

表 題 : レナリドマイド耐性を誘導する IKZF1 転写因子複合体の探索

論文の区分 : 論文博士

著 者 名 : 長田 直希

所 属 : 自治医科大学 分子病態治療研究センター
領域融合治療研究部

2024 年 2 月 15 日申請の学位論文

紹 介 教 員 : 地域医療学専攻 血液・免疫疾患学専攻分野
造血発生学専攻科
職名・氏名 准教授・菊池 次郎

目 次

1. はじめに	2
2. 研究方法	5
3. 結果	10
4. 考察	22
5. 参考文献	27

はじめに

多発性骨髄腫（MM）は、形質細胞が腫瘍化した難治性の血液がんである[1]。その予後は極めて不良であったが、2000年代になって認可されたプロテアソーム阻害剤やサリドマイド及びその誘導体であるレナリドマイド(Len)とポマリドマイド(Pom)（これらは総称して免疫調節薬（IMiDs）と呼ばれる）が、その予後を大きく改善した[2]。これら治療薬に加え、最近認可された CD38 や SLAMF7 に対する抗体薬を含む 3 剤あるいは 4 剤併用療法には、さらなる予後の改善が期待されている[3]。このうち、Len は初発例及び再発例に対する多くのレジメンに加え、維持療法にも用いられる最も重要な治療薬である[4]。したがって、Len に対する感受性低下と耐性獲得は、再発と予後悪化に直結するため[5]、鍵分子を含む機序の解明は治療成績向上に向けた重要な研究課題である。

IMiDs は、CRL4 E3 ユビキチンリガーゼ複合体の構成分子セレブロン（CRBN）に結合することで、抗骨髄腫作用を発揮する[6]。中でも Len 及び Pom は CRBN との結合を介して、IKZF ファミリー転写因子である IKZF1(Ikaros)と IKZF3(Aiolos)をユビキチン化、プロテアソーム依存的に分解する[7]。IKZF1 と IKZF3 が分解されると、MM 細胞の生存に必須の転写因子 IRF4 の発現が低下し、細胞死が起こる[6-8]。したがって、CRBN の変異によって Len が結合できなくなると、感受性低下と耐性獲得に働く可能性が示唆される。実際、Gooding ら[9] は、IMiDs 耐性例における CRBN の点突然変異、構造異常、alternative splicing などの変化を明らかにしている。しかしながら、Len 結合能を消失した点突然変異は、Len 耐性例の 10%未満で検出されたに過ぎず、耐性獲得には未解明の機序が多く残されている[10, 11]（図 1）。従って、未知の耐性機序の解明は、現在も重要な研究課題と言える。

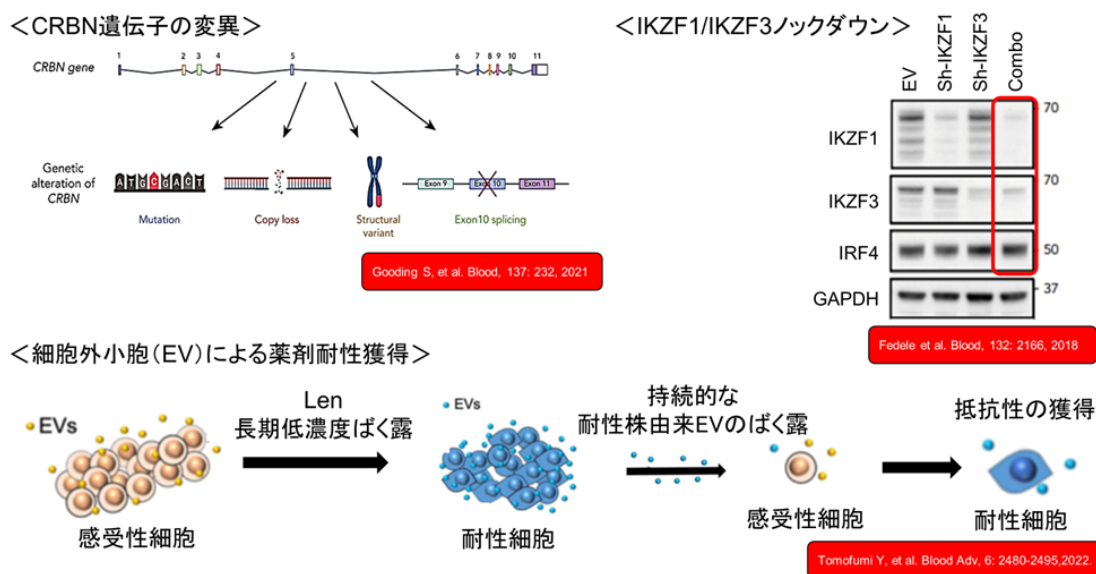


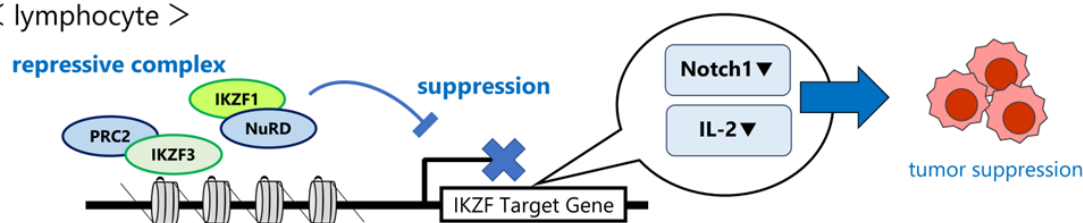
図1.免疫調節薬(immunomodulatory drugs ; IMiDs)に対する耐性化機序

図1：近年、Len の長期使用に伴う耐性出現が問題となっているが、耐性獲得機序の多くは未解明である。これまでの研究で、①Len/Pom 抵抗性症例の約 30%で CRBN 遺伝子に何らかの異常がみられること、②Len のターゲットである IKZF1 や IKZF3 をノックダウンしても、その下流にある IRF4 などの発現が完全には低下しないこと、③治療抵抗性が細胞外小胞 (EV) を介して耐性細胞から感受性細胞へと伝播すること、などが報告されているがこれらは一例にすぎず、耐性化機序について説明がつかない部分が多くある。

IKZF ファミリーは造血系で広く発現しており、血液細胞の増殖と分化に関与する多種多様な遺伝子の転写調節を介して恒常性を維持している[12]。このうち、IKZF1 は、ヌクレオソームリモデリングおよび脱アセチル化酵素 (NuRD) 複合体およびポリコーム複合体 (PRC2) と連携して NOTCH1 等の oncogene を転写抑制することにより、腫瘍抑制因子として機能する[13, 14]。正常なリンパ球系細胞では、IKZF1 のリプレッサー機能は、アクチベーター機能よりも優位に働く[15]。一方、MM 細胞では、IKZF1 は転写活性化因子として働き、IRF4 を含む様々ながん遺伝子の発現を促進する[16, 17]。ここから、我々は、MM 細胞では IKZF1 が正常リンパ球とは異なる複合体を形成し、この複合体形成によって IKZF1 が転写活性化因子として働くのではないかと推測した。この見解を裏付けるように、最近の報告では、IKZF1 をノックダウンして

も MM 細胞における IRF4 の発現は必ずしも抑制されないことが示されている [18]。この知見は、IKZF1 とは独立して、あるいは IKZF1 と協調して、MM 細胞におけるがん遺伝子の転写活性を行い、IKZF1 の分解後も IRF4 等の転写が維持されて Len 耐性に働く未知の因子の存在を示唆している（図 2）。

< lymphocyte >



< myeloma cell >

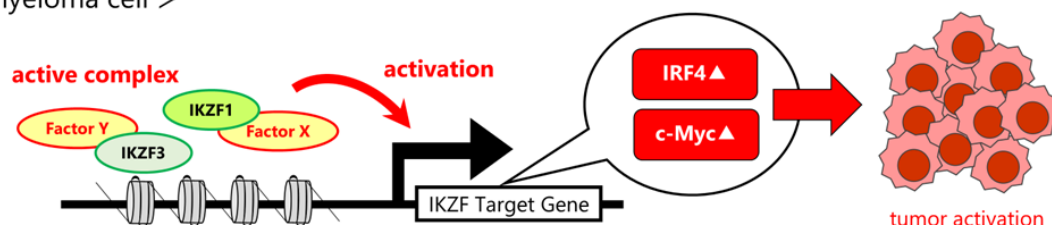


図2.IKZF複合体の転写制御機構

図 2：正常リンパ球系細胞において IKZF1 は、NuRD 複合体を形成、転写抑制的に働いているが、MM 細胞では一転して活性化に働く。したがって、IKZF1 は腫瘍化に際してパートナー分子を代え、その分子（ファクターX/Y）により耐性化が誘導されると推測した。

本研究では、クロマチン免疫沈降シーケンス(ChIP シーケンス)解析を含むバイオインフォマティクスの手法を用いて、MM 細胞において IKZF1 複合体を転写抑制から活性化に変化させる因子の同定を試みた。その結果、activator protein-1 (AP-1) ファミリー転写因子である c-Fos [19, 20] が IKZF1 と複合体を形成し、MM 細胞の生存や増殖に必須の IRF4 を含む IKZF1 標的遺伝子の転写を活性化させると共に Len 耐性に働く機序を見出した。

研究方法

細胞および細胞培養

ヒト骨髄腫細胞株 MM.1S, KMM.1, KMS12-BM, KMS21, KMS26, KMS28-BM, KMS34, SK-MM2, NCI-H929, および RPMI8226 は JCRB 細胞バンクから入手した。MM.1S, KMM.1, KMS12-BM, KMS21, KMS26, KMS28-BM, KMS34, NCI-H929, および RPMI8226 はウシ胎仔血清(Sigma-Aldrich)を 10%、SK-MM2 は 20% 添加した RPMI1640(Sigma-Aldrich)培地を用い、CO₂ 5%、37°C の条件下で培養した。細胞培養は、 1.5×10^5 cells/ml で開始し、 1×10^6 cells/ml まで増殖した時点で再度 1.5×10^5 cells/ml に希釈し継代した。

試薬

Len と activator protein-1 (AP-1) 阻害剤 T-5224 は Selleck Chemicals から購入した。薬剤はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、薬効や細胞増殖への影響を防ぐために DMSO の最終濃度を 0.1% 未満で使用した。

レンチウイルス発現ベクターの構築と作製

c-Fos 発現のノックダウンには、レンチウイルス short-hairpin RNA (shRNA) 発現ベクター pLL3.7 を使用した。小文字で示した標的配列を含む shRNA 配列を表 1 に示す。コントロールとして、空ベクターあるいは配列をランダムに並べたノックダウン効果のないスクランブル配列を用いた。これらのベクターをパッケージングプラスミド (Thermo Fisher Scientific) と共に 293FT 細胞に共導入し、培養上清中に感染性レンチウイルスを産生させた。次に、レンチウイルスを細胞懸濁液に添加し、24 時間導入した。

表 1. c-Fos に対する shRNA 配列

Forward: 5'- T gaccaatattatactaaga TTCAAGAGA
tcttagtataatattggtc TTTTTC -3'
Reverse: 5'- TCGAGAAAAAA gaccaatattatactaaga TCTCTTGAA
tcttagtataatattggtc A -3'

定量的リアルタイム RT-PCR

RNeasy Kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出し、ReverTra Ace と oligo(dT) primers (Toyobo) を用いて cDNA に逆転写した。市販のプローブ (c-Fos : Hs99999140、IRF4 : Hs00180031、SLAMF7 : Hs00904275、BSG : Hs00936295、CD48 : Hs00152927、および GAPDH : Hs01922876) (Thermo FisherScientific)を用いて定量リアルタイム RT-PCR を行った。

免疫沈降とイムノブロット法

核・細胞質抽出試薬 (Cayman Chemical) [21]を用いて核抽出物を調製した。免疫沈降は、一次抗体とプロテイン A 磁気ビーズ (Thermo Fisher Scientific) を 4°C で 24 時間インキュベートし、上清を捨てた後に細胞ライセートを加え、30 分インキュベートした。洗浄後、免疫沈降物を溶出し、SDS-PAGE にかけた後、IKZF1 (#14859)、IKZF3 (#15103)、c-Fos (#2250)、FOSB (#2251)、c-Jun (#9165) (Cell Signaling Technology)、IRF4 (sc-48338)、GAPDH (sc-47724) (Santa Cruz Biotechnology)、normal rabbit IgG (PM035)、および FLAG tag (PM020) (MBL) に対する抗体を用いてイムノブロットを行った。

クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイ

クロマチン免疫沈降法は ChIP-IT Express Enzymatic Kit (Active Motif) を用いて行った[22]。まず細胞を 1%ホルムアルデヒドで固定(室温、10 分)し、Enzymatic Shearing Cocktail で 37°C、10 分間反応させ、断片化したクロマチンを得た。遠心

分離後、得られた上清に protein G magnetic beads と IKZF1 と c-Fos (Cell Signaling Technology) あるいは免疫グロブリン(IgG) (Medical & Biological Laboratories) を混合し、4°Cで一晩インキュベートした。この混合物から DNA 断片を精製し、Power SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) と表 2 に示したプライマーを用いて定量 PCR を実施した。ChIP-DNA と input-DNA の間の標的遺伝子の fold enrichment は $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法で求めた。ChIP-seq 解析は Active Motif に委託した。

表 2.ChIP アッセイに使用したプライマーの配列

IRF4 promoter Primer#1	(転写開始点からの位置)	(断片長)
forward: 5'- cagcatctcagacgatcgaa -3'	(-526 to -506)	103bp
reverse: 5'- ttaagtggaccagggattttaca -3'	(-446 to -423)	
IRF4 promoter Primer#2		
forward: 5'- gttggccaggctggtctc -3'	(-239 to -221)	150bp
reverse: 5'- aacctcaacctggaggaaagc -3'	(-110 to -89)	
IRF4 promoter Primer#3		
forward: 5'- tcaattcaattcaccagcctaa -3'	(+43 to +65)	100bp
reverse: 5'- cccagctcccttgagctatt -3'	(+123 to +143)	
IRF4 promoter Primer#4		
forward: 5'- gctctgcaaagcgaagtcc -3'	(+287 to +306)	109bp
reverse: 5'- acctcaggaggccagtcaat -3'	(+376 to +396)	
SLAMF7 promoter Primer#1		
forward: 5'- acacaggatggccaggaa -3'	(-950 to -932)	100bp
reverse: 5'- tcagagcttaagtttgccatgt -3'	(-872 to -850)	
SLAMF7 promoter Primer#2		
forward: 5'- gatggctgatttctcactgg -3'	(-566 to -546)	113bp
reverse: 5'- ttcatgagaaccatatcaggtaa -3'	(-477 to -453)	
SLAMF7 promoter Primer#3		
forward: 5'- gccaaagacccgtaaga -3'	(-273 to -254)	113bp
reverse: 5'- tgacaattccttatatgttccaagt -3'	(-185 to -160)	

SLAMF7 promoter Primer#4

forward: 5'- ttcaccaaggaggatatgga -3' (−96 to −76) 97bp
reverse: 5'- tcattgtggctttaatttgcac -3' (−18 to +1)

タンパク質-DNA 結合アッセイ

EpiQuik General Protein-DNA Binding Assay Kit (EpiGentek) を用いて、IKZF1 と c-Fos が DNA 上で安定な複合体を形成するかどうかを解析した [23]。核抽出物をビオチン化した IKZF1 結合配列(TCAGCTTTTGGGAATGTATTCCCTGTCA) [24] の合成オリゴとインキュベートし、得られた IKZF-DNA 複合体をストレプトアビジンでコートしたプレートの底に捕捉した。プレートを洗浄した後、抗 IKZF1 抗体 (Thermo Fisher Scientific) と二次抗体を用いたサンドイッチ ELISA により、マイクロプレートリーダーによる測定値から残存する複合体を検出した。核抽出液と合成オリゴの混合物中、c-Fos (Cell Signaling Technology) および IKZF1 (Cell Signaling Technology) 抗体を加え、残存する複合体量の変化を解析した。

動物実験

ルシフェラーゼを発現する MM.1S (MM.1S-Luc) および KMS26 (KMS26-Luc) 細胞亜株を 100μL の Iscove's modified Dulbecco's medium に懸濁し、Matrigel basement membrane matrix(Becton Dickinson) と混合、6 週齢の雄 nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency (NOD/SCID) マウス (Charles River Laboratories) に移植した。なお、MM.1S-Luc は皮下に、KMS26-Luc は尾静脈からそれぞれ移植した。非侵襲的バイオイメーキングシステム IVIS-CT Imaging System with Living Image software (Xenogen) を用いたルシフェラーゼの発光量から、マウス体内に MM 細胞の生着が確認された後、マウスを 4 群にわけ、薬剤投与を行なった。なお、対照群には同じスケジュールで DMSO のみを投与した。腫瘍量の定量的データは IVIS による測定値、フォトン単位 (photons/s) で表し

た[25-27]。すべての動物実験は、施設動物倫理委員会の承認を受け、米国科学アカデミーが策定した「**Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**」に従って実施した。また、全ての動物実験は動物を扱うための自治医科大学ガイドラインに沿って行った。

結 果

MM 細胞における IKZF1 標的遺伝子の転写開始点での IKZF1 と c-Fos の共局在

MM に特異的な IKZF1 複合体の探索のため、ヒト MM 細胞株 MM.1S を用いて、IKZF1 抗体による ChIP-seq を行い、ゲノム上への IKZF1 結合部位を網羅的に解析した。その結果、ゲノム上の 13,932 箇所 IKZF1 の結合が検出され、その約 60% が転写開始点 (TSS) 近傍に位置していた (図 3A)。内訳として MM の治療標的であり IKZF1 によって転写調節されることが既知の IRF4、SLAMF7、BSG [7, 16, 28, 29] に加え、新たに CNTRL、ISG20、OMA1、CD48、ICAM1、TIGIT、TET1 などを見出した (図 3B)。また、MM.1S 細胞に Len を添加した際の遺伝子発現変化をマイクロアレイにより解析した結果から、転写開始点近傍に IKZF1 結合が見られても発現が低下しない遺伝子の存在が明らかになった (図 3C)。

ChIP-seq データを解析可能なウェブサイトのソフトウェア ChIP-Atlas [30, 31] を用いて、IKZF1 結合部位の遺伝子配列を同定、結合可能な転写因子を推測する Transfac ソフトウェアを用いて、この領域に結合可能な転写因子を探索した。その結果、Len によって発現が低下する遺伝子特異的に AP-1 ファミリー転写因子である c-Fos 結合モチーフの存在が明らかになった (図 3C : 赤枠)。ここから、c-Fos が IKZF1 と複合体を形成し、転写活性化に働く可能性が示唆された。続いて、同じく MM.1S 細胞を用いて c-Fos 抗体による ChIP-seq 解析を行った。その結果、ゲノム上の 10,173 箇所 c-Fos 結合が見出され、その約 80% は TSS 近傍に位置していた (図 4A)。さらに IKZF1 の ChIP-seq データと比較したところ、IKZF1 は c-Fos 結合部位の 95% (9660/10173) で、c-Fos は IKZF1 結合部位の 69% (9660/13932) で、それぞれ共局在が観察された (図 4B)。また、両者の結合モチーフにも高い重複が見られ (図 4C)、2 つの転写因子が同じ領域に結合している可能性が強く示唆された。続いて、IKZF1 の主要な標的遺伝子であり、MM で発現の高い IRF4 や SLAMF7 遺伝子の TSS 付近の IKZF1 と c-Fos の結合量を ChIP-Atlas を用いて可視化すると、両者のピークは重複が見られた (図 5A)。また、これら以外にも CD38 や MCL1 等、MM 細胞で発現する遺伝子の TSS 付

近でも共局在が検出された（データ未掲載）。一方、MM で発現が低い遺伝子ではこれらピークの重複は見られなかった（図 5B）。これらの結果は、c-Fos が IKZF1 と協調して IRF4 など MM の増殖や生存に必須の遺伝子の転写活性化に働くコファクターであることを強く示唆している。

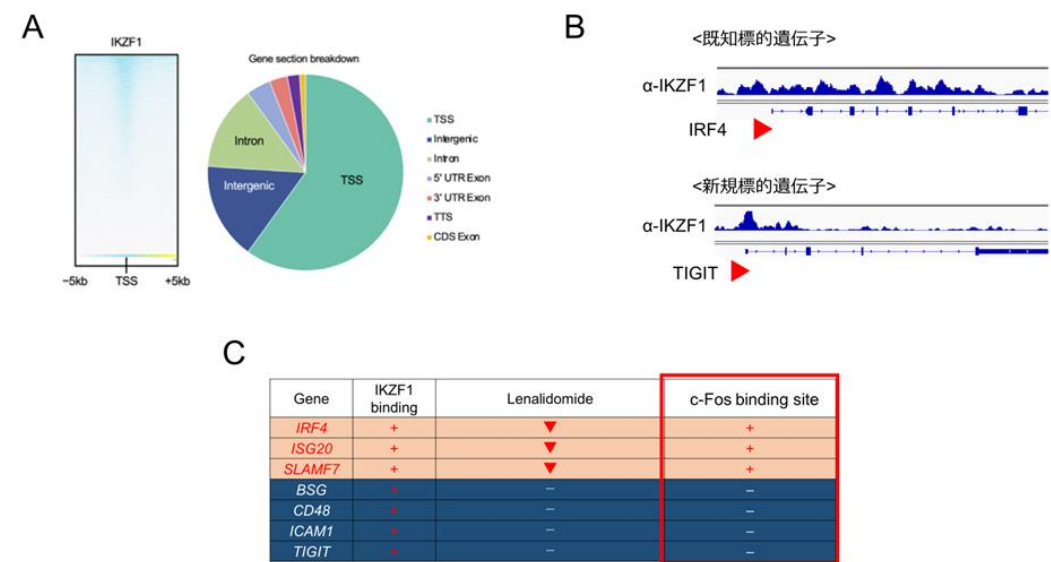


図3.抗IKZF1抗体によるChIP-Seqとレナリドマイド処理による遺伝子発現解析

(A) 転写開始点前後の 5 kb(TSS±5kb)にわたる IKZF1 ChIP-seq 解析における、(左)ヒートマップと、(右) 結合部位のセクション毎の割合を示した円グラフを示す。(B) 代表的な IKZF1 標的遺伝子の転写開始点付近の IKZF1 結合を ChIP-Atlas を用いて可視化した結果を示す。なお転写開始点 (TSS) を赤い三角で示した。(C) 骨髄腫細胞株 MM.1S に Len を添加時の遺伝子発現変化のマイクロアレイ解析における代表的な遺伝子の発現変化と、転写開始点付近の c-Fos 結合配列の有無を示した。なお赤い十字は IKZF1 が結合していることを、赤い下三角は遺伝子発現の低下を表している。

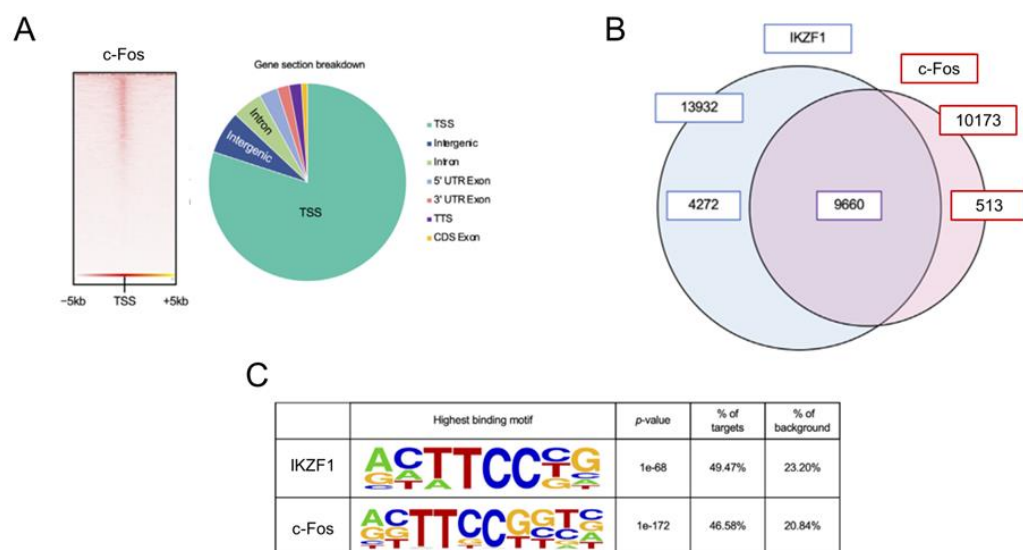


図4. 抗IKZF1および抗c-Fos抗体によるChIP-Seq解析

(A) c-Fos 抗体による ChIP-seq 解析における、転写開始点前後 5 kb (TSS \pm 5kb) にわたる (左) ヒートマップと、(右) 結合部位のセクション毎の割合を示した円グラフを示す。(B) MM.1S 細胞における IKZF1 結合部位 (n = 13932) と c-Fos 結合部位 (n = 10173) の重複を弁図で示した。(C) MM.1S 細胞の ChIP-seq 解析から見出された IKZF1 および c-Fos 結合部位のモチーフ配列と有意差検定、全結合部位における割合とバックグラウンドを示した。

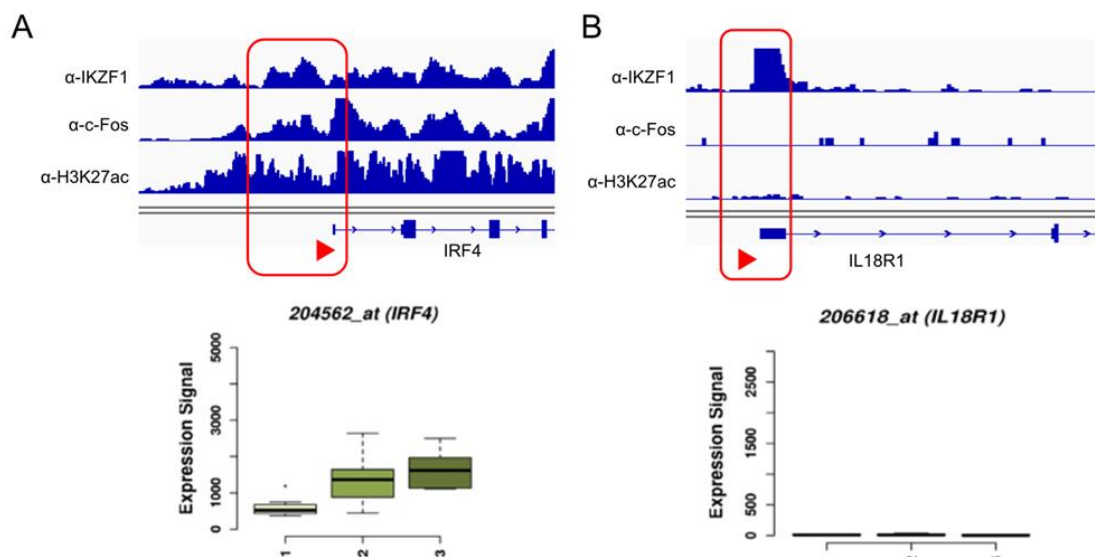


図5. プロモーター領域におけるIKZF1,c-FosおよびH3K27acの局在

(A) ChIP-Atlas を用いた IRF4 遺伝子の転写開始点付近の IKZF1 と c-Fos 結合量を可視化した結果。なお、ヒストン H3 の 27 番目のリジン残基へのアセチル化(H3K27ac)は、転写が活性化されている領域を示すコントロールであり、ピークの高い遺伝子は発現レベルが高いことを示す。下段に genomicscape データベースから(1)意義不明の単クローン性ガンマグ

ロブリン血症(MGUS)患者、(2) 初発 MM 患者、(3) 形質細胞白血病患者（それぞれ 8 症例を含む）由来の CD138 陽性細胞のマイクロアレイ解析による IRF4 遺伝子発現レベルを示す[32]。(B) 同様に、IL18R1 遺伝子の結果。

c-Fos は MM 細胞における IKZF1 標的遺伝子の転写制御に関与している

c-Fos が IKZF1 と協調して転写活性化に働く可能性が示唆されたため、c-Fos を含む AP-1 ファミリー転写因子の MM 細胞株における発現様式をイムノブロットにより解析した。その結果、c-Fos 及び c-Jun は、ほとんどの細胞株で様々なレベルで発現していたが、FOSB は少数の細胞株でのみ検出された（図 6A）。患者由来の細胞における遺伝子発現レベルの解析においても、c-Fos と c-Jun は MM 細胞において正常形質細胞や MGUS に比べて発現が亢進していた（図 6B）。

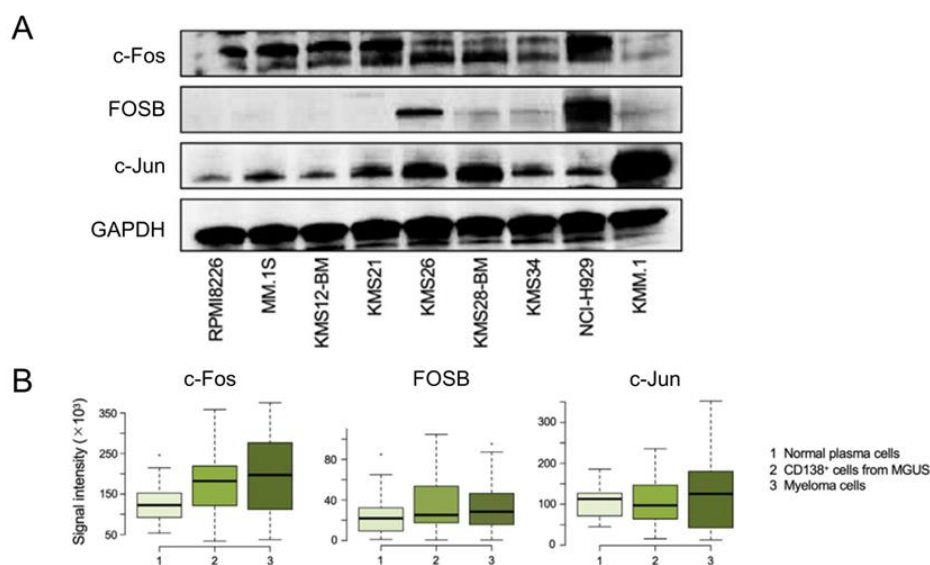


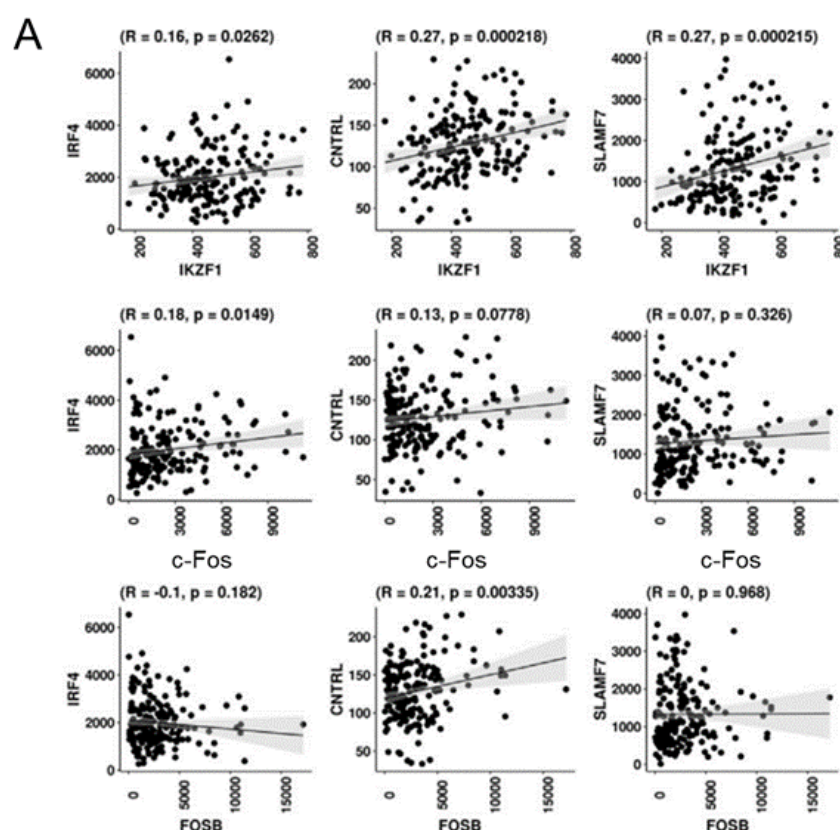
図6.MMにおけるAP-1ファミリーの発現様式

(A) MM 細胞株から調整した細胞溶解液を用いて、c-Fos、FOSB、c-Jun および GAPDH（コントロール）発現をイムノブロットにより解析した。(B) 1. 健常者（n=22）、2. MGUS 患者（n=44）、3. MM 患者（n=12）由来の CD138 陽性細胞における c-Fos、FOSB、c-Jun 遺伝子発現レベルを GenomicScape データベースに登録されているマイクロアレイデータから解析した[32]。

この結果を受け、次に c-Fos が MM 細胞における IKZF1 標的遺伝子の転写活性化に実際に関与しているかどうかを調べた。まず、患者由来の MM 細胞にお

ける遺伝子発現を GenomicScape データベースで解析したところ、IKZF1 と IRF4 発現に正の相関 ($R=0.16$, $P=0.0262$) が見られた。同様に、c-Fos と IRF4 発現レベルにも正の相関 ($R=0.18$, $P=0.0149$) が認められた (図 7A : 上段と中段)。一方、FOSB には相関は見られなかった (図 7A : 下段)。

次に MM 細胞株における c-Fos ノックダウンによる IKZF1 標的遺伝子発現への影響を検証した。その結果、予想通り、c-Fos のノックダウンは、IRF4 や SLAMF7 の発現を有意に減少させたが、BSG や CD48 のような転写調節領域に c-Fos の局在を欠く IKZF1 標的遺伝子の発現は減少させなかった (図 7B)。またノックダウン時の c-Fos の発現レベルは IRF4 および BSG の発現レベルとそれぞれ正および負の相関があった (図 7C)。これらの結果は、c-Fos が MM 細胞において IKZF1 標的遺伝子の転写を正に制御していることを示唆している。



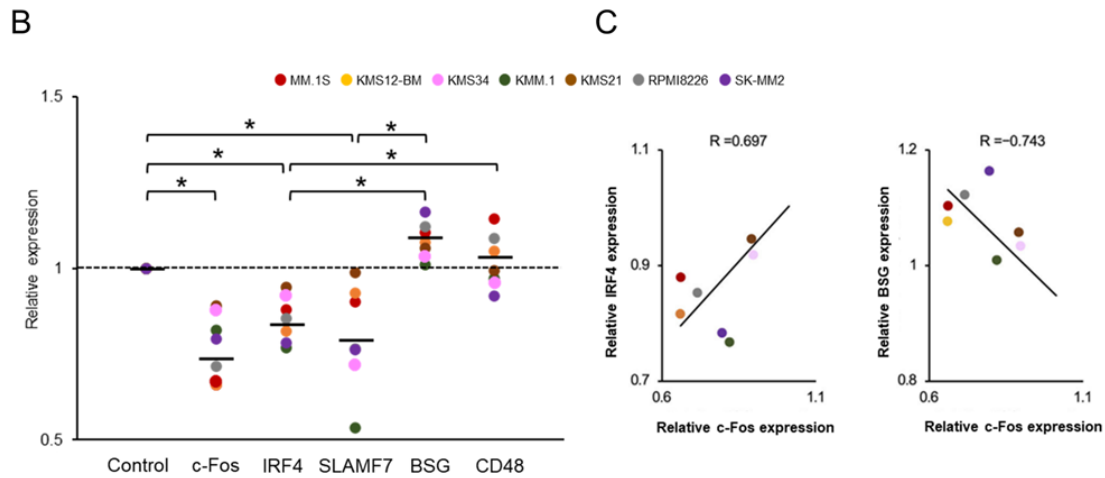


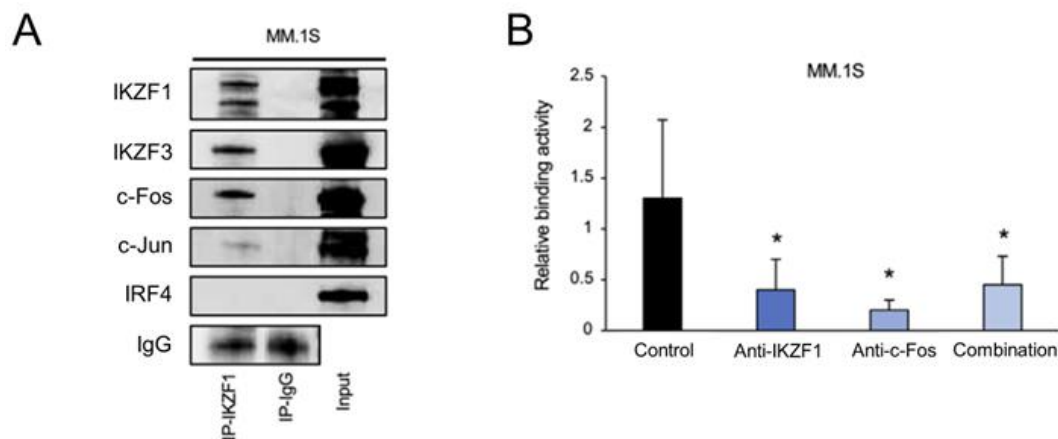
図7.c-FosノックダウンによるIKZF1標的遺伝子発現への影響

(A) GenomicScape (<http://www.genomicscape.com>) を用いて、IKZF1 (上段)、c-Fos(中段)、FOSB(下段)(横軸)と IKZF1 標的遺伝子である IRF4、CNTRL、SLAMF7 発現(縦軸)との相関性を解析した。なお、このデータは初診時に採取した MM 患者由来の細胞における遺伝子発現のマイクロアレイ解析から抽出したものである[32]。(B) shRNA による c-Fos ノックダウン時の c-Fos 及び IKZF1 標的遺伝子 (IRF4、SLAMF7、BSG および CD48) の発現量を q-PCR で解析した。データは GAPDH をコントロールに用いて $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法で解析し、sh-control を導入した細胞をコントロール(control)とした相対的発現量を示した。*は、Student's *t*-test による有意差 $p < 0.05$ を示す。(C) 複数の MM 細胞株における c-Fos ノックダウン時の q-PCR 解析結果について、c-Fos を横軸に IRF4 または BSG を縦軸にとってプロットした結果を示す。

c-Fos は MM 細胞において IKZF1 複合体の不可欠な構成要素である

これまでの結果から、IKZF1 と c-Fos が転写調節領域で複合体を形成している可能性が推察される。そこで、2つの骨髄腫細胞株、MM.1S と KMS12-BM の核抽出物を用いて IP-Western を行った。その結果、予想通り、IKZF1 抗体を用いた免疫沈降において、c-Fos が検出されたほか、複合体形成が報告されている IKZF3 及び c-Jun も検出された。一方、IRF4 は検出されなかった (図 8A)。続いて、IKZF1 と c-Fos が複合体を形成して DNA に結合しているのか、あるいは同じ領域に独立して結合しているのかをタンパク-DNA 結合アッセイにより解析した。その結果、IKZF1 抗体及び c-Fos 抗体は、それぞれ単独で IKZF 結合モチーフを

含む合成オリゴへの結合を阻害したことから、両者は複合体を形成して転写開始点付近に結合している可能性が示唆された (図 8B)。続いて、IKZF1 タンパク質のどの部位を介して c-Fos が結合しているかを調べるため、HA タグを有し異なる IKZF1 の部位からなる断片を作製、FLAG タグを付加した c-Fos とともに HEK293T 細胞に発現させた。細胞溶解液の IP-Western から、c-Fos は、IKZF1 のエクソン 5-6 とエクソン 7 からなる転写活性化に関わる部位と二量体化に関わる部位に結合する可能性が示唆された (図 8C)。一方、AlphaFold2 を用いたタンパク質間相互作用の解析結果からも、IKZF1 のエクソン 5-6 とエクソン 7 に挟まれた領域に c-Fos が結合することが示された (図 8D)。これらのデータをまとめると、c-Fos は MM 細胞において IKZF1 と直接結合し複合体を形成することが明らかとなった。



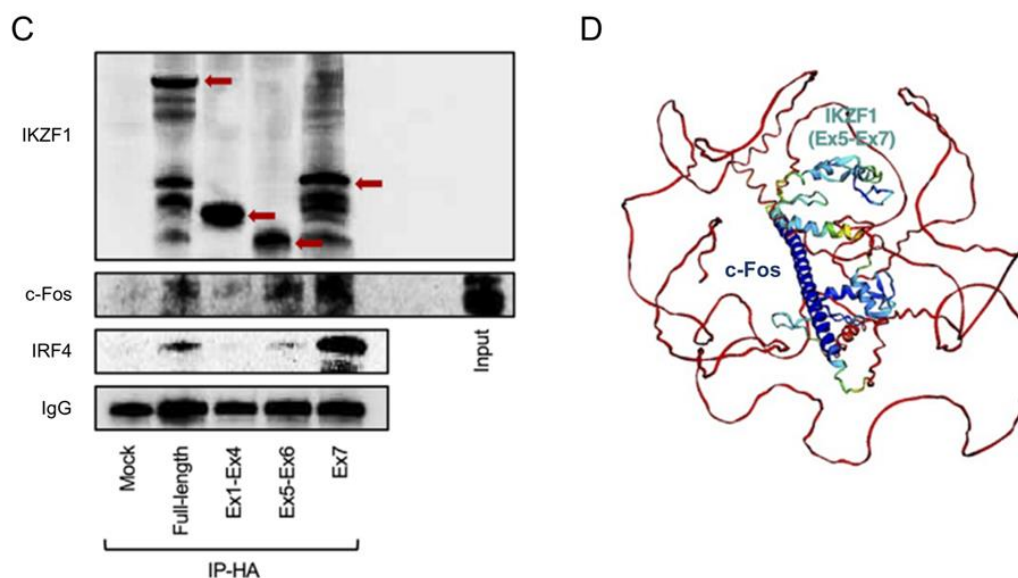


図8. MM細胞におけるIKZF1とc-Fosの結合様式

(A) MM.1S 細胞からの核抽出物を IKZF1 抗体または免疫グロブリン(IgG)で免疫沈降した。これら免疫沈降物について、IKZF1、IKZF3、c-Fos、c-Jun または IRF4 の有無をイムノブロットにより解析した。なお、Input は免疫沈降前の核抽出物。(B) IKZF 結合配列を含む合成オリゴへの IKZF1 複合体の結合量のタンパク-DNA 結合アッセイによる測定結果。IKZF1 抗体、c-Fos 抗体及び両者を添加時の測定値を抗体非添加時の値の相対値で示した[24]。

*は、Student's *t*-test による有意差 $p < 0.05$ を示す。(C) HEK293T 細胞に、空ベクター(Mock)、または IKZF1 の HA タグ付き全長 IKZF1 タンパク質(Full-length)、エクソン 1-エクソン 4 フラグメント(Ex1-Ex4)、エクソン 5-エクソン 6 フラグメント(Ex5-Ex6)、エクソン 7 フラグメント(Ex7)を FLAG タグ付き c-Fos 発現ベクターと共にトランスフェクトした。トランスフェクションから 24 時間後に核抽出物を単離、抗 HA 抗体で免疫沈降させ、続いて HA タグ抗体(IKZF1)、FLAG タグ抗体(c-Fos)、IRF4 抗体及びラビット IgG 抗体(タンパク量コントロール)でイムノブロットした。赤い矢印はトランスフェクトされた IKZF1 断片の位置を示す。(D) AlphaFold2 プログラムを用いた IKZF1-c-Fos 相互作用複合体の立体構造予測。

c-Fos の過剰発現は MM 細胞における Len 耐性と関連する

これまでの結果から、c-Fos が IKZF1 と複合体を形成し、IRF4 を含む IKZF1 標的遺伝子発現を制御していることを考えると、c-Fos の発現レベルが MM 細胞の Len 感受性に影響を与えている可能性が考えられた[6, 7]。そこで、この仮説を立証するために、MM.1S および KMS12-BM 細胞で c-Fos を過剰発現させ、Len

に対する感受性の変化を解析した。その結果、c-Fos の過剰発現は、予想通り IRF4 の発現低下を阻害すると共に (図 9 : 左)、Len の増殖抑制作用を有意に阻害した [33] (図 9 : 右)。

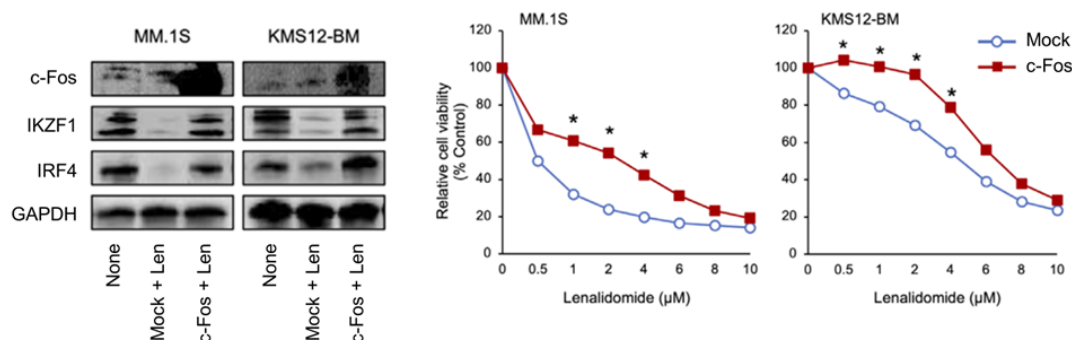


図9.MM細胞におけるc-Fos過剰発現によるLenへの影響

MM.1S および KMS12-BM 細胞に c-Fos 発現ベクターまたは空ベクター (Mock) をトランスフェクト、2.5 μ M の Len で 24 時間処理した後のイムノブロット解析結果(左)。MM.1S および KMS12-BM 細胞に c-Fos 発現ベクターまたは空ベクター (Mock) をトランスフェクトした後、Len を添加し 72 時間後の細胞生存率の濃度依存曲線を示す。細胞生存率は、Cell Counting Kit (Fujifilm Wako Biochemicals) を用いた MTT アッセイにより解析した。グラフは 3 回の独立した実験の平均値を示す。*は、Student's *t*-test による有意差 $p < 0.05$ を示す。

図 7 および図 9 で c-Fos 発現の増減により、IRF4 発現が変化したことから、次に c-Fos - IKZF1 複合体の IRF4 発現制御機構について解析した。TRANSFAC 解析によると、IRF4 プロモーター領域には 10 個の IKZF1 結合サイトと 1 個の c-Fos 結合サイトが検出された。ChIP-Atlas 解析によると、IKZF1 結合サイト 4-9 には IKZF1 と c-Fos 結合が認められた (図 10A)。続いて、ChIP アッセイを行うと、Len は結合サイト 4-9 への IKZF1 の量を約 20%まで有意に減少させた (図 10B : グレーバー)。しかしながら、同じ部位への c-Fos 結合量は増加していた (図 10B : ピンクバー)。なお、同様な結果は、SLAMF7 遺伝子の転写開始点付近でも観察された (図 10C&D)。一方、Len 2.5 μ M 添加時の KMS12-BM 細胞の生存率は 70%までしか低下しておらず (図 9 : 右図)、IKZF1 のゲノムへの結合量低下との間の不一致が、c-Fos 結合増加による IRF4 転写維持による可能性が示唆される。この仮説を裏付けるように、Len 添加時の IRF4 発現は mRNA およ

びタンパク質レベル共に 80%程度までしか減少しなかった (図 10E)。

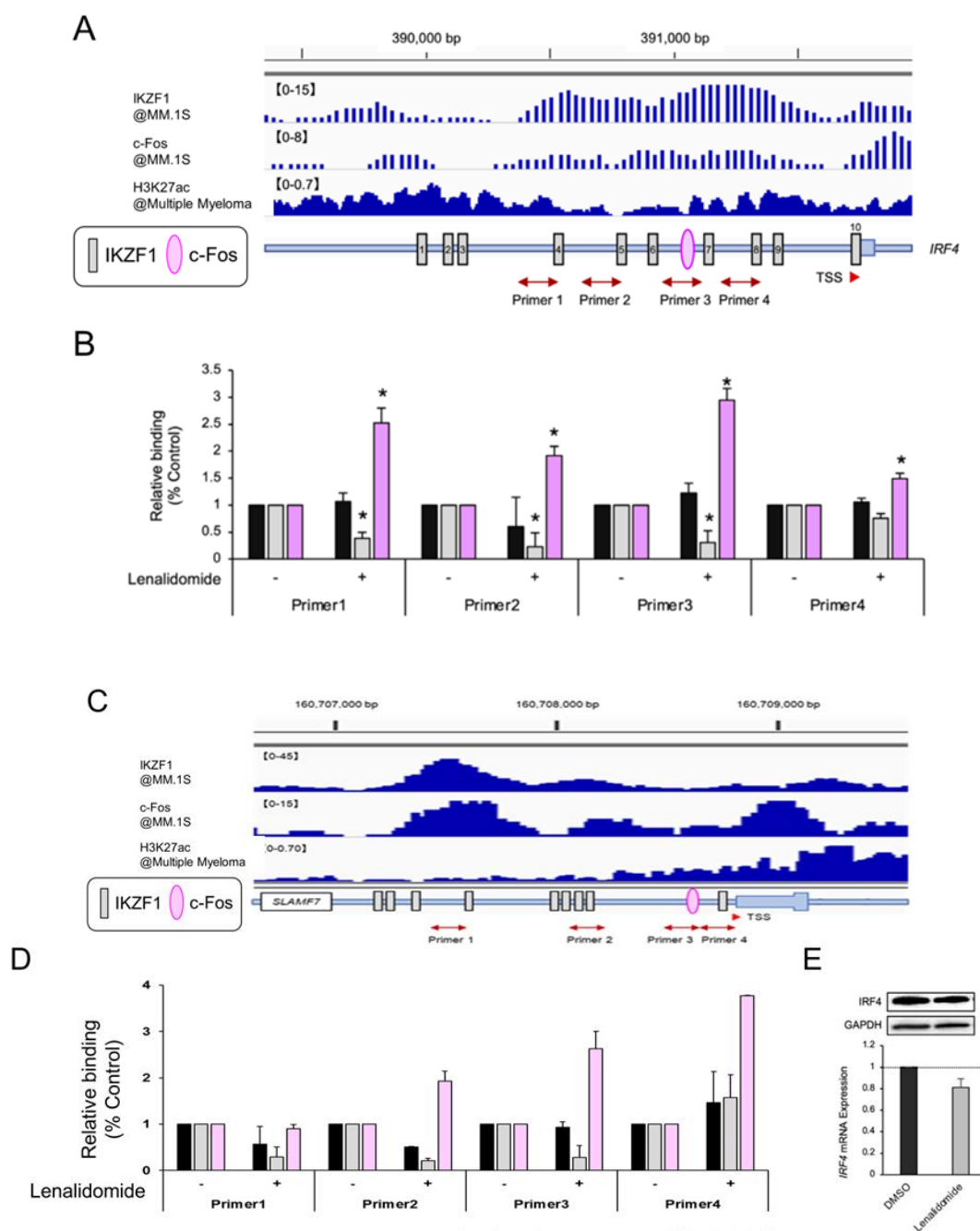


図 10. c-FosはMM細胞におけるLen耐性を誘導

(A) ChIP-atlas で作成した IRF4 プロモーター領域の IKZF1 及び c-Fos 結合を可視化した結果の拡大図と TRANSFAC によって推測された IKZF1(グレー)及び c-Fos (ピンク)結合部位を示す。TSS は転写開始点を双方向赤矢印は ChIP アッセイで PCR 増幅する領域を示す。

(B) DMSO または Len (2.5 μ M) で 24 時間培養した KMS12-BM 細胞からクロマチン懸濁液を調製し、抗 IKZF1 抗体 (グレーバー) および c-Fos 抗体 (ピンクバー) または IgG (ブ

ラックバー) で免疫沈降させた。得られた沈殿物を上段に示したプライマーを用いて q-PCR 解析した。いずれも Len 非添加時をコントロールとした相対値を示した。*は、Student's *t*-test による有意差 $p < 0.05$ を示す。(C) ChIP-atlas で作成した SLAMF7 プロモーター領域の IKZF1 及び c-Fos 結合を可視化した結果の拡大図と TRANSFAC によって推測された IKZF1(グレー)及び c-Fos (ピンク)結合部位を示す。TSS は転写開始点を、双方向赤矢印は ChIP アッセイで PCR 増幅する領域を示す。(D) DMSO または Len ($2.5 \mu\text{M}$) で 24 時間培養した KMS12-BM 細胞からクロマチン懸濁液を調製し、抗 IKZF1 抗体 (グレーバー) および c-Fos 抗体 (ピンクバー) または IgG (ブラックバー) で免疫沈降させた。得られた沈殿物を上段に示したプライマーを用いて q-PCR 解析した。いずれも Len 非添加時をコントロールとした相対値を示した。*は、Student's *t*-test による有意差 $p < 0.05$ を示す。(E) DMSO または Len ($2.5 \mu\text{M}$) で処理した KMS12-BM 細胞における IRF4 発現のイムノブロット解析結果と q-PCR による遺伝子発現解析結果。

そこで Len 耐性における c-Fos の役割を調べるため Len 耐性細胞株 (NCI-H929LR) を樹立した。予想通り耐性株では親株と比べ、タンパクおよび mRNA レベルで c-Fos および IRF4 の発現が増加していた (図 11)。これらの結果から、c-Fos は Len 耐性に関与しており、耐性化を克服するための治療標的といえる。

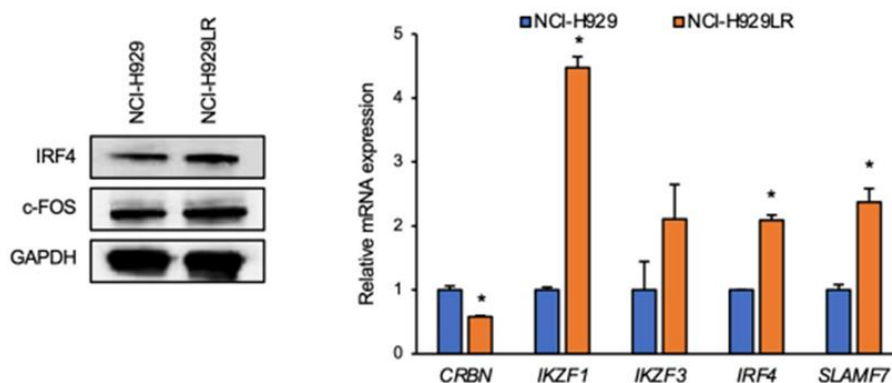


図 11. Lenalidomide耐性細胞株における各遺伝子発現様式

MM 細胞株 NCI-H929 の親株(NCI-H929)と Len 耐性株 (NCI-H929LR) の発現様式。左 : イムノブロットによる IRF4 と c-Fos 発現解析結果。右 : q-PCR による IKZF1/3、IRF4 及び SLAMF7 発現解析結果。

c-Fos の阻害は *in vitro* における Len の抗骨髄腫活性を増強する

これまでの結果から Len 耐性化に c-Fos が関与する可能性が示唆されたことから、c-Fos 阻害が Len 感受性を増強させるかどうかを検討した。まず、shRNA による c-Fos ノックダウンに Len を添加したところ、MM.1S 細胞および KMS12-BM 細胞の両者において、IRF4 遺伝子発現低下を伴った細胞生存率低下の有意な増強が観察された (図 11A)。次に、c-Fos ノックダウンの代わりに c-Fos 阻害作用を有する AP-1 阻害剤 T-5224 を用いて同様の実験を行った[34]。すると、T-5224 単独では MM 細胞の IRF4 の発現や細胞生存率に与える影響は軽微であったが、Len との併用時は両細胞株に対して IRF4 発現と細胞生存率の低下を有意に増強した (図 11B)。

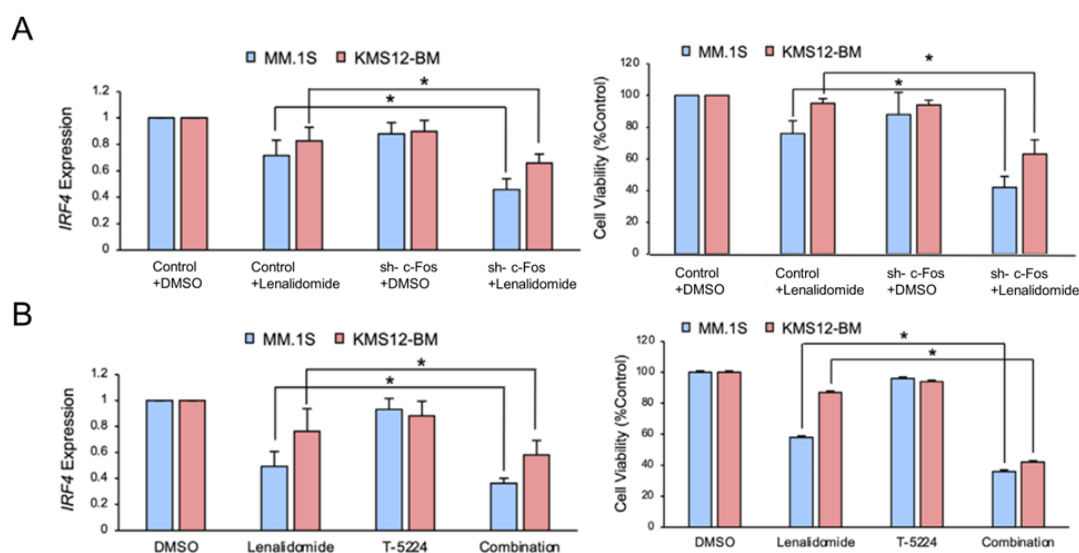


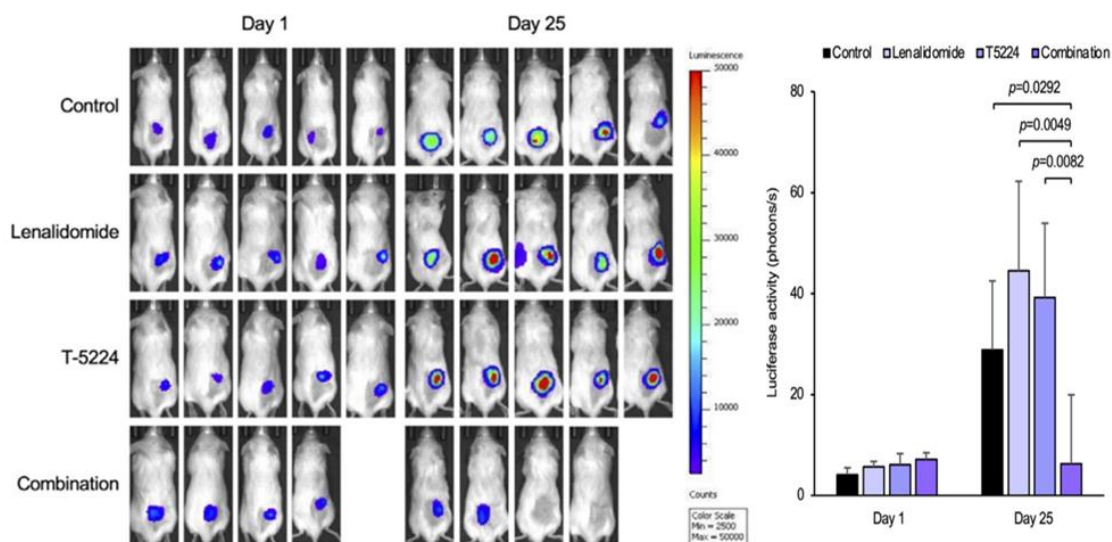
図12. 骨髄腫細胞に対するLenとAP-1阻害剤の併用効果 (*in vitro*)

(A) MM.1S 細胞および KMS12-BM 細胞に sh-Fos または sh-control を導入し、DMSO または Len ($10 \mu\text{M}$) を添加、24 時間後の IRF4 発現の q-PCR 解析結果(左)、MTT アッセイによる細胞生存率の解析結果(右)。(B) MM.1S および KMS12-BM 細胞を DMSO、Len ($10 \mu\text{M}$)、T-5224 ($20 \mu\text{M}$)、または Len と T-5224 の両者を添加、24 時間後の IRF4 発現の q-PCR 解析結果(左)、MTT アッセイによる細胞生存率の解析結果(右)。なお、いずれの結果も DMSO 添加時に対する相対値を示した。データは、独立した 3 回の実験の平均値 (S.D.) を示した。*は、Student's *t*-test による有意差 $p < 0.05$ を示す。

AP-1 阻害剤が *in vivo* における Len の抗骨髄腫活性を増強する

In vitro での結果を受け、マウスモデルを用いて Len と T-5224 の併用効果を確認した[25-28]。ルシフェラーゼ発現株 (MM.1S-Luc) を NOD/SCID マウス皮下に移植した異種移植モデルに対して、DMSO 単独、T-5224 単独、Len 単独、または Len と T-5224 両者を併用して治療した。その結果、Len と T-5224 の併用は、ルシフェラーゼ活性 (図 12A) および 25 日目に摘出した腫瘍の重量 (図 12B) から明らかなように、増殖を有意に抑制した。一方、T-5224 または Len 単独では、この実験で使用した投与量とスケジュールでは有意な効果は得られなかった。引き続き、マウスの生存率に与える影響について、異なる細胞株(KMS26-Luc)を尾静脈より移植し、MM 患者と同様、骨髄内に生着する異種移植モデルを用いて検討した。IVIS により骨髄への生着を確認した後、マウスを 4 群 (n=5) に分け、DMSO 単独、T-5224 単独、Len 単独、または Len と T-5224 の併用による治療を開始した。図 12C に示すように、2 剤の併用は単独治療群と比較して有意に生存期間を延長させたが、Len または T-5224 による単剤治療では、コントロールに対して有意な生存期間延長効果は得られなかった。

A



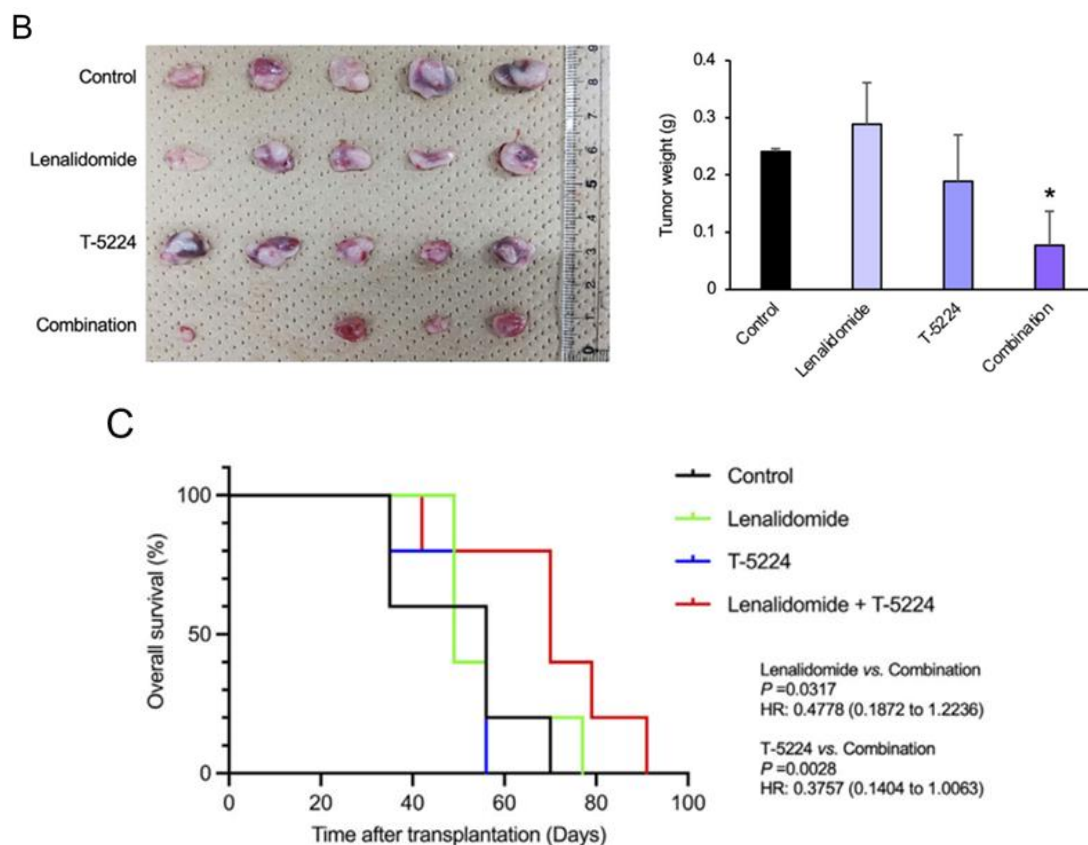


図13. 骨髄腫細胞に対するLenとAP-1阻害剤の併用効果(*in vivo*)

(A) ルシフェラーゼを発現する MM.1S 細胞を NOD/SCID マウス皮下に移植した (1×10^6 個/マウス)。移植した骨髄腫細胞の生着が確認できた時点で (1 日目と定義)、Control (0.9% NaCl、週 2 回)、20mg/kg の T-5224 (週 2 回)、10mg/kg の Len (週 2 回)、または T-5224 と Len の併用 (20mg/kg の T-5224 と 10mg/kg の Len、週 2 回) を 2 週間腹腔内投与した。左図：1 日目と 25 日目のマウス写真。右図：1 日目と 25 日目の IVIS によるルシフェラーゼ活性測定値 (photons/s) の平均値 \pm S.D.を示した。p-値は、Student's *t*-test を用いた。(B) 左図：25 日目に切除された腫瘍組織の写真。右図：腫瘍重量の平均 \pm S.D.。p-値は、Student's *t*-test を用いた。(C) ルシフェラーゼを発現する KMS26 細胞 (1×10^6 個/マウス) を尾静脈より NOD/SCID マウスに移植した。14 日目に移植細胞の骨髄への生着を確認した後、マウスを、Control (0.9% NaCl、週 3 回)、20 mg/kg の T-5224 (週 3 回)、10 mg/kg の Len (週 3 回)、または T-5224 と Len の併用 (20 mg/kg の T-5224 と 10 mg/kg の Len、週 3 回) の 4 群 (n=5) に分け、それぞれ 3 週間腹腔内に投与した。マウス生存率のカプランマイヤー曲線を示す。p 値およびハザード比 (95%信頼区間) は、併用投与群 (赤) と Len 単独投与群 (緑) または T-5224 単独投与群 (青) との間で log-rank 検定により算出した。Control 群と Len 単独治療群または T-5224 単独治療群との間に有意差は認められなかった。

考察

本研究において我々は、バイオインフォマティクスの手法から得た知見に、生物学的アプローチを加えることにより、AP-1 ファミリー転写因子 c-Fos が IKZF1 複合体の構成要素であり、MM 細胞において IKZF1 の転写能を活性化へシフトさせることで、細胞の生存と薬剤耐性獲得に働くことを明らかにした。

ChIP シークエンスの結果から、c-Fos と IKZF1 は多くの遺伝子を共通の標的とし、MM の biology に深く関与する IRF4、BCL2、MCL1 等の転写開始点付近に共局在していた。また、Len 耐性株では c-Fos と IRF4 発現が亢進しており（図 11）、c-Fos 強発現は IRF4 発現を介して Len 抵抗性を示した（図 9：右）。

AP-1 ファミリー転写因子は、FOS（c-Fos、FOSB、FRA-1、FRA-2）、JUN（c-Jun、JUNB、JUND）、ATF、MAF のサブファミリーに分類され、その多くは複合体を形成して転写調節を行うが、このうち c-Fos/c-Jun 二量体は代表的な複合体である[19, 20]。これら AP-1 ファミリーは、MM を含む様々な細胞の増殖、分化、細胞死を制御している[20]。MM では、c-Fos/c-Jun 活性が MM 細胞の生存に関わる転写ネットワークにおける中心的な役割も示唆されている[35]。一方、Fan らも、JUNB が骨髄微小環境における MM 細胞の増殖、生存における役割や薬剤耐性を促進する作用を[36, 37]、Ohguchi らは、c-Fos がヒストン脱メチル化酵素(KDM6B)-MAP キナーゼ経路の下流で MM 細胞の増殖と生存に重要な因子であることを[38]、それぞれ報告している。さらに Liu らはシングルセル解析を用いて、MM 患者において c-Fos や c-Jun の発現が亢進するサブグループを見出している[39]（図 14A）。この報告では c-Fos 発現の亢進が BCL2 や MCL1 などの発現亢進を介して、薬剤耐性と再発に関わっている可能性が示された（図 14B）。

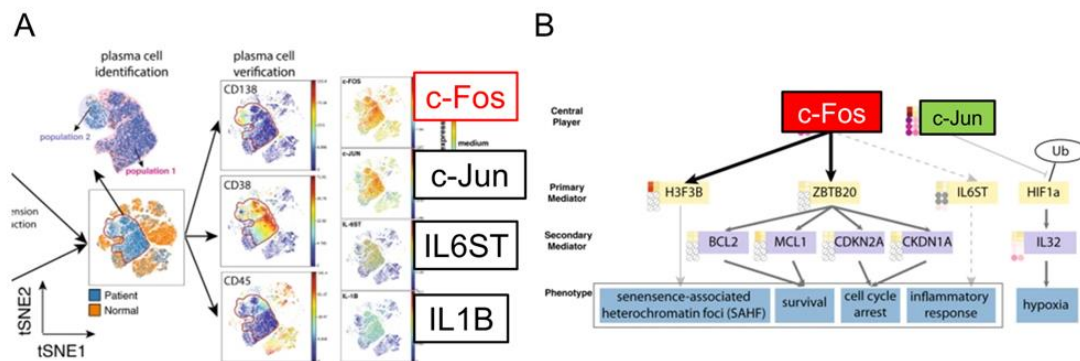


図14. RRMMにおけるc-Fos発現サブクローンと薬剤耐性のメカニズム

(A) 再発難治性骨髄腫患者（RRMM）の CyTOF 解析結果。骨髄腫細胞を含む CD138 及び CD38 陽性細胞で、c-Fos、c-Jun、IL6ST 発現が亢進するサブグループが示されている(文献 39 より引用)。(B) c-Fos による薬剤耐性獲得機序(文献 39 より引用)。

これまでの知見と、本研究で見出された c-Fos の役割を考慮すると、Len 治療による IKZF1/IKZF3 の分解だけでは、IRF4 の発現低下と細胞死誘導効果が不十分と考えられ、c-Fos 発現の亢進が耐性化と再発の一因となっている可能性が示唆される（図 15）。

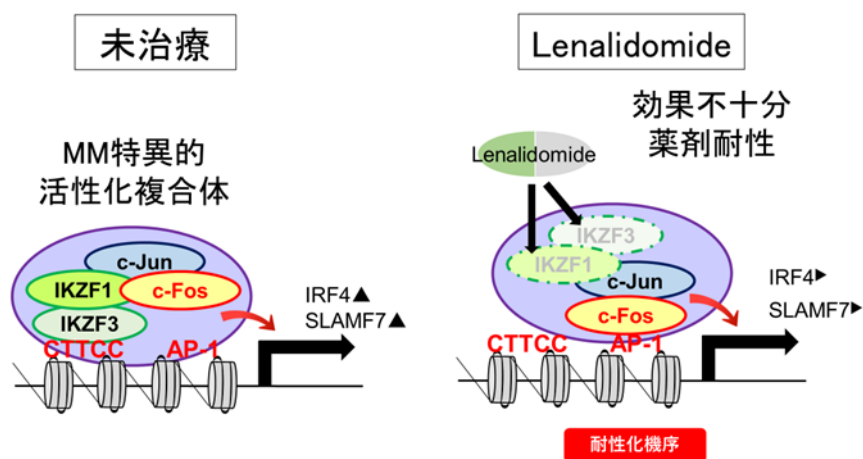


図15. Len耐性機序の模式図

MM 特異的転写活性化複合体と Len 耐性獲得機序の模式図。IKZF 複合体は、IRF4 や SLAMF7 など MM 細胞の増殖と生存に関与する遺伝子のプロモーター領域の IKZF 結合モチーフ CTTCC に結合する。しかしながら、Len によって IKZF1/IKZF3 が分解されると、c-Fos が近傍に存在する AP-1 結合配列に結合、発現の維持に働いた結果、Len 耐性がもたらされる。

また、本研究結果から c-Fos がハイリスク染色体異常を有する MM の予後悪化に関与している可能性も示唆される。特に、t(4;14)を有する症例では、転座に伴いヒストンメチル化酵素 MMSET/NSD2 が過剰発現し[40]、転写活性化に働くヒストン修飾である H3K36 へのメチル化亢進を介して IRF4 と SLAMF7 発現に寄与する可能性が報告されている[41, 42]。また、t(4;14)を有する症例は Len 抵抗性となりやすいことから[43, 44]、MMSET に加えて c-Fos の発現亢進が下流にある IRF4 などの発現を亢進させて耐性獲得に働く可能性が示唆される (図 16)。実際に Annunziata らは、t(4;14)陽性 MM 細胞における MMSET のノックダウンが、IRF4 だけでなく c-Fos 発現も低下させることを示している[45]。したがって、t(4;14)を有する症例では、MMSET と c-Fos 経路の活性化が IRF4 など下流の遺伝子の発現を維持、その結果、Len を含む薬剤耐性を獲得し予後が悪化する機序の存在が示唆される。

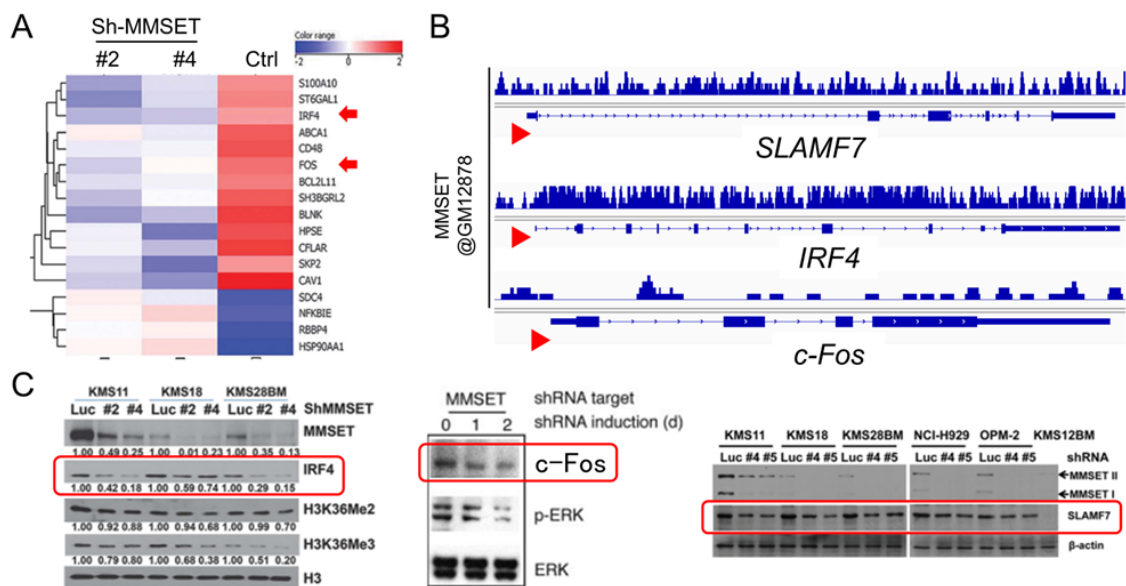


図16. 高リスク患者[t(4;14)]におけるMMSET - c-Fos経路

(A)MMSET ノックダウンのマイクロアレイ結果 (文献 41 より引用)。sh-MMSET#2 および sh-MMSET#4 はそれぞれ異なる標的配列が用いられている。(B) ChIP-atlas により各遺伝子のプロモーター領域の H3K36 メチル化レベルを可視化した。(C) MMSET ノックダウン時の MMSET、IRF4、c-Fos、SLAMF7 発現と H3K36 メチル化レベルを免疫ブロットで解析した結果 (文献 41、42、45 より引用改変)。sh-Luc はコントロールとして用いられ、sh-MMSET#2、sh-MMSET#4、sh-MMSET#4、sh-MMSET#5 はそれぞれ異なる標的配列が用いら

れている。

このように、c-Fos はハイリスク染色体異常を有する症例を含む Len 耐性例に対する有効な治療標的分子として期待される。したがって、AP-1 阻害剤には、Len の殺細胞効果の増強と、Len 耐性を克服する可能性が示唆される(図 17A)。事実、本研究においても、AP-1 阻害剤 T-5224 が、in vitro および 2 つのマウスモデルにおいて、Len の抗 MM 活性を有意に増強することを明らかにした (図 11 & 12)。なお、T-5224 は米国で臨床試験が進められており、第 I 相試験では重篤な副作用がないことが確認され、現在、関節リウマチや炎症性疾患患者を対象に第 II 相試験が進められており[34]、今後、MM への応用が期待される。

以上より、c-Fos は MM 細胞において IKZF1 と転写活性化複合体を形成し、多剤耐性獲得に関与する可能性が明らかになった。AP-1 ファミリーを標的とした治療が、多剤耐性を獲得した再発難治性 MM の予後改善に有効なアプローチとして期待される (図 17B)。

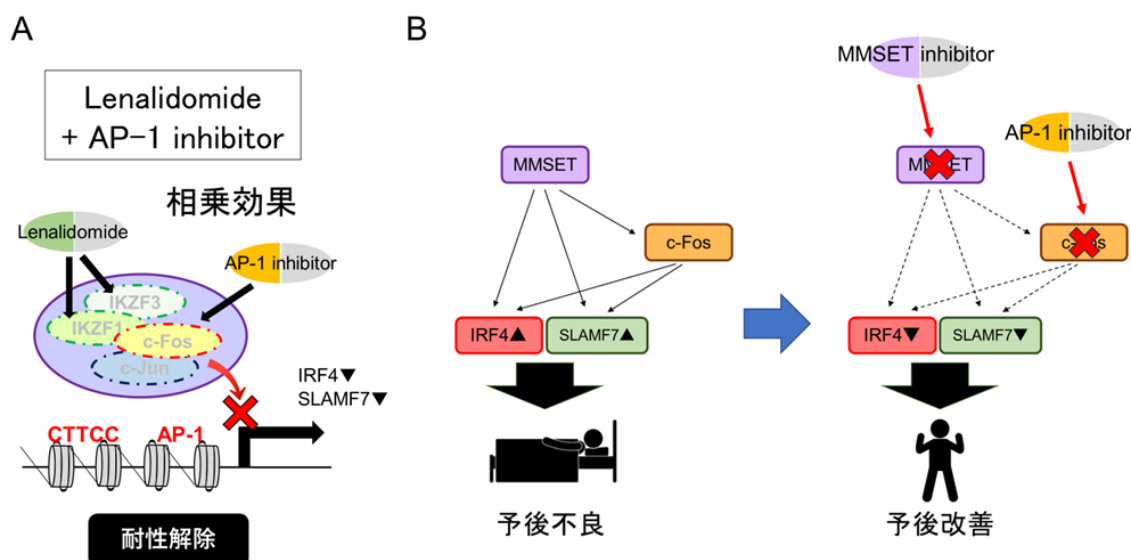


図17. Len耐性解除機序および多剤耐性獲得再発難治性MMに対する治療戦略の模式図

(A) Len と AP-1 阻害剤 T-5224 の併用による IRF4 発現低下の増強が、Len の抗 MM 効果の増強と Len 耐性克服に働く。(B) T-5224 の臨床応用によって、ハイリスク症例を含む Len 耐性例など再発難治性患者の予後改善効果が期待できる。

文 献

1. Furukawa Y, Kikuchi J. Molecular basis of clonal evolution in multiple myeloma. *Int. J. Hematol.* 111: 496-511. 2020.
2. Suzuki K. Latest treatment strategies aiming for a cure in transplant-eligible multiple myeloma patients: how I cure younger MM patients with lower cost. *Int. J. Hematol.* 111: 512-518. 2020.
3. Leleu X, Martin T, Weisel K, Schjesvold F, Iida S, Malavasi F, Manier S, Min CK, Ocio EM, Pawlyn C, Perrot A, Quach H, Richter J, Spicka, Yong K, Richardson PG. Anti-CD38 antibody therapy for patients with relapsed/refractory multiple myeloma: differential mechanisms of action and recent clinical trial outcomes. *Ann. Hematol.* 101: 2123-2137. 2022.
4. Holstein SA, Suman VJ, McCarthy PL. Update on the role of lenalidomide in patients with multiple myeloma. *Ther. Adv. Hematol.* 9: 175-190. 2018.
5. Moreau P, Zamagni E, Mateos M-V. Treatment of patients with multiple myeloma progressing on frontline-therapy with lenalidomide. *Blood Cancer J.* 9: 38. 2019.
6. Ito T, Yamaguchi Y, Handa H. Exploring ubiquitin ligase cereblon as a target for small-molecule compounds in medicine and chemical biology. *Cell Chem. Biol.* 28: 987-999. 2021.
7. Bjorklund CC, Lu L, Kang J, Hagner PR, Havens CG, Amatangelo M, Wang M, Ren Y, Couto S, Breider M, Ning Y, Gandhi AK, Daniel TK, Chopra R, Klippel A, Thakurta AG. Rate of CRL4^{CRBN} substrate Ikaros and Aiolos degradation underlies differential activity of lenalidomide and pomalidomide in multiple myeloma cells by regulation of c-Myc and IRF4. *Blood Cancer J.* 5: e354. 2015.
8. Ikeda S, Kitadate A, Abe F, Saitoh H, Michishita Y, Hatano Y, Kawabata Y, Kitabayashi A, Teshima K, Kume M, Takahashi N, Tagawa H. Hypoxia-inducible microRNA-210 regulates the DIMT1-IRF4 oncogenic axis in multiple myeloma. *Cancer Sci.* 108: 641-652. 2017.
9. Gooding S, Ansari-Pour N, Towfic F, Estévez MO, Chamberlain PP, Tsai KT, Flynt E, Hirst M, Rozelle D, Dhiman P, Neri P, Ramasamy K, Bahlis N, Vyas P, Thakurta A. Multiple cereblon genetic changes are associated with acquired resistance to lenalidomide or pomalidomide in multiple myeloma. *Blood.* 137; 232-237. 2021.
10. Haertle L, Barrio S, Munawar U, Han S, Zhou X, Vogt C, Fernández RA, Bittrich M, Heredia YR, Viá MD, Zovko J, Trojaola AG, Bolli N, Ruckdeschel A, Stühmer T, Chatterjee M, Kull M, Krönke J, Agirre X, Martin-Subero JI, Raab P, Einsele H, Rasche L, Martinez-Lopez J, Haaf T, Kortüm KM. Cereblon enhancer methylation and IMiDs resistance in multiple myeloma. *Blood.* 138: 1721-1726. 2021.

11. Jones JR, Barber A, Bihan Y-V Le, Weinhold N, Ashby C, Walker BA, Wardell CP, Wang H, Kaiser MF, Jackson GH, Davies FE, Chopra R, Morgan GJ, Pawlyn C. Mutations in CRBN and other cereblon pathway genes are infrequently associated with acquired resistance to immunomodulatory drugs. *Leukemia*. 35: 3017-3020. 2021.
12. John LB, Ward AC. The Ikaros gene family: Transcriptional regulators of hematopoiesis and immunity. *Mol. Immunol.* 48: 1272-1278. 2011.
13. Georgopoulos K. The making of a lymphocyte: the choice among disparate cell fates and the IKAROS enigma. *Genes Dev.* 31: 439-450. 2017.
14. Ding Y, Zhang B, Payne JL, Song C, Ge Z, Gowda C, Iyer S, Dhanyamraju PK, Dorsam G, Reeves ME, Desai D, Huang S, Payne KJ, Yue F, Dovat S. Ikaros tumor suppressor function includes induction of active enhancers and super-enhancers along with pioneering activity. *Leukemia*. 33: 2720-2731. 2019.
15. Heizmann B, Kastner P, Chan S. The Ikaros family in lymphocyte development. *Curr. Opin. Immunol.* 51: 14-23. 2018.
16. Lopez-Girona A, Heintel D, Zhang LH, Mendy D, Gaidarova S, Brady H, Bartlett SB, Schafer PH, Schreder M, Bolomsky A, Hilgarth B, Zojer N, Gisslinger H, Ludwig H, Daniel T, Jäger U, Chopra R. Lenalidomide downregulates the cell survival factor, interferon regulatory factor-4, providing a potential mechanistic link for predicting response. *Br. J. Haematol.* 154: 325–336. 2011.
17. Zhu YX, Braggio E, Shi CX, Kortuem KM, Bruins LA, Schmidt JE, Chang XB, Langlais P, Luo M, Jedlowski P, LaPlant B, Laumann K, Fonseca R, Bergsagel PL, Mikhael J, Lacy M, Champion MD, Stewart AK. Identification of cereblon-binding proteins and relationship with response and survival after IMiDs in multiple myeloma. *Blood*. 124: 536-545. 2014.
18. Fedele PL, Willis SN, Liao Y, Low MS, Rautela J, Segal DH, Gong JN, Huntington ND, Shi W, Huang DCS, Grigoriadis G, Tellier J, Nutt SL. IMiDs prime myeloma cells for daratumumab-mediated cytotoxicity through loss of Ikaros and Aiolos. *Blood*. 132: 2166-2178. 2018.
19. Bejjani F, Evanno E, Zibara K, Piechaczyk M, Jariel-Encontre I. The AP-1 transcriptional complex: Local switch or remote command? *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*. 1872: 11-28. 2019.
20. Fan F, Podar K. The role of AP-1 transcription factor in plasma cell biology and multiple myeloma pathophysiology. *Cancers*. 13: 2326. 2021.
21. Koyama D, Kikuchi J, Kuroda Y, Ohta M, Furukawa Y. AMP-activated protein kinase activation primes cytoplasmic translocation and autophagic degradation of the BCR-ABL protein in CML

- cells. *Cancer Sci.* 112: 194-204. 2021.
22. Saito S, Kikuchi J, Koyama D, Sato S, Koyama H, Osada N, Kuroda Y, Akahane K, Inukai T, Umehara T, Furukawa Y. Eradication of central nervous system leukemia of T-cell origin with a brain-permeable LSD1 inhibitor. *Clin. Cancer Res.* 25: 1601-1611. 2019.
 23. Zhou X, Medina S, Bolt AM, Zhang H, Wan G, Xu H, Lauer FT, Wang SH, Burchiel SW, Liu KJ. Inhibition of red blood cell development by arsenic-induced disruption of GATA-1. *Sci. Rep.* 10: 19055. 2020.
 24. Molnár Á, Georgopoulos K. The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* 14: 8292-8303. 1994.
 25. Kikuchi J, Koyama D, Wada T, Izumi T, Hofgaard PO, Bogen B, Furukawa Y. Phosphorylation-mediated EZH2 inactivation promotes drug resistance in multiple myeloma. *J Clin Invest.* 125: 4375-4390. 2015.
 26. Kikuchi J, Kuroda Y, Koyama D, Osada N, Izumi T, Yasui H, Kawase T, Ichinohe T, Furukawa Y. Myeloma cells are activated in bone marrow microenvironment by the CD180/MD-1 complex which senses lipopolysaccharide. *Cancer Res.* 78: 1766-1778. 2018.
 27. Kikuchi J, Kodama N, Takeshita M, Ikeda S, Kobayashi T, Kuroda Y, Uchiyama M, Osada N, Bogen B, Yasui H, Takahashi N, Miwa A, Furukawa Y. EMD originates from hyaluronan-induced homophilic interactions of CD44 variant-expressing MM cells under shear stress. *Blood Adv.* 7: 508-524. 2023.
 28. Kikuchi J, Hori M, Iha H, Toyama-Sorimachi N, Hagiwara S, Kuroda Y, Koyama D, Izumi T, Yasui H, Suzuki A, Furukawa Y. Soluble SLAMF7 promotes the growth of myeloma cells via homophilic interaction with surface SLAMF7. *Leukemia.* 34: 180-195. 2020.
 29. Eichner R, Heider M, Fernández-Sáiz V, Bebbber FV, Garz AK, Lemeer S, Rudelius M, Targosz BS, Jacobs L, Knorn AM, Slawska J, Platzbecker U, Germing U, Langer C, Knop S, Einsele H, Peschel C, Haass C, Keller U, Schmid B, Götze KS, Kuster B, Bassermann F. Immunomodulatory drugs disrupt the cereblon-CD147-MCT1 axis to exert antitumor activity and teratogenicity. *Nat. Med.* 22: 735-743. 2016.
 30. Oki S, Ohta T, Shioi G, Hatanaka H, Ogasawara O, Okuda Y, Kawaji H, Nakaki R, Sese J, Meno C. ChIP-Atlas: a data-mining suite powered by full integration of public ChIP-seq data. *EMBO Rep.* 19: e46255. 2018.
 31. Osada N, Kikuchi J, Koyama D, Kuroda Y, Yasui H, Levenson JD, Furukawa Y. mTOR inhibitors sensitize multiple myeloma cells to venetoclax via IKZF3- and Blimp-1-mediated BCL-2 upregulation. *Haematologica.* 106: 3008-3013. 2021.

32. Kassambara A, Réme T, Jourdan M, Fest T, Hose D, Tarte K, Klein B. GenomicScape: An easy-to-use web tool for gene expression data analysis. Application to investigate the molecular events in the differentiation of B cells into plasma cells. *PLoS Comput. Biol.* 11: e1004077. 2015.
33. Yang L, Luo Y, Wei J. Integrative genomic analyses on Ikaros and its expression related to solid cancer prognosis. *Oncol. Rep.* 24: 571-577. 2010.
34. Ye N, Ding Y, Wild C, Shen Q & Zhou J. Small molecule inhibitors targeting activator protein 1 (AP-1). *J. Med. Chem.* 57: 6930-6948. 2014.
35. Miannay B, Minvielle S, Roux O, Drouin P, Avet-Loiseau H, Guérin-Charbonnel C, Gouraud W, Attal M, Facon T, Munshi NC, Moreau P, Campion L, Magrangeas F, Guziolowski C. Logic programming reveals alteration of key transcription factors in multiple myeloma. *Sci. Rep.* 7: 9257. 2017.
36. Fan F, Bashari MH, Morelli E, Tonon G, Malvestiti S, Vallet S, Jarahian M, Seckinger A, Hose D, Bakiri L, Sun C, Hu Y, Ball CR, Glimm H, Sattler M, Goldschmidt H, Wagner EF, Tassone P, Jaeger D, Podar K. The AP-1 transcription factor JunB is essential for multiple myeloma cell proliferation and drug resistance in the bone marrow microenvironment. *Leukemia.* 31: 1570-1581. 2017.
37. Fan F, Malvestiti S, Vallet S, Lind J, Garcia-Manteiga JM, Morelli E, Jiang O, Seckinger A, Hose D, Goldschmidt H, Stadlbauer A, Sun C, Mei H, Pecherstorfer M, Bakiri L, Wagner EF, Tonon G, Sattler M, Hu Y, Tassone P, Jaeger D, Podar K. JunB is a key regulator of multiple myeloma bone marrow angiogenesis. *Leukemia.* 35: 3509-3525. 2021.
38. Ohguchi H, Harada T, Sagawa M, Kikuchi S, Tai YT, Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC. KDM6B modulates MAPK pathway mediating multiple myeloma cell growth and survival. *Leukemia.* 31: 2661-2669. 2017.
39. Liu R, Gao O, Foltz SM, Fowles JS, Yao L, Wang JT, Cao S, Sun H, Wendl MC, Sethuraman S, Weerasinghe A, Rettig MP, Storrs EP, Yoon CJ, Wyczalkowski MA, McMichael JF, Kohnen DR, King J, Goldsmith SR, O'Neal J, Fulton RS, Fronick CC, Ley TJ, Jayasinghe RG, Fiala MA, Oh ST, DiPersio JF, Vij R, Ding L. Co-evolution of tumor and immune cells during progression of multiple myeloma. *Nat. Commun.* 12: 2559. 2021.
40. Yang P, Guo L, Duan ZJ, Tepper CG, Xue L, Chen X, Kung HJ, Gao AC, Zou JX, Chen HW. Histone methyltransferase NSD2/MMSET mediates constitutive NF- κ B signaling for cancer cell proliferation, survival, and tumor growth via feed-forward loop. *Mol. Cell. Biol.* 32: 3121-3131. 2012.
41. Xie Z, Bi C, Chooi JY, Chan ZL, Mustafa N, Chng WJ. MMSET regulates expression of IRF4

- in t(4;14) myeloma and its silencing potentiates the effect of bortezomib. *Leukemia*. 12: 2347-54.2015.
42. Xie Z, Gunaratne J, Cheong LL, Liu SC, Koh TL, Huang G, Blackstock WP, Chng WJ. Plasma membrane proteomics identifies biomarkers associated with MMSET overexpression in T(4;14) multiple myeloma. *Oncotarget*. 7: 1008-18. 2013.
 43. Yoshida T, Ri M, Fujinami H, Oshima Y, Tachita T, Marumo Y, Sasaki H, Kinoshita S, Totani H, Narita T, Masaki A, Ito A, Kusumoto S, Ishida T, Komatsu H, Iida S. Impact of chromosomal abnormalities on the efficacy of lenalidomide plus dexamethasone treatment in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *Int. J. Hematol.* 110: 228-236. 2019.
 44. Pawlyn C, Cairns D, Kaiser M, Striha A, Jones J, Shah V, Jenner M, Drayson M, Owen R, Gregory W, Cook G, Morgan G, Jackson G, Davies F. The relative importance of factors predicting outcome for myeloma patients at different ages: results from 3894 patients in the Myeloma XI trial. *Leukemia*. 34: 604-612. 2020.
 45. Annunziata CM, Hernandez L, Davis RE, Zingone A, Lamy L, Lam LT, Hurt EM, Shaffer AL, Kuehl WM, Staudt LM. A mechanistic rationale for MEK inhibitor therapy in myeloma based on blockage of MAF oncogenic expression. *Blood*. 117: 2396-2404. 2011.