

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17774

研究課題名(和文) 小児ALLにおけるASNS遺伝子のメチル化がL-asparaginase感受性におよぼす影響の解析

研究課題名(英文) Involvement of methylation status of asparagine synthetase gene in asparaginase sensitivity of pediatric BCP-ALL

研究代表者

渡邊 敦 (Watanabe, Atsushi)

山梨大学・大学院総合研究部・特任助教

研究者番号：30610498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：小児B前駆細胞型急性リンパ性白血病において、アスパラギナーゼは血清中のアスパラギンを枯渇させる。正常血液細胞においてはアスパラギンはASNSによって再合成されるが、ALL細胞は十分にアスパラギンを合成することができない。今回、ASNS CpG islandは正常な血液細胞では非メチルを、ALL細胞ではアリル特異的にメチル化を呈しており、アスパラギナーゼ感受性との関連を明らかにした。ASNS遺伝子のメチル化は7q21領域のインプリングクラスターと関連していた。また、臨床的には予後不良なALLではASNSのCpG islandが低メチルを示し、アスパラギナーゼ低感受性が予後不良の一因と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児急性リンパ性白血病におけるASNS遺伝子プロモーター領域のメチル化状態がアスパラギナーゼの薬剤感受性に関連していることは、個別化医療の発展に貢献しうる。また、ALLの核型は従来より代表的な予後因子として知られていたが、そのゲノム薬理学的な根拠の一つが明らかになった。ASNS遺伝子のメチル化はアリル特異的に起こっていることが理解され、がんの薬剤感受性にゲノムインプリング現象が関連している新規の知見が得られた。これらの成果は、ALLに対する臨床応用にとどまらず、がんの分子細胞生物学を解明する礎となる。

研究成果の概要(英文)：Asparaginase, which depletes serum asparagine, is the important component in current chemotherapy for childhood BCP-ALL. Normal hematopoietic cells can produce asparagine by asparagine synthetase (ASNS) activity, while ALL cells are unable to synthesize adequate amounts of asparagine.

We investigated the association of ASNS methylation status with asparaginase sensitivity. ASNS CpG island is largely unmethylated in normal hematopoietic cells but is allele-specifically methylated in BCP-ALL cells. The ASNS gene is located at 7q21, an evolutionarily conserved imprinted gene cluster. Clinically, in three childhood BCP-ALL cohorts, ASNS is highly methylated in BCP-ALL with favorable karyotypes but is mostly unmethylated in BCP-ALL with poor prognostic karyotypes.

These observations demonstrate that silencing of the ASNS gene due to aberrant imprinting is a pharmacogenetic mechanism for the leukemia-specific activity of asparaginase therapy in BCP-ALL.

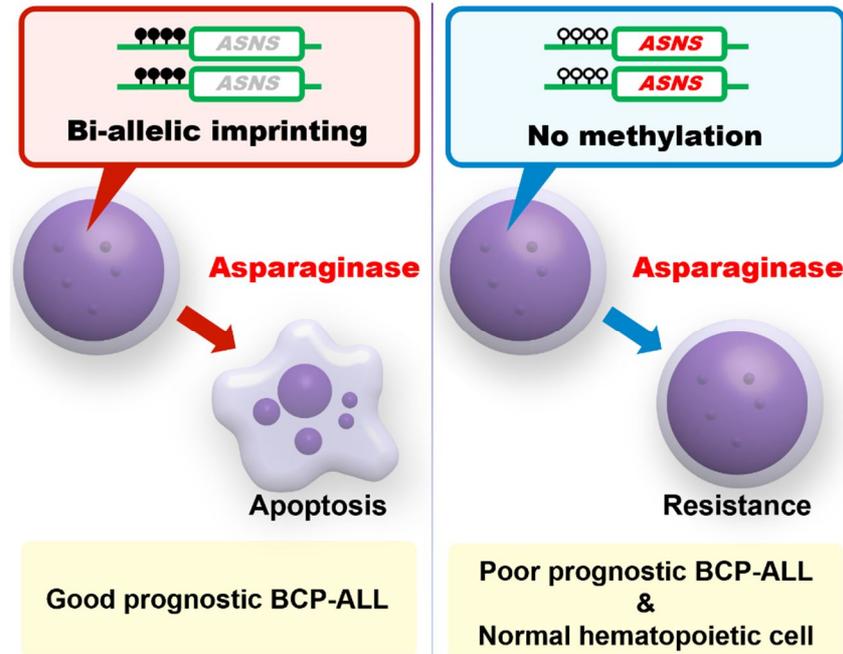
研究分野：小児血液・小児がん

キーワード：急性リンパ性白血病 個別化医療 エピジェネティクス ゲノム薬理学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Asparaginase は血清中のアスパラギンを枯渇させ、抗腫瘍効果を発揮する。正常血液細胞においてアスパラギンは ASNS によって再合成されるが、ALL 細胞は十分にアスパラギンを合成することができず、細胞死に至るとされる。Asparaginase は小児 B 前駆細胞型急性リンパ性白血病 (BCP-ALL) における化学療法の重要な構成要素のひとつであるが、重篤な副作用も多く報告されているため、感受性を規定する要因を見出して投与計画に反映することができれば、ALL の治療成績向上に貢献しうる。



2. 研究の目的

ASNS 遺伝子のメチル化状態と asparaginase の薬剤感受性との関連について解析する。また、ASNS 遺伝子にメチル化を引き起こす要因としてインプリンティング異常が想定されており、この分子的な証左を得たい。さらに、in vitro の解析から発展し、実際の臨床サンプルを用いた ASNS 遺伝子のメチル化状態並びに asparaginase 感受性について解析をすすめたい。

これらの解析を通じ、本研究では asparaginase の感受性を規定する因子として ASNS 遺伝子のメチル化状態について検討し、その臨床的な意義や背景因子について解析を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1)山梨大学小児科が有する BCP-ALL の細胞株をパネルで解析し、正常リンパ球と対比させながら ASNS 遺伝子プロモーター領域のメチル化状態を次世代シーケンサーで解析する。

(2)BCP-ALL 細胞株については asparaginase 感受性を alamar blue assay で解析し、asparaginase の IC50 を算出して ASNS 遺伝子メチル化状態との関連を調べる。

(3)NOPHO が公開しているメチロームデータベースを用いて、臨床検体における ASNS 遺伝子のメチル化状態を核型の関連を解析する。

(4)染色体 7q21 領域に存在する PEG10 遺伝子関連インプリンティング領域について、白血病細胞株、臨床検体の公開データ、マウス ALL サンプルを用いてメチル化状態を解析する。

4. 研究成果

(1)正常リンパ球において ASNS 遺伝子は非メチル化を呈する一方で、BCP-ALL 細胞株は低～高メチルまでさまざまなメチル化状態をとりうることを示された。また、メチル化特異的制限酵素を用いた解析を通じて、ASNS 遺伝子のメチル化がアリル特異的に起こる現象であることが示された。すなわち BCP-ALL においては、アリル特異的な ASNS 遺伝子のメチル化が起こっていることが示された。(Fig. 1 参照)

Fig.1

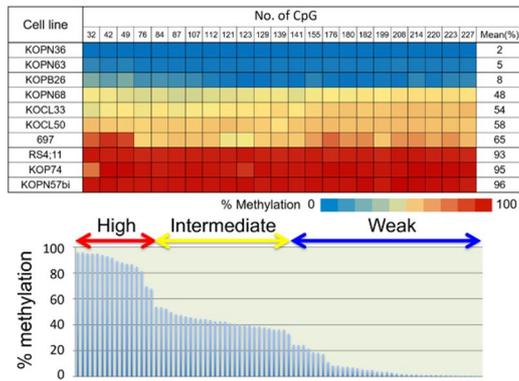
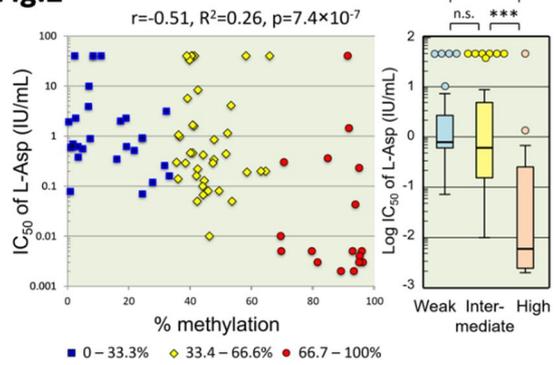


Fig.2



(2)BCP-ALL 細胞株を用いた in vitro の解析を行った結果、asparaginase の感受性は特に *ASNS* 遺伝子高メチル群において中間～低メチル群に比べて約 100 倍程度高いことが明らかとなった。(Fig. 2 参照)実際の臨床においては多剤併用化学療法の優劣は長期的なフォローアップによる生存、再発などで評価せざるを得ない側面がある。しかし、細胞株を用いた再現可能な in vitro 実験を行った結果、個々の薬剤感受性を評価することが可能であることが実証された。特に、*ASNS* 遺伝子メチル化状態は asparaginase の感受性の重要な規定因子の一つであることが示された。

(3)実際の臨床サンプルにおいては量に限りがあり、複数回の解析を実施することはできないため、asparaginase の感受性を系統的に調べることは困難である。しかし、本研究においては NOPHO グループが公開している約 700 検体の小児 ALL サンプルの大規模メチロームデータを効果的に解析することができた。その結果、小児 BCP-ALL において代表的な予後良好核型である高二倍体や t(12;21)では *ASNS* 遺伝子は比較的高いメチル化を示す一方で予後不良な Ph+, *MLLr* は低メチルを示した。(Fig. 3 参照)この解析を通じて、メチル化による *ASNS* の抑制とそれに起因するアスパラギン再合成能の違いが、核型が予後を規定する一因と考えられた。また、本邦において凍結保存された臨床サンプルを用いて *ASNS* 遺伝子のメチル化状態と asparaginase 感受性との間に相関があることを示した。

Fig.3

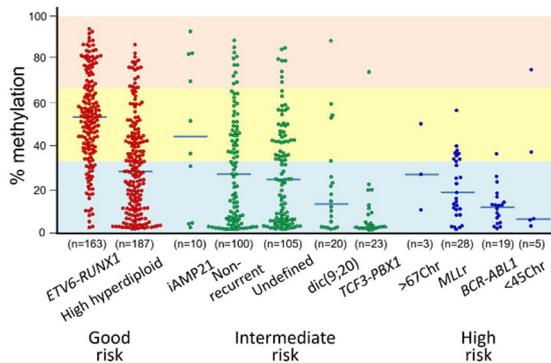
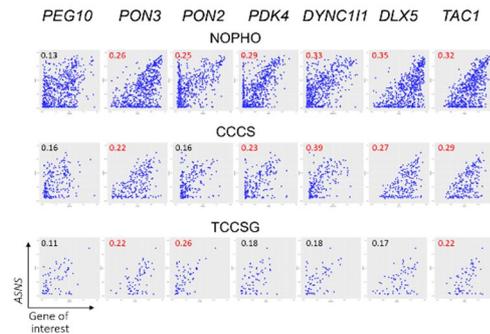


Fig.4



(4)7q21 領域の他の遺伝子、特に *PEG10*, *PON1*, *PON3*, *PDK4*, *DLX5*, *TAC1* は *ASNS* 遺伝子のメチル化状態と正の相関が見られた。(Fig.4 参照)これは白血病細胞株、臨床検体の公開データ、マウス ALL サンプルいずれでも明らかであり、種間で保存されたインプリンティングクラスターが薬剤感受性に関連する新規の知見と考えられた。インプリンティング異常は比較的新しい概念であり、ゲノムインプリンティングが薬剤感受性に関連しているという知見はがんの分子細胞生物学の発展にも貢献するものと考えた。

上記の研究成果は論文化し、すでに Blood 誌に採択されて公開をまっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Atsushi Watanabe, Kunio Miyake, Jessica Nordlund, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Association of aberrant ASNS imprinting with asparaginase sensitivity and chromosomal abnormality in childhood BCP-ALL	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Atsushi Watanabe, Kunio Miyake, Koushi Akahane, Tamao Shinohara, Shinpei Somazu, Kinuko Hirose, Hiroko Oshiro, Hiroki Sato, Kazuya Takahashi, Makoto Nakamura, Satoru Kojika, Kumiko Goi, Masako Abe, Keiko Kagami, Takeshi Inukai
2. 発表標題 Significance of methylation status and protein expression level of ASNS in asparaginase sensitivity of BCP-ALL
3. 学会等名 日本血液学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Atsushi Watanabe, Takeshi Inukai, Tamao Shinohara, Shinpei Somazu, Kinuko Hirose, Hiroko Oshiro, Hiroki Sato, Kazuya Takahashi, Kumiko Goi, Masako Abe, Keiko Kagami, Kunio Miyake, Kanji Sugita
2. 発表標題 小児BCP-ALLにおける核型とASNS遺伝子メチル化状態の関連
3. 学会等名 第59回日本小児血液がん学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Atsushi Watanabe, Kunio Miyake, Jessica Nordlund, et al.
2. 発表標題 Association of allele specific methylation of ASNS gene with prognostic significance of chromosomal abnormalities in childhood BCP-ALL
3. 学会等名 60th SIOP（国際学会）
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----