

令和元年6月24日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19193

研究課題名(和文) 白血病細胞純化システムを用いた急性骨髄性白血病の新規予後因子探索

研究課題名(英文) Investigation of novel prognostic factors in acute myeloid leukemia using the purification system of leukemic cells

研究代表者

松尾 英将 (Matsuo, Hidemasa)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80769737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：血液塗抹標本より血球形態に基づいて白血病細胞を純化する新しい手法を確立した(Int J Hematol. 2017;106(1):55-59.)。また小児急性骨髄性白血病(AML)の低リスク群において、CXCR4遺伝子高発現が予後不良因子となることを明らかにした(Pediatr Blood Cancer. 2016;63(8):1394-9.)。さらに小児・成人MLL再構成AMLにおいて、新規CCND3遺伝子変異を同定し、CDK4/6阻害が有望な治療法となること、共存変異の存在が予後不良因子となることを明らかにした(Blood Adv. 2018;2(21):2879-2889.)。

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)の予後は、遺伝子・染色体異常等に基づく治療層別化により改善してきた。しかし、依然として難治・再発例がみられ、それらの予後は不良であるため、さらなる治療層別化につながる新規予後因子の同定が必要である。本研究により新規予後因子・治療ターゲットが同定され、さらに、より正確な予後因子解析を可能とする手法が開発されたことで、今後AML患者の治療成績向上に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：A novel method to purify leukemic cells from blood smears based on the blood cell morphology was established (Int J Hematol. 2017;106(1):55-59.). CXCR4 overexpression was identified as a poor prognostic factor in pediatric acute myeloid leukemia (AML) with low risk (Pediatr Blood Cancer. 2016;63(8):1394-9.). In both pediatric and adult MLL-rearranged AML, novel CCND3 mutations were identified and CDK4/6 inhibition was shown as a promising therapeutic strategy. Moreover, the presence of coexisting mutations was a poor prognostic factor in MLL-rearranged AML (Blood Adv. 2018;2(21):2879-2889.).

研究分野：血液腫瘍学

キーワード：白血病 予後因子 レーザーマイクロダイセクション 次世代シーケンス CXCR4 G-CSFR CCND3 CDK4/6

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小児急性骨髄性白血病(AML)の予後は、遺伝子染色体異常等に基づく治療層別化により改善してきた。しかし、依然として低リスク群・標準リスク群であっても難治・再発例がみられ、それらの予後は不良である。よって、さらなる治療層別化につながる新規予後因子の同定が急務である。

研究代表者はこれまでに、全国のほとんどの小児がん治療施設が参加する日本小児白血病リンパ腫研究グループ(JPLSG)、現日本小児がん研究グループ(JCCG)のAML-05臨床試験で収集された患者検体を用いて、小児AMLの予後因子を複数同定してきた。しかし、患者検体は骨髄液から抽出された核酸(DNA、RNA)であり、患者骨髄液中の白血病細胞(芽球)割合が低い症例では正常細胞の混入により遺伝子異常の検出感度が低いという問題があった。研究代表者が行った過去の研究でも予後不良への関与が疑われたものの、有意差がみられなかった遺伝子異常が存在した。世界的にみても白血病細胞割合に着目し正確な予後因子解析を行う試みは技術的制約により行われてこなかった。

2. 研究の目的

- (1) 血液塗抹標本から白血病細胞を純化し、遺伝子解析する手法を確立する。
- (2) (1)で確立した手法を併用し、AMLの新規予後因子の同定を行う。
- (3) AMLの網羅的遺伝子解析による新規遺伝子変異の同定、および治療法開発を行う。

3. 研究の方法

細胞株

KPAM1: ダウン症合併AML(AML-DS)患者よりにて京都大学小児科で樹立された細胞株である。37℃、CO₂濃度5%の環境下において、熱不活性化した10%ウシ胎児血清、ペニシリン/ストレプトマイシン、50 ng/mLのstem cell factor(SCF)を添加したRPMI 1640培地にて培養した。K052、ML-2、MV4-11、MOLM-13、THP-1、NOMO-1: KPAM1の培養条件からSCFを除いた条件で培養した。

臨床検体

白血病細胞純化システム確立のための臨床検体は、JCCGのTAM-10臨床試験に登録された一過性骨髄異常増殖症(TAM)患者の末梢血を用いた。予後因子解析用の臨床検体は、JCCGのAML-05臨床試験に登録された初発AML検体(DNA、RNA)を用いた。AML-R13、AML-R15臨床試験登録症例については患者骨髄液もしくは末梢血を用いた。いずれもJCCGおよび京都大学医の倫理委員会の承認を得ている。

標本作成と芽球の採取

まず末梢血および骨髄液採取時にフィルム付きスライドガラスに塗抹し、室温で乾燥させた。続いてメイ・グリュンワルド染色を行った。標本を作成した後、レーザーマイクロダイセクション(LMD)にて芽球のみを採取した。

GATA1 遺伝子変異解析

DNAはQIAamp DNA micro kitを用いて行った。続いてGATA1遺伝子のexon2を標的とするnested PCRを行った。PCR産物を用いてアガロースゲル電気泳動を行い、QIAquick PCR精製キットを用いて精製した。精製したPCR増幅断片の配列は、ABI Prism 310 Genetic Analyzerを用いてdirect sequenceにより調べた。

CXCR4・G-CSFR isoform IV 発現量解析

患者の骨髄液・末梢血をスライドガラスに塗抹し、LMDで採取した芽球からRNeasy micro kitを用いてRNAを抽出し逆転写、リアルタイムPCRを行った。内在コントロールとしてAbelsonを用いた。

次世代シーケンス解析

全エクソンシーケンスはSureSelect Human ALL Exon V5・V5 Inc RNA 5 kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)を用いてサンプルを調整し、HiSeq 2000/2500 sequencing system (Illumina, San Diego, CA)でシーケンスを行った。ターゲットシーケンスはSureSelect custom kit (Agilent Technologies)を用いて、計338の遺伝子を対象に行った。詳細なプロトコルは〔雑誌論文〕#1に記載。

細胞周期解析

細胞にDMSO(コントロール)、Palbociclib (500nM)、Abemaciclib (500nM)を加えて24時間培養し、Propidium iodide (PI)で染色し、FACS Canto II (BD Biosciences, San Jose, CA)で測定を行った。

4. 研究成果

(1) 白血病細胞純化システムの確立

細胞株による確認実験

研究の概略を図1に示す。LMDで採取した血液細胞を用いて遺伝子解析可能か検討するため、急性巨核芽球性白血病細胞株であるKPAM1を用いて、AML-DSの芽球に特徴的なGATA1遺伝子変異が検出可能か解析した。KPAM1と、急性骨髄芽球性白血病細胞株であるK052を1:9の割合で混合して擬似的に目的の細胞が10%の状態を作り出し、標本作成を行った(図2A)。形態学的特徴によりKPAM1のみ約100細胞LMDで採取し、抽出したgenomic DNAを用いてGATA1変異が検出可能かdirect sequenceにて解析した。その結果、Wild Typeと比較して、2塩基(AG)のdeletionに伴うframe shift変異が検出された(図2B)。

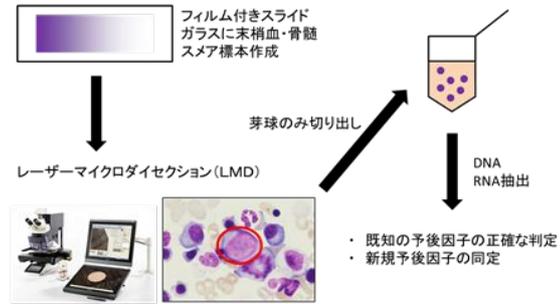


図1：白血病細胞純化システム

臨床検体を用いた確認実験

次に、ダウン症患者がAML-DSを発症する過程でみられるTAM患者末梢血を用いて、芽球のみを抽出することでGATA1変異が高感度に検出可能か解析した。本症例は、検体採取時は白血球数24500、blast20%であった。標本作成後、図中の矢印のような形態を持つ芽球をLMDにて約100細胞採取し(図2C)、GATA1変異解析を行った。その結果、duplicationに伴うframe shift変異が検出された(図2D)。また正常シグナルはほとんど見られなかった。

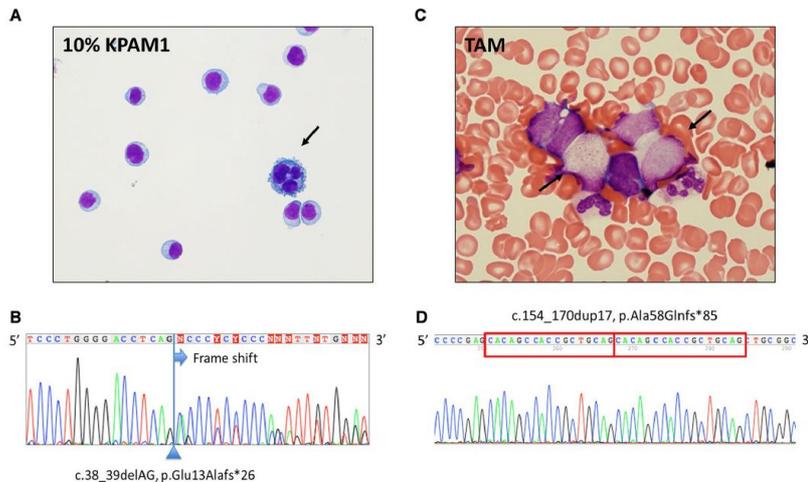


図2：実験結果

A：細胞株塗抹標本の鏡検像
(矢印：KPAM1細胞)
B：LMDで採取したKPAM1細胞からのGATA1変異解析結果
C：TAM患者末梢血塗抹標本の鏡検像
(矢印：芽球)
D：LMDで採取した芽球からのGATA1変異解析結果

AML 検体塗抹標本からの G-CSFR isoform

本システムを用いてG-CSFR isoform発現量が測定可能か解析した。京都大学医学部附属病院の3名のAML患者(同意書取得済)より採取された骨髄液をスライドガラスに塗抹し、LMDにて約100細胞採取し、抽出したRNAを用いて逆転写、リアルタイムPCRを行った。その結果、表1のように、blastの割合が7%である低形成マルクの症例を含めて3例ともに発現量が測定可能であった。よって、芽球の割合の低い患者検体でも高純度の芽球を抽出し、予後因子解析が可能であることが示唆された。

遺伝子発現量解析

	G-CSFR isoform 発現量
過去に測定されたAML-05臨床試験登録症例の結果	1.10(中央値) 1.83(平均値)
Patient #1 (blast 74%)	0.52
Patient #2 (blast 90%)	1.42
Patient #3 (blast 7%)	8.79

表1：G-CSFR isoform 遺伝子発現量解析結果

(2) AMLの新規予後因子の同定

成人AMLにおいてCXC chemokine receptor 4 (CXCR4)の高発現は予後不良と相関することが示されているが、小児での解析は行われていなかった。そこで、AML-05臨床試験に登録された248例の小児AML患者のRNAを用いて、CXCR4遺伝子発現量を測定し予後と比較した。

コホート全体では、CXCR4 遺伝子高発現群(n=81)は低発現群(n=167)と比較して 3 年全生存率に有意な差は認めなかった(69.4% vs. 75.2%, P = 0.44)。一方で、リスク別に予後を比較したところ、低リスク(LR)群において、CXCR4 遺伝子高発現群(n=30)は低発現群(n=63)と比較して 3 年全生存率が有意に低い結果となった(79.2% vs. 98.3%, P = 0.007)(図 3)。低リスク群における多変量解析では、CXCR4 遺伝子高発現は独立した予後不良因子であることが明らかになった(hazard ratio, 11.47; P = 0.01)。よって、小児 AML においても CXCR4 遺伝子高発現が予後不良と関連することが考えられた。

なお、AML-R13、AML-R15 臨床試験においては、白血球細胞純化システムを用いた G-CSFR isoform 遺伝子発現量解析を順次行っている。患者の予後データが揃った段階で、発現量と予後との関連を解析し、成果をまとめる予定である。

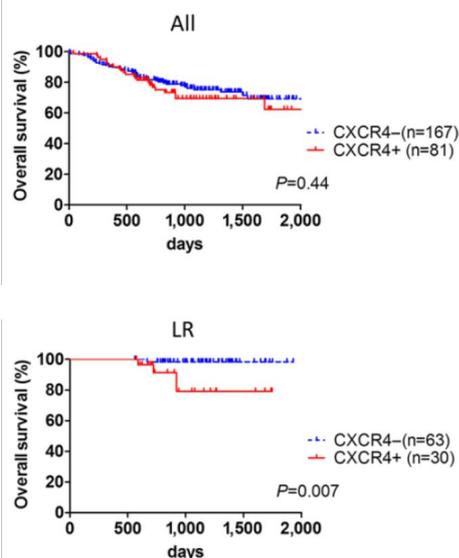


図 3 : CXCR4 遺伝子発現量と予後との関連

(3) AML の新規遺伝子変異同定および治療法開発

MLL 再構成 AML は小児(特に乳児)に高頻度にみられるが、詳しい遺伝子異常は不明である。また、これまで AML において報告されてきた遺伝子異常のほとんどは、現時点で治療標的にならないという問題もある。そこで、MLL 再構成 AML において新規遺伝子異常および治療標的を明らかにするために、以下の実験を行った。

まず JCCG AML 委員会による臨床試験 AML-05 に登録された小児 MLL 再構成 AML 症例の余剰検体を用いて、次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子解析(全エクソンシーケンス 9 例、ターゲットシーケンス 56 例)を行った。その結果、5/56 例(8.9%)において CCND3 遺伝子変異を同定し、さらに成人 MLL 再構成 AML の追加解析でも 2/61 例(3.3%)に CCND3 遺伝子変異がみられた(図 4)。CCND3 遺伝子は cyclin D3 タンパク質をコードしており、CDK4/6 と複合体を形成することで細胞周期(G1 期 S 期)を正に制御している。今回同定した全ての CCND3 遺伝子変異は、PEST ドメインという、タンパク質の分解に関わる領域に局在していたことから、PEST ドメインの変異により cyclin D3 タンパク質が安定化し、MLL 再構成 AML 細胞の増殖を促進していると考えられた。

そこで、CDK4/6 が治療ターゲットとなる可能性を考え、乳がんや近年臨床応用されている CDK4/6 阻害剤のうち代表的な 2 種類(Palbociclib, Abemaciclib)を、CCND3 遺伝子変異を持つ MLL 再構成 AML 細胞株である ML-2 に反応させたところ、細胞増殖および細胞周期(G1 期 S 期)を著明に抑制することが明らかになった(図 5)。また CCND3 遺伝子変異を持たないが cyclin D3 タンパク質を高発現している MLL 再構成 AML 細胞株 4 種類でも、CDK4/6 阻害剤添加により同様の結果が得られた(data not shown)。よって、将来的に CDK4/6 阻害剤が MLL 再構成 AML 治療の有望な選択肢となり、CCND3 遺伝子変異・高発現が CDK4/6 阻害剤の有効性を予測できる指標となる可能性があると考えられた。

さらに、MLL 再構成 AML の中でも最も頻度の高かった MLL-MLLT3(AF9)再構成症例において、共存変異の有無が予後と相関するかどうか検討した。共存変異を持つ症例(n=16)は、持たない症例(n=9)と比較して、無再発生存率・全生存率ともに有意に低かった。よって、共存変異の存在は MLL-MLLT3 再構成症例における予後不良因子となると考えられた。詳細な結果は [雑誌論文] #1 に記載。

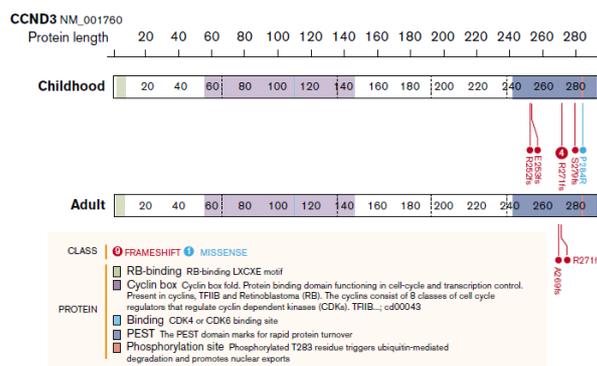


図 4 : 小児/成人 AML における CCND3 遺伝子変異

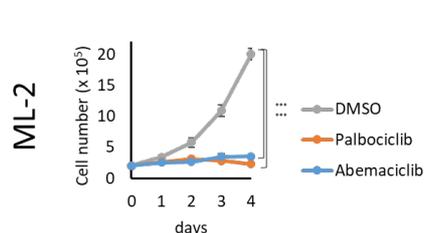


図 5 : MLL 再構成 AML 細胞に対する CDK4/6 阻害剤の効果

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Matsuo H, Yoshida K, Fukumura K, Nakatani K, Noguchi Y, Takasaki S, Noura M, Shiozawa Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Okada A, Nannya Y, Takeda J, Ueno H, Shiba N, Yamato G, Handa H, Ono Y, Hiramoto N, Ishikawa T, Usuki K, Ishiyama K, Miyawaki S, Itonaga H, Miyazaki Y, Kawamura M, Yamaguchi H, Kiyokawa N, Tomizawa D, Taga T, Tawa A, Hayashi Y, Mano H, Miyano S, Kamikubo Y, Ogawa S, Adachi S. Recurrent CCND3 mutations in MLL-rearranged acute myeloid leukemia. *Blood Adv.* 2018 Nov 13;2(21):2879-2889. doi: 10.1182/bloodadvances.2018019398. (査読有)
2. Matsuo H, Handa T, Tsuchiya M, Kubo T, Yoshizawa A, Nakayama Y, Shiga S, Hitomi T, Adachi S, Date H, Hirai T, Ichiyama S. Progressive Restrictive Ventilatory Impairment in Idiopathic Diffuse Pulmonary Ossification. *Intern Med.* 2018 Jun 1;57(11):1631-1636. doi: 10.2169/internalmedicine.9433-17. (査読有)
3. Morita K, Noura M, Tokushige C, Maeda S, Kiyose H, Kashiwazaki G, Taniguchi J, Bando T, Yoshida K, Ozaki T, Matsuo H, Ogawa S, Liu PP, Nakahata T, Sugiyama H, Adachi S, Kamikubo Y. Autonomous feedback loop of RUNX1-p53-CBFB in acute myeloid leukemia cells. *Sci Rep.* 2017 Nov 30;7(1):16604. doi: 10.1038/s41598-017-16799-z. (査読有)
4. Iijima-Yamashita Y*, Matsuo H*, Yamada M, Deguchi T, Kiyokawa N, Shimada A, Tawa A, Takahashi H, Tomizawa D, Taga T, Kinoshita A, Adachi S, Horibe K. Multiplex fusion gene testing in pediatric acute myeloid leukemia. *Pediatr Int.* 2018Jan;60(1):47-51. doi: 10.1111/ped.13451. (査読有) *equal contribution.
5. Matsuo H, Iijima-Yamashita Y, Yamada M, Deguchi T, Kiyokawa N, Shimada A, TawaA, Tomizawa D, Taga T, Kinoshita A, Adachi S, Horibe K. Monitoring of fusion gene transcripts to predict relapse in pediatric acute myeloid leukemia. *Pediatr Int.* 2018 Jan;60(1):41-46. doi: 10.1111/ped.13440. (査読有)
6. Nakayama H, Tomizawa D, Tanaka S, Iwamoto S, Shimada A, Saito AM, Yamashita Y, Moritake H, Terui K, Taga T, Matsuo H, Kosaka Y, Koh K, Hosoi H, Kurosawa H, Isoyama K, Horibe K, Mizutani S, Adachi S. Fludarabine, cytarabine, granulocyte colony-stimulating factor and idarubicin for relapsed childhood acute myeloid leukemia. *Pediatr Int.* 2017 Oct;59(10):1046-1052. doi: 10.1111/ped.13378. (査読有)
7. Morita K, Suzuki K, Maeda S, Matsuo A, Mitsuda Y, Tokushige C, Kashiwazaki G, Taniguchi J, Maeda R, Noura M, Hirata M, Kataoka T, Yano A, Yamada Y, Kiyose H, Tokumasu M, Matsuo H, Tanaka S, Okuno Y, Muto M, Naka K, Ito K, Kitamura T, Kaneda Y, Liu PP, Bando T, Adachi S, Sugiyama H, Kamikubo Y. Genetic regulation of the RUNX transcription factor family has antitumor effects. *J Clin Invest.* 2017 Jun 30;127(7):2815-2828. doi: 10.1172/JCI91788. (査読有)
8. Matsuo H, Shiga S, Imai T, Kamikubo Y, Toki T, Terui K, Ito E, Adachi S. Purification of leukemic blast cells from blood smears using laser microdissection. *Int J Hematol.* 2017 Jul;106(1):55-59. doi:10.1007/s12185-017-2227-z. (査読有)
9. Matsuo H, Nakamura N, Tomizawa D, Saito AM, Kiyokawa N, Horibe K, Nishinaka-Arai Y, Tokumasu M, Itoh H, Kamikubo Y, Nakayama H, Kinoshita A, TagaT, Tawa A, Taki T, Tanaka S, Adachi S. CXCR4 Overexpression is a Poor Prognostic Factor in Pediatric Acute Myeloid Leukemia With Low Risk: A Report From the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Pediatr Blood Cancer.* 2016 Aug;63(8):1394-9. doi: 10.1002/pbc.26035. (査読有)

[学会発表] (計 10 件)

1. Hidemasa Matsuo, Kenichi Yoshida, Kazutaka Fukumura, . . . , Yasuhiko Kamikubo, Seishi Ogawa, Souichi Adachi. Recurrent genomic aberrations of D-type cyclins are therapeutic targets of CDK4/6 inhibitors in t(8;21) and MLL-rearranged acute myeloid leukemia. 60th ASH Annual Meeting and Exposition 2018 年
2. Taeko Kaburagi, Genki Yamato, Norio Shiba, Kenichi Yoshida, Yusuke Hara, Yuichi Shiraishi, Kentaro Ohki, Manabu Sotomatsu, Hirokazu Arakawa, Hidemasa Matsuo, Akira Shimada, Nobutaka Kiyokawa, Daisuke Tomizawa, Takashi Taga, Keizo Horibe, Satoru Miyano, Seishi Ogawa, Souichi Adachi, Yasuhide Hayashi. ASH Annual Meeting and Exposition 2018 年
3. Hidemasa Matsuo, Kenichi Yoshida, Yuichi Shiraishi, Kenichi Chiba, Hiroko Tanaka, Hiroo Ueno, Nobutaka Kiyokawa, Daisuke Tomizawa, Takashi Taga, Akio Tawa, Satoru

Miyano, Yasuhiko Kamikubo, Seishi Ogawa, Souichi Adachi. Landscape and prognostic significance of coexisting mutations in pediatric MLL-rearranged AML. The 33rd World Congress of Biomedical Laboratory Science (IFBLS) 2018 年

4. Hidemasa Matsuo, Kenichi Yoshida, Kazutaka Fukumura, ... , Yasuhiko Kamikubo, Seishi Ogawa, Souichi Adachi. Identification of recurrent CCND3 mutations in MLL-rearranged acute myeloid leukemia. 第 80 回日本血液学会学術集会 2018 年
5. Koji Sasaki, Norio Shiba, Yuri Uchiyama, Junji Ikeda, Masahiro Yoshitomi, Yuko Shimosato, Mayu Tokumasu, Hidemasa Matsuo, ... , Naomichi Matsumoto, Shuichi Ito, Yasuhide Hayashi. The detection of minor clones with somatic KIT D816V mutations in pediatric de novo AML. 第 80 回日本血液学会学術集会 2018 年
6. Mina Noura, Ken Morita, Hidemasa Matsuo, Hiroshi Sugiyama, Yasuhiko Kamikubo, Souichi Adachi. Analysis of the functional role of CBFβ in leukemogenesis. 第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年
7. Mina Noura, Ken Morita, Chieko Tokushige, Shintaro Maeda, Hiroki Kiyose, Toshikazu Bando, Kenichi Yoshida, Hidemasa Matsuo, Seishi Ogawa, Paul P. Liu, Hiroshi Sugiyama, Yasuhiko Kamikubo, and Souichi Adachi. Cell-Autonomous Feedback Loop of RUNX1-p53-CBFβ in Acute Myeloid Leukemia Cells. 59th ASH Annual Meeting and Exposition 2017 年
8. Ken Morita, Kensho Suzuki, Shintaro Maeda, Yoshihide Mitsuda, Chieko Tokushige, Gengo Kashiwazaki, Junichi Taniguchi, Rina Maeda, Mina Noura, Masahiro Hirata, Tatsuki Kataoka, Hiroki Kiyose, Mayu Tokumasu, Hidemasa Matsuo, ... , Yasuhiko Kamikubo, Souichi Adachi. RUNX cluster regulation by GENE SWITCH triggers a profound tumor regression of diverse origins. 第 79 回日本血液学会学術集会 2017 年
9. Hidemasa Matsuo, Hiroo Ueno, Kenichi Yoshida, Yuichi Shiraishi, Hiroko Tanaka, Kenichi Chiba, Tomohiro Wakita, Katsuyuki Ohmori, Hidefumi Hiramatsu, Hiroshi Kawabata, Akifumi Takaori-Kondo, Yasuhiko Kamikubo, Satoru Miyano, Seishi Ogawa, Souichi Adachi. Distribution of the driver mutations among blood cell compartments in MDS and AML. 第 78 回日本血液学会学術集会 2016 年
10. Hidemasa Matsuo, Kanako Suzuki, Kuniko Iwata, Tomoya Yoneda, Yuko Nakayama, Takeshi Higuchi, Shuichi Shiga, Satoshi Ichiyama. Experience of the first certification of ISO15189:2012 in physiological examination in Japan. The 32nd World Congress of Biomedical Laboratory Science. 2016 年

〔図書〕(計 2 件)

1. 松尾英将 Introduce My Article 臨床血液 2019 年 60 巻 3 号 256 頁 日本血液学会
2. 松尾英将、足立壮一 小児急性骨髄性白血病の分子的理解と臨床応用 血液フロンティア 2016 年 26 巻 11 号 1513-1521 頁 医薬ジャーナル社

〔その他〕

1. 京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻検査応用開発学分野 血液・生体防御学研究室ホームページ
<https://adachilab-kyotouniv.amebaownd.com/>
2. 急性骨髄性白血病の新規遺伝子変異を発見 - 乳がんの既存薬が治療に有効である可能性
http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2018/181101_1.html
3. 白血病、既存の乳がん薬が効果 京大が遺伝子変異特定
<https://www.nikkei.com/article/DGXMZ037173800R31C18A000000/>

6. 研究組織

(1)研究分担者
なし

(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。