

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16238

研究課題名（和文）IgH遺伝子再構成とRAS変異を標的とした多発性骨髄腫の低侵襲診断

研究課題名（英文）Minimally invasive diagnosis of multiple myeloma by targeting IgH gene reconstructions and RAS mutations

研究代表者

山本 昌代（Yamamoto, Masayo）

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：30596284

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：多発性骨髄腫患者の骨髄検体を解析してRAS遺伝子変異の有無を解析し、RAS変異陽性例を対象に血漿由来のcfDNAを用いてデジタルPCRでRAS遺伝子変異のmutation allele frequency（MAF）の解析を経時的に行い、血清フリーライトチェーンなどの臨床所見との関連性を検討した。その結果、一部の症例で臨床的な増悪を認める前に血漿中でMAFの増加を認め、血漿由来cfDNAでの解析が骨髄腫の病勢を反映する可能性が示唆された。さらに、RAS遺伝子変異を認める症例では認めない症例に比べ予後が不良である可能性を示唆する結果も得られており、今後学会での報告を予定している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性骨髄腫（MM）は同一個体内でも病変が不均一に分布すると考えられており、骨髄内に腫瘍細胞がなく、骨病変などの髄外病変を認める場合がある。現在、骨髄細胞を用いたマルチカラーフローサイトメトリーによる微小残存病変（MRD）の評価が治療効果判定等に有用とされているが、骨髄での解析だけでは不十分である可能性もある。本研究では血漿由来のcfDNAを用いた解析がMMの病勢を反映する可能性が示唆された。血漿由来のcfDNAは骨髄以外の病変由来の遺伝子変異の解析も可能であることから、現在のMRDの解析よりもより正確にMMの病勢を反映する可能性もあり、今後、現在のMRD評価の代替となる可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：We analyzed for the presence of RAS mutations using bone marrow samples from patients with multiple myeloma (MM), and, in the patients with RAS mutation positive, we analyzed mutation allele frequency (MAF) using cfDNA from plasma. Furthermore, we examined the association with MAF of cfDNA and clinical findings such as serum free light chain. The results showed that MAF increased in plasma before clinical progression in some cases, suggesting that analysis of cfDNA from plasma may reflect the disease status of MM. Furthermore, in the other analysis, the results suggest that patient with RAS mutation may have a poorer prognosis than those without RAS mutations, which will be reported in the future.

研究分野：医学

キーワード：多発性骨髄腫 cfDNA RAS遺伝子変異 リキッドバイオプシー

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫 (multiple myeloma: MM) は分化過程の B 細胞に複数のゲノム異常が蓄積して発症する形質細胞性の腫瘍である。その前駆病変として単クローン性免疫グロブリン血症 (monoclonal gammopathy of undetermined significance: MGUS) が知られており、MGUS から MM への移行は年率約 1% とされる (Mouhieddine TH, et al. Blood. 2019)。その進行には、骨髄腫細胞内で起こるゲノム不安定性や遺伝子プロモーターのメチル化などのエピジェネティックな制御の異常や、特定の遺伝子変異が関わっていると考えられている。

一方で、MM において病勢把握や治療評価に重要とされている微小残存病変 (minimal residual disease: MRD) については、現時点では骨髄液での解析に留まっており、侵襲を伴うため頻回の評価が難しい。さらに、MM は一個体内でも腫瘍細胞の分布が不均一 (Rasche L. et al, Nat Commun. 2017) で、形質細胞腫等の髄外病変を有する症例も見られることから、骨髄での MRD 解析のみで正確な病勢の評価では不十分な症例も存在する可能性が考えられている。近年、血漿遊離核酸 (cell-free DNA: cfDNA) を試料とした遺伝子解析が着目されている。この cfDNA を用いた遺伝子解析が髄外病変を有する症例を含めた MM のゲノム異常を低侵襲かつ包括的に補足可能であることが予測され、また病勢や予後指標としても有用であると考えられた。

2. 研究の目的

MM および MGUS 患者では約 40% の症例で KRAS もしくは NRAS 変異が見られることが知られているが、それらが予後や治療反応性に寄与するかは十分な検討がなされていない。さらに、膵癌などの固形がんでは cfDNA を用いた解析が病勢把握に有用であることを示唆する報告があるが、MM については cfDNA による解析が有用であるか十分な検討がなされていない。そこで、本研究では、MM および MGUS 患者における KRAS、NRAS 変異の有無と cfDNA における変異アレル頻度 (mutation allele frequency: MAF) の割合が化学療法への感受性や予後に影響するか、あるいは MGUS や無症候性 MM から症候性 MM への進展に影響するかを検討し、最終的には cfDNA による KRAS、NRAS 変異の解析による MM の病勢把握が可能かを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

書面にて同意を得られた MM および MGUS 患者の骨髄液検体および血漿検体を採取し、骨髄検体からは DNA を、血漿検体からは cfDNA を抽出する。なお、これらの検体は通常診療の検査の際に採取する。

まずは骨髄由来の DNA 検体を用いて、本研究グループ独自で作成した骨髄腫の遺伝子変異解析パネルを用いた解析を次世代シーケンサーを用いて行い、KRAS や NRAS を含めたドライバー遺伝子変異の有無について検証する。その結果、ドライバー遺伝子変異が解析できた症例については、臨床情報と照らし合わせながら経時的に血漿検体を採取し、それらから抽出した血漿 cfDNA を用いてデジタル PCR で解析を行い、ドライバー遺伝子変異の MAF を算出する。

それと並行して、骨病変をはじめとした髄外病変を有する患者で、同部位から検体を採取できた症例については、パラフィン包埋後の FFPE 検体から DNA を抽出し上記と同様の解析を行い、ドライバー遺伝子変異の有無と MAF の解析を行った。

以上の方法で得られた情報をもとに、以下の解析を行った。

(1) cfDNA 解析で得られた MAF の変動と MM の病勢における相関性の検討

特に再発・難治例の MM 患者の骨髄検体でドライバー遺伝子変異が確認できた症例を対象に、経時的に血漿検体を採取し cfDNA における該当ドライバー遺伝子の MAF の推移と臨床所見 (血清 M 蛋白量、フリーライトチェーン (free light chain: FLC) など) との相関性について検討した。

(2) 同一個体内でのドライバー遺伝子 MAF の不均一性に関する検討

初発、再発を問わず骨病変を中心とした髄外病変を有し、髄外病変からの検体採取を行った患者について、骨髄由来の DNA と髄外病変由来の DNA でドライバー遺伝子の有無と、陽性だった場合その MAF を算出し、骨髄と髄外病変とで違いがあるか検討した。

(3) ドライバー遺伝子の有無と MM 患者の予後の相関性についての検討

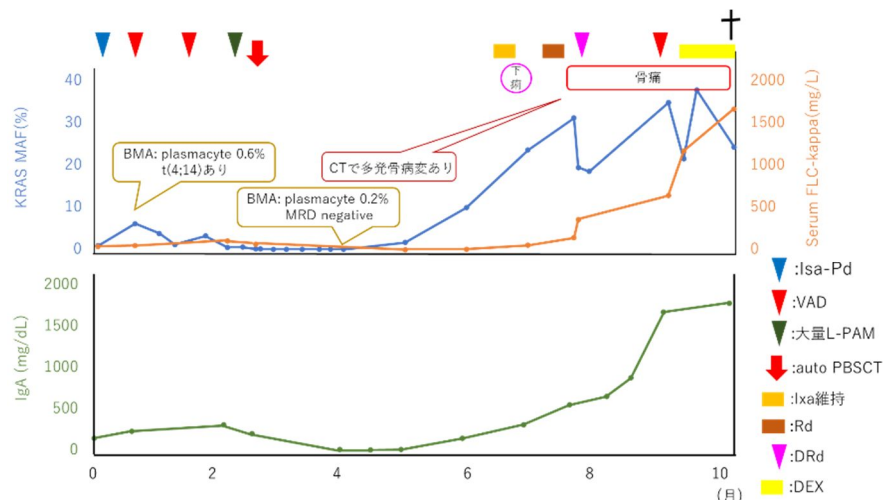
初発症候性 MM 患者を対象に、KRAS や NRAS、BRAF といったドライバー遺伝子変異の有無で無病生存割合 (progression free survival: PFS) や全生存割合 (overall survival: OS) 等に変異の有無による差があるか検討した。なお、これらの解析では EZR (Kandda Y. Bone Marrow Transplant, 2013) を用いて統計学的検討を行った。

4. 研究成果

(1) cfDNA 解析で得られた MAF の変動と MM の病勢における相関性の有無の検討

上記 (1) の解析を行った結果、少数例での検討ではあるが、cfDNA における MAF の推移が臨床所見と相関する症例が一定数認められることが示唆された。

その中で、再発難治例の IgA- 型で KRAS 遺伝子変異陽性の MM 症例（髄外病変あり）では、自家末梢血幹細胞移植後の骨髄での MRD は陰性で、血清 FLC や IgA の増加がみられていないにも関わらず、血漿 cfDNA における KRAS MAF が増加傾向となり、その直後に臨床的再発が見られた（右図）。この結果から、cfDNA での MAF の増加が臨床的再発よりも早期に MM の病勢悪化としてとらえられる可能性が示唆された。この結果については第 84 回日本血液学会学術集会での学会発表、並びに論文発表（Clinica chimica acta; 551 117590-117590 2023）にて報告済みである。



本症例以外にも同様にドライバー変異の MAF が病勢を反映して増減している症例が複数あり、今後さらなる解析や検討を行う予定である。

(2) 同一個体内でのドライバー遺伝子 MAF の不均一性に関する検討

本研究期間中に骨髄および髄外病変の DNA サンプルが得られた症例のうち、3 例でドライバー遺伝子変異が見られ（TP53 陽性例 1 例、KRAS 変異陽性 1 例、NRAS 変異陽性 1 例）、いずれも髄外病変は骨病変であった。この 3 例について骨髄と骨病変とでドライバー遺伝子変異の MAF に差があるか検討したところ、腫瘍細胞割合に対して 2 例は骨病変のほうが MAF 陽性の割合が高く、1 例は骨髄病変ではドライバー遺伝子変異は認めず、骨病変でのみ陽性であった。以上の結果から、髄外病変は骨髄病変と比べてドライバー遺伝子変異の頻度が高くなる、あるいは新たにドライバー遺伝子変異が加わり、より悪性度が高くなっている可能性が示唆された。本内容については、第 85 回日本血液学会学術集会にて報告済みである。

(3) ドライバー遺伝子の有無と MM 患者の予後の相関性についての検討

2018 年 4 月から 2023 年 4 月までに症候性 MM と診断された 15 例を対象に、ドライバー遺伝子変異の有無と予後との相関の有無について検討した。症例のうち 6 例はドライバー遺伝子変異陰性で、残り 9 例が陽性（KRAS 陽性 4 例、NRAS 陽性 1 例、BRAF 陽性 1 例、NRAS および BRAF 陽性 1 例）であった。ドライバー遺伝子変異の有無で 2 群に分け解析を行った。両群間に R-ISS や予後不良の遺伝子異常の有無も含め、患者背景に有意差はなく、また自家末梢血移植実施割合についても有意差はなかった。初回治療反応性については、ドライバー遺伝子陽性群で陰性群に比べて悪かったが有意差は認めなかった。しかし、PFS についてはドライバー遺伝子変異陽性群が有意に悪かった。以上のことから、ドライバー遺伝子変異は R-ISS などほかの予後不良因子とは独立した予後因子となる可能性が示唆された。本内容については、現在第 86 回日本血液学会学術集会での報告に向けて演題応募を行っている。

ただ、今回の検討はいずれも少数例かつ観察期間も短く、今後さらなる症例数および観察期間での検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masayo Yamamoto, Motohiro Shindo, Takuya Funayama, Chihiro Sumi, Takeshi Saito, Yasumichi Toki, Mayumi Hatayama, Yusuke Ono, Kazuya Sato, Yusuke Mizukami, Toshikatsu Okumura	4. 巻 551
2. 論文標題 Monitoring mutant KRAS in plasma cell-free DNA can predict disease progression in a patient with multiple myeloma: A case report.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry	6. 最初と最後の頁 117590
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cca.2023.117590	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 -

〔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 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、奥村利勝
2. 発表標題 血漿中のcfDNAを用いたリキッドバイオプシーで病勢を予測しえた再発・難治性多発性骨髄腫の1例
3. 学会等名 第84回 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

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、土岐康通、畑山真弓、佐藤一也、湯澤明夏、谷野美智枝、小野裕介、水上裕輔、奥村利勝
2. 発表標題 多発性骨髄腫患者での病変部位による遺伝子変異の発現頻度の検討
3. 学会等名 第85回 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2023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
研究協力者	水上 裕輔 (Mizukami Yusuke)	旭川医科大学・内科学講座 消化器内科学分野・教授 (10107)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	小野 裕介 (Ono Yusuke)	医療法人徳洲会札幌東徳洲会病院医学研究所・ゲノム診断研究部・部門長 (90101)	
研究協力者	進藤 基博 (Shindo Motohiro)	旭川医科大学・内科学講座 血液内科学分野・講師 (10107)	

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