

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08759

研究課題名(和文) リキッドバイオプシーを用いた多発性骨髄腫の病態予測ゲノムバイオマーカーの探索研究

研究課題名(英文) Exploratory study to find predictive genomic biomarkers using liquid biopsy 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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、骨髄形質細胞および末梢血cell free DNA(cfDNA)の比較により、多発性骨髄腫の病勢進行や薬剤感受性に関わる遺伝子変異を同定し、予後や薬剤感受性を予測するバイオマーカーを同定することを目的とする。本研究の成果として、骨髄中形質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cfDNAに同定された。特に、染色体高リスク症例では骨髄穿刺部位以外の全身の骨髄や髄外病変に別クローンが存在し、それら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。今後は症例を蓄積し、薬剤耐性や予後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、骨髄中の形質細胞の解析のみからは同定しえなかった遺伝子変異や構造異常を抽出できた。これは、多発性骨髄腫細胞は体内の骨髄や髄外病変など多くの部位でクローン進化しており、それが患者の病態を反映し生命予後や薬剤反応性に寄与すると考えられた。すなわち、多数例での末梢血cfDNA解析によって、薬剤耐性や予後に関連したバイオマーカーを同定すれば患者毎の至適な治療法を確立することが可能となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate genetic mutations related to sensitivity or resistance to each drug and prognosis of the patients with multiple myeloma (MM). It was compared using clinical samples derived from marrow plasma cells and those of cell free DNA(cfDNA) in peripheral blood. As a result, various types of gene mutations and structural variants were identified in cfDNA relevant to clinical features but not in marrow plasma cells. It suggests that the genetic aberrations detected in cfDNA reflect those of other marrow sites from aspiration site in addition to the extramedullary lesions, and they determines the prognosis of the patients in MM especially with high-risk cytogenetic abnormalities. Further study is warranted to identify clinically available gene mutations in cfDNA related to the drug resistance and patient prognosis in MM.

研究分野：血液内科学

キーワード：多発性骨髄腫 バイオマーカー リキッドバイオプシー cell free DNA クローン進化 薬剤感受性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、多発性骨髄腫の治療にプロテアソーム阻害薬、免疫調節薬や抗 CD38 抗体が導入されたことによって、患者予後は著しく改善し、患者の生存期間中央値はおおよそ 6 年となり、10 年以上の長期生存者も増加している。しかし、最終的には多剤耐性状態による難治性骨髄腫へと移行し、なかには、治療開始後 2 年以内に死亡する予後不良例も経験される。そのような病勢進展や予後不良例の予測因子として、これまで骨髄腫細胞における染色体異常を中心に研究が進められてきた。我々も、t(14;16)陽性多発性骨髄腫患者の全国的調査研究を行い、新規薬剤時代においても生存期間が中央値で 3 年程度の高リスク病型であることを報告した(成田、李、飯田ら、Blood Cancer J 2015; 5: e285)。ただし同じ高リスク病型であっても、生存期間や薬剤感受性は患者毎に多様である。同様に標準リスク群に分類される t(11;14)転座や高二倍体を有する患者においても、時に悪性度の高い経過をたどる患者が経験される。このような予後不良な患者は、初発時や再発時に髄外の腫瘍性病変が多発しやすいことも臨床的に経験される。すなわち骨髄形質細胞の早期の分子異常である染色体転座や異数性に加えて、二次的に生じる遺伝子異常とその機能的な結果を含む臨床病態の検討が必要になる。さらに骨髄腫細胞の主要な増殖部位である骨髄だけでなく、髄外病変における骨髄腫細胞のクローン進化についても把握する必要があると考えられる。最近の次世代シーケンス (NGS) の進歩に伴い、侵襲の少ない末梢血より腫瘍細胞の遺伝子異常を高感度に検出するリキッド・バイオプシーが注目されている。末梢血の解析は、体内に存在する骨髄内外の腫瘍細胞全体の遺伝子変異を網羅的に検出し、予後や薬剤感受性の正確な予測を可能にすることが期待される。すなわち「末梢血試料(単核球や血清 cfDNA)は、多発性骨髄腫の進展状態を反映する包括的な情報を含み、骨髄試料よりも臨床的に有用な情報となりえる」という学問的な問い・仮説を提唱した。

2. 研究の目的

多発性骨髄腫患者由来の骨髄中形質細胞および末梢血試料(単核球 DNA および血清 cfDNA)の NGS による遺伝子変異解析から、骨髄腫の病勢進行・薬剤感受性に関わる遺伝子変異を同定することを目的とした。

具体的には、末梢血の解析から、体内に存在する骨髄内外の腫瘍細胞全体の遺伝子変異を網羅的に検出し、予後や薬剤感受性を予測するかどうかを検討することや、患者さんの初発未治療時から再発・難治性骨髄腫へと移行する際の骨髄検体および末梢血試料における遺伝子変異の経時的な変化から、薬剤耐性やその後の予後などの臨床上有用となりうる因子を同定しえないかなどを探索した。とくに、再発・難治性骨髄腫に頻発する、髄外病変に関連した遺伝子変異を同定し、それらが薬剤感受性耐性や、予後にどのように寄与するかを明らかにすることが重要であると考えた。

3. 研究の方法

患者さんの末梢血試料から、全身の腫瘍細胞を反映したクローン構造を明らかにし、骨髄腫の病勢進行・薬剤抵抗性に関わる遺伝子異常を同定し、予後を予測するバイオマーカーと治療標的分子を探索する。試料として、初発時・再発時・難治性状態の各段階で採取した骨髄中形質細胞および末梢血（末梢血単核球および血清）を分離・保存とした。具体的には、骨髄検査時の残余検体より、CD138 ビーズを用いて骨髄形質細胞の純化を施行後に検体保存し、それらを用いて、以下のような遺伝子変異の解析および、関連解析（末梢血試料中の遺伝子変異と予後や薬剤感受性との関連）を計画した。

(1) 骨髄中形質細胞の解析

本研究に同意いただいた多発性骨髄腫患者さんの骨髄残余検体中の骨髄単核細胞から抗CD138抗体ビーズを用いて純化した形質細胞からDNAを抽出する。骨髄中形質細胞由来の遺伝子変異解析データをコントロールとし、末梢血試料（単核球およびcfDNA）の遺伝子変異解析と比較することで、末梢血試料に特異的な変異データを抽出する。

(2) 血清中のcell free DNAの解析

我々の検討では、骨髄腫患者さんの未治療時の血清1mlあたり、中央値77ng（6-420）のcfDNAが採取され、治療経過中に難治性になるにつれてcfDNA量が増加する。患者さんの各段階で採取した末梢血血清から40-200ngほどのライブラリー作成に十分量のcfDNAを抽出、骨髄形質細胞の解析と同様にターゲットシーケンスを行う。約1%程度の低頻度の変異も含めて検出する。同一患者の骨髄形質細胞および、末梢血単核球（腫瘍混入例）のそれぞれの遺伝子変異プロファイルと比較検討すると同時に、生存期間および薬剤感受性と関連のある血清cfDNA特異的な遺伝子変異を探索する。

(3) 遺伝子変異データと生存期間および薬剤感受性との関連解析

初発時末梢血試料で同定された遺伝子変異に関しては、生存期間との関連を統計的に検証し、予後に関わる変異・コピー数変化を同定する。また、プロテアソーム阻害薬や免疫調節薬治療における最良効果や無増悪期間との関連は群間比較にて解析する。また同一患者の治療中の各段階で採取した末梢血検体を用い、耐性獲得時に出現する変異・コピー数異常を統計解析により同定する。

4. 研究成果

(1) 健常者、MGUS、無症候性、初発時骨髄腫患者間でのcfDNA量の比較

血清1mL当たりからcfDNA抽出を行い、DNA量を比較した。健常者(healthy)、前がん状態(MGUS)とくすぶり型骨髄腫(SMM)、未治療の多発性骨髄腫(NDMM)の3群に分類した。健常者(n=10 中央値31.6ng/mL)とMGUS及びSMM(n=18 中央値57.0ng/mL)の群では有意差がなかった。一方で、健常者とNDMM(n=81 中央値78.1ng/mL)の群では有意差があった。また、MGUS及びSMMとNDMMの群ではcfDNA量に有意差が示されなかった。

(2) 治療経過毎の末梢血 cfDNA 量の変化

治療経過毎に腫瘍量と cfDNA 量の変化について観察した。観察した患者は今回抽出に用いた中でも経過中に再発難治性となった症例を選択した。治療経過毎の cfDNA 量に関しては増加傾向もあれば減少傾向の症例もあり動向は一様ではなかった。そして、cfDNA 量と および のいずれかの腫瘍性免疫グロブリンの遊離軽鎖 (involved FLC) の値を使用しその関係を統計学的に評価したが、相関は認められなかった。

(3) 末梢血 cfDNA と骨髓検体における遺伝子変異の同定と臨床データとの関連解析

初発未治療の多発性骨髄腫患者に由来する末梢血血清から cfDNA を抽出し、約 40~200 ng ほどのライブラリー作成に十分な量を得られることを確認した。得られる末梢血 cfDNA の量は同一患者でのステージ進行や腫瘍量と相関があることを見出した。これまでに作成したターゲットキャプチャーシーケンスの基盤となる、多発性骨髄腫の薬剤や病態に関連する遺伝子パネルリストを用いて、実際にシーケンスを行った。全ての保存検体を有する症例のシーケンスを実行できる未通しがたたなかったため、予後不良な経過をたどった染色体高リスク病型である t(14;16)陽性、すなわち *IgH-MAF* 転座症例を中心に、病態に関わる遺伝子変異を骨髓中形質細胞と末梢血 cfDNA の双方でドライ解析を行った。その結果、骨髓中形質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 cfDNA 解析で同定されることが見いだされた。このことは、染色体高リスク症例では骨髓穿刺部位以外の全身の骨髓や主病変以外の髄外病変に別の進化クローンが存在し、髄外病変の遺伝子変異情報によって予後が規定される可能性があることが考えられた。

また、染色体高リスク患者の経時的な変化の解析 (ダイナミックな解析) では、再発・難治状態へ進むにつれて、初発時に認められなかった新規の遺伝子変異が骨髓腫細胞と末梢血 cfDNA の双方から検出された。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 *K-RAS* や *N-RAS* 変異などのドライバー変異が主であった。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が示唆された。今後、ダイナミックな変異解析の蓄積を通して、薬剤耐性やその後の予後に関わる遺伝子変異を末梢血から同定できる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ri Masaki, Iida Shinsuke, Maruyama Dai, Sakabe Aya, Kamei Ryo, Nakashima Takuto, Tohkin Masahiro, Osaga Satoshi, Tobinai Kensei, Fukuhara Noriko, Miyazaki Kana, Tsukamoto Norifumi, Tsujimura Hideki, Yoshimitsu Makoto, Miyamoto Kenichi, Tsukasaki Kunihiro, Nagai Hirokazu	4. 巻 112
2. 論文標題 HLA genotyping in Japanese patients with multiple myeloma receiving bortezomib: An exploratory biomarker study of JCOG1105 (JCOG1105A1)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 5011~5019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15158	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 Kanamori T, Sanada M, Ri M, Ueno H, Nishijima D, Yasuda T, Tachita T, Narita T, Kusumoto S, Inagaki A, Ishihara R, Murakami Y, Kobayashi N, Shiozawa Y, Yoshida K, Nakagawa MM, Nannya Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Horibe K, Handa H, Ogawa S, Iida S.	4. 巻 191
2. 論文標題 Genomic analysis of multiple myeloma using targeted capture sequencing in the Japanese cohort.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 755-763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.16720	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 Tachita T, Kinoshita S, Ri M, Aoki S, Asano A, Kanamori T, Yoshida T, Totani H, Ito A, Kusumoto S, Komatsu H, Yamagata K, Kubo K, Tohkin M, Fukuda S, Iida S.	4. 巻 111
2. 論文標題 Expression, mutation, and methylation of CRBN-pathway genes at pre- and post-lenalidomide treatment in multiple myeloma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1333-1343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14352	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 Yasuda T, Sanada M, Nishijima D, Kanamori T, Iida S, Tomita A, Horibe K, et al.	4. 巻 111
2. 論文標題 Clinical utility of target capture-based panel sequencing in hematological malignancies: a multicenter feasibility study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3367-3378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14552	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takashi Kanamori, Shinsuke Iida
2. 発表標題 Cytogenetic risk/Genome-based medicine in multiple myeloma
3. 学会等名 The 12th. JSH International Symposium 2021 in Kamakura
4. 発表年 2021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	李 政樹 (Ri Masaki) (00567539)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授 (23903)	

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