

多発性骨髄腫におけるグルココルチコイド耐性 (トランスクリプトミクスからのアプローチ)

本記事では、Omics Playground を使用し、Logie et al., 2021 で使用されたデータを再解析していきます。

論文の概要

多発性骨髄腫 (Multiple Myeloma; MM) は、悪性腫瘍の一つであり、しばしば抗がん剤に対する一次耐性および獲得耐性を有している。そして、この耐性はチロシンキナーゼシグナリングの過剰な活性化と関連がある場合がほとんどである。この論文において、著者らは2種類のブルトン型チロシンキナーゼ (Bruton's Tyrosine Kinase; BTK) 阻害剤をグルココルチコイド (glucocorticoid; GC) 耐性腫瘍細胞に作用させ、その作用機序や抗腫瘍的特性を調べた。そして、前臨床のファイトケミカルであるウィザフェリン A (withaferin A; WA) は広範なチロシンキナーゼに作用し、顕著な抗腫瘍の効果が認められたのに加え、BTK の mRNA およびタンパク質の発現を減少させることが分かった。

本記事では、GEO に登録されているデータ (GSE162475) を使用し、再解析を行った。このデータには、WA 処理後または DMSO 処理後 (UT, 対照群) の GC 感受性 (MM1S) および GC 耐性 (MM1R) B 細胞株の mRNA 発現プロファイルが含まれている。

はじめに論文内の解析内容を再現した後、Omics Playground に搭載されているモジュールを使用し、発展的な解析を行った。

1. クラスタリング解析

PCA プロット (図1) およびサンプルごとの遺伝子発現に基づくヒートマップ (図 2A) を見ると、データセットの構造が明確に理解できる。サンプルは GC 耐性の有無を反映した2つの大きなクラスターからなり、さらに個々のクラスターは処理の違いを反映したサブクラスターに分割することができた。

プラットフォームでは、ヒートマップ内の遺伝子クラスターごとに、そのクラスターに含まれる機能アノテーションを確認できる。各クラスターにおける上位 12 個のアノテーションについては、図 2B で示している。クラスター S1 の遺伝子発現に着目すると、耐性の有無にかかわらず、WA 処理細胞と DMSO 処理細胞の間で差があることがわかる (図 2A)。また、クラスター S1 の遺伝子にみられるアノテーションに着目すると、細胞周期調節に関わるパスウェイ (p53 pathway)、IL6/JAK/STAT3 パスウェイ (さまざまながんの増殖に関与し

ている)、転写因子の制御に関わるパスウェイ (TNF α signaling via NF- κ B) などが含まれていた。本記事では掲載していないが、クラスターS1のGOタームに着目しても、B細胞およびT細胞の活性化や分化に関するタームや、血管新生に関わるタームが含まれていた。これらの結果は、もとの論文とも一致していた。

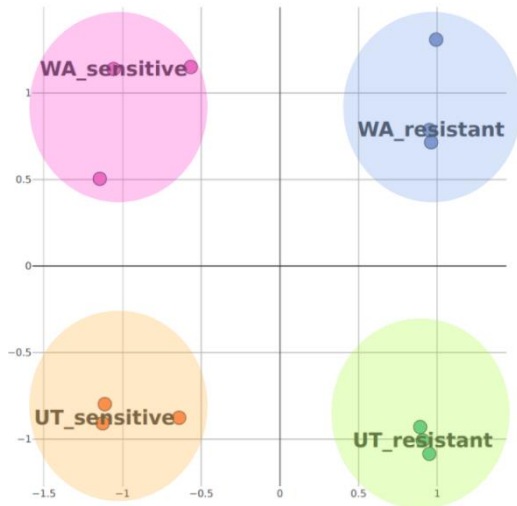


図1 各サンプルをフェノタイプ (GC感受性またはGC耐性) および処理 (WAまたはDMSO) ごとにPCAでプロットした図。紫:WA処理GC感受性細胞 青:WA処理GC耐性細胞 オレンジ:DMSO処理GC感受性細胞 緑:DMSO処理GC耐性細胞

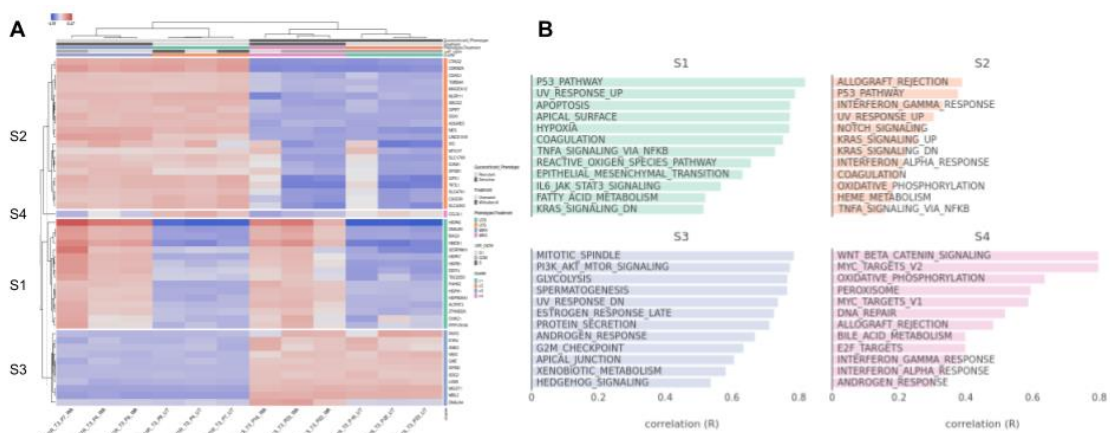


図2 (A) 各サンプルでの遺伝子発現を表すクラスター化されたヒートマップ。発現上昇している遺伝子を赤で、発現低下している遺伝子を青で示している。GC耐性 (MM1R) かGC感受性 (MM1S) かによって大きく2つのクラスターに分かれているおり、各クラスターは、WA処理もしくはDMSO処理 (UT) の違いによってさらに2つのクラスターに分かれている。主要な4つの遺伝子クラスターが図の左側にS1-S4として示されている。(B) ヒートマップで示された4つの遺伝子クラスターにおけるアノテーション。クラスターS1の遺伝子はGC耐性細胞およびGC感受性細胞の両方で、処理の違いを反映した発現傾向となっている。

2.発現変動解析

発現変動解析に際しては、non-coding 遺伝子も含めて解析を行った。DMSO 処理 GC 耐性細胞と DMSO 処理 GC 感受性細胞の比較を行った結果 (DESEQ2(lrt test); FDR<0.01, $|\log_2FC|>1$)、413個の発現変動遺伝子が得られたが、これは元の論文で得られた数(1383個)よりも少なかった (図 3)。これについて、リードカウントに着目して詳しく調べると、発現量が著しく低い遺伝子による影響であることがわかった。すなわち、元の論文では、発現量が非常に低い遺伝子 (HER4 や BLK) が考慮されていたが、本プラットフォームでは、少なくとも 2つのサンプルで発現量が 1cpm 以上でない遺伝子は除外されているために、差が生じていた。ただ、発現量の低い遺伝子の比較は信頼性が期待できないため、今回は、引き続き発現量の低い遺伝子は考慮しないまま解析を進めた。

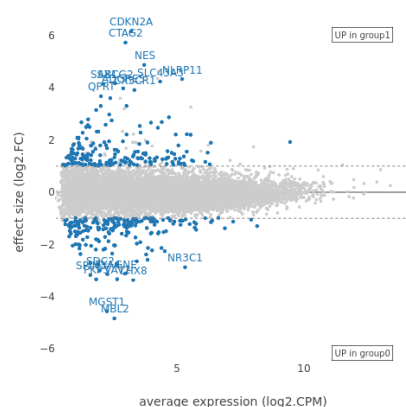


図3 DMSO 処理の GC 耐性細胞および GC 感受性細胞間で遺伝子発現を比較した MA プロット。Y 軸が変動の大きさ (logFC)、X 軸が平均発現量を表す。

補正済みの p-value を使用して抽出した発現変動遺伝子のうち、変動幅の大きい上位 20 個の遺伝子を表 1 に示したが、元の論文で示されていたリストとは異なるものとなり、特に今回のリストでは、発現低下遺伝子の数が大幅に増えていた (表 1)。また、BTK はどちらにもリストアップされた。しかしながら、元の論文で挙げられていた変動幅の大きい 20 個の遺伝子は、プラットフォームを使用した今回の解析においても、有意に発現変動が起きている遺伝子として抽出されていた (表 2)。

また BTK 遺伝子について詳細にみても、GC 耐性細胞と GC 感受性細胞の間では、BTK の発現量に差があるものの、特に WA 処理群で大きく発現が減少する (統計的には有意な減少ではあったものの) ということは見られなかった (図 4)。

Gene	logFC	Adjusted p
MBL2	-4.8	0.00E+00
LINC01518	3.6	1.29E-225
NES	4.9	2.63E-203
CTAG2	5.7	6.06E-201
MGST1	-4.6	4.59E-197
SPIN3	-3.2	1.80E-145
ADGRE5	4.0	2.23E-139
CDKN2A	6.2	4.28E-129
TUBB4A	3.3	3.38E-125
SSX1	4.1	1.44E-124
LHX8	-3.4	3.12E-107
GNE	-3.1	4.32E-100
MAGEA3	2.7	1.53E-99
BTK	2.7	7.33E-94
PCSK1N	2.8	1.68E-90
CDKN2B	2.1	1.68E-84
ZNF175	-2.4	9.90E-81
SDC2	-3.0	2.70E-74
TMEM25	2.5	9.75E-74
ZNF544	-2.7	2.97E-73

Gene	logFC	Adjusted p
LINC01518	3.6	1.29E-225
CDKN2A	6.2	4.28E-129
CTAG2	5.7	6.06E-201
BTK	2.7	7.33E-94
RELN	2.5	1.19E-47
PLXNB2	1.9	1.18E-37
PODXL2	2.5	1.91E-27
ESAM	2.2	1.95E-25
PRKX	1.1	3.11E-47
ACP5	2.6	1.03E-69
GNG7	1.5	8.85E-68
UTS2R	1.6	1.90E-39
TNFRSF8	3.0	3.02E-26
CD52	2.6	4.71E-53
CMTR1	-1.2	2.38E-58
TMEM25	2.5	9.75E-74
TUBB4A	3.3	3.38E-125
NLRP11	4.3	2.01E-70
SLC38A5	1.9	3.06E-42
ABCG2	4.2	3.19E-24

表 1 OmicsPlayground で同定された上位 20 個の発現変動遺伝子。元の論文でも上位 20 個の発現遺伝子として報告されているものは赤字で示してある。

表 2 Logie (2021)で報告されている上位 20 個の発現変動遺伝子。プラットフォームで計算された p 値と logFC 値を同時に示している。

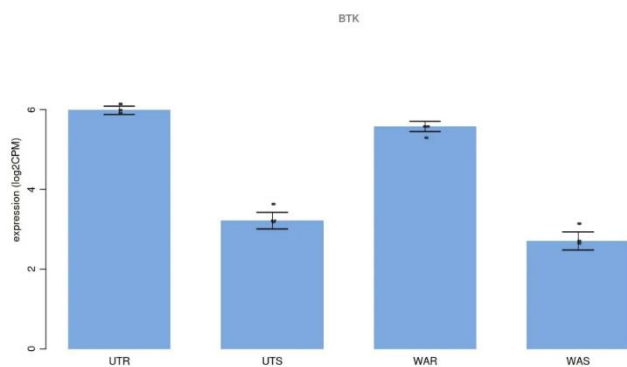


図 4 BTK のサンプルごとの発現量 (logCPM)。UTR:DMSO 処理 GC 耐性細胞 UTS:DMSO 処理 GC 感受性細胞 WAR:WA 処理 GC 耐性細胞 WAS:WA 処理 GC 感受性細胞

3. 遺伝子セットエンリッチメント解析

つづいて、プラットフォーム中の GSEA モジュールを利用して解析を行った。このモジュールでは、KEGG パスウェイや GO ターム解析の他、Drug cMAP データベースやパブリックデータベースに登録されている 50,000 以上の遺伝子セット (Akhmedov et al., 2020) を利用した解析が可能である。最終的な結果として、3つの異なる統計手法 (gsva, fgsea, フィッシャーの正確確率検定; EDR < 0.05, $|\log FC| > 1$) でいずれも有意と判定された遺伝子を使用した。

WA 処理 GC 耐性細胞における遺伝子発現は、さまざまな抗がん剤処理細胞 (WA 自身を含む) における遺伝子発現と正の相関がみられた (図 6)。また、WA 処理 GC 感受性細胞についても同様の結果となった (図 7)。WA 処理と相関の高い 24 個の薬剤のうちのいくつかは HSP90 (heat shock protein 90) 阻害剤であった (monorden/radicicol, alvespimycin, tanespimycin, geldanamycin など) (図 6, 7)。

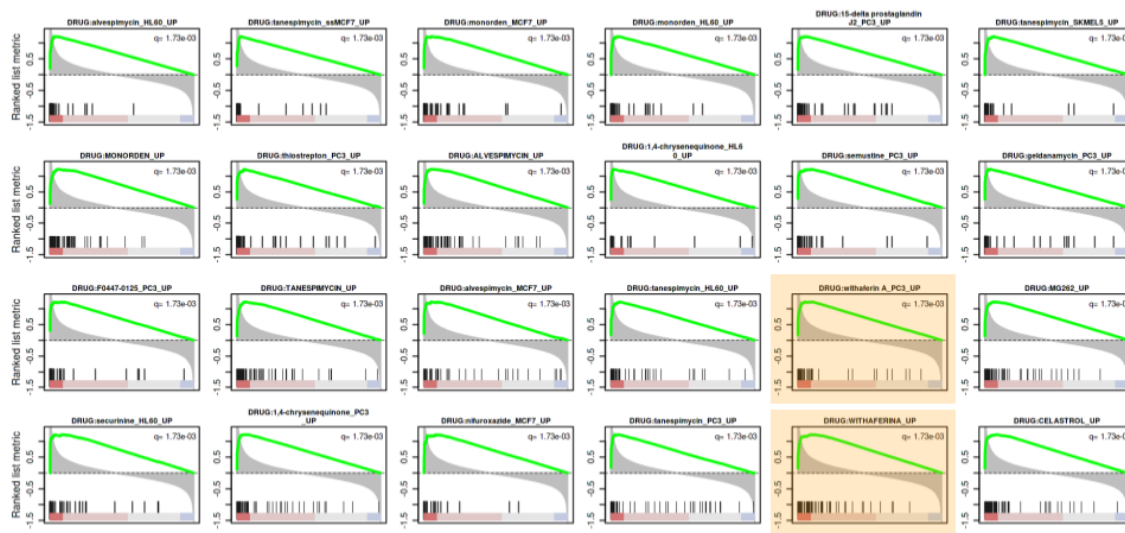


図 6 WA 処理後の GC 耐性細胞での遺伝子発現変動と同様の変動をもたらす薬剤。q 値を基準とし、相関の高いもの上位 24 個を掲載した。オレンジでハイライトしたように、公共データベースに登録されている WA の遺伝子発現変動も抽出されている。

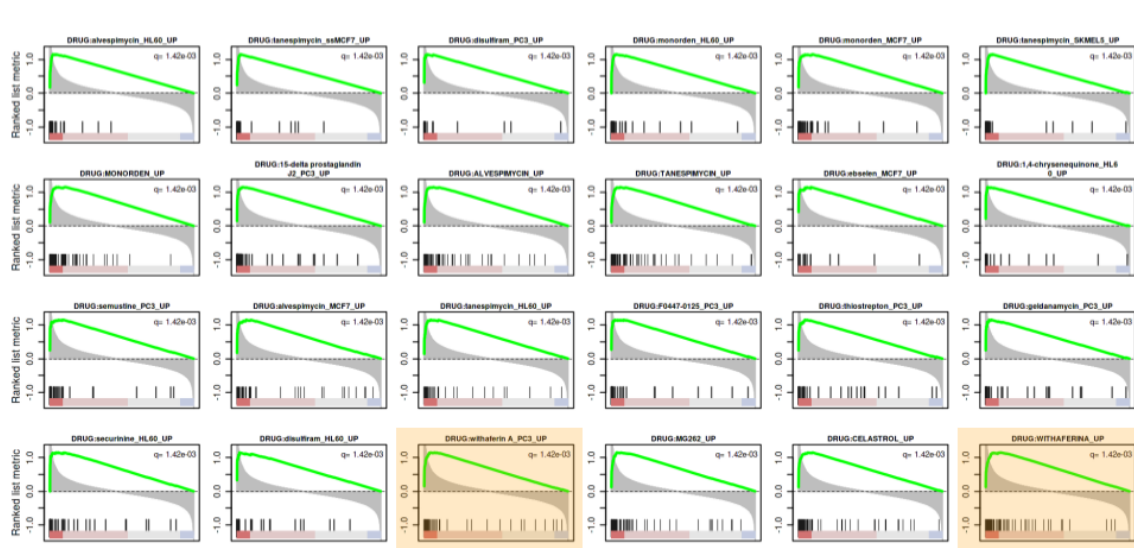


図 7 WA 処理後の GC 感受性細胞での遺伝子発現変動と同様の変動をもたらす薬剤。q 値を基準とし、相関の高いもの上位 24 個を掲載した。オレンジでハイライトしたように、公共データベースに登録されている WA の遺伝子発現変動も抽出されている。

処理後の遺伝子発現プロファイルについて相関関係がある薬剤については、プラットフォーム中の機能アノテーションに関するプロットから、それら薬剤に共通している作用機序 (modes of action; MOA) に関する洞察を得ることができる。DMSO 処理および WA 処理 GC 耐性細胞間の比較結果 (図 8A) と DMSO 処理および WA 処理 GC 感受性細胞間と比較結果 (図 8B) は非常によく似ていた。どちらの比較においても HSP 阻害剤が上位に入っており、前段落の HSP90 阻害剤処理細胞が WA 処理細胞と遺伝子発現プロファイルの相関が高いという結果とも一致している。また、真核生物ではグルココルチコイド受容体 (glucocorticoid receptor; GR) と HSP90 が複合体を形成しており、それにより GR の機能調節が行われているという報告もある (Kirschke et al., 2014)。

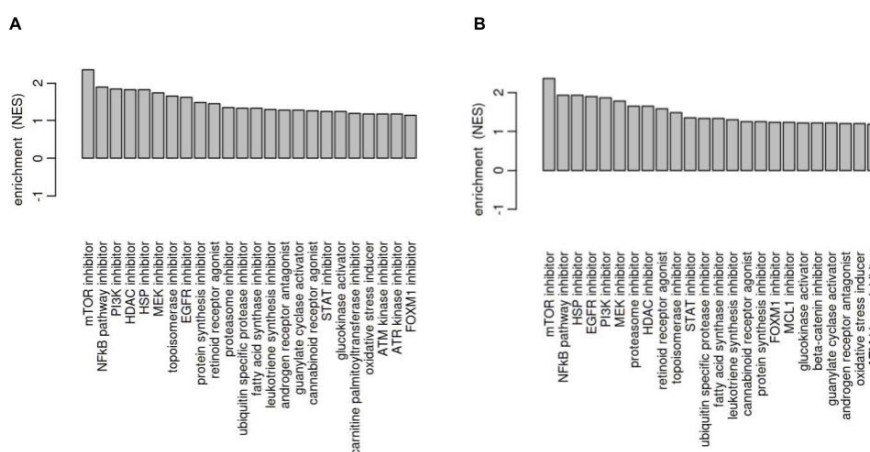


図 8 (A) WA 処理および DMSO 処理 GC 耐性細胞間でみられる遺伝子発現変動と同様の変動をもたらす薬剤に関連する MOA のうち上位のもの。(B) WA 処理および DMSO 処理 GC 感受性細胞間でみられる遺伝子発現変動と同様の変動をもたらす薬剤に関連する MOA のうち上位のもの。

また、結果の中で、着目すべき他の MOA としては、mTOR パスウェイ、NF-κB パスウェイ、プロテオソーム阻害などが挙げられる。一方、BTK 阻害剤はこの結果には含まれていなかった。これは、この MOA にとって重要ないくつかの遺伝子 (BMX や BLK など) が、前述したように、カバレッジが低いためにフィルタリングをうけたことによるものである。

また、これまでの報告からは、WA の抗がん作用は BTK 阻害能にとどまらず、ヒートショック反応や mTOR パスウェイ、NF-κB パスウェイ、プロテアソーム、タンパク質合成、酸化ストレス反応の阻害能 (Dom et al, 2020) の他、複数の EGF 受容体 (epidermal growth factor receptor; EGFR) に対する阻害作用があることがわかっている (Malik et al., 2021)。そして、今挙げたすべての MOA がプラットフォームで出力されたプロットからも確認できた。

元の論文では、腫瘍細胞における WA の BTK 活性に対する阻害能のみに焦点が当てられていたが、プラットフォームで作成されたプロットでは、WA が有する複数の MOA を一つのプロットから明らかにしているところは、着目すべき点である。このことが、元の論文で指摘されていたような WA がイブルチニブよりも殺 GC 耐性細胞効果が強いことの一因となっている可能性がある。

次に、元の論文の内容から発展し、DMSO 処理 GC 耐性細胞と DMSO 処理 GC 感受性細胞での遺伝子発現プロファイルの比較を行った。ここでは、Drug cMAP L1000 データベースを使用し、耐性—感受性細胞間で生じる発現変動と逆の発現変動をもたらす薬剤を探索した。これにより、腫瘍細胞における GC 耐性をキャンセルし、GC 耐性を和らげることができる薬剤の発見につながる可能性がある。このようにして得られた薬剤の候補として、strophanthidin があった (図 9)。Strophanthidin はヒトの癌における MAPK シグナリングパスウェイの阻害剤であり (Reddy et al., 2020)、MAPK パスウェイの阻害は白血病において GC 耐性の逆転をもたらすことが知られている (Jones et al. 2015)。

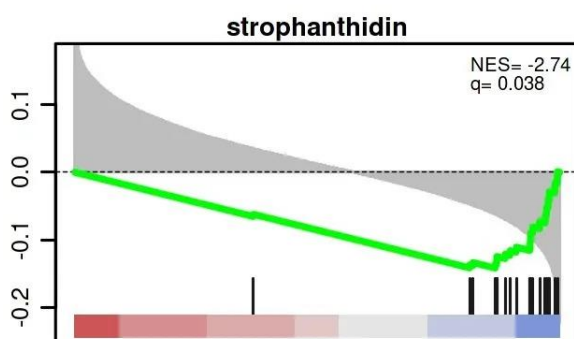


図 9 strophanthidin によってもたらされる発現変動と DMSO 処理 GC 耐性細胞—感受性細胞間の発現変動を比較した GSEA プロット。正規化されたエンリッチメントスコア (Normalized enrichment score; NES (緑のライン)) により、有意な負の相関が示されている ($q < 0.05$)。

4. バイオマーカー分析

最後に、プラットフォーム中の「find biomarker」ツールを利用し、4つのグループを特徴づけるバイオマーカーの探索を行った。決定木の候補がいくつか得られたが、それらの中で共通する傾向として、DNAJA4 (HSP40) がWA処理GC感受性処理群において、他の群に比べて特徴的な発現をすることが挙げられる (図 10A)。DNAJA4 は、WA処理GC感受性細胞では顕著な発現上昇が認められるものの、WA処理GC耐性細胞では、発現上昇は認められなかった (図 10B)。DNAJA4 は分子シャペロン的一种であり、特にDNA-J様タンパク質は、HSP90/GRヘテロ複合体と相互作用し、複合体形成を促進することが知られている (Dittmar et al., 1998)。それゆえ、WAへの暴露によって生じるDNAJA4の発現上昇が、GC耐性細胞では抑制されているという点は、非常に興味深い。

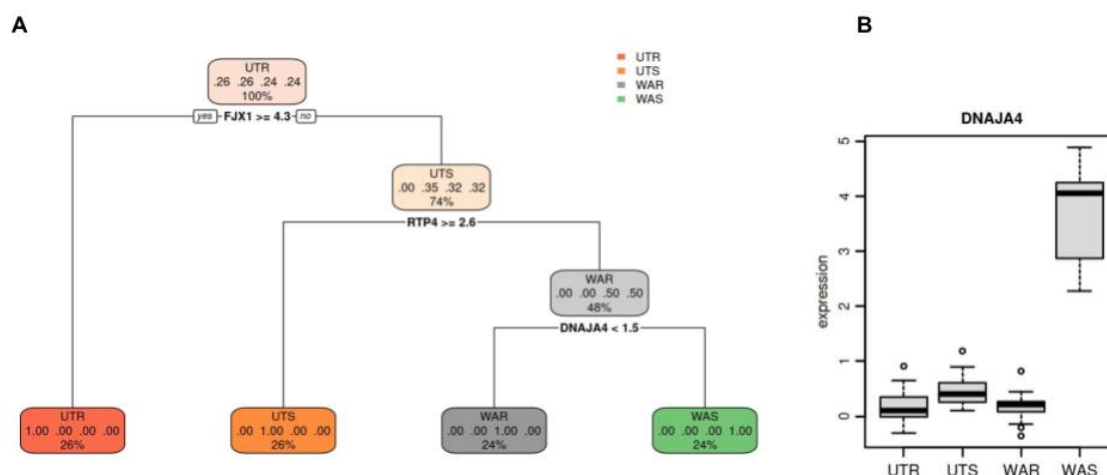


図 10 (A)ある特徴的な遺伝子の発現量に基づいてサンプルを分類する決定木のうちのの一つ。(B)各サンプルにおける DNAJA4 の発現量。UTR:DMSO 処理 GC 耐性細胞 UTS:DMSO 処理 GC 感受性細胞
 WAR:WA 処理 GC 耐性細胞 WAS:WA 処理 GC 感受性細胞

結論

本研究では Logie et al.で使用されたトランスクリプトームデータの再解析を Omics Playground にて行った。プラットフォームに搭載されているフィルターによって、発現量が十分でない遺伝子については、取り除いて解析が行われたものの、元の論文の結果を再現することができた。さらに GSEA では、WA がもつ抗腫瘍特性を BTK の阻害という点以外からも考察することができた。先行研究では WA は HSP90 と結合し、グルココルチコイド受容体を制御することなど、さまざまなパスウェイを阻害し、がんを抑制しているということが知られており、この再解析で得られた結果を裏付けている。また、GC 耐性細胞の発現プロファイルからは、抗腫瘍薬の一種である strophanthidin に対する感受性が高まっていることが推測された。最後に行ったバイオマーカー分析では、WA 処理 GC 感受性細胞のみで DNAJA4 の発現上昇がみられることが分かった。GC 耐性細胞で、DNAJA4 の上昇が見られなかったことは、DNAJA4 がグルココルチコイド受容体の形成において果たす役割をかんがみるに、GC 耐性の獲得と直接関連しているのではないかと考えられる。

参考文献

1. Logie, E., Chirumamilla, C. S., Perez-Novo, C., Shaw, P., Declerck, K., Palagani, A., ... & Berghe, W. V. (2021). Covalent cysteine targeting of bruton's tyrosine kinase (BTK) family by Withaferin-A reduces survival of glucocorticoid-resistant multiple myeloma mm1 cells. *Cancers*, 13(7), 1618.
2. Khan, S., Rammeloo, A. W., & Heikkila, J. J. (2012). Withaferin A induces proteasome inhibition, endoplasmic reticulum stress, the heat shock response and acquisition of thermotolerance. *PLoS One*, 7(11), e50547.
3. Dubey, S., Yoon, H., Cohen, M. S., Nagarkatti, P., Nagarkatti, M., & Karan, D. (2018). Withaferin A associated differential regulation of inflammatory cytokines. *Frontiers in immunology*, 9, 195.
4. Akhmedov, M., Martinelli, A., Geiger, R., & Kwee, I. (2020). Omics Playground: a comprehensive self-service platform for visualization, analytics and exploration of Big Omics Data. *NAR genomics and bioinformatics*, 2(1), lqz019.
5. Kirschke, E., Goswami, D., Southworth, D., Griffin, P. R., & Agard, D. A. (2014). Glucocorticoid receptor function regulated by coordinated action of the Hsp90 and Hsp70 chaperone cycles. *Cell*, 157(7), 1685-1697.
6. Dom, M., Berghe, W. V., & Van Ostade, X. (2020). Broad-spectrum antitumor properties of Withaferin A: A proteomic perspective. *RSC medicinal chemistry*, 11(1), 30-50.
7. Malik, V., Kumar, V., Kaul, S. C., Wadhwa, R., & Sundar, D. (2021). Computational insights into the potential of Withaferin-A, withanone and caffeic acid phenethyl ester for treatment of aberrant-

EGFR driven lung cancers. *Biomolecules*, 11(2), 160.

8. Reddy, D., Ghosh, P., & Kumavath, R. (2020). Strophanthidin attenuates MAPK, PI3K/AKT/mTOR, and Wnt/ β -catenin signaling pathways in human cancers. *Frontiers in oncology*, 9, 1469.

9. Jones, C. L., Gearheart, C. M., Fosmire, S., Delgado-Martin, C., Evensen, N. A., Bride, K., ... & Carroll, W. L. (2015). MAPK signaling cascades mediate distinct glucocorticoid resistance mechanisms in pediatric leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 126(19), 2202-2212.

10. Dittmar, K. D., Banach, M., Galigniana, M. D., & Pratt, W. B. (1998). The role of DnaJ-like proteins in glucocorticoid receptor· hsp90 heterocomplex assembly by the reconstituted hsp90· p60· hsp70 foldosome complex. *Journal of Biological Chemistry*, 273(13), 7358-7366.

【お問い合わせ先】

フィルジェン株式会社 バイオインフォマティクス部

〒459 8011 愛知県名古屋市緑区定納山一丁目 1409 番地

TEL: 052 624 4388 (9 : 00~17 : 00) **FAX:** 052 624 4389 **Email:** biosupport@filgen.jp