

令和 6 年 5 月 10 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07756

研究課題名（和文）血清オミックス解析を中心とした多発性骨髄腫の治療薬レナリドミドの感受性因子の探索

研究課題名（英文）Exploration of factors related to sensitivity of lenalidomide therapy by omics analysis

研究代表者

李 政樹（Masaki, Ri）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・准教授

研究者番号：00567539

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、骨髄検体および末梢血検体の解析を通して、レナリドミド感受性・耐性や骨髄腫の病勢進行に関わる因子を同定することを目的とする。本研究の主な成果として、レナリドミドの標的であるCRBN以外に、複数の遺伝子変異が同定されることにある。さらには、脂質メタボローム解析を通して、CRBN以外に、複数のリン脂質・脂肪酸の関を同定しえたことにある。今後は症例を蓄積し、レナリドミド感受性に関連した臨床的に有用な遺伝子変異を探索する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、末梢血cfDNAにおいて、骨髄中の腫瘍細胞の解析から同定しえなかった遺伝子変異を抽出でき、レナリドミド治療感受性との関連を同定しえたことは、今後の研究発展に大いに寄与する。また、本研究で行った末梢血血清の脂質メタボローム解析は、わが国が先行している斬新な研究手法であり、これまでのセレブロンおよびその関連因子とは違った新たな因子の関与を発見できるものと見込んでおり、実際に、複数個の脂肪酸およびリン脂質群が治療効果と相関があることを見出し、特定の脂肪酸とビタミン様作用物質が、免疫調節薬の効果に関わることを見出している。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate factors related to sensitivity or resistance of lenalidomide and progression of multiple myeloma (MM) from the analysis of clinical samples, including bone marrow and peripheral blood. As a result, several gene mutations relevant to efficacy of lenalidomide treatment, other than CRBN, were identified from the analysis of circulating cfDNA. In addition, from the lipidomic analysis of serum, several metabolites were also identified. Further study is warranted to identify clinically available factors related to lenalidomide resistance and sensitivity of MM patients from the analysis of cfDNA and serum.

研究分野：Hematological oncology

キーワード：Multiple myeloma lenalidomide lipidomics cfDNA

1. 研究開始当初の背景

初発未治療多発性骨髄腫の治療薬であるレナリドミドの感受性因子を探索する研究は、海外において、標的のセレブロン及びその関連因子の解析(遺伝子発現量・蛋白質量の測定、および変異解析)が複数件行われたが、有用な感受性因子の発見には至っていない。レナリドミドの作用は、標的であるセレブロンの分解促進や機能抑制ではなく、セレブロンの機能変化(Ub 化基質の対象変化)であるため、単なるその発現量の測定では、感受性推測が困難と考えられる)。これまで、我々はレナリドミドの感受性因子の探索研究を着手するにあたり、予備的な検討として、同一患者さんの治療前および薬剤耐性獲得時の各段階で採取した骨髄腫細胞の遺伝子発現の比較解析(CAGE 解析: RNA の5'末端同定定量法)を行った。レナリドミド耐性時には、セレブロンおよび関連因子の発現量は低下傾向ではあったが、それ以外に、形質細胞への分化能・腫瘍の転移能・がん精巢抗原等に関わる遺伝子等の発現量が有意に変化していた(p 値 <0.05 、FDR <0.05)。また、レナリドミド治療前の患者さん血清を用いた少数例での予備的なメタボローム解析では、治療高感受性群に複数個の酸化脂肪酸・リン脂質群が有意に上昇しており、PI 剤の研究結果と同様に、抗炎症性脂質と薬剤感受性との関与が考えられた。これらの予備的な結果から、レナリドミドの感受性には、形質細胞の分化度・転移関連因子・炎症性脂質等のセレブロン関連因子とは異なる他の要因(おそらく Ub 化基質の変化の影響)の関与が示唆され、多数例での解析を行う本研究の基盤となった。本研究の学術的な問いは、レナリドミドの治療効果の感受性因子を骨髄腫細胞・血清・両者の試料測定により、セレブロン及びその関連因子以外から探しだすことができるのではと仮説のもとで本研究を開始した。

2. 研究の目的

患者検体(骨髄液および末梢血)から、レナリドミドの治療効果を予測するバイオマーカー候補を探索することを目的とする。以下に各目的と特徴があげられる。第一に、造血器腫瘍における末梢血遊離核酸・エキソソーム解析はまだ十分な研究がなされておらず、本研究により新たな基盤を形成できると見込まれる。第二に、高度な分離分析技術を要する脂質メタボローム解析系において安定性・再現性のある系を既に樹立しており、既に、脂質代謝物中に分子標的薬の感受性因子を見出している。第三に、単一物質(ある遺伝子、タンパク質、代謝産物)による指標では十分に予測しえなかった骨髄腫治療薬の感受性予測を、本研究によるオミックス解析に基づいたマルチバイオマーカーによって、臨床的に有用な治療効果予測モデルを確立しようとする試みであることが本研究として特徴づけられる。

3. 研究の方法

患者検体のうち、骨髄中の骨髄腫細胞・ストローマ細胞からは遺伝子変異・発現量解析を行い、末梢血からは脂質代謝物・遊離核酸・エキソソームを単離しそれらを網羅的に解析する。上記の解析データと薬剤の治療効果に関わる情報(最良効果、無増悪生存期間、生存期間)を照合し、レナリドミドの治療感受性因子を同定する。以下のように、研究方法を計画した。

末梢血血清中のエキソソームのオミックス解析

レナリドミド治療直前に採取された血清より、エキソソームを単離し、約 10 nt の miRNA を抽出し、NGS による発現定量解析を行う。エキソソーム内部および膜状のタンパクは、タンパク可溶分画を濃縮後に、様々な生体パスウェイに関連するタンパク質やリン酸化タンパク質に対する抗体が多数スポットされた抗体アレイ (1358 種類) による解析にかける。主に、腫瘍免疫の抗原や、がん増殖に係る因子の解析を行い、腫瘍免疫および薬剤の感受性に係る新規の因子の発見を目的とする。またエキソソームの脂質成分の解析は、エキソソーム膜を構成するリン脂質の脂肪酸の種類等を解析し、薬剤の感受性に関連する脂質成分を同定する。

末梢血血清全体の遊離核酸解析

血清中に遊離している核酸 (cfDNA, cfRNA, miRNA など) を効率的に抽出し、NGS による miRNA の発現定量を行い、エキソソーム内容物と血清全体との比較検討を行う

末梢血血清全体の脂質メタボローム解析

代謝産物群では、骨髄腫細胞がタンパク・脂肪酸合成が盛んであり脂質代謝酵素群が活性化していることから、脂質代謝産物の解析が重要であると考えられる。血清約 500ul から、酸化脂肪酸群とリン脂質群を分画する。これを、クロマトグラフィー等を用いて物質の性質ごとに分離し、分離した産物を質量分析器にかけて各代謝物の同定とその量を測定する。上記の手法で得られた各サンプルの代謝産物のデータを、末梢血の核酸解析と同様に臨床情報と照らし合わせて、治療効果と相関性のある物を同定する。

骨髄液および末梢血血清の試料測定データと臨床情報との統合解析

骨髄液および血清のオミックス解析によってえられた、遺伝子変異・遺伝子発現量・血清の脂質代謝産物等の複数の因子を組み合わせることで、治療薬の感受性 (最良奏効率および、無増悪生存率、全生存率) を予測できる精度の高い予測モデルを確立する。

4. 研究成果

初発未治療の多発製骨髄腫患者さんの末梢血血清 1ml から、cfDNA を抽出し、約 40-200ng ほどのライブラリー作成に十分量を得ることができた。多発性骨髄腫のステージや腫瘍量に対して、末梢血 cfDNA の収量は相関が見られた。一方、末梢血だけでなく、骨髄中の骨髄腫細胞も CD138 抗体で純化し核酸を抽出し、十分量の gDNA が得られている。さらに、ターゲットキャプチャーシクエンスの基盤となる、多発性骨髄腫の薬剤や病態に関連する遺伝子リストを作成した。

遺伝子パネルリストを用いて、実際にシークエンスを行い原データの収集を行なった。なかでも、ハイリスク染色体異常である IgH-MAF 転座症例を中心に、病態に関わる遺伝子変異を骨髄腫細胞と末梢血 cfDNA の双方の dry 解析を行なった。

その結果、骨髄腫細胞では同定しえなかった複数の遺伝子変異・染色体構造異常が、末梢血中に同定されることが見いだされた。このことは、ハイリスク症例では骨髄腫の主病変である骨髄以外に全身に骨髄腫細胞の別クローンが存在し (髄外病変)、髄外病変の遺伝子変異情報によって予後が規定され可能性があると考えられた。その一方で、初発時に見られた遺伝子変異も同様に検出されたが、それらは TP53 変異や RAS 変異などの獲得性が報告されている変異が主である印象を受けた。さらには、PSMB8 などのプロテアソーム関連遺伝子変異も見られ、薬剤耐性との関連性も示唆された。今後は本研究成果を発展させて、ハイリスク症例の解析数を増やし、薬剤耐性や予後に関連する

遺伝子変異を末梢血 cfDNA から有意差をもって検出できるようにしていく予定である。

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	前川 京子 (Maekawa Keiko) (70270626)	同志社女子大学・薬学部・教授 (34311)	

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