

学内グラント 報告書

平成25年度 学内グラント終了時報告書

多発性骨髄腫に対する次世代シーケンサーを用いた
遺伝子発現解析及び新規治療薬の開発

研究代表者 佐川 森彦 (総合医療センター 血液内科)
研究分担者 木崎 昌弘*, 得平 道英*, 多林 孝之*,
根本 朋恵*, 富川 武樹*

緒言

近年のシーケンシング技術は驚くべき進化を遂げ、DNA塩基配列の解析では従来のキャピラリーシーケンサーの100倍以上のスループットをもつシーケンサーがいくつも出現している。これらシーケンサーは次世代シーケンサーと呼ばれ、現在このシーケンサーを用いて多数の生物のde novoゲノム配列が決定されている。また、転写産物の配列解析 (RNA-seq) も盛んに行われており、解析可能な試料数の多さを利用して遺伝子発現解析にも広く利用されている。

これまでのマイクロアレイでは、遺伝子配列情報が判明している場合には発現の計測が可能であったが、未知の遺伝子発現については計測が原理的に不可能であり、造血器腫瘍に多く認められる遺伝子転座に伴う融合遺伝子における解析も非常に困難であった。RNA-seqは、既知の遺伝子の発現解析をこれまで以上にhigh-throughputに容易にすると共に、マイクロアレイでは不可能とされていた新規の生物種、新規の遺伝子発現の計測、及び融合遺伝子の解析が可能となり、結果としてトランスクリプトームの全体像を理解することが可能となる。このような技術的背景より、RNA-seqは徐々に腫瘍学の分野に適用されるようになり (Maher CA, et al. Nature 2009;458:97)、既にヒトがん由来細胞株において新たな変異遺伝子や融合遺伝子が発見され、同時に発現量の計測が行われている。RNA-seqは腫瘍学の分野において、今後種々のがんに応用されていくことが考えられる。多発性骨髄腫における次世代シーケンサーを用いた解析の報告としては、Chapman MA, et al. (Nature 2011;471(7339):467) によるものが代表的であるが、その報告は限定的であり、それ以外のグループからの報告は未だに認められていない。したがって、今回の申請者らの検討は非常に新しく独創的で意欲的な研究になると考えられる。

多発性骨髄腫は、ボルテゾミブ、レナリドミドなどの新規治療薬、造血幹細胞移植の進歩にも関わらず、現状では未だ治癒の期待出来ない難治性の造血器腫瘍である。発症年齢は、65-70歳がピークと高齢者に多く、高齢化社会を迎え、今後ますます患者数が増加することが予測され、高齢者にも適応可能な、生体への侵襲が少なく、抗がん剤治療、移植治療に変わる全く新しい概念の治療法の開発が切望されている。

申請者らは、これまで多発性骨髄腫に対する新規分子標的薬の開発を行ってきた。東京大学分子生物学研究所有機化学研究部門 橋本祐一博士の協力のもとで、サリドマイドの薬理作用から多くの薬物標的を仮想して構造展開することにより、当該の薬物標的に対する特異的な医薬リード化合物を多数創製できる可能性を検証し、新規微小管重合阻害薬 2-(2,6-Diisopropylphenyl)-5-hydroxy-1H-indole-1,3-dione (5HPP-33) が骨髄腫の新規治療薬となりうることを明らかにした (Iguchi, et al. Int J Mol Med 2008;21:163, Noguchi, et al. Bioorg Med Chem Lett 2005;15:321)。

更に、我々は東南アジアに自生するショウガ科植物 *Languas galanga* に由来する成分 1'-acetoxychavicol acetate (ACA) が、骨髄腫に対し *in vitro* および *in vivo* で NF- κ B の核内移動を抑制することでアポトーシスを誘導すること (Ito K, et al. Cancer Res 2005;65:4417)、及び TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) の活性化を介してアポトーシスを誘導すること (Ito K, et al. Biochem Biophys Res Commun 2005;338:1702) を見出した。現在、橋本祐一博士らの協力のもとでACAをリード化合物とする構造展開による多発性骨髄腫の新規分子標的薬の開発を行い、多発性骨髄腫の増殖・分化の分子学的メカニズムの解明にも努めている。

今回、次世代シーケンサーを用いた数々のプロジェクトに参加してきた (Ninomiya M, et al. J Clin Microbiol 2012;508:57, Okae H, et al. Hum Mol Genet 2012;21:548,

* 総合医療センター 血液内科

Renfree MB, et al. Genome Biol 2011;12:R81), 独立行政法人理化学研究所基幹研究所長田抗生物質研究室の客員研究員である西田有一郎博士らの協力が得られることとなり, 本研究を着想するに至った。

材料と方法

1. 骨髄腫細胞株を用いたcDNAライブラリーの作製

多発性骨髄腫細胞株 (U266, RPMI8226) 等に対し, 申請者らがこれまで開発を行ってきた新規治療薬 ACA, TM-233 など投与し, 投与群・非投与群それぞれで mRNA の抽出を行った上で, cDNA ライブラリーの作製を行う。

2. 骨髄腫細胞株由来のcDNAライブラリーを用いた RNA-Seq

作製された cDNA ライブラリーを, 理化学研究所にて次世代シーケンサー GAIIX (Illumina 社), あるいはさらに高性能な次世代シーケンサー MiSeq (Illumina 社) を用いて RNA-Seq を行い, 遺伝子発現解析を行う。解析の過程では, ①非投与群 (control) において, 骨髄腫で既知の遺伝子の発現を確認すると共に, 未知の遺伝子発現 (これまで未知であった新規の遺伝子群の発現, 骨髄腫との関連が薄いとされてきた遺伝子群の発現) を見出し, 新規分子標的の候補となりうる遺伝子か否かを分析する。②投与群・非投与群の比較により, 発現の変化のあった遺伝子群を見出す。

3. RNA-Seqの結果の精査

RNA-Seqの結果を踏まえて以下を行う。

①非投与群 (control) において見出された遺伝子群の中で, 未知の遺伝子群の発現の可否を RT-PCR 法や Western blot 法などにて検証を行う。

②次に, 骨髄腫に対し臨床的に用いられている治療薬 (デキサメタゾン, メルファラン, ドキソルビシンなどの古典的な治療薬, 及びボルテゾミブ, レナリドミドなど新規治療薬) 投与前後において, ①で見出された遺伝子の発現を RT-PCR 法, real-time PCR 法, 更には Western blot 法を用いて検証を行う。更に, 検証の結果, 有効と考えられた場合には, その上流・下流のシグナル分子に対しても同様に検討する。

③投与群・非投与群での比較により見出された遺伝子群に対しても, ①と同様な検証を行う。

4. 骨髄腫患者検体を用いたcDNAライブラリーの作製

骨髄腫細胞を用いて実験系が確立出来れば, 多発性骨髄腫患者検体 (初発時, 再発時など, 可能であれば 1 患者について複数検体を) 数検体に対して, 1. と同様に新規治療薬投与群・非投与群それぞれで RNA の抽出, 続いて cDNA ライブラリー作成を行う。

5. 骨髄腫患者検体由来のcDNAライブラリーを用いた RNA-Seq

作成された cDNA ライブラリーを, 2. と同様に, 次世代シーケンサーを用いて RNA-Seq を行って, 遺伝子発現解析を行う。

初発時, 再発時など複数回, 検体が採取出来た患者の場合には, それぞれにおける遺伝子発現の違いについても解析することで, 治療抵抗性, 薬剤感受性等を含めた解析が可能となると考えられる。

6. 骨髄腫患者検体のRNA-Seqの結果の精査

患者検体の RNA-Seq の結果を踏まえて, 以下を行う。

①非投与群 (control) において見出された遺伝子群の中で, 未知の遺伝子群の発現の可否を RT-PCR 法や Western blot 法などにて検証を行う。

②次に, 投与群・非投与群での比較により見出された遺伝子群に対しても, ①と同様な検証を行う。

③同一患者において, 初発・再発時の複数回の検体が採取出来た場合には, その 2 群間において生じた遺伝子発現の変化について, RT-PCR 法, real-time PCR 法, Western blot 法などによる検証を行い, 耐性メカニズム等の検証に役立てる。

結果

骨髄腫細胞株 U266 および RPMI8226 を用いて cDNA ライブラリーを作成し, その上で RNA-Seq を試みた。しかし検体不良が原因と思われるノイズが膨大に出てしまい, 検証に値するデータが得られなかった。原因を精査し, 改めて cDNA ライブラリーの作製を行っている段階である。近日中に改めてデータの検証を行う予定である。

骨髄腫検体については既に 3 症例程の細胞が集積出来ており, 骨髄腫細胞を用いた系でうまく RNA-Seq の結果が得られるようであれば, 1 症例ずつ cDNA ライブラリー作製の上で RNA-Seq を行うようにしていきたい。

尚, 申請者らが研究を進めて来た多発性骨髄腫の新規治療薬の候補である ACA およびその誘導体である TM-233 については, 骨髄腫細胞に対して, NF- κ B 経路等を介した細胞死を誘導することを報告した。

考察

本研究はこれまで申請者らが集積してきた ACA の白血病や骨髄腫に対する分子作用機構に関する研究成果をもとに, さらに ACA をリード化合物として種々の化合物を構造展開することで, 従来の作用基盤に加えて新たな生物活性を有する新規化合物による新規骨髄腫治療薬を開発する独創的な研究である。更に, 次世代シーケンサーを用いた RNA-Seq により, 多発性骨髄腫の増殖・分化に関する分子学的メカニズムを high-throughput に明らかにすることで, これまで未知であった多発性骨髄腫の発症や

進展に関する分子学的メカニズムを解明すること, 耐性症例を用いて耐性メカニズムを解明することが目的である。

本研究により, 多発性骨髄腫の増殖や進展に関わる真の分子が同定できれば, 生体への侵襲の少ない多発性骨髄腫に対する新たな治療薬が開発される可能性があり, その臨床的意義は極めて大きい。前述の通り, 多発性骨髄腫では, 特に高齢化社会の到来に伴い, 治癒を期待できる

有効な治療法が存在しない患者の数が急増している。したがって, 本研究に基づく成果が臨床応用されれば, 多発性骨髄腫の治療成績の著明な向上, さらにはこれまで期待できなかった骨髄腫の治癒にも大きく寄与するものと考えられ, 臨床的にも非常に意義が大きな研究と考えられる。今後の展開が非常に重要である。