

多発性骨髄腫の経時的single cell RNA-seqによる 新規薬剤耐性遺伝子の同定

九州大学病院 内分泌代謝・糖尿病内科
土師 正二郎

(共同研究者)

九州大学大学院医学研究院 病態制御内科学	教授	小川 佳宏
九州大学生体防御医学研究所 情報生物学分野	教授	須山 幹太
九州大学大学院医学研究院 病態制御内科学	助教	中嶋 康博
九州大学大学院医学研究院 病態制御内科学	大学院生	増田 徹

はじめに

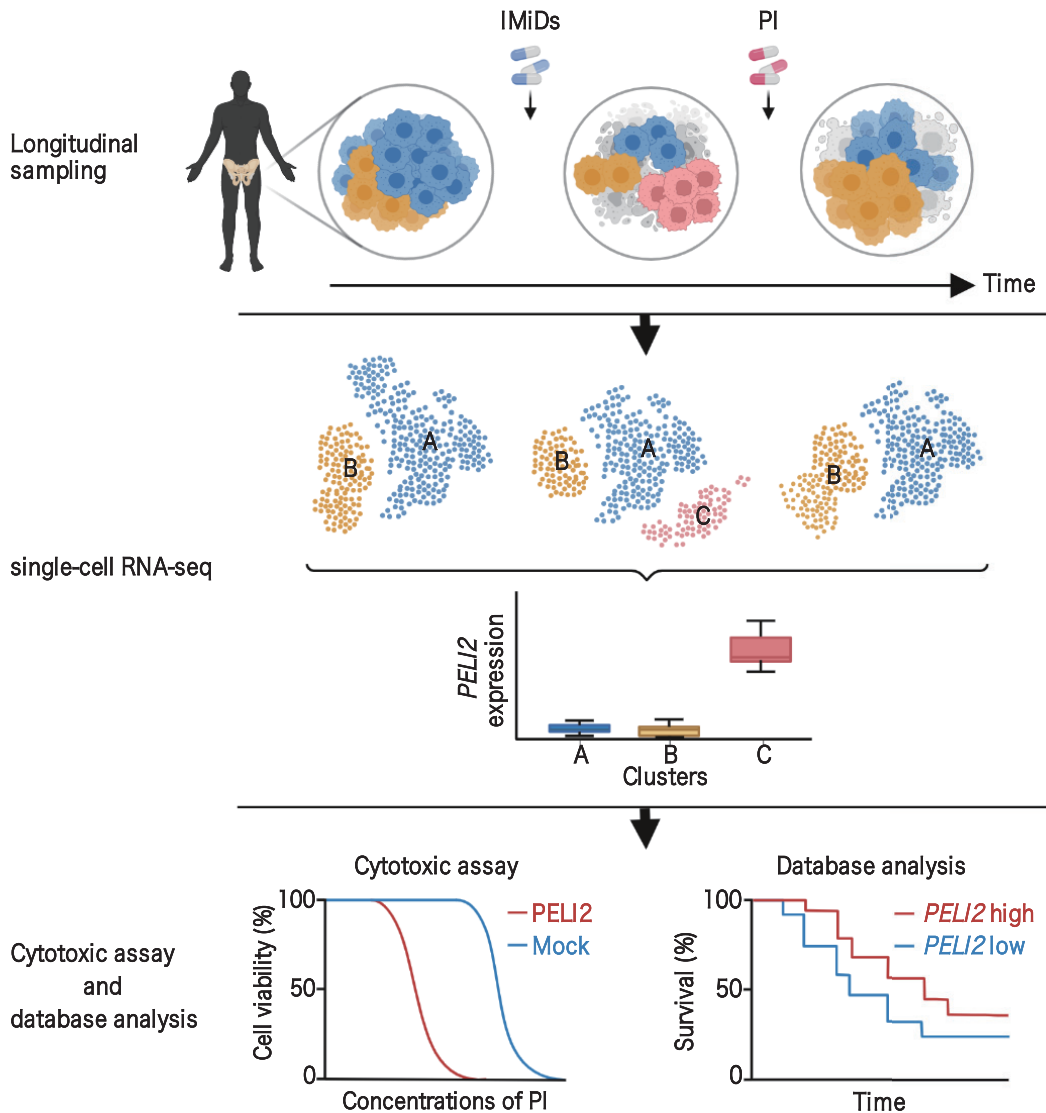
多発性骨髄腫 (Multiple Myeloma: MM) は高齢者に多くみられる難治性血液悪性腫瘍であり、今後の超高齢化社会において患者数の更なる増加が予想される。近年Proteasome inhibitors (PI) などの新規薬剤が登場し治療成績は飛躍的に向上したが、ほとんどの症例で薬剤耐性を生じ再発するため、治癒をもたらすことは依然困難である。新規薬剤耐性獲得の分子機構の解明とそれを踏まえた最も有効な薬剤選択指標の確立は喫緊の課題であるが、薬剤耐性に関与する遺伝子の同定が進んでおらず、耐性獲得の分子基盤は不明な点が多い。

耐性遺伝子の同定が困難な要因としてMMの腫瘍内不均一性が知られている。MMでは初期に発生に関わる遺伝子異常が起こり、さらに一部クローンにおいて増幅に有利な遺伝子異常が加わる“枝分かれ”な腫瘍進展を示すため、ゲノム異常パターンの異なる大小複数のクローンが存在する。このため従来の細胞集団全体を対象とした解析では、MM幹細胞などのマイナークローンに存在する耐性遺伝子を同定することが困難であり、single cell レベルでの解析が望まれている。一方、MMは治療経過中にもゲノム異常が蓄積し薬剤耐性を獲得するため、診断時サンプルの解析のみでは治療関連の獲得耐性に関連する遺伝子異常を同定できない。以上より、MMに出現する薬剤耐性遺伝子の網羅には、同一患者の経時的なサンプルを対象としたsingle cell RNA-sequencing (scRNA-seq) 解析によるクローンの追跡と解析が不可欠である。最近我々は、同一患者の治療前後のサンプルを対象としたscRNA-seq解析を行い、PI投与により速やかに消失する細胞集団 (cluster) のみに強く発現する遺伝子*PELI2*をPI感受性に関与する候補遺伝子として同定した。遺伝子の多寡によりMMを2群化し、各々のPI投与時の予後を検索することができる共用database (PRECOG) を用い、*PELI2*発現の多寡による全生存率を比較したところ、高発現する患者において生存率が有意に高いことを確認した。さらに*PELI2*を欠損あるいは過剰発現させた骨髄腫細胞株を樹立しこれらのPIへの感受性を細胞毒性アッセイにより検討したところ、*PISG*発現がPI

感受性を高めることを見出した(図1)⁽¹⁾。

本研究では同様の手法を用い、治療前後のみでなく寛解期の骨髄サンプルも対象とした解析を行い、薬剤耐性遺伝子を検索した。

図1 経時的scRNA-seq解析とデータベース解析、in vitro解析の統合的手法によるPI感受性遺伝子の同定



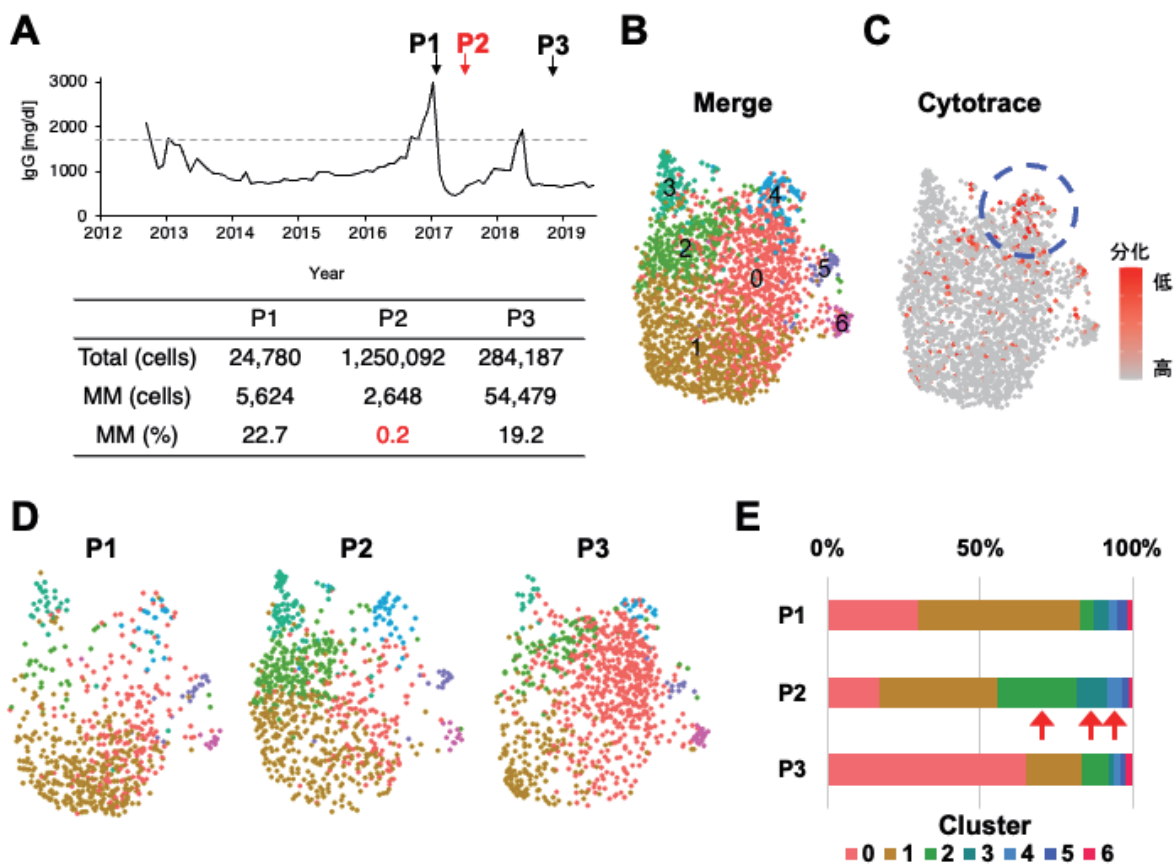
結果

経時的に初発時から新規薬剤抵抗性となる経過を追う事が出来、さらに治療が奏功し寛解となった時点での骨髄検体も取得できている症例を対象として経時的scRNA-seq解析を行った。寛解期の骨髄中にごく少数存在するMM細胞は薬剤抵抗性が高く、これらが治療奏功時にも残存することが再発の一因と考えられている。寛解時に残存する耐性細胞集団において特異的に発現する耐性遺伝子の同定を目的とし、下記検討1を進めた。

検討1：経時的scRNA-seq解析による新規薬剤抵抗性遺伝子の同定

骨髓検体より、BD FACS Melody™セルソーターを用い、CD38⁺CD45⁻CD19⁻のMM細胞を、患者1検体あたり960細胞を目標としてプレートに1細胞ずつソーティングを行った。CEL-Seq2法によってライブラリーを作成し、1細胞あたり50万リードを想定し、Illumina HiSeq 1500 sequencersでペアエンドシーケンスを行った。解析結果は、GRCh38 human referenceを用いてマッピングを行った。得られたリードカウント情報を解析用ツールSeuratで解析し、UMAP plotとクラスター毎のvariable gene listを作成した。臨床経過と照らし合わせ、治療奏功時にその比率が増大するCluster2、3、4を同定した(図2)。

図2 寛解期に割合が増大するclusterの同定



- 寛解期を含む骨髓サンプルを対象としたscRNA-seq解析を行った。
- (A) 寛解期 (P2) を含む骨髓サンプルを得られた症例を対象とした。P2ではMM細胞の比率は0.2%とごくわずかであった。
- (B) 全サンプルより得られたリードカウント情報を解析用ツールSeuratで解析し、UMAP plotを作成したところ7つのclusterに分けることができた。
- (C) 細胞の成熟度を推定できるアルゴリズムであるCytotraceを用いて解析を行ったところ、cluster4に未熟な細胞が多くみられることがわかった。

(D) (B)で作成したUMAP plotを採取ポイント毎に分割した。

(E) 採取ポイント毎の各clusterの細胞数比率を積み上げグラフとして表示した。

Cluster2、3、4が寛解期であるP2で増加することが判明した。

現在、P2で細胞数比率が上昇するcluster2、3、4に特異的に発現する遺伝子のうち $p < 0.05$ の遺伝子リストを作成中であり、この中から薬剤抵抗性遺伝子の候補を同定する。さらに今後検討2-3を行う予定である。

検討2：同定した候補遺伝子を欠損・強発現する骨髄腫細胞株の樹立

データベースより候補遺伝子を持たない骨髄腫細胞株を検索する。該当するものがない場合はCRISPR-Cas9システムを用い、候補遺伝子を欠損した骨髄腫細胞株を樹立する。さらに欠損株に、候補遺伝子を含む発現ベクターをトランスフェクションし高発現株を作製する。遺伝子欠損・高発現株を対象とした細胞増殖アッセイやRNA-seq解析を行い、これらの遺伝子が増殖など細胞機能に与える影響を解析する。

検討3：樹立した細胞株における新規薬剤反応性の評価と新規治療法の探索

検討2で樹立した細胞株の、新規薬剤への感受性を細胞毒性アッセイにより検討する。具体的には各濃度の新規薬剤添加24、48時間培養後に細胞生存率を評価し IC_{50} を算出する。また、検討1にて同定された遺伝子に対し阻害作用の報告がある薬剤が存在する場合、高発現細胞株にその薬剤を新規薬剤と共に添加し、細胞生存・増殖率に与える影響を解析し、新規治療薬としての有用性を検討する。

考 察

寛解期に残存するMM細胞は微小残存病変と言われ、再発・予後と関連することが予想されるがその希少性から詳細な解析はこれまでのバルク解析では困難であった。本研究ではscRNA-seq解析を用いることで、寛解期の骨髄細胞のうち0.2%しか存在しないMM細胞のトランスクリプトを解析することが可能であった。また同定した「寛解期に拡大する細胞集団」のうちcluster 4はcytotrace解析の結果、より未分化な細胞集団であることが示唆されており再発の原因となりうるMM幹細胞の同定につながる可能性がある。本研究により、微小残存病変が持つ耐性遺伝子が同定できれば、新規予後指標や新規治療法の開発につながると考えられる。

要 約

MMが持つ腫瘍内・腫瘍間多様性を克服し薬剤反応性遺伝子を同定しうる統合的手法を先行研究において樹立したことから⁽¹⁾、本研究では再発時のみならず寛解期のサンプルも対

象とし同様の解析を行うことで寛解期に残存する耐性細胞が持つ耐性遺伝子の同定を試みた。その結果、寛解期に拡大する細胞集団を同定でき、現在これらの細胞集団が持つ耐性遺伝子の同定を進めている。

文 献

1. Masuda T*, **Haji S***, 他 (*: **contributed equally**, 13名中2番目) . Identification of a drug-response gene in multiple myeloma through longitudinal single-cell transcriptome sequencing. *iScience*. 2022 in press 査読有