

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16832

研究課題名（和文）小児急性骨髄性白血病におけるD型サイクリン遺伝子異常の解明と新規治療法開発

研究課題名（英文）Identification of D-type cyclin gene abnormalities and development of novel therapeutic strategies in pediatric acute myeloid leukemia

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）：本研究では、t(8;21)という染色体異常を有する急性骨髄性白血病(AML)患者サンプルのゲノム解析により、CCND2遺伝子の変異や高発現を高頻度に見出した。さらに、t(8;21)AML細胞株および臨床サンプルにおいて、CDK4/6とオートファジーの同時阻害が、in vitro/in vivoで相乗的な抗腫瘍効果をもたらすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではt(8;21)という染色体上を持つ急性骨髄性白血病(AML)の患者から収集したサンプルを用いて遺伝子異常を調べることで、CCND2という遺伝子に変異や高発現が高頻度に見られることを明らかにした。これはAMLを引き起こすメカニズムの解明につながる成果である。またCDK4/6とオートファジーを同時に阻害することが、t(8;21)AML細胞に対し有効である可能性を見出した。これはすぐに臨床応用される成果ではないが、将来的にAMLの個別化医療に結びつく可能性のある知見である。

研究成果の概要（英文）：In this study, genomic analysis of t(8;21) acute myeloid leukemia (AML) patient samples revealed frequent mutations and overexpression of CCND2 gene. Furthermore, we demonstrated that simultaneous inhibition of CDK4/6 and autophagy exerts synergistic anti-tumor effects in vitro/in vivo in t(8;21) AML cell lines and clinical samples.

研究分野：血液腫瘍

キーワード：白血病 AML 遺伝子異常 t(8;21) CCND2 CDK4/6 オートファジー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小児における急性骨髄性白血病(AML)は、日本で年間 100~200 人が発症する比較的にまれな疾患である。しかしながら、その予後は小児白血病の中で最も不良であり、5 年生存率は 60%台にとどまる。よって小児 AML の発症メカニズムの解明に基づく新規治療法開発が急務である。

研究代表者は網羅的遺伝子解析によって、小児 AML の中でも MLL 遺伝子再構成を伴う症例において新規 CCND3 遺伝子変異を同定した。CCND3 遺伝子は D 型サイクリンの一つである 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を正に調節しているため、CCND3 遺伝子変異による cyclin D3 の脱制御が本疾患の病態に関与していると考えられた。そこで CCND3 遺伝子変異陽性の MLL 再構成 AML 細胞株に対し、乳がんにて臨床応用されている CDK4/6 阻害剤を反応させたところ、著効することを見出した。しかしながら、MLL 再構成 AML 以外の病型における D 型サイクリン遺伝子異常については多くが不明である。

t(8;21)(q22;q22)/RUNX1-RUNX1T1(以降 t(8;21))は、AML で最も頻度の高い染色体異常の一つである。そこで本研究では主に t(8;21)を伴う AML に着目して研究を実施した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、t(8;21) AML における D 型サイクリン遺伝子異常の種類・割合を明確にすること、t(8;21) AML 細胞における D 型サイクリン遺伝子異常の果たす役割および CDK4/6 阻害剤の有効性を明らかにすることである。

3. 研究の方法

日本小児がん研究グループ(JCCG)の臨床試験余剰検体のゲノム解析、および public data の再解析による D 型サイクリン遺伝子異常の同定を行った。また、t(8;21)AML の細胞株及び臨床サンプル、AML マウスモデルを用いた CDK4/6 阻害剤の有効性、相乗効果を発揮する併用薬の検討を実施した。

4. 研究成果

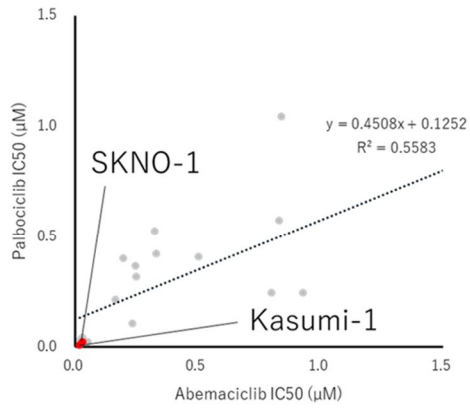
AML 患者検体の網羅的遺伝子解析、および public data の再解析により、小児と成人の両方の t(8;21)AML 患者において約 10%の割合で CCND2 遺伝子変異が検出された(図 1)。CCND2 遺伝子変異は PEST ドメインに局在していたことから、本遺伝子がコードする cyclin D2 タンパク質の安定化に関与していると考えられた。さらに AML 患者サンプルおよび AML 細胞株の両方で、他の病型と比較して t(8;21)AML において CCND2 遺伝子の mRNA 発現が高いことが示された(図 2)。そこで t(8;21)AML 細胞株において CCND2 遺伝子をノックダウンしたところ、細胞周期 G1/S 期の進行阻害、細胞増殖抑制がみられた(図 3)。この結果から、t(8;21)AML における CCND2 遺伝子の脱制御が治療ターゲットとなる可能性が考えられた。

Cyclin D2 タンパク質は、CDK4/6 と複合体を形成し、Rb タンパク質をリン酸化することにより、G1 期から S 期への細胞周期の進行を誘導する。そこで、近年乳癌を含む固形癌治療にて承認され、その有効性が報告されている CDK4/6 阻害剤(Palbociclib、Abemaciclib)が有効であると仮定した。そこで 19 の AML 細胞株を使用して CDK4/6 阻害剤への感受性を調べた結果、2 種類の t(8;21)AML 細胞株(Kasimi-1、SKNO-1)は非 t(8;21)AML 細胞株と比較して IC50 が低く(図 4)、CDK4/6 阻害剤による顕著な細胞増殖抑制、G1/S 期における細胞周期抑制効果がみられた(図 5)。またマイクロアレイ解析にて、t(8;21)AML 細胞株に CDK4/6 阻害剤を作用させ、1.5 倍以上発現が変化した遺伝子を抽出し解析した。その結果、PI3K-AKT-mTOR 経路と MAP-ERK 経路の抑制が見いだされ、オートファジーへの関与が考えられた。そこで t(8;21)AML 細胞株において CDK4/6 阻害剤によるオートファジー誘導をウエスタンブロットおよび電子顕微鏡にて評価したところ、オートファジーのマーカーである LC3B-II/I の増加およびオートファゴソームの増加が観察された(図 6)。オートファジーは各種癌における化学療法への耐性に関与していることが知られており、オートファジーの同時阻害が有望な治療戦略となるかを次に検討した。

t(8;21)AML 細胞株において、CDK4/6 やオートファジーを阻害した場合のアポトーシスの割合をフローサイトメトリーで評価した。CDK4/6 阻害剤単独でもアポトーシス陽性細胞の増加がみられたが、CDK4/6 阻害剤とオートファジー阻害剤との共処理では、より高い割合のアポトーシス陽性細胞およびカスパーゼ-3 タンパク発現量の上昇がみられた(図 7)。一方、コントロールに対しオートファジー阻害剤単独の処理では有意差を示さなかった。1 例の小児 t(8;21) AML 患者由来の primary 細胞を用いた検討でも、同様の結果が得られた。さらに、t(8;21)AML 細胞をマウスに皮下移植した系において、CDK4/6 とオートファジーの同時阻害が相乗的な抗腫瘍効果をもたらすことを明らかにした(図 8)。

以上より、CCND2 遺伝子の脱制御を伴う t(8;21)AML に対し、CDK4/6 とオートファジーの阻害が、有効な新規治療戦略となる可能性が考えられた。

AML cell line(n=19)



- t(8;21)AML (n=2)
- Non- t(8;21)AML (n=17)

t(8;21) AML		IC50 (µM)	
FAB	Cell lines	Palbociclib	Abemaciclib
M2	Kasumi-1	0.0186	0.0089
	SKNO-1	0.0319	0.0212

Non-t(8;21) AML		IC50 (µM)	
FAB	Cell lines	Palbociclib	Abemaciclib
M0	Kasumi-3	0.8013	0.2462
	MOLM16	0.2361	0.1044
M1	KG-1a	0.0219	0.0330
M2	HL-60	1.9890	0.9009
	Kasumi-6	0.8351	0.5739
M3	KO52	0.3313	0.4224
	NB-4	0.2517	0.3163
M4	UF-1	0.1655	0.2151
	ML-2	0.5063	0.4068
M5	THP-1	0.8431	1.0442
	U937	0.1989	0.4016
M5a	MV4-11	0.0543	0.0241
	MOLM13	0.0315	0.0440
	NOMO-1	0.3263	0.5252
M6	HEL	0.2486	0.3677
	KG-1	0.0254	0.0166
M7	CMK-86	0.9319	0.2441

図 4. 各種 AML 細胞株に対する CDK4/6 阻害剤の有効性(IC50)

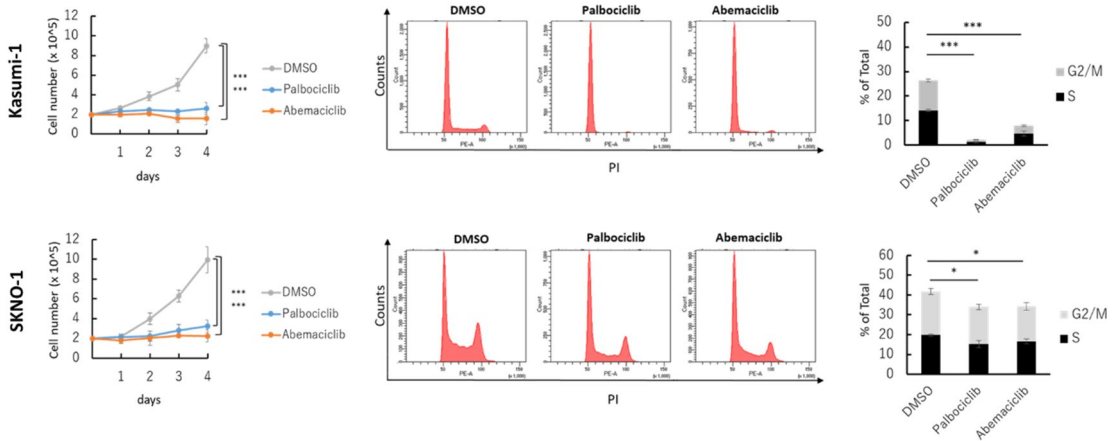


図 5. t(8;21)AML 細胞株に対する CDK4/6 阻害剤の効果

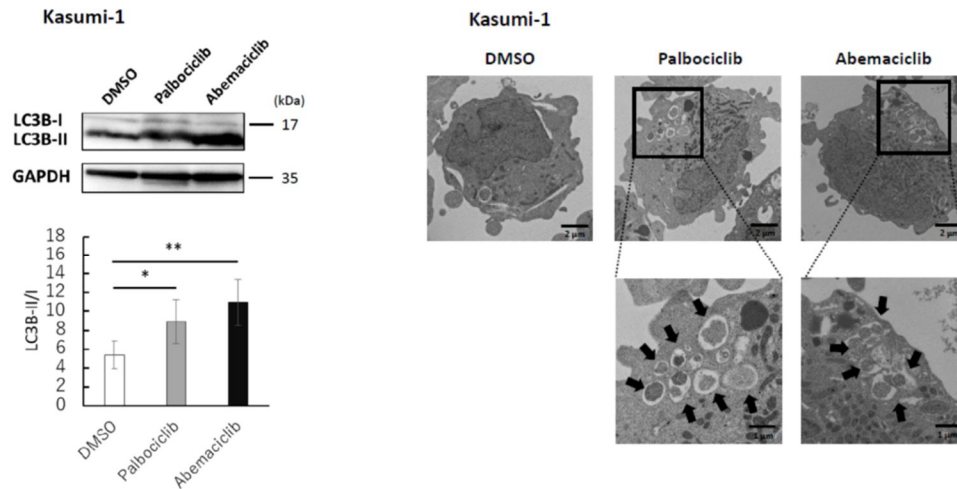


図 6. t(8;21)AML 細胞株に対する CDK4/6 阻害剤のオートファジー誘導効果

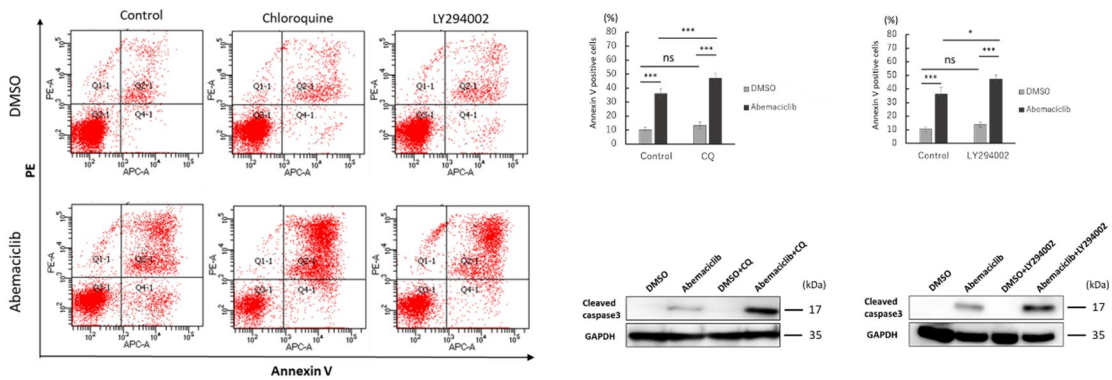


図 7. t(8;21)AML 細胞株における CDK4/6・オートファジーの同時阻害によるアポトーシス誘導効果

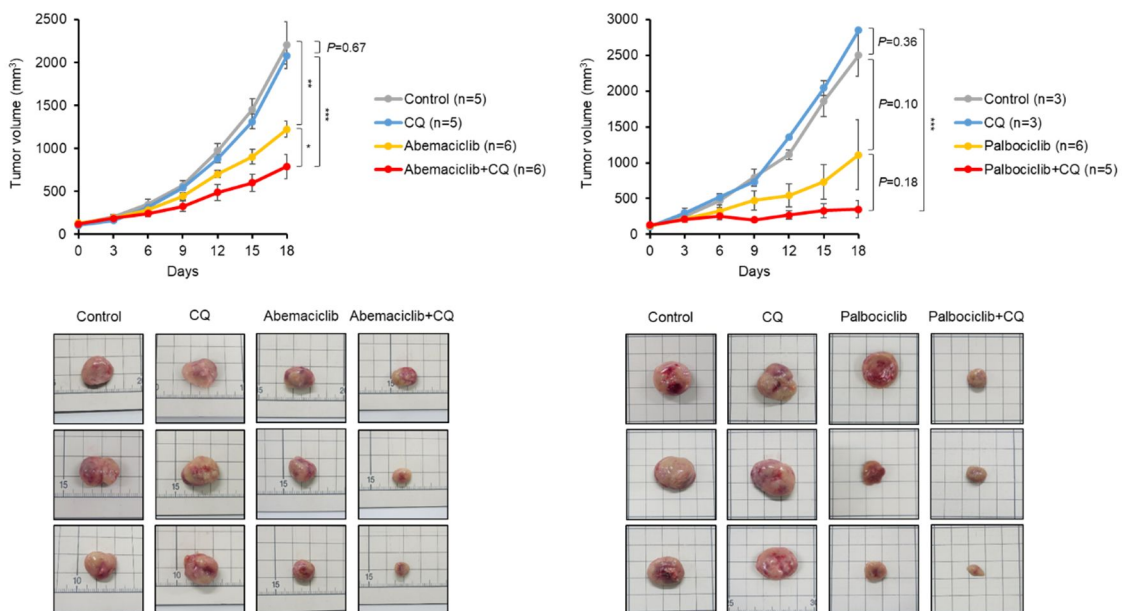


図 8. t(8;21)AML マウスモデルにおける CDK4/6・オートファジーの同時阻害による抗腫瘍効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Matsuo Hidemasa, Nakatani Kana, Harata Yutarou, Higashitani Moe, Ito Yuri, Inagami Aina, Noura Mina, Nakahata Tatsutoshi, Adachi Souichi	4. 巻 27
2. 論文標題 Efficacy of a combination therapy targeting CDK4/6 and autophagy in a mouse xenograft model of t(8;21) acute myeloid leukemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101099 ~ 101099
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2021.101099	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakatani Kana, Matsuo Hidemasa, Harata Yutarou, Higashitani Moe, Koyama Asami, Noura Mina, Nishinaka-Arai Yoko, Kamikubo Yasuhiko, Adachi Souichi	4. 巻 113
2. 論文標題 Inhibition of CDK4/6 and autophagy synergistically induces apoptosis in t(8;21) acute myeloid leukemia cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 243 ~ 253
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-020-03015-4	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 松尾 英将	4. 巻 80(1)
2. 論文標題 AML治療におけるCDK4/6阻害薬の作用機序と有効性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 血液内科（科学評論社）	6. 最初と最後の頁 28 ~ 33
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39件（うち招待講演 0件／うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Yutarou Harata, Hidemasa Matsuo, Moe Higashitani, Kana Nakatani, Yuri Ito, Yasuhiko Kamikubo, Souichi Adachi
2. 発表標題 In vivo efficacy of CDK4/6 and autophagy inhibition on t(8;21) acute myeloid leukemia
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kana Nakatani, Hidemasa Matsuo, Yutarou Harata, Moe Higashitani, Asami Koyama, Mina Noura, Yoko Nishinaka-Arai, Yasuhiko Kamikubo, Souichi Adachi
2. 発表標題 Autophagy Inhibition Enhances CDK4/6 Inhibitor-Induced Apoptosis in t(8;21) Acute Myeloid Leukemia Cells.
3. 学会等名 62nd ASH Annual Meeting & Exposition (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kana Nakatani, Hidemasa Matsuo, Yuki Morimoto, Yasuhiko Kamikubo, Souichi Adachi
2. 発表標題 CDK4/6 and autophagy inhibitors synergistically induce apoptosis in t(8;21) AML cells.
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中谷香菜, 松尾英将, 上久保靖彦, 足立壯一
2. 発表標題 Induction of autophagy by CDK4/6 inhibition in t(8;21) acute myeloid leukemia cells.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
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
---------	---------