

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08443

研究課題名(和文) ダウン症候群合併骨髄性白血病の治療反応の多様性解明の研究

研究課題名(英文) Research for diversity of treatment response for myeloid leukemia with Down syndrome

研究代表者

多賀 崇 (Taga, Takashi)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30273410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ダウン症候群合併骨髄性白血病(ML-DS)は、一般的に予後良好であるが、一部は極めて予後不良である。この多様性解明と治療方法の開発のため、白血病細胞の薬剤感受性を測定した。ML-DS症例の薬剤感受性は検討できなかったが、ML-DSの前段階として知られる新生児一過性白血病(TAM)細胞の薬剤感受性を8症例で検討し、cytarabine、dexamethasoneやMEK阻害薬trametinibに高感受性がみられることがわかった。TrametinibはTAM細胞がRAS/MEK pathwayを介して増殖をしていること、TAMならびにML-DSの治療薬になりうることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、白血病を含むがん治療においては分子標的薬の開発ならびに導入が進んでいるが、TAMならびにML-DSに対してはほとんど手が付けられていない。この研究はTAMならびにML-DSの病的細胞の増殖機転の解明につながる可能性がある。また、これらの疾患はダウン症という基礎疾患に引き続き発症することから、従来のような全身に負担となる抗がん剤治療でなく、より特異性の高く副作用の少ない治療薬の開発が必要であり、この研究成果ならびに発展が有力な治療方法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Myeloid leukemia with Down syndrome is associated with good prognosis in general, however, few patients have very poor prognosis. To address for this diversity and to develop new treatment approach, drug sensitivity test for leukemic cells of ML-DS were conducted. Unfortunately, we could not evaluate leukemic cells of ML-DS, but we could these of eight patients with transient abnormality of myelopoiesis (TAM), which is considered pre-leukemic status of ML-DS. The leukemic cells with TAM had high sensitivity for cytarabine, dexamethasone and Trametinib (MEK inhibitor). This finding indicates TAM's cells proliferate via RAS/MEK pathway and trametinib could be one of the promising drugs for treatment TAM and ML-DS.

研究分野：小児血液・小児がん

キーワード：薬剤感受性 白血病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ダウン症候群は代表的な染色体異常疾患であるが、非ダウン症候群児に対して、10 - 20倍白血病が発症しやすいといわれている。なかでも、急性骨髄性白血病は、そのほとんどが4歳までに発症する、急性巨核芽球性白血病を呈することが多い、などから、WHO分類(2008年)でも Myeloid Leukemia with Down syndrome (ML - DS) として独立した疾患概念として扱われている。ML-DSはnon ML-DSに比べ、治療合併症が多い一方で抗がん剤、特にシタラピン(Ara-C)に対する感受性が高いことが知られており(Zwaan CM, Blood 2002)。結果として近年ML-DSに対してはnon ML-DSに対する治療より大幅に減弱した治療研究が行われてその長期生存率は80 - 90%と良好である(多賀崇、小児科臨床ピクシス10:小児白血病診療、2009)。また、ML-DSは新生児期にTransient Abnormalities of Myelopoiesis(TAM)という一過性白血病状態を呈することも多く、このTAMにみられる白血病細胞は、ML-DSの白血病細胞と形態学的には区別つかないものの、自然あるいは少量の抗がん剤でその多くが消失する。これらの一連の現象からダウン症候群児がTAMからML-DSが発症する過程は、白血病の多段階発症のモデルのひとつとして注目されている。研究代表者(多賀崇)は、本邦におけるML-DSに対する全国規模の臨床研究、JPLSG AML-D05ならびにAML-D11研究の研究代表者を務め、最近前者の結果を英文誌に報告した(Taga T, et al, Pediatric Blood & Cancer, 2016)。本邦で以前から行われている治療よりも減弱した治療を行ったにも関わらず生存率の低下はなく、多くのML-DSの患者でさらなる治療減弱が可能であることが示唆された。一方、1 - 2割を占める寛解導入不能例や再発例の予後はきわめて不良であり、これは研究代表者が行った後方視的研究でも明らかになっている(Taga T, et.al, Blood, 2012)。欧米で行われている治療など一律の治療強化により予後の改善を図るという考えもあるが、対象となる疾患群は先天性心疾患など重度の合併症を有していることも多く、受け入れがたい。

現在までに国内外でML-DSの予後不良因子を見出す試みがなされているが、まだ臨床応用可能な予後因子は見つかっていない。診断ならびに治療開始後早期にわかる予後因子の発見と予後不良群に対する適切な治療開発が喫緊の課題である。白血病細胞などがん細胞に対する薬剤感受性試験は、その結果がすぐに臨床応用できうるものであり、すでに種々のがん腫で行われて

いる。一方、ダウン症候群に発症した白血病に対する薬剤感受性試験は先に述べた欧州グループからの報告以外にはなく、また TAM、ML-DS、再発 ML-DS という連続的な検索はなされていない。そこで、TAM、ML-DS の初発時ならびに再発時の白血病細胞の薬剤感受性を可能な限り経時的、連続的に調べ、これに他の予後因子や臨床経過をあわせて検討することで、これらの疾患群に対し、より適切な発症予防法や治療法が見出せるのではないかと考え、本研究を計画した。

2 . 研究の目的

ダウン症候群に発症した骨髄性白血病に対し、前白血病状態とされる新生児一過性白血病 (TAM) と急性骨髄性白血病 (ML-DS) の初診時と再発時の白血病細胞に対する薬剤感受性を連続的に検討し、多段階発がん過程におけるその変化と予後良好群と不良群における差、最適な薬剤を見出すことを目的とする。さらにこの手法を用い、治療早期にその患者さんへの最適な治療薬を選択するなど、本疾患群を持つそれぞれの患者さんに最適な治療につなげたい。

3 . 研究の方法

本研究実施にあたり、類似疾患での薬剤感受性試験の研究実績がある神奈川県立小児医療センター血液腫瘍科 後藤裕明科長とメールなどで情報交換、さらに平成 29 年 6 月 30 日には研究代表者の多賀崇が同センターに出張し、試験の具体的実施方法、問題点につき見学ならびに研究方法などについて討論、意見交換した。本研究費申請の段階では、WST- 8 アッセイ法にて研究を行う予定であったが、WST- 8 アッセイ法では多くの細胞数が必要であり、小児白血病、特にダウン症を伴う急性骨髄性白血病では検体採取が困難な場合が多いことから、アッセイが十分でない可能性があり、より少量の細胞数でアッセイ可能なプロメガ社の Cell Titer Gro による測定に切り替えることになった。これらを踏まえて研究計画書を書き直し、滋賀医科大学の倫理委員会に申請、2017 年 10 月承認を得た。

Cell Titer Gro による薬剤感受性測定方法

検体から単核球を分離し、あらかじめ薬剤が添加されている 384 well plate に

1 well あたり原則として、 1×10^4 個の生細胞を添加した。各薬剤は最終濃度、その $\times 1/5$ 、 $\times 1/25$ 、 $\times 1/125$ の、計 4 段階の濃度で検査を行っております。培養開始から 4 日目に、各 well に試薬 CellTiter-Glo (Promega) を添加し、生細胞の量に比例して生じる発光量を定量した。薬剤

非添加 control well の発光量を 1.0 とし、薬剤を添加した well に含まれる生細胞数を比率で表した。Drug Effect Score (DES) は下記の式で求めた値で、検体間での感受性を比較するために算出した。ある薬剤により x1/125 濃度でも完全に細胞が死滅する場合は、DES 100、まったく薬剤に反応しない場合は DES 0 となる。 $DES = [\log_{125} \times \{1 - (x1/125 \text{ 濃度での細胞生存率})\} + \log_{25} \times \{1 - (x1/25 \text{ 濃度での細胞生存率})\} + \log_5 \times \{1 - (x1/5 \text{ 濃度での細胞生存率})\} + \{1 - (x1 \text{ 濃度での細胞生存率})\}] \times 100 / (\log_{125} + \log_{25} + \log_5 + 1)$

4 . 研究成果

当初の予定から変更した Cell Titer Gro による測定を実際に行い、評価ならびに問題点に対する対応を行った。

まず凍結検体を用いた Cell Titer Gro 法によるアッセイ法の有用性を検討するために、本学附属病院で診療し本研究への同意が得られた 6 名の白血病患者 (急性リンパ性白血病 5 例、急性骨髄性白血病 1 例) の 7 つの凍結検体 (1 名は急性リンパ性白血病患者の初発時と再発時) を神奈川県立こども医療センターに新たに導入された分注器を使用し検討した。従来行われていた WST8 法と同等の結果が得られ、また少量の細胞、凍結細胞でもアッセイ可能なことが示された。

引き続き、滋賀医科大学ならびに神奈川県立こども医療センターで診療され本研究への同意が得られた TAM 8 症例に対し 41 種類の薬剤に対する感受性試験を Cell Titer Gro 法で行った。従来の報告にあるように TAM の病的細胞においては抗白血病薬として実臨床で用いられている cytarabine に加え、dexamethasone や MEK 阻害薬 trametinib に高感受性がみられた。Trametinib の効果は、TAM 細胞数が多い症例でより感受性が高かった。Trametinib は新規薬剤として有望であるとともに、TAM 細胞が RAS/MEK pathway を介して増殖をしていることが示唆された。dexamethasone への感受性があることについて、グルココルチコイド受容体が TAM 細胞にもあることを現在確認中である。RAS 変異については、NGS によるエクソーム解析を行い、NRAS、KRAS、HRAS、Flt3、BRAF、PTPN11 の hot spot に変異はないことが確認された。dexamethasone ならびに MEK 阻害剤は今後 TAM 治療への応用が期待できる。これらの結果を現在、論文執筆中である。

TAM に引き続き高頻度で発症する ML-DS 症例の検討は、上記 TAM 例から ML-DS の発症がなく、また自施設や関連施設からの該当症例がなかったことから実施できなかった。ML-DS に関しては希少疾患であることに加え、白血病発症時の芽球比率が極めて少ないことから、症例集積ならび

に解析方法については、検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yokosuka T, Nakamura W, Hayashi A, Fujita S, Miyagawa N, Iwasaki F, Hamanoue S, Goto S, Goto H, Taga T
2. 発表標題 In vitro Testing of Trametinib in Transient Abnormal Myelopoiesis
3. 学会等名 第61回日本小児血液・がん学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------