

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461397

研究課題名(和文) 骨髄微小環境と形質細胞の相互作用に基づいたPOEMS症候群の発症機構の解明

研究課題名(英文) Genetic and Transcriptional Landscape of Plasma Cells in POEMS Syndrome

研究代表者

中世古 知昭 (Nakaseko, Chiaki)

千葉大学・大学院医学研究院・特任教授

研究者番号：30323398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：POEMS症候群は単クローン性形質細胞を背景とした稀な傍腫瘍症候群であり、その形質細胞の意義は不明である。我々は本症候群患者骨髄形質細胞を純化し、網羅的遺伝子解析を行った。全エクソン解析では14例に334遺伝子、359体細胞変異が同定された。MMで高頻度に検出されるMAPK経路やp53遺伝子には変異は検出されなかった。51遺伝子に絞りターゲットシーケンスを行ったところ、10遺伝子に重複する変異が同定された。RNAシーケンスによる主成分分析ではPOEMSとMGUS, MMを明確に分類することが出来た。今回の結果から、POEMSの遺伝学的背景はMMやMGUSとは明らかに異なることが示された。

研究成果の概要(英文)：POEMS syndrome is a rare paraneoplastic disease associated with monoclonal plasma cells; however, the pathogenic importance of plasma cells is not clear. We performed comprehensive genetic analyses of plasma cells in patients with POEMS syndrome. A total of 359 somatic mutations in 334 genes were identified in 14 patients. None of the driver gene mutations frequently found in multiple myeloma (MM) were detected. Targeted sequencing of 52 selected genes identified 10 recurrently mutated genes. RNA sequencing revealed that the transcriptional profiles of POEMS syndrome were distinct from those of MGUS and MM. VEGF was not significantly upregulated and genes associated with tumorigenesis, such as MYC, were downregulated. We found that the genetic and transcriptional profiles of plasma cells in POEMS syndrome were distinct from those of other plasma cell disorders such as MM and MGUS, indicating unique properties of clonal plasma cells in the pathogenesis of POEMS syndrome.

研究分野：血液内科

キーワード：POEMS症候群 Whole exome sequencing RNA sequencing 次世代シーケンサー VEGF

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 研究の学術的背景

POEMS 症候群(Crow-Fukase 症候群, 高月病)は plasma cell dyscrasia を基盤に、多発神経炎による末梢神経障害、臓器腫大、浮腫・胸腹水、皮膚症状(剛毛、色素沈着、血管腫)、骨硬化性骨病変、M 蛋白血症などを呈する全身性疾患であり、稀ではあるが、本邦で比較的頻度の高い疾患である。成人に多く、形質細胞腫瘍の 1-2%と推定される。多彩な症状の中で、特に末梢神経障害が患者の ADL を著しく障害し、末期には四肢麻痺、多臓器不全に至る予後不良な疾患である。近年、多発性骨髄腫に準じて自家末梢血幹細胞移植、サリドマイドなどの新規薬剤により末梢神経障害を改善して ADL を改善し、生命予後も改善しうる事が明らかとなってきた(Kuwabara S, Nakaseko C et al. Cochrane Database Syst Rev 2012)。

1996 年に本症候群患者血清中で血管内皮増殖因子(VEGF)が異常高値であることが報告されて以来、VEGF が多彩な症状を惹起していることが推定されている(Watanabe et al. Lancet 1996)。VEGF はモノクローナル形質細胞が産生していると考えられているが、一方で VEGF は本患者の血小板に高濃度に蓄積されて生理的な刺激により放出されることが判明している(Hashiguchi et al. Muscle Nerve 2000)。さらに POEMS 症候群では、モノクローナル M 蛋白軽鎖はほぼ全例で 型であるという、他の形質細胞腫瘍では見られない極めてユニークな特徴を有する。

我々は千葉大学神経内科と協力してこれまで多数例の POEMS 症候群患者を治療するとともに、臨床検体を用いて以下の事実を明らかにしてきた。

自家移植やサリドマイド治療により血清 VEGF 値は有意に低下し、重篤な末梢神経障害等の臨床症状が改善するとともに生存期間が延長する(Kuwabara et al. Neurology, 2006,他多数)

POEMS 症候群では VEGF 以外にも多くのサイトカインが上昇し、特に IL-12 は病勢とも相関し、新たなバイオマーカーとなる(Kanai K et al. Neurology 2012)。

VEGF 以外にも、bFGF, HGF 等の増殖因子も高値である(Yamada Y et al. Ann Hematol 2013)。

型再構成軽鎖は全例 V 1 subfamily に属し、しかも IGLV1-40 と IGLV1-44 というわずか 2 種類の特定の germline 遺伝子に由来する(Abe D et al. Blood 2008)。中国の Li らも追試を行って同様の結果を得、人種を越えて同じ 2 種類の germ line 鎖に起因することを報告している(Li et al. Ann Hematol 2012)。

しかし、これらのサイトカインや増殖因子がどの細胞・組織で産生されるか、その制御機構は未だ明らかではない。さらに、この特定の構造を有する再構成 鎖が POEMS 症

候群の病態にどのように関わっているかは未だ解明されていない。

POEMS 症候群では、骨髄中の形質細胞比率は通常 5%未満で多発性骨髄腫の診断基準は満たさず、Monoclonal gammopathy of undermined significance(MGUS)様であるが、傍腫瘍症候群による徴候が前面に出るものである。近年、MGUS から多発性骨髄腫に進展する過程において、骨髄微少環境と形質細胞との相互作用が極めて重要であることが明らかとなり、exosome や micro RNA(miRNA)の役割が明らかになりつつある。POEMS 症候群においても MGUS と同様、骨髄微少環境や miRNA に何らかの特徴的な所見が存在するはずである。

## 2. 研究の目的

本研究では POEMS 症候群の病態における骨髄微少環境と形質細胞との相互作用について解析し、特に VEGF や IL-12, HGF 等のサイトカイン、増殖因子の産生機構を明らかにすること、また、POEMS 症候群に特徴的な IGLV1-40 と IGLV1-44 のモノクローナル 鎖を有するモノクローナル形質細胞の病態への関与を明らかにすることにより、POEMS 症候群の発症機構を解明し、新たな治療戦略の確立のための基盤形成を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) POEMS 患者骨髄における骨髄微少環境の病態への関与の解析

POEMS 患者骨髄細胞を用いて、骨髄微少環境において骨髄間質細胞が産生するサイトカイン、増殖因子を網羅的に解析し、さらに exosome, miRNA を同定して、疾患への関与を解析する。

骨髄微少環境におけるサイトカイン、増殖因子の網羅的解析

我々はこれまでの研究で、POEMS 症候群患者血清中に VEGF や IL-12, bFGF, HGF 等のサイトカインや増殖因子が極めて高値となることを明らかにしてきた。本研究では骨髄微少環境においてサイトカイン、増殖因子が高濃度で産生されているかを探索する。POEMS 症候群患者より得られた骨髄細胞を液体培養し、付着細胞を得ることにより骨髄間質細胞の培養系を確立する。培養上清中に発現するサイトカイン、増殖因子を網羅的に解析する。

POEMS 症候群に特異的な exosome の解析

本研究の連携研究者である Ghobrial らは、MGUS や多発性骨髄腫では、骨髄間質細胞より産生された exosome が形質細胞の増殖と深く関わり、そのパターンは MGUS と骨髄腫では異なっている事を示している(Roccaro AM et al. J Clin Invest 2013)。上記 a にて得られた骨髄間質細胞培養から exosome を抽出し、その表現系を解析する。さらに骨髄腫細胞株

を用いて培養系に exosome を添加し、形質細胞の増殖と VEGF 産生に与える影響を解析する。

#### (2) 次世代シーケンサーを利用した骨髓形質細胞の遺伝子変異解析

POEMS 症候群の患者骨髓細胞から MACS を用いて抗 CD138 抗体により形質細胞を分離する。その形質細胞から DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて whole exome sequence を行い、網羅的に遺伝子解析を行う。コントロールとしては患者類粘膜細胞を用いる。

さらに RNA を抽出し、RNA シーケンスを行い網羅的に遺伝子発現を解析する。多発性骨髓腫(MM) ,MGUS 症例と比較することによりこれらの形質細胞増殖性疾患との遺伝子発現プロファイルの差について検証する。

#### (3) 次世代シーケンサーを利用した骨髓モノクローナル形質細胞の鎖遺伝子レパトア解析

POEMS 症候群におけるモノクローナル形質細胞の型再構成鎖は全例 V 1 subfamily に属し、しかも IGLV1-40 と IGLV1-44 というわずか 2 種類の特定の germline 遺伝子に由来することが明らかとなっている。しかしこれらの骨髓中形質細胞に占める割合や治療後臨床経過でのクローンサイズ等については不明である。そこで、次世代シーケンサーを利用してより正確にモノクローナル鎖レパトアを解析し、新規薬剤や自家末梢血幹細胞移植等の治療前後で比較することによりモノクローナル形質細胞のクローンサイズが病態に与える影響を解析する。

## 4 . 研究成果

我々はこれまで本症候群患者骨髓細胞から MACS 法を用い、CD138 陽性形質細胞を sorting し、CD138 陰性細胞から in vitro における骨髓間質細胞培養系を確立した。2014 年 7 月から 2016 年 6 月までに当院にて診断された POEMS 症候群の患者 20 名(M:F 12:8、平均年齢 42.6 歳、血清 VEGF 平均値 6,471 pg/ml、骨髓形質細胞平均値 4.4%)の骨髓形質細胞を純化し、網羅的遺伝子解析を行った。15 例において DNA を抽出し、次世代シーケンサー (NGS) を用いて whole exome sequence(WES)解析を行った。14 例の 334 遺伝子に 359 個、1 症例あたり平均 15 の形質細胞の遺伝子変異が認められ、そのうち PCDH10、EML4 などを含むいくつかの遺伝子が recurrent mutation として同定された。これらの同定された遺伝子と多発性骨髓腫等の血液腫瘍にて変異頻度の高い遺伝子についてさらに詳細に解析するため、51 の遺伝子に絞り込みターゲットシーケンスを行ったところ、10 遺伝子(KLHL6、LTB、RYR1、EHD1、EML4、HEPHL1、HIPK1、PCDH10、USH2A、ZNF645)に重複する変異が同定された。特記すべきことに MM で高頻度に検出される

MAPK 経路や p53 遺伝子には変異は検出されなかった。染色体の数的変異は 5 例に認められ、-13、+1q、多倍体変異などが含まれていた。

また POEMS5 例、MM4 例、MGUS5 例で RNA シーケンスを行った結果、VEGF は POEMS 群で有意に上昇していなかったが、主成分分析では POEMS 群と MGUS 群、MGUS 群と MM 群にわずかな重なりを認めつつも各疾患群に分類することが出来、これらの疾患とは異なる遺伝子発現プロファイルを有していることが明らかとなった。今回の結果から、POEMS の遺伝学的背景は MM や MGUS とは明らかに異なることが示された。

また、POEMS 症候群のモノクローナル鎖はほとんどが鎖であり、しかも IGLV1-40 と IGLV1-44 というわずか 2 種類の germline に由来することが報告されている。そこで、NGS を利用してこの鎖レパトアを臨床経過とともに詳細に解析した所、POEMS 症候群のモノクローナル形質細胞クローンサイズは血清 VEGF 値と相関し、再発時には clonal evolution を示している症例も求められた。

以上の結果から、特徴的な germline に起因するモノクローナル鎖は疾患の発症と経過に密接に関係していることが示された。

## 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 2 件)

Muto T, Ohwada C, Takaishi K, Isshiki Y, Nagao Y, Hasegawa N, Kawajiri-Manako C, Togasaki E, Shimizu R, Tsukamoto S, Sakai S, Takeda Y, Mimura N, Takeuchi M, Sakaida E, Misawa S, Shimizu N, Iseki T, Kuwabara S, Nakaseko C. Safety and efficacy of granulocyte-colony stimulating factor monotherapy for peripheral blood stem cell collection in POEMS Syndrome. Biol Blood Marrow Transplant 2017;23(2):361-3.(査読あり)

Muto T, Ohwada C, Sawai S, Beppu M, Tsukamoto S, Takeda Y, Mimura N, Takeuchi M, Sakaida E, Sogawa K, Misawa S, Shimizu N, Iseki T, Nomura F, Kuwabara S, Nakaseko C. Acutely deteriorated extravascular volume overload during peripheral blood stem cell mobilization in POEMS syndrome: A case series with cytokine analysis. Transfus Apher Sci 2016; 54(2): 276-81. (査読あり)

[学会発表](計 5 件)

Nagao Y, Mimura N, Takeda J, Oshima M, Yoshida K, Shiozawa Y, Aoyama K, Saraya A, Koide S, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Kawajiri-Manako C, Hasegawa N, Sakai S, Takeda Y, Ohwada C, Takeuchi M, Sakaida E,

Iseki T, Misawa S, Yokote K, Miyano S, Ohara O, Kuwabara S, Sanada M, Iwama A, Ogawa S, Nakaseko C. Distinctive genetic features of plasma cells in POEMS syndrome. The 58th Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego, USA, Dec 3-6, 2016

Kawajiri-Manako C, Mimura N, Fukuyo M, Namba-Fukuyo H, Rahmutulla B, Nagao Y, Togasaki E, Shimizu R, Hasegawa N, Sakai S, Takeda Y, Ohwada C, Takeuchi M, Sakaida E, Iseki T, Misawa S, Yokote K, Tsuiji M, Kuwabara S, Kaneda A, Nakaseko C. Clonal immunoglobulin light-chain gene rearrangements detected by next generation sequencing in POEMS Syndrome. The 58th Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego, USA, Dec 3-6, 2016

永尾侑平, 三村尚也, 竹田淳恵, 大島基彦, 吉田健一, 堺田恵美子, 横手幸太郎, 桑原聡, 眞田昌, 岩間厚志, 小川誠司, 中世古知昭. POEMS 症候群における形質細胞の網羅的遺伝子解析. 第 54 回日本臨床分子医学会学術集会, 東京国際フォーラム, 東京都千代田区, 2017/4/14-16

中世古知昭, 眞子千華, 三村尚也, 福世宏枝, 福世真樹, 永尾侑平, 大島渚, 塚本祥吉, 高石浩司, 酒井紫緒, 竹田勇輔, 大和田千桂子, 武内正博, 井関徹, 三澤園子, 桑原聡, 金田篤志, 堺田恵美子. POEMS 症候群における NGS を用いた 鎖レパトア解析によるクローナル 鎖再構成と疾患活動性の解析. 第 42 回日本骨髄腫学会学術集会, 日本赤十字看護大学, 東京都渋谷区, 2017/5/27-28

川尻千華, 三村尚也, 南波宏枝, 福世真樹, 永尾侑平, 東ヶ崎絵美, 清水亮, 竹田勇輔, 酒井紫緒, 大和田千桂子, 武内正博, 堺田恵美子, 井関徹, 三澤園子, 桑原聡, 築地信, 金田篤志, 中世古知昭. Clonal IGL gene rearrangements detected by NGS is correlated with disease status in POEMS syndrome. 第 78 回日本血液学会総会, パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市, 2016/10/13-15

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
中世古 知昭 (NAKASEKO, Chiaki)  
千葉大学・大学院医学研究院・特任教授  
研究者番号：30323398
- (2) 研究分担者  
堺田 恵美子 (SAKAIDA, Emiko)  
千葉大学・大学院医学研究院・講師  
研究者番号：60422218
- (3) 連携研究者  
三村 尚也 (MIMURA, Naoya)  
千葉大学・医学部付属病院・助教  
研究者番号：00710229