

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K15664

研究課題名(和文)小児急性ALLにおけるメチル化率のMRD解析への応用

研究課題名(英文)Application of methylation rate in acute childhood leukemia to microscopic residual disease analysis.

研究代表者

篠原 珠緒 (Shinohara, Tamao)

山梨大学・大学院総合研究部・医学研究員

研究者番号：80747452

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): データベースにあるBCP-ALL663例、T-ALL101例と、寛解期骨髄86例におけるメチロームデータを対象に約48.5万カ所のCpG配列を分析し、BCP-ALL症例とT-ALL症例のそれぞれに白血病細胞で高いメチル化状態を呈し、かつ、寛解期骨髄で非メチル化状態を呈する領域を複数ヶ所同定した。これらのCpGサイトは細胞株(n=37)ならびに凍結保存初発時臨床検体(n=49)を用いて次世代シーケンサーで解析し、同領域は白血病細胞株でも高いメチル化状態を呈した。

最適なプライマー設計を組み臨床検体で応用予定であったが、プライマー設計に難渋し臨床検体での応用が困難だった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALLの化学療法において初期治療の反応性をMRDとしてその後の治療に反映させることが国際的なコンセンサスとなっている。しかし、現方法ではMRDの評価が不能な症例が10-20%の割合で存在するため、MRD解析における新たな検査方法の確立が望まれていた。われわれの方法は白血病細胞に特異的なゲノムの異常メチル化が認められる点に注目し、MRDの指標としての可能性について700例を越えるALL症例のメチル化データベースを活用して検討し、その可能性を見出したが臨床検体におけるprimer設計に難渋し応用が困難であった。しかし、MRD解析の方法に関して現行法だけではない可能性を見出したと考える。

研究成果の概要(英文): Approximately 485 000 CpG sequences were analysed from methylome data in 663 BCP-ALL and 101 T-ALL cases and 86 remission bone marrow cases in the database, and several regions were identified in BCP-ALL and T-ALL cases, respectively, that are highly methylated in leukaemia cells and unmethylated in remission bone marrow. Several regions were identified in leukaemia cells and unmethylated bone marrow in remission. These CpG sites were analysed by next-generation sequencing using cell lines (n = 37) and cryopreserved primary clinical samples (n = 49), and the same regions were also highly methylated in leukaemia cell lines.

The best primer design was planned to be applied to clinical samples, but due to difficulties in primer design, it was difficult to apply the primers to clinic

研究分野：小児血液学

キーワード：小児急性白血病 微小残存病変

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小児急性リンパ性白血病(Acute lymphoblastic leukemia ; ALL)の化学療法において、初期治療の反応性を微小残存病変(Minimal residual disease ; MRD)として、迅速かつ高精度で定量評価し、その後の治療に反映させることが国際的なコンセンサスとなっている。しかし、最も広く利用されている白血病細胞に特異的な Ig/TCR 遺伝子再構成を real time RT-PCR によって定量する方法では、特異的再構成が同定できずに評価が不能な症例が 10-20%の割合で存在する。

2. 研究の目的

そこで、われわれは、白血病細胞に特異的なゲノムの異常メチル化が認められる点に注目し、MRD の指標としての可能性について 700 例を超える ALL 症例のメチル化データベースを活用して検討した。その結果、ALL の診断時に全例でメチル化を示し寛解期に非メチル化を示す CpG 配列を複数同定した。そこで、本研究では、これら CpG 配列のメチル化状態を MRD の指標としてバイサルファイト PCR によって定量的に解析し、臨床応用への可能性を検証する。

3. 研究の方法

本研究では、上記でスクリーニングされた候補 CpG 配列について、ALL 細胞株を対象に 100% のメチル化状態を示す CpG 配列を絞り込み、当科で治療した ALL 症例のうち、治療終了から 5 年以上を経て再発なく経過している症例において、MRD 陰性と想定される治療終了時の凍結骨髄を対象として、0%の非メチル化状態にあることを検証し、当科で治療した ALL 症例で、診断時と寛解導入療法終了時の凍結骨髄に加えて、再発した症例では再発に至るまでの凍結骨髄も対象にして、MRD および再発を早期に検出する指標としての精度を、本法と Ig/TCR 解析方法と比較検討し、日本小児白血病研究グループ(JPLSG)の ALL 治療の臨床研究で行われた Ig/TCR 解析の余剰検体を用いて両者の解析結果が一致することを検証する。

4. 研究成果

多数症例でのデータベースの使用

公的データベースに登録された北欧の小児 ALL 症例 764 例 (B 前駆細胞型 ALL; 663 例、T 細胞型 ALL; 101 例) と、86 例の寛解期骨髄におけるメチル化データベースを対象に、48.5 万カ所余りの CpG 配列のメチル化率を分析した。その結果、B 前駆細胞型 ALL 症例と T 細胞型 ALL 症例のそれぞれに、全症例で共通して白血病細胞でメチル化状態にある一方で、寛解期骨髄では高頻度に脱メチル化状態にある複数の CpG 配列を同定した。

白血病に特異的なメチル化状態が存在する

診断時検体には正常血球が一定レベルで混入している一方で、寛解状態の骨髄には残存白血病細胞が混入していると想定されることから、診断時検体で平均 80%以上の高メチル化率を示す一方で、寛解期検体において平均 5%未満の非メチル化を示す CpG 配列のうち、CpG 配列が集簇している CpG アイランドにあるものを一次検索した。その結果、B 前駆細胞型 ALL で 53 カ所、T 細胞型 ALL で 42 カ所 (16 カ所は共通) が該当した。さらに詳細に確認したところ、診断時検体が高メチル化率であり、寛解期検体の半数前後が MRD 陽性の判断基準とされる 0.1%未満である CpG 配列を複数同定した。

候補部位のメチル化は再発時検体でも維持されている

ALL の診断時にも複数の派生クローンが存在し、化学療法を行うとマイナーな耐性クローンが選択的に残存・拡大してくることがあることが報告されている。このような場合には、現行法では MRD が正しく評価できない可能性がある。そこで、初発時と再発時のデータセットにおいてメチル化状態を比較したところ、27 組全てにおいて、いずれの候補配列においても再発時にメチル化が維持されていた。したがって、これらの CpG 配列におけるメチル化状態は派生クローンでも維持されており、安定した MRD の指標になると期待された。

メチル化 PCR によって高精度での定量解析が可能である

データベースのメチル化率は単独の CpG 配列における評価であるが、候補としてリストアップした CpG 配列はいずれも CpG 配列が集簇した CpG island 内に位置しており、CpG island 全体がメチル化されていると想定される。DNA をバイサルファイト処理すると非メチル化シトシンはウラシルに変換される一方で、メチル化シトシンは影響を受けない。そこで、非メチル化状態に対応したプライマー(ウラシルはアデニンと相補的)と、メチル化状態に対応したプライマーを

それぞれ設計し、バイサルファイト処理した DNA でそれぞれ real time PCR を行うことで、メチル化状態を高精度で定量解析することが可能になる。両側 20 塩基余りのプライマー内部にそれぞれ複数ヶ所の CpG 配列が含まれるように設計することで、単独の CpG 配列よりも高精度での評価が可能になると想定されたが、臨床検体での primer 設計に難渋した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------