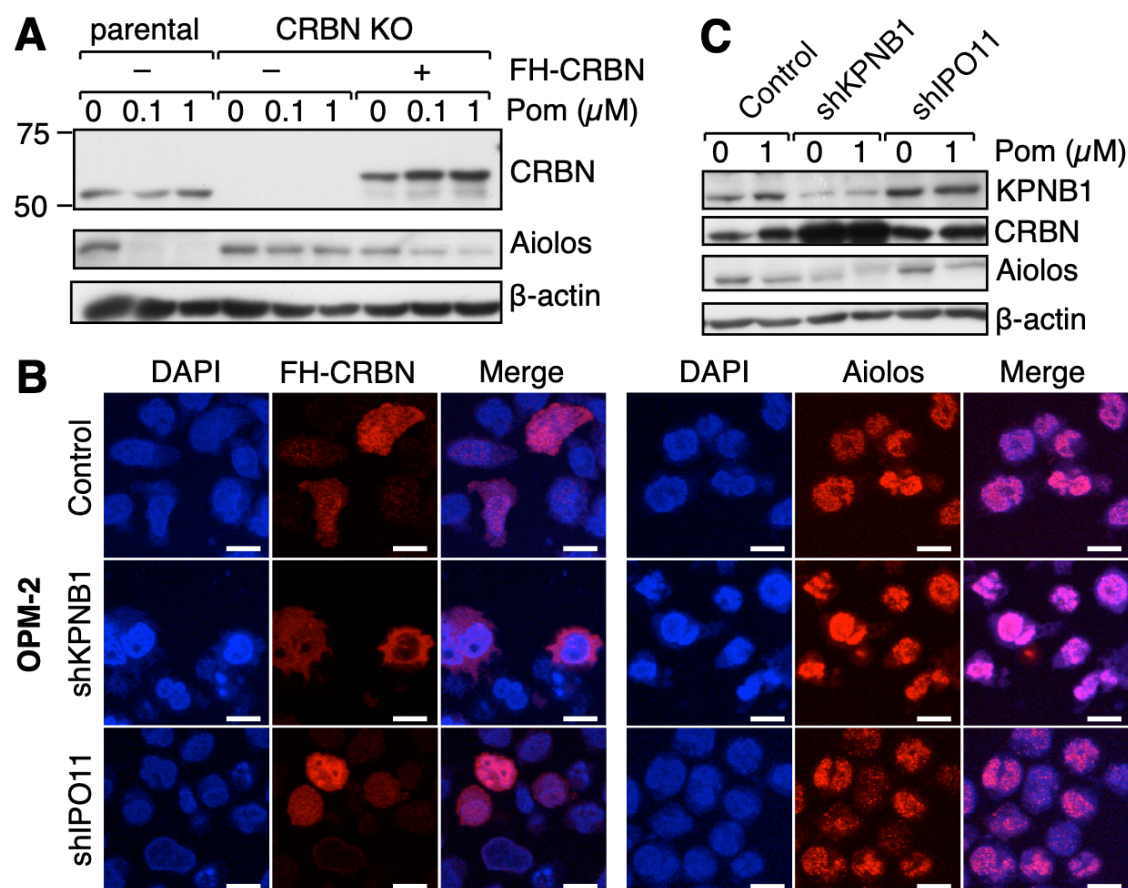


図 4-4 FH-CRBN 発現 OPM-2 細胞における CRBN と Aiolos の細胞内局在

(A) pX330 ベクターを用いた CRISPR-Cas9 system により内因性 *CRBN* を KO した OPM-2 細胞を作成した。FlagHA-CRBN (FH-CRBN) を発現する pLenti6 を用いたレンチウイルスを感染させ CRBN KO、FH-CRBN 発現 OPM-2 細胞を作製した。親株 (parental)、CRBN KO、内因性 CRBN KO FH-CRBN 発現 OPM-2 細胞に 0、0.1、1 μ M の pomalidomide を 6 時間処理してタンパク質を回収、ウエスタンブロットにより CRBN と Aiolos の発現量を調べた。 β -actin は loading control として用いた。

(B) KPNB1 と IPO11 を標的とする shRNA 発現レンチウイルスを感染し、4 日後に細胞を固定化し蛍光免疫染色を行った。DAPI を用いて核を染色し、 α -HA 抗体を用いて CRBN の細胞内局在 (左図) を、 α -Aiolos 抗体を用いて Aiolos の細胞内局在 (右図) を可視化した。スケールバーは 10 μ m を示す。

(C) CRBN を KO した FH-CRBN 発現 OPM-2 細胞に shRNA 発現レンチウイルスを感染 4 日後に 0、もしくは 1 μ M の pomalidomide を添加して 6 時間後にタンパク質を回収、ウエスタンブロットにより定量した。

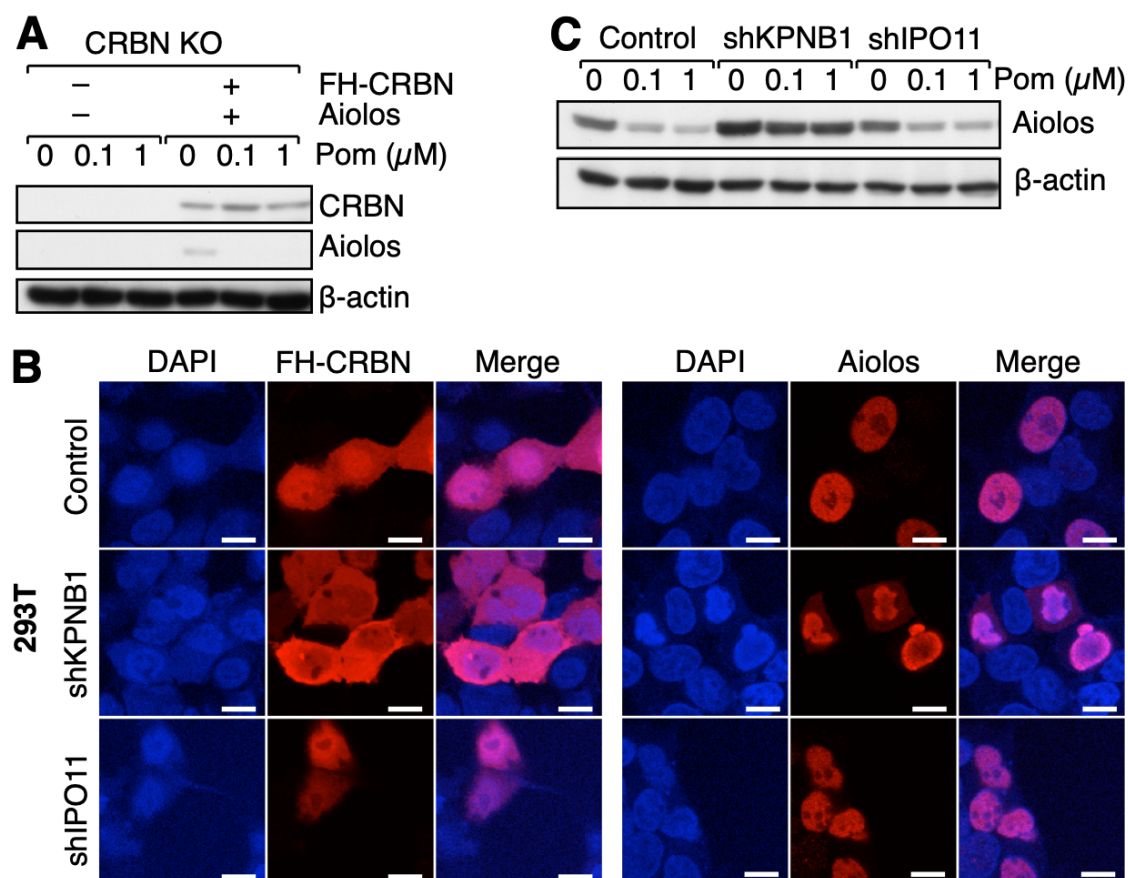


図 4-5 FH-CRBN 発現 293T 細胞における CRBN と Aiolos の細胞内局在

(A) pX330 ベクターを用いた CRISPR Cas9 system により内因性 *CRBN* を KO した 293T 細胞に FlagHA-CRBN (FH-CRBN) を発現する pLenti6 を用いたレンチウイルスを感染させ CRBN KO、FH-CRBN 発現 293T 細胞を作成した。Aiolos を一過性過剰発現させた細胞に 0、0.1、1 μ M の pomalidomide を 6 時間処理してタンパク質を回収、ウエスタンブロットにより CRBN と Aiolos の発現量を調べた。 β -actin は loading control として用いた。

(B) KPNB1、IPO11 を標的とする shRNA と Aiolos を一過性に過剰発現させた内因性 CRBN KO FH-CRBN 発現細胞を固定化し蛍光免疫染色を行った。DAPI を用いて核を染色し、 α -HA 抗体を用いて CRBN の細胞内局在（左図）を、 α -Aiolos 抗体を用いて Aiolos の細胞内局在（右図）を可視化した。スケールバーは 10 μ m を示す。

(C) KPNB1 と IPO11 を標的とする shRNA と Aiolos を一過性に過剰発現させた内因性 CRBN KO FH-CRBN 発現細胞に 0、0.1、1 μ M の pomalidomide を添加して 6 時間後にタンパク質を回収、ウエスタンブロットにより定量した。

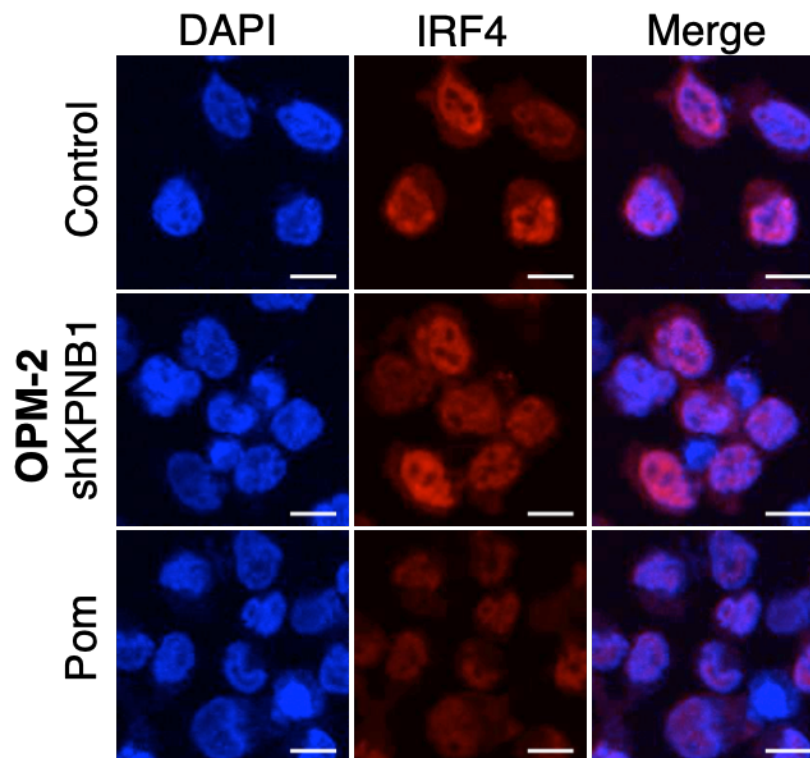


図 4-6 KPNB1 KD が IRF4 の細胞内局在に与える影響

内因性 CRBN KO FH-CRBN 発現 OPM-2 細胞に KPNB1 を標的とする shRNA 発現レンチウイルスを感染 4 日後、もしくは 1 μ M の pomalidomide を 2 日間処理した細胞を固定化し蛍光免疫染色を行った。DAPI を用いて核を染色し、 α -IRF4 抗体を用いて IRF4 の細胞内局在を可視化した。スケールバーは 10 μ m を示す。

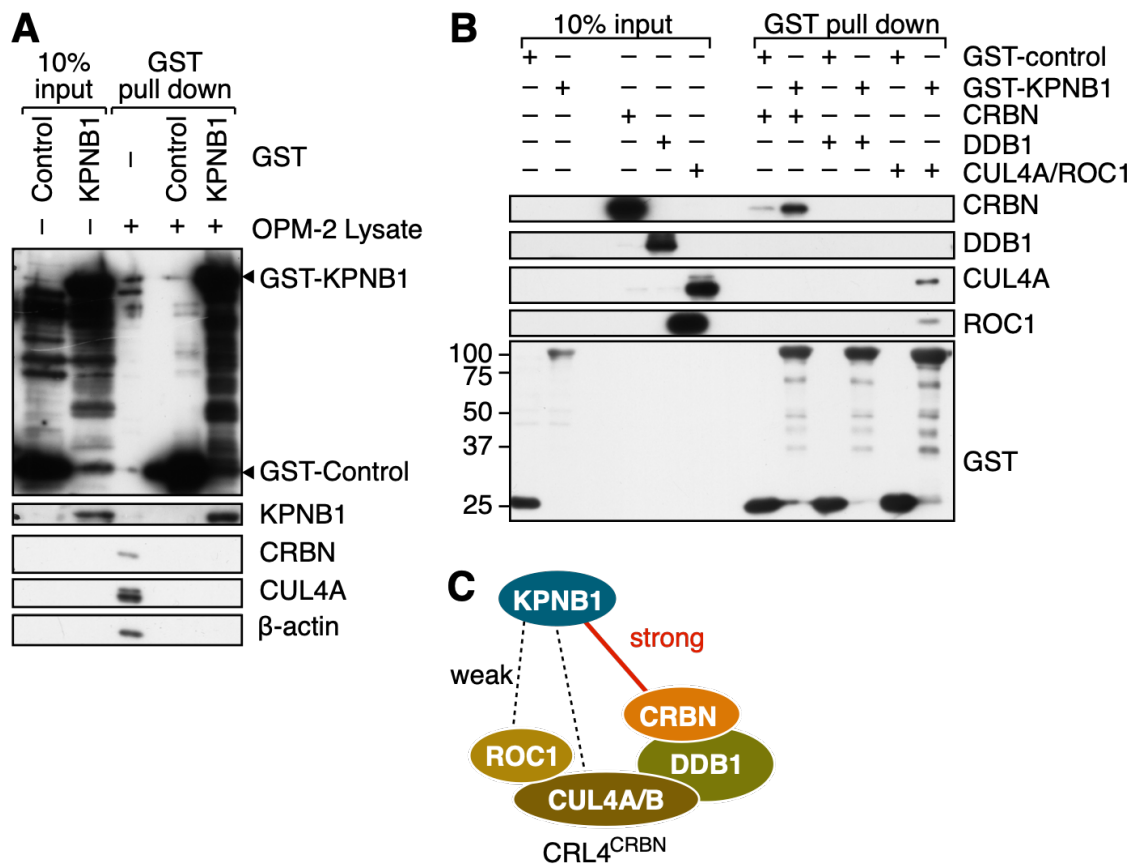


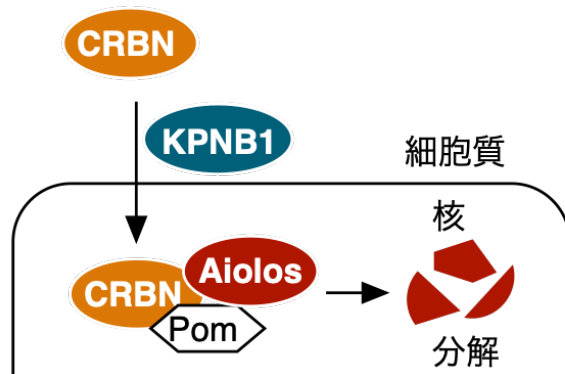
図 4-7 GST 融合 KPNB1 と CRL4^{CRBN} 構成因子の相互作用解析

(A) 大腸菌から調製した GST-control もしくは GST-KPNB1 と OPM-2 細胞のライセートを混合し、GST pull-down assay を行った。回収したサンプルはウエスタンブロットにより検出を行った。

(B) 大腸菌から調製した GST-Control もしくは GST-KPNB1 と CRL4^{CRBN} の構成因子を過剰発現させた昆虫細胞のライセートを混合し、GST pull-down assay を行った。回収したサンプルはウエスタンブロットにより検出を行った。

(C) GST pull-down assay の結果から示唆された KPNB1 と CRL4^{CRBN} 構成因子の相互作用の強さを示した。KPNB1 と CRBN は強く相互作用し CUL4A や ROC1 は弱く相互作用する。

A コントロール条件



B KPNB1ノックダウン

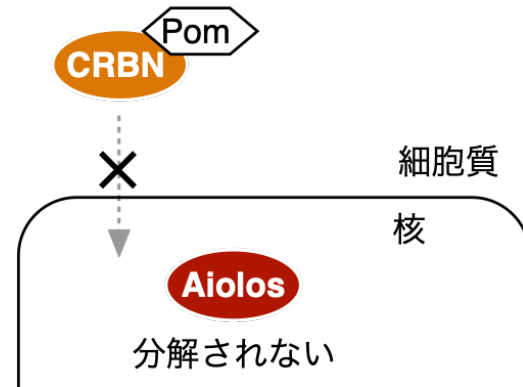


図 4-8 KPNB1 が pomalidomide 感受性に与える影響のモデル

(A) コントロール条件では KPNB1 が存在することで CRBN が核にも存在し pomalidomide (Pom) 存在下で Aiolos を分解する。

(B) KPNB1 を KD すると CRBN が細胞質に局在し Aiolos と細胞内局在が不一致となるため pomalidomide を処理しても Aiolos が分解されない。

表 4-1-A 変動遺伝子の GO 解析

GO accession	GO term: BP	-log10[P-value]	Genes
GO:0006413	translational initiation	16.2	COPS5, RPL14, RPL35, RPL36, RPL23A, RPS26, EIF3D, EIF4G2, EIF4G3, RPL30, EIF3B, RPL7, RPL32, RPL23, RPL31, RPL6, RPS14, EIF2S2, RPL8, RPS13, RPL10, RPL5, RPL37A, RPS11
GO:0006614	SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	13.8	RPL14, RPL35, RPL36, RPL23A, SRP19, RPS26, RPL30, RPL7, RPL32, RPL23, RPL31, RPL6, RPS14, RPL8, RPL10, RPS13, RPL5, RPL37A, RPS11
GO:0006364	rRNA processing	12.8	RPL14, SNU13, RPL35, RPL36, SKIV2L2, RPS26, RPL30, DDX47, RPL7, RPL32, RPL6, RPL31, RPL8, RPL10, RPL5, RPL23A, PWP2, EIF4A3, RPL23, RPS14, RPS13, WDR3, RPL37A, RPS11, C1D
GO:0000184	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	12.0	RPL14, RPL35, RPL36, RPL23A, RPS26, EIF4A3, RPL30, RPL7, RPL32, RPL23, RPL31, RPL6, RPS14, RPL8, RPS13, RPL10, RPL5, RPL37A, RPS11
GO:0000398	mRNA splicing, via spliceosome	11.6	PABPN1, CRNKL1, U2AF2, SNRPD3, SNU13, SNRPD1, SNRPD2, SKIV2L2, SF3A1, SNURF, POLR2A, EIF4A3, AQR, HNRNPK, USP39, SNRNP200, DHX15, SLU7, USP49, PHF5A, HNRNPC, DDX41, SNRPE, SNRPG
GO:0019083	viral transcription	11.3	RPL14, RPL35, RPL36, RPL23A, RPS26, RPL30, RPL7, RPL32, RPL23, RPL31, RPL6, RPS14, RPL8, RPL10, RPS13, RPL5, RPL37A, RPS11
GO:0006412	translation	9.6	COPS5, RPL14, RPL35, SNU13, RPL36, RPL23A, IGHMBP2, SLC25A30, RPS26, RPL30, RPL7, RPL32, RPL23, RPL31, RPL6, RPS14, RPL8, RPS13, RPL10, RPL5, RPL37A, RPS11, TNIP1
GO:0000715	nucleotide-excision repair, DNA damage recognition	5.8	GPS1, COPS2, COPS5, COPS6, DDB1, COPS4, RBX1
GO:0000245	spliceosomal complex assembly	5.5	CRNKL1, SNRPD3, USP39, SNRPD1, SNRPD2, SNRPE, SNRPG
GO:0006283	transcription-coupled nucleotide-excision repair	5.4	GPS1, COPS2, UVSSA, AQR, COPS5, COPS6, DDB1, COPS4, POLR2A, RBX1
GO:0010388	cullin deneddylation	5.1	GPS1, COPS2, COPS5, COPS6, COPS4
GO:0038061	NIK/NF-kappaB signaling	4.9	PSMA2, PSMA1, PSMC6, PSMA6, PSMA5, PSMA3, PSMD1, RIPK3, SKP1
GO:0090263	positive regulation of canonical Wnt signaling pathway	4.5	PSMA2, PSMA1, PSMC6, PSMA6, PSMA5, UBR5, PSMA3, ZBED3, PSMD1, LGR4, WNT2B
GO:0002223	stimulatory C-type lectin receptor signaling pathway	4.2	PSMA2, UBE2N, PSMA1, PSMC6, PSMA6, PSMA5, PSMA3, PSMD1, SKP1, TAB1
GO:0006369	termination of RNA polymerase II transcription	4.0	PABPN1, EIF4A3, SNRPD3, U2AF2, SLU7, SNRPE, SETX, SNRPG
GO:0008380	RNA splicing	4.0	EIF4A3, DDX47, SON, SNRPD3, USP39, SNRPD1, DHX15, SNRPD2, HNRNPC, WTAP, SNURF, SNRPG
GO:0043161	proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process	3.8	PSMA2, PSMA1, PSMC6, CRBN, KBTBD4, PSMA6, PSMA5, ARRB1, DDB1, PSMA3, PSMD1, SKP1, RBX1

(次のページへ続く)

表 4-1-B 変動遺伝子の GO 解析 (前ページの続き)

GO accession	GO term: BP	-log10[P-value]	Genes
GO:0050852	T cell receptor signaling pathway	3.7	PSMA2, UBE2N, PSMA1, PTPRC, PSMC6, PSMA6, PSMA5, PSMA3, PSMD1, SKP1, RFTN1
GO:0051170	nuclear import	3.7	SNRPD3, SNRPD1, SNRPD2, SNRPE, SNRPG
GO:0006521	regulation of cellular amino acid metabolic process	3.7	PSMA2, PSMA1, PSMC6, PSMA6, PSMA5, PSMA3, PSMD1
GO:0006396	RNA processing	3.7	PABPN1, HNRNPK, CRNKL1, SNRPD3, ADAD1, SNRPD1, DDX54, SF3A1, SETX
GO:0000209	protein polyubiquitination	3.6	PSMA2, PSMA1, LRSAM1, PSMC6, PSMA6, PSMA5, UBR5, PSMA3, PSMD1, SKP1, RNF14, RBX1
GO:0051437	positive regulation of ubiquitin-protein ligase activity involved in regulation of mitotic cell cycle transition	3.6	PSMA2, PSMA1, PSMC6, PSMA6, PSMA5, PSMA3, PSMD1, SKP1
GO:0016055	Wnt signaling pathway	3.5	RSPO4, WNT7B, AMER2, LDB1, DDB1, RTF1, ZBED3, PAF1, SKP1, CSNK1G3, RBX1, WNT2B
GO:0002479	antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I, TAP-dependent	3.2	PSMA2, PSMA1, PSMC6, PSMA6, PSMA5, PSMA3, PSMD1
GO:0002181	cytoplasmic translation	3.1	RPL7, RPL6, RPL31, RPL8, RPL36
GO:0038095	Fc-epsilon receptor signaling pathway	3.1	PSMA2, UBE2N, PSMA1, PSMC6, PSMA6, PSMA5, PSMA3, PSMD1, MS4A2, SKP1, TAB1
GO:0006511	ubiquitin-dependent protein catabolic process	3.0	PSMA2, UBE2N, PSMA1, PSMC6, PSMA6, USP9X, UBR5, PSMA3, NEDD8, USP49, SKP1
GO:0000387	spliceosomal snRNP assembly	3.0	SNRPD3, SNRPD1, SNRPD2, SNRPE, SNRPG
GO:0051436	negative regulation of ubiquitin-protein ligase activity involved in mitotic cell cycle	2.9	PSMA2, PSMA1, PSMC6, PSMA6, PSMA5, PSMA3, PSMD1
GO:0000338	protein deneddylation	2.8	COPS5, COPS6, COPS4
GO:0090090	negative regulation of canonical Wnt signaling pathway	2.8	PSMA2, PSMA1, PSMC6, AMER2, PSMA6, PSMA5, PSMA3, PSMD1, WWTR1, RBX1
GO:0031145	anaphase-promoting complex-dependent catabolic process	2.7	PSMA2, PSMA1, PSMC6, PSMA6, PSMA5, PSMA3, PSMD1
GO:0051301	cell division	2.6	KIF11, MAU2, USP9X, BIRC6, KNSTRN, REEP4, CCNB3, RAD21, PPP1R1C, USP39, KIF20B, SPG20, ARL8B, NSUN2, TUBA1B
GO:0060071	Wnt signaling pathway, planar cell polarity pathway	2.4	PSMA2, PSMA1, PSMC6, PSMA6, PSMA5, PSMA3, PSMD1
GO:0000027	ribosomal large subunit assembly	2.3	RPL6, RPL10, RPL5, RPL23A
GO:0006610	ribosomal protein import into nucleus	2.1	RPL23, IPO11, KPNB1
GO:0043488	regulation of mRNA stability	2.1	PSMA2, PSMA1, PSMC6, PSMA6, PSMA5, PSMA3, PSMD1

第 5 章 CRBN の細胞内局在が pomalidomide 感受性に与える影響の解析

5-1 諸言

インポーチン KPNB1 が CRL4^{CRBN} と相互作用し CRBN の細胞内局在をコントロールすることで pomalidomide 依存的な Aiolos 分解に関与することが示唆されたが、CRBN の細胞内局在が pomalidomide を始めとする CRBN modulator への感受性に影響を与えるかどうか不明なため確認が必要である。そこでインポーチンのノックダウンという間接的な局在変化ではなく、核局在シグナル (nuclear localization signal, NLS) もしくは核外輸送シグナル (nuclear export signal, NES) を融合した CRBN を用いることで、CRBN の細胞内局在を直接コントロールすることにより、CRBN の細胞内局在が pomalidomide の感受性に与える影響を調べた。

5-2 NLS、NES 融合 CRBN 発現 OPM-2 細胞の作製

内在性の CRBN が発現している細胞では外来性の FH-CRBN を導入しても競合してしまう恐れがある。そこで NLS 融合 CRBN (FH-NLS-CRBN)、および NES 融合 CRBN (FH-NES-CRBN) を発現する OPM-2 細胞は、FH-CRBN を発現する OPM-2 細胞と同様に内在性の CRBN を KO した OPM-2 細胞を用いて作製した。NLS の配列は SV40 large T antigen の NLS 配列²³、NES の配列は HIV の rev protein の NES 配列²⁴ をそれぞれ採用した。CRBN KO OPM-2 細胞に pLenti6 をベースとする FH-NLS-CRBN もしくは FH-NES-CRBN 発現レンチウイルスベクターを感染した後、blasticidin セレクションすることで、FH-NLS-CRBN もしくは FH-NES-CRBN を発現する OPM-2 細胞を作製した (図 5-1A)。ウエスタンブロットにより CRBN を KO しない親株の OPM-2 細胞 (Parental) と比較して半分から同程度の CRBN が発現していることを確認した。

CRBN は DDB1、ROC1、CUL4A とともに E3 ユビキチンリガーゼ複合体 CRL4^{CRBN} を形成し、機能している。CRBN の局在変化による pomalidomide の感受性を正しく評価するためには外来性の FH-CRBN が CRL4^{CRBN} 複合体を形成することが重要である。そこで FH-CRBN の Flag タグを用いた免疫沈降により、

外来性の CRBN が CRL4^{CRBN} 複合体を形成することを確認した。親株の OPM-2 細胞ならびに CRBN KO 細胞と FH-CRBN (WT、NLS、NES) 発現細胞からタンパク質を回収し、これらを Flag-M2 agarose と混合し、Flag peptide による溶出を行った後、ウエスタンブロットにより CRBN、DDB1、CUL4A の共沈降を調べた (図 5-1A)。親株の OPM-2 細胞や CRBN KO 細胞では CRBN や DDB1、CUL4A は精製されなかったが、FH-CRBN 発現細胞、FH-NLS-CRBN 発現細胞そして FH-NES-CRBN 発現細胞では CRBN とともに DDB1 や CUL4A が共沈降した。以上の結果から、外来性の CRBN は CRL4^{CRBN} 複合体に同程度の効率で取り込まれていることが分かった。

5-3 NLS、NES 融合 CRBN 発現 OPM-2 細胞の CRBN の細胞内局在

NLS もしくは NES を融合した CRBN と Aiolos の細胞内局在を調べるため FH-CRBN、FH-NLS-CRBN、FH-NES-CRBN のいずれかを発現する OPM-2 細胞を用いて蛍光免疫染色を行った (図 5-1B)。FH-CRBN は核と細胞質の両方に存在したが、FH-NLS-CRBN は核内に、FH-NES-CRBN は細胞質に局在した。一方、Aiolos はどの細胞でも核内に局在していた。FH-CRBN 発現細胞と FH-NLS-CRBN 発現細胞では核内で CRBN と Aiolos の共局在がみられ、FH-NES-CRBN 発現細胞では核に局在する Aiolos と細胞質に局在する CRBN の細胞内分布が全く一致しなかった。

5-4 CRBN の細胞内局在が pomalidomide 依存的 Aiolos の分解に与える影響

CRBN と Aiolos の細胞内局在の一致が Aiolos の分解に影響を与えるかを調べるため、FH-CRBN、FH-NLS-CRBN、FH-NES-CRBN を発現する OPM-2 細胞に 1 μ M の lenalidomide、もしくは pomalidomide を 12 時間処理し、Aiolos や Ikaros の発現量の変化をウエスタンブロットにより調べた (図 5-2)。内在性の CRBN を発現する親株の OPM-2 細胞 (parental) では pomalidomide (Pom) 処理もしくは lenalidomide (Len) 処理によって Aiolos や Ikaros の分解が誘導されたが、CRBN KO 細胞では Aiolos や Ikaros の分解は誘導されなかった。ここに FH-CRBN を再導入した細胞で表現型のレスキューを期待したが、実際には Aiolos や Ikaros の分解はわずかしき確認できなかった。

5-5 NLS、NES 融合 CRBN 発現 293T 細胞の作製

5-4 でレスキュー実験がうまくいかなかった原因として、OPM-2 細胞では FH-CRBN の発現量が内在性の CRBN と比べて低いことが考えられた (図 5-1A)。そこで次善の策として、多発性骨髄腫細胞ではない 293T 細胞を用いて同様の実験を行なった。293T 細胞は Aiolos を発現しないため、transfection により外因性の CRBN と Aiolos を高効率で高発現させた。

OPM-2 細胞と同様の手法を用いて CRBN を KO した 293T 細胞に pLenti6_FH-CRBN、pLenti6_FH-NLS-CRBN、pLenti6_FH-NES-CRBN を transfection し、細胞内タンパク質を回収してウエスタンブロットにより FH-CRBN の発現確認を行った (図 5-3A)。その結果、FH-CRBN、FH-NLS-CRBN、FH-NES-CRBN の発現が確認できた。次に anti-Flag 抗体を用いた免疫沈降により、外因性 CRBN が DDB1、CUL4 と複合体を形成しているかを確認した。細胞抽出液と Flag-M2 agarose を混合し、Flag peptide による溶出を行い、ウエスタンブロットにより精製効率の確認を行った (図 5-3A)。CRBN KO 細胞では CRBN、DDB1、CUL4 は精製されなかったが、FH-CRBN、FH-NLS-CRBN、FH-NES-CRBN を発現細胞では CRBN、DDB1、CUL4 が共精製されたことから、外来性の CRBN が CRL4^{CRBN} 複合体を形成することがわかった。

次に、NLS もしくは NES を融合した CRBN と Aiolos の細胞内局在を調べるため co-transfection により FH-CRBN (WT、NLS、NES) と Aiolos を発現する 293T 細胞を用いて蛍光免疫染色を行った (図 5-3B)。OPM-2 細胞の結果と同様に、FH-CRBN は核と細胞質の両方に存在したが、FH-NLS-CRBN は核内に、FH-NES-CRBN は細胞質に局在した。一方、Aiolos はどの細胞でも核内に局在していた。FH-CRBN 発現細胞と FH-NLS-CRBN 発現細胞では核内で CRBN と Aiolos の共局在がみられ、FH-NES-CRBN 発現細胞では核に局在する Aiolos と細胞質に局在する CRBN の細胞内分布が全く一致しなかった。

5-6 293T 細胞において CRBN の細胞内局在が pomalidomide 依存的 Aiolos の分解に与える影響

CRBN の細胞内の分布が Aiolos の分解に及ぼす影響を調べるため、内在性の CRBN を KO し、FH-CRBN、FH-NLS-CRBN、FH-NES-CRBN と Aiolos を導入した 293T 細胞に 1 μ M の pomalidomide を 12 時間処理し、Aiolos の発現量の変化をウエスタンブロットにより調べた (図 5-4)。FH-CRBN を発現する細胞 (WT)

では pomalidomide 依存的に Aiolos が効率的に分解された。FH-NLS-CRBN を発現する細胞でも pomalidomide 依存的に Aiolos が分解された。しかし FH-NES-CRBN を発現する細胞では、pomalidomide 依存的な Aiolos の分解はみられなかった。図 5-3 で示した免疫染色の結果から、FH-CRBN と FH-NLS-CRBN は核内の Aiolos と細胞内分布が部分的にでも一致するが、FH-NES-CRBN と Aiolos と細胞内分布が全く一致しない。以上の結果は、CRBN と基質タンパク質の細胞内分布の一致が基質タンパク質の分解に重要であるという仮説を支持するものである。

5-7 293T 細胞において CRBN の細胞内局在が CC-885 依存的な GSPT1 の分解に与える影響

CRBN modulator 依存的な CRBN の基質として、Aiolos の他に CC-885 依存的に翻訳因子 GSPT1 が知られている⁹。GSPT1 は小胞体の細胞質側に存在すると言われている²⁸。従って Aiolos とは反対に、細胞質に局在する FH-NES-CRBN の存在下で CC-885 依存的に GSPT1 が分解され、細胞内局在が一致しない FH-NLS-CRBN の存在下では GSPT1 の分解が誘導されないことが予想された。

そこで pomalidomide 処理による Aiolos の分解を確認した実験と同様に、内在性の CRBN を KO した 293T 細胞に、FH-CRBN、FH-NLS-CRBN、FH-NES-CRBN を発現させ 0.1 μ M、もしくは 1 μ M の CC-885 を 24 時間処理し、ウェスタンブロットにより GSPT1 の発現量の変化を調べた (図 5-5A)。FH-CRBN 発現細胞 (WT) では CC-885 依存的に GSPT1 の発現量が低下した。同様に、FH-NES-CRBN 発現細胞では CC-885 依存的に GSPT1 の発現量が低下したが、FH-NLS-CRBN 発現細胞では CC-885 を処理しても NES の場合ほど GSPT1 の発現量が低下しなかった。

CC-885 は多発性骨髄腫のみならず 293T 細胞に対しても抗細胞増殖作用をもつ⁹。そこで先ほどの細胞に 0.1 μ M、もしくは 1 μ M の CC-885 を 48 時間処理し、CC-885 の抗細胞増殖作用を比較した (図 5-5B)。CRBN を KO した親株では CC-885 による細胞増殖阻害は観察されなかったが、FH-CRBN を発現する 293T 細胞 (WT) では CC-885 によって細胞増殖阻害が引き起こされた。また、FH-NLS-CRBN 発現細胞は CC-885 感受性をほとんど示さなかったが、FH-NES-CRBN 発現細胞は CC-885 感受性を示した。

以上の結果から、CC-885 依存的なネオ基質 GSPT1 が存在する細胞質に CRBN

存在するときに限って CC-885 が抗細胞増殖作用を示すことが分かった。

5-8 まとめ

通常状態では CRBN は細胞質と核の両方に存在し、pomalidomide 依存的に核内タンパク質 Aiolos を、CC-885 依存的に細胞質タンパク質 GSPT1 をそれぞれ分解する (図 5-6A)。NLS もしくは NES 融合 CRBN 発現細胞を用いて、pomalidomide 依存的な核内タンパク質 Aiolos の分解と、CC-885 依存的な細胞質タンパク質 GSPT1 の分解を調べたところ、NLS-CRBN 発現細胞では pomalidomide 依存的な Aiolos の分解のみが観察され (図 5-6B)、NES-CRBN 発現細胞では CC-885 依存的な GSPT1 の分解のみが観察された (図 5-6C)。これらの結果から、CRBN とその基質タンパク質の細胞内局在が一致することが基質タンパク質の効率的なユビキチン化と分解に重要であることが示唆された。

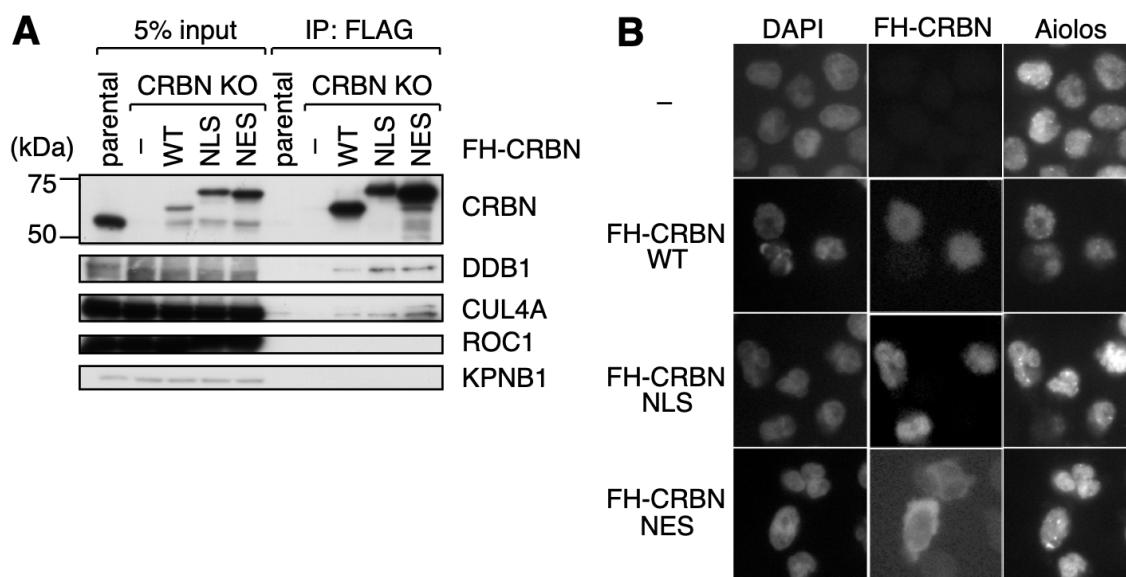


図 5-1 NLS、NES 融合 FH-CRBN 発現 OPM-2 細胞の蛍光免疫染色
(A,B) pLenti6 ベクターを用いた FH-CRBN (WT)、FH-NLS-CRBN (NLS)、FH-NES-CRBN (NES) を発現するレンチウイルスを内因性 CRBN を KO した OPM-2 細胞に感染し、内因性 CRBN KO、FH-CRBN、FH-NLS-CRBN、FH-NES-CRBN 発現 OPM-2 細胞を作製した。CRBN を KO していない親株 (parental) と新たに作製した OPM-2 細胞から 1% NP40 lysis buffer を用いてタンパク質を回収し、Flag M2 agarose を用いて Flag 精製を行い、ウエスタンブロットで各タンパク質の発現量を調べた (A)。さらにこれらの細胞の CRBN と Aiolos の細胞内局在を蛍光免疫染色により可視化した (B)。DAPI を用いて核を染色し、 α -HA 抗体を用いて CRBN の細胞内局在を、 α -Aiolos 抗体を用いて Aiolos の細胞内局在を可視化した。

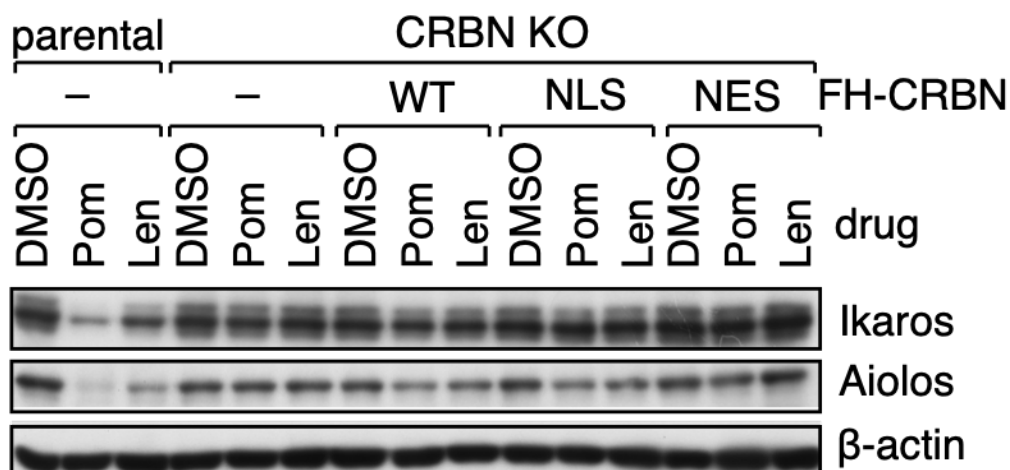


図 5-2 NLS、NES 融合 FH-CRBN が OPM-2 細胞の Aiolos と Ikaros 分解に与える影響

親株 (parental)、内因性 CRBN KO、FH-CRBN、FH-NLS-CRBN、FH-NES 発現 OPM-2 細胞に DMSO、1 μ M の pomalidomide (Pom)、もしくは 1 μ M の lenalidomide (Len) を 12 時間処理し、薬剤依存的基質である Aiolos と Ikaros の発現量をウェスタンブロットで調べた。 β -actin は loading control として用いた。

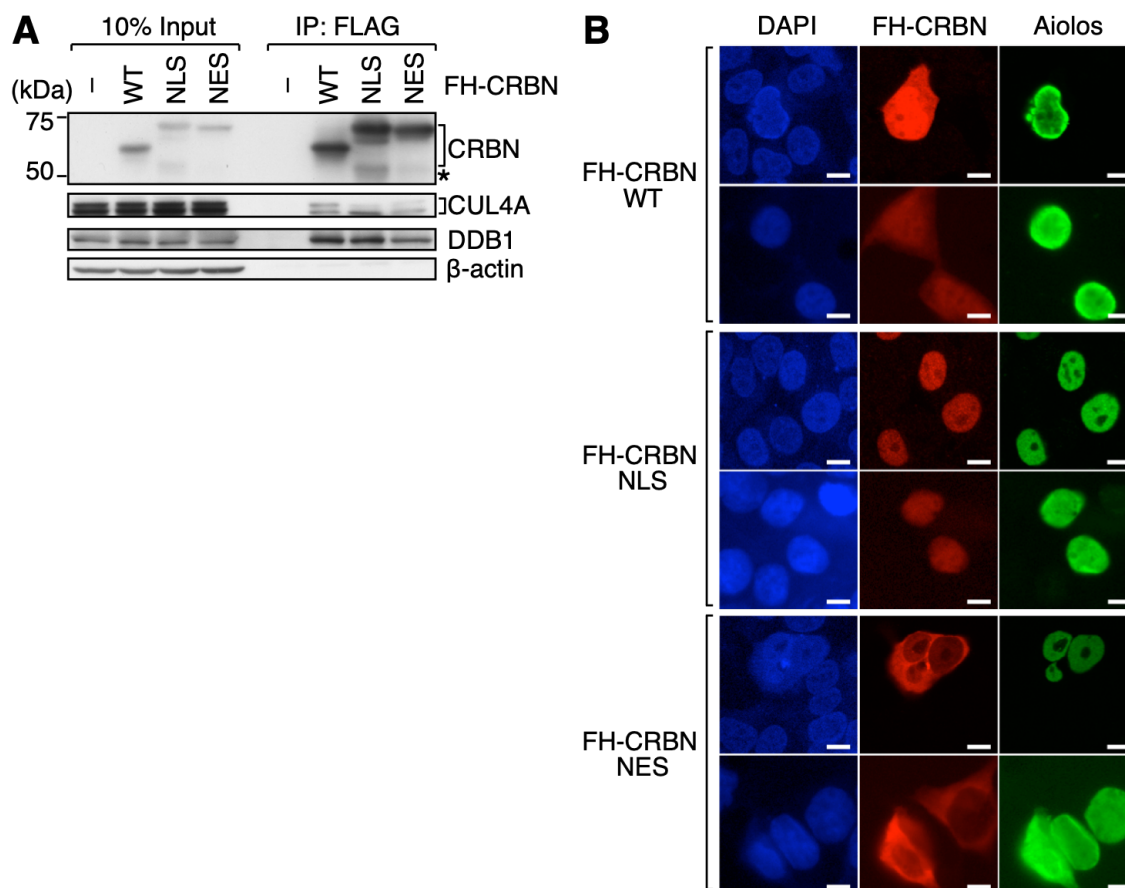


図 5-3 NLS、NES 融合 FH-CRBN 発現 293T 細胞の蛍光免疫染色

(A,B) FH-CRBN (WT)、FH-NLS-CRBN (NLS)、FH-NES-CRBN (NES) の発現ベクターを内因性 CRBN を KO した 293T 細胞にトランスフェクションし、細胞から 1% NP40 lysis buffer を用いてタンパク質を回収し、Flag 精製を行い、ウエスタンブロットで各タンパク質の発現量を調べた (A)。*の位置のバンドはバックグラウンドである。

さらにこれらの細胞の CRBN と Aiolos の細胞内局在を蛍光免疫染色により可視化した (B)。DAPI を用いて核を染色し、 α -HA 抗体を用いて CRBN の細胞内局在を、 α -Aiolos 抗体を用いて Aiolos の細胞内局在を可視化した。

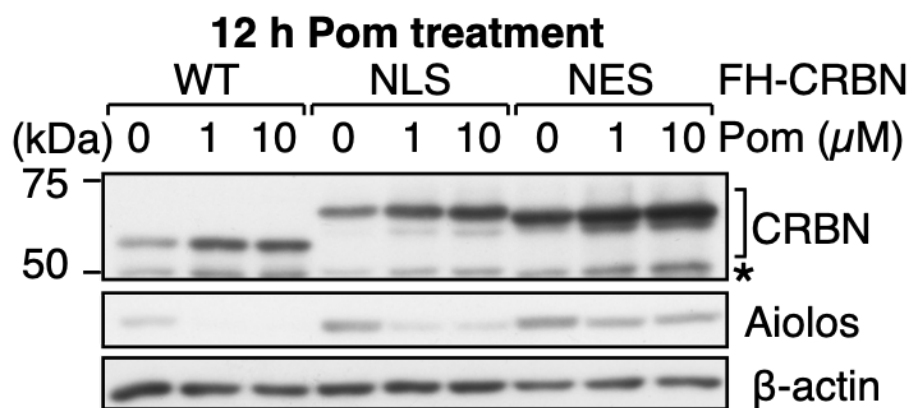


図 5-4 NLS、NES 融合 FH-CRBN が 293T 細胞の Aiolos と分解に与える影響

内因性 CRBN KO、FH-CRBN、FH-NLS-CRBN、FH-NES 発現 OPM-2 細胞に 0、1、10 μ M の pomalidomide (Pom) を 12 時間処理し、Aiolos の発現量をウエスタンブロットで調べた。 β -actin は loading control として用いた。*の位置のバンドはバックグラウンドである。

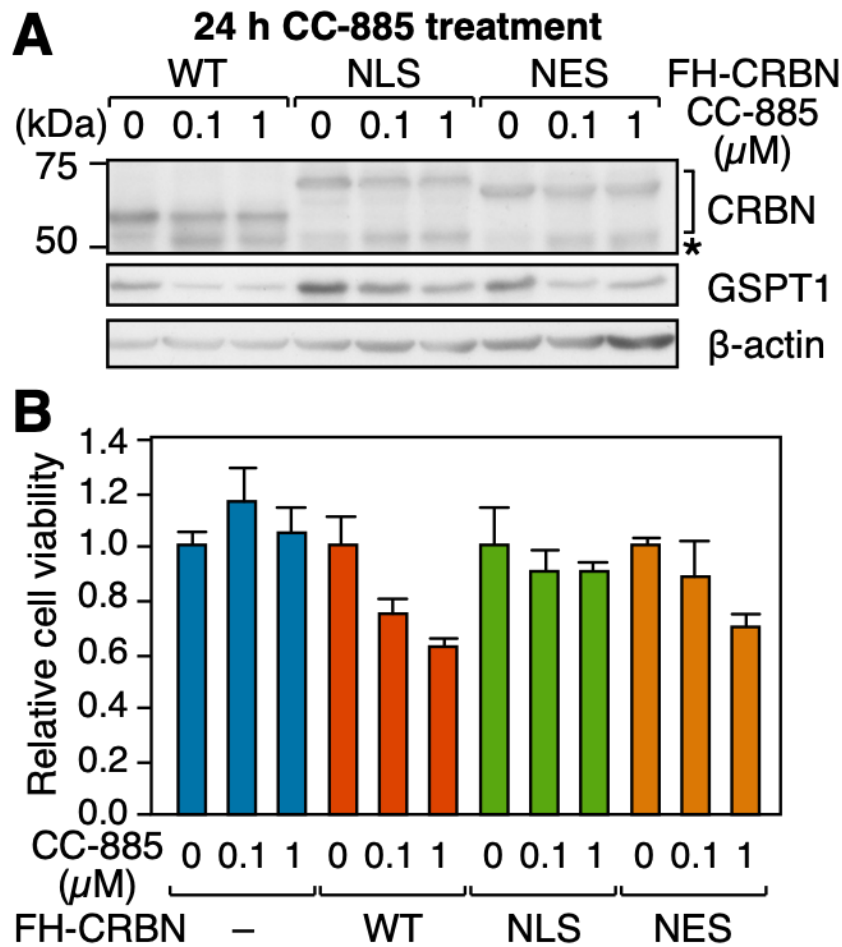


図 5-5 NLS、NES 融合 FH-CRBN が 293T 細胞の CC-885 感受性に与える影響
 (A) FH-CRBN (WT)、FH-NLS-CRBN (NLS)、FH-NES-CRBN (NES) 発現 293T 細胞に 0、0.1、1 μ M の CC-885 を 24 時間処理し、CC-885 依存的なネオ基質である翻訳因子 GSPT1 の発現量をウエスタンブロットで調べた。 β -actin は loading control として用いた。*の位置のバンドはバックグランドである。
 (B) 内因性 CRBN KO (-)、FH-CRBN (WT)、FH-NLS-CRBN (NLS)、FH-NES-CRBN (NES) 発現 293T 細胞に 0、0.1、1 μ M の CC-885 を 48 時間処理し、生細胞数を SF assay により調べた。縦軸は各細胞で CC-885 を処理していない条件の生細胞数を 1 とした時の値を示した。

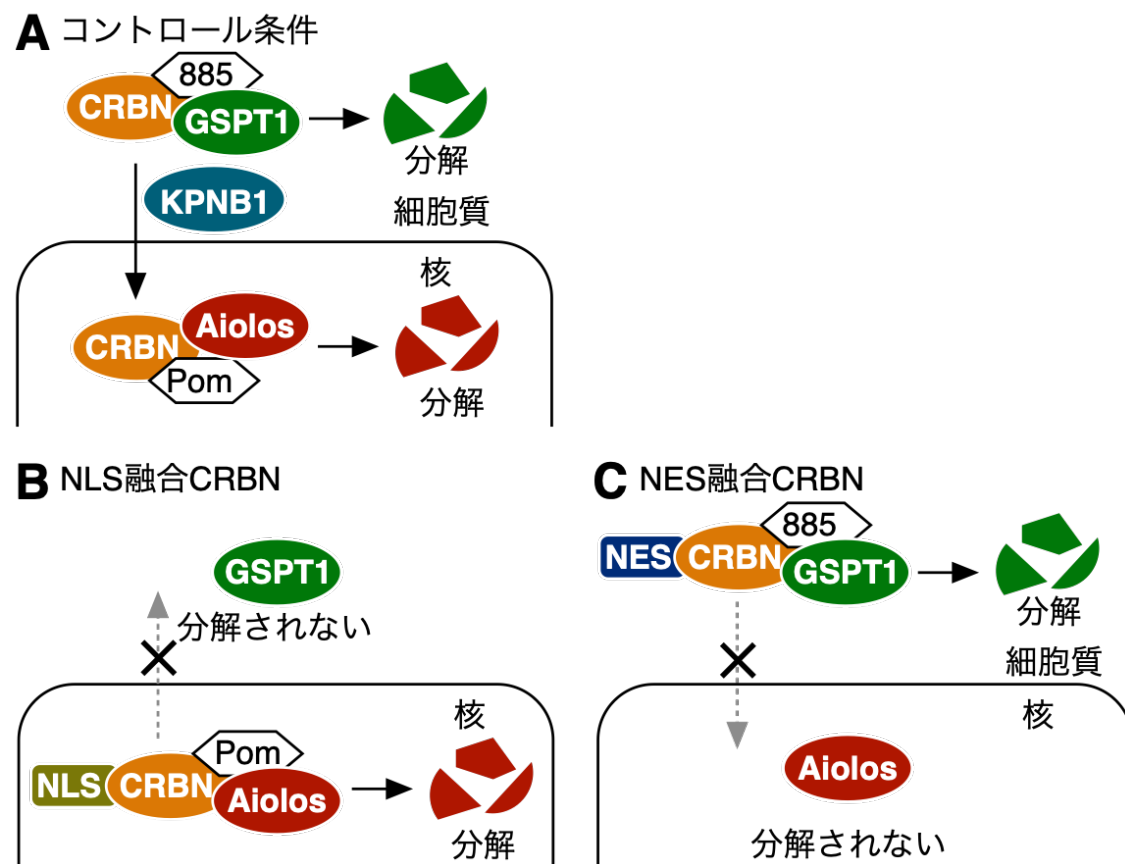


図 5-6 CRBN の細胞内局在が薬剤感受性に与える影響のモデル

- (A) コントロール条件では細胞質と核の両方に CRBN が存在するため pomalidomide は Aiolos、CC-885 は GSPT1 の分解をそれぞれ誘導する。
- (B) NLS-CRBN は核に局在するため、pomalidomide 処理により Aiolos の分解が誘導されるが、CC-885 を処理しても GSPT1 は分解されない。
- (C) NES-CRBN は細胞質に局在するため、CC-885 処理により GSPT1 が分解されるが、pomalidomide を処理しても Aiolos は分解されない。

第6章 考察

6-1 実験結果のまとめ

本研究により 445 遺伝子が pomalidomide 感受性に関与する変動遺伝子として同定された。変動遺伝子には pomalidomide 標的因子 CRBN、CRL4^{CRBN} 複合体の構成因子 (ROC1、DDB1)、CRL4^{CRBN} の活性に関与することが既に報告されていた NEDD8、CSN の構成因子、26S proteasome の構成因子が含まれていた (図 3-2、3)。また、複数の多発性骨髄腫由来細胞株において変動遺伝子の個別 KD が pomalidomide 感受性に影響することが確かめられた (図 3-9、10)。これらの結果から、本スクリーニングの結果が妥当であることが示された。

また、変動遺伝子の GO 解析によってユビキチンプロテアソーム経路などのタンパク質分解経路だけでなく、RNA splicing や翻訳などの遺伝子発現に関与する経路やタンパク質の核内輸送が pomalidomide の多発性骨髄腫に対する抗がん活性に関与することが示された (表 4-1)。さらに、KPNB1 が CRBN の細胞内局在のコントロールすることで CRBN modulator への感受性に関与することが示された (図 4-8、6-1)。そして、CRBN の細胞内分布が複数の CRBN modulator の感受性に影響することが示唆された (図 5-6、6-1)。これらの新たな知見は CRBN modulator の多岐にわたる薬効を明らかにする研究に対して新たなアプローチを提供することができたことに加え、CRBN modulator の多岐に渡る薬理作用の中心である CRBN の細胞内分子機構の一端を明らかにした。

6-2 過去に報告された genome-wide screening との比較

最近、私が本論文で行なった研究戦略と類似した機能的スクリーニングの結果が複数報告された (図 6-2)。Zhu et al., 2015 では lenalidomide を用いた short interfering RNA (siRNA) スクリーニングによって、ribosomal protein S6 kinase A3 (RPS6KA3、RSK2) を含む 63 遺伝子が lenalidomide 感受性因子として報告された²⁹。この論文で報告された RSK2 は ribosomal S6 kinase family に属し、細胞増殖や分化に関与し、RSK2 を MM1.S や他の多発性骨髄腫細胞株でノックダウン、もしくは化合物により阻害すると、lenalidomide の感受性が増加した。Sievers et al., 2018 や Patil et al., 2019 では CRISPR-Cas9 ライブラリを用いた KO スクリーニングにより、CRL4^{CRBN} の neddylation を制御する COP9 signalosome subunits

(CSNs) が同定されたほか、ユビキチンをユビキチンリガーゼ (E3) CRL4^{CRBN} に輸送するユビキチン結合酵素(E2) として UBE2G1 が同定された^{30,31}。

本研究で同定された変動遺伝子と過去の論文で同定された遺伝子は完全には一致しない。例えば CRL4^{CRBN} の構成因子 DDB1 や ROC1 は本研究や CRISPR-Cas9 スクリーニングの遺伝子リストに含まれていたが、Zhu et al., 2015 で報告された lenalidomide 感受性因子には含まれず、反対に同論文で同定された RSK2 は本研究を含む他のスクリーニングでは同定されなかった。また、2つの CRISPR-Cas9 スクリーニングでは E2 ユビキチンリガーゼとして ubiquitin Conjugating Enzyme E2 G1 (UBE2G1) が共通して同定されたが、UBE2G1 は本研究の変動遺伝子としては同定されなかった。このように結果が一致しなかった原因として、以下の要素が考えられた。

1 つ目の要素は CRBN modulator の処理条件の違いである。本研究では pomalidomide を 1 μ M で 5 日間処理する条件を採用したが、siRNA スクリーニングでは lenalidomide を 10~200 μ M で 5 日間処理、CRISPR-Cas9 スクリーニングでは 213 nM pomalidomide、117 nM CC-122、2 μ M lenalidomide を 9 日間処理や 1 μ M lenalidomide を 20 日間処理といった条件が採用された。2 つ目の要素は用いた多発性骨髄腫細胞株の違いである。本研究は OPM-2 細胞を用いたが、siRNA スクリーニングでは KMS11 細胞が、2 つの CRISPR-Cas9 スクリーニングでは MM1.S 細胞と BC-3 細胞が用いられた。そして、最も重要な 3 つ目の要素はスクリーニング実験系の違いである。本研究では 15,377 遺伝子を標的とするプール型の shRNA 発現レンチウイルスライブラリを用いて HTS により細胞数を定量したが、siRNA スクリーニングでは 6,992 遺伝子を標的とする 384-well プレート型の siRNA ライブラリを用いて遺伝子が個別に KD され、発光測定によって細胞数が定量された。siRNA は恒常的な KD が可能な shRNA と異なり KD が一過性のため、標的遺伝子の KD により一度耐性を獲得しても 5 日間という比較的長い処理条件では標的遺伝子の発現量が復活し、感受性が復活することが考えられる。そのため感受性を高め早期に細胞死が誘導する遺伝子を同定できたが、本研究のような KD が耐性を与える遺伝子は同定できなかったと考えられた。一方、CRISPR-Cas9 スクリーニングでは 19,050 遺伝子を標的とするライブラリが用いられ、KD ではなく KO でスクリーニングが行われた。本研究の shRNA を用いた KD では、CRISPR-Cas9 による KO と比べて内因性タンパク質の発現抑制が不完全なため、機能的な冗長性を持つと考えられるユビキチン結

合酵素 (E2) が同定されにくかったと考えられる。

6-3 KPNB1 が担う CRBN の細胞内局在制御

KPNB1 が属する Importin-β family は積荷タンパク質の NLS とよばれる特異的な領域を認識し積荷タンパク質の核内輸送を行う。ヒトの Importin-β family には少なくとも 22 メンバーが存在し、ある程度の冗長性はあるが異なった積荷タンパク質の認識と核内輸送を行っている^{27,32}。

KPNB1 と CRL4^{CRBN} の相互作用を GST-KPNB1 と昆虫細胞で個別に過剰発現した CRL4^{CRBN} のサブユニットを用いて GST pull-down を行ったところ、CRBN が GST-KPNB1 と比較的強く共沈降したことから、CRBN が KPNB1 と直接結合している可能性が高い (図 4-7)。また、ROC1、CUL4、DDB1 を共通の構成因子として持ち、異なる基質認識レセプター-Damage Specific DNA Binding Protein 2 (DDB2) を有する CRL4^{DDB2} 複合体は、UV 照射による DNA 損傷に起因した核内輸送に DDB2 が重要な役割を果たしており、DDB2 を認識するインポートンとして importin-α8 が知られている。従って、CRBN が DDB2 と同様に CRL4^{CRBN} 複合体の細胞内局在を制御する可能性は高い^{33,34}。しかしながらタンパク質の細胞内局在に係わるドメインサーチプログラム PSORT (<https://psort.hgc.jp/>) や PredicNLS (<https://bio.tools/predictnls>) を用いたところ、CRBN に既知の NLS が確認できず、KPNB1 が CRBN を直接認識、結合して核内輸送を行っているのか、それとも CRL4^{CRBN} の他の構成因子を介して間接的に核内輸送を行っているのか不明である。いずれにせよ、22 メンバーが存在するヒトの Importin-β family の中で KPNB1 が CRBN の細胞内局在に重要であることを明らかにしたことは有用な発見であると考えられる。

6-4 CRBN の細胞内分布が CRBN modulator の薬効に与える影響

本研究によって CRBN とその基質タンパク質の細胞内局在の一致が、基質の効果的な分解と CRBN modulator の薬効に重要であることが示唆された (図 5-6)。現在までに CRBN modulator 依存的なユビキチン化基質 (ネオ基質) として Ikaros および Aiolos¹²⁻¹⁴、CK1α¹⁷、Sal-like protein 4 (SALL4)^{35,36}、Tumor Protein P63 (p63、ΔNp63α、Tap63α)³⁷、ZFP92 Zinc Finger Protein (ZFP91)³⁸、内因性のユビキチン化基質 (天然基質) として AMP-activated protein kinase α (AMPKα)³⁹、glutamine synthetase (GS)⁴⁰、MESI2¹⁶、KCNMA1/SLO1²⁶、Chloride Channel Protein 1 (CLC1)

⁴¹等が同定されている (図 4-2)。転写因子である Ikaros、Aiolos、SALL4、MEIS2 は核局在するが、glutamine synthetase、翻訳因子 GSPT1、キナーゼ CK1 α は細胞質に存在する。そしてカリウムチャネル KCNMA1/SLO1 やクロライドチャネル CLC1 は細胞膜に存在する^{26,41}。また、ユビキチン化基質だけでなく CRBN の細胞内分布も細胞株によって異なる。OPM-2 細胞や 293T 細胞では細胞質と核の両方に CRBN が存在し、わずかに核に多く存在した (図 4-2、3)。一方で多発性骨髄腫細胞株の DF15 細胞では細胞質に局在することが報告されている⁵。従って、たとえ同じ疾患に由来する細胞であっても CRBN の細胞内分布が異なる可能性が考えられ、様々な CRBN modulator によって引き起こされる CRL4^{CRBN} の基質の効率的な分解、そして抗がん活性の発揮に CRBN の細胞内分布が影響する可能性がある。例えば、多発性骨髄腫細胞において CRBN が細胞質に留まり核内の Aiolos と細胞内分布が一致しなくなれば pomalidomide 耐性を獲得する可能性がある。こうしたことが、もしかすると多発性骨髄腫が lenalidomide や pomalidomide に耐性を獲得するメカニズムの 1 つとなっているかもしれない。反対に、CRBN が核に局在して Aiolos と細胞内局在が完全に一致すれば、より効果的に pomalidomide が抗がん活性を発揮すると考えられる。従って、CRBN の細胞内分布をコントロールする方法を確立することができれば、CRBN modulator の薬効を強めたり、適応範囲を拡大することができると期待される。

6-5 変動遺伝子が pomalidomide 感受性に与える影響

本研究で同定された変動遺伝子は、細胞内機能に基づく GO 解析で分類された 3 つの遺伝子群とその他の遺伝子群に分けられた (図 4-1)。

1 つ目の GO term 群はユビキチン化・分解関連で、CRL4^{CRBN} 構成因子や UBE2D1 などユビキチン経路に含まれる遺伝子、CRL4^{CRBN} の活性に関与する NEED8 や COP9 signalosome 構成因子、タンパク質分解を行う Proteasome 構成因子が含まれる。これらの遺伝子は pomalidomide による Aiolos 分解に直接関与することで pomalidomide 感受性に影響を与えていることが考えられた。

2 つ目の GO term 群は遺伝子発現関連で、SLU7 や SNRPD1 などの Spliceosome 構成因子や RPS26 などの Ribosome 構成因子、EIF4A3 などの翻訳因子などが含まれる。これらは CRBN や下流の転写因子すなわち Aiolos や IRF4、c-Myc などの遺伝子発現におけるスプライシングや翻訳に関与することで、pomalidomide 感受性に影響を与えていることが考えられた。

3 つ目の GO term 群はインポートンで、本研究で KPNB1 が CRBN と相互作用し CRBN の細胞内局在をコントロールすることで pomalidomide 感受性に影響を与えることが考えられた。また、IPO11 は CRBN や Aiolos の細胞内局在には関与しないが、それ以外の因子、すなわち IRF4 や c-Myc などの下流の転写因子の核内輸送に関与するのではないかと考えられた。

3 つの遺伝子群に含まれない遺伝子はそれぞれ違った箇所で pomalidomide 感受性に関与していると考えられた。例えば ATP Binding Cassette Subfamily C Member 12 (ABCC12) は multi- drug resistance proteins (MRP) と呼ばれる細胞膜に存在し、細胞内の分子を細胞外に汲み出す働きを持つタンパク質の 1 つのため、pomalidomide の細胞内への取り込みや汲み出しに関与することで pomalidomide 感受性に影響することが考えられた⁴²。

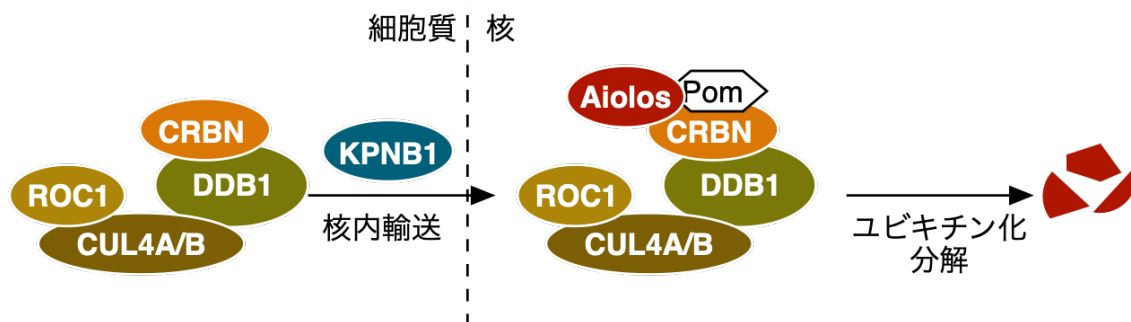


図 6-1 実験結果のまとめ

CRL4^{CRBN} は KPNB1 によって核内輸送される。CRBN が核内で pomalidomide と結合すると Aiolos をユビキチン化・分解に導き、pomalidomide の多発性骨髄腫細胞株への抗細胞増殖作用が発揮される。

論文	実験系	同定した遺伝子			
		CRBN	CSNs	UBE2G1	その他
Tateno et al., Sci. Rep. (2020)	knockdown (shRNA)	○	○	×	KPNB1
Zhu et al., Blood (2015)	knockdown (siRNA)	対象外	×	×	RSK2
Sievers et al., Blood (2018)	knockout (CRISPR-Cas9)	○	○	○	UBE2M1 UBE2D1
Patil et al., Blood adv. (2019)	knockout (CRISPR-Cas9)	○	○	○	SENP8

図 6-2 本研究と過去の報告 genome-wide screening の結果の違い

過去に報告された genome-wide screening の実験系と各研究が同定した代表的な遺伝子を示した^{29-31,43}。

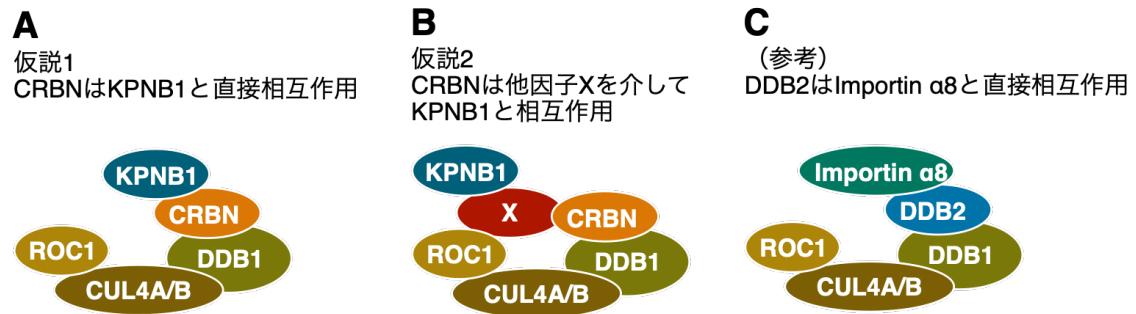


図 6-3 CRL4^{CRBN} と KPNB1 の相互作用モデルの仮説

- (A) CRBN と KPNB1 は直接相互作用する。
- (B) CRBN と KPNB1 は他因子を介して間接的に相互作用する。
- (C) CRL4^{DDB2} は DDB2 と Importin α1 が直接相互作用し核へ輸送される。

参考文献

1. Ito, T. *et al.* Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science* **327**, 1345–50 (2010).
2. Melchert, M. & List, A. The thalidomide saga. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **39**, 1489–1499 (2007).
3. Singhal, S. *et al.* Antitumor Activity of Thalidomide in Refractory Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* **341**, 1565–1571 (1999).
4. Zhu, Y. X. *et al.* Cereblon expression is required for the antimyeloma activity of lenalidomide and pomalidomide. *Blood* **118**, 4771–9 (2011).
5. Lopez-Girona, A. *et al.* Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide. *Leukemia* **26**, 2326–2335 (2012).
6. Jackson, S. & Xiong, Y. CRL4s: the CUL4-RING E3 ubiquitin ligases. *Trends Biochem. Sci.* **34**, 562–570 (2009).
7. Cope, G. A. & Deshaies, R. J. COP9 signalosome: A multifunctional regulator of SCF and other cullin-based ubiquitin ligases. *Cell* **114**, 663–671 (2003).
8. Soucy, T. A., Dick, L. R., Smith, P. G., Milhollen, M. a & Brownell, J. E. The NEDD8 Conjugation Pathway and Its Relevance in Cancer Biology and Therapy. *Genes Cancer* **1**, 708–16 (2010).
9. Matyskiela, M. E. *et al.* A novel cereblon modulator recruits GSPT1 to the CRL4 CRBN ubiquitin ligase. *Nature* **535**, 252–257 (2016).
10. Raab, M. S., Podar, K., Breitkreutz, I., Richardson, P. G. & Anderson, K. C. Multiple myeloma. *Lancet* **374**, 324–339 (2009).
11. Usmani, S. Z. & Lonial, S. Novel Drug Combinations for the Management of Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **14**, S71–S77 (2014).
12. Lu, G. *et al.* The Myeloma Drug Lenalidomide Promotes the Cereblon-Dependent Destruction of Ikaros Proteins. *Science (80-.).* **343**, 305–309 (2013).
13. Gandhi, A. K. *et al.* Immunomodulatory agents lenalidomide and pomalidomide co-stimulate T cells by inducing degradation of T cell repressors Ikaros and Aiolos via modulation of the E3 ubiquitin ligase complex CRL4 CRBN. *Br. J. Haematol.* **164**, 811–821 (2013).

14. Krönke, J. *et al.* Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells. *Science* **343**, 301–5 (2014).
15. Ito, T. & Handa, H. Cereblon and its downstream substrates as molecular targets of immunomodulatory drugs. *Int. J. Hematol.* **104**, 293–299 (2016).
16. Fischer, E. S. *et al.* Structure of the DDB1-CRBN E3 ubiquitin ligase in complex with thalidomide. *Nature* **512**, 49–53 (2014).
17. Petzold, G., Fischer, E. S. & Thomä, N. H. Structural basis of lenalidomide-induced CK1 α degradation by the CRL4CRBN ubiquitin ligase. *Nature* **532**, 127–130 (2016).
18. Liddicoat, B. J., Abdulrahman, W. & Mikkelsen, T. Defining the human C2H2 zinc finger degrome targeted by thalidomide analogs through CRBN. *Science* (80-.). **362**, eaat0572 (2018).
19. Krönke, J. *et al.* Lenalidomide induces ubiquitination and degradation of CK1 α in del(5q) MDS. *Nature* **523**, (2015).
20. Sun, X. *et al.* PROTACs : great opportunities for academia and industry. *Signal Transduct. Target. Ther.* 4–64 (2020). doi:10.1038/s41392-019-0101-6
21. Winter, G. E. *et al.* Phthalimide conjugation as a strategy for in vivo target protein degradation. *Science* (80-.). **348**, 1376–81 (2015).
22. Hong, F. *et al.* RankProd: A bioconductor package for detecting differentially expressed genes in meta-analysis. *Bioinformatics* **22**, 2825–2827 (2006).
23. Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D. & Smith, A. E. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* **39**, 499–509 (1984).
24. Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M. & Mattaj, I. W. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* **90**, 1051–1060 (1997).
25. Agapova, O. A. *et al.* Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science* (80-.). **339**, 819–823 (2013).
26. Liu, J. *et al.* CRL4ACRBN E3 ubiquitin ligase restricts BK channel activity and prevents epileptogenesis. *Nat. Commun.* **5**, 1–9 (2014).
27. Kimura, M. *et al.* Identification of Cargo Proteins Specific for the Nucleocytoplasmic Transport Carrier Transportin by Combination of an in Vitro Transport System and Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC)-based Quantitative Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 145–157 (2013).

28. Hegde, R. *et al.* The Polypeptide Chain-releasing Factor GSPT1/eRF3 Is Proteolytically Processed into an IAP-binding Protein. *J. Biol. Chem.* **278**, 38699–38706 (2003).
29. Zhu, Y. X. *et al.* RNA interference screening identifies lenalidomide sensitizers in multiple myeloma, including RSK2. *Blood* **125**, 483–491 (2015).
30. Sievers, Q. L., Gasser, J. A., Cowley, G. S., Fischer, E. S. & Ebert, B. L. Genome-wide screen identifies cullin-RING ligase machinery required for lenalidomide-dependent CRL4 CRBN activity. *Blood* **132**, 1293–13–3 (2018).
31. Patil, A., Manzano, M. & Gottwein, E. Genome-wide CRISPR screens reveal genetic mediators of cereblon modulator toxicity in primary effusion lymphoma. *Blood Adv.* **3**, 2105–2117 (2019).
32. Ström, A. C. & Weis, K. Importin-beta-like nuclear transport receptors. *Genome Biol.* **2**, REVIEWS3008 (2001).
33. Kimoto, C. *et al.* Biochimica et Biophysica Acta Functional characterization of importin α 8 as a classical nuclear localization signal receptor. *BBA - Mol. Cell Res.* **1853**, 2676–2683 (2015).
34. Alekseev, S. *et al.* Cellular Concentrations of DDB2 Regulate Dynamic Binding of DDB1 at UV-Induced DNA Damage. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 7402–7413 (2008).
35. Matyskiela, M. E. *et al.* SALL4 mediates teratogenicity as a thalidomide-dependent cereblon substrate. *Nat. Chem. Biol.* **14**, 981–987 (2018).
36. Donovan, K. A. *et al.* Thalidomide promotes degradation of SALL4 , a transcription factor implicated in Duane Radial Ray syndrome. *Elife* **91**, 1–25 (2018).
37. Asatsuma-okumura, T. *et al.* p63 is a cereblon substrate involved in thalidomide teratogenicity. *Nat. Chem. Biol.* **15**, 1077–1084 (2019).
38. An, J. *et al.* pSILAC mass spectrometry reveals ZFP91 as IMiD-dependent substrate of the CRL4CRBN ubiquitin ligase. *Nat. Commun.* **8**, 1–11 (2017).
39. Kwon, E., Li, X., Deng, Y., Chang, H. W. & Kim, D. Y. AMPK is down-regulated by the CRL4A-CRBN axis through the polyubiquitination of AMPK α isoforms. *FASEB J.* **33**, 6539–6550 (2020).
40. Nguyen, T. Van *et al.* Glutamine Triggers Acetylation-Dependent Degradation of Glutamine Synthetase via the Thalidomide Receptor Cereblon. *Mol. Cell* **61**, 809–820 (2016).

41. Chen, Y.-A. *et al.* The Cullin 4A/B-DDB1-Cereblon E3 Ubiquitin Ligase Complex Mediates the Degradation of CLC-1 Chloride Channels. *Sci. Rep.* **5**, 10667 (2015).
42. Chen, Z. & Tiwari, A. K. Multidrug resistance proteins (MRPs/ABCCs) in cancer chemotherapy and genetic diseases. *FEBS J.* **278**, 3226–3245 (2011).
43. Tatenos, S., Iida, M., Fujii, S., Suwa, T. & Katayama, M. Genome-wide screening reveals a role for subcellular localization of CRBN in the anti-myeloma activity of pomalidomide. *Sci. Rep.* **4**, 1–11 (2020).

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました東京工業大学生命理工学院の山口雄輝教授、東京医科大学ケミカルバイオロジー講座の半田宏特任教授に心から厚く御礼申し上げます。

shRNA ライブラリスクリーニングの解析をしていただきました、九州工業大学大学院情報工学研究院の藤井聡助教、飯田緑研究員に深く感謝致します。

本研究に関して多大なるご指導、ご援助を賜りました東京医科大学ケミカルバイオロジー講座の伊藤拓水准教授、東京工業大学生命理工学院の坂本助教、山本淳一助教に深く感謝致します。

Ion Proton を使用させて頂きました横浜市立大学大学院医学研究科遺伝学教室の松本教授、宮武助教、興水研究員に深く感謝致します。

また研究グループの仲間として多くの場面で議論をし、切磋琢磨し多くの時間を共有してきた山口研究室の皆様に、深く感謝致します。

最後にいつも暖かく見守り応援してくれた家族に心から感謝致します。