

平成 21 年 6 月 3 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591127

研究課題名（和文） 多発性骨髄腫の SKY-ゲノムアレイ解析と臨床応用

研究課題名（英文） Genomic analysis of multiple myeloma using SKY and oligonucleotide array

研究代表者

谷脇 雅史 (TANIWAKI MASAFUMI)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：80163640

研究成果の概要：

多発性骨髄腫の病型診断と治療法の開発に寄与するバイオマーカーを同定することを目的として今回の研究を行った。そのために、多色蛍光染色体分析 (SKY) 法とゲノムアレイ解析により、発症と進展に関与する遺伝子異常の同定に注力した。多発性骨髄腫と B 細胞リンパ腫のゲノム異常を比較検討し、両者に共通し高頻度に異常を検出した領域の一つである 11q22 の loss と 18q21.1-q21.3 の gain を解析した。11q22 領域の loss は 4Mb であったが、候補遺伝子はまだ同定できていない。18q21.1-q21.3 領域に存在する *SMAD4*, *DCC*, *STARD6*, *TCF4*, *TXNL1*, *WDR7*, *FECH*, *NARS*, *MALT1*, *BCL2* の発現を RT-PCR で解析した。その結果、*DCC* の発現に明らかな差が認められた。B 細胞リンパ腫株では発現が消失するか非常に減弱していた。一方、多発性骨髄腫では殆どに発現が認められたが、3 株で exon1 を欠いた発現産物を検出した。Exon1 にかかわって結合する未知の配列の可能性について、Bubble PCR で検討中である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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：多発性骨髄腫, SKY, FISH, ゲノムアレイ, 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫では、約 60% の症例で免疫グロブリン H 鎖遺伝子 (*IGH*) の染色体再構成により、腫瘍化に関与する遺伝子が活性化される。*IGH* 転座の相手遺伝子には、*FGFR3/MMSET*, *MUM1(IRF4)*, *MAF*, *MAFB*, *CCND1*, *CCND3* などがある。一方、

高二倍数性 (hyperdiploidy) や第 13 染色体長腕欠失 (13q-) の疾患特異性と臨床的意義が強調されている。例えば、t(4;14) は予後不良因子であり、その転座の結果である活性化 *FGFR3* キナーゼを阻害する低分子化合物の開発が進んでいる。従って、染色体ゲノム異常に起因する遺伝子異常は、診断、予後推定

の指標や分子治療薬開発の標的になる。このような観点から、多発性骨髄腫に発症に関与する遺伝子単離の共同研究や診断への応用に取り組んできた (Blood 1997, Cancer Genet Cytogenet, 2000, Immunity 2001, Jap J Cancer Res 2001, Leukemia 2003)

2. 研究の目的

研究開始当初の背景で述べたように、多発性骨髄腫の腫瘍化と増悪進展の分子機構はきわめて複雑であり、多数の遺伝子異常が蓄積している。従って、ゲノム異常を統合的に解析する必要があり、DNA アレイ解析により新発見が得られている (Cancer Cell 9:313, 2006)。私共は、高密度 SNP アレイ解析に多色蛍光染色体解析 (Spectral Karyotyping, SKY) を併用し、染色体構造異常と切断点を詳細に解析している。18q21 の均一染色部位 (homogeneously staining region, HSR) による増幅、VCAMI の含まれる 1p21 の増幅、11q22 のホモ欠失を同定している (第 65 回日本癌学会総会, 第 68 回日本血液学会総会)。今回の研究は、多発性骨髄腫の予後推定と治療薬の開発に寄与する標的分子を同定することを目的として、以下の点を明らかにする。

(1) 多発性骨髄腫の腫瘍化と増悪進展に関与する遺伝子異常を、高密度ゲノムアレイと SKY を用いて細胞株を解析することによって同定する。同定された分子について、保存検体を含む多数の臨床例で予後推定に寄与するか否かを検討する。

(2) すでに同定している 18q21 (2 箇所, 各々約 500KB) と 1p21 の増幅領域 (約 3MB) について候補遺伝子を特定する。過剰発現している遺伝子については、siRNA の導入による細胞増殖抑制の検討を行い、分子標的治療薬の候補になるか否かを検討する。

(3) 11q22 に同定しているホモ欠失領域 (約 4MB) における責任遺伝子を同定するために、候補遺伝子の発現をノザンプロットイングや RT-PCR で解析する。

3. 研究の方法

(1) 18q21 増幅領域における候補遺伝子の同定

ゲノムアレイ解析によって、すでに第 18 染色体長腕 (18q21) で 10 倍の増幅を同定している。SKY と FISH 解析から、増幅部位は、均一染色部位 (HSR) を形成していることが明らかにした。骨髄腫患者の胸水から樹立された細胞株に見出された異常であり、同一患者の骨髄から樹立された細胞株にはこの異常が見出されていない。従って、骨髄腫の増悪進展に関与する遺伝子が想定される。

18q21 の増幅領域は 2 箇所あり、いずれも約 500KB のサイズである。セントロメア側の増

幅部位には *BCL2*, *FVT1*, *PHLPP* が含まれていたが、テロメア側の 430KB の増幅部位には遺伝子はマップされていない。後者の領域について、エキソントラップによる発現遺伝子の同定、またノザンプロットイングによりマイクロ RNA を直接検出するほか、前駆体の発現を RT-PCR で検討する。

未知のマイクロ RNA の場合にはクローニングを行う。新規のマイクロ RNA が検出された場合には、発現を各臓器と血液腫瘍細胞株や臨床検体で発現を検討し、腫瘍化への関与を検討する。

(2) 欠失と染色体再構成が同時に認められる領域の FISH 解析

ゲノムアレイで同定した欠失領域と、SKY 解析の染色体転座の一致する領域を解析する。そのために、SKY で同定した染色体転座の切断点を FISH 法で解析する。切断点をカバーする BAC から遺伝子を特定し、欠失の切断点領域に存在する遺伝子との再構成を RT-PCR で検討する。必要に応じて、点突然変異の検討も行う。

ゲノムアレイ解析によって同定できたホモ欠失については、ノザンプロットイングや RT-PCR で発現を解析する。すでに第 11 染色体長腕 (11q22) のホモ欠失を同定している。*YAP1*, *PORMIN*, *MMP family* などが含まれており、完全に発現が消失している遺伝子については、*in vitro* の機能解析や遺伝子改変マウスを作成して個体レベルで解析する。

4. 研究成果

多発性骨髄腫では、約 60% の症例で免疫グロブリン H 鎖遺伝子 (*IGH*) の染色体再構成により、腫瘍化に関与する遺伝子が活性化される。*IGH* 転座の相手遺伝子には、*FGFR3/MMSET*, *MUM1(IRF4)*, *MAF*, *MAFB*, *CCND1*, *CCND3* などがある。しかし、多発性骨髄腫の腫瘍化と増悪進展の分子機構はきわめて複雑であり、多数の遺伝子異常が蓄積している。

今回の研究では、Affymetrix 社の高密度オリゴヌクレオチドアレイと多色蛍光染色体解析法で多発性骨髄腫細胞株 11 株と B 細胞リンパ腫細胞株 9 株を解析し、ゲノム異常の集中する領域について遺伝子発現を検討した。いずれにも共通する 11q22 のホモ欠失と 18q 領域の gain に注目し解析した。

11q22 領域の loss は 4Mb であったが、候補遺伝子はまだ同定できていない。18q21.1-q21.3 の gain 領域に存在する *SMAD4*, *DCC*, *STARD6*, *TCF4*, *TXNL1*, *WDR7*, *FECH*, *NARS*, *MALT1*, *BCL2* の発現を RT-PCR で解析した。その結果、*DCC* の発現に差が認められ、B 細胞リンパ腫株では発現が消失するか非常に減弱していた。一方、多発性骨髄

腫では殆どに発現が認められたが、3株で exon1 を欠いた発現産物を検出した。Exon1 にかわって結合する未知の配列の可能性について、Bubble PCR で検討中である。

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 10 件)

- ① Ashihara E, Kawata E, Nakagawa Y, Shimazaki C, Kuroda J, Taniguchi K, Uchiyama H, Tanaka R, Yokota A, Takeuchi M, Kamitsuji Y, Inaba T, Taniwaki M, Kimura S, Maekawa T. beta-catenin small interfering RNA successfully suppressed progression of multiple myeloma in a mouse model. *Clin Cancer Res.* 15:2731-2738, 2009, 査読あり
- ② Murakami H, Shimizu K, Sawamura M, Suzuki K, Sugiura I, Kosugi H, Shimazaki C, Taniwaki M, Abe M, Takagi T. Phase II and pharmacokinetic study of thalidomide in Japanese patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *Int J Hematol.* 2009 Apr 28. [Epub ahead of print], 査読あり
- ③ Fuchida SI, Shimazaki C, Hirai H, Akamatsu S, Yamada N, Uchida R, Okano A, Okamoto M, Inaba T, Taniwaki M. The effects of thalidomide on chemotactic migration of multiple myeloma cell lines. *Int J Lab Hematol.* 30:220-229, 2009, 査読あり
- ④ Chinen Y, Taki T, Nishida K, Shimizu D, Okuda T, Yoshida N, Kobayashi C, Koike K, Tsuchida M, Hayashi Y, Taniwaki M. Identification of the novel AML1 fusion partner gene, LAF4, a fusion partner of MLL, in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia with t(2;21)(q11;q22) by bubble PCR method for cDNA. *Oncogene* 27:2249-56, 2008, 査読あり
- ⑤ Hidaka T, Nakahata S, Hatakeyama K, Hamasaki M, Yamashita K, Kohno T, Arai Y, Taki T, Nishida K, Okayama A, Asada Y, Yamaguchi R, Tsubouchi H, Yokota J, Taniwaki M, Higashi Y, Morishita K. Down-regulation of TCF8 is involved in the leukemogenesis of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 112:383-393, 2008, 査読あり
- ⑥ Kuroda J, Matsumoto Y, Tanaka R, Kurita K, Kobayashi T, Shimizu D, Kimura S, Ashihara E, Horiike S, Shimazaki C, Taniwaki M. JAK2V617F-positive essential thrombocythemia and multiple myeloma with IGH/CCND1 gene translocation coexist, but originate from separate clones. *Acta Haematol.* 120:177-181, 2008, 査読あり
- ⑦ Kuroda J, Kamitsuji Y, Kimura S, Ashihara E, Kawata E, Nakagawa Y, Takeuchi M, Murotani Y, Yokota A, Tanaka R, Andreeff M, Taniwaki M, Maekawa T. Anti-myeloma effect of homoharringtonine with concomitant targeting of the myeloma-promoting molecules, Mcl-1, XIAP, and beta-catenin. *Int J Hematol.* 87:507-515, 2008, 査読あり
- ⑧ Kuroda J, Taniwaki M. Involvement of BH3-only proteins in hematologic malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008 Nov 18. [Epub ahead of print]

- ⑨ Taniwaki M, Matsumoto Y.
Cytogenetic and molecular basis of
multiple myeloma. *Nippon Rinsho*.
2007 Dec;65(12):2179-86. Review.
Japanese. 査読なし
- ⑩ Uchida R, Ashihara E, Sato K, Kimura
S, Kuroda J, Takeuchi M, Kawata E,
Taniguchi K, Okamoto M, Shimura K,
Kiyono Y, Shimazaki C, Taniwaki M,
Maekawa T. Gamma delta T cells kill
myeloma cells by sensing mevalonate
metabolites and ICAM-1 molecules on
cell surface. *Biochem Biophys Res
Commun*. 354:613-8, 2007

[学会発表] (計 8 件)

- ① 黒田純也. Homoharrington のアポト
ーシス抵抗性分子多重阻害による
抗骨髄腫細胞効果. 第 33 回日本骨
髄腫研究会総会, 2008 年 11 月 15 日,
広島
- ② 古林 勉. JAK2V617F 陽性本態性血小
板増加症に合併した IGH/CCND1 陽性
JAK2V617 陰性多発性骨髄腫: 造血器腫
瘍重複における異クローン製の証明. 第
33 回日本骨髄腫研究会総会, 2008 年 11
月 15 日, 広島
- ③ 谷口享子. Bortezomib による末梢神
経障害とその発症因子に関する解
析. 第 33 回日本骨髄腫研究会総会, 2008
年 11 月 15 日, 広島
- ④ 古林 勉. 難治・再発多発性骨髄腫
に対するボルテゾミブ/デキサメサ
ゾン併用 (BD) 療法. 第 7 回日本臨
床腫瘍学会学術集会. 2009 年 3 月
21 日, 名古屋
- ⑤ 山下美穂子. CD20 陽性形質細胞性腫瘍
の 2 例. 第 69 回日本血液学会・第 49 回
日本臨床血液学会合同総会, 2007 年 10
月 12 日, 横浜
- ⑥ 内山人二. 多発性骨および髄外腫瘍で発
症した igD 型骨髄腫の 2 症例. 第 69 回
日本血液学会・第 49 回日本臨床血液学
会合同総会, 2007 年 10 月 12 日, 横浜
- ⑦ 西田一弘. 多発性骨髄腫と B 細胞リンパ
腫に由来する樹立細胞株のゲノムアレ
イと FISH 解析. 第 32 回日本骨髄腫研究
会総会, 2007 年 11 月 10 日, 東京
- ⑧ 志村知穂. Bortezomib 投与中に尿閉をきた
した多発性骨髄腫の 4 例. 第 32 回日

本骨髄腫研究会総会, 2007 年 11 月 10 日,
東京

[図書] (計 2 件)

- ① 谷脇 雅史. 内科学第 9 版 (分担). 朝
倉書店, 2007
- ② 滝 智彦, 谷脇雅史. 臨床検査ガイド
2009-2010 (分担). 文光堂, 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷脇 雅史 (TANIWAKI MASAFUMI)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号: 80163640