

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591399

研究課題名(和文)ゲノム構造異常とエピゲノム異常の包括的解析に基づく新規骨髄腫治療法の開発

研究課題名(英文)Development of the new myeloma treatment based on the comprehensive analysis for genome structure abnormality and epigenome abnormality

研究代表者

石田 禎夫(Ishida, Tadao)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20305220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：今回の検討により多発性骨髄腫において長鎖散在反復配列(LINE-1)は有意に低メチル化していることが示され、かつその前癌病変であるMGUSは正常コントロールと骨髄腫の中間のメチル化レベルを示したことから多発性骨髄腫の進展に伴いメチル化レベルが段階的に低下することが示唆された。さらに、LINE-1メチル化レベルと染色体欠失の程度には有意な逆相関を認め、LINE-1が低メチル化している検体ほど染色体欠失が多いことが示された。また、LINE-1のメチル化レベルと予後の相関を検討した結果、LINE-1の低メチル化は独立した予後不良因子であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Global levels of the long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) methylation declined with the degree of malignancy of plasma cells, and there was a significant inverse correlation between the degree of genomic loss and the LINE-1 methylation levels. Finally, there was a significant association between LINE-1 hypomethylation and poorer overall survival. Our findings suggest that global hypomethylation of LINE-1 may increase the malignant potential of myeloma cells by inducing broad copy-number losses.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：multiple myeloma methylation LINE-1

## 1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫は、B細胞の最終分化段階である形質細胞の悪性腫瘍であり、経過中に治療抵抗性を獲得するため、新規治療薬（ボルテゾミブ・サリドマイド・レナリドマイド）の臨床導入にも関わらず、依然として治癒困難である。この問題の一部として、多発性骨髄腫が、多彩なレベルでの染色体構造異常・遺伝子異常・メチル化異常を呈する不均一な疾患であることが挙げられる（Fonseca et al, Leukemia, 2009）。

近年、がん細胞におけるDNAコピー数異常が高い頻度で起きている事が明らかとなり、Comparative Genomic Hybridization（CGH）法とDNAマイクロアレイとを組み合わせたアレイCGH法やその変法を用い、微細なゲノム構造異常のハイスループット解析が可能となった。実際に、がん細胞における10kBレベルの欠失を検出し、そのゲノムコピー数異常領域内から癌抑制遺伝子の単離を試みる事が可能となりつつある（Beroukhi et al, Nature, 2010）。

一方、DNAメチル化やヒストン修飾などのエピジェネティックな変化が、癌の発生と進展に関与することが明らかとなりつつある。骨髄腫においても、さまざまな知見が集積しつつあり、DNAメチル化異常による遺伝子不活化の報告として、申請者らによるBNIPをはじめ（Murai et al, Br J Cancer, 2005）、細胞周期に関わる分子（p15INK4b, p16INK4a）、細胞シグナルに関わる分子（SOCS-1, SFRP）、アポトーシス関連分子（DAPK, BAD, BAK, BIK, BAX）等の報告がある。さらに申請者らは、骨髄腫細胞株におけるメチル化阻害剤により発現変動する遺伝子群を検索し、細胞株及び臨床検体を用いたメチル化プロファイルの結果、RASD1がメチル化標的遺伝子の一つであることを発見した（Clin Cancer Res. 2009;15:4356-64）。近年、脱メチル化剤アザシチジンやデシタピンが骨髄異形成症候群で有用性を認められ、DNAメチル化を標的とした血液悪性疾患の治療が有望視されるようになり、どのような患者に有効であるかを知るバイオマーカーの探索が重要である。

このような状況の中、多発性骨髄腫におけるアレイCGH法によるゲノム構造解析と、次

世代シーケンサーを用いた全ゲノムレベルでのメチル化解析とを組み合わせ、ゲノム・エピゲノム異常と臨床情報とを包括的に解析し、抗癌剤抵抗性に関わるゲノム構造異常とメチル化異常を同定する研究を継続する必要があると考えられた。

## 2. 研究の目的

多発性骨髄腫における染色体異常は極めて多様であり、その解析は、骨髄腫の発生・進展機序の解明に有用である。本研究は、アレイCGH法を用いたゲノム構造解析と、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム領域のDNA異常メチル化解析とを組み合わせ、ゲノム・エピゲノム異常を包括的に解析し、発がん・病態進展に関連する標的遺伝子を探索することで疾患の発生と進展における役割を明らかにする。次に、ゲノムワイドなメチル化異常を解析するため、ヒトゲノムの42%を占めるレトロトランスポゾン（LINE-1、Alu等）のメチル化解析を行うとともに、臨床データと照らし合わせ、治療効果・予後との関連も検索することを目的とした。

## 3. 研究の方法

骨髄腫細胞株および臨床検体を用いて、アレイCGH法を用いたゲノム構造解析と、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム領域のDNA異常メチル化解析を行う。バイオインフォマティクスを用いて、ゲノム・エピゲノム異常を包括的に解析し、発がん・病態進展に関連する標的遺伝子を探索する。特にレトロトランスポゾンのうち、LINE-1に注目し、骨髄腫細胞を用いて、そのメチル化の状態をメチル化定量法で評価する。さらにDNAメチル化領域の新しいゲノムワイドスクリーニング法として、骨髄腫細胞に対して次世代シーケンサーを用いたMethyl-CpG-binding domain protein（MBD）シーケンス法を行う。これらの検討により判明したメチル化情報と、臨床情報・細胞遺伝学的情報との相関を解析する。

## 4. 研究成果

今回我々は、多発性骨髄腫におけるDNA繰り返し配列のメチル化レベルと染色体異常

および予後との関連について検討を行った。まずヒトゲノムの 42%を占めるレトロトランスポソンのメチル化レベルを検討した。これまでも様々な腫瘍においてその低メチル化が指摘されているが、今回の検討により多発性骨髄腫においても LINE-1 は有意に低メチル化していることが示され、かつその前癌病変である MGUS は正常コントロールと骨髄腫の中間のメチル化レベルを示したことから多発性骨髄腫の進展に伴いメチル化レベルが段階的に低下する可能性が示された。aCGH により遺伝子のコピー数に関しては予後不良と関係する 13 番染色体の欠失と 1q の増幅を持つ群が同定された。さらに、LINE-1 メチル化レベルと染色体欠失の程度には有意な逆相関を認め、LINE-1 が低メチル化している検体ほど染色体欠失が多いことが示された。染色体欠失が生じる場合には染色体欠失領域の両断端が重要と考え、染色体欠失領域の断端と隣接するプローブの間の領域を Breakpoint として抽出し詳細な検討を行った。Breakpoint のうち 4 症例以上で共通して認められるものを Common break point (CBP) と定義したところ、全ゲノム中に 80 の CBP が同定された。CBP 領域にはその他の領域と比較し LINE-1 がより多く存在することが示され、かつ breakpoint の数と LINE-1 のメチル化レベルには有意な逆相関が認められたことから、LINE-1 が高密度であり低メチル化を生じている検体では染色体欠失が生じやすいことが推察された。また、LINE-1 のメチル化レベルと予後の相関を検討した結果、LINE-1 の低メチル化は独立した予後不良因子であることが示された。さらに予後分類である ISS のステージ-1、ステージ 2/3 の患者群において LINE-1 の低メチル化と予後を検討したところ、同じステージ内でも LINE-1 の低メチル化症例は有意に予後不良であった。多発性骨髄腫においては染色体が non-hyperdiploidy (染色体の高度な増幅を伴わない) である群が予後不良であることが知られているが、non-hyperdiploidy は染色体欠失に特徴づけられる一群であり、このことは今回の結果と一致すると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

1. Ishida T. [Multiple myeloma: chromosomal abnormalities, clinical features and prognosis]. Rinsho Ketsueki. 2013;54:1856-66. (査読有) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24064837>
2. Aoki Y, Ikeda H, Ishida T, et al. Genomic vulnerability to LINE-1 hypomethylation is a potential determinant of the clinicogenetic features of multiple myeloma. Genome Med. 2012;4:101(1-14). (査読有) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23259664>
3. Yasui H, Ishida T, Ikeda H, et al. Model of translational cancer research in multiple myeloma. Cancer Sci. 2012;103:1907-1912. (査読有) DOI: 10.1111/j. 1349-7006.2012.02384.x.
4. Liu Y, Ishida T, et al. Heat stress activates ER stress signals which suppress the heat shock response, an effect occurring preferentially in the cortex in rats. Mol Biol Rep. 2012; 39:3987-3993. (査読有) DOI:10.1007/s11033-011-1179-2
5. Watanabe Y, Ishida T, et al. In vitro and in vivo antitumor effects of recombinant bispecific antibodies based on humanized anti-EGFR antibody. Oncol Rep. 2011;26:949-955. (査読有) DOI:10.3892/or.2011.1382
6. Sasaki S, Ishida T, et al. Interferon- $\gamma$  and anti-fibroblast growth factor receptor 1 monoclonal antibody suppress hepatic cancer cells in vitro and in vivo. PLoS One. 2011;6:e19618 (査読有) DOI:10.1371/journal.pone.0019618

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 石田禎夫. 多発性骨髄腫 : 染色体異常と臨床病型・予後 . 第 75 回日本血液学会学術集会 . 教育講演( EL - 37 プログレス ) 2013、札幌.
2. Yasui H, Ishida T, et al. Hypomethylation of Retrotransposons is Correlated with Malignant Levels, Frequency of Chromosomal Aberrations, and Poor Prognosis in Multiple Myeloma. JSH International Symposium 2012 in Kawagoe, May, 26-27, 2012, Kawagoe, Japan.
3. Yasui H, Ishida T, et al. Hypomethylation of endogenous retrotransposons is correlated with frequent chromosomal deletions and poor prognosis in multiple myeloma. 17th Congress of the European Hematology Association, Jun, 15, 2012, Amsterdam, Netherlands.
4. Ishida T, et al. Genomic screening for genes silenced by DNA methylation explore epigenetic biomarkers for prediction of sensitivity to dexamethasone in MM. 13<sup>th</sup> International Myeloma Workshop. May, 3, 2011, Paris, France.

〔図書〕(計 14 件)

- 1 Ishida T. [Triplets therapy for the patients of multiple myeloma]. Nihon Rinsho. 2013;71:1691-1696. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24205736>
- 2 Ishida T. [Myeloma therapy(2) Treatment of transplant-ineligible patients]. Rinsho Ketsueki. 2013;54:711-714.
- 3 石田禎夫. 多発性骨髄腫に対する初期治療の概念 . 多発性骨髄腫 Updating 第 3 巻 . 編集 清水一之、阿部正博、島崎千尋、鈴木憲史 . 医薬ジャーナル社 (大阪) . pp12-27, 2013.
- 4 安井寛、石田禎夫. 多発性骨髄腫におけるエピゲノム異常と治療の可能性 . 血液内科 . 2013;66 : 337-345, 2013.
- 5 石田禎夫. 多発性骨髄腫における神経

障害のマネジメント . 血液内科 . 2013;66 : 257-264.

- 6 石田禎夫. 移植非適応の多発性骨髄腫患者に対する治療 . International Journal of Myeloma. 2013;3:12-25.
- 7 石田禎夫. 多発性骨髄腫に対する免疫調節薬治療 . Jpn J Cancer Chemother. 2013;40:589-593.
- 8 石田禎夫. 高齢者多発性骨髄腫の特徴と治療の実際 . 血液フロンティア . 23:1733-1742, 2013.
- 9 安井 寛, 石田禎夫. 発症機構とエピジェネティクス異常 (6) 多発性骨髄腫 . 造血器腫瘍とエピジェネティクス-治療への応用と新たな展開 - : 木崎昌弘編 : 医薬ジャーナル社 : 140-148, 2012.
- 10 石田禎夫, 安井寛 . 多発性骨髄腫 - 現状と進歩 検査法と病態 t(4 ; 14) 転座と多発性骨髄腫 SET ドメイン蛋白質 (MMSET) の意義 . 医学のあゆみ . 2012;242 : 1063-1067.
- 11 石田禎夫. 青木由佳 . 多発性骨髄腫におけるエピジェネティック異常 . 血液内科 . 2012;64 : 405-411.
- 12 青木由佳、石田禎夫. 多発性骨髄腫に対する治療のエビデンスレビュー ~ 高齢者に対する初回治療 ~ . 血液フロンティア . 2012;22 : 661-669, 2012.
- 13 石田禎夫. 染色体ハイリスク骨髄腫に対する治療の最新知見 . 血液フロンティア . 21:63-71, 2011.
- 14 石田禎夫, 青木由佳 . Thalidomide の薬剤特性、治療成績、有害反応 . 内科 . 108:261-267, 2011.

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

石田 禎夫 (ISHIDA Tadao)  
札幌医科大学・消化器・免疫・リウマチ内科学講座・准教授  
研究者番号 : 20305220

### (2) 研究分担者

池田 博 (IKEDA Hiroshi)  
札幌医科大学・道民医療推進学講座・助教  
研究者番号 : 60570132