

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：20101  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23790666  
 研究課題名（和文） 症例対照研究による多発性骨髄腫のリスク要因と多段階的エピジェネティクス異常の探索  
 研究課題名（英文） Exploration of multi-step epigenetic mechanism in multiple myeloma with case-control study approach  
 研究代表者  
 野島 正寛 (Nojima Masanori)  
 札幌医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：00457699

研究成果の概要（和文）：本研究では、多発性骨髄腫における反復配列 LINE-1 の異常低メチル化とその染色体欠失との関連、低メチル化と予後不良との関連が示された。さらに、DNA 切断領域には LINE-1 密度が高い点や次世代シーケンサーのメチル化解析における有用性も見出された。以上の結果は Genome Medicine 2012;4:101 として報告した。本研究の成果により、反復配列メチル化異常を標的とした新規的診断法・治療法の発展が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we observed aberrant hypomethylation of LINE-1 and other repeated sequences in multiple myeloma, its association with genomic deletion, and the association between hypomethylation and poor prognosis. In addition, it was indicated that LINE-1 sequences are dense in the commonly deleted legion and also usefulness of MBD-sequencing. We reported these results in Genome Medicine 2012;4:101. Our study suggested the potential of LINE-1 targeting strategy in clinical situation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学，衛生学

キーワード：多発性骨髄腫，エピジェネティクス，DNA メチル化，リスク要因，反復配列

## 1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫は形質細胞に由来する悪性腫瘍で、近年、新規薬剤が数多く開発され臨床現場での利用が始まっている。しかしながら、依然として治癒を得ることは困難であり、その予後規定因子の一つとして様々な染色体異常の存在がある。また、多くの悪性腫瘍において DNA メチル化をはじめとするエピジェネティックな異常が報告され、多発性骨髄腫も例外ではないが、中でも Long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) 等の DNA 繰り返し配列の低メチル化と腫瘍細胞における染色体不安定性との関連が指摘されている。

## 2. 研究の目的

以上のような背景の下、多発性骨髄腫における LINE-1 をはじめとする DNA 繰り返し配列のメチル化、全ゲノムのグローバルな DNA メチル化レベルの検討、および染色体異常や臨床遺伝学的特徴との関連性についての検討などを行うことを目的とし本研究を計画した。

本研究では、多発性骨髄腫症例を症例群、前骨髄腫状態である monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) 症例と非 MGUS 非多発性骨髄腫症例（正常形質細胞）を対照群とした対照研究

の形を取っており、3つの状態を比較することにより多段階的なエピジェネティック変化についても検討を行う。

### 3. 研究の方法

74例の多発性骨髄腫症例、8例の monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) 症例、4例の非 MGUS、非多発性骨髄腫症例（正常形質細胞）から骨髄液の提供を受け、形質細胞のマーカーである CD138 陽性細胞を分離し DNA を抽出し、実験に使用した。Bisulfite-pyrosequencing 法にて LINE-1, AluYb8, AluYa5, Sat- $\alpha$  の 4 つの DNA 繰り返し配列のメチル化レベルを測定し、染色体異常は array comparative genomic hybridization (aCGH) によって検出した。全ゲノムの DNA メチル化レベルは Methyl-CpG binding domain sequencing (MBD-seq) によって測定した。

### 4. 研究成果

今回調べられた繰り返し配列はいずれも正常形質細胞から MGUS, 多発性骨髄腫と悪性度を増すにつれてそのメチル化レベルが有意に低下していることが示された(図 1)。繰り返し配列のメチル化レベルと染色体異常の相関を検討した結果、繰り返し配列のメチル化レベルが低い検体ほど染色体欠失が多い傾向を示した。特に LINE-1 でその傾向が強く、aCGH 法にて検出された欠失プローブ数と LINE-1 のメチル化レベルは有意な逆相関を示した(図 2)。またいずれかの染色体の欠失を持つ検体と持たない検体の LINE-1 メチル化レベルを比較した結果、染色体欠失のある群が有意に LINE-1 のメチル化レベルが低いことが示された(図 3)。

図 1

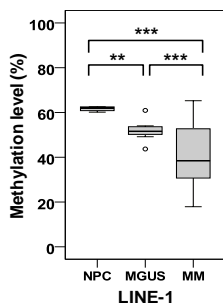


図 2

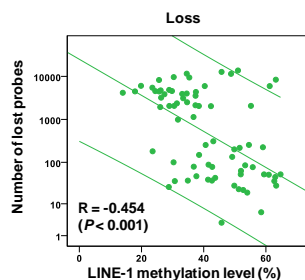
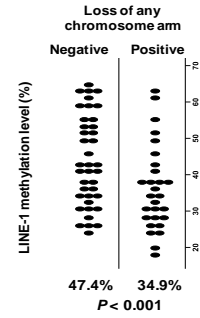
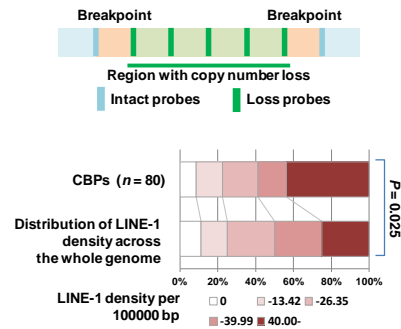


図 3



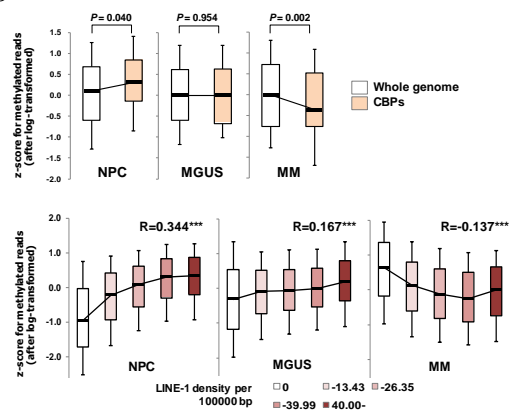
欠失領域とその隣接するプローブ間の領域をゲノム欠失の原因となる breakpoint として同定し、4 検体以上で共通して認められる breakpoint を common breakpoint (CBP) と定義し検討を進めた。CBP 上の LINE-1 の密度を測定した結果、全ゲノムと比較し CBP 上では LINE-1 の密度が高いことが示された(図 4)。また各検体における LINE-1 のメチル化レベルと breakpoint 数を比較したところ有意な逆相関を示し、LINE-1 のメチル化レベルが低い検体ほど breakpoint 数が多いことが示された。

図 4

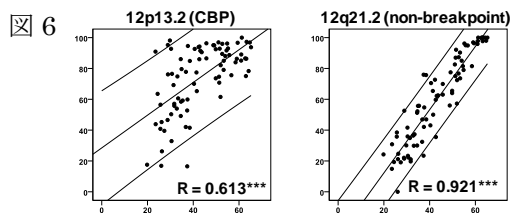


MBD-seq により CBP 領域および全ゲノム上のグローバルなメチル化レベルを測定した結果、多発性骨髄腫では CBP 領域のメチル化レベルがより低下していることが示された。一方、正常形質細胞では CBP 領域のメチル化レベルの方が高く、MGUS では両方で差がないことが示された。全ゲノムを LINE-1 の密度毎に分類し各領域のグローバルなメチル化レベルを検討した結果、多発性骨髄腫では LINE-1 の密度が高い領域ほどメチル化レベルが高いことが示された。

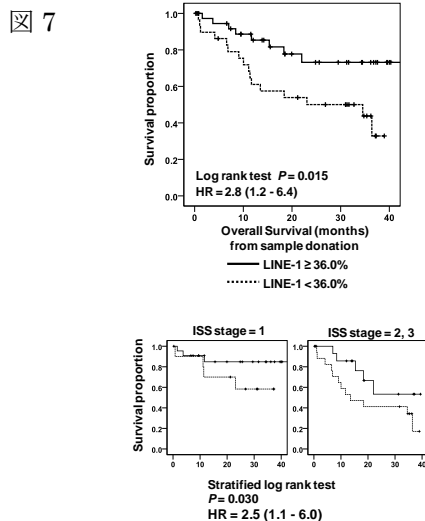
図 5



続いて我々は、血液悪性腫瘍においてしばしば欠失が認められる 12 番染色体の CBP 領域および同染色体上の非 CBP 領域に存在する局所特異的な LINE-1 について、5'UTR のメチル化レベルを測定した結果、これまでに測定していたグローバルな LINE-1 のメチル化レベルと極めて高い相関傾向を示した (図 6)。一方で LINE-1 の gene body に相当する領域のメチル化レベルは 5'UTR のメチル化レベルと比較し明らかに高値であり、相関は認められなかった。グローバルな LINE-1 のメチル化レベルは 5'UTR 領域のメチル化レベルを測定していることから、今回の結果と一致していた



最後に、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 の低メチル化は有意な予後不良因子であることが示された。ISS 病期および年齢による層別解析を行った場合においても、LINE-1 の低メチル化は独立した予後因子であることが示された (図 7)。



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。DNA 繰り返し配列の中でも LINE-1 は最も多く存在しヒトゲノムの約 20% を占める。LINE-1 は逆転写酵素活性による自律性増殖能を持ち、ゲノム上の他の領域への転位が可能である (retrotransposition)。LINE-1 が転位する際に染色体不安定が生じ、挿入された領域の近隣にある癌関連遺伝子の活性

に影響を与えることによって腫瘍形成に関与しているのではないかと推察されている。そして LINE-1 の活性調節の一因子としてエピジェネティックな制御機構が考えられている。

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。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。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。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。

本研究において、DNA 繰り返し配列のグローバルな低メチル化が染色体の欠失を通じ、多発性骨髄腫の進展に関与することが示唆された。特に LINE-1 は、最も染色体異常に影響を与える反復配列であることが推察された。グローバルな低メチル化を介して染色体異常が生じる具体的なメカニズムに関しては今後のさらなる検討が必要と考えられた。また、本研究の成果により反復配列メチル化異常を標的とした臨床応用の発展が期待される。

なお、当初予定していた生活習慣に関わる多発性骨髄腫の発症要因の探索については、大規模コホート研究の結果の検討をもってこれを行うこととし、現在解析中である。その結果は今後論文等で報告する。現在のところ、肥満との関連が見出されており、喫煙や飲酒との関連は大きくないことが示唆されている (図 8)。

図 8

Adjusted by age, sex, smoking and drinking						95%CI	
	BMI	N	Case	P	HR	Lower	Upper
Male	<18.5	2463	3	Ref			
	18.5-24.9	33371	49	0.981	0.99	0.30	3.22
	25-30	7581	9	0.828	0.86	0.22	3.31
	30<	465	1	0.594	1.86	0.19	18.09
Female	<18.5	3823	3	Ref			
	18.5-24.9	42509	54	0.576	1.40	0.43	4.53
	25-30	12341	12	0.983	0.99	0.27	3.66
	30<	1294	5	0.020	5.46	1.30	22.92

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 1 件)

Yuka Aoki, Masanori Nojima, et al. Genomic vulnerability to LINE-1 hypomethylation is a potential determinant of the clinicogenetic features of multiple myeloma., Genome Medicine 2012;4:101, 査読有

[学会発表] (計 6 件)

Yuka Aoki, The significance of global hypomethylation of DNA repetitive elements in multiple myeloma. 第 74 回日本血液学会学術集会. 2012 年 10 月 19 日～2012 年 10 月 21 日. 京都

野島 正寛, 多発性骨髄腫の発生における DNA メチロームの意義: MBD シーケンシング法によるアプローチ. 第 71 回日本癌学会学術総会. 2012 年 09 月 19 日～2012 年 09 月 21 日. 札幌

野島 正寛, MBD-sequencing による多発性骨髄腫のメチローム解析とそのゲノム脆弱性への影響. 第 6 回日本エピジェネティクス研究会年会. 2012 年 05 月 14 日～2012 年 05 月 15 日. 東京

青木 由佳, グローバルな低メチル化に対するゲノム脆弱性は多発性骨髄腫の臨床遺伝学的特徴を決定づける. 第 6 回日本エピジェネティクス研究会年会. 2012 年 05 月 14 日～2012 年 05 月 15 日. 東京

Masanori Nojima, Epigenetic changes in repetitive elements are closely associated with genetic and clinical features in multiple myeloma. ISOBM 2011. 2011 年 10 月 15 日～2011 年 11 月 19 日イタリア・フィレンツェ

Masanori Nojima, DNA methylome and chromosomal aberrations in multiple myeloma: an integrated analysis based on

MBD-sequencing. 第 70 回日本癌学会学術集会. 2011 年 09 月 22～2011 年 09 月 24 日. 名古屋

[図書] (計 0 件)

該当なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

該当なし

○取得状況 (計 0 件)

該当なし

[その他]

ホームページ等

現在のところ該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野島 正寛 (Nojima Masanori)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号:

00457699

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

青木 由佳 (Aoki Yuka)

札幌医科大学・医学部・大学院生

研究者番号: