

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590556

研究課題名（和文） 骨髄腫の多段階発癌と予後における microRNA とメチル化遺伝子の役割

研究課題名（英文） The role of micro RNA and methylated gene in multistep genesis and prognosis of multiple myeloma

研究代表者

半田 寛 (HANDA HIROSHI)

群馬大学・医学部・講師

研究者番号：90282409

研究成果の概要（和文）：

WWOX プロモーターのメチル化は骨髄腫細胞株、骨髄腫患者にみられ MGUS には見られなかった。骨髄腫患者 MGUS 患者、骨髄腫細胞株で異常 WWOX の発現が見られた。Dnmt の発現量と microRNA の miR15a, 15b, 16, 29a, 29b, 29c の発現量との間に相関関係がみられた。miR15a、Dnmt の発現量は、骨髄腫患者で減少し Dnmt、Mcl-1 mRNA 発現量は増加していた。

研究成果の概要（英文）：

We detected methylated WWOX promoter in myeloma cell lines, myeloma patients but not in MGUS patients. The aberrant transcript of WWOX mRNA was detected in myeloma patients, MGUS and cell lines. The expression level of micro-RNA miR15a 15b, 16 were very low or lacked in purified plasma cells in some patients. MiR 15a, 15b, 16 levels were lower in plasma cells of MM than those of MGUS. On the contrary, Dnmts and Mcl-1 levels were higher in plasma cells of MM than those of MGUS.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学・腫瘍検査学

キーワード：骨髄腫・多段階発癌・メチル化遺伝子・microRNA

## 1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫(以下MM)の予後は、自己末梢血幹細胞移植やサリドマイド、ボルテゾミ

ブなどの新規薬剤の導入により、無病生存期間、全生存期間の延長を認めてきているが、未だに根治することができない予後不良の

造血器悪性腫瘍である。MMの分子基盤の解明は、診断時の予後予測に役立つマーカーの抽出だけでなく、治療ターゲットになる分子標的の選出やより分子病態に基づいた治療に役立つことが期待される。MMは複数のがん原遺伝子の活性化やがん抑制遺伝子の不活性化により多段階に発症・進展する終末分化B細胞性腫瘍であることが明らかにされつつある(Kuehl et. al. Nat Rev Cancer 2002)。MM症例の約 10~30%で先行する無症候性のMGUSやくすぶり型骨髄腫(SMM)を認めるとされ、さらにMGUSは年約1~2%程度の割合でMMあるいはその関連疾患に進展することが明らかにされている(Kyle et. al. Immunol Rev 2003)。MMにおいては、治療開始時は化学療法に良好な反応を示すMM患者が再発・再燃を繰り返し、次第に化学療法不応性となってくることも多く、各種染色体異常がMGUS、MM、進行期MMの各段階で異なった頻度で認められることは、臨床的、また分子レベルにおいてMMの多段階発症を示唆するものである。近年MMの分子機構は、染色体解析、がん遺伝子、がん抑制遺伝子発現レベル、機能解析、cDNAマイクロアレイを用いた発現プロファイリングなどを通して明らかになりつつあり(Zhan et. al. Blood 2002, 2003)、病期の進展・悪性化にかかわる遺伝子異常を探索・同定し臨床にフィードバックしていくことが、MMの治療においてきわめて重要となってきた。

近年、腫瘍においてはそのエピジェネティックな異常が注目されている。脊椎動物ゲノムのDNAは、メチルトランスフェラーゼ(Dnmt)の働きによりCpG配列のシトシン塩基5位にメチル基が転移されるDNAのメチル化修飾によって、遺伝子の実体である塩基配列を変えることなくその遺伝子発現が制御される。ゲノム上に散在しているCpG配列の大部分はメチル化されており、転写活性化されている遺伝子プロモーター部分のCpGアイランドと呼ばれる高密度CpG配列は非メチル化状態になっている。プロモーター領域に存在する転写因子の結合モチーフがメチル化されると、一部の転写因子を除いてほとんどの転写因子はDNAに結合できず、遺伝子発現はoffになる。癌細胞のゲノムにおいては一部の遺伝子の転写開始部位のCpGアイランドが高度にメチル化されており発症に重要な

役割を果たしている。造血器腫瘍である、MMや白血病においてもこれらのDNAメチル化が認められている。またこれらの腫瘍の前癌状態でもある、MGUSあるいはMDSにおいてはその進行とともにメチル化DNAの種類と量が増加していく傾向が観察されており、悪性化に関与していると考えられる。予後因子などに関連する癌の性質診断、正常組織に蓄積したDNAメチル化異常を利用した発癌リスク診断なども可能になりつつある。

骨髄腫においては細胞周期にかかわるがん抑制遺伝子p16や接着分子E-Cadherin、サイトカインシグナル関わるSOCSやRASSF1A、アポトーシスに関連するDAPKなどさまざまな遺伝子のプロモーター領域メチル化が報告され、骨髄腫発症、MGUSからの進展・予後との関連が示唆されている。われわれの研究室では、固形癌で高頻度にプロモーター領域がメチル化され、発現が低下しているFHIT(Fragile Histidine Triad)が、造血器腫瘍である骨髄腫においても高頻度にメチル化されていることを認め、それが予後不良因子であることを報告した(Eur J Hematol 2005)。近年の研究で、肺癌、乳癌においてWFOX(WW domain containing oxidoreductase)のメチル化が予後不良に関連していることが明らかになってきており、骨髄腫においても、LOHによるWFOXの発現低下が報告されている。どちらの遺伝子もcommon fragile siteと呼ばれる不安定な遺伝子領域に存在し、FHITはFRA3Bとも呼ばれ染色体3p14.2に、WFOXは染色体16q23.2に位置しFRA16Bとも呼ばれている。どちらも発症、予後に関連するがん抑制遺伝子と考えられており、双方の遺伝子発現低下がリンクして同時に起こるケースが多いこと、プロモーター領域のメチル化が発現低下に関与するケースが多いことが報告されている(Smith et. al. Semm Cancer Biol 2007)。しかし骨髄腫ではWFOXとFHITのメチル化と遺伝子発現量、進展・予後との関連について報告したものはない。我々の検討でもFHITのメチル化を示したのみであり、FHITとWFOXの発現量、メチル化の関係を検討する必要がある。

MicroRNAは19~25塩基のpolyAを持たないRNAで、non-coding RNA(ncRNA)とも呼ばれ、主に遺伝子DNA intronに存在し2000年以來、翻訳レベルでの発現制御に関わっていること、組織発生、細胞分化、細胞増殖、細

胞死などのいろいろなプロセスに関与していることが報告されている。microRNA に関する研究報告はこの3年ほど爆発的に増加しがんとの関連を報告しているものも数多く存在する。microRNA は数千も存在することが報告されており、その全体像はまだ明らかにはなっていない。

最近 Croce らは、肺癌細胞において、遺伝子メチル化に必須である DNA メチルトランスフェラーゼ (Dnmt) 発現量の多いものが予後不良であること、予後関連するメチル化ターゲット遺伝子の一部が FHIT と WWOX であること、Dnmt 発現を microRNA である miR-29 family がコントロールしていることを報告した (PNAS 2007)。また Mott らは胆管細胞がん細胞株において、miR-29 が骨髄腫細胞の生存を大きく左右している抗アポトーシス遺伝子 Mcl-1 の発現をコントロールしていると報告している (Oncogene 2007)。Croce らは microRNA の発現プロファイリングが慢性リンパ白血球 (CLL) の進展・予後と関連すること (N. Eng. J. Med 2005)、CLL で頻繁に欠損する染色体 13q14 領域に microRNA miR-15 と miR-16 が存在し、13q14 deletion では発現が低下していること、この miR-15 と miR-16 がやはり抗アポトーシス遺伝子である bcl-2 をターゲットにしていることを報告した (PNAS 2002 2005)。染色体 13q14 領域欠損は骨髄腫でも頻繁に見られる欠損であり、予後不良因子とされているが、未だに関連する遺伝子が発見されていない。造血器腫瘍における、microRNA 発現の検討報告はまだ少なく、白血病における報告がほとんどで、骨髄腫においては miR-21 に関するもののみである。

## 2. 研究の目的

膨大な数に上る microRNA の発現を網羅的に解析するためには、マイクロアレイを使用した発現プロファイリングが必要であるが、われわれの検討報告と上記の論文報告を総合すると、骨髄腫においても microRNA 特に miR-29 family と Dnmt, FHIT, WWOX メチル化との関連、また Mcl-1 との関連、del 13q14 と miR-15, miR-16 との関連は骨髄腫の予後と関連させることにより検討する価値があると考えられる。

われわれは、同意を得て保存し、予後が判明している骨髄腫骨髄サンプル 50 症例以上

を所有しており、これは今後も増加していくと思われる。また、われわれは、川崎医科大学の大槻教授より供与いただいた異なる染色体異常を持つ骨髄腫細胞株を多数保有している。これらの細胞における FHIT と WWOX のメチル化をメチル化特異的 PCR で、FHIT mRNA と WWOX mRNA 発現量をリアルタイム PCR にて検討する。同時にメチル化に必須の Dnm-1, 3A, 3B の mRNA 発現をリアルタイム PCR で、タンパク発現を病理組織学的に検討する。microRNA のうち miR-29 family miR-15, 16 の発現レベルをリアルタイム PCR で検討を行う。Mcl-1 発現をリアルタイム PCR による mRNA 発現とタンパク発現レベルを検討する。Mcl-1 の骨髄腫細胞生存へのインパクトを考えると、非常に重要な研究結果になるのではと予想する。MGUS, SMM の形質細胞における、microRNA 発現、FHIT, WWOX のメチル化、Dnmt 発現を検討し、骨髄腫の多段階発癌における、microRNA と遺伝子メチル化の役割の一部を明らかにしたい。さらに上記の解析が骨髄腫の進展、予後とどのように相関するのか、International Scoring System (ISS) や、FISH での予後不良染色体異常 (t(4;14), t(14;16), del13 など) あるいは、予後良好染色体異常とどのように関連するのかを解析し、予後予測因子となりうるかどうかを検討する。骨髄腫の治療戦略を考える上で、予後予測因子、薬剤耐性関連因子を発見することは、非常に重要な意味を持つと考える。

最近の技術開発により microRNA を治療薬とすること (RNA 創薬) が可能になりつつある。上記の欠損 microRNA をに in vitro で骨髄腫細胞株に導入し、Mcl-1 の down-regulation が起こるかどうかが、それにより骨髄腫細胞が細胞死にいたるのかどうか、Dnmt の発現が低下し FHIT, WWOX のメチル化状態が変化するかどうか、それが骨髄腫細胞にどのような影響をあたえるのかを、検討する。MicroRNA の欠損が MGUS から骨髄腫への進展に役割を果たしていることが、判明すれば、microRNA を形質細胞に発現させる方法を見つけられればその進展を抑制することが、また薬剤耐性に関連していることが判明すれば、やはり導入により薬剤耐性を克服することが可能になるかもしれない。遺伝子メチル化との関連が明らかになれば、Azacytidinen などの脱メチル化剤との synergy 効果が期待できる可能性もある。

いまだに根治不能である骨髄腫において、microRNA をあらたな治療ターゲットとして探索する研究を行うことは非常に意義があると考えられる。

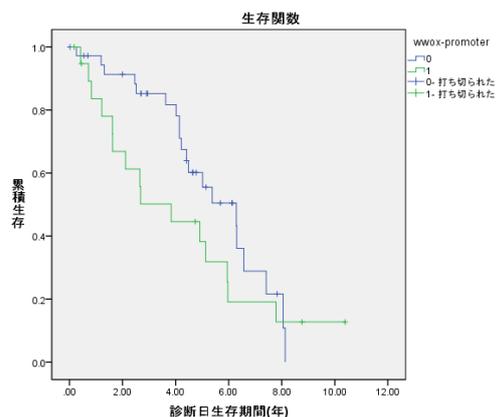
### 3. 研究の方法

同意を得て凍結保存し、予後が判明している骨髄腫骨髄サンプルと、同意を得た新規患者の骨髄細胞から CD138 抗体とビーズ、FACS を用いて骨髄腫細胞を分離保存、DNA、RNA、microRNA を抽出保存する。川崎医科大学の大槻教授より供与いただいた異なる染色体異常を持つ骨髄腫細胞株 (KMM1, KMS11, KMS12, KMS18, KMS20, KMS21, KMS28, KMS34) から DNA、RNA、microRNA を抽出保存する。これらの細胞における FHIT と WWOX のメチル化をメチル化特異的 PCR で、FHIT mRNA と WWOX mRNA 発現量をリアルタイム PCR にて検討する。同時にメチル化に必須の Dnm-1, 3A, 3B の mRNA 発現をリアルタイム PCR で、タンパク発現を病理組織学的に検討する。microRNA のうち miR-29 family miR-15, 16 の発現レベルをリアルタイム PCR で検討を行う。Mc1-1 発現もリアルタイム PCR による mRNA 発現とタンパク発現レベルを検討する。これらの解析が予後とどのように関連するのかを解析し、さらに in vitro で、microRNA を骨髄腫細胞株に導入することにより、機能解析を行う。Mc1-1 mRNA 発現をリアルタイム PCR で、予後が判明している患者の予後と他の予後因子との関連、染色体異常との関連について、さらに MGUS と MM における違いを SPSS 統計ソフトを用いて統計学的に処理、検討を行う。

### 4. 研究成果

まずメチル化遺伝子の標的としてわれわれが選んだ癌抑制遺伝子、common fragile site に存在する FHIT と WWOX のプロモーターメチル化状態を検討した。川崎医科大学の大槻教授より供与いただいた異なる染色体異常を持つ骨髄腫細胞株 (KMM1, KMS11, KMS12, KMS18, KMS20, KMS26, KMS28, KMS34) さらに、ARH77 から DNA、RNA、microRNA を抽出。これらの細胞株における、癌抑制遺伝子 FHIT と WWOX 遺伝子プロモーター領域のメチル化状態をメチル化特異的 PCR 法にて解析した。今回は FHIT のメチル化遺伝子検出のための primer の設定が不良のためか検出できなかったが、WWOX 遺伝子に関しては、その

プロモーター領域のメチル化が認められた。WWOX 遺伝子の Exon 領域において、KMS11, KMS12, KMS26, ARH77 メチル化状態がヘテロに認められた。さらに、同意を得た骨髄腫患者の骨髄細胞から CD138 抗体と磁気ビーズを用いて、骨髄腫細胞を純化しメチル化状態を検討した。FHIT のメチル化についてはやはり検討できなかったが、WWOX については患者ごとにメチル化状態が異なっており今後 WWOX 遺伝子発現や患者予後とともに検討する。また抽出した microRNA から miR15a, 15b, 16 の発現を検討したが、やはり細胞株ごと、患者ごとに異なっており、染色体データと合わせて検討する予定である。発現の完全欠損は今のところ認められていない。骨髄腫細胞株から RNA、DNA、microRNA を抽出し、これらの細胞株における発現などを検討した。リアルタイム PCR による発現定量的結果、DNA メチルトランスフェラーゼ Dnmt-1, Dnmt-3a, Dnmt-3b の発現は、白血病細胞株である HL60 より骨髄腫細胞株において、その発現量が高値であった。また Dnmt の発現量と microRNA の miR15a, 15b, 16, 29a, 29b, 29c の発現量には、相関関係がみられ、これらの microRNA が Dnmt の発現量をコントロールしているという仮説を示唆しているものと考えられた。同意を得た 20 人の骨髄腫患者骨髄検体より CD138 抗体と磁気ビーズを用いて、骨髄腫細胞を純化したのち、microRNA の発現量を検討した。microRNA のうち、miR15a, 15b, 16 の発現量は染色体異常 del 13q をもつ患者検体において少ない傾向が見られた。microRNA 15a は MGUS の CD138 陽性形質細胞より MM の形質細胞において有意に低値であり、いくつかの MM 形質細胞においては発現が全く見られなかった。Dnmt1, 3a, 3b mRNA の発現量はこれとは逆に MM 形質細胞において MGUS より高値であった。また Mc1-1 の mRNA 発現量も同様に MM 形質細胞において高値であった。同意を得られた、84 人の骨髄腫患者と 12 人の MGUS 患者骨髄単核球から DNA、RNA を抽出し、common fragile site FHIT と WWOX のプロモーターメチル化状態をメチル化特異的 PCR (MSP) を用いて、また RT-PCR を用いて FHIT と WWOX の RNA の発現を検討した。WWOX のプロモーターメチル化は骨髄腫細胞株の 2/6 に、骨髄腫患者の 15% にみられたが、MGUS には見られなかった。



また、一部の患者についてWWOXプロモーター領域メチル化ありなしでの全生存の違いを Kaplan-Meier法にて検討した。メチル化が検出された患者群の全生存が劣っている傾向がみられたものの、統計学的には有意差を認めなかった。85%の骨髄腫患者と63%のMGUS患者、4/6の骨髄腫細胞株で、SRD領域を欠損している短い異常WWOXの発現が見られた。CD138 で純化された形質細胞のWWOXは、すべての骨髄腫患者検体で異常WWOX が検出された。しかし、別のcommon fragile site geneであるFHITでは、異常FHITは骨髄腫患者の2.5%、MGUS患者の16%にしか認められず、common fragile site geneでも異なっていた。

#### 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)

[学会発表] (計1件)

- ①半田寛 Common fragile site gene FHIT (fragile histidine triad gene) and WWOX (WW domain containing oxidoreductase) expression are frequently altered in multiple myeloma.

13<sup>th</sup> International Myeloma Workshop

2011年5月3日 Paris, France

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

半田 寛 (HANDA HIROSHI)

群馬大学・医学部・講師

研究者番号：90282409

##### (2) 研究分担者

村上 博和 (MURAKAMI HIROKAZU)

群馬大学・医学部・教授

研究者番号：40166260

小河原 はつ江 (OGAWARA HATSUE)

群馬大学・医学部・教授

研究者番号：60134293