

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17873

研究課題名（和文）急性骨髄性白血病におけるRAS経路関連遺伝子の意義

研究課題名（英文）The clinical features of de novo AML with RAS signal transduction pathway genes mutation

研究代表者

由井 俊輔（Yui, Shunsuke）

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：30740542

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）：(1)急性骨髄性白血病（AML）の約1400検体の遺伝子解析の結果、正常核型でFLT3-ITD遺伝子変異陰性かつNPM1遺伝子変異陽性患者群で、RAS経路関連遺伝子のN-RAS遺伝子変異陽性群とK-RAS遺伝子変異陽性群が予後良好の傾向であった。
 (2)一方で、正常核型でFLT3-ITD遺伝子変異陰性かつNPM1遺伝子変異陰性患者群で、RAS経路関連遺伝子のK-RASとNF1遺伝子変異陽性群が予後不良の傾向であった。
 (3)また、正常核型でFLT3-ITD遺伝子変異陰性かつNPM1遺伝子変異陽性患者群で、他のclass I 遺伝子のJAK3とWT1に遺伝子変異があると予後不良な傾向であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

正常核型のAMLにおけるRAS経路関連遺伝子が予後にどのような影響を及ぼすか明らかにした。今回の発見により、これまで予後中間群と判定していた症例の一部が、移植を行うべきタイミングを診断時に決定できる。RAS経路関連遺伝子全体では予後因子にはならず、N-RAS、K-RAS、HRAS、PTPN11、NF1、CBLにわけて調べる必要がある。HRASやCBLは頻度が少なく、予後因子にはならない傾向であったので、今後調べる必要はないかもしれない。その他の遺伝子のN-RAS、K-RAS、PTPN11、NF1に関しては、NPM1遺伝子変異との兼ね合いで予後がかわることから、一緒に調べる必要がありそうである。

研究成果の概要（英文）：(1)Genetic analysis of approximately 1400 samples of acute myeloid leukemia patients showed a trend toward a better prognosis in the N-RAS mutation-positive and K-RAS mutation-positive groups of RAS pathway-related genes in the normal karyotype, FLT3-ITD mutation-negative and NPM1 mutation-positive patient group.
 (2)On the other hand, patients with normal karyotype, negative for FLT3-ITD mutation and negative for NPM1 mutation tended to have a poor prognosis in the K-RAS and NF1 mutation-positive groups.
 (3)In the group of patients with normal karyotype, negative for FLT3-ITD mutation and positive for NPM1 mutation, mutations in other class I genes, JAK3 and WT1, were associated with a poor prognosis.

研究分野：急性骨髄性白血病

キーワード：急性骨髄性白血病 RAS経路関連遺伝子 N-RAS K-RAS H-RAS PTPN11 NF1 CBL

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病(AML)の治療は、イダルビシンとシタラビンもしくはダウノルビシンとシタラビンを使用した寛解導入療法をまず行い、寛解に至ったら地固め療法として大量のシタラビンを使用するのが一般的である。さらに症例によっては同種造血幹細胞移植(allo-HSCT)を行う必要があり、診断時に染色体の検査や遺伝子変異の検査で予後不良であると判明した場合は、第一寛解期に allo-HSCT を行う。予後中間群に関しては、兄弟間で HLA フルマッチのドナーがいれば allo-HSCT を行うことが推奨されているが、それ以外の予後中間群の症例や予後良好群の症例は再発した場合に骨髓バンクや臍帯血バンクからドナーを探して allo-HSCT を行うこととなる。(予後分類は European Leukemia Net(ELN)や National Comprehensive Cancer Network(NCCN)のガイドラインを参照している)

Allo-HSCT は AML の根治を目指すには有用な治療法であるが、治療関連死亡率が 15-20%と高いため、症例の予後を予測して適切に実施する必要がある。前述のような移植適応の考え方でも allo-HSCT を行う症例を選択していると、移植を行わなくても寛解を維持できたかもしれない予後中間群症例に、兄弟の HLA フルマッチドナーがいるがために移植を行い、治療関連死させてしまうこともある。現時点の ELN や NCCN のガイドラインでは、半数以上の症例は予後中間群に分類され、予後の層別化は十分とはいえない。さらには、移植が不要なはずの予後良好群に分類される症例でも、寛解導入療法や地固め療法の効果がなく、非寛解での allo-HSCT が必要になることがあり、現在の予後分類では診断時に治療方針を明確に決定できる症例は少ない。よって、さらなる予後の正確な層別化と allo-HSCT の適応を、AML 診断時に見極めていくことが課題であり、その一つの切り口として RAS 経路関連遺伝子(NRAS、KRAS、HRAS、PTPN11、NF1、CBL)に注目した。

AML の分野では次世代シーケンサー(NGS)を用いた網羅的遺伝子変異解析が進み、頻度 5%以上の遺伝子変異はほぼ全て同定された。遺伝子変異解析において、FLT3-ITD 遺伝子変異は予後不良因子として確固たる地位を確立しているが、一方で FLT3-ITD 変異陰性の群は NPM1 変異陽性群や CEBPA 両アレル変異群が予後良好と一部解明されている。しかし、その他多くの症例は予後分類が明確になされていない。今回注目した RAS 経路関連遺伝子は、細胞内増殖シグナル伝達を調整しており、細胞増殖に関与していることが知られている。細胞外シグナルを核に伝達する過程で、RAS 蛋白が guanosine triphosphate(GTP)と結合することで活性型となるが、RAS 経路関連遺伝子変異があるとその経路が恒常的に活性化される。そのため、RAS 経路関連遺伝子変異は AML 発症に強く関与していると考えられている(他の腫瘍でも RAS 経路関連遺伝子の報告が散見される)。小児の造血器腫瘍では RAS 経路の遺伝子解析は進んでおり、PTPN11、NRAS、KRAS、NF1 の遺伝子異常は若年性骨髄単球性白血病(JMML)の 80%にみられ、それぞれはほぼ重複せずみだされることから、これらの変異が単独で RAS シグナル伝達を活性化し、JMML の発症に関わっていると考えられている。成人では頻度は下がるものの、AML に NRAS や KRAS 遺伝子変異が 10~20%程度、PTPN11 遺伝子変異は 5~10%程度、NF1 欠失・変異は 12~30%程度と報告されている。RAS 経路遺伝子変異は上記を合わせると 40%くらいになり、AML での最大の遺伝子変異群となる。RAS 遺伝子変異群は AML 最大の遺伝子変異として考えることができ、本研究の発想の起点でもある。

2. 研究の目的

本研究は「治療開始後どのタイミングで同種造血幹細胞移植(allo-HSCT)を行うべきか」という臨床現場で生まれた問いに対して答えを見つけることが目的である。今回検証する RAS 経路関連遺伝子に関しては、NRAS、KRAS、PTPN11、NF1 などについてはすでいくつかの報告があるものの、臨床的特徴や予後の報告に一定の見解がない。RAS 経路関連遺伝子が AML の予後にどのような影響を及ぼすか明らかになっていないと考えてよいだろう。RAS 経路関連遺伝子全体で検討された報告はなく、NRAS、KRAS、HRAS、PTPN11、NF1、CBL それぞれが予後因子としてどのような意味合いをもつのかと同時に、RAS 経路全体で考えたときに予後因子となり得るのかも検討したい。また、RAS 経路の遺伝子は予後因子として確立されつつある NPM1 や DNMT3A との重複が多く、関連を調べた報告もないことから、これらとの関連を調べることで予後を層別化できる可能性があるのではないかと考えた。

3. 研究の方法

研究方法としては、AML への治療反応性を RAS 経路関連遺伝子変異と他の遺伝子変異との併存ごとに NGS で解析し、RAS 経路関連遺伝子変異の臨床的意義を調べる。さらには in vitro で、遺伝子導入を行った細胞の増殖曲線や薬剤感受性を検討し、機能解析で遺伝子変異の意義を明らかにする。

(1) RAS 経路関連遺伝子変異を有する AML 症例の臨床的特徴と予後を明らかにする。

de novo AML の初発検体、AML 再発検体、骨髓異形性症候群(MDS)の白血化検体、骨髓増殖性腫瘍(MPN)からの白血化検体の約合計 1400 検体を対象に Ion Proton™ シーケンサーを

用いて NRAS、KRAS、HRAS、PTPN11、NF1、CBL 変異のスクリーニングを行い AML 初発時における RAS 経路関連遺伝子変異の頻度、再発時におけるこれらの変異のクローナリティーの変化、難治性と考えられている MDS や MPN からの AML 症例におけるこれらの遺伝子変異の頻度を明らかにする。今回対象となるそれぞれの検体に関しては我々がこれまで行ってきた「急性骨髄性白血病における予後規定因子となる遺伝子変異の探索」、「慢性骨髄増殖性疾患における JAK2 遺伝子、MPL 遺伝子、TET2 遺伝子変異の研究」においてすでに収集済みである。遺伝子変異解析に関して RAS 経路関連遺伝子変異以外に FLT3-ITD、NPM1、CEBPA や、骨髄系腫瘍において変異が報告されている 55 の遺伝子を同時に網羅的に変異解析予定である。

前述のスクリーニングで得られた RAS 経路関連遺伝子変異陽性 AML 症例の臨床的特徴を解析する。臨床的特徴は、「急性骨髄性白血病における予後規定因子となる遺伝子変異の探索」の研究で収集している年齢、性別、リンパ節腫脹、肝脾腫、歯肉腫脹、Performance Status、白血球数、骨髄芽球数、末梢血芽球数、Hb 値、血小板数、LDH 値、染色体分析、FAB 分類、中枢神経浸潤の有無、治療法、移植の有無、初診日、寛解日、再発日、死亡日などに関して解析をおこなう。

(2) AML における RAS 経路関連遺伝子変異の白血病発症機能の解明と新規治療の探索

これまでの小児 AML における解析では NRAS 変異を認める AML は予後良好、PTPN11 を認める AML は予後不良と同じ RAS 経路関連遺伝子変異でも予後が異なることが報告されている。そこで各 RAS 経路関連遺伝子変異の細胞増殖活性に違いがどの程度あるのかを *in vitro* で解析する。具体的には上記の変異スクリーニングで各遺伝子での頻度の高い変異をヒト血球系 GM-CSF 依存性細胞株の MO7e と F-36P や IL3 依存性マウス AML 細胞株である 32Dc に遺伝子導入をする。遺伝子導入は、pDON-AI-2 CAP1-GFP をリポフェクション法でエコトロピック細胞の BOSC23 に導入しレトロウイルスを作らせてから、それをアンフォトロピック細胞 ψ CRIP に感染させて MO7e と F-36P、32Dc へ各 CAP1-GFP の遺伝子導入を行う。各遺伝子変異発現細胞に対してサイトカイン非依存性細胞増殖活性の有無とその程度の違い、シタラビンによるアポトーシス誘導に対する耐性、PI3-kinase などの RAS 経路の細胞内下流シグナルのリン酸化活性の違いなどを評価する。

AML において認められる RAS 経路関連遺伝子変異に対しての RAS 経路阻害薬の効果を検証する。具体的には、ロミデプシンの投与をまずは考えている。末梢性 T 細胞リンパ腫に対して治療効果が認められる HDAC 阻害薬であるロミデプシンはもともと藤沢製薬が抗 RAS 薬として開発を行った薬剤であり PI3-kinase 下流の抑制効果がある。その他には、RAS が活性化して増殖が高まるとブドウ糖代謝が亢進し、その結果ブドウ糖欠乏に弱くなるため、ブドウ糖類似体は選択性の抗腫瘍効果があることが示されて(Nature 531:110, 2016)、我々の作成した細胞でも検証を行いたい。上記で作成した各 RAS 経路関連遺伝子変異導入細胞でこれらの分子標的薬の単剤だけではなく、シタラビン併用の抗白血病効果を検証する。

4. 研究成果

急性骨髄性白血病 (AML) の約 1400 検体の遺伝子解析の結果、正常核型で FLT3-ITD 遺伝子変異陰性かつ NPM1 遺伝子変異陽性患者群で、RAS 経路関連遺伝子の N-RAS 遺伝子変異陽性群と K-RAS 遺伝子変異陽性群が予後良好の傾向であった。また、正常核型で FLT3-ITD 遺伝子変異陰性かつ NPM1 遺伝子変異陰性患者群で、RAS 経路関連遺伝子の K-RAS と NF1 遺伝子変異陽性群が予後不良の傾向であった。また、CBF-AML においては KIT 遺伝子の D816 変異が陽性の症例が予後不良と我々が報告しているが、それを除いて RAS 経路関連遺伝子を検証したところ、K-RAS と NF1 遺伝子変異陽性群が予後不良な傾向であった。

これら臨床データから得られた情報が真実であることを確認するために、IL3 依存性マウスの AML 細胞株である 32Dc に N-RAS と K-RAS さらに NPM1 遺伝子の野生型と変異型を導入した。薬剤感受性試験や機能解析を行うことを考えていたが、32Dc に N-RAS と K-RAS の遺伝子変異型を導入した細胞について、細胞増殖がむしろ低下してしまい、遺伝子導入した細胞は検鏡したところ単球系へ分化していた。そこで、ヒトの MDS 細胞で GM-CSF 依存性細胞株の F-36P に N-RAS と K-RAS、NPM1 遺伝子の野生型と変異型を導入することを試みた。これに関して細胞増殖が予想に反して低下してしまい、再度実験系を検証している段階である。

また、正常核型で FLT3-ITD 遺伝子変異陰性かつ NPM1 遺伝子変異陽性患者群で、他の class I 遺伝子の JAK3 と WT1 に遺伝子変異があると予後不良な傾向であったことから、上記と同様に 32Dc や F36P へ JAK3 や WT1 を導入し、N-RAS や K-RAS の遺伝子変異群と比較することも行いたいと考えているが、その前段階の実験で止まっている。

細胞実験に関しては予想していた結果が得られず、再考中ではあるものの、臨床データの蓄積が進み、解析可能な AML 患者さんの検体と臨床データが、当初の予定よりも 1000 症例近く増えた。現在も次世代シーケンサーで 500 検体を追加で解析しており、合計で 2000 症例以上のデータから遺伝子に関する予後分析のデータを報告できそうである。

前述の RAS 経路関連遺伝子と予後に関する臨床データを再検証し、まずは臨床データの論文化を予定している。さらに、そこから細胞を使用した実験計画を組みなおす予定である。

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
---------	---------