Title	LncRNAを標的とした新規薬剤抵抗性造血器腫瘍の克服
Sub Title	Overcoming resistance to new drug in hematological malignancy targeting LncRNA.
Author	市川, 大樹(Ichikawa, Daiju)
Publisher	
Publication year	2022
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2021.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究では多発性骨髄腫におけるレナリドミド感受性についてDNA microarray・GSEA解析により, レナリドミド感受性細胞株で高発現するlncRNAを3種類(XIST, OVAAL, LINC02397)を同定した. さらにXISTlowOVAALhigh LINC02937low患者において有意に予後不良であり, GSEAの結果より多発性骨髄腫の予後不良に関与する遺伝子群"ZHAN MULTIPLE MYELOMA MS UP"がエンリッチされていた. このエンリッチされた遺伝子群中の1遺伝子がレナリドミド抵抗性に寄与することを過剰発現系などの結果より明らかとした. In this study, we focused on the mechanism of lncRNA to IMiDs resistance in multiple myeloma (MM). We identified 3 lncRNAs (XIST, OVAAL, LINC02397) that are up-regulated in lenalidomide-sensitive MM cell lines using DNA microarray and GSEA. Moreover, MMRF-CoMMpass study indicated that patients with XISTlowOVAALhigh LINC02937low expressions are a significantly shorter overall survival (OS) in comparison to patients with XISThighOVAALlow LINC02937high expressions. GSEA data also showed that the gene set "ZHAN MULTIPLE MYELOMA MS UP" involved in the poor prognosis of multiple myeloma was enriched. We demonstrate that one gene in the enriched gene set contributed to lenalidomide resistance by the results of in vitro assays.
Notes	研究種目 : 基盤研究 (C) (一般) 研究期間 : 2019～2021 課題番号 : 19K07716 研究分野 : 分子生物学に基づくがん免疫学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_19K07716seika

様　式　C－19、F－19－1、Z－19　(共通)

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４ 年　６ 月　３ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2019～2021
課題番号：１９K０７７１６
研究課題名（和文）LncRNAを標的とした新規薬剤抵抗性造血器腫瘍の克服

研究課題名（英文）Overcoming resistance to new drug in hematological malignancy tageting LncRNA.

研究代表者
市川　大樹（ICHIKAWA, DAIJU）

慶應義塾大学・薬学部（芝共立）・助教

研究者番号：６０４６２７９３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では多発性骨髄腫におけるレナリドミド感受性についてDNA microarray・GSEA解析により，レナリドミド感受性細胞株で高発現するlncRNAを3種類(XIST, OVAAL, LINC02397)を同定した．さらにXISTlowOVAALhigh LINC02937low患者において有意に予後不良であり，GSEAの結果より多発性骨髄腫の予後不良に関与する遺伝子群”ZHAN MULTIPLE MYELOMA MS UP”がエンリッチされていた．このエンリッチされた遺伝子群中の1遺伝子がレナリドミド抵抗性に寄与することを過剰発現系などの結果より明らかとした．

研究成果の学術的意義や社会的意義
多発性骨髄腫(MM)においてIMiDs やPIs といった薬剤が開発され治療効果が得られているが，これらの治療薬をもってしても治癒に至らず，さらには抵抗性を示す難治性多発性骨髄腫がある．本研究においてレナリドミドの感受性に起因するlncRNAとしてXIST, LINC02397を同定した．これらlncRNAのさらなる分子機序を解明することで，臨床現場においてがん患者さんへの薬剤選択に役立つといったプレシジョン・メディシンへの応用に繋がり，難治性多発性骨髄腫だけでなく予後絶対不良なマントル細胞リンパ腫に対する新規治療薬開発に繋がることが期待される．

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the mechanism of lncRNA to IMiDs resistance in multiple myeloma (MM). We identified 3 lncRNAs (XIST, OVAAL, LINC02397) that are up-regulated in lenalidomide-sensitive MM cell lines using DNA microarray and GSEA. Moreover, MMRF-CoMMpass study indicated that patients with XISTlowOVAALhigh LINC02937low expressions are a significantly shorter overall survival (OS) in comparison to patients with XISThighOVAALlow LINC02937high expressions. GSEA data also showed that the gene set“ZHAN MULTIPLE MYELOMA MS UP” involved in the poor prognosis of multiple myeloma was enriched. We demonstrate that one gene in the enriched gene set contributed to lenalidomide resistance by the results of in vitro assays.

研究分野：分子生物学に基づくがん免疫学

キーワード：多発性骨髄腫　免疫調節薬　CRBN非依存性　lncRNA

１．研究開始当初の背景
近年，世界中で RNA-seq 解析，ATAC-seq 解析といった大規模なトランスクリプトーム・エピゲノム解析,さらにはプロテオーム解析といった包括的解析を基に効率的な創薬標的分子の探索やプレシジョン・メディシンが行われている．このトランスクリプトーム解析の中で膨大な種類の lncRNA が同定され注目されている．lncRNA は，miRNA などと同様に非コード RNA の一つであるが 200 塩基より大きな RNA であり，たんぱく質をコードしている mRNA より多種類発現している．この lncRNA は転写・転写後調節，タンパク質安定化，発癌・癌進展，さらにはがんにおける薬剤耐性において重要であることが報告されている．
多発性骨髄腫(Multiple myeloma: MM)は，モノクローナルな免疫グロブリン(M 蛋白)の存在と溶骨性変化や腎障害などの臨床症状を特徴とした B 細胞の最終分化段階である形質細胞の腫瘍性疾患である．近年，免疫調節薬(Immunomodulatory Drugs: IMiDs)であるレナリドミド，ポマリドミド，さらにプロテアソーム阻害剤(Proteasome inhibitors: PIs)であるボルテゾミブ，カルフィルゾミブの登場により，MM 患者の生存率は改善してきている.しかしこれらの薬剤をもってしても MM は治癒には至らず絶対予後不良であり，さらにはレナリドミドによる治療抵抗性を示す例やレナリドミドの長期維持療法により２次発がんの頻度が増加する可能性があることも報告されている．
MM と *lncRNA* との関連性については，MM 患者由来の間葉系幹細胞において *lncRNA MALAT-1* や *lncRNA MEG3* が高発現することで TGF-b シグナル伝達の活性化や骨芽細胞への分化に関与するというもの，*lncRNA H19* が NF-kB シグナル伝達を介して MM 細胞の増殖に関与するというものが報告されている．一方，MM において薬剤耐性における lncRNA の関連性についてはこれまでに報告されていないものの，急性骨髄性白血病において *GAS-AS2 lncRNA* が薬剤耐性において重要な役割を果たすことが報告されている．

２．研究の目的
そこで本研究ではこれらの状況を踏まえ，lncRNA に焦点を当てたレナリドミドによる耐性機序の解明および新たな治療(核酸医薬)の開発により難治性 MM 克服に向けた躍進を目指した．

３．研究の方法
まずレナリドミド抵抗性多発性骨髄腫細胞株における耐性機構を解明するために，DNA microarray・Gene Set Enrichment Analysis(GSEA)を用いてレナリドミド感受性 MM 抵抗性株と感受性 MM 細胞株を比較し，網羅的に RNA 発現変動を解析した．次に GSEA 解析によりレナリドミド耐性株においてランクされた上位 100 遺伝子，レナリドミド感受性株においてランクされた 100 遺伝子のうち lncRNA として報告のある遺伝子を同定した．同定した lncRNA をノックダウンした細胞株を樹立し，レナリドミド耐性機構の解明を行った.実際には下記の方法で行った．
(1) レナリドミド耐性株と感受性株とで RNA 発現量に差異のある lncRNA の網羅的同定
下記の 4 種類の細胞からそれぞれ RNA を抽出し，RNA レベルでの差につい DNA microarray を用いて網羅的に解析したのちに GSEA により特定の遺伝子セットへの偏りおよびレナリドミド耐性株においてランクされた上位 100 遺伝子，レナリドミド感受性株においてランクされた 100 遺伝子のうち lncRNA として報告のある遺伝子を同定した．
① レナリドミド感受性細胞株(KMS21, MUM24)
② レナリドミド抵抗性細胞株 (KMS26, KMS34)

(2) 上記で同定した lncRNA のレナリドミド誘導細胞死への影響について
① 上記で同定した lncRNA ノックダウン MM 細胞株の樹立
上記で同定した lncRNA が，実際にレナリドミドで誘導される細胞死に重要な役割を果たすのかを調べるために，同定した lncRNA ノックダウン細胞株をそれぞれ樹立した．
② 作製した細胞株におけるレナリドミド誘導細胞死への影響
得られたノックダウン MM 細胞株についてレナリドミド処理し，lncRNA をノックダウンしたレナリドミド抵抗性細胞株では感受性が上がるか，lncRNA をノックダウンしたレナリドミド感受性細胞株では細胞死の抑制が起こるのかを MTT 法により検討した．

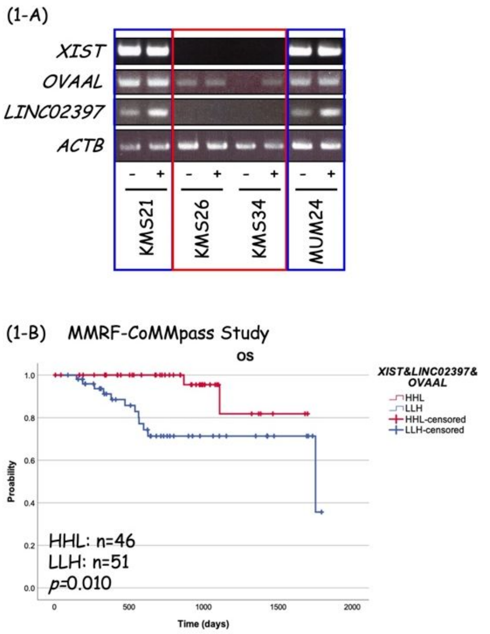
(3) 患者検体由来 RNA-seq を用いた予後解析および変動遺伝子群解析
① 上記において同定した lncRNA が予後に関連があるのかを検討するために，MMRF-CoMMpass Study 上の患者骨髄検体由来 CD138 陽性 MM 細胞 RNA-seq データーベースを用いて ROC 曲線によりカットオフ値を算定した．その後に Kaplan-Meier 法および Cox 比例ハザードモデルにより生存期間分析を行った．
② 上記において有意であった遺伝子について発現量で分類したのちに GSEA を用いてエンリッチされる遺伝子群を解析した．さらに上記(1)において得られた MM 細胞株間比較においてレナリドミド耐性 MM 細胞株にてエンリッチされた遺伝子群を比較し，両セットでエンリッチされて

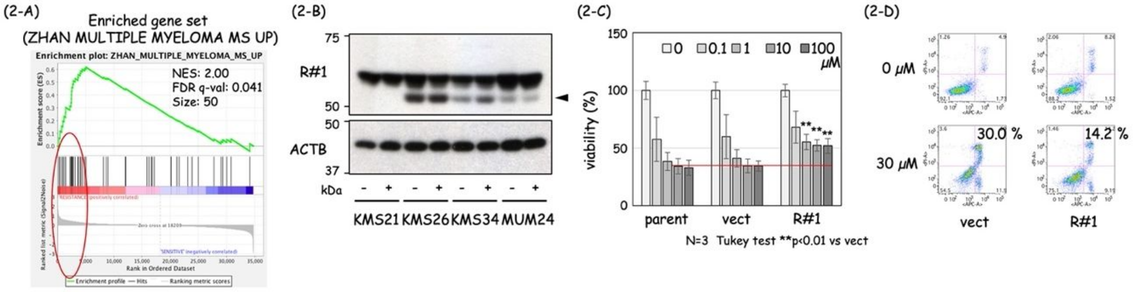
いた遺伝子群を同定した．

(4) GSEA 解析により得られた遺伝子群とレナリドミド感受性への影響
　まず上記でエンリッチされた遺伝子群のうち MM において関連性が報告されている遺伝子群について，RT-PCR 法および Immunoblot 法により寄与する遺伝子(タンパク質)を同定した．
① 上記で同定したタンパク質過剰発現 MM 細胞株の樹立
上記で同定したタンパク質が，実際にレナリドミドで誘導される細胞死に重要な役割を果たすのかを調べるために，過剰発現細胞株をそれぞれ樹立した．
② 作製した細胞株におけるレナリドミド誘導細胞死への影響
得られた過剰発現 MM 細胞株についてレナリドミド処理することでアポトーシスを抑制するのかを MTT 法および FACS により検討した．

４．研究成果

　レナリドミドの感受性に関与する lncRNA を同定するために DNA mciroarray・GSEA 解析を行い，耐性株で上昇する lncRNA として 10 種類，感受性株において 9 種類を得た．実際にこれらの遺伝子が耐性 MM 細胞株もしくは感受性 MM 細胞株のどちらかで発現しているのかを RT-PCR 法により検討した結果，耐性株で上昇する lncRNA として 9 種類(DPP10-AS1，LINC010966，LINC00649，CDK6-AS1，CRYM-AS1，LOC101928126，FGF13-AS1，LINC00866，SERTAD4-AS1)，感受性株において上昇する lncRNA として 3 種類(XIST，OVAAL，LINC02397)を同定した．そこでそれらの lncRNA が直接レナリドミド感受性に影響を与えるのかを検討するために，それぞれノックダウン細胞株を樹立し MTT 法により解析した．その結果，レナリドミド耐性株において高発現している 9 種類の lncRNA は，それぞれ単独ではレナリドミド感受性を促すことはなかった．一方，感受性株において上昇している 3 種類の lncRNA のうち XIST は部分的にレナリドミドによるアポトーシスを抑制することがわかった．
　我々はレナリドミド感受性 MM 細胞株において高発現している 3 つの lncRNA についてさらに解析した．まず MMRF-CoMMpass Study により得られた大規模な患者の骨髄血由来 CD138 陽性 MM 細胞の RNA-seq data を用いて，ROC 曲線によりカットオフ値を算出後に全生存期間(OS)を確認した.その結果，XIST もしくは LINC02397 高発現群はそれらの低発現群と比べて有意に予後良好であった．一方で OVAAL は予想に反して高発現群において予後不良であった.また，$XIST^{high}$ $LINC02397^{high}$ $OVAAL^{low}$ 患者群と比較して $XIST^{low}$ $LINC02397^{low}$ $OVAAL^{high}$ 患者群について予後解析および GSEA を行った．その結果，$XIST^{low}$ $LINC02397^{low}$ $OVAAL^{high}$ 患者群において有意に予後不良であり(図 1)，さらにそれらの患者群においてエンリッチされた遺伝子群(FDR q-val<0.5)は 3173sets で，DNA microarray より耐性株においてエンリッチされた遺伝子群(FDR q-val<0.25)は 26sets であった．そのうち両解析でエンリッチされた遺伝子群は 19sets で，多発性骨髄腫の予後に関連する遺伝子群として”ZHAN MULTIPLE MYELOMA MF UP”および”ZHAN ULTIPLE MYELOMA MS UP”が得られた．これら遺伝子群のうち，in vitro における DNAmicroarray・GSEA 解析において FDR q-val<0.05 であった”ZHAN ULTIPLE MYELOMA MS UP”に焦点をあて解析した．実際にレナリドミド抵抗性に寄与する遺伝子を同定するために RT-PCR 法により感受性株および抵抗性株にて比較した結果，1 遺伝子(以下 R#1 と記す)が同定された．さらにこの遺伝子(R#1)を感受性株へ過剰発現させることで，レナリドミドに対して抵抗性を示すのか検討した結果，MTT 法および AnnexinV/PI による FACS 解析において部分的に抵抗性を示すことが示された(図 2)．

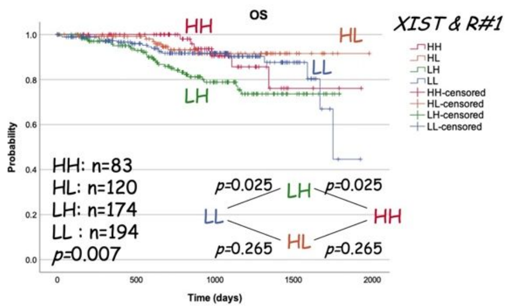




そこで先ほどより使用している患者由来の RNA-seq データを用いて，XIST と R#1 が MM の予後に影響を与えるのかを検討した． その結果，XIST^{high}R#1^{low} 患者群と比べ ，XIST^{low}R#1^{high} 患者群において有意に予後不良であることが示された(図 3)．

今後も今回得られた遺伝子(*XIST，R#1*)がどのような機序でレナリドミドに対して抵抗性を示すのかエピゲノムの観点から解明を行い，最終的には多発性骨髄腫などに対する新規治療薬開発へ繋げていく．

(3) MMRF-CoMMpass Study



５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計1件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 Takumi Futo, Ryo Uozaki, Takashi Yamaguchi, Tomofumi Yamamoto, Hiroki Tsuji, Koichi Samata, Daiju Ichikawa, Maiko Matsushita, Yutaka Hattori
２．発表標題 多発性骨髄腫細胞のレナリドミド耐性に関する多様な分子メカニズム
３．学会等名 The 81th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology
４．発表年 2019年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関