

骨髄腫の薬剤耐性化に関与する分子機構の解析

愛知医科大学医学部
生化学講座 助教 太田明伸
愛知医科大学医学部
生化学講座 教授 細川好孝

研究目的

多発性骨髄腫は形質細胞性の難治性疾患である。サリドマイドやその誘導体は、本邦において難治性および再発性の骨髄腫に使用されているが、特にサリドマイド誘導体であるレナリドマイド (LEN) はサリドマイドに比べて抗腫瘍活性が高く、治療成績も良好であることから、骨髄腫治療の主要な治療薬として確立している。しかしながら、LEN 治療効果は骨髄腫患者によって異なり、作用機構および薬剤耐性機構の分子基盤については、未だ不明な点が多い。そこで本研究では、最新の高密度アレイ comparative genomic hybridization (aCGH) 法と cDNA マイクロアレイ法を用いて、LEN 治療の耐性機構に関与する標的分子の同定を試みた。骨髄腫の薬剤耐性に関わる分子機構を解明することは、エビデンスに基づく新たな診断・治療・創薬の開発につながる可能性が高い。

結果

3つの骨髄腫細胞株 (U266, NCU-MM1, AMU-MM1) を入手し、細胞増殖アッセイ法を用いて LEN に対する感受性確認試験を行った。その結果、LEN がこれらの細胞株すべてにおいて細胞増殖抑制効果を示すことを確認した。次に、細胞株に対して低濃度の LEN を暴露し続けることにより、U266 と NCU-MM1、AMU-MM1 の3つの細胞株から薬剤耐性株を樹立した。薬剤耐性化は、細胞増殖アッセイを利用して確認された (Figure 1)。次に、親株と耐性株における遺伝子発現プロファイルの変化を確認するために、cDNA マイクロアレイを行った。その結果、U266細胞から樹立した LEN 耐性株においては、5倍以上の発現量の増加を認めた遺伝子として IL32、ITGA8、ITGB2、ARHDIB、SEPT9、Nestin、Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 2 (RASSF2)、actin-like 8 (ACTL8)、ATCAY、FGF9、CD2 などが見出された (Table 1)。逆転写 PCR 法を用いた遺伝子発現量の解析を行ったところ、IL32、ITGA8、ARHDIB は親株と比較して、耐性株において

研究実績報告書（中間報告書）

明らかに増加していた（**Figure 2A**）。一方で c-Myc の発現量に変化はなかった。同様に、U266 細胞で同定された遺伝子群を NCU-MM1 と NCU-MM1 から樹立した耐性株の間において比較した結果、両群に発現量の差は見られなかった（**Figure 2B**）。NCU-MM1 細胞から樹立した LEN 耐性株においては、親株と比較して 3 倍以上の発現量の増加を認めた遺伝子として、Proteoglycan 2 (PRG2)、CD52、RET などが見出された（**Table 2**）。また、AMU-MM1 細胞から樹立した LEN 耐性株は、MTT アッセイによる耐性能の評価と cDNA マイクロアレイ解析による遺伝子発現プロファイルを作成中である。本研究の解析結果から、LEN の標的（結合）分子であるセレブロンや、骨髄腫の悪性化に関与すると報告された Interferon regulatory factor 4 (IRF4) の遺伝子発現量には変化がないことを確認している。また、骨髄腫細胞のクローン進化による耐性獲得の可能性を考慮し、耐性株に特徴的なゲノム異常を見出すことを目的として aCGH 解析を行った。その結果、耐性株に特異的なゲノム増幅または欠損領域が見出された。このゲノム異常領域の近傍には、マイクロアレイ解析によって見出された遺伝子は確認されなかった。

考察

最近、CD133 陽性の幹細胞の性質を示す大腸がん細胞株において IL32 の発現増加が見られ（Chang et al, *BBRC*, 2011）、抗 IL32 抗体によって腫瘍の増殖を抑制したことから、IL32 が造腫瘍性に関与することが示唆されている。そこで現在、IL32 と骨髄腫細胞株の薬剤耐性化との関連性についての解析を行うために、IL32 遺伝子導入と IL32 遺伝子ノックダウンシステムの構築を進めている。また、インテグリンファミリーは骨髄腫細胞の骨髄微小環境における生存において重要であると考えられている。本研究で同定された ITGA8 遺伝子と骨髄腫の進展に関する報告は未だ存在しない。FGF9 は近年固形癌において発現が確認され、癌遺伝子であるとの報告がある（Hendrix et al, *Cancer Res*, 2006）。ITGA8 や FGF9 についても IL32 同様に解析を進める予定である。今後は MTT アッセイを用いて薬剤感受性の変化を解析後、論文投稿する予定である。

Table 1. Upregulation of gene expression in lenalidomide-resistant U266 cells.

Gene Name	Systematic Name	Description	U266 parent		U266 Len-R	
			DMSO	LEN	DMSO	LEN
ACTL8	NM_030812	Actin-like 8	1	0.4	132.9	112.3
WNT5A	NM_003392	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A	1	1.0	81.0	106.3
ATCAY	NM_033064	Ataxia, cerebellar, Cayman type	1	1.0	66.1	105.9
CD2	NM_001767	CD2 molecule	1	3.5	41.4	55.6
ITGB2	NM_000211	Integrin, beta 2, variant 1	1	0.4	29.8	23.6
ARHGDI8	NM_001175	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	1	0.5	26.2	23.8
BRUNOL4	NM_020180	Bruno-like 4, RNA binding protein, variant 1	1	0.5	19.4	14.6
NES	NM_006617	Nestin	1	0.8	13.3	13.2
RASSF2	NM_014737	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 2, variant 1	1	1.0	12.7	17.7
IL32	NM_001012631	Interleukin 32, variant 1	1	1.7	11.7	14.9
SEPT9	NM_006640	Septin 9, variant 3	1	1.2	8.2	7.1
FGF9	NM_002010	Fibroblast growth factor 9 (glia-activating factor)	1	1.0	7.3	5.6
IL32	NM_001012633	Interleukin 32, variant 4	1	1.0	6.7	8.1

Table 2. Upregulation of gene expression in lenalidomide-resistant NCU-MIM1 cells.

Gene Name	Systematic Name	Description	U266 parent		U266 Len-R	
			DMSO	LEN	DMSO	LEN
SNORA60	BF304636	CDNA clone IMAGE:41218195, mRNA sequence	1	1.1	13.8	14.3
PRG2	NM_002728	Proteoglycan 2, bone marrow	1	0.8	10.1	11.7
OR7C2	NM_012377	Olfactory receptor, family 7, subfamily C, member 2	1	0.9	5.1	4.8
DEFB104B	NM_001040702	Defensin, beta 104B	1	0.9	4.9	4.7
CD52	NM_001803	CD52 molecule	1	0.9	4.7	4.2
C9orf84	NM_032307	Chromosome 9 open reading frame 84	1	1.0	4.6	2.0
GPR55	NM_005683	G protein-coupled receptor 55	1	2.7	4.4	5.9
ADAM7	NM_003817	ADAM metallopeptidase domain 7	1	1.4	4.4	4.0
BC012881	BC012881	CDNA clone IMAGE:3463076	1	1.2	4.2	3.4
RET	NM_020975	Ret proto-oncogene, variant 2	1	0.7	3.8	2.6
PRRT4	NM_001114726	Proline-rich transmembrane protein 4	1	0.7	3.4	2.8

Figure 1

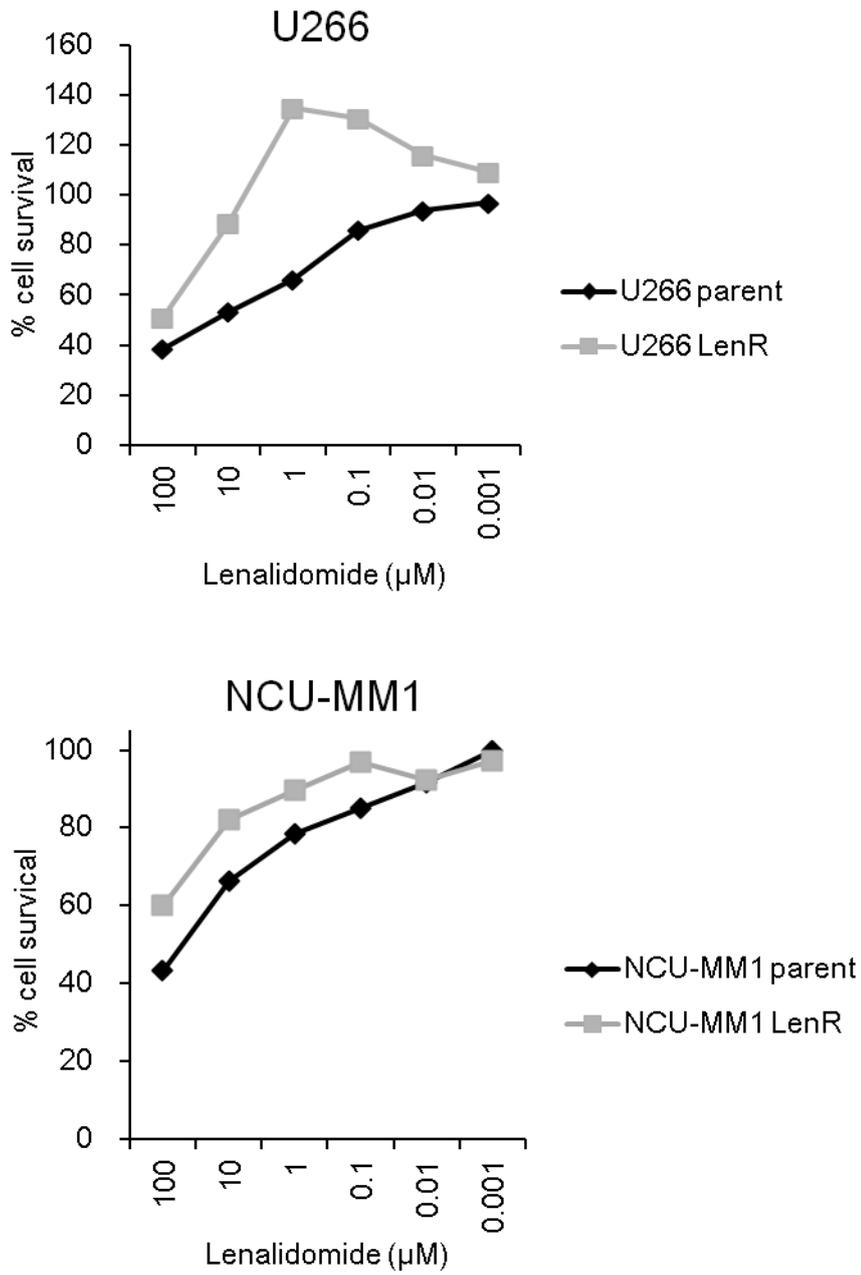


Figure 2

