

平成 30 年 4 月 19 日現在

機関番号：13301
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2015～2017
 課題番号：15K19605
 研究課題名(和文) MLL遺伝子再構成を有する難治性乳児白血病の病態解析から新規治療法開発を試みる

研究課題名(英文) Establishment the novel treatment strategy from the analysis of MLL gene rearranged refractory infantile leukemia

研究代表者
 伊川 泰広 (Ikawa, Yasuhiro)
 金沢大学・附属病院・特任助教

研究者番号：10722043
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：難治性乳児白血病に代表的なMLL遺伝子再構成を有する融合遺伝子を、CD10陽性の白血病細胞株に導入した。当初、融合遺伝子を導入することで、乳児白血病に特徴的とされるCD10の発現が陰性化することが推測された。しかし、導入後もCD10は陰性化されないことが認められ他の要因の関連性が示唆された。また、無治療自然寛解した先天性急性骨髄性白血病症例を経験した。細胞解析を行うと、発症時点でRNAやタンパクの発現量が極端に低下していることが分かった。このように発現が抑制されていることは過去に示されたことではなく新規発見となった。これらのメカニズムの解明が新規治療法開発の足がかりになると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We introduced MLL rearranged fusion gene into CD10 positive leukemic cell line. At first, we thought CD10 expression would shut down after transduction as typical infantile MLL-rearranged lymphocytic leukemia. However, CD10 did not turn into negative. The other factors would be related to this CD10 negativity phenomenon. Next, we experienced congenital acute myeloid leukemia case who got into spontaneous remission without any therapy. We checked DNA, RNA and protein expression level and realized that RNA and protein expression levels were extremely low compared to DNA. This suppression phenomenon has not been reported so far. Continuous examination of this mechanism would shed light on the establishment the novel treatment strategy of refractory infantile leukemia.

研究分野：小児悪性腫瘍

キーワード：乳児白血病 MLL遺伝子再構成 新規治療法開発 無治療自然寛解

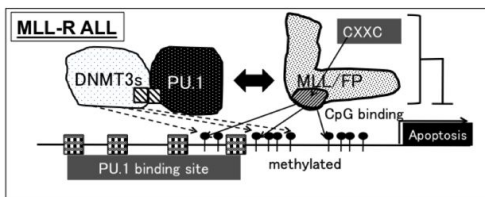
1. 研究開始当初の背景

乳児白血病は非常に予後が悪く死亡率や再発率が非常に高い。そのため、多剤併用化学療法や造血幹細胞移植を必要とし、たとえ生存したとしても強力な化学療法や移植片対宿主病による臓器障害で重篤な晩期障害をきたす。そのため、分子標的療法をまじえた、可能な限り化学療法薬の使用を減じた治療戦略が必要とされる。

乳児期に発症する予後不良な白血病の代表に、MLL 遺伝子再構成を有する急性リンパ性白血病 (MLL-R ALL) がある。現在まで、その発症メカニズムは分かっていないが、MLL-R ALL はアポトーシスに関連する遺伝子がメチル化されているという報告がある。そのため、エピジェネティクスに関連した遺伝子発現制御機構が働いていることが推察される。

アポトーシスに関連する遺伝子の発現調節に重要とされる転写因子の一つに PU.1 タンパクがあげられる。PU.1 タンパクは白血病の発症にも大きく寄与していることが知られている。PU.1 タンパクは DNA のメチル化に必須とされる DNA メチルトランスフェラーゼ 3s (Dnmt3s) と複合体を形成し、プロモーター領域の CpG 領域にメチル化を誘導することで遺伝子発現調節を行っている。また、興味深いことに MLL 遺伝子にメチル化されていない CpG 領域に結合できる CXXC domain を持ち合わせている。以上より、MLL-R ALL の発症機構として、「アポトーシス関連遺伝子のプロモーター領域に MLL キメラタンパクと PU.1-Dnmt3s 複合体が共に結合することでメチル化され、アポトーシス関連タンパクの発現が抑制されることで白血病の発症に寄与する」ことが推測される。

図1: MLLキメラ蛋白の機能的全貌

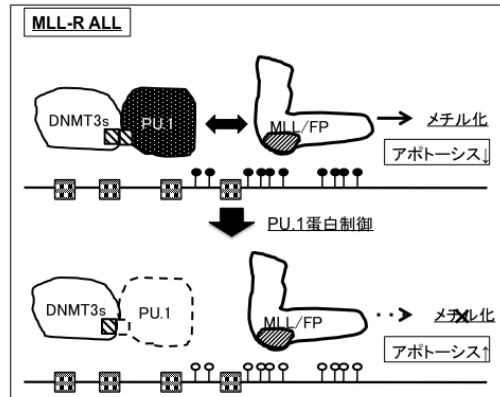


MLLキメラ蛋白がPU.1-Dnmt3s複合蛋白との相互作用により、アポトーシス関連遺伝子のプロモーター領域をメチル化し、細胞死への誘導を抑制する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、MLL キメラタンパクと PU.1 タンパクによるエピジェネティックな発現制御が MLL-R ALL の分子発生機構に関与していることを明らかにし、さらに、PU.1 タンパク発現制御により病状を改善できる可能性について検討することである。

図2: PU.1蛋白の発現を抑制する事で、アポトーシス関連蛋白を誘導し細胞死に導く。



3. 研究の方法

我々は MLL-R ALL に特徴的とされる CD10 タンパク発現抑制のメカニズムが、CD10 遺伝子プロモーター領域におけるメチル化であることを過去に解明し報告している (Ikawa et al. 2010)。そこで、CD10+/CD19+ の急性 B リンパ芽球性白血病の細胞株 (HAL-01) にレトロウイルスベクターを用いて MLL 融合遺伝子を遺伝子導入し、CD10 陰性化を確認することで、すなわち、MLL キメラタンパクと PU.1-Dnmt3s 複合体の相互作用による DNA メチル化の指標に CD10 遺伝子を標的候補遺伝子として用いることができると考えられた。

(1) MLL キメラ遺伝子ウイルスの作成と遺伝子導入: 保護者から遺伝子研究に同意を得た患児の MLL-R ALL 細胞より total RNA を抽出し、MLL キメラ遺伝子 cDNA を PCR 法で増幅する。増幅された cDNA をレトロウイルスベクター-MSCV-5' Neo に挿入する。ネオマイシン耐性遺伝子を用いることで、遺伝子導入された細胞の stable cell line を獲得可能となる。また、GFP 遺伝子を組み込むことで、容易に遺伝子導入がなされたことを確認可能とした。作成されたウイルスベクターを PA317 細胞株に Lipofectamin2000 を用いて transfection することでパッケージングセルラインを獲得する。遺伝子導入はレトロネクチンで coating した plate を用い遠心装置下で行うことで、浮遊細胞である白血病細胞への導入効率を上昇させる。G418 を用いてセレクトションし、遺伝子導入の有無を GFP 発現で確認する。

(2) CD10 遺伝子発現と CD10 遺伝子プロモーター領域のメチル化解析: 遺伝子導入された HAL-01 細胞の CD10 タンパク発現はフローサイトメトリー法を用いる。また、Bisulfite Sequence 法を用いてメチル化解析を行う。検出感度に優れた Methyl Easy Xceed kit (Human Genetics Signature) を用いる。

(3) PU.1 遺伝子を標的とした治療実験: MLL 遺伝子を導入した細胞株の PU.1 タンパク発現を、siRNA を用いて発現を抑制させ遺伝子導入前後での細胞増殖速度などを解析する。

4. 研究成果

(1) 遺伝子発現研究に同意を得た患者より取得した MLL-AF9 遺伝子をネオマイシン耐性遺伝子と GFP 遺伝子と共にレトロウイルスベクターに挿入した。挿入したウイルスベクターを PA317 に transfection したのち、適切な濃度の G418 でセレクションをかけ2週間程度で、目的としたパッケージングセルラインを獲得した。予め、レトロネクチンで coating した plate にウイルス上清のをせ、遠心装置下に 3,000G で2時間かけてウイルス粒子を plate の底に接着させた。次に、HAL-01 を遠心させてウイルス粒子と接着させ transduction させた。48時間の培養のすえ、約30%の遺伝子導入効率で遺伝子導入されたことが確認された (GFP 陽性細胞を用いて確認)。

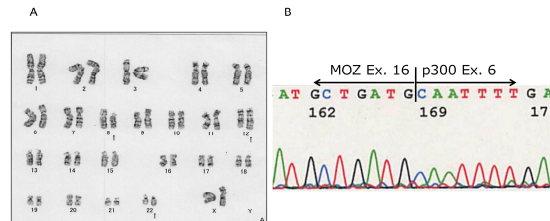
(2) GFP 陽性細胞の CD10 発現をフローサイトメトリー法で解析した。すると、GFP 陽性細胞は全て、CD10 タンパクを発現していた。その後、長期にわたり (1ヶ月以上) CD10 タンパクの発現を確認したが、GFP 陽性細胞は常に CD10 タンパクを発現していることが分かった。CD10 タンパクが陰性化しなかった理由は現時点では究明できていない。おそらく、PU.1 タンパクの発現量が十分ではなかった可能性が示唆され、今後の検討課題となった。

(3) また、本研究中に、成人症例では予後が非常に悪いとされる MLL 遺伝子と遺伝子学的に類似した MOZ 遺伝子の再構成を有する乳児急性骨髄性白血病症例 (MOZ-R AML) を経験した。興味深いことに、本症例は無治療経過観察のみで自然寛解した。本症例において自然寛解した詳細なメカニズムを解明することは、予後不良な乳児白血病の新規治療法開発の足がかりになると考えた。

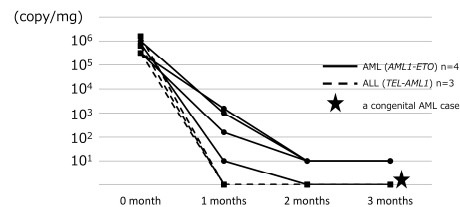
本症例を簡潔に提示する。出生時より全身の皮膚に無数の腫瘍を認めた。血液検査上、白血球数の増加 (芽球が約半数) と LDH 値の著増を認めた。骨髄検査からも約70%に AML (FAB: M5a) と考えられる芽球を認めたため先天性 AML と診断した。皮膚生検からも骨髄から見られた細胞と同様の細胞を認め、皮膚浸潤と考えた。

細胞解析では、G 分染法で t(8;22) の転座が20細胞中17細胞 (85%) に確認された。過去に8番染色体の MOZ 遺伝子と2番染色体の p300 遺伝子が転座を形成し AML を発症した報告が成人例だけが3症例あったため解析を継続した。MOZ 遺伝子による転座の有無を FISH 法で行ったところ、999細胞中295細胞 (30%) で MOZ 遺伝子の split が確認された。次に、MOZ タンパクと p300 タンパクの抗体を用いて Western blotting 法 (WB 法) でそれぞれのタンパクの有無、および複合タンパクの有無を確認した。すると、野生型のそれぞれのタンパクと、

それよりも大きなサイズに band が確認された。すなわち、MOZ-p300 融合タンパクの存在を示唆させた。そこで、MOZ 遺伝子と p300 遺伝子に primer を作成し PCR 法を用いて breakpoint の検索を行い、過去に報告のない新規の MOZ-p300 融合遺伝子を見出し報告した (Ikawa et al. 2018)。



患者の全身状態が良かったこと、過去に MOZ 遺伝子と p300 遺伝子と相同性を有する CBP 遺伝子との転座を有する先天性 AML 症例の半数に自然寛解したとの報告を認めたことから経過観察とした。すると徐々に皮膚腫瘍が縮小し、血液検査所見も改善した。生後1ヶ月時点で行なった骨髄検査では、初発時に認めた白血病細胞は確認できず、PCR 法を用いても同様の融合遺伝子は同定されなかった。生後3ヶ月時に採取した骨髄細胞から total RNA を抽出し droplet digital PCR 法 (ddPCR 法) を用いて minimal residual disease (MRD) の有無を確認したが、droplet を認めなかった。予後良好とされる AML1-ETO 融合遺伝子を有する AML 症例や TEL-AML1 融合遺伝子を有する ALL 症例の MRD レベルと比較しても、白血病細胞の残存程度はそれらに匹敵していた。現在、1歳9ヶ月時点で再発が確認され、転院先で治療中である。



初発時の細胞から total RNA を抽出し ddPCR 法を用いて RNA 発現を確認したところ、12,658 droplets 中 198 droplets (1.65%) しか発現していないことが分かった。また、先に行なった WB 法によるタンパク解析結果を再確認したところ、融合タンパクの band が非

常に薄いことが分かった。すなわち、DNA レベルでは約半数で遺伝子の転座が確認されているが、RNA やタンパクレベルではその発現量がわずか1%程度まで低下していることが分かった。その発現抑制が、自然寛解を引き起こしたと考えられた。今後、本検討を続け、乳児白血病の新規治療法開発につなげて行きたい。

表：融合遺伝子発現の違い

sample	陽性細胞数	割合
染色体 (G分染)	17/20細胞	85%
gDNA (FISH)	295/999細胞	30%
mRNA (ddPCR)	198/12658 droplets	1.65%
タンパク (WB)	-	薄い

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yasuhiro Ikawa, Ryosei Nishimura, Hideaki Maeba, Toshihiro Fujiki, Rie Kuroda, Kazuhiro Noguchi, Masaki Fukuda, Shintaro Mase, Raita Araki, Yusuke Mitani, Tomohiko Sato, Kiminori Terui, Etsuro Ito, Issay Kitabayashi, and Akihiro Yachie. Deep spontaneous molecular remission in a patient with congenital acute myeloid leukemia expressing a novel MOZ-p300 fusion transcript. *Leukemia & Lymphoma* 2018 Feb 12:1-3. Doi: 10.1080/10428194.2018.1434885. 査読あり

〔学会発表〕(計 1 件)

伊川泰広 他 Spontaneous remission of congenital acute myeloid leukemia with novel MOZ-p300 fusion transcript. 第58回日本小児血液・がん学会学術集会、2016年12月15日～17日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊川 泰広 (IKAWA YASUHIRO)
金沢大学・大学病院・特任助教
研究者番号：10722043

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()