

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 9 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460673

研究課題名(和文) 多発性骨髄腫における塩基除去修復の解析

研究課題名(英文) Analysis of base excision repair in multiple myeloma

研究代表者

齋藤 貴之 (Saitoh, Takayuki)

群馬大学・保健学研究科・教授

研究者番号：80375542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：OGG1, XRCC1, APE1, MUTYH, PARP1を用いた塩基除去修復(BER)遺伝子多型解析では、OGG1 Cys/Cys型(低活性型)や PARP1 non V / V型(低活性型)が多発性骨髄腫(MM)患者で健常者に比べて有意に多く、BER遺伝子多型がMMの発症に関与することが示唆された。BER遺伝子発現解析では、OGG1, APE1, PARP1のmRNA発現はMM細胞株やMM患者細胞で正常形質細胞よりも著明に高値であった。また、BER遺伝子阻害薬の1つのPARP-1阻害薬はMM細胞増殖を抑制し、塩基除去修復経路を抑えることがMMの治療に結びつく可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Polymorphism studies of base excision repair (BER) genes, including OGG1, XRCC1, APE1, MUTYH, and PARP1, showed that multiple myeloma (MM) patients with OGG1 Cys/Cys (low activity type) or PARP-1 non Val/Val (low activity type) were increased than health controls. Furthermore, mRNA expression of BER genes, including OGG1, APE1, and PARP-1, was increased in MM patients. In addition, new generation PARP-1 inhibitor was effective in MM cell lines, suggesting inhibition of BER pathway may be a treatment option in the future.

研究分野：血液検査学

キーワード：多発性骨髄腫 塩基除去修復遺伝子 OGG1 PARP-1 多型

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨髄腫は、自家末梢血幹細胞移植やサリドマイドなどの新規薬剤が導入されて、50%生存期間が5年に予後が改善してきている。しかしながら、ほとんどの患者は、化学療法抵抗性で、治癒が望めない。

(2) DNAは様々な酸化的ストレスにより損傷を受ける。その結果生じた損傷塩基の中では、8-hydroxyguanine (以下、8-OHGと略)は、シトシンだけでなくアデニンとも対合できるためG:C T:A transversionの突然変異を起こし、がん化の原因の一つになると考えられている。この8-OHG損傷塩基を修復するのが塩基除去修復機構である。

(3) 8-OHGを除去するグリコシラーゼであるOGG1は、がん化抑制に重要な役割を示す。OGG1遺伝子欠損マウスでは、8-OHGの蓄積が生じ、肺腫瘍が高頻度に発生する(Sakumi et al, Cancer Res, 2003)。申請者らは、OGG1を強制発現させると突然変異が抑えられること(Sunaga N, Saitoh T et al, Carcinogenesis, 2001)、8-OHGに対合するアデニンを除去するMYHも強制発現させると突然変異が抑えられること(Yamane A, Saitoh T et al, Carcinogenesis, 2003)、さらに、塩基除去修復遺伝子の一つとして働くAPE1遺伝子も、酸化的ストレスにより誘導され、OGG1の酵素活性を上昇させることを報告してきた。このように、塩基除去修復遺伝子は、8-OHGなどの損傷塩基に対して、共同的に働き、損傷塩基を修復し、がん化を防いでいると考えられる。

(4) 塩基除去修復は、がん化の関与だけでなく、化学療法の反応性に関与していることが注目されている。DNA修復とがんの関係は、「がん化の原因」と「抗がん薬の効きやすさ=化学療法反応性」の二つの側面があると考えられる。

しかしながら、骨髄腫と塩基除去修復機構の関係は明らかでなかったため、今回の研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、塩基除去修復と骨髄腫の関係を明らかにし、がん化や化学療法抵抗性との関連について解析する。さらに、他のがんでは臨床応用されている塩基除去修復阻害薬の応用について検討する。

3. 研究の方法

骨髄腫における塩基除去修復における基礎的研究

(1) 骨髄腫の発症および臨床像と塩基除去修復遺伝子多型との関係:

骨髄腫患者146名と健常者131例に対して、塩基除去修復遺伝子のOGG1 Ser326Cys,

XRCC1 Arg399Gln, APE1 Asp148Glu, MUTYH Gln324His, ARPI Val762Alaの多型解析を実施した。多型解析には、PCR-RFLPを用いて、検体の一部をシーケンスにより確認した。

number	146
age (median)	34.2-83.3 (65.4)
F / M	68 / 78
Ig type	G 80
	A 31
	D 3
	M 1
	BJP 28
	non-secretory 3
D-S stage	I 18
	II 36
	III 92
ISS score	I 42
	II 44
	III 45
	unknown 15

(2) 骨髄腫における塩基除去修復遺伝子発現の解析:

CD138陽性細胞(形質細胞)を用いて、OGG1, APE1, MYH, XRCC1, PARP-1mRNAの発現をreal-time PCRで検討した。

(3) 骨髄腫の塩基除去修復阻害薬の検討:

骨髄腫細胞株はPARP-1阻害薬を用いてMMの増殖の影響を見た。

4. 研究成果

(1) 骨髄腫の発症および臨床像と塩基除去修復遺伝子多型との関係:

OGG1Cys/Cys型(低活性型)が、MM患者群が健常者群より多かった。また、PARP1は、MM患者群では健常者コントロール群に比べてV/V型(高活性型)が有意に少なく、V/A型が有意に多かった。OGG1多型やPARP1多型が多発性骨髄腫の発症リスクに影響することが示唆された。塩基除去修復遺伝子多型と骨髄腫の病態リスクの関連も示唆された。

PARP1V762A遺伝子型・allele頻度

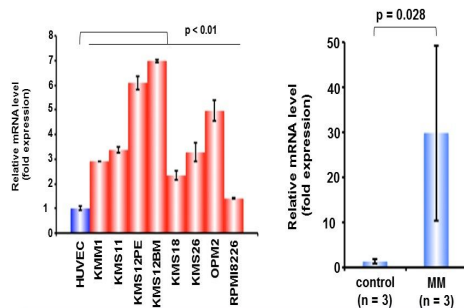
Genotype	Control n (%)	MM n (%)	p value	OR (95% CI)
VV (高活性)	88 (43.6)	48 (32.9)	0.044	0.614 (0.407-0.989)
VA	87 (43.1)	83 (56.8)	0.011	1.74 (1.133-2.677)
AA (低活性)	27 (13.4)	15 (10.3)	0.382	0.742(0.380-1.451)
Allele				
V	263 (65.1)	174 (60.8)	0.304	1.178 (0.862-1.609)
A	141 (34.9)	39.2 (39.2)		



MM患者群ではコントロール群に比べてVV型が有意に少なく、VA型が有意に多かった。

(2) 骨髄腫における塩基除去修復遺伝子発現の解析：すべての骨髄腫細胞株で発現が確認された。細胞株による発現量の相違が見られた。また、患者検体の骨髄腫細胞は、正常形質細胞と比較して、OGG1, APE1, MUTYH, XRCC1, POLB, PARP1 mRNA の発現が 2-20 倍の上昇が見られた。また、OGG1 と APE1 には、蛋白発現量を Western blot 法にて検討した。OGG1 と APE1 の発現ベクターを作製し、コントロールにおいた。OGG1 は、陽性コントロールである発現ベクター細胞株は著明な上昇が見られたが、骨髄腫細胞株は、低発現であった。APE1 は、すべての細胞株において発現が確認された。下の図のように、PARP-1 mRNA も骨髄腫細胞株で検出され、患者の骨髄腫細胞は、健常者正常形質細胞よりも著明の上昇していた。

### PARP1 mRNA発現量の検討



➡ MM細胞株では非腫瘍細胞株に比べてPARP1 mRNAが**高発現**。臨床検体では細胞株に比べ**さらなる高発現**。

(3) 骨髄腫の塩基除去修復阻害薬の検討：Talazoparib, BYK204165, olaparib, veliparib の4つの PARP 阻害剤の検討を実施した。

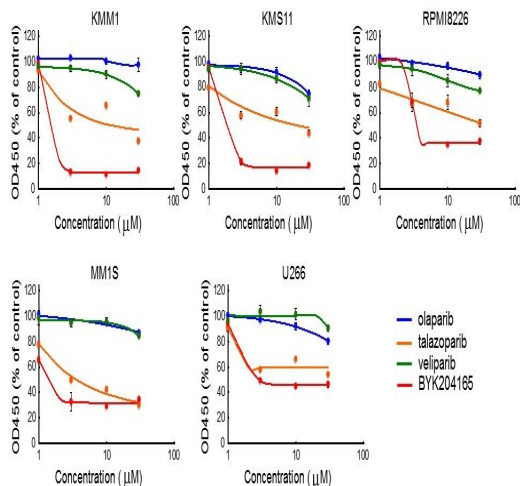
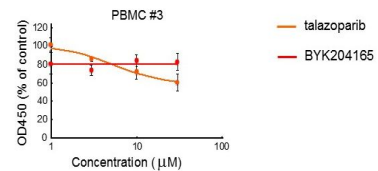
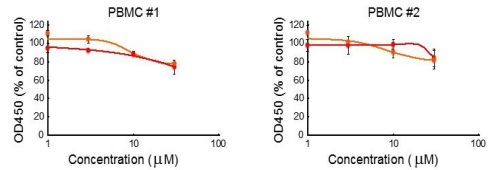
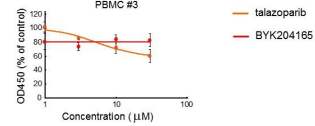
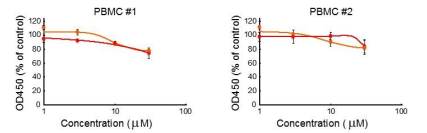


Table 3. IC50 values ( $\mu\text{M}$ ) of PARP inhibitors on MM cell lines

	KMM1	KMS11	RPM18226	MM1S	U266
olaparib	>30	>30	>30	>30	>30
talazoparib	11.2	19.6	>30	3.6	>30
veliparib	>30	>30	>30	>30	>30
BYK204165	1.6	1.9	3.2	1.3	2.8



塩基除去修復機構の阻害特に PARP-1 阻害薬は新しい骨髄腫治療につながる可能性が示唆された。

- 以上から、以下の可能性が示せた。
- (1) 塩基除去修復遺伝子多型と骨髄腫発症の関係
  - (2) 塩基除去修復遺伝子発現と骨髄腫の悪性度の関係
  - (3) PARP 阻害薬の骨髄腫細胞の有効性

### 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)

〔学会発表〕(計1件)

齋藤貴之, 湊雄介, 笠松哲光, 半田寛, 村上博和 多発性骨髄腫における Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) の役割  
第 40 回 日本骨髄腫学会学術集会、2015 年 5 月 16-17 日、熊本県熊本市

〔その他〕

ホームページ等

群馬大学保健学研究科血液研究室

<http://ketsuken-gunma.kenkyukai.jp/abou/index.asp?>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 貴之 (Saitoh Takayuki)  
群馬大学・保健学研究科・教授  
研究者番号 : 80375542

(2) 研究分担者

村上博和 (Murakami Hirokazu)  
群馬大学・保健学研究科・教授  
研究者番号 : 40166260

(3) 研究協力者

湊雄介 (Minato Yusuke)  
笠松哲光 (Tetsuhiro Kasamatsu)  
後藤七海 (Nanami Gotoh)