

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08644

研究課題名(和文) 次世代シーケンサーと蛋白質アレイを用いた骨髄腫病態解析と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel treatments of myeloma based on MRD using next-generation sequencing and protein-array assay

研究代表者

高松 博幸 (Takamatsu, Hiroyuki)

金沢大学・医学系・講師

研究者番号：70401932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫症例での微小残存病変(MRD)検出する方法である次世代シーケンサー(NGS)法、マルチパラメーターフローサイトメトリー(MFC)法を確立し、骨髄や自家移植片中のMRD検査を実施した。その結果、MRDが陰性の場合に極めて良好な無増悪生存や全生存となった。その結果に基づいて、NGSとMFCによるMRD検出の臨床的意義を検証する多施設前向き臨床研究(UMIN-CTR ID: UMIN000022238)を開始した。一方、NGSやMFCでMRDが陰性となった極めて深い奏効を達成した多発性骨髄腫症例の血清中で検出される抗X抗体のターゲット抗原Xは、癌精巢抗原の1種であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated the clinical value of minimal residual disease (MRD) detection in multiple myeloma (MM) patients using next-generation sequencing (NGS) and multiparameter flow cytometry (MFC). When MRD negativity in bone marrow and/or autografts of MM patients was achieved, the progression-free survival and overall survival were dramatically improved. Based on the results, we have started the clinical study "Prognostic value of minimal residual disease detection using multiparameter flow cytometry (EuroFlow method) in patients with multiple myeloma who underwent autologous stem cell transplantation: comparison with sequencing-based method (UMIN-CTR ID: UMIN000022238)". On the other hand, we clarified that anti-X antibody which is detected in the sera of MRD negative MM patients binds to a cancer-testis antigen X.

研究分野：多発性骨髄腫および関連疾患

キーワード：多発性骨髄腫 微小残存病変 癌精巢抗原

## 1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫は治療法が確立されておらず、治癒することは困難とされてきた。しかし近年、ボルテゾミブ、サリドマイド、レナリドマイドといった新規薬剤が開発された結果、自家造血幹細胞移植後にこれらの新規薬剤を用いて地固め・維持療法を施行することにより、高感度なPCR法を用いても微小残存病変(minimal residual disease: MRD)が検出できない「分子的完全寛解状態(molecular complete remission: mCR)」が達成できる骨髄腫症例の存在が報告されるようになった。mCRが達成された場合には、長期間にわたる寛解状態が維持され、一部の患者では治癒に至る可能性が示唆されている。

## 2. 研究の目的

次世代シーケンサー(NGS)を用いたMRD解析を行い、現在行われている症例特異的PCR法およびマルチパラメーターフローサイトメトリー(MFC)法を用いたMRD検査法と感度・特異度などについて比較検討する。

分子的完全寛解維持症例の血清をタンパク質アレイで解析し、検出される特異的自己抗体(抗X抗体)の臨床的意義を明らかにする。

## 3. 研究の方法

症例特異的PCR法、マルチパラメーターフローサイトメトリー(MFC)法、次世代シーケンサー(NGS)法を用いて骨髄腫患者の骨髄、自家末梢血幹細胞移植片中のMRDを解析した。

また、極めて深い寛解であるmCRを達成した骨髄腫患者血清中に検出される特異抗体(抗X抗体)を蛋白質アレイを用いて同定した。

## 4. 研究成果

(1) 症例特異的リアルタイムPCR(qPCR)法ではMRD陰性であった検体を用いた症例特異的デジタルPCR(ddPCR)法と次世代シーケンサー(next-generation sequencing: NGS)法によるMRDの検出・比較検討

自家末梢血幹細胞移植を受けた23症例の自家移植片中のMRDを評価したところ、

19症例はqPCR法及びddPCR法で評価可能であったが、NGS法では23症例すべてで評価可能であった。qPCR法でMRD陰性であった19症例のうち、7症例はddPCR法とNGS法でMRD陽性、7症例はddPCR法とNGS法でMRD陰性であった。残りの5症例はddPCR法ではMRD陰性、NGS法ではMRD陽性であった。以上から、MRD検出感度の点では、NGS, ddPCR, qPCRの順に優れていることがわかった(Takamatsu, H et al., BJH, 2017)。

(2) 自家末梢血幹細胞移植を施行した多発性骨髄腫症例で使用した自家移植片中のMRDがNGSで陰性の場合、自家移植後に地固め・維持療法などの追加治療を施行しなくとも長期間の無増悪生存が得られることを明らかにした(Takamatsu, H et al., Ann Oncol, 2017)。

(3) 前記したMFCのうち、世界的に標準化されたEuroFlow-MFCの技術をスペイン・サラマンカ大学から導入し、骨髄腫症例でのMRD検出をルーチン検査として行えるようにした。さらに、NGSとMFCによるMRD検出の臨床的意義を検証する多施設前向き臨床研究『自家末梢血幹細胞移植施行多発性骨髄腫におけるマルチパラメーターフローサイトメトリーによる微小残存病変の検出法の確立：次世代シーケンサー法との比較検討』

(UMIN-CTR ID: UMIN000022238)や日本の保険診療で実施可能なMFC法と世界標準であるMFC法(EuroFlow法)との比較前向き研究「多発性骨髄腫骨髄腫微小残存病変検出での8カラーフローサイトメトリー(EuroFlow法)と簡便マルチカラーフローサイトメトリー検査法(亀田総合病院法、SRL社法)の比較・検討」

(UMIN000029367)を開始することができた。今後、その結果は学会や論文で発表する予定である。

(4) NGSやMFCでMRDが陰性となった極めて深い奏効を達成した多発性骨髄腫症例の血清中に検出される抗X抗体のターゲット抗原Xは、癌精巢抗原の1種であることを確認した。その抗原Xは多くの骨髄腫細胞株、患者由来骨髄腫細胞、白血病細胞などの悪性腫瘍に発現していたが、健常者末梢血細胞では低発現であった。さらに、その抗原Xをウエスタンブロットによって詳細に検討したところ、健常者末梢血単核球では高分子量抗原Xのみの発現が認められたが、患者骨髄腫細胞では低分子量もしくは高分子と低分子量の抗原Xが発現していた。これまでの研究によって同定された抗X抗体は、極めて深い寛解の骨髄腫症例でのみ検出されたため、抗X抗体の臨床的意義を検討中である。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 13 件)

高松 博幸. 微小残存病変(MRD)測定の臨床的意義 1) アリル特異的PCR (ASO-PCR)と次世代シーケンサーを用いたMRD測定. 査読無、血液フロンティア. 2017; 27: 49-55.

高松 博幸. 次世代シーケンサーと蛋白質アレイを用いた骨髄腫病態解析. 査読無、Bio Clinica. 2017; 32: 70-74.

高松 博幸. 診断と治療効果判定に必要な新たな検査法. 査読無、Vita. 2017; 34: 54-61.

Hiroyuki Takamatsu. Comparison of minimal residual disease detection by multiparameter flow cytometry, ASO-qPCR, droplet digital PCR, and deep sequencing in patients with multiple myeloma who underwent autologous stem cell transplantation.

Journal of Clinical Medicine. 査読有、2017; 6: 91-101.

Hiroyuki Takamatsu, Naoki Takezako et al., Prognostic value of sequencing-based minimal residual disease detection in patients with multiple myeloma who underwent autologous stem cell transplantation. 査読有、Ann Oncol. 2017; 28: 2503-2510.

Hiroyuki Takamatsu, Rachel K Wee et al., A comparison of minimal residual disease detection in autografts among ASO-qPCR, droplet digital PCR, and next-generation sequencing in patients with multiple myeloma who underwent autologous stem cell transplantation. 査読有、Br J Haematol, 2017, in press.

高松 博幸. 微小残存病変 (MRD)測定の臨床的意義 1) アリル特異的PCR (ASO-PCR)と次世代シーケンサーを用いたMRD測定. 血液フロンティア. 査読無、2017; 27: 49-55.

高松 博幸. 微小残存病変評価方法と臨床的意義. 査読無、Pharma Medica. 2016; 34: 59-63.

高松 博幸. 効果判定と微小残存病変. 微小残存病変 次世代シーケンサーによる微小残存病変評価、多発性骨髄腫学-最新の診療と基礎研究. 査読無、日本臨床 . 2016 ; 74: 565-569.

高松博幸. 骨髄腫患者の経過観察に必要な検査、特集：外来で診るリンパ腫・骨髄腫. 査読無、Medicina. 2015; 52: 2156-2160.

高松 博幸. 多発性骨髄腫の微小残存病変と治療モニタリング. 査読無、

血液内科. 2015; 70: 698-703.

高松 博幸. 造血器腫瘍における微小残存病変解析法とその臨床的意義. 金沢大学十全医学会雑誌. 査読無、2015; 124: 92-96

高松 博幸. 次世代シーケンサーによる多発性骨髄腫微小残存病変検出の臨床的意義. 臨床血液. 査読有、2015; 56: 989-996.

[学会発表](計7件)

Hiroyuki Takamatsu, Naoki Takezako, Rachel Wee, Takeshi Yoroidaka, Takeshi Yamashita, Ryoichi Murata, Jianbiao Zheng, Martin, Moorhead, Victoria Carlton, Malek Faham, Shinji Nakao. Comparison of MRD detection in autografts of multiple myeloma patients between EuroFlow and NGS. 日本血液学会一般口演(英語セッション). 2017.

Hiroyuki Takamatsu. Implementation of MRD Testing in MM in Asia. 国際骨髄腫財団Asian Myeloma Network Summit 2017(招待講演)(国際学会). 2017.

高松博幸、鎧高健志、坂本淳、平郡雄二、野間芳弘、石田禎夫、鈴木憲史、中尾眞二、村上博和、Brian Durie、清水一之. 多発性骨髄腫微小残存病変評価法の比較:

OneFlow/DuraClone-MFC, EuroFlow, 及びNGS. 日本骨髄腫学会ワークショップ(招待講演). 2017.

Hiroyuki Takamatsu, Rachel Wee, Naoki Takezako, Jianbiao Zheng, Victoria Carlton, Martin Moorhead, Takashi Yoshida, Malek Faham, Shinji Nakao. COMPARISON BETWEEN 8-COLOR

MULTIPARAMETER FLOW CYTOMETRY AND NEXT-GENERATION SEQUENCING TO DETECT MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN MULTIPLE MYELOMA PATIENTS WHO UNDERWENT AUTO-SCT. 21th congress of the European Hematology Association Meeting (国際学会). 2016.

Hiroyuki Takamatsu, Ryoichi Murata, Jianbiao Zheng, Martin Moorhead, Naoki Takezako, Shigeki Ito, Toshihiro Miyamoto, Kenji Yokoyama, Kosei Matsue, Tsutomu Sato, Toshiro Kurokawa, Hideo Yagi, Yasushi Terasaki, Kinya Ohata, Takashi Yoshida, Malek Faham, Shinji Nakao. Prognostic Value of Sequencing-Based Minimal Residual Disease Detection in Patients with Multiple Myeloma Who Underwent Autologous Stem Cell Transplantation. 米国血液学会(国際学会). 2015.

Rachel K Wee, Hiroyuki Takamatsu, Ryoichi Murata, Jianbiao Zheng, Martin, Moorhead, Naoki Takezako, Shigeki Ito, Toshihiro Miyamoto, Kenji Yokoyama, Kosei Matsue, Tsutomu Sato, Toshiro Kurokawa, Hideo Yagi, Yasushi Terasaki, Kinya Ohata, Takashi Yoshida, Malek Faham and Shinji Nakao. A Comparison of Minimal Residual Disease Detection Among ASO-PCR, Dd-PCR and Deep-Sequencing in Patients with Multiple Myeloma Who Underwent Autologous Stem Cell Transplantation. 米国血液学会(国際

学会). 2015.

HIROYUKI TAKAMATSU, JIANBIAO ZHENG, MARTIN MOORHEAD, MALEK FAHAM, SHINJI NAKAO, KOSEI MATSUE. Comparison of MRD detection in MM between multiparameter flow cytometry and deep-sequencing. 日本血液学会. 2015.

〔図書〕(計8件)

高松博幸 他. 免疫調節薬 IMiDS 基礎と臨床. 2015: pp91-99.

高松博幸 他. ブラッシュアップ多発性骨髄腫. 2015: pp56-62.

高松 博幸、清水 一之 他. 医薬ジャーナル社. ASO-PCR ~ mCRの指標として、「多発性骨髄腫Updating 第8巻 多発性骨髄腫の新・診断基準 SMMとMRD Update(清水一之編集). 2016: pp154-161.

高松 博幸、名倉 英一他. 文光堂. 多発性骨髄腫における微小残存病変 minimal residual disease (MRD)、「多発性骨髄腫の診療指針.(第4版)」、日本骨髄腫学会[編]. 2016: p39, p41.

高松 博幸、赤司 浩一他. メディカルレビュー社. 微小残存病変 (MRD) 測定法、「多発性骨髄腫診療 PROGRESS (赤司浩一 監修). 2016: pp86-90.

高松 博幸、谷脇 雅史他. 日本臨床社. 次世代シーケンサー (NGS)によるMRD検出. 「白血病学(上)」、日本臨床増刊号. 2016: pp459-462.

高松 博幸、谷脇雅史 他. 日本医事新報社. 微小残存病変解析-手法と造血器腫瘍診療への応用、「造血器腫瘍アトラス(改訂第5版)」。2016: pp103-110.

高松 博幸 他. 医薬ジャーナル社.

骨髄腫内クローンと進展, 「多発性骨髄腫Updating 第10巻 骨髄腫治療を理解するためのMyeloma Biology(清水一之編集)」。2017: pp98-105.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

高松 博幸 (TAKAMATSU, Hiroyuki)

金沢大学・医学系・講師

研究者番号: 70401932

(2)研究分担者

(3)連携研究者

西川 博嘉 (NISHIKAWA, Hiroyoshi)

国立がん研究センター・先端医療開センター・免疫TR分野長

研究者番号: 10444431

(4)研究協力者

( )