

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08746

研究課題名(和文)血管前駆細胞移植を用いた低酸素解除による難治性多発性骨髄腫治療

研究課題名(英文)Elucidation of new testing method in refractory multiple myeloma

研究代表者

進藤 基博(Shindo, Motohiro)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：10396377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Circulating cell-free DNA (cfDNA) は細胞外遊離DNA断片であり、担癌患者では、がん細胞に由来するDNA (circulating tumor DNA) が含まれる。近年、このcfDNAを用い腫瘍性疾患の診断や治療への応用が検討されている。本研究は、多発性骨髄腫においてcfDNAを用いた解析が骨髄穿刺検査に代わり、より侵襲の少ない新たな検査法となりうる可能性があるかを検討した。KRAS変異を有する多発性骨髄腫症例で、血漿由来のcfDNAを用いた経時的解析が多発性骨髄腫の治療評価に有用であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、侵襲の大きい骨髄穿刺検査に代わり、より侵襲の少ない血液検査による検体を用いることが特色である。血漿由来のcfDNAを用いた経時的解析が多発性骨髄腫の治療評価に有用である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Cell-free DNA (cfDNA) is an extracellular free DNA fragment that contains circulating tumor DNA (ctDNA). Recent studies have shown that cfDNA is useful for diagnosis and examining treatment efficacy in neoplastic disease. In this study, we investigated the genetic mutation of ctDNA in multiple myeloma patients and followed test results over time. From this study, we have found that the analysis of cfDNA is useful for monitoring disease status in patients with KRAS mutation. This finding suggests that cfDNA obtained from a blood test can be used to study disease status instead of bone marrow aspiration, which is more invasive.

研究分野：血液内科学

キーワード：多発性骨髄腫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫(multiple myeloma)は、形質細胞の単クローン性腫瘍性増殖と、その産物である M 蛋白(単クローン性免疫グロブリン)が血清・尿中で増加し、全身の臓器障害を引き起こす造血器悪性疾患である。全造血器悪性疾患の約 10%を占め、発症率、死亡率ともに年々増加傾向にある。多発性骨髄腫の治療薬として 2000 年代に入り、新規薬剤(サリドマイド、ボルテゾミブ、レナリドミド、ポマリドミド、パノビノスタット、カルフィルゾミブ、エロツズマブ、イキサゾミブ、ダラツムマブ、イサツキシマブ、イデカブタゲンビクルユーセル、シルタカブタゲンオートルユーセル)が次々と臨床応用され、それ以前に用いられていた抗癌剤に比べ、予後の改善が認められるようになった。

単クローン性免疫グロブリン血症(Monoclonal gammopathy of undetermined significance : MGUS)やくすぶり型多発性骨髄腫から、症候性多発性骨髄腫への進展を予測することは難しく、また、多発性骨髄腫の治療効果は個体差が大きい。その背景として、骨髄腫細胞のゲノム不安定性やエピジェネティック制御異常に伴う病態の多様性が示されており、それによって引き起こされる遺伝子異常の把握は個々の治療の検討や病勢の予測に役立つと予測される。

近年、骨髄中の形質細胞を用いた微小残存病変(minimal residual disease: MRD)の評価が治療効果判定に有用であるとされ、治療後に MRD 陰性となることが良好な予後と関連すると考えられており、MRD の陰性化が治療目標の一つとなっている。ただし、骨髄穿刺による骨髄からの形質細胞の採取は侵襲的な検査であるため、頻回のモニタリングが困難である。また、骨髄穿刺によって得られた検体では、空間的に不均一であるという多発性骨髄腫の特性のため、一か所の骨髄穿刺による単一部位での評価では十分でない可能性もあり、MRI や PET-CT などの画像評価を組み合わせることで補完されうるが完全ではない。

一方、リキッドバイオプシーは、主にがん領域で行う組織採取の生体検査(バイオプシー)を血液などの体液(リキッド)で代用させる技術である。腫瘍の全体像をより反映している可能性があり、継続的に検体の採取が簡便にできるメリットがある。cell-free DNA(cfDNA)は、ヒトの末梢血などの体液中の DNA であり、通常 145bp 未満の二本鎖 DNA 断片として存在する。血液中の cfDNA の大部分は造血細胞由来である。担癌患者では、がん細胞に由来する DNA(circulating tumor DNA : ctDNA)が含まれる。固形癌患者では、健常人と比べて血中 cfDNA 濃度が有意に高いことが報告されている。固形癌領域では、様々な癌において、リキッドバイオプシーによる cfDNA や ctDNA 解析が、診断や予後予測に有用なバイオマーカーとして有望視されている。

造血器腫瘍領域においても、血漿由来の cfDNA を用いて遺伝子変異等を解析するリキッドバイオプシーが多発性骨髄腫の病勢評価に有用であり、cfDNA を用いた解析では血液検査による検体採取が可能であるため、骨髄中の形質細胞を用いた MRD 評価よりも、非侵襲的に

頻回に多発性骨髄腫の病勢を評価し追跡できる可能性がある。

## 2 . 研究の目的

本研究では、多発性骨髄腫および単クローン性免疫グロブリン血症(MGUS)患者における cfDNA を用いた分子異常の検出を行う。これにより、低侵襲に個々の病勢や治療反応性の予測が可能になることが期待される。

KRAS 変異を有する多発性骨髄腫患者で、血漿由来の cfDNA を用いた経時的解析にて多発性骨髄腫の治療評価を行い、その有用性を検討した。

## 3 . 研究の方法

まず、多発性骨髄腫患者の再発期の骨髄穿刺で得られた形質細胞を含む骨髄有核細胞由来の DNA を用いて遺伝子解析を行ったところ KRAS Q61L 変異が認められた。これを受けて次に、血漿由来の cfDNA を用いた digital PCR 解析を行ったところ同様の KRAS Q61L 変異が検出された。

以上の結果を踏まえ、以後、血漿由来の cfDNA を用いた digital PCR 解析にて KRAS Q61L 変異の mutation allele frequency (MAF) の経時的な解析を行った。

### (1) 骨髄由来の有核細胞からの DNA 抽出

骨髄穿刺施行時に採取したクロット検体のパラフィン包埋標本を 10 μm の厚さで薄切した検体を用い、GeneRead DNA FFPE Kit (QIAGEN 社) を使用して DNA を抽出した。

### (2) 骨髄の有核細胞由来の DNA を用いた遺伝子解析

本研究グループでデザインした Ampliseq カスタムパネル (Thermo Fisher Scientific) を用い、Iron GeneStudio5 システムでターゲットシーケンスを行い、目的領域の変異解析を行った。

### (3) 血漿検体からの cfDNA 抽出

magLEAD 12gC (PSS 社) を使用し、Meg DEA DxMV キットにて DNA 抽出を行った。

### (4) 血漿由来 cfDNA を用いた digital PCR 解析

digital PCR QX200 システム (BioRad 社) を使用し、QuantaSoft により解析を行った。KRAS 変異の検出に際しては、BioRad 社のバリデード済みの screening kit (プライマープローブセット) を使用した。

#### 4 . 研究成果

(1) KRAS 変異を有する多発性骨髄腫患者において、血漿由来の cfDNA を用いた経時的解析による多発性骨髄腫の治療評価。

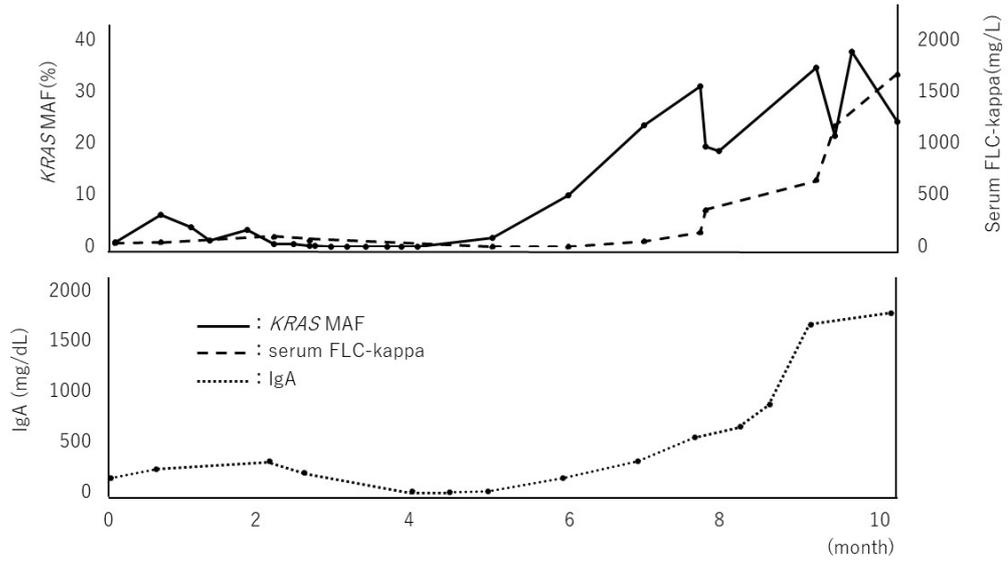
多発性骨髄腫で化学療法後、CT にて新規骨病変を認めたと、骨髄穿刺では形質細胞の増加が認められない症例において、血清 IgA と FLC- の上昇がみられた。KRAS MAF も上昇していた。

化学療法を追加したところ、血清 IgA と FLC- はいずれも低下し、KRAS MAF も減少した。CT 上、骨病変も消失し、90%以上の M 蛋白の減少が得られたため VGPR 相当の奏効と判断した。その後、大量 L-PAM 療法を前処置として 2 回目の自家末梢血幹細胞移植 (2nd auto PBSCT) を行った。2nd auto PBSCT 後の骨髄穿刺では形質細胞の増加はなく、MRD 陰性であり、sCR の奏効と判断した。この時点で、血清 IgA と FLC- も低下しており、KRAS MAF は 5%未満まで減少していた。

しかし、その直後に、血清 IgA や FLC- の上昇は認めなかったが、KRAS MAF が上昇に転じた。その後、維持療法を開始したが有害事象で継続できなかった。その間も KRAS MAF は上昇し続け、2nd auto PBSCT から約 2 か月後には血清 IgA と FLC- も上昇に転じた。その後、新規の多発骨病変を認め、再発の診断となった。化学療法を行うも治療効果が得られず、血清 IgA と FLC- は上昇傾向のままであった。KRAS MAF は治療直後には一時減少するものの、すぐに上昇に転じた。その後も治療は奏功しなかった。

骨病変が主体で骨髄中の異型形質細胞の割合が少なく、髄外病変主体の多発性骨髄腫の再燃患者において、2nd auto PBSCT 後の骨髄穿刺では MRD 陰性であったにもかかわらず、血漿由来の cfDNA での解析ではその後すぐに KRAS MAF が陽転化し、それから間もなく臨床的にも多発性骨髄腫の再燃を認めた。このことから、特に骨病変といった髄外病変を主体とした多発性骨髄腫患者においては、現在の MRD 評価よりも血漿由来の cfDNA を用いた解析のほうがより正確に多発性骨髄腫の病勢を反映する可能性があり、また、連続的に cfDNA を用いた解析を行うことで多発性骨髄腫の病勢や治療効果の評価に有用である可能性が考えられた。

図1



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sato K, Igarashi S, Tsukada N, Inamura J, Yamamoto M, Shindo M, Moriichi K, Mizukami Y, Fujiya M, Torimoto Y.	4. 巻 22
2. 論文標題 Cytomegalovirus infection in patients with malignant lymphomas who have not received hematopoietic stem cell transplantation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Cancer.	6. 最初と最後の頁 944
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-022-10008-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto M, Shindo M, Funayama T, Sumi C, Saito T, Toki Y, Hatayama M, Imadome KI, Mizukami Y, Okumura T.	4. 巻 101
2. 論文標題 Late-onset posttransplant Epstein-Barr virusrelated lymphoproliferative disease after cord blood transplantation for chronic active Epstein Barr virus infection: A case report.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medicine (Baltimore).	6. 最初と最後の頁 e29055
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MD.0000000000029055.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Funayama T, Nozu T, Ishioh M, Igarashi S, Sumi C, Saito T, Toki Y, Hatayama M, Yamamoto M, Shindo M, Tanabe H, Okumura T.	4. 巻 1809
2. 論文標題 Centrally administered GLP-1 analogue improves intestinal barrier function through the brain orexin and the vagal pathway in rats.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Brain Res.	6. 最初と最後の頁 148371
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2023.148371.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Igarashi S, Nozu T, Ishioh M, Funayama T, Sumi C, Saito T, Toki Y, Hatayama M, Yamamoto M, Shindo M, Tanabe H, Okumura T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Ghrelin prevents lethality in a rat endotoxemic model through central effects on the vagal pathway and adenosine A2B signaling : Brain ghrelin and anti-septic action.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Physiol Biochem.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13105-023-00962-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本昌代、進藤基博、船山拓也、鷺見千紘、齋藤豪志、畑山真弓、土岐康通、小野裕介、水上裕輔、谷野美智枝、奥村利勝
2. 発表標題 Liquid biopsy with cfDNA in plasma could predict disease progression in a case of multiple myeloma
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------