

令和元年6月12日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08976

研究課題名(和文)急性骨髄性白血病におけるRUNX3の意義

研究課題名(英文)Significance of evaluating RUNX3 expression in acute myeloid leukemia

研究代表者

松下 弘道(Matsushita, Hiromichi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医長

研究者番号：50286481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでに急性骨髄性白血病(AML)の予後不良因子FLT3-ITDが転写因子RUNX3を介してAra-C耐性を誘導することを明らかにしてきた。本研究では、AMLにおけるバイオマーカーとしてのRUNX3発現の意義の検証を目的とした。AML71症例で検討したところ、全生存率においてRUNX3低発現群に予後良好の傾向が認められたが、正常核型40例では差はなかった。またRUNX3発現レベルはFLT3-ITDやepigenetics関連遺伝子TET2、DNMT3A、IDH2、ASXL1の変異の有無で変化することはなかった。引き続き詳細な検討を行い、RUNX3発現の意義を検証していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性骨髄性白血病(AML)の悪性度は症例によって様々であり、染色体・遺伝子異常などの指標(=バイオマーカー)を参考にしながら治療方法を決定することが多い。今回の研究では、私達が抗がん剤耐性に関係すると報告してきたRUNX3遺伝子についてバイオマーカーとしての可能性を検討した。検討したAML71症例全体ではRUNX3遺伝子の量の低い方が生存率が高い傾向であったが、まだ十分な結果は得られていない。今後さらなる解析を続けて、RUNX3遺伝子の量を検索することの有用性を明らかにしていきたい。

研究成果の概要(英文)：We previously elucidated that FLT3-ITD, a poor prognostic factor in acute myeloid leukemia (AML), induces Ara-C resistance through the upregulation of RUNX3. The current study aimed to investigate whether the RUNX3 expression is an excellent biomarker that predicts the prognosis of AML. In 71 AML cases with various genetic mutations, the cases with lower RUNX3 expression tended to have better overall survival (OS) than higher expression without statistical significances. Forty AML cases with normal karyotype also showed no difference in OS, when the cases with higher and lower RUNX3 expression were compared. Additionally, the mutations in epigenetic associated-genes such as TET2, DNMT3A, IDH2 and ASXL1 as well as the FLT3-ITD mutation did not affect the RUNX3 expression. Although there have been no apparent evidences that showed the RUNX3 expression is a useful biomarker for AML thus far, we will continue to examine in detail the significance of RUNX3 expression in AML.

研究分野：臨床検査学

キーワード：RUNX3 急性骨髄性白血病 遺伝子変異 予後不良因子

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

近年の網羅的な解析から、急性骨髄性白血病（AML）にはエピジェネティクスやクロマチンリモデリングに関係した遺伝子変異を含め数多くの遺伝子異常が報告され、予後因子や治療標的としての検討がされてきた。しかし、AML の治療は現状では依然として抗がん剤を用いた化学療法が中心である。これまでの研究から、我々は予後不良因子 *FLT3*-ITD が白血病細胞における Ara-C 耐性に関与すること（引用文献①）、その際に下流に位置する転写因子 *RUNX3* が Ara-C 耐性を誘導することを明らかにしてきた（引用文献②）。

RUNX3 は、胃がんや大腸がんを用いた解析で発現の欠失や変異、promoter のメチル化による不活性化が認められること、*RUNX3* ノックアウトマウスが骨髄増殖性腫瘍を発症することから、がん抑制遺伝子であると考えられてきた。一方で、卵巣がんや皮膚がん、頭頸部がんなどで *RUNX3* が過剰発現しているという報告も散見され、*RUNX3* と腫瘍原性の関係は必ずしも明らかにはなっていない。

2. 研究の目的

AML 検体を用いた従来の報告では、*FLT3*-ITD 陽性例で *RUNX3* の発現増加が認められる場合に予後不良であり、またキメラ遺伝子 *RUNX1-RUNX1T1* や *CBFB-MYH11* を有する予後良好例でその発現は低下する。これらの報告は、これまでの我々の研究結果と合わせて、予後因子とされる様々な遺伝子異常が *RUNX3* 遺伝子発現のコントロールを介して各症例における治療予後を左右する可能性を示唆していると考えられる。そこで本研究では、AML における *RUNX3* の意義について他の遺伝子変異や予後との関係を検証し、予後予測のためのバイオマーカーとしての可能性を探ることとする。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍分画の抽出

磁気細胞分離システムを用いて、AML 骨髄検体（83 例）から CD33 または CD34 陽性分画を分離した。分離効率は、分離後の検体における CD33 または CD34 の陽性率で確認した。

(2) RNA 発現解析

分離した細胞から total RNA を抽出し、cDNA を合成後、*RUNX3* の定量 PCR を施行した。同時に測定した GAPDH との比を用いて、発現レベルの比較を行った。

(3) 次世代シーケンサーによる DNA 変異解析

分離した細胞から DNA を抽出し、Covaris M220 を用いて断片化した。その後 76 遺伝子のエクソーム領域（1216 region、約 290kbp）に対してデザインした NimbleGen SeqCap EZ Choice Library Kit（Roche）によるキャプチャーシステムを用いてライブラリー調製し、MiSeq（Illumina）により 150bp ペアエンドシーケンスを行った。

(4) 統計学的解析

EZR を用いて、2 群間比較については t-検定あるいは Mann-Whitney U 検定を、生存については Kaplan-Meier 法を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞分離について

CD33 または CD34 陽性分画分離後の陽性率の中央値は 99.6%であった。90%以上であった 78 例を次世代シーケンサー解析に使用した

(2) 次世代シーケンサーによる DNA 変異解析の基礎データ

78 例における症例あたりの平均リード数は平均 174 万（117 万～273 万）、mapping 領域は平均 99.5%（98.9%～99.7%）、depth は平均 430（303～657）、target coverage は depth 100 以上で平均 98.2%（96.7%～99.1%）、depth 50 以上で平均 99.4%（98.9%～99.7%）であった。全 76 遺伝子において depth 50 以上の target coverage 80%以上であった。

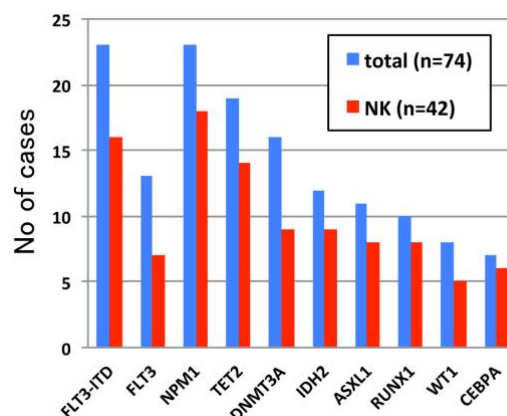


図 1 AML に認められた遺伝子変異

(3) AMLにおける遺伝子変異

高頻度に同定された遺伝子変異は、*FLT3*-ITDのほか、*FLT3*、*NPM1*、*TET2*、*DNMT3A*、*IDH2*、*ASXL1*、*RUNX1*、*WT1*、*CEBPA*などの遺伝子変異であった(図1)。これまでの報告とほぼ同様の傾向であった。

(4) *RUNX3*の発現解析

*RUNX3*の発現解析は71例で施行した、症例の内訳は、正常核型40例、t(8;21)4例、inv(16)2例、複雑核型5例であった。

(5) *RUNX3*の発現と予後

各症例を*RUNX3*の発現レベルにより2つに分けてOverall survivalを検討した。AML全例について検討したところ、統計学的には有意ではなかったが(p=0.136)、低発現群は予後良好の傾向にあった。しかしt(8;21)やinv(16)などを除いた正常核型42例のみで解析を行った場合には、高発現群と低発現群とも5年生存率は約40%であり、予後に差異は認められなかった(p=0.774)。

(6) *RUNX3*の発現と予後

FLT3-ITD異常と*RUNX3*の発現レベルの関係は明らかでなかった。このほか、*RUNX3*の発現レベルと遺伝子発現に影響すると考えられるepigenetics関連遺伝子である*TET2*、*DNMT3A*、*IDH2*、*ASXL1*の変異との関係についても検討したが、*RUNX3*の発現レベルの関係は明らかでなかった。

(7) 総括

全AML76症例を用いた解析には予後良好で*RUNX3*低発現と報告されているt(8;21)やinv(16)が含まれており、これらのCBF白血病の存在が予後に反映された可能性がある。正常核型症例のみを用いて解析した場合には生存曲線はほぼ一致していた。また、epigenetics関連遺伝子の変異と*RUNX3*の発現レベルについては、これまでの検索では明らかではなかった。これまでの検討の範囲では、AMLにおける予後推定におけるバイオマーカーとしては十分とは言えない。今後、症例数を増やすとともに、条件の絞り込みを行うなどして特定のAML集団におけるバイオマーカーとしての可能性について検討を続けていく。

<引用文献>

- ① Jin G, [Matsushita H](#), et al. FLT3-ITD induces ara-C resistance in myeloid leukemic cells through the repression of the ENT1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390(3): 1001-6.
- ② Damdinsuren A, [Matsushita H](#), [Ando K](#), et al. FLT3-ITD drives Ara-C resistance in leukemic cells via the induction of RUNX3. *Leuk Res* 2015; 39(12): 1405-13.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計17件)

- ① Kawai H, [Matsushita H](#), [Ando K](#), 他4名(2番目). Overcoming tyrosine kinase inhibitor resistance in transformed cell harboring *SEPT9-ABL1* chimeric fusion protein. *Neoplasia*, 査読有, *in press*.
- ② Ikeda C, [Matsushita H](#), 他4名(6番目). Bone marrow involvement by monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma. *Br J Haematol*, 査読有, *in press*.
- ③ Kawai H, [Matsushita H](#), [Ando K](#), 他14名(2番目). A case of composite lymphoma with extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type and diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Exp Hematop*, 査読有, 2019; 59(1): 34-39. doi: 10.3960/jslrt.18038.
- ④ Ogasawara A, [Matsushita H](#), [Ando K](#), 他4名(2番目). A simple screening method for the diagnosis of chronic myeloid leukemia using the parameters of a complete blood count and differentials. *Clin Chim Acta*, 査読有, 2019; 489: 249-53. doi: 10.1016/j.cca.2018.08.038.
- ⑤ [松下弘道](#)、池田千秋. 第65回日本臨床検査医学会学術集会 シンポジウム7: フローサイトメトリー検査実践講座 初級・中級者向け(5) ケーススタディ(リンパ系腫瘍). *臨床病理*, 査読無, 2019; 67: 505-12.
- ⑥ Tabe Y, [Matsushita H](#), 他17名(9番目). Eprobe mediated RT-qPCR for the detection of leukemia-associated fusion genes. *PLoS One* 2018; 13(10): e0202429. doi: 10.1371/journal.pone.0202429.
- ⑦ Kawai H, [Matsushita H](#), [Ando K](#), 他3名(2番目). Dysplastic features seen in a patient with acute myeloid leukemia harboring the *KMT2A-TET1* fusion gene. *Int J Hematol*, 査読有, 2018; 108(1): 1-2. doi: 10.1007/s12185-018-2469-4.
- ⑧ Yoshimura S, [Matsushita H](#), 他2名(4番目). Marked erythroblastosis in

- myelodysplastic syndrome induced by gastric hemorrhaging. *Int J Hematol*, 査読有, 2018; 107(4): 387-9. doi: 10.1007/s12185-017-2374-2.
- ⑨ Aruga Y, Matsushita H, 他 3 名 (5 番目). Pseudo-Chédiak-Higashi granules and Auer rods in mixed phenotype acute leukaemia, T/myeloid, not otherwise specified. *Br J Haematol* 2018; 180(2): 175. doi: 10.1111/bjh.14924.
- ⑩ Kito M, Matsushita H, 他 3 名 (5 番目). The infiltration of classical Hodgkin lymphoma cells into pleural effusion. *Int J Hematol*, 査読有, 2018; 107(1): 1-2. doi: 10.1007/s12185-017-2329-7.
- ⑪ 松下弘道, 有賀祐, 池田千秋. 第 19 回 日本検査血液学会学術集会 テクニカルセミナー2 フローサイトメトリー検査を用いた造血器腫瘍診断の進歩 2. マルチカラー解析の基礎. 日本検査血液学会雑誌, 査読無, 2018; 19(3): 422-29.
- ⑫ Matsuzawa H, Matsushita H, Ando K, 他 2 名 (2 番目). Comparison of the gene expression profiles of human hematopoietic stem cells between humans and a humanized xenograft model. *Tokai J Exp Clin Med*, 査読有, 2017; 42(1): 41-51.
- ⑬ Tabe Y, Matsushita H, 他 19 名 (14 番目). Survival of acute monocytic leukemia cells is driven by fatty acid oxidation-mediated activation of AMPK in bone marrow adipocytes. *Cancer Res*, 査読有, 2017; 77(6): 1453-1464. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1645.
- ⑭ Hara R, Matsushita H, Ando K, 他 11 名 (6 番目). NKG2D gene polymorphisms are associated with disease control of chronic myeloid leukemia by dasatinib. *Int J Hematol*, 査読有, 2017; 106(5): 666-674. doi: 10.1007/s12185-017-2294-1.
- ⑮ 日下拓, 松下弘道, 他 8 名 (2 番目). CD34/HLA-DR 陰性の急性骨髄性白血病の解析 当院における 38 例の検討. 日本検査血液学会雑誌, 査読有, 2017; 18(1): 45-53.
- ⑯ Matsushita H, Maruyama D. Bone marrow involvement of primary cutaneous γ/δ T-cell lymphoma. *Blood*, 査読有, 2016; 128(18): 2274. doi: 10.1182/blood-2016-07-730002.
- ⑰ Ogiya D, Matsushita H, Murayama H, Ando K. Chédiak-Higashi-like granules and waxy Auer bodies in a case of acute promyelocytic leukemia. *Int J Hematol*, 査読有, 2016; 104(6): 637-8. doi: 10.1007/s12185-016-2078-z.

[学会発表] (計 20 件)

- ① 吉村咲子, 松下弘道, 他 9 名 (11 番目). 末梢血中にリンパ形質細胞様細胞が認められた多発性骨髄腫の一例. 第 29 回日本サイトメトリー学会学術集会. 2019 年 5 月.
- ② 有賀祐, 松下弘道, 他 6 名 (8 番目). 乳び検体における MCHC への影響と Hgb 補正の検討. 第 14 回東京都医学検査学会. 2018 年 12 月.
- ③ 松下弘道. フローサイトメトリー検査実践講座 初級・中級者向け 「ケーススタディ (リンパ系腫瘍)」。第 65 回日本臨床検査医学会学術集会. 2018 年 11 月.
- ④ 若井進, 松下弘道, 他 7 名 (9 番目). リンパ腫における病理組織標本からの *MYC* および *IGH-BCL2* 遺伝子 FISH 検査の判定基準に関する一考察. 第 65 回日本臨床検査医学会学術集会. 2018 年 11 月.
- ⑤ 松下弘道. テクニカルセミナー2 マルチカラー解析の基礎. 第 19 回日本検査血液学会学術集会. 2018 年 7 月.
- ⑥ 松下弘道. ランチョンセミナー9 骨髄検査の結果報告 -1 つ上の報告を目指して-. 第 19 回日本検査血液学会学術集会. 2018 年 7 月.
- ⑦ 有賀祐, 松下弘道, 他 6 名 (8 番目). 慢性リンパ性白血病における微笑残存病変検出法の検討. 第 19 回日本検査血液学会学術集会. 2018 年 7 月.
- ⑧ 有賀祐, 松下弘道, 他 10 名 (12 番目). フローサイトメトリーが疾患推定に有用であった ALK 陽性未分化大細胞型リンパ腫の一例. 第 28 回日本サイトメトリー学会学術集会. 2018 年 5 月.
- ⑨ 川井英嗣, 松下弘道, 安藤潔. チロシンキナーゼ阻害薬耐性である SEPT9-ABL1 に対する CRM1 阻害薬の効果. 第 22 回造血器腫瘍研究会. 2018 年 1 月.
- ⑩ Kawai H, Matsushita H, Ando K, 他 3 名 (2 番目). Overcoming tyrosine kinase inhibitor resistance to SEPT9-ABL1 chimeric fusion protein using CRM1 inhibitors. 59th ASH Annual Meeting & Exposition. 2017 年 12 月.
- ⑪ Matsushita H, Ando K, 他 8 名 (1 番目). Targeted resequencing of acute myeloid leukemia using next generation sequencer. 第 79 回日本血液学会学術集会. 2017 年 10 月.
- ⑫ 鬼頭桃子, 松下弘道, 他 7 名 (9 番目). 治療経過中に胸水への浸潤を認めた古典的ホジキンリンパ腫の一例. 第 18 回日本検査血液学会学術集会. 2017 年 7 月.
- ⑬ 吉村咲子, 松下弘道, 他 9 名 (11 番目). 治療経過中に胸水への浸潤を認めた古典的ホジキンリンパ腫の一例. 第 18 回日本検査血液学会学術集会. 2017 年 7 月.
- ⑭ 有賀祐, 松下弘道, 他 6 名 (8 番目). 著明なアズール顆粒の形成を認めた混合表現型急性白血病 MPAL, T/myeloid の一例. 第 18 回日本検査血液学会学術集会. 2017 年 7 月.
- ⑮ 松下弘道. 造血器腫瘍における遺伝子異常の意義. 第 25 回染色体遺伝子検査基礎技術セミナー. 2017 年 7 月.
- ⑯ 松下弘道. 急性骨髄性白血病と遺伝子異常. 第 32 回慶應血液検査研究会. 2017 年 2 月.

- ⑰ Kawai H, Matsushita H, Ando K, 他 4 名 (2 番目). Mechanism of tyrosine kinase inhibitors-resistance by SEPT9-ABL1. 第 78 回日本血液学会学術集会. 2016 年 10 月.
- ⑱ Ogasawara A, Ando K, Matsushita H, 他 4 名 (6 番目). A simple method based on peripheral blood parameters for early diagnosis of chronic myelogenous leukemia, The 32nd World Congress of Biomedical Laboratory Science (IFBLS2016). 2016 年 9 月.
- ⑲ 小笠原篤、安藤潔、松下弘道、他 4 名 (6 番目). 慢性骨髄性白血病 CML の早期診断を目的としたカットオフ値の設定. 第 63 回日本臨床検査医学会学術集会/第 65 回日本医学検査学会. 2016 年 9 月.
- ⑳ アナラ ダムディンスレン、松下弘道、他 2 名 (2 番目). Generation of the leukemic cell line models with common KIT mutations. 第 63 回日本臨床検査医学会学術集会/第 65 回日本医学検査学会. 2016 年 9 月.

[図書] (計 3 件)

- ① 松下弘道. 末梢血検査, 血小板・凝固機能の検査, 生化学検査, 免疫機能検査, 染色体・遺伝子検査, 骨髄検査 (pp. 33-47). 看護学テキスト NiCE 病態・治療論[6] 血液・造血器疾患. 安藤潔, 横田弘子 編. 南江堂, 東京 (2019 年 5 月発行) .
- ② 松林秀弥, 松下弘道. 可溶性インターロイキン 2 受容体 (pp. 130-136). がんの臨床検査ハンドブック. 山田俊幸 前川真人 編. 日本医事新報社, 東京 (2019 年 1 月 31 日発行) .
- ③ 松下弘道. 血清鉄 (Fe)、総鉄結合能 (TIBC)、フェリチン (Ferritin) (pp. 42-43). 50 人の専門医が教える検査と検査値のはなし. 一般社団法人日本衛生検査所協会, 東京 (2018 年 11 月 1 日発行) .

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：安藤 潔

ローマ字氏名：ANDO kiyoshi

所属研究機関名：東海大学医学部

部局名：血液腫瘍内科

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：70176014

(2) 研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。