

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860361

研究課題名(和文)新規PDGFR 転写産物を指標とした多発性骨髄腫に普遍的なバイオマーカーの開発

研究課題名(英文)Development of universal biomarkers for multiple myeloma using novel PDGFRalpha transcript as index

研究代表者

湊 雄介 (Minato, Yusuke)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：00710245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、多発性骨髄腫に特異的な血小板由来増殖因子受容体 (PDGFR) 転写産物の同定を試みた。その結果、多発性骨髄腫に特異的な転写産物は同定できなかったが、ヒトPDGFR 遺伝子の新規first exonを5つ見出した。複数のfirst exonによる遺伝子発現制御はその遺伝子の時空間特異的な発現に関わることが報告されている。そこで新規first exonのマウスホモログを同定しその発現を調べた。その結果、各first exonはそれぞれ異なる組織発現パターンを示したことから、PDGFR 遺伝子は複数のfirst exonによりその発現が緻密に制御されている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to identify a transcript of the platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) gene which specifically expresses in multiple myeloma. We found five novel first exons of the human PDGFR gene although a multiple myeloma-specific transcript was not identified. It has been reported that a gene expression system by alternative first exons is involved in a spatio-temporal expression of the gene. Thus we identified mouse homologues of the first exons and their expression was examined. The first exons showed a different tissue expression patterns, suggesting that the expression of the PDGFR gene is precisely regulated by its first exons.

研究分野：細胞生物学

キーワード：PDGFR

1. 研究開始当初の背景

近年、自家末梢血幹細胞移植や新規薬剤が導入され、治癒困難な疾患である多発性骨髄腫(以下、骨髄腫と略)の予後が改善されてきている。特に完全寛解(complete response: CR)と判定された患者は長期生存が期待される。しかし、CRと判定された患者の中には、現在のCR判定基準では検出できない微小残存病変により、再発して予後が非常に悪化する症例が少なくない。よって、すべての骨髄腫患者に適応でき、且つより感度が高いCR判定に有用なバイオマーカーの開発が喫緊の課題である。

骨髄腫の病態には「骨髄微小環境」と呼ばれるニッチが大きく影響し、ニッチ構成細胞から分泌される種々のサイトカインが骨髄腫細胞の増殖や生存に重要であることが示されている。このことから、サイトカインが骨髄腫のバイオマーカーになりうると考えられ、骨髄腫患者の血清中や骨髄中のサイトカイン濃度がこれまで精力的に調べられてきた。

血小板由来増殖因子(platelet-derived growth factor: PDGF)-ABは、このような背景のもとに調べられてきたサイトカインの1つであり、PDGF-ABの血清中・骨髄中濃度は骨髄腫の悪性度や治療効果と関連することが報告されている。PDGFにはA、B、C、Dの4つのアイソフォームがあり、AA、AB、BB、CC、DDといったホモ/ヘテロダイマーの形でそれぞれ特異的な受容体に結合する。PDGF受容体(PDGFR)には α 、 β の2つのアイソフォームがあり、PDGFR α はPDGF-A、B、Cと、PDGFR β はPDGF-B、C、Dとそれぞれ結合する。すなわち、PDGF-ABがその機能を発揮するためにはPDGFR α が必要である。骨髄腫においては、PDGFR β については過剰発現が報告されているものの、PDGFR α の発現に関する報告は未だにない。

我々はこれまでに骨肉腫細胞株で、翻訳領域を完全に有する新しいPDGFR α 転写産物(type II PDGFR α)が発現していることを見出した。さらに、type II PDGFR α の発現はCyclin D1/pRB/E2F-1経路により制御されることを明らかにした。骨髄腫ではt(11;14)(q13;q32)(Cyclin D1過剰発現)やdel(13q)(pRB欠損)といったCyclin D1/pRB/E2F-1経路に異常をきたす染色体異常が知られている。よって、骨髄腫でtype II PDGFR α が発現している可能性は高いと考えられた。そこで、骨髄腫細胞株におけるtype II PDGFR α の発現をRT-PCRにより検討したところ、翻訳領域内であるexon 4-5の発現は検討をおこなったすべての細胞株で検出されたが、同じく翻訳領域内であるexon 2-5、exon 4-23の発現は検出できなかった。以上の結果から、骨髄腫では完全な翻訳領域を持たない異常なPDGFR α 転写産物が発現していることが強く示唆された。これ

までも融合遺伝子を含め、いくつかの異常なPDGFR α 転写産物が報告されているが、exon 4、5を含みexon 2を含まない転写産物は報告されていない。すなわち、見出したPDGFR α 転写産物はこれまでに報告のない新規転写産物である可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究では、存在が強く示唆された新規PDGFR α 転写産物と骨髄腫の病態との関連性を分子レベルで明らかにし、骨髄腫の新規バイオマーカーの開発へとつなげることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)骨髄腫に発現するPDGFR α 転写産物の同定

細胞株よりtotal RNAあるいはmRNAを抽出し、3'-rapid amplification of cDNA ends (RACE)、5'-RACE、RT-PCRを行った。必要に応じて増幅断片をアガロースゲルより抽出し、シークエンスを行った。

(2)骨髄腫に発現するPDGFR α 翻訳産物の検討

細胞株よりタンパク質を抽出し、そのままあるいは抗PDGFR α 抗体による免疫沈降を行った後に抗PDGFR α 抗体を用いたwestern blotを行った。

(3)新規first exonのマウスホモログの同定

GENETYXによる相同性検索を行った。成体マウスの各臓器よりtotal RNAを抽出、逆転写し、RT-PCRを行った。成体マウス脳あるいはマウス胚線維芽細胞NIH3T3株よりmRNAを抽出し、5'-RACEを行った。必要に応じて増幅断片をアガロースゲルより抽出し、シークエンスを行った。

4. 研究成果

(1)骨髄腫に発現するPDGFR α 転写産物の同定

PDGFR α 遺伝子は23のexonから成る。骨髄腫細胞株で発現しているPDGFR α 転写産物の構造を3'-RACE、5'-RACEにより調べた。その結果、5'側は既知のexon 1の他に、これまでに論文での報告がないfirst exon 5種類、exon 3の途中から始まるものなど、様々であった。一方3'側は、exon 23までであるものの他に、exon 14の直後にintron 14が続いてpoly A配列となるものがあつた。そこで新たに見出したfirst exonあるいはintron 14を指標として、骨髄腫細胞に特異的なものがあるかをRT-PCRにより検討した。その結果、これらの配列は急性骨髄性白血病株や骨肉腫細胞株だけでなく、ヒト正常血管内皮細胞株でも検出された。以上の結果から、骨髄腫に特異的に発現するPDGFR α 転写産物は同定できなかったが、ヒトPDGFR α 遺伝子の新しいfirst exonを複数見出した。

(2) 骨髄腫に発現する PDGFR α 翻訳産物の検討

(1)において exon 3 の途中から始まる転写産物については RT-PCR により他の転写産物との区別ができないことから、翻訳産物として検出できないか検討した。この転写産物から予想される翻訳産物は、PDGFR α のフレーム以外では数アミノ酸程度のものしか翻訳されないことから、抗 PDGFR α 抗体で検出できる可能性が高いと考えた。また、3' 端が intron 14 である可能性を考え、exon 4-14 内にエピトープを持つ抗体を用いて western blot により検討した。その結果、候補と考えられるバンドを複数検出したが、いずれも免疫沈降による濃縮ができず、目的の転写産物の同定には至らなかった。

(3) 新規 first exon のマウスホモログの同定

複数の first exon による遺伝子制御機構はその遺伝子の時間空間的な特異性に寄与することが知られている。(1)においてヒト PDGFR α 遺伝子の新しい first exon を同定したことから、各転写産物の時間空間的な発現特異性を調べることは PDGFR α の生体内での機能をより詳細に解析する上で非常に有用であると考えられる。そこでまず、新規 first exon のマウスホモログが存在するか調べた。マウス PDGFR α 遺伝子の intron 1 内でヒトの各 first exon の配列と相同性が高い領域を検索し、対象領域に primer を設計して RT-PCR を行った結果、ヒトで見出された 5 つの first exon (exon 1 γ 、1 δ 、1 ϵ 、1 ζ 、1 η)のうち 4 つ(exon 1 γ 、1 δ 、1 ϵ 、1 ζ)がマウスにも存在することが明らかとなった。次に 5' -RACE により各マウスホモログの 5' 端を決定した。得られた結果をもとに primer を再設計し、成体マウスにおける各 first exon の組織特異性を既知のもの(exon 1 α 、1 β)も含めて RT-PCR により検討した。その結果、exon 1 α 、1 β 、1 γ 、1 δ は広範の組織で発現が検出されたが、exon 1 ϵ 、1 ζ は限られた組織でのみ発現が検出された。特に exon 1 ϵ の発現は中枢神経系でのみ検出された。以上の結果から、PDGFR α 遺伝子は複数の first exon によりその時間空間的な発現が緻密に制御されている可能性が強く示唆された。

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)

1. Kasamatsu T, Saitoh T, Minato Y, Shimizu H, Yokohama A, Tsukamoto N, Handa H, Sakura T, Murakami H. Polymorphisms of IL-10 affect the severity and prognosis of myelodysplastic syndrome. *Eur J Haematol.* 96, 245-251, 2016. 査読あり

DOI: 10.1111/ejh.12577

2. Norjmaa B, Saitoh T, Kasamatsu T, Minato Y, Murakami H. XRCC1 Arg194Trp and XRCC1 Arg399Gln Polymorphisms Affect Clinical Features and Prognosis of Myelodysplastic Syndromes. *The Kitakanto Medical Journal*, 65, 11-19, 2015. 査読あり
DOI: なし

[学会発表] (計 19 件)

1. 湊雄介、大谷佐知、田中宏一、前田誠司、八木秀司. 新規 PDGFR α 転写産物の同定と発現解析. 第 39 回日本分子生物学会 2016 年 12 月 2 日パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
2. Takahashi N, Saitoh T, Gotoh N, Kimura K, Kuroda Y, Nagai K, Nagashima T, Kasamatsu T, Minato Y, Shimizu H, Ishizaki T, Yokohama A, Takizawa M, Koiso H, Mitsui T, Tsukamoto N, Handa H, Murakami H. Th1 Polarization of Cytokine and Cytokine Receptor Polymorphisms Affect the Susceptibility and Severity of ITP. 第 57 回アメリカ血液学会 2015 年 12 月 6 日オーランド(米国)
3. Norjmaa B, Saitoh T, Kasamatsu T, Minato Y, Sunaga N, Murakami H. The polymorphisms of XRCC1 Arg194Trp and the XRCC1 Arg399Gln affect the clinical features and the prognosis of MDS. 第 16 回アメリカ癌学会 2015 年 4 月 21 日フィラデルフィア(米国)
4. Minato Y, Saitoh T, Gotoh N, Nitta Y, Kaneko A, Suda I, Masuda Y, Norjmaa B, Takahashi N, Alkebsi L, Kasamatsu T, Isoda A, Matsumoto M, Sawamura M, Shimizu H, Iriuchishima H, Ishizaki T, Takizawa M, Koiso H, Mitsui T, Yokohama A, Tsukamoto N, Handa H, Nojima Y, Murakami H. High expression level of PARP-1 in multiple myeloma. 第 76 回日本血液学会 2014 年 10 月 31 日大阪国際会議場(大阪府大阪市)
5. 後藤七海、齋藤貴之、岩崎篤史、新田恭浩、ノルジマーバトチメグ、湊雄介、笠松哲光、佐倉徹、半田寛、村上博和. 急性骨髄性白血病における塩基除去修復遺伝子 APE1、XRCC1 遺伝子多型の解析. 第 15 回日本検査血液学会 2014 年 7 月 21 日仙台国際センター(宮城県仙台市)

他 14 件

[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

湊 雄介 (MINATO YUSUKE)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：00710245

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()