

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：16K09855

研究課題名(和文) 多発性骨髄腫における分子標的薬の効果を予測する血液中バイオマーカーの同定

研究課題名(英文) Identification of blood biomarkers predicting clinical efficacy of molecular targeting agents in multiple myeloma

研究代表者

飯田 真介 (Iida, Shinsuke)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授

研究者番号：50295614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫患者の病態や進展、および分子標的薬の感受性を事前に予測する血液中バイオマーカーを探索した。患者末梢血中の遊離核酸や脂質代謝物を網羅的に測定し、臨床情報との関連について解析した。プロテアソーム阻害剤のボルテゾミブ感受性を予測する血清マイクロRNAを複数同定した。末梢血 cell free DNAを用いた同一患者の経時的な解析によって、骨髄腫の病勢増悪に關する変異遺伝子群を同定した。血清中リポドミクス解析によって、ボルテゾミブとデキサメタゾン併用療法の臨床効果と末梢神経障害の発症を予測する脂質バイオマーカー候補分子を同定した。今後、これらの因子を多数例での解析で検証する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、採取が簡便で臨床応用しやすい血液サンプルから診断マーカーとして血清中の遊離核酸と脂質代謝物を検討した点が特色である。これまでの造血器腫瘍、特に多発性骨髄腫領域では、その測定系や評価法は十分に確立されていない。本研究により、リキッドバイオプシーの臨床応用に向けた新たな基盤を形成できたと考えている。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to explore predictive or prognostic biomarkers in blood in patients with multiple myeloma (MM). Cell free nuclear acids such as microRNA and cfDNA isolated from peripheral blood were analyzed by next generation sequencing in association with clinical information including patients' prognosis and sensitivity to molecular targeting agents. Our study identified several serum microRNAs associated with sensitivity to bortezomib therapy. Sequential genetic analysis of cfDNAs in the same patients could identify some specific mutations relevant to the disease progression in MM. As well, serum lipid metabolites were comprehensively analyzed. It identified some lipid metabolites which might predict poor response to bortezomib plus dexamethasone therapy and occurrence of grade 2 or higher bortezomib-induced peripheral neuropathy. Further studies are needed to validate such candidate biomarkers in prospective large-scale studies.

研究分野：血液内科学

キーワード：多発性骨髄腫 分子標的薬 バイオマーカー マイクロRNA セルフリーDNA 脂質 血液 病態進展

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫の治療薬として新規薬剤(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、骨髄腫患者の予後は大きく改善した。しかし、各薬剤には特有の副作用が認められ、各薬剤の治療効果は投与してみるまで予測出来ないのが実情である。したがって、各分子標的薬の治療効果や副作用を血液中の簡易なバイオマーカー検査で予測可能となれば、不要な副作用を回避するとともに最も適した薬剤の選択が可能となる。我々は、既にプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブの作用機序として、アポトーシス誘導因子である NOXA の活性上昇(Cancer Sci 100:341,2009)、そして薬剤耐性機序としてプロテアソームの遺伝子変異を同定した(Leukemia 24:1506,2010)。しかし、これまでの研究は骨髄腫細胞の薬剤感受性規定因子を同定したに過ぎず、骨髄微小環境と腫瘍細胞との相互作用がもたらす薬剤感受性や耐性への影響を解明したわけではない。新規薬剤は骨髄腫細胞だけでなく骨髄微小環境や免疫細胞にも作用するため、骨髄腫患者の体内環境全体を反映させる手法が、薬剤感受性に関わるバイオマーカーの同定には不可欠である。骨髄腫細胞と微小環境内のストローマ細胞との相互作用に関わる因子として、様々な接着分子・細胞外基質・サイトカインが同定されている。臨床的に有用なバイオマーカーを開発するには、採取が簡便な末梢血中に存在する物質の探索が必須と考え、血清中の遊離核酸である small RNA および cell free DNA(cfDNA)、そして血清を用いたリピドミクス解析に着目した。

## 2. 研究の目的

本研究では、多発性骨髄腫の病態や進展、そして治療薬の感受性や副作用を予測しうる分子を末梢血中から探索することを目的とする。特に患者末梢血中の遊離核酸と、血清中の脂質分画の網羅的解析に重点を置いた。網羅的解析によって得られたデータと、病態や予後、さらに薬剤の治療効果や副作用に関わる臨床情報を照合することによって、血液中から臨床的に有用なバイオマーカーを探索することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 多発性骨髄腫患者由来の骨髄形質細胞と末梢血検体の採取

施設 IRB 承認を得た説明・同意文書で試料提供の同意を得た多発性骨髄腫患者 81 名から末梢血採取を行い血清保存を行った。同様に骨髄穿刺検査時の残余骨髄検体を用い、抗 CD138 抗体ビーズを用いて CD138 陽性形質細胞を純化し保存した。コントロールとして研究参加同意を得た健常者 10 名由来の末梢血を採取し血清を保存した。

### (2) 末梢血血清中の small RNA の抽出とその解析

各患者由来の血清 1mL から small RNA の抽出を行い、次世代シーケンス法 (NGS) により、リード数を基に small RNA の定量を行った。

### (3) 末梢血血清中の cfDNA の抽出

QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit(キアゲン)を用いて、各患者由来の血清 1mL から cfDNA の抽出を行った。cfDNA の定量には QuantiFluor dsDNA System(プロメガ)を用いた。

#### (4) 末梢血 cfDNA の定性

抽出した末梢血 cfDNA の分子量分布を確認するため、Agilent 2100 バイオアナライザー (Agilent) の Agilent High Sensitivity DNA kit を使用し分子量を確認した。

#### (5) 骨髄形質細胞からの gDNA の抽出

Allprep DNA/RNA Mini Kit(キアゲン)を用いて、骨髄中形質細胞から gDNA の抽出を行った。gDNA の定量には末梢血 cfDNA と同様に QuantiFluor dsDNA System を用いた。

#### (6) シークエンス用ライブラリーの調整と定量

QIAseq Targeted DNA Panel(キアゲン)を用いて、抽出した骨髄形質細胞由来 gDNA 及び末梢血 cfDNA を用いてライブラリーの調整を行った。遺伝子パネルは Human Comprehensive Cancer Panel (275 遺伝子)を使用した。

調整したライブラリーは QIAseq Library Quant Assay Kit(キアゲン)で定量し、その結果得られた濃度を元にサンプルの調整を行った。

#### (7) シーケンスと解析

シーケンスには NGS の Miseq (Illumina) を使用し、専用のカートリッジ (MiSeq Reagent Kit v3 150bp ペアリード) を用いた。シーケンスにより得られたデータは Genomic Work Bench (Filgen) を使用し、Variant Allele Frequency (VAF) を骨髄形質細胞 gDNA では 5% 以上、末梢血 cfDNA では 1% 以上で変異コールとした。また、シーケンスデータは信頼性評価(エラーの除去)として Quality は 20 以上とした。一方で、上記の体細胞変異の候補から胚細胞変異(SNPs)を除去するために骨髄形質細胞 gDNA と同様に腫瘍混入のない末梢血単核球からも gDNA の抽出を行い、シーケンスを行い、各患者における SNP データを揃えた。更にアジア人・日本人の公共の SNPs のデータベースも活用した。

#### (8) 血清中脂質分画の同定と定量

当院でボルテゾミブ+デキサメタゾン併用(Bd)療法を受けた 59 名の治療開始前の脂質組成、特に磷脂質、スフィンゴ脂質、中性脂質、多価不飽和脂肪酸およびその酸化体について UPLC-TOFMS と UPLC/MS/MS を用いて解析した。各脂質の定量結果と Bd 療法の奏効レベル、およびボルテゾミブ投与時に問題となるグレード 2 以上の末梢神経障害の発生の有無との関連について解析した。

### 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

まず疾患特異的な血清マイクロ RNA の同定を試みた。具体的には、骨髄腫患者と健常人の血清マイクロ RNA の発現解析を行い比較した。健常人 15 名・初発骨髄腫患者 10 名・再発難治骨髄腫患者 52 名の血清中マイクロ RNA を次世代シーケンサー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血清中で有意に高値であった。その中で 5 種類のマイクロ RNA (mir-10a, 10b, 92a, 378a, 378d) は、骨髄腫患者においても、再発・難治例において、初発例と比べて有意に高値であることが判明した。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いる。さらに mir-92a

に関しては骨髄腫患者由来の骨髄中形質細胞を用いた検討で、ボルテゾミブを含んだ治療レジメン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) 初発骨髄腫患者における末梢血血清中 cfDNA の抽出とその遺伝子変異解析

初発の多発性骨髄腫患者約 80 例の、治療前に採取・保存された末梢血血清の解析に着手した。血清 1ml から、QIAGEN 社の circulating nuclear acid kit を用いて cfDNA 相当と考えられる血清中 DNA の抽出を行った。またコントロールとして健常者 10 名の血清からも同様に抽出を行った。健常者 10 名と骨髄腫患者 80 名で比較したところ、血清 1ml あたりの DNA 収量は、31.6ng/ml vs 77.0ng/ml と有意に骨髄腫患者さんの血清中の DNA が多い結果であった ( $P=0.015$ )。また、これら血清中の DNA をバイオアナライザーで解析したところ、mono-nucleosome (150~200 bp)、Di-nucleosome(300-400bp)、Tri-nucleosome(600bp 程度)に相当するピークが認められた。末梢血 cfDNA 量と腫瘍量(形質細胞)との相関性を解析するために初発時における末梢血 cfDNA 量と腫瘍量の指標となる免疫グロブリンの遊離軽鎖(FLC)の値との相関を解析した。初発骨髄腫 34 症例について末梢血 cfDNA と FLC の値を評価すると  $R^2=0.0985(0.2 < |r| < 0.4)$  となり弱いながらも相関がみられた。

一方、同一患者において、治療経過中の末梢血 cfDNA 量の変化について観察した。初回治療後に、再発難治性骨髄腫 (Relapsed/refractory multiple myeloma: RRMM) に至った患者 7 名について未治療時と再発・再燃時の cfDNA の増減比をとって比較したところ、FLC の増減比との相関性が確認された。

#### (3) 予後不良な患者さん検体の末梢血中の遺伝子変異の経時的な変化

多発性骨髄腫患者 80 例中、短期間で病態が進展し予後が極めて不良であった 4 例の血清 cfDNA を QIAGEN 社の、ターゲットシークエンスパネル (Comprehensive cancer panel) にて、数百の遺伝子のエクソンをカバーするアンプリコンを作成し、経時的な解析を施行したところ、およそ 5 から 40 ヶ所の遺伝子変異が新規に出現、もしくは消失していた。変動の見られた遺伝子変異のその意義について現在も検討中である。

#### (4) ボルテゾミブ + デキサメタゾン併用 (Bd) 療法の効果と副作用を予測する血清脂質バイオマーカーの探索

当院で Bd 療法を受けた 59 名の多発性骨髄腫患者の治療前に採取された起床空腹時の血清中に 385 種類の脂質代謝物が同定された。その中で数種類の glycerophospholipids、sphingolipids と cholesteryl ester の低値が非奏効 (部分奏効未満) に関連し、数種類の lysophosphatidylcholines (LPCs)、PCs、DG、TG や 8,9-diHETrE、14,15-diHETE の高値がグレード 2 以上の末梢神経障害の発症と関連していた。臨床効果に関連した脂質として血小板活性化因子の合成に関わる代謝物、末梢神経障害に関連した脂質としてミエリン障害や炎症刺激に関わる代謝物がバイオマーカー候補として同定された。しかし、本研究は探索的な研究であるため、今後は大規模前向き臨床試験での検証を計画している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yoshida T, Ri M, Kinoshita S, Narita T, Totani H, Ashour R, Ito A, Kusumoto S, Ishida T, Komatsu H, Iida S	4. 巻 13
2. 論文標題 Low expression of neural adhesion molecule, CD56, is associated with poor efficacy of bortezomib plus dexamethasone therapy in multiple myeloma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0196780
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0196780	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 -
1. 著者名 Yoshida Takashi, Ri Masaki, Kanamori Takashi, Aoki Sho, Ashour Reham, Kinoshita Shiori, Narita Tomoko, Totani Haruhito, Masaki Ayako, Ito Asahi, Kusumoto Shigeru, Ishida Takashi, Komatsu Hirokazu, Kitahata Shun, Chiba Takuya, Ichikawa Satoshi, Iida Shinsuke	4. 巻 9
2. 論文標題 Potent anti-tumor activity of a syringolin analog in multiple myeloma: a dual inhibitor of proteasome activity targeting $\beta$ 2 and $\beta$ 5 subunits	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 9975-9991
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.24160	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 -
1. 著者名 Maekawa Keiko, Ri Masaki, Nakajima Miki, Sekine Akihiro, Ueda Ryuzo, Tohkin Masahiro, Miyata Naoki, Saito Yoshiro, Iida Shinsuke	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 Science	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 -
1. 著者名 Murase Takayuki, Inagaki Atsushi, Masaki Ayako, Fujii Keiichiro, Narita Tomoko, Ri Masaki, Hanamura Ichiro, Iida Shinsuke, Inagaki Hiroshi	4. 巻 59
2. 論文標題 Plasma cell myeloma positive for t(14;20) with relapse in the central nervous system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical and Experimental Hematopathology	6. 最初と最後の頁 135 ~ 139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3960/jslirt.19011	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 -

1. 著者名 Murase Takayuki, Ri Masaki, Narita Tomoko, Fujii Keiichiro, Masaki Ayako, Iida Shinsuke, Inagaki Hiroshi	4. 巻 110
2. 論文標題 Immunohistochemistry for identification of CCND1, NSD2, and MAF gene rearrangements in plasma cell myeloma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2600 ~ 2606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14109	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Ri M, Maekawa K, Nakajima M, Sekine A, Ueda R, Tohkin M, Miata N, Saito Y, and Iida S
2. 発表標題 Serum lipid metabolomics can predict the efficacy of bortezomib treatment and peripheral neuropathy in patients with multiple myeloma
3. 学会等名 23rd. Annual Congress of European Hematology Association (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Narita T, Ri M, Kinoshita S, Yoshida T, Totani H, Ashour R, Masaki A, Ito A, Kusumoto S, Ishida T, Komatsu H, Osabe M, Tohkin M, Iida S
2. 発表標題 Identification of circulating serum microRNAs as novel biomarkers predicting disease progression and sensitivity to bortezomib treatment in multiple myeloma.
3. 学会等名 58th Annual Meeting of American Society of Hematology (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Ri M, Iida S, Maruyama D, Saito K, Saito Y, Osga S, Tonkin M, Miata N, Fukuhara N, Miyazaki K, Tsukamoto N, Tsujimura H, Yoshimitsu M, Minamoto K, Tsukasaki K, and Nagai H
2. 発表標題 Lipidomic profiling of plasma samples in patients with newly diagnosed multiple myeloma; a biomarker study for predicting the response and toxicity of Melphalan, Prednisolone, and Bortezomib (MPB) regimen: an ancillary study of JCOG1105 (JCOG1105A1)
3. 学会等名 61st. Annual Meeting of American Society of Hematology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kanamori T, Sanada M, Ri M, Ueno H, Nishijima D, Yasuda T, Aoki S, Asano A, Tachita T, Kinoshita S, Narita T, Ito A, Kusumoto S, Masuda Y, Kobayashi N, Shiozawa Y, Yoshida K, Nakagawa M, Nannya Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Komatsu H, Miyano S, Handa H, Ogawa S, Iida S
2. 発表標題 Comprehensive genetic analysis of multiple myeloma in Japan
3. 学会等名 24th. Congress of European Hematology Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tachita T, Kinoshita S, Ri M, Aoki S, Asano A, Kanamori T, Totani H, Asao Y, Narita T, Ito A, Kusumoto S, Komatsu H, Iida S
2. 発表標題 Analysis of expression levels, mutations, and methylation status of CRBN-related genes pre- and post-lenalidomide treatment in multiple myeloma
3. 学会等名 24th. Congress of European Hematology Association (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究分担者	桶本 和男  (Okemoto Kazuo)  (50415486)	名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教   (23903)	
研究分担者	前川 京子  (Maekawa Keiko)  (70270626)	国立医薬品食品衛生研究所・医療安全科学部・室長   (82601)	