

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07179

研究課題名(和文) プロテアソーム阻害剤獲得耐性機序の解明と耐性を克服する新規分子標的の探索研究

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of resistance to proteasome inhibitors and search for novel molecular targets to overcome resistance

研究代表者

李 政樹 (RI, MASAKI)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師

研究者番号：00567539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、プロテアソーム阻害剤の薬剤耐性機序を、臨床レベルで明らかにすることを目的とし、骨髄腫患者様の薬剤耐性前後で採取された検体(骨髄腫細胞、末梢血血清：small RNA)の比較解析を行った。その結果、プロテアソーム阻害剤のボルテゾミブの感受性のある複数個の血清マイクロRNAが同定され、また、プロテアソーム阻害剤の獲得耐性に関連する複数の遺伝子変異を同定することができた。また、耐性時に発現量の変動を示す共通した遺伝子は同定されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ボルテゾミブの感受性に関わる因子(マイクロRNAおよび遺伝子変異)を、細胞株を用いた検証でなく臨床検体から直接同定しえたことは意義が大きいと考えられる。本研究結果により、患者さんの骨髄腫治療において、プロテアソーム阻害剤の感受性や耐性パターンに応じたバイオマーカー開発に寄与し、至適な治療法を確率することが可能となりうることで、難治性の骨髄腫患者の予後改善におおいに寄与できると考えている。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the mechanism of drug resistance of proteasome inhibitors at the clinical level using the samples, including myeloma cells and peripheral blood serum: small RNA, collected before and after the administration of proteasome inhibitors in myeloma patients. As a result, several serum microRNAs sensitive to the proteasome inhibitor treatment were identified. In addition, several gene mutations related to the acquired resistance of the proteasome inhibitor could be identified. Finally, a common gene showing an altered expression level after the drug resistance was not identified.

研究分野：造血器腫瘍

キーワード：多発性骨髄腫 プロテアソーム阻害剤 耐性 感受性

1. 研究開始当初の背景

近年、多発性骨髄腫の治療として、新規薬剤(ボルテゾミブ・サリドマイド・レナリドミド・ポマリドミド)が導入され、従来の抗がん剤では見られなかった奏効率及び無増悪生存期間の延長が見られるようになった。しかし、これらの新規薬剤の導入によっても、骨髄腫患者様の骨髄腫の治療には至らず、治療途中で薬剤の耐性化が見られ、薬剤耐性機序の克服が大きな課題として残っている。新規薬剤の目まぐるしい開発の一方で、薬剤の耐性メカニズムを詳細に解析する試みはあまりなされていない。我々はこれまで、ボルテゾミブに注目した研究を進め、その作用機序として、アポトーシス因子である転写因子 NOXA の活性上昇(Ri M et al. Cancer Sci 100:341, 2009)及び、薬剤耐性としてプロテアソームの遺伝子変異を同定してきた(Ri M et al. Leukemia 24:1506, 2010)。さらに、骨髄腫細胞が恒常的な小胞体ストレス状態にあることに着目し、小胞体ストレス応答を破綻する新規分子標的薬を開発(XBP1 阻害剤)ならびに、プロテアソーム阻害剤耐性細胞には XBP1 阻害剤が有効であることを示した(Ri M et al. Blood Cancer Journal 2:e79, 2012)。これまでの研究は主に骨髄腫細胞の腫瘍細胞自身の特性を同定したものであるが、その研究成果を踏まえて、微小環境を形成する周辺細胞と腫瘍細胞の相互作用がもたらす薬剤感受性や耐性への影響を含めた研究へと発展させてきている。新規薬剤は骨髄腫細胞だけでなく微小環境内の周辺細胞にも強く作用するため、周辺細胞の特性を把握しそれを反映させる手法も取り入れることは、薬剤の重要な作用機序および獲得耐性機序の解明には不可欠である。微小環境内の周辺細胞の影響を考慮する手法として、末梢血漿中の small RNA を解析することに重点を置き、プロテアソーム阻害剤治療骨髄腫患者様の治療薬耐性前後の各段階におけるこれらの検体の保存を進めている。

2. 研究の目的

本研究では、プロテアソーム阻害剤の薬剤耐性機序を、臨床レベルで明らかにすることを目的とし、具体的には、ボルテゾミブ(単剤もしくはデキサメサゾンとの併用)治療を受けた骨髄腫患者様の、薬剤耐性前後の各段階で採取された検体(骨髄腫細胞、末梢血血清: small RNA)の比較解析を行う(探索的段階)。複数の症例における上記の比較解析データを集積し分析することで、耐性化のパターン分類、耐性化を早期に予測できる簡便なバイオマーカーの開発、耐性化の各パターンに対応した耐性化機序を克服するための戦略および新規化合物の同定を目標とする(応用的段階)。本邦では、ボルテゾミブと他の新規薬剤との多剤併用療法は広くは行われておらず、また、これまでのボルテゾミブ単剤もしくはデキサメサゾン剤のみとの併用した症例の多数例の臨床検体の蓄積があるため、十分な解析が可能と考えている。

プロテアソーム阻害剤の耐性獲得メカニズムの解析として、次世代シーケンズ法による網羅的な遺伝子の発現・変異の解析手法にて、骨髄腫細胞の遺伝子発現、遺伝子変異および末梢血血清中の small RNA 発現量を解析することで、プロテアソーム阻害剤の耐性獲得時に高頻度に観察される遺伝子変異及び遺伝子発現量変化を同定する。

3. 研究の方法

プロテアソーム阻害剤投与前と耐性獲得時の各段階における骨髄腫患者さんの臨床検体の収集とその網羅的な比較解析骨髄腫患者さんのプロテアソーム阻害剤の治療直前、治療中(最良効果発現時)、薬剤耐性獲得時の各段階における骨髄および末梢血の検体を採取する。骨髄検査時の残余検体より、CD138 ビーズを用いた骨髄腫細胞の回収を行い、以下の解析を行った。

1. 骨髄腫細胞の解析

骨髄腫細胞から DNA および全 RNA を抽出する。genomic DNA に関しては、次世代シーケンズ用の高純度の DNA 抽出キット(QIAGEN 社の Blood & Cell Culture DNA Kit など)を用いて分解の少ない DNA を抽出する。また、RNA の抽出は mRNA および長鎖 noncoding RNA に関しては RNA easy mini kit、200nt 以下の small RNA については、miRNeasy mini kit を用いてそれぞれ抽出する。イルミナ社のシーケンズ用のライブラリー調整を行い、RNA シーケンズを行い、網羅的な解析を行った。

2. 血漿中の遊離核酸の解析

血清中の cell free DNA(cf-DNA)は 150-200bp ほどの DNA フラグメントであり、担癌患者さんの血清では、腫瘍細胞由来の cf-DNA が多いことが報告されている。骨髄腫患者さんでプロテアソーム薬剤耐性時に出現する特異的な DNA の獲得変異およびその検出量を網羅的に解析する。

4. 研究成果

1. 骨髄腫患者さんにおける末梢血血清の small RNA の抽出とその発現量解析

まずは疾患特異的な血清マイクロ RNA を同定することとした。具体的には、骨髄腫患者さんと健常人の血清マイクロ RNA の発現解析を行った。具体的には、健常人 15 名・初発骨髄腫患者 10 名・再発難治骨髄腫患者 52 名の血清のマイクロ RNA を次世代シーケンサー法にて発現量の解析を行った。検出された 200 前後のマイクロ RNA のうち、32 個のマイクロ RNA が健常人と比べて、骨髄腫患者さんの血清にて高発現していた。さらに、そのうち 5 つのマイクロ RNA (mir-10a, 10b, 92a, 378a, and 378d) が、骨髄腫患者さんのなかでも、再発・難治症例において、初発症例と比べて有意に高いことが判明した。これら 5 つのマイクロ RNA は、乳がん等の固形腫瘍においては、細胞増殖・薬剤耐性・転移能などの悪性能に関わることが報告されており、さらに、mir-92a に関しては骨髄腫患者さんから採取した骨髄腫細胞を用いた解析で、ボルテゾミブを含んだ治療方法との感受性に関わることが、後方視的な解析で判明している。

2. 初発骨髄腫患者さんにおける末梢血血清の cell free DNA の抽出とその遺伝子変異解析

骨髄腫患者さんのボルテゾミブによる治療前、および、薬剤耐性獲得時の、治療前後の RNA シークエンス解析を 8 ペア検体 (16 サンプル) にて行った。ボルテゾミブ治療前後で、骨髄検体が採取された 15 症例のうち、治療の奏効率が PR 以上だった 8 症例の治療前後検体の 16 サンプルを用いた。16 サンプル中、一部にマッピング率が低いものがふくまれるものの、多くが総リード数の 70 から 80% 以上のマッピング率であった。また、すべてのサンプルにおいてマッピングされたリード数は、2500 万リード数以上であった。遺伝子の発現量解析のみならず、遺伝子の変異や融合遺伝子等の探索に十分なリード数であると考えられた。8 症例において、ボルテゾミブ耐性前後の各 mapping されたリードの遺伝子変異の比較を行った。

遺伝子変異候補からの filtering 条件として、治療前の検体からは同定されない 変異部位を含む部位のリードカバー数が 20 リード以上、 変異リード数が 4 リード以上、 変異頻度 20% 以上で設定した。また、免疫グロブリン遺伝子に関連した変異は除外した。上記の filtering の結果、各ペアあたり、およそ 30-200 個程度の遺伝子変異の箇所が検出された。それら遺伝子変異の意義と、変異の見られた遺伝子群の GO 解析等を行い、ボルテゾミブ耐性との関連性を今後の研究として継続していく。

一方、発現量解析では形質細胞の分化や浸潤能に関わる遺伝子群が変化していることを明らかにし、ボルテゾミブ耐性との関連性が指摘された。小胞体ストレス応答や各種プロテアソームの遺伝子の発現量の変化を評価したが、ボルテゾミブ耐性検体に共通した変化は見られなかった。

また、早期にボルテゾミブ耐性を示したハイリスクとして 2 症例の末梢血血清の cell free DNA の解析を行い、ボルテゾミブ耐性後の段階で血清中に初発時では見られなかった新規の遺伝子変異を複数個同定した。RNA シークエンスで発現量の変化のあった遺伝子群との関連を今後の研究課題である。

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 Maekawa K, Ri M, Nakajima M, Sekine A, Ueda R, Tohkin M, Miyata N, Saito Y, Iida S.	4. 巻 110
2. 論文標題 Serum lipidomics for exploring biomarkers of bortezomib therapy in patients with multiple myeloma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 3267-3274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14178	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----