

## 2022年度 日本骨髄腫学会奨励賞 研究成果報告書

氏名	原田武志
所属施設名	徳島大学 大学院医歯薬学研究部 血液・内分泌代謝内科学分野
研究課題名	1q 増幅多発性骨髄腫に対する RNA 編集酵素 ADAR1 を標的とする新規治療戦略の創出
研究期間	2022年 4月 1日 ~ 2023年 3月 31日
研究成果報告	<p>1) 論文をもって研究成果報告とする場合には以下にチェックの上、論文を添えて提出してください。</p> <p style="margin-left: 2em;">■ <u>研究結果の主な内容が含まれ、本助成を受けている事が明記された論文があるため、研究成果報告を論文に代え提出いたします。</u></p> <p>2) 論文がない場合には以下に報告内容を記載してください。</p> <p>多発性骨髄腫 (MM) に対する免疫・細胞療法を中心とした治療法の開発が進む中、治療成績の向上が期待されている一方で、難治性の克服は依然として未解決の課題である。特に、1番染色体長腕 (1q) の増幅は治療抵抗性と関連する難治性因子として知られている。1q には二本鎖 RNA (dsRNA) 編集酵素である ADAR1 が位置しており、MM の進展と難治例において、その発現が高まることが報告されている。ADAR1 には、構成的に発現する ADAR1 p110 とインターフェロン (IFN) により発現誘導される ADAR1 p150 の2つのアイソフォームが存在する。ADAR1 は難治性 MM の病態形成に関与すると考えられているが、そのアイソフォーム毎の MM における機能的役割については十分に解明されていない。そこで、本研究では、IFN 誘導性の ADAR1 p150 に着目し、その MM 細胞死の制御機構および治療標的としての可能性を明らかにすることを目的とする検討を行った。</p> <p>まず、MM 細胞株および患者由来 CD138 陽性細胞を用いた解析により、IFN 刺激により ADAR1 p150 の発現が誘導される一方で、ADAR1 p110 の発現には変化がないことを確認した。shRNA を用いた <i>ADAR1</i> の発現抑制は、MM 細胞の生存・増殖を抑制し、さらに、<i>ADAR1</i> 発現抑制下では、IFN 刺激による細胞死が顕著に誘導されることが示された。加えて、CRISPR-Cas9 により <i>ADAR1 p150</i> の発現を特異的に欠失させた MM 細胞においても、shRNA での検討と同様に IFN 依存的な細胞死が強く誘導された。</p> <p>次に、dsRNA を介する細胞死制御において近年注目されている ZBP1 と ADAR1 の関係性についての検討を行った。まず、MM 細胞における dsRNA、ZBP1、ADAR1 p150 の細胞内局在を免疫蛍光染色 (IF) により解析したところ、dsRNA は細胞質に、ZBP1 および ADAR1 p150 は核と細胞質に局在していた。ZBP1 と ADAR1 p150 は共に Z<math>\alpha</math>ドメインを有し、左巻き RNA (Z-RNA) を認識することができる。抗 Z-DNA/RNA 抗体を用いた IF では、Z-DNA/RNA が MM 細胞の核と細胞質の両方に存在し、RNase での処理により、細胞質のシグナルが有意に消失したことから、Z-RNA は主に細胞質に局在することが示唆された。さらに、近接ライゲーションアッセイにより、Z-RNA と ZBP1、および Z-RNA と ADAR1 p150 がともに細胞質で有意に近接して存在することが明らかとなった。これらの結果から、ADAR1 p150 が IFN 刺激下において ZBP1 を介した細胞死を抑制している可能性が示された。</p>

※提出時のファイル形式は A4 サイズ PDF データとすること

ADAR1 p150 は nuclear export sequence (NES) を有し、NES は XPO1 との結合を介して、核から細胞質に移行する。欧米で既に MM での臨床開発が進む XPO1 阻害薬 selinexor (KPT-330) を用いた検討では、MM 細胞の ADAR1 p150 が核内に留まることが確認された。さらに、*ADAR1 p150* 発現欠失 MM 細胞での IFN 刺激による細胞死誘導の現象と同様に、MM 細胞で KPT-330 と IFN の併用が協調的に細胞死を誘導することを確認できた。また、この細胞死はアポトーシスであることを annexin V-PI アッセイで確認した。C.B-17 SCID マウスにヒト MM 細胞株を移植した MM モデルを用いた *in vivo* 解析においても、KPT-330 と IFN の併用による腫瘍増殖抑制効果が確認された。以上の結果より、ADAR1 p150- ZBP1 軸は、IFN 応答を介した MM 細胞死の制御における新たな治療標的となり得ることが示唆される。

本研究助成を通じて、ADAR1 の高発現が 1q 増幅を獲得した MM 細胞の生存維持に寄与するという仮説のもと、MM 細胞での ADAR1 p150 アイソフォームの機能的局在と ZBP1 経路との関連を明らかにし、細胞死誘導に基づく新たな治療戦略の提案に至った点は大きな進展である。さらに、XPO1 阻害薬と IFN の併用療法により、難治性 MM に対する新たな分子標的治療への展開の可能性が見出された点も、本研究の重要な成果と位置付けられる。今後は、ADAR1 p150 が編集する dsRNA の配列の特定および、ZBP1 活性化との ADAR1 p150 の直接的な関係の解析を進め、最終的には、1q 増幅を有する高リスク MM 患者に対する新規治療法の確立に貢献することを目指す。