

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08831

研究課題名（和文）骨髄形質細胞の遺伝子発現解析によるALアミロイドーシスの分子病態解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular pathology of AL amyloidosis by gene expression analysis of bone marrow plasma cells

研究代表者

堺田 恵美子（Sakaida, Emiko）

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：60422218

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：次世代シーケンサーを用いてALアミロイドーシスの遺伝子発現を解析し、モノクローナル形質細胞を同定、病態の解明を試みた。これまで正確な腫瘍クローンの検出が難しく、研究が困難であったALアミロイドーシスの骨髄中モノクローナル形質細胞の検出、腫瘍クローン割合が正確に同定可能となった。本研究にてALアミロイドーシスにおいて骨髄形質細胞中のごく一部のモノクローナル形質細胞が症状を生じるに十分な量の異常アミロイド蛋白を産生していることが明らかとなり、またIGLVレパトアと臓器特異性との関連性について海外の既報とは異なる日本人IGLVレパトアの障害臓器特異性の存在を示すことができる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身性病変を有するALアミロイドーシスは、指定難病となっている疾患である。

本研究はNGSでALアミロイドーシスの骨髄中の形質細胞の免疫グロブリン遺伝子を網羅的に解析した日本で初の研究であり、今後症例数を増やすことで海外とは異なる日本人におけるIGLVレパトアの障害臓器特異性の存在を示すことができる可能性が示唆された。本研究の成果から、今後の病態解明などに寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the gene expression of AL amyloidosis using a next-generation sequencer, identified monoclonal plasma cells, and attempted to elucidate the pathophysiology. It has become possible to detect AL amyloidosis monoclonal plasma cells in bone marrow and to accurately identify the tumor clone ratio, which has been difficult to accurately detect tumor clones.

In this study, it was revealed that in AL amyloidosis, a small number of monoclonal plasma cells in bone marrow plasma cells produce a sufficient amount of abnormal amyloid protein to cause symptoms, and IGLV repatoa and organ specificity. Regarding the relevance, it was suggested that it may be possible to show the existence of the disordered organ specificity of Japanese IGLV plasma cells, which is different from the previously reported overseas.

研究分野：造血器腫瘍

キーワード：ALアミロイドーシス 形質細胞類縁疾患 次世代シーケンサー 腫瘍クローン

## 1. 研究開始当初の背景

全身性ALアミロイドーシスは plasma cell dyscrasia を基盤とし線維構造を有するアミロイド蛋白が全身臓器に蓄積し、種々の臓器障害をきたす難治性の骨髄腫類縁疾患であり、国の難病指定疾患のひとつである。本疾患のアミロイド蛋白は、微量のモノクローナル形質細胞が産生するモノクローナル免疫グロブリン (M 蛋白) 軽鎖 (特に約7割がλ鎖に偏る) に由来するものである。しかし、その病因、遺伝学的特性は同定されておらず、結果として有用な治療法や治療モニタリングに応用可能な微小残存病変 (MRD) の同定に至っていない。

AL アミロイドーシスの予後は発症後平均生存期間1~2年 (Zhang et al. Blood Rev. 2017 Mar 8) と不良であることが示されており、治療によっても十分な治療効果は得られていない。本疾患の発症頻度は年間100万人あたり3~9人 (Muchtar et al. Acta Haematol. 2016;135(3):172-90.) と稀少疾患であることから患者検体が非常に得られにくく、さらにALアミロイドーシスが形質細胞性腫瘍でありながら骨髄中の形質細胞量が少なく細胞株が樹立されていないこと、病態を模倣する動物モデルが樹立できていないことなどが、その研究を困難なものとしている。

同じ形質細胞性疾患である多発骨髄腫においては、新規薬剤を組み合わせた治療により目覚ましい予後の改善を認めており、本症例に対しても骨髄腫同様に、新規薬剤を導入した治療戦略の確立が期待されるものの、治療遂行の際の心不全、イレウス、神経障害などの本疾患特有の有害事象発現プロファイルは、患者それぞれで異なり、治療方針の決定は画一的でないことが広く知られている。これは患者毎にアミロイド蛋白が沈着する主要臓器が一定ではないことが一因と考えられるが、最近アミロイド蛋白が沈着した臓器の病理標本を用いた質量分析の解析結果が報告 (Kourelis et al. Blood. 2017 Jan 19;129(3):299-306.) され、各臓器のアミロイド蛋白の免疫グロブリン遺伝子について検討した結果、いずれの臓器においても同一の germline 由来免疫グロブリン遺伝子から成るアミロイド蛋白が同定された。これは多様な臓器浸潤を伴うALアミロイドーシスは、骨髄中の病的クローン性形質細胞に起因する疾患であることを改めて示したものであり、骨髄中の形質細胞を対象とした基礎研究こそが本疾患の病態解明には必要不可欠であることを立証した研究であると考えられる。しかし、肝心の病態の中心的役割を担う形質細胞に注目した解析の結果はなく、さらに、骨髄腫に準じ、治療効果判定に際して軽鎖に注目して評価を行うことが試みられているものの、臓器沈着したアミロイドーシス病態を説明しうるほどの根拠のあるマーカーにはなりえておらず、MRDの検討として、少数の検討例にてフローサイトメトリーを用いた検討の結果がわずかに問題提起する形で報告がなされているのみであった。 (Kastritis E, Dimopoulos MA, et al. Blood Cancer Journal. 2018 May 24;8(5):46)

## 2. 研究の目的

上記の背景より、本研究では、ALアミロイドーシスの骨髄形質細胞に着目し、希少疾患である本症候群患者の形質細胞の網羅的遺伝子解析と遺伝子発現解析に加え、単一細胞レベルで遺伝子変異解析とRNA発現解析、免疫グロブリンのレパトア解析を行うことによりモノクローナル形質細胞の病的特性を解明することを目的とした。

これらにより有用な疾患モニタリング法や治療を目指した新たな治療戦略の確立のための基盤形成を目指す。

## 3. 研究の方法

本疾患が希少疾患であることが研究を困難とする理由の一つであるが、アミロイドーシス診療拠点病院と連携し共同研究として多数例のアミロイドーシス患者検体を用いた検討を計画した。

前述のごとく、ALアミロイドーシスの骨髄形質細胞の遺伝子プロファイルと免疫グロブリン遺伝子の多様性解析、さらには骨髄間質細胞や骨髄微小環境の網羅的解析は国内外にも報告は皆無であり、世界へ日本からのデータを発信できる可能性があり、ALアミロイドーシスの病態解明に大きく貢献できるものと考えた。

本研究者の研究チームは、すでに同様の骨髄腫類縁疾患であるPOEMS症候群の病態解明に関する研究を遂行しており論文化している。(Kawajiri-Manakoら. Am J Hematol. 2018, Nagaoら. Leukemia. 2019) POEMS症候群と同様にλ軽鎖を疾患特性として有する

本研究においても同様の手法を用い、さらに、以下の遺伝子発現の解析に加え、詳細な臨床情報を収集し総合解析を行う。

#### 1. 骨髄モノクローナル形質細胞と骨髄間質細胞の遺伝子異常の網羅的解析

AL アミロイドーシス患者骨髄細胞より形質細胞の特異的細胞表面マーカーである CD138 を用いて MACS/FACS sorting を行い、CD138 陽性形質細胞と陰性細胞を分離し以下の解析を行う。

##### a. 形質細胞のシングルセル RNA シークエンスによる網羅的遺伝子発現解析

病的形質細胞における遺伝子発現プロファイルを明らかにするため AL アミロイドーシス形質細胞におけるシングルセル RNA シークエンスを行う。同じクローン性形質細胞性疾患である多発性骨髄腫 (MM) および意義不明の単クローン性ガンマグロブリン血症 (MGUS) 症例をコントロールとする。本研究により各細胞の免疫グロブリン軽鎖遺伝子の病的クローンの同定が可能であり、アミロイド蛋白を産生しない MM および MGUS 症例との比較によりアミロイド蛋白産生に関与する候補遺伝子の同定が期待される。さらにこれらの結果と患者の臨床データとを総合解析することで、特定の遺伝子発現とアミロイド蛋白の沈着する主要臓器との関係を明らかとする。

##### b. 骨髄間質細胞の網羅的遺伝子解析

多発性骨髄腫や MGUS では骨髄間質細胞 (Bone Marrow Stromal Cells: MSCs) が腫瘍の進展や治療抵抗性に深く関わっていることが知られており、これまで数多くの研究がなされている。一方で、AL アミロイドーシスにおける MSCs の研究は皆無であり、病的形質細胞と MSCs との関係は明らかとなっていない。本研究では骨髄 CD138 陰性細胞から *in vitro* で MSCs を培養し、AL アミロイドーシス由来 MSCs と MM/MGUS 由来の MSCs から RNA、DNA を抽出して RNA シークエンス、全エキソームシークエンスを行い、AL アミロイドーシス形質細胞の遺伝子発現プロファイルと同一患者由来の MSCs の遺伝子発現プロファイルを比較することにより、AL アミロイドーシスにおける MSCs の役割を明らかにする。

#### 2. 免疫グロブリン遺伝子の多様性解析 (レパトア解析)

AL アミロイドーシス症例の M 蛋白軽鎖は  $\lambda$  鎖が  $\kappa$  鎖に比べて多く (3:1)、特定の germline 由来の免疫グロブリン遺伝子がアミロイド蛋白産生に関与しているものと推定される。形質細胞性腫瘍では免疫グロブリン遺伝子を増幅し、遺伝子配列を解析 (レパトア解析) することにより各遺伝子の頻度を明らかにすることが可能である。

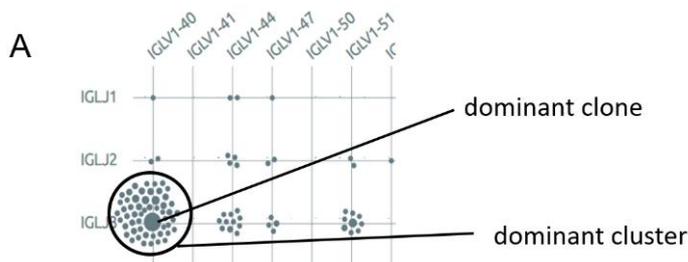
これまで AL アミロイドーシスにおいては NGS によるレパトア解析は行われておらず、本研究により特定の germline 由来の免疫グロブリン遺伝子が臨床経過に及ぼす影響を解析する。

#### 4. 研究成果

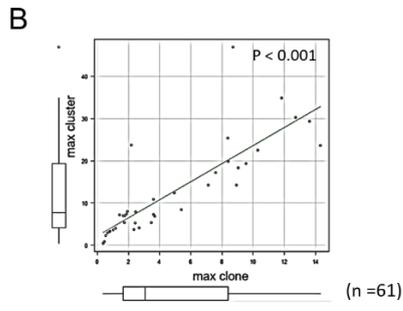
骨髄モノクローナル形質細胞と骨髄間質細胞の遺伝子異常の網羅的解析とともに、免疫グロブリン遺伝子の解析を進めた。

免疫グロブリン遺伝子の多様性解析で得られた結果より、AL アミロイドーシスでは 1 つの IGLV family が dominant に利用されている症例を認める一方で、複数の IGLV family が均等に利用されている症例も認めた。これまでの IMGT 解析では IGLJ family を明確に区別できず、微量なモノクローナル形質細胞の有無を正確に判別することが困難であった。この点を詳細に区別可能とする新たな解析法である Vidjil 解析を用い、さらに IGLV, IGLJ, CDR3 クローナリティについて検討を加えた。

Vidjil 解析にて同定された最大 clone を dominant clone と定義し、dominant clone



と同一の IGLV, IGLJ の組み合わせながら、一塩基以上異なる clone のクラスターを dominant cluster と定義した。(図 A)



各疾患の dominant clone 量、dominant cluster 量中央値は AL アミロイドーシスでそれぞれ 3.07%、7.66%、多発性骨髄腫で 17.8%、37.2%、MGUS で 1.95%、3.78%、コントロールで 0.67%、2.01%であった。(表 1)

Dominant clone 量と dominant cluster 量に正の相関を認め ( $P < 0.001$ 、 $R^2 = 0.88$ )、両者をモノクローナルの基準に用いることの妥当性を確認した。(図 B)

Vidjil 解析ではコントロール全例において dominant clone  $< 1\%$ かつ dominant cluster  $< 3.5\%$ であり、dominant clone  $> 1\%$ かつ dominant cluster  $> 3.5\%$ をモノクローナル形質細胞と定義した。この基準を用いた各疾患のモノクローナル形質細胞の同定率は AL アミロイドーシスの 84%、多発性骨髄腫の 100%、MGUS の 67%であった。Dominant clone の臨床的な意義を検討するため、腫瘍量を反映し予後因子でもある dFLC と dominant clone 量の相関を検討したが、両者に相関は認めず、骨髄中の少数のモノクローナル形質細胞が症状を生じるに足る十分量のアミロイド蛋白を産生していることが明らかとなった。

表 1 Vidjil 解析による形質細胞疾患のクローン・クラスター量

	AL amyloidosis	MGUS	MM	Control
	median (range)	median (range)	median (range)	median (range)
n	38	9	7	7
Vidjil max clone %	3.07 (0.38-14.3)	1.95 (0.42-14.6)	17.8 (2.2-29.1)	0.67 (0.422-0.913)
Vidjil max cluster %	7.66 (0.39-46.9)	3.78 (0.89-32.0)	37.2 (4.74-58.7)	2.01 (1.48-3.28)
Identification of malignant clone	32/38 (84%)	6/9 (67%)	7/7 (100%)	0/0

既報において、フローサイトメトリーを用いた AL アミロイドーシスのモノクローナル形質細胞量と FLC の関連を検討した報告においても、両者に相関を認めておらず、本研究と同様の結果であった。AL アミロイドーシスで同定した dominant clone の IGLV family と障害臓器の関連に関して、AL アミロイドーシスの心障害および腎障害合併例では、ともに IGLV1-51 が最多となるクローンであった。

海外からの既報では、心障害あり群で IGLV1-44、腎障害あり群で IGLV6-57 が多いなどの報告があるが、今回解析した症例とは異なるレパトアが使用されていた。

次世代シーケンサーを用いた解析を行い、AL アミロイドーシスのモノクローナル形質細胞を同定した。本研究手法により、骨髄中のモノクローナル形質細胞の割合が正確に同定可能であった。

AL アミロイドーシスにおいて骨髄形質細胞中のごく一部のモノクローナル形質細胞が症状を生じるに十分な量の異常アミロイド蛋白を産生していることが明らかとなった。また、IGLV レパトアと臓器特異性との関連性に関して、心障害および腎障害合併例とともにこれまでの既報とは異なる IGLV1-51 が多く使用されていた。

本研究は NGS で AL アミロイドーシスの骨髄中の形質細胞の免疫グロブリン遺伝子を網羅的に解析した日本で初の研究であり、今後症例数を増やすことで海外とは異なる日本人における IGLV レパトアの障害臓器特異性の存在を示すことができる可能性が示唆された。本研究の成果から、今後の疾患モニタリングへの有用性、さらなる病態解明などに寄与することが期待される。

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 Kimura K, Tsukamoto S, Miyazaki K, Kawajiri-Manako C, Ishii A, Rahmutulla B, Fukuyo M, Oshima-Hasegawa N, Mitsukawa S, Takeda Y, Mimura N, Takeuchi M, Ohwada C, Iseki T, Matsusaka K, Sanada M, Yokote K, Kaneda A, Ishida T, Suzuki K, Nakaseko C, Sakaida E.	4. 巻 101-102
2. 論文標題 Identification of clonal immunoglobulin light-chain gene rearrangements in AL amyloidosis using next-generation sequencing.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Exp Hematol.	6. 最初と最後の頁 34-41.e4.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.exphem.2021.08.001. Epub 2021	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 木村賢司, 塚本祥吉, 堺田恵美子ら
2. 発表標題 NGSによるALアミロイドーシスでのクローナル免疫グロブリン 遺伝子の同定
3. 学会等名 第44回日本骨髄腫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村賢司, 塚本祥吉, 堺田恵美子ら
2. 発表標題 ALアミロイドーシスにおけるNGSによるクローナル免疫グロブリン 遺伝子の同定
3. 学会等名 第81回日本血液学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村賢司, 塚本祥吉, 堺田恵美子ら
2. 発表標題 Identification of Clonal Immunoglobulin Light-Chain Gene Rearrangements in AL Amyloidosis Using Next Generation Sequencing
3. 学会等名 61st ASH Annual meeting and Exposition (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	三村 尚也 (Mimura Naoya) (00422220)	千葉大学・医学部附属病院・講師  (12501)	
研究分担者	塚本 祥吉 (Tsukamoto Shokichi) (00814617)	千葉大学・医学部附属病院・特任助教  (12501)	
研究分担者	中世古 知昭 (Nakaseko Chiaki) (30323398)	国際医療福祉大学・医学部・主任教授  (32206)	
研究分担者	大和田 千桂子 (Ohwada Chikako) (80436352)	国際医療福祉大学・医学部・准教授  (32206)	
研究分担者	武内 正博 (Takeuchi Masahiro) (50466702)	千葉県がんセンター(研究所)・腫瘍・血液内科・部長  (82504)	

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
---------	---------