

課題名：形質細胞の遺伝子プロファイルと免疫グロブリン遺伝子の多様性解析 による原発性 AL アミロイドーシスの分子病態解明

【研究の背景および目的】

アミロイドーシスは線維構造を有するアミロイド蛋白が全身の臓器に蓄積し、種々の臓器障害をきたす難治性疾患である。アミロイド蛋白がモノクローナルな免疫グロブリン（M 蛋白）軽鎖に由来するものが原発性 AL アミロイドーシスであり、多発性骨髄腫と同様のクローン性形質細胞性疾患と考えられている。近年、次世代シーケンサー（next generation sequencing: NGS）の登場により多発性骨髄腫の分子病態が次々と明らかになっている一方で、AL アミロイドーシスの分子病態は未だほとんど明らかになっていない。AL アミロイドーシスは極めて難治性、予後不良な疾患であり、新規治療の開発および既存の治療法選択における予後予測のため、その病態解明が不可欠である。そこで、我々はAL アミロイドーシスの病態解明を目的として NGS を用いた形質細胞の遺伝子異常解析と免疫グロブリン遺伝子の多様性解析の研究を計画した。本研究は国内有数の頭書疾患の症例数を診療している日本赤十字社医療センター・骨髄腫アミロイドーシスセンターとの共同研究であり、稀少疾患である本疾患を多数例で検討することが可能である。

AL アミロイドーシスにおける免疫グロブリン遺伝子の多様性解析（レパトア解析）

【方法】

<患者骨髄細胞>

日本赤十字社医療センター・骨髄腫アミロイドーシスセンターおよび千葉大学医学部附属病院血液内科に凍結保存されている AL アミロイドーシス患者骨髄細胞およびその対照として MGUS および多発性骨髄腫（MM）患者骨髄細胞を用いた。さらに正常コントロールとして骨髄浸潤のない悪性リンパ腫患者骨髄細胞を用いた。倫理面への対応として、本研究は千葉大学大学院医学研究院および日本赤十字社医療センターの倫理委員会にて承認を得、凍結保存された患者検体の研究への利用に関して、両施設のホームページにて研究概要のオプトアウトを行い、患者の研究への参加を拒否す

る機会を保障した（千葉大学大学院医学研究院・生命倫理審査委員会：受付番号 760）。

<NGSでのレパトア解析のためのライブラリー作製>

骨髄細胞より DNA および RNA を抽出し、当科・真子（川尻）らの POEMS 症候群患者での研究¹と同様に NGS によるレパトア解析を行った。具体的には、まず骨髄細胞より抽出した DNA および RNA (cDNA) より、免疫グロブリン λ 軽鎖 (IGL) 遺伝子の variable (V) 領域：IGLV 11 ファミリーの中で約 9 割の IGL 遺伝子再構成に関わる IGLV1、2 および 3 と、IGLJ1/2/3 に対するそれぞれの primer を用い²、両者に囲まれた相補的決定領域 (complementarity-determining regions, CDRs) を含む領域を PCR 法にて増幅した。続いて各サンプルごとに異なる index を付加するための PCR を追加し、PCR 産物を AMPure Beads にて精製後、Agilent 2100 バイオアナライザーにて濃度および DNA サイズを確認し、Illumina 社 Miseq にてシーケンスを行った。

<シーケンス結果の解析方法>

真子（川尻）らの POEMS 症候群患者でのレパトア解析¹と同様に、シーケンスにて得られた塩基配列から IMGT (the international ImMunoGeneTics information system, <http://www.imgt.org/>) のデータベースを用いて IGLV 遺伝子のレパトアを同定した。さらに、近年開発された解析プログラムである Vidjil (<http://www.vidjil.org/>) を用いて、IMGT での解析では困難であった V 領域、CDR3、J 領域の組み合わせでクローンを細分化することを試みた。

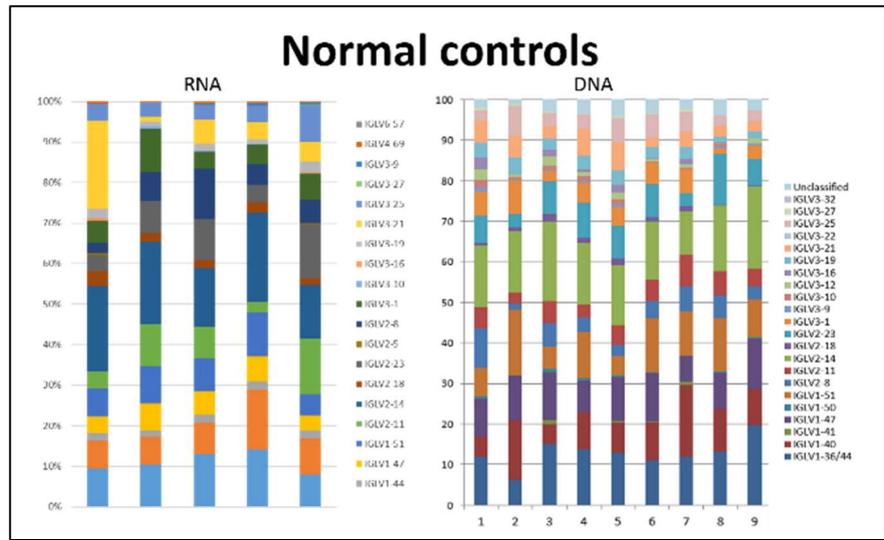
【結果】

1. DNA サンプルと RNA サンプルの比較検討

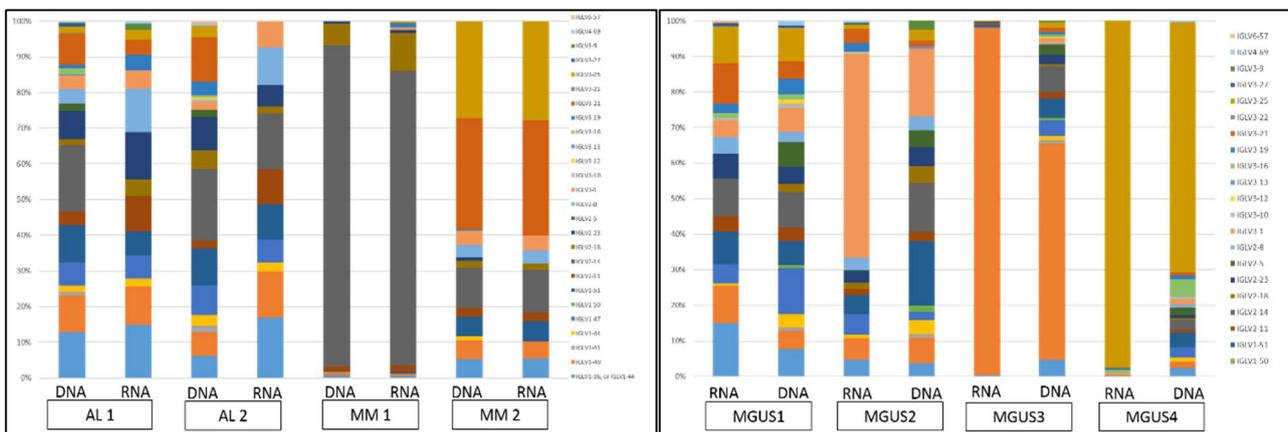
真子（川尻）らの POEMS 症候群患者でのレパトア解析¹では骨髄細胞より DNA を抽出し NGS でのレパトア解析を行ったが、POEMS 症候群では骨髄中に含まれる形質細胞の割合が少ないため、骨髄細胞 DNA 中に含まれる形質細胞由来の免疫グロブリン遺伝子の割合が少なく、そのため POEMS 症候群におけるクローナルな形質細胞を示す IGLV1-40 および IGLV1-44 の割合は多くの症例で 30%以下であった。そこで、免疫グロブリン遺伝子は主として形質細胞において翻訳され、

抗体産生されることから、RNA サンプルの方が DNA サンプルより形質細胞由来の免疫グロブリン遺伝子 (mRNA) を多く含有しているとの仮説を立て、レパトア解析に関して DNA サンプルと RNA サンプルの比較検討を行った。用いたサンプルは正常コントロール (N=5)、MGUS (N=4)、AL アミロイドーシス (N=2)、多発性骨髄腫 (MM、N=2) であり、シーケンスデータは IMGT のデータベースにて解析を行った。結果を以下の図に示す (Normal コントロールにおける DNA サンプルの結果は真子らの論文 1

より引用)。仮説と異なり、DNA サンプルの結果と RNA サンプルの結果に相違はなく、正常およびさまざまな疾患においても結果は同様であった。そのため、形質細胞性腫瘍におけるレパトア解析は

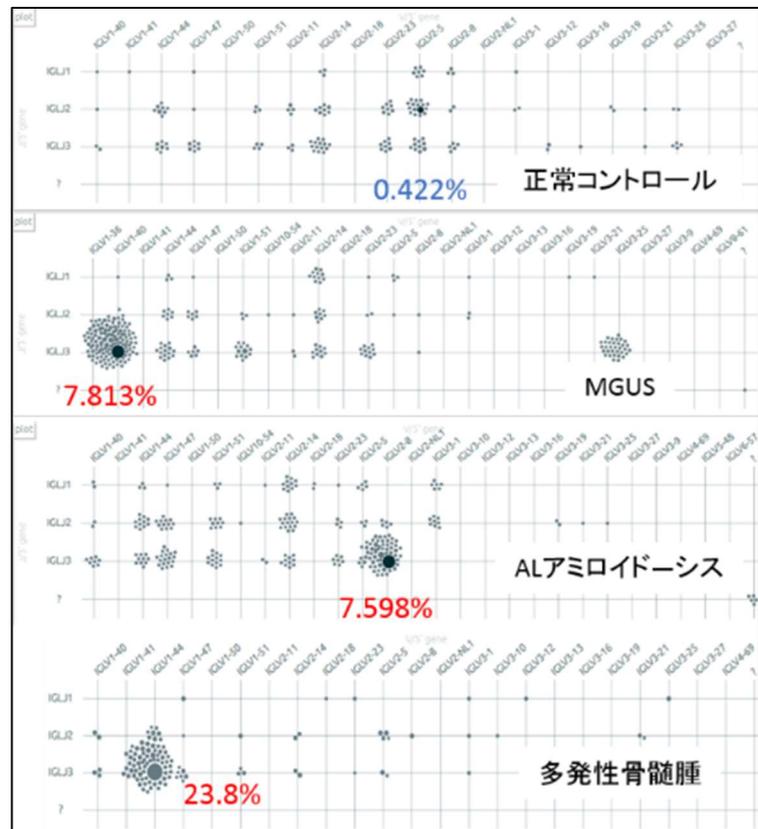


DNA サンプルで十分であるとの結論に至り、以降の AL アミロイドーシスの解析は DNA サンプルで行うこととした。



2. DNAサンプルを用いたALアミロイドーシス骨髄細胞におけるレパトア解析

症例数を増やしALアミロイドーシス(N=19)、MGUS(N=7)、多発性骨髄腫(N=6)および正常コントロール(N=4)の骨髄細胞を用いてレパトア解析を行った。新規のレパトア解析プログラムであるVidjilにて解析を行ったところ、右図のようにMGUSでは7例中7例、多発性骨髄腫では6例中6例、ALでは19例中17例でクローナルな免疫グロブリンλ遺伝子が同定された。MGUSやALではクローンの割合は多発性骨髄腫に比べて小さく、それら小さなクローンがALの発症にどのように関わっているか明らかにするため今後多数例での解析を準備中である。今回の成果は第44回日本骨髄腫学会学術集会(2019年5月名古屋)にて発表予定である。



<参考文献>

1. Kawajiri-Manako C, Mimura N, Fukuyo M, et al. Clonal immunoglobulin lambda light-chain gene rearrangements detected by next generation sequencing in POEMS syndrome. *Am J Hematol.* 2018;93(9):1161-1168.
2. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia.* 2003;17(12):2257-2317.