

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08336

研究課題名(和文) 多発性骨髄腫進展のドライバー因子の同定と早期治療介入への応用

研究課題名(英文) Identification of a driver gene for progression of multiple myeloma and its application to early treatment intervention

研究代表者

黒田 芳明 (Kuroda, Yoshiaki)

自治医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：00625840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：APOBEC3遺伝子が多発性骨髄腫の進展・悪性を促進するという仮説を検証した。骨髄腫細胞においてはAPOBEC3B(A3B)が特異的に強発現していたが、細胞株ではintron7を含む異常なmRNA(A3Bi7)が発現していた。A3Bi7と野生型A3B cDNAを293細胞に導入したところA3Bi7導入細胞においてp53 遺伝子ではGC>AT点突然変異が高頻度認められた。骨髄腫治療薬によってA3Bi7 mRNAとタンパク質の発現が誘導されることが分かり、治療後に残存した骨髄腫細胞が遺伝子変異を獲得してクローン進化する際にA3Bi7が関与することを推測させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

APOBEC3遺伝子の質的・量的異常が、癌関連遺伝子の点突然変異やゲノムの不安定性を惹起し、多発性骨髄腫の進展・増悪に寄与する可能性を明らかにした。多発性骨髄腫は治療薬の進歩にも関わらず依然難治性であり、本研究成果により骨髄腫の進展・増悪予測としての標的遺伝子の一つが同定され、今後創薬研究開発へも繋がると思われる。

研究成果の概要(英文)：We tested the hypothesis that the APOBEC3 gene promotes the progression of multiple myeloma. Among the APOBEC3 family of cytidine deaminases, the APOBEC3B gene (A3B) was specifically and strongly expressed in myeloma cells; furthermore, abnormal A3B mRNA, which retains intron 7, (A3Bi7) was expressed in myeloma cell lines. When A3Bi7 and wild-type A3B cDNA were introduced into 293 cells, GC>AT point mutations were more frequently observed in the TP53 gene in A3Bi7-trnasduced cells. Anti-myeloma drugs induced the expression of A3Bi7 mRNA and proteins, suggesting that A3Bi7 is involved in the acquisition of gene mutations, which may underlie clonal evolution of residual myeloma cells after treatments.

研究分野：血液腫瘍学 分子生物学

キーワード：多発性骨髄腫 APOBEC3B MGUS 点突然変異

研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫はBリンパ球分化の最終段階に位置する形質細胞が腫瘍化し骨髄内で増殖する難治性疾患である。多発性骨髄腫はMGUS（意義不明の単クローン性ガンマグロブリン血症）と呼ばれる前がん状態を経て発症することが知られているがMGUSから多発性骨髄腫への進展を予測できるバイオマーカーが見つければ時宜を得た治療介入が可能となり、治療成績の画期的な改善につながることを期待される。骨髄腫進展のメカニズムについて最近の国際共同研究によって特記すべき知見が得られ（Alexandrov et al. Nature 500: 415, 2013）、多発性骨髄腫に特異的な遺伝子変異パターンにおける変異は5'-N-CpGと5'-T-C-NにおけるC>T変異の2種類でありその基盤にあるのは加齢と考えられた。この結果は多発性骨髄腫の発症年齢の中央値が67歳で、高齢者に好発するという事実によくマッチしている。後者はAPOBEC3 family cytidine deaminaseの異常によると推察されるが、詳細はまだ明らかでない。以上の結果から、申請者はAPOBEC3遺伝子の質的・量的異常が、癌関連遺伝子の点突然変異やゲノムの不安定性を惹起し、MGUSから多発性骨髄腫への進展を促進するという仮説を立てて予備実験を行った。結果は、この仮説を支持するものであり、患者検体とマウス・モデルを用いた検証を経て、MGUSの進展予測と治療介入のマーカーとして前臨床試験を開始することを目標としたい。これらの目標が実現した暁には、これまで不可能であった多発性骨髄腫の早期発見・早期治療が可能となり、予後の大きな改善が期待される。

2. 研究の目的

MGUSから骨髄腫への進展にはさらなるgrowth advantageの獲得が必要であり、その原因として最も高頻度に見られるのがRasの点突然変異である。MGUSから骨髄腫の進展に伴って点突然変異が生ずる遺伝子として、K-Ras/N-Ras以外にNF- κ B活性化に関する分子（TRAF3・CYLD・I κ B）、エピジェネティック制御因子（UTX・MMSET）、癌抑制遺伝子（p53・FAM46C・DIS3）などが報告されている（Morgan et al. Nat. Rev. Cancer 12: 335, 2012; Furukawa et al. Int. J. Clin. Oncol. 20: 413, 2015）。これら遺伝子の異常が多発性骨髄腫の進展に関与していることは明らかで、突然変異の起こるメカニズムを解明することで、効果的な治療の介入が可能になると期待される。Cytidineの4位のアミノ基を除去し、uridineに変換する酵素をcytidine deaminaseと総称し、CDA・AID・APOBEC1（apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide 1）・APOBEC3の4つのグループに分類される。APOBEC3にどのような変化が生じて本来の役割とは異なる機能（発がん性）を獲得するかはまだ完全には明らかにされていない。そこで申請者らは、MGUSの段階においてAPOBEC3に生じる異常の本態を解明し、多発性骨髄腫への進展にどう関与しているかを明らかにすることを目的として予備実験を行った。

3. 研究の方法

予備実験の結果から、多発性骨髄腫においては正常細胞と異なるAPOBEC3(A3Bi7)が強発現しており、Ras・p53・UTXなどの癌関連遺伝子に高頻度に点突然変異を導入して病変を進行させると推察される。本研究課題においては、以下の実験を行ってこれらの仮説を実証する。

1) 多発性骨髄腫における異常A3B発現の臨床経過への影響：多発性骨髄腫およびMGUSの臨床検体を用いて、細胞株で得られた予備的知見を検証する。正常A3BとA3Bi7をそれぞれ特異的に増幅するPCR primerを設計し、real-time RT-PCRによって発現を定量化する。健康人末梢リンパ球および非ホジキンリンパ腫・急性リンパ性白血病などの造血器腫瘍細胞を対照に用いて、MGUS/骨髄腫におけるA3B強発現とA3Bi7の特異的発現を確認する。さらにMGUS症例におけるA3Bi7発現レベルと多発性骨髄腫への進展との相関関係について、臨床データベースを基にretrospectiveに解析する。

2) 骨髄腫に特異的に発現する異常A3Bの機能および構造解析：多発性骨髄腫において特異的に発現しているA3Bi7と正常A3Bの機能の違いを明らかにする。A3Bi7と野生型A3B cDNAを293細胞に導入し、C>T変

異が入ると発光するプローブ（5'-[6-FAM]-AAATTCTAATAGATAATGTGA-[TAMRA]-3'）を用いて cytidine deaminase 活性を測定する。また導入細胞をしばらく継代した後、Ras・p53・UTXなどの癌関連遺伝子にC>T変異が生じているかどうかをDNAシーケンシングにて確認する。A3Bi7 mRNAは正常A3B transcriptの3'末端に311塩基が挿入されており、mRNAの安定性が上昇している可能性がある。そこで、前述の293細胞をactinomycin Dで処理し、新規RNA合成を止めた状態でNorthern blottingを行い、mRNAの半減期を比較する。一方、蛋白レベルではA3Bi7は490アミノ酸からなり、正常と比べてC末に108個のアミノ酸が付加された構造になっている。この挿入配列が酵素活性や細胞内局在に及ぼす影響を生化学的に解析する。タンパク質レベルでの安定性についても、cycloheximideを用いた半減期測定によって検討する。

3) A3Bi7が多発性骨髄腫の発症・進展に及ぼす影響のマウス・モデルによる検証：造血前駆細胞およびB細胞系列特異的にA3BおよびA3Bi7を強発現するトランスジェニック・マウスを作製し、多発性骨髄腫が発症するかどうかを観察する。申請者はすでに系統特異的トランスジェニック・マウスによる造血器腫瘍発症モデルを確立しており、今回も同様に研究を進める（Wada et al. Blood 125: 3731, 2015）。一方、BALB/cマウスはpristane（2, 6, 10, 14-tetramethylpentadecane）の腹腔内注射によって多発性骨髄腫を発症することが知られている（Anderson et al. Nature 222: 994, 1969）。そこでA3Bi7がpristaneによる骨髄腫発症および進展を加速するかどうかを調べる。マウスに発症した骨髄腫細胞において、Ras・p53・UTXを始めとする骨髄腫の進展に関わる遺伝子にC>T変異が起こっていることを、次世代シーケンスを用いた網羅的解析によって明らかにする。

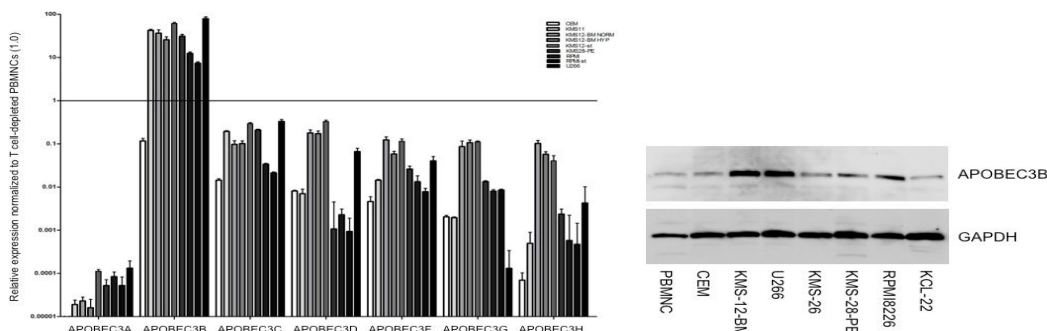
4) A3Bi7に対する特異的阻害剤の開発と臨床応用：以上の実験によってA3Bi7がMGUSの発症や骨髄腫への進展に関与していることが証明されれば、A3Bi7に対する特異的阻害剤を開発して治療的介入に応用する。申請者はすでに新規プロテアソーム阻害剤の作用機序を結晶解析にて明らかにした実績があり（Kikuchi et al. PLoS One 8: e60649, 2013）、そのノウハウを生かして、今回も研究を進める。以上の実験は理化学研究所の創薬・医療技術基盤プログラムと連携して実施する。

4. 研究成果

1) 多発性骨髄腫細胞におけるAPOBEC3ファミリー分子の発現

9種類の多発性骨髄腫細胞株とヒトTリンパ球性白血病由来細胞株CCRF-CEMを用いて7種類のAPOBEC3ファミリー分子の発現をreal-time quantitative RT-PCRを用いて定量的に解析した。健康人由来の末梢血単核細胞からTリンパ球を除去したものを対照とし、それぞれの発現を対数比で表すと多発性骨髄腫細胞においてはAPOBEC3Bが特異的に強発現していることが分かった。

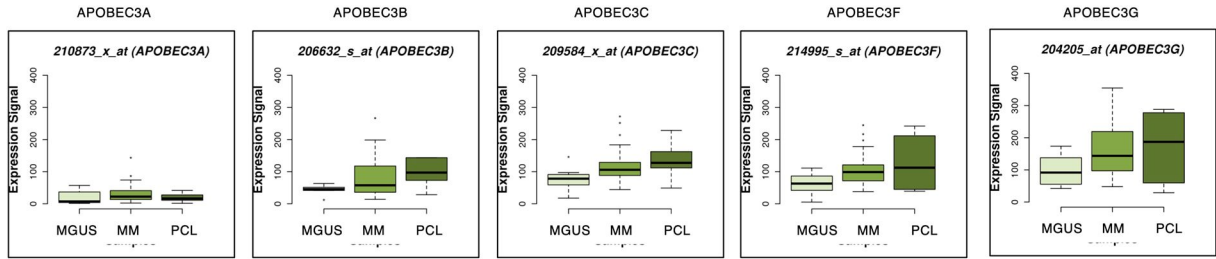
続いてAPOBEC3Bに対する特異抗体を用いたWB法により、蛋白レベルでも強発現していることを確認した。



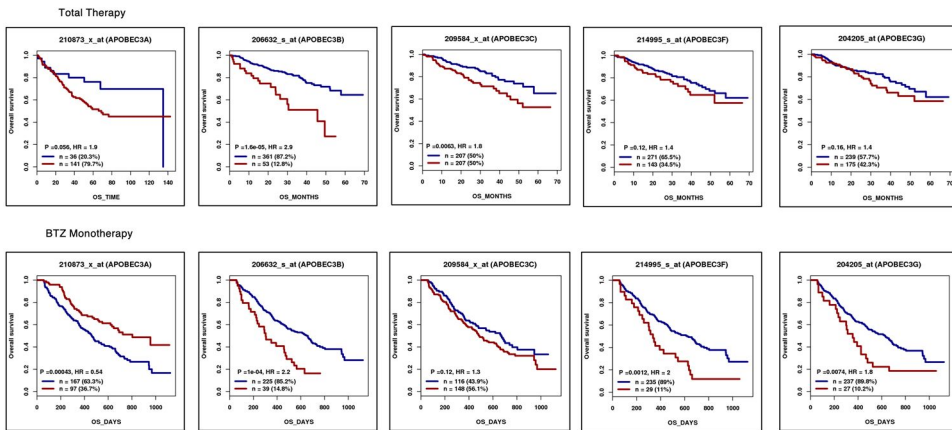
2) 多発性骨髄腫におけるAPOBEC3B発現の臨床経過への影響

続いて臨床検体におけるAPOBEC3Bの強発現と予後への影響についてgenomicscapeにdepositされているデータを用いて解析した。臨床検体においてもAPOBEC3Bの強発現が認められ、MGUS 多発性骨髄腫(MM) 形質細胞性白血病(PCL)とステージの進行に伴って発現量が増加する傾向が認められた。細胞株での解析と同様

に APOBEC3A の強発現は見られなかったが、APOBEC3C, F, G は強発現を病期の進展に伴う変化が観察された。

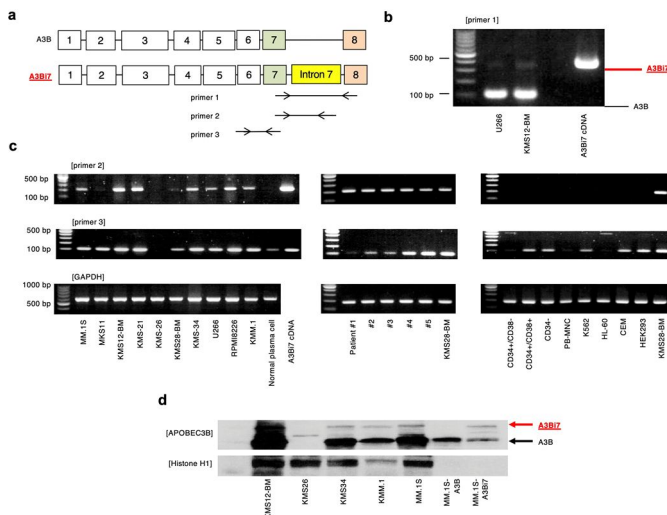


APOBEC3 分子の発現と治療成績の相関を解析すると、APOBEC3B と APOBEC3C の強発現によって Total Therapy 2/3 後の OS が有意に短縮していた。一方、bortezomib 単剤治療による OS には APOBEC3C 以外の分子が影響していた。両方の治療に negative impact を与えたのは APOBEC3B のみで、ハザード比も最も大きかった。

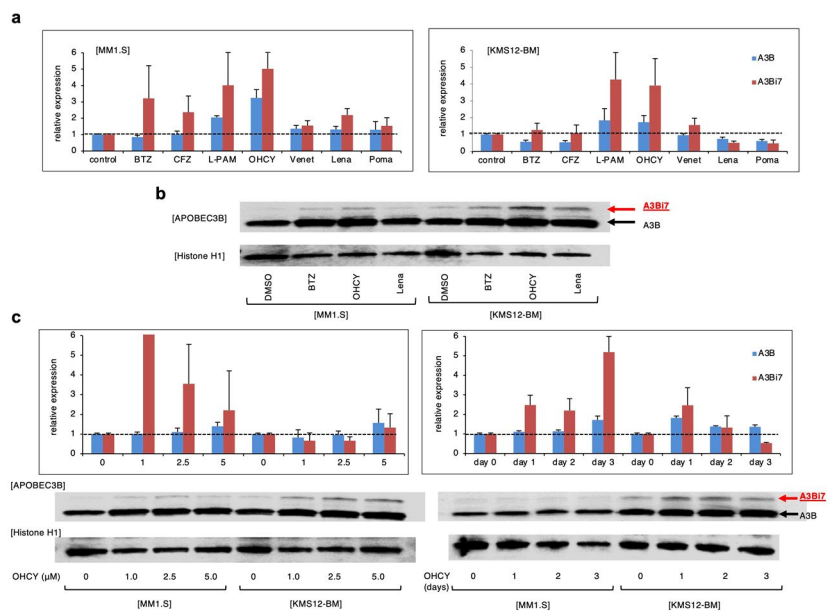


3) 多発性骨髄腫に特異的に発現する異常 APOBEC3B の機能および構造解析

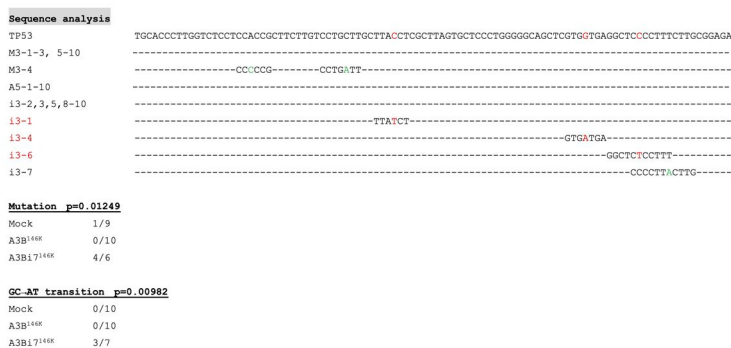
多発性骨髄腫細胞株を用いて A3B の遺伝子構造について解析したところ、intron7 が含まれた異常な mRNA (A3Bi7) が発現していることが分かった。そこで正常 APOBEC3B と A3Bi7 をそれぞれ特異的に増幅する PCR primer (primer 3/2) を設計し、real-time RT-PCR を行ったところ、健康人末梢リンパ球および非ホジキンリンパ腫・急性リンパ性白血病などの造血器腫瘍細胞では APOBEC3B のみ発現しており、A3Bi7 の発現は多発性骨髄腫に特異的であることが分かった。さらに蛋白レベルでも A3Bi7 が発現していることを確認した。



さらに多発性骨髄腫において、プロテアソーム阻害剤やアルキル化薬によって A3Bi7 mRNA とタンパク質の発現が誘導されることが分かった。このことは治療後に残存した骨髄腫細胞が新たな遺伝子変異を獲得してクローン進化する際に A3Bi7 が関与することを推測させる。

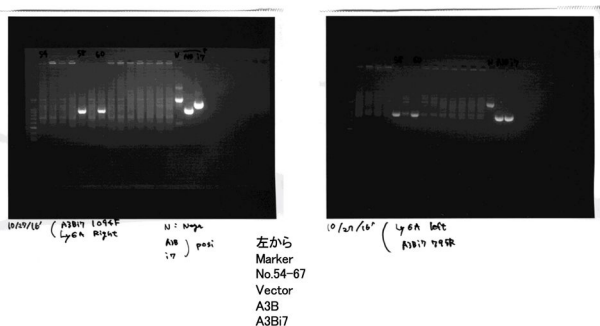


そこで A3Bi7 が実際に遺伝子変異の誘発に関与しているかどうかを確認する目的で、A3Bi7 と野生型 A3B cDNA を 293 細胞に導入し、N-RAS・TP53・UTX などの癌関連遺伝子に C>T 変異が生じているかどうかを DNA シークエンシングにて確認した。以下に TP53 遺伝子の解析結果を示すが、統計的に有意の差をもって A3Bi7 が遺伝子変異を導入していた。



4) A3Bi7 が多発性骨髄腫の発症・進展に及ぼす影響のマウス・モデルによる検証

Sca-1(Ly6A) promotor の下流に APOBEC3B または A3Bi7 の full-length cDNA を組み込み、造血前駆細胞および B 細胞系列特異的にそれぞれを強発現するトランスジェニック・マウス C57 BL/6J-Tg(Ly6a-APOBEC3B*v1) を作製した。BALB/c マウスは pristane (2, 6, 10, 14-tetramethylpentadecane) の腹腔内注射によって多発性骨髄腫を発症することが知られている (Anderson et al. Nature 222: 994, 1969)。そこでこのマウスを用い、A3Bi7 が pristane による骨髄腫発症および進展を加速するかどうかを調べる。マウスに発症した骨髄腫細胞において、N-Ras や TP53 など骨髄腫の進展に関わる遺伝子に C>T 変異が起こっていることを、次世代シーケンスを用いた網羅的解析によって明らかにする。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究分担者	古川 雄祐 (Furukawa Yusuke) (00199431)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関