

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：34311

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15978

研究課題名（和文）多発性骨髄腫におけるボルテゾミブ耐性機構の解明とその克服法の探索

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanisms of bortezomib resistance in multiple myeloma and strategies to overcome them

研究代表者

高橋 知里（Takahashi, Chisato）

同志社女子大学・薬学部・助教

研究者番号：70833680

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、多発性骨髄腫におけるボルテゾミブ耐性機構を解明するため、ボルテゾミブ耐性骨髄腫細胞株を用いたタンパク質および代謝物の網羅的解析を行った。超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析計（SFC/MS）を用いた測定系を構築し、189種類の脂質分子種について測定を行った。その結果、耐性株では特定の脂質分子種の発現が変動し、脂肪酸代謝の亢進が耐性機構に関与している可能性が示唆された。さらに、ボルテゾミブ不応性患者の血清中で抗炎症性脂質が減少していることが確認され、これらの脂質分子種が耐性に関連する重要なバイオマーカーであることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性骨髄腫におけるボルテゾミブ耐性獲得の分子機構の解明と新規薬剤の導入による併用療法の確立は急務だが、その分子基盤には不明な点が多く残されている。本研究の学術的意義として、特定の脂質分子種と脂肪酸代謝の亢進が耐性機構に関与していることが示唆された。これにより、これまで解明されていなかった耐性のメカニズムに新たな知見を提供することができた。社会的意義としては、本研究によって耐性メカニズムの理解が進み、個々の患者に最適な治療法を提供するための新たな指針が得られ、患者の予後や生活の質の向上に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed a comprehensive analysis of proteins and metabolites using bortezomib-resistant myeloma cell lines to elucidate the mechanisms of bortezomib resistance in multiple myeloma. We constructed a supercritical fluid chromatography/mass spectrometry (SFC/MS) assay system and measured 189 lipid molecular species. The results indicated that the expression of specific lipid species fluctuated in resistant strains, suggesting that enhanced fatty acid metabolism may be involved in the resistance mechanism. Furthermore, anti-inflammatory lipids were decreased in the serum of bortezomib-refractory patients, indicating that these lipid species are putative biomarkers associated with resistance.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：多発性骨髄腫 分子標的薬 脂質 プロテオミクス メタボロミクス

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫は、骨髄中の形質細胞が悪性化した難治性の造血器腫瘍である。プロテアソーム阻害薬ボルテゾミブはその治療において重要な役割を果たしている。しかし、臨床現場では治療に対する耐性や不応性が顕在化し、大きな課題となっており、耐性例に対して有効な治療法は確立されていない。従来の研究では、耐性機構として、プロテアソームの発現増加や遺伝子変異のほか、ストレス応答への不応や IGF-1 受容体の過剰発現などが報告されていたが、詳しいメカニズムは未だ不明であった。一方で、形質細胞のがん化により引き起こされる多発性骨髄腫では、脂質合成が盛んであり、脂質はその治療薬である分子標的薬の奏効性を予測するバイオマーカーとしても注目されていた。そこで、ボルテゾミブ不応性患者の血清中で抗炎症性脂質が減少していることに着目し、タンパク質および代謝物の網羅的解析(プロテオミクス・メタボロミクス)により、耐性機構を包括的に解明することを目指した。

2. 研究の目的

本研究では、これまでのボルテゾミブ耐性因子の探索研究を基に、ボルテゾミブ耐性骨髄腫細胞株を用いたタンパク質および代謝物の網羅的解析により薬剤耐性機構を明らかにすることを目的とする。また、ボルテゾミブ不応性患者で減少している血清中脂質が耐性に与える影響を分子レベルで解明する。プロテアソーム阻害薬の耐性機序に重要なシグナル伝達経路を明らかにすることにより、治療効果を予測し、個々のがん患者にとって最適な治療の選択と、予後および QOL の改善に寄与できる。

3. 研究の方法

(1) SFC/MS 測定系の構築

これまでに測定系を確立した酸化脂肪酸に加え、超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析計 (SFC/MS) を用いたリン脂質 (グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質等) に加え、エーテル型脂質等、リン脂質の中でも、比較的存在量が少ない脂質を対象に、SFC/MS を用いた定量系を構築した。標準品を用いて、SFC/MS 測定パラメーターの最適化を行い、保持時間の前後 2 分に測定時間を絞った scheduled Selected Reaction Monitoring (sSRM) メソッドを作成した。

(2) 細胞試料を用いたメタボローム測定条件の検討

メタボローム測定に必要な細胞数の検討及び、それぞれの測定のための試料抽出の検討を行った。細胞数、破碎条件、濃縮率等の検討を行うため、細胞を破碎後、Bligh & Dyer 法にて脂質を抽出した。抽出後、濃縮を行い、外標準物質を加えて測定サンプルとし、SFC/MS を用いて測定した。

(3) ボルテゾミブ耐性骨髄腫細胞株のタンパク質および代謝物の網羅的解析

ボルテゾミブ耐性を示すヒト骨髄腫由来細胞株 KMS-11/BTZ とその親株 KMS-11 から Bligh & Dyer 法により総脂質を抽出し、189 種類の脂質分子種について SFC/MS を用いて測定し、薬剤耐性に関連する脂質分子種を探索した。また、細胞からタンパク質を抽出し、トリプシン消化したのち LC/MS 測定を行い、薬剤耐性に関連するタンパク質を探索した。得られた結果から、ボルテゾミブ耐性化機構において、着目すべき分子やシグナル伝達経路を探索した。

(4) BD 療法治療開始前血清中の脂質画分の同定と定量

ボルテゾミブ + デキサメタゾン併用療法 (BD 療法) 治療開始前の多発性骨髄腫患者の血清中の脂質分子種を Bligh & Dyer 法にて抽出した。抽出後、濃縮を行い、外標準物質を加えて測定サンプルとし、SFC/MS を用いて測定した。治療奏効率に関して、国際骨髄腫作業部会統一効果判定規程 (IMWG uniform response criteria および Blade 診断基準) に基づき、不応・無効および治療効果が低い PD、SD 患者を非レスポonder、治療効果が高い MR、PR、VGPR、CR 患者をレスポonderと設定した。群間で有意差 (有意水準 $P = 0.05$) がある脂質分子種を解析した。

4. 研究成果

(1) SFC/MS 測定系の構築

SFC は、従来の方法である順相クロマトグラフィー (NPLC) や親水性相互作用型クロマトグラフィー (HILIC) よりも、解析時間の短さや幅広い種類の脂質に対する分離という点で優れている。最終的に 189 種類の脂質分子種についてパラメーターを決定した。また、検量線を作成したところ良好な直線性を示し、本測定系の定量性についても確認した。

(2) 細胞試料を用いたメタボローム測定条件

本研究で構築した測定系を用いて細胞試料から抽出した脂質分子種の測定を行った。ヒト血清中に存在量の多いホスファチジルコリンやホスファチジルエタノールアミン等の脂質分子種に関しては、用いた細胞数に関わらず十分なピークエリアを検出することができた。また、ヒト血漿中での存在量の少ない (エーテル型ホスファチジルコリン (ePC)、エーテル型ホスファチジルエタノールアミン (ePE))、アシルカルニチン等の脂質分子種の測定系においても、PC や PE 等の脂質分子種と同量の試料量から検出が可能であることを確認した。また、ヒト血清サンプルでは検出が難しいホスファチジルセリン (PS) などの脂質分子種に関しても細胞試料を用いた場合は検出できることが明らかとなった。

(3) ボルテゾミブ耐性骨髄腫細胞株のタンパク質および代謝物の網羅的解析

KMS-11/BTZ とその親株サンプル中に含まれるリン脂質等を定量し、耐性株で有意に高レベルに発現する 26 種、および低レベルの 12 種の脂質分子種を見いだした。プロテオーム解析の結果から、これらの脂質分子種に関連するタンパク質の発現の変動を探索した結果、耐性株において、アシルカルニチンの含有量が減少していることが確認され (図 1)、さらに関連するタンパク質の発現として、耐性株では、親株と比較して、CPT1A (Carnitine 0-palmitoyl transferase 1) が高レベルに発現していた (図 2、表 1)。

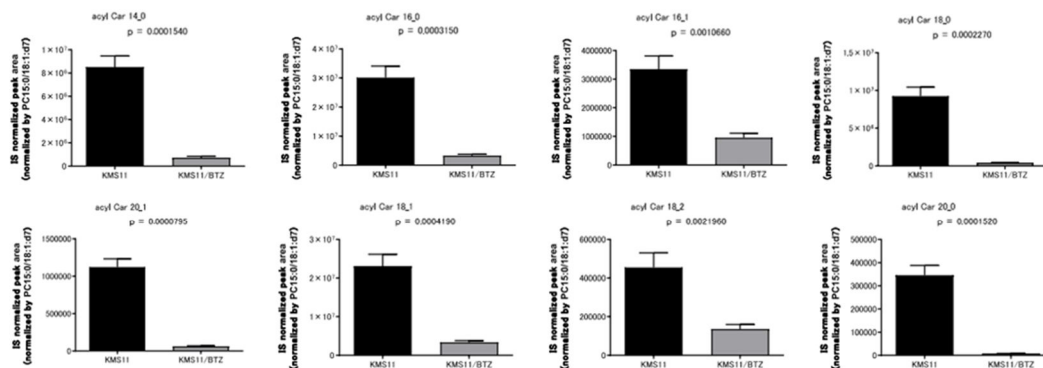


図 1 親株と耐性株における acyl carnitine 存在レベルの比較

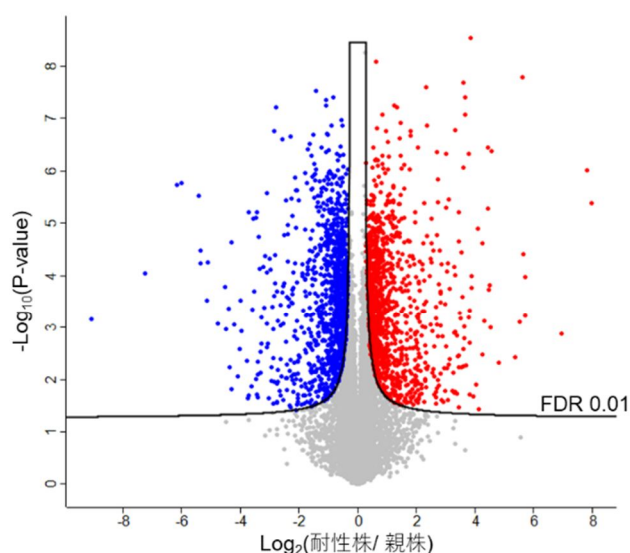


図 2 親株に対する耐性株のタンパク質発現の volcano plot
縦軸: $-\text{Log}_{10}(\text{p値})$ 、横軸: Log_2 (各群平均の変動値)

表1 プロテオーム解析によって有意差がみられたacyl carnitine代謝pathway関連タンパク質 (有意水準 $P < 0.05$)

Number	Gene Symbol	Protein Name	log ₂ Fold-change (耐性株群 / 親株群)	p-value
1	CPT1A	Carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform	1.38	2.66E-05
2	ACSL3	Fatty acid CoA ligase Acsl3	0.51	2.34E-05
3	ACSL4	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4	1.49	1.28E-05
4	ACSL5	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 5	1.56	4.08E-03
5	ATP5F1A	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	0.71	4.35E-04
6	ATP5F1B	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	0.77	8.19E-05
7	ATP5F1C	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	0.74	4.92E-04
8	ATP5F1D	ATP synthase subunit delta, mitochondrial	0.73	1.15E-03

CPT1A は、細胞質中の acyl CoA のカルニチンへの転移を触媒し、アシルカルニチンとしてミトコンドリアマトリックスへと輸送するため、CPT1 とアシルカルニチンは、脂肪酸代謝を介してがん細胞のエネルギー供給をサポートし、がんの進行に寄与している。本結果から、耐性株ではアシルカルニチンを消費する代謝経路が亢進しているのではないかと考えられる(図3)。今後、アシルカルニチンが関与する耐性化機序について研究を進める予定である。

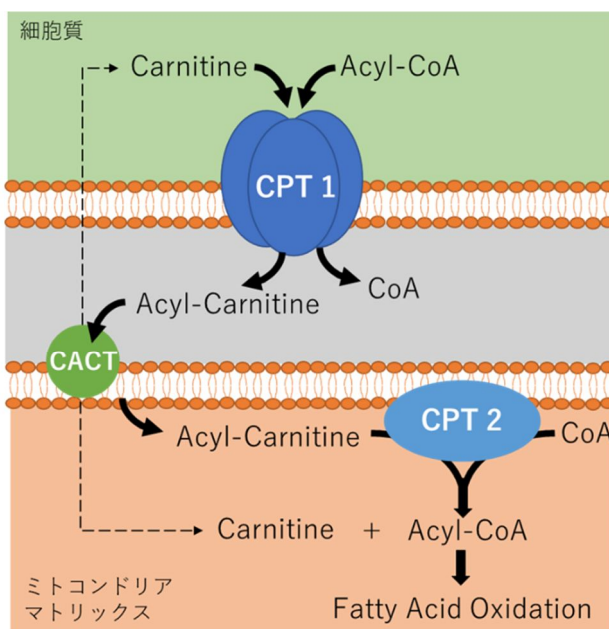


図3 Acyl-CoAのミトコンドリア内への輸送経路

また、ボルテゾミブの作用機序には、プロテアソーム阻害による小胞体ストレス誘導およびその応答機構が深く関与しているが、小胞体ストレスに関連するタンパク質発現が耐性株で有意に減少していた。これにより、小胞体ストレス応答の抑制が耐性機序に関連している可能性が示唆された。本研究により、耐性株が特有の脂質プロファイルを有する可能性が示唆された。

(4) BD 療法治療開始前血清中の脂質画分の同定と定量

ボルテゾミブ不応性を示した患者の血清中では、抗炎症性脂質として知られる不飽和脂肪酸含有ホスファチジルコリン(usPC)やエーテル型ホスファチジルエタノールアミン(Ether PE)が奏功群と比較して、有意に減少しており、先行研究と一致した(Maekawa K et al., Cancer Sci. 110(10):3267-74. 2019)。一方でこれらの脂質の存在レベルは、親株と比較してボルテゾミブ耐性骨髓腫細胞で有意に高く、その意義については現在も検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋知里、坂根理恵、藤森美音、李政樹、飯田真介、前川京子
2. 発表標題 超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析計を用いたリポミクス測定系の構築とボルテゾミブ治療に関するバイオマーカーの探索
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤尾 茉美、高橋 知里、徳川 宗成、李 政樹、飯田 真介、前川 京子
2. 発表標題 SFC/MSを用いた脂質メタボローム解析による多発性骨髄腫におけるボル テゾミブ耐性機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024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
---------	---------