

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月17日現在

機関番号： 20101
研究種目： 若手研究 (B)
研究機関： 2010～2011
課題番号： 22790917
研究課題名 (和文) 難治性形質細胞疾患の臨床病態に関連したエピジェティック異常の解析
研究課題名 (英文) Analysis of epigenetic aberration in plasma cell dyscrasia
研究代表者：
安井 寛 (YASUI HIROSHI)
 札幌医科大学・道民医療推進学講座・助教
研究者番号： 40448593

研究成果の概要 (和文)：

難治性形質細胞疾患である多発性骨髄腫の形質細胞において、ゲノム全体での DNA メチル化異常の解析を行いました。DNA メチル化により発現抑制される遺伝子群を同定し、一部の遺伝子では治療抵抗性や予後との関連が見いだされました。次に、ヒトゲノムの 42%を占めるレトロトランスポゾンに着目し、その低メチル化と染色体異常や予後との関連を見いだしました。さらに、次世代シーケンサーを用いて、ゲノム全体の DNA メチル化異常を解析し、病因や病態進展と関わる遺伝子発現や染色体異常との関連を調べております。

研究成果の概要 (英文)：

We analyzed gene expression profile in MM cells treated with or without demethylating agent to screen for the tumor related genes silenced by DNA methylation. We next examined the effect of DNA hypomethylation in retrotransposon for chromosomal aberration. Patients in MM with chromosomal deletion showed significant lower LINE-1 methylation levels than patients without deletion suggesting that LINE-1 hypomethylation are associated with chromosomal instability. Our ongoing study is to decipher the methylome in MM cells using high-throughput next-generation sequencer; and assess the association between the methylome status and the genome status.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：血液内科学・難治性形質細胞疾患

1. 研究開始当初の背景

形質細胞はB細胞の最終分化段階であり、免疫グロブリンを産生する。多発性骨髄腫は、この形質細胞が腫瘍化した悪性疾患である。

化学療法および大量化学療法併用自家末梢血幹細胞移植が標準療法であるが、経過中に治療抵抗性を獲得するため治療困難であり、平均生存は3～4年と予後不良である。近年、骨髄腫の遺伝子情報やシグナル伝達がより明らかとなり、その情報に基づく新規薬剤の開発が欧米を中心に活発に行われている。実際に、サリドマイドやプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブといった新規薬剤により、依然治療困難ではあるが、予後改善が認められている (Kyle & Rajkumar, Blood, 2008)。

原発性ALアミロイドーシスは、免疫グロブリン軽鎖由来のアミロイド蛋白が異常形質細胞により産生され、諸臓器に沈着し機能障害を引き起こす治療困難な疾患である。近年、上記のような多発性骨髄腫に効果的な治療をALアミロイドーシス症例に行うことにより、アミロイド産生形質細胞を減少もしくは消失させ、その結果、予後を改善しうることが明らかとなってきた。骨髄腫の分子病態の解明と治療法の開発は、骨髄腫のみならずALアミロイドーシスに対しても効果的であり、形質細胞を標的としたより一層効果的な治療法の開発が期待されている (Wechalekar et al, Br J Haematol, 2008)。

DNA異常メチル化による遺伝子不活化が、発がん・がん進展に関わる事が、明らかになってきている (Toyota & Issa, Semin Oncol, 2005)。一方、メチル化阻害剤アザシチジンやデシタピンが、近年、骨髄異形成症候群で有用性を認めており、DNAメチル化を標的とした血液悪性疾患の治療が有望視されている (Yasui & Imai, Anticancer Agents Med Chem, 2008)。多発性骨髄腫では、DNAメチル化異常による遺伝子不活化の報告として、申請者らのグループによるBNIPをはじめ (Murai et al, Br J Cancer, 2005)、細胞周期に関わる分子 (p15INK4b, p16INK4a)、細胞シグナルに関わる分子 (SOCS-1, SFRP)、アポトーシス関連分子 (DAPK, BAD, BAK, BIK, BAX) などの報告があるが、網羅的かつ系統的にDNAメチル化異常と遺伝子発現との関係を解析した報告は限られていた。

そのような状況の中、申請者らは、骨髄腫細胞株におけるメチル化阻害剤により発現変動する遺伝子群を検索し、細胞株および臨床検体を用いたメチル化プロファイルを行い報告したが (Nojima et al, Clin Cancer Res, 2009)、DNA異常メチル化の発癌・癌進展における意義解明のためには、さらに継続して研究を行う必要があると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、多発性骨髄腫と原発性ALアミロイドーシスとにおける形質細胞のDNA異常メ

チル化を系統的かつ網羅的に解析し、その頻度と意義を明らかにすることを目的とする。細胞株および臨床検体の解析により、DNA異常メチル化により不活化される疾患関連遺伝子の候補を検索し、それらの遺伝子型と表現型との相関を各々検証することで、両疾患の発生と進展における役割を明らかとする。次に、ゲノムワイドなメチル化異常を解析するため、ヒトゲノムの42%を占めるレトロトランスポゾンに注目したメチル化解析や、次世代シーケンサーを用いたメチローム解析を行い、臨床情報・細胞遺伝学的情報との相関を解析し、DNAメチル化異常と難治性形質細胞疾患 (多発性骨髄腫・原発性ALアミロイドーシス) の病因・進展との関連を検討する。

3. 研究の方法

はじめに、骨髄腫細胞株を用いてメチル化阻害剤処理で発現回復する遺伝子群をDNAマイクロアレイ法により選り出し、それらの遺伝子群に対して細胞株や臨床検体でのDNA異常メチル化頻度をバイサルファイトパイロシーケンス法で解析し、臨床情報を含めた表現型との相関を検討した。次に、レトロトランスポゾンのうち、LINE-1に注目し、骨髄腫細胞およびALアミロイドーシスの異常形質細胞を用いて、そのメチル化の状態をメチル化定量法で評価する。さらに、DNAメチル化領域の新しいゲノムワイドスクリーニング法として、多発性骨髄腫細胞に対して次世代シーケンサーを用いた Methyl-CpG-binding domain protein (MBD) シーケンス法を試みる。これらにより判明したメチル化情報と、臨床情報・細胞遺伝学的情報との相関を解析する。形質細胞における染色体異常の検出は、G-banding法とアレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション法 (Array Comparative Genomic Hybridization: aCGH) を用いる。

4. 研究成果

デシタピンにより発現誘導される腫瘍関連遺伝子を複数同定した。そのうちの一つである Dexamethasone-induced Ras-related protein 1 (RASD1) は、多発性骨髄腫治療のキードラッグであるデキサメサゾンで発現誘導される遺伝子であり、プロモーター領域の高メチル化に伴いRASD1発現低下を認める細胞株ほど、デキサメサゾンへの感受性が低くなる傾向を認めた。デキサメサゾン低感受性株は、デシタピン処理により、デキサメサゾン感受性が増強したことから、RASD1メチル化とデキサメサゾン感受性が関連している可能性が示唆された。臨床検体での検討で

は、難治性・再発性症例において、RASD1 のメチル化頻度が高くなる傾向を認めた。

次に、RASD1 メチル化を伴いデキサメサゾン低感受性である細胞株においてDNAマイクロアレイ解析を行い、RASD1 同様にデシタピン・デキサメサゾン併用処理にて発現が上昇する遺伝子を同定し、そのメチル化を解析した。そのうちの一つBNIP3はプロモーター領域の高メチル化を認めていた。BNIP3 の高メチル化はHellerら (Cancer Res, 2008) の報告では予後不良因子でもあるが、デシタピン投与により抑制されていたBNIP3 発現が回復する可能性が示唆された。

次に、多発性骨髄腫および原発性ALアミロイドーシスにおいてゲノムワイドなメチル化レベルを検討するため、ヒトゲノムの 42% を占めるレトロトランスポソンのメチル化レベルを検討した。レトロトランスポソンは自律的に転移できるトランスポソンの1種であり、ゲノム上に繰り返し現れる同一の配列である反復配列に分類される。長鎖散在反復配列と短鎖散在反復配列を有するものがあり、前者ではLINE-1、後者ではAlu 配列と呼ばれるものが代表的で、ゲノム上のそれぞれ17%と10%を占めている。正常形質細胞・monoclonal gammopathy undetermined significance (MGUS)・多発性骨髄腫・ALアミロイドーシスの臨床検体において、LINE-1のメチル化レベルを解析した結果、正常形質細胞と比較して、多発性骨髄腫の前状態であるMGUS、多発性骨髄腫へと進展するにつれてLINE-1 メチル化レベルの低下が認められた。原発性ALアミロイドーシスは少数例でありpreliminaryな結果だが、MGUS相当と考えられた。LINE-1 の低メチル化は染色体に不安定性をもたらすという報告があることから (Iskow RC et al, 2010, Cell)、LINE-1 メチル化レベルと染色体不安定性との関連を検討した。その結果、LINE-1 低メチル化により染色体欠失が多い傾向を認め、13 番染色体の欠失のある群ではない群と比べて有意にLINE-1 の低メチル化を認めた。さらに、LINE-1 の低メチル化を認める骨髄腫症例は、有意に予後が悪い結果を認めた。

最後に、次世代シーケンサーを用いて、骨髄腫細胞 (臨床検体 9 例・細胞株 2 例) のメチローム解析を行った。現在、その解析結果とaCGHによって評価されたゲノムコピー数変化およびDNAマイクロアレイによって評価された遺伝子発現との関連性を解析している。同手法は、最近普及しつつあるメチル化アレイと比較してプローブに規定されないため、既知の遺伝子以外の解析やGene bodyのメチル化解析など、従来法では難しかったメチル化解析が可能であり、新たな知見を得られる可能性が高いことから、今後も継続して研究を進める必要があると考える。

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4件)

1. Watanabe Y, Yasui H, et al. In vitro and in vivo antitumor effects of recombinant bispecific antibodies based on humanized anti-EGFR antibody. *Oncol Rep.* 2011;26 (4):949-55 (査読有) DOI:10.3892/or.2011.1382
2. Sasaki S, Yasui H, et al. Interferon- α/β and anti-Fibroblast Growth Factor Receptor 1 monoclonal antibody suppress hepatic cancer cells in vitro and in vivo. *PLoS ONE.* 2011; 6(5):e19618 (査読有) DOI:10.1371/journal.pone.0019618
3. Miyake N, Yasui H, et al. Loss-of-function mutations of CHST14 in a new type of Ehlers-Danlos syndrome. *Hum Mutat.* 2010; 31(8):966-74 (査読有) DOI: 10.1002/humu.21300
4. Ikeda H, Yasui H, et al. PI3K/p110 δ is a novel therapeutic target in multiple myeloma. *Blood.* 2010;116(9):1460-8. (査読有) DOI:10.1182/blood-2009-06-222943

[学会発表] (計13件)

1. Nojima M, Yasui H, et al. Epigenetic changes in repetitive elements are closely associated with genetic and clinical features in multiple myeloma. The 39th Congress of the ISOBM, Oct 17, 2011, Firenze, Italy
2. 安井 寛ら 次世代シーケンサーを用いた多発性骨髄腫におけるメチローム解析の試み 第73回日本血液学会学術集会 口演、名古屋、2011年10月16日
3. 池田 博, 安井 寛ら CD138 抗体治療は骨髄微小環境下にいる骨髄腫細胞に対して細胞障害性を持つ. 第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月5日
4. 野島正寛, 安井 寛ら 多発性骨髄腫に

におけるDNAメチロームと染色体異常：メチル化DNA結合蛋白を利用した次世代シーケンシングによる検討 第70回日本癌学会学術総会、口演、名古屋、2011年10月3日

5. 青木由佳, 安井 寛ら 多発性骨髄腫におけるDNA繰り返し配列の低メチル化と染色体異常の関連 第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月3日
6. 野島正寛, 安井 寛ら エピゲノム解析による造血器腫瘍の新たな分子標的の同定 第20回日本癌病態治療研究会年会、東京、2011年6月17日
7. 野島正寛, 安井 寛ら 多発性骨髄腫における次世代シーケンサーを利用したメチローム解析 第5回日本エピジェネティックス研究会年会、熊本、2011年5月19日
8. Nojima M, Yasui H, et al. Methylome analysis by the combination of methylated DNA enrichment and next-generation sequencing in multiple myeloma. AACR 102nd Annual Meeting 2011, Apr 04, 2011, Orlando, FL, USA.
9. 青木由佳, 安井 寛ら 多発性骨髄腫におけるDNAメチル化遺伝子の網羅的スクリーニングおよびRASD1遺伝子メチル化のデキサメサゾン感受性への関与 第35回日本骨髄腫研究会総会、口演、富山、2010年11月20日
10. 豊田 実, 安井 寛ら エピゲノム解析による造血器腫瘍の新たな分子標的の同定 第72回日本血液学会総会、シンポジウム、横浜、2010年9月26日
11. 高丸博之, 安井 寛ら 未分化型胃癌におけるDNAメチル化異常の解明. 第69回日本癌学会学術総会、大阪、2010年9月23日
12. 池田 博, 安井 寛ら PI3K/p110 δ 阻害剤は多発性骨髄腫細胞に対して細胞障害性を有する. 第69回日本癌学会学術総会、大阪、2010年9月22日
13. 安井 寛ら 多発性骨髄腫におけるDNAメチル化の網羅的解析と治療抵抗性予測への応用 第61回日本電気泳動学会総会、口演、札幌、2010年9月18日

〔図書〕(計1件)

1. 安井 寛, 石田禎夫 II-3. 発症機構とエピジェネティックス異常 6)多発性骨髄腫. 造血器腫瘍とエピジェネティクス-治療への応用と新たな展開-: 木崎昌弘編: 医薬ジャーナル社: 2012; in press

6. 研究組織

研究代表者

安井 寛 (YASUI HIROSHI)

札幌医科大学・道民医療推進学講座・助教

研究者番号: 40448593