

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 18 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460665

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを用いた骨髄腫におけるnon-coding RNAの役割解析

研究課題名(英文)Analyzing role of non-coding RNA in multiple myeloma by using next generation sequencer

研究代表者

半田 寛 (Handa, Hiroshi)

群馬大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90282409

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫(MM)前がん病変MGUS、難治性骨髄外形質細胞腫(EMM)を対象に、non coding RNAが疾患進行にどのように関わるのかを次世代シーケンサーRNA-seqで解析した。その結果MALAT1とNEAT1がMMとEMMでMGUSより高発現しており、特にMALAT1はEMMでMMより数千倍も高発現していた。MM細胞株でMALAT1をノックダウンしたが、細胞増殖、細胞運動遺伝子発現には変化は認められなかった。MALAT1、NEAT1発現量はボルテゾミブとドキシソルビシンにより増加した。薬剤ストレスによって誘導されたMALAT1やNEAT1がEMM形成に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed multiple myeloma (MM), precancerous stage MGUS, refractory extramedullary plasmacytoma (EMM) by the next-generation sequencer how non coding RNA was associated with disease progression. As a result, MALAT1 and NEAT1 expressed higher in MM and EMM than in MGUS, particularly, MALAT1 expressed markedly higher in EMM with several thousand fold. We knocked down MALAT1 in MM cell line, but the change was not found in a cell proliferation, cell motility gene expression. MALAT1 and NEAT1 expression increased by bortezomib and doxorubicin. It was suggested that induced MALAT1 and NEAT1 by drug stress were associated with EMM formation.

研究分野：血液内科学 血液検査学

キーワード：多発性骨髄腫 non coding RNA 次世代シーケンサー 髄外形質細胞腫 ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫(以下 MM)の予後は、大量化学療法、ボルテゾミブやレナリドミド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。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。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の多段階発癌を示唆するものである。近年MMの分子機構が明らかになりつつあり、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ている。

今世紀に入って、大規模なトランスクリプトーム解析が行われるようになり、ヒトやマウスではたんぱく質をコードしないゲノム領域が大量にRNAへ転写されていることが明らかになってきている。そしてこのたんぱく質をコードしないRNA: non-coding RNA(ncRNA)こそが生物の複雑さを生み出す基盤となっているのではないかと考えられつつあり、ncRNAの中ではmicroRNAについて、この10年間でかなり研究が進みその機能などについてかなり詳細に判明してきている。

MicroRNAは19~25塩基のpolyAを持たないRNAで、non-coding RNA(ncRNA)の一種である。主に遺伝子DNA intronに存在し2000年以来、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が、癌との関連を報告するものは多い。肺癌細胞においてはDnmt発現量の多いものが予後不良でありDnmt発現をmiR-29 familyがコントロールしていること(PNAS 2007) またmiR-29が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されている(Oncogene 2007) 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) また2005年ころよりmicroRNAのMMへの関わりは報告が増加しつつある(Blood 2008, 2009, Cancer 2012) 我々の研究室でも、microRNA発現を純化した形質細胞にて検討したところ、MMにおいてmiR-15a, 15b, 16発現の著明な減少および、そのターゲット遺伝子の著明な高発現を確認、さらにこれがMGUSとMMの間にも明らかな差を認めたことからMM発がんにおいて重要な役割を果たすことを示唆することを報告した。さらにmiR-29がDnmt発現と負に相関しDnmt発現を制御すること、HDAC発現を制御すること、DnmtがmiR-34のメチル化を制御することから、microRNAとエピジェネティクスとの間の複雑なネットワークを見出した。我々は、多くのmicroRNAがMMへの進行とともに発現量が低下していく現象を発見しているが、その機序についてはまだ判明していないことが多い。MicroRNA以外のncRNAについての解析は長らく進んでいなかったが、近年その機能が明らかになりつつある。その機能にはクロマチン修飾酵素群と相互作用することにより遺伝子発現制御に関わるもの、核内構造体を形成する役割をもつもの、核酸修飾やスプライシングに関わるものなどが挙げられているが、まだその全容については不明のことが多い。我々も現在、MMの長鎖ncRNAについて解析を行っているが、リアルタイムPCRやマイクロアレイによる解析では、未知の長鎖ncRNAについては解析不能である。

次世代シーケンサー(NGS)は、サンガ法を原理とするDNAシーケンサーより圧倒的に早く、正確にゲノムシーケンスを可能にした装置である。NGSにより、ヒト全ゲノム解析が容易となり、癌をはじめとした様々な疾患においてその解析により、疾患の遺伝子的特徴や発症メカニズムが判明しつつある。MMにおいてもNGSによる全ゲノムシーケンスの結果Clonal evolutionの存在が確認された。NGSの大規模な塩基配列決定能力を背景に、網羅的にRNAシーケンス(RNA-Seq)解析を行い、そのデジタルカウントによりトランスクリプトーム解析を行う手法が一般化してきている。RNA-Seq解析においては、蛋白をコードするmRNAに加えて、同一のスキームより調整された鋳型からnc-RNAの情報も副次的に得られる。これらNGSの持つ高度な能力を使用し、まだMMにおいては未解明なncRNAを解析する本研究を立案した。

## 2. 研究の目的

近年MMの分子機構は、染色体解析、機能解析、発現プロファイリング、全ゲノムシーケンスなどを通して明らかになりつつあり病期の進展・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。今世紀の大規模なトランスクリプトーム解析により、ヒトやマウスではたんぱく質をコードしないゲノム領域が大量にRNAへ転写されていることが明らかになってきている。そしてこのたんぱく質をコードしないRNA:non-coding RNA(ncRNA)こそが生物の複雑さを生み出す基盤となっており、エピジェネティック遺伝子発現制御を通して発癌に関わると考えられるようになってきている。本研究においては、近年発展の著しい次世代シーケンサー技術を用いて、これらncRNAのMM発癌における役割を明らかにすることを目的とする。

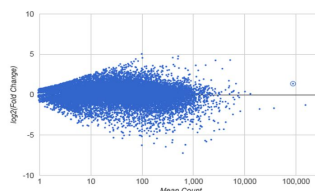
### 3. 研究の方法

同意を得て凍結保存し、予後が判明しているMMおよびMGUS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MM細胞を分離保存、DNA、RNA、ncRNA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、ncRNAを抽出保存する。抽出したRNAを次世代シーケンサー(NGS) Ion ProtonによりRNAシーケンスを行う。シーケンスデータをゲノム上にマップし、既知ncRNA塩基配列変異の解析、未知ncRNAの発見、リード数解析により発現定量を行う。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、機能解析を行う。

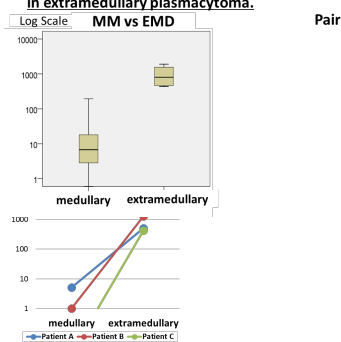
### 4. 研究成果

多発性骨髄腫(Multiple Myeloma: MM)およびその前がん病変であるMonoclonal Gammopathy of Undetermined Significance(MGUS)さらにMMから進行し難治性となった骨髄外形質細胞腫(Extramedullary Myeloma)の細胞を対象に、non coding RNAがこの疾患の進行にどのように関わっているのかを検討した。3名の正常、8名のMGUS、10名のMMの骨髄形質細胞および5名のEMM細胞からRNAを採取しIllumina Next-seqを使って、non coding RNAを含んだ全トランスクリプトーム解析(RNA-seq)を行った。その結果、まず既知のlong non coding RNAとしてMALAT1/NEAT2とNEAT1がMMとEMMで高発現していることが明らかになった。これを定量PCRでさらに110名のMMと48名のMGUS、19名の正常形質細胞で確認したところ、どちらのlong non coding RNAもMMで著明発現が亢進していた。特にMALAT1はEMMでMMより数千倍も高発現しておりEMM形成との関連が示唆された。MALAT1の機能を検討するためAntisense RNA LNA-GapmeRを用いてMM細胞株のMALAT1をknock down(KD)し、細胞増殖および細胞運動解析、RNA-seqを行った。KDによりMALAT1発現量は50%以下に減少したものの、細胞増殖には変化なく、細胞運動やそれに関わる遺伝子発現には変化は認められなかった。MM細胞におけるMALAT1は同じ

long non coding RNA NEAT1の発現量と正相関し、またHSP90発現量とも相関した。細胞株においてはプロテアソーム阻害薬ボルテゾミブや抗がん薬ドキソルビシン投与により、MALAT1、NEAT1、HSP90の発現量は増加した。EMMはMM治療の好機に出現することが多い腫瘍であり薬剤ストレスによって誘導されたMALAT1がその形成に関わることが示唆された。



### III. MALAT1 expressions were significantly higher in extramedullary plasmacytoma.



### 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 0 件)

[学会発表](計 4 件)

1. Handa H. et al Long non-coding RNA MALAT1 is associated with the progression of multiple myeloma and induced by cellular stress. Eur Haematol Asso 2016 Copenhagen Denmark
2. Kimura K, Handa H et al. Loop regulation between microRNAs and epigenetics underlie microRNA dysregulation in multiple myeloma and is associated with the disease progression Am Soci Hematol 2015 Orland FL USA
3. Kuroda K, Handa H et al. Long non-coding RNA MALAT1 is associated with the progression of multiple myeloma and induced by cellular stress Am Soci Hematol 2015 Orland FL USA
4. Handa H, Masuda Y et al. Network of micro RNA and epigenetics are associated with the progression of MGUS and multiple myeloma Eur Haemaol Asso 2014 Milan Italy

〔図書〕(計 1 件)

半田寛、黒田裕子、村上博和 多発性骨髄腫  
Updating 第10巻骨髄腫治療を理解するための  
Myeloma Biology ~ここに注目~ Lnc  
non-coding RNA 2017年 p90-97 医薬ジャー  
ナル社  
〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

半田 寛 (Handa Hiroshi)  
群馬大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：60701323

### (2) 研究分担者

村上博和 (Murakami Hirokazu)  
群馬大学・大学院保健学研究科・教授  
研究者番号：40166260

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )