

「大規模 1 細胞 RNA-seq による多発性骨髄腫の髄外病変の形成過程の解明と 治療標的の探索」

現在の所属 職位 国立がん研究センター研究所 病態情報学ユニット 独立ユニット長
氏名 山本 雄介

要旨

多発性骨髄腫(Multiple Myeloma, MM)は複数の遺伝子異常の蓄積により発生するがんである。近年、レナリドミドなどの免疫調節薬やボルテゾミドなどのプロテアソーム阻害薬が承認され、その予後が改善しつつある。しかし、いまだに MM 患者の多くは再発をきたす難治性がんである。中でも腫瘍が薬剤に対して耐性を獲得した患者や髄外病変の予後は不良である。プロテアソーム阻害薬等に対する薬剤耐性は明確な予後不良因子であるが、その発生メカニズムは不明な点が多い。その理由としては、進展の間に様々なサブクローンが発生し解析を困難にしていることや、適切な解析モデルが存在しないことが挙げられる。本研究では、1 細胞 RNA-seq データを統合することで大規模な MM 症例の遺伝子発現データセットの構築を行う。大規模 1 細胞 RNA-seq データを用いて、MM の前がん病変といわれる意義不明の単クローン性免疫グロブリン血症(monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS)から、くすぶり型 MM(smoldering multiple myeloma, SMM)を経て MM の発症、進行がんへと変遷する過程で特徴的な細胞集団や遺伝子の探索を行う。それにより、MM の本体解明となるだけでなく、新たな診断マーカーや新規治療標的・創薬標的を選出する。

背景・目的

多発性骨髄腫(MM)は形質細胞ががん化した造血器腫瘍である。近年、MM は免疫調節薬やプロテアソーム阻害薬などの新規治療薬により予後が大きく改善した。しかしながら、薬剤の長期ばく露による薬剤耐性は依然として予後不良である(Kumar et al. Nat Rev Dis Primers. 2017)。申請者らは、1 細胞 RNA-seq 解析を用いることで、がんや炎症疾患における少数性細胞の存在意義の解明を行ってきた。その過程で、大きな細胞集団の中にある一部の細胞集団が、がん組織の薬剤耐性能に獲得に深く関わることを明らかにした(Prieto-Vila et al. Cancer Res. 2019)。さらに、公共データベースに保存されている 1 細胞 RNA-seq データを統合することで、大規模な 1 細胞 RNA-seq データセットを構築し、組織の包括的な解析にも成功している(Nakayama et al, Cancer Res Commun. 2023)。本手法を用いることで、低コストで非常に大きな規模での 1 細胞レベルでのがん細胞やその周囲の細胞の遺伝子解析が可能となる。バルク RNA-seq では判別しづらい少数の細胞集団が存在する可能性があり、大規模な 1 細胞レベルでの解析を実施することで MM の進展過程に深く関与する細胞を探索する。データベース上の保管されている様々な MM に関する単一細胞データセットを統合することで、MM の病期の変遷(MGUS→SMM→MM→進行がん)や、進行がんにおいて生じる薬剤に対する耐性や髄外病変の理解につながると考えた。

方法

(1) MMの大規模な1細胞RNA-seqデータセットの構築

GEO等の公共データベース上に保管されているMMの1細胞RNA-seqのデータを収集する。実験条件、ライブラリ作製、NGSが同様に実施されているデータセットを統合することで、バッチ間差を軽減させる。1細胞ごとに検出される遺伝子数やUMI値をもとに、解析に組み込む細胞の質のCutoff値を決め、発現データの質を揃える。また、ミトコンドリア関連遺伝子の発現量(20%以下)に基づき生細胞を選択する。様々なステージのMMデータを含む大規模な1細胞トランスクリプトームデータを構築する。1細胞発現データには、患者の年齢、性別、腫瘍のステージなどの臨床情報を付加することが可能であり、特定の症例の細胞だけを取り出して解析することが可能である。Single-Cell Portal等のデータベースに登録されている遺伝子の発現パターンからクラスター毎の細胞の種類を特定し解析を進める。

(2) MM細胞のステージごとのマーカーとなる遺伝子の探索

細胞の種類を特定するマーカー遺伝子の発現プロファイルより、クラスターごとの細胞種を特定した後、MMのステージを規定する遺伝子マーカーを同定する。それに基づき、MM細胞の病期ごとに高発現している遺伝子を探索する。特に進行がんに関与する遺伝子を特性することで、MMの再発や薬剤耐性に関与する遺伝子群を解析する。

(3) MM細胞株を用いた候補遺伝子の検証

計画1,2において、有望な薬剤耐性の責任遺伝子候補があった場合には、複数の多発性骨髄腫の細胞株(KMS11, KMS21, KMS28, KMS34等)を用いて、ボルテゾミブ処理を行い、それらの遺伝子やタンパク質レベルでの変化を検証する。さらに、それらの遺伝子を強制発現するレンチウイルスベクターを複製し、MM細胞株での薬剤耐性能や、髄外病変につながる浸潤能などのがんの悪性化に関与する機能を検証し、同定された遺伝子の機能解析を行う。

結果

1. MMの大規模な1細胞RNA-seqデータセットの構築

公共データベースを用いて、MMの1細胞RNA-seqデータを取得する。約200症例のデータセットが保存されているが、検体の調製方法(特定の細胞を選択しているかどうかなど)、NGSライブラリの作製方法(本検討では、10x Genomics社に絞る)、生データのマッピング方法が同一の検体に絞った。また、極端に症例数が少ないデータセットを除外し、最終的には3データセット70症例を統合してMMの1細胞データセット(トータルで約15万細胞)を構築した(図1)。図2Aに示すように、MMのマーカー遺伝子であるCD38, CD138, SLAMF7, XBP1の発現をもとに、細胞集団の中からMM細胞を抽出した。それらのマーカー遺伝子の発現をもとに選択した細胞だけを用いて、UMAP上に新たに展開し、MMの進行期毎に細胞を分けた(図2B)。

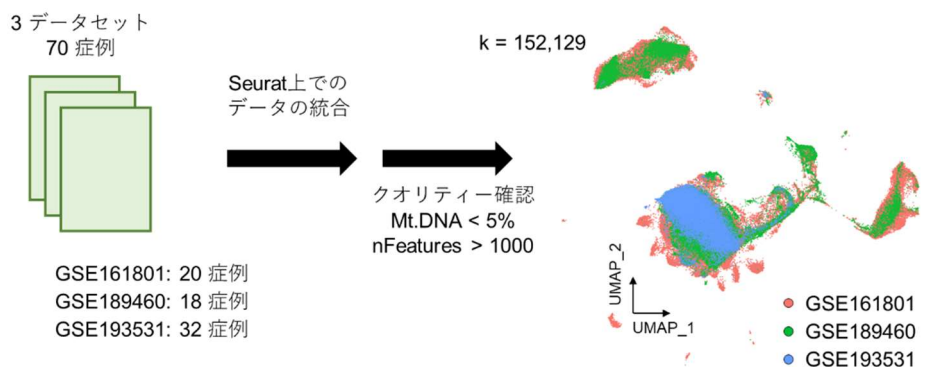


図1. 公共データベースを用いたMMに対する1細胞RNA-seqデータの構築

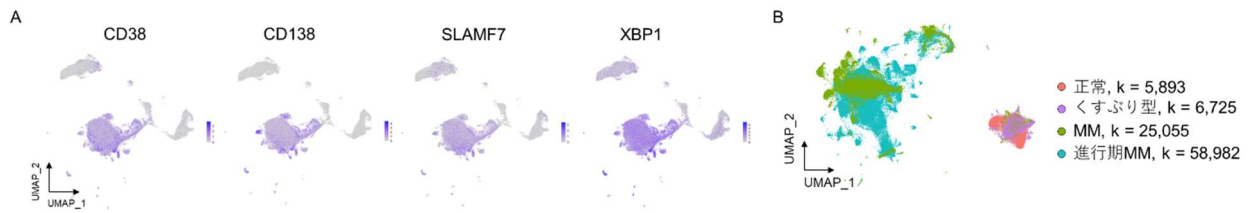


図2. MM細胞の選択と病期ごとの解析. A. MMマーカー遺伝子の発現、B. 病期におけるMM細胞の分布

2. MM細胞のステージごとのマーカーとなる遺伝子の探索

がんの進行度合いに応じて、1細胞レベルにおいて、高発現する遺伝子群の探索を行った。図3Aに示すように、複数の遺伝子が、正常やくすぶり期で発現が低く、進行期で多くの細胞において高発現していることを確認した。例えば、UCHL1 遺伝子や長鎖 RNA などが進行期の特定の MM のサブグループで高発現していることを見出した。また、SQSTM1 や GADD45A 遺伝子は進行度に応じて発現が上昇していることが確認できた(図3B)。

本解析で用いた進行期の MM 検体(58,982 細胞)はボルテゾミブによる治療後に再発した検体を多く含んでいたことから、図3Aの進行期で発現が上昇している遺伝子群には、薬剤に対する耐性に関与する遺伝子が含まれていると考えられた。

3. MM細胞株を用いた候補遺伝子の薬剤耐性の検証

図3で示した遺伝子群がボルテゾミブ処理によって誘導された遺伝子であることを確認するために、MMの細胞株を用いた検証実験を行った。4種類のMM細胞株を用いて、それぞれの細胞株のIC60ならびにIC80の濃度を用いてボルテゾミブ処理を行った。図3Aに示された遺伝子を対象として定量的PCRを行った。その結果、どちらの濃度においてもSQSTM1ならびにGADD45Aの発現上昇が確認された(図4A)。SQSTM1においては、ウェスタンブロットによるタンパク質レベルでの検証によって、ボルテゾミブ処理でタンパク質量が増加することを確認した(図4B)。現在、レンチウイルスによって、SQSTM1をMM細胞株で強制発現させて薬剤耐性能に与える影響や進行期に生じる髄外病変に関する浸潤能の検証を行っている。

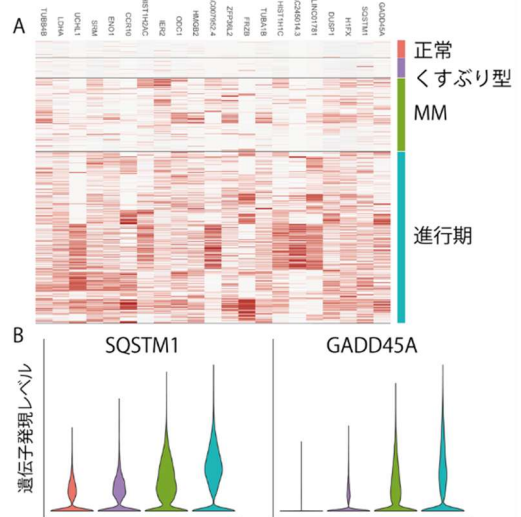


図3. 進行期において高発現する遺伝子群の探索
A. 進行期に応じて発現上昇する遺伝子のヒートマップ
B. SQSTM1およびGADD45Aのバイオリンプロット

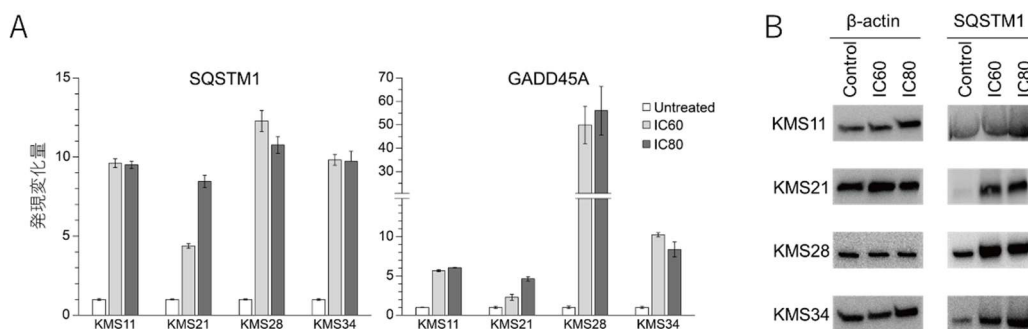


図4. ボルテゾミブ処理による遺伝子の発現上昇
A. IC60ならびにIC80濃度でのボルテゾミブ処理によるSQSTM1およびGADD45A遺伝子上昇
B. SQSTM1のタンパク質レベルでの検証

考察

MM は、レナリドミドなどの免疫調節薬やボルテゾミブなどのプロテアソーム阻害薬の登場によって、その予後は改善しつつある。しかしながら、抗がん剤の長期ばく露において、骨髄腫細胞が薬剤に対する耐性を獲得することは大きな問題である。薬剤耐性獲得の分子メカニズムは様々な説が提唱されているが、その1つに腫瘍内不均一性が挙げられる。本研究において注目している MM の進行期においても、特定の細胞集団ががんの悪性化に関与している可能性がある。大規模な 1 細胞 RNA-seq 解析を行うことで、骨髄腫内に存在する特定の時期や細胞集団で機能する遺伝子の探索が可能になり、複数の遺伝子が進行期において高発現することを見出した。それらは骨髄腫の本態解明となるだけでなく、新たな診断マーカーや新規治療標的・創薬標的となる可能性が高いと期待している。

共同研究者

早稲田大学 大学院 先進理工学研究科 生命医科学専攻 博士課程大学院生 中道 和也
国立がん研究センター 研究所 病態情報学ユニット 特任研究員 片岡寛樹

引用論文

1. Kumar et al. Multiple myeloma. Nat Rev Dis Primers. 3:17046. (2017)
2. Prieto-Vila et al. Single-Cell Analysis Reveals a Preexisting Drug-Resistant Subpopulation in the Luminal Breast Cancer Subtype. Cancer Res. 79(17):4412-4425. (2019)
3. Nakayama J and Yamamoto Y. Cancer-prone Phenotypes and Gene Expression Heterogeneity at Single-cell Resolution in Cigarette-smoking Lungs. Cancer Res Commun. 3(11):2280-2291. (2023)

助成研究に関連した発表論文

該当なし（現在、論文投稿準備中）