

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03653

研究課題名（和文）中枢神経系白血病の骨髄非依存的生存の分子基盤の解明

研究課題名（英文）Investigation of molecular biology of CNS leukemia

研究代表者

加藤 元博（Kato, Motohiro）

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：40708690

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、髄外再発に至る治療抵抗性の分子メカニズムを明らかにするため、髄外再発ALL患者11名を対象に、全エクソームシーケンスを実施した。髄外再発時のゲノムプロファイルは、初発時のものと異なっており、診断時のマイナークローンが再発に寄与していることが示唆された。さらに、その11個中5個に遺伝子Xに異常があることを見出し、この異常のあるALLは有意に高い再発率を示すことが別のALLコホートでも確認された。遺伝子Xの機能抑制によりDNA修復が速やかに行われることが確認され、化学療法によって誘発されるDNA損傷に対して白血病細胞の生存を有利にする可能性があることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性リンパ性白血病の治療成績は向上し、免疫療法薬剤などの開発により骨髄再発のコントロールは可能になった。一方で、依然として中枢神経再発に対する治療開発は限られており、頭蓋照射などは晩期合併症の高リスクとなる。本研究の成果により、中枢神経再発の機序が明らかになり、再発リスクの特定だけでなく、中枢神経再発の機序を直接の標的とした治療開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, whole exome sequencing was performed in 11 patients with extramedullary relapsed ALL to elucidate the molecular mechanisms of treatment resistance leading to extramedullary recurrence. The genomic profile at relapse differed from that at initial disease, suggesting that minor clones at diagnosis contributed to the recurrence. In addition, 5 of the 11 were found to have abnormalities in gene X, and high relapse rate of patients with this alteration was reproduced in the validation cohort. The results confirm that suppression of gene X function results in rapid DNA repair and may favor survival of leukemic cells against chemotherapy-induced DNA damage.

研究分野：小児科学、分子遺伝学

キーワード：癌 白血病

1. 研究開始当初の背景

(1) 小児白血病の治療と残された課題

白血病は小児期のがんの中で最も罹患頻度が高い造血器腫瘍である。小児白血病の治療成績はこの数十年で向上し、70-80%の長期生存率が達成された (Kato M, et al. *Pediatrics Int* 60:4-12, 2018)。しかし、その改善した治療成績の裏側で、依然として白血病により命を落とす小児患者が罹患者の 20-30%の割合で経験されている。小児白血病のおもな死亡要因はやはり再発であるため、「いかにして再発率を低下させるか」は小児白血病の治療開発における継続的な課題として残されている。

(2) 小児白血病の中樞神経系再発

本研究では、白血病の「中樞神経系再発」の分子病態に焦点を置く。白血病の治療に用いられる化学療法剤は血液脳関門 (blood brain barrier: BBB) に阻害されることから、中樞神経系浸潤への対策なしでは、骨髄では寛解を維持している状態でも、高率に中樞神経系からの再発が生じる (図1)。

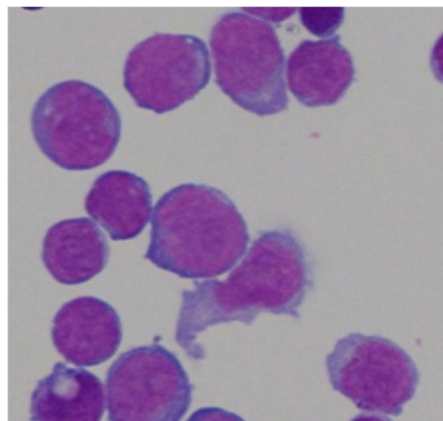


図1. 中樞神経に浸潤した急性リンパ性白血病細胞

白血病の中樞神経系からの再発を防ぐための治療として、1970年代までは頭蓋照射が主流であったが、頭蓋照射は二次がんや認知機能障害など晩期合併症のリスクとなることが明らかとなり、「いかに放射線照射を回避しながら中樞神経系再発への対策を行うか」は近年の小児白血病の治療開発における大きなテーマであった。大量メソトレキセート療法や髄注の強化により頭蓋照射の代替が可能になってきているが、依然として一定の割合で中樞神経系再発が生じているだけでなく、頻回の髄注でも白質脳症などの神経合併症が誘発され、認知機能を起こしうるということが明らかになった。すなわち、これ以上の化学療法/放射線照射の強化では晩期合併症と引き換えになることから、中樞神経系再発に向けた新たな治療戦略の開発が求められている。

近年、キメラ抗原受容体 T 細胞 (CAR-T) や抗体医薬など、免疫機構を利用した immunotherapy が難治性白血病の治療を大きく変える新たな選択肢として登場し、診療への実装が始まっている。しかし、これらの薬剤は中樞神経系白血病への効果は不十分であり、むしろ高サイトカイン血症などによる神経合併症が問題となる。治療開発により全身病変の管理が可能になってきた現在こそ、中樞神経系白血病への対策が必要である。

(3) 骨髄"非"依存的な白血病細胞の増殖をもたらす分子病態基盤の解明

白血病細胞は血液細胞ががん化した細胞であり、本来は骨髄外の環境への親和性は低く、中樞神経系などの環境下で自己複製・生存する能力はもたないはずである。しかし、中樞神経系のみでの再発もしばしば経験されることを踏まえると、骨髄外に浸潤し再発する白血病は、そのような非造血環境下でも増殖・生存できる能力をもたらす何らかの分子遺伝学的な変異を獲得しているという仮説に至る。この「白血病の骨髄"非"依存的な生存を可能にする分子遺伝学的基盤は何か？」が本研究課題の核心をなす学術的「問い」である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、中樞神経系などの骨髄外の組織に浸潤・再発した白血病細胞の解析により、基盤となるゲノム異常を特定し、そこからもたらされる分子病態を検証することで、骨髄"非"依存的な環境での増殖 (= bone marrow independency) を獲得させ、治療抵抗性に関与する分子遺伝学的な病態を解明することである。

3. 研究の方法

本研究では、骨髄外浸潤・再発した白血病患者の検体を用いて、治療に抵抗性を示し、中樞神経環境での生存有意性をもたらすゲノム異常を探索し、PDX マウスを用いて生体内で骨髄外浸潤の評価を行う。以下に具体的な計画を示す。

(1) 骨髄外浸潤と関連する白血病細胞の DNA/RNA 解析

中樞神経系などの骨髄外から浸潤・再発した白血病患者から採取した検体を用いて、ゲノム解析を行う。実際には、患者の「骨髄外浸潤した白血病細胞」「骨髄中の白血病細胞」「白血病細胞を含まない寛解期検体」から抽出した DNA を用い、全エクソン解析/全ゲノム解析を実施し、「骨髄外浸潤した白血病細胞」に濃縮されたゲノム異常を探索する。並行して、中樞神経再発リスクの高いゲノム病型について、全エクソン解析などの詳細な解析を追加することでゲノムプロファイルを明らかにする。

(2) 大規模検体でのゲノム解析による意義の確認

次に、discovery cohort により候補となった遺伝子群について、一般の (unselected な) 白血病の検体を validation cohort として遺伝子を絞った解析を実施し、中枢神経系などの骨髄外再発のリスクになっているかどうかを確認する。

(3) 骨髄外白血病にみられたゲノム異常の機能解析 >

これまでに述べたゲノム解析の結果によって特定された「骨髄外白血病の背景にある分子基盤」の候補となる遺伝子について、その遺伝子の異常が白血病細胞に "bone marrow independency" を獲得させていることを検証するために、機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) 中枢神経再発リスクの高い白血病の分子病態

急性リンパ性白血病の中で、中枢神経再発のリスクが高いとされているゲノム異常がいくつか報告されているが、その中で TCF3-PBX1 および BCR-ABL1 に着目した。TCF3-PBX1 陽性で腫瘍形成をするリンパ芽球性リンパ腫¹や、BCR-ABL1 陽性の T 細胞性白血病²など、特殊な病型のもつゲノムプロファイルについて明らかにした。

(2) 中枢神経再発白血病の分子病態

中枢神経系などの髄外に再発した白血病の検体を収集し、まずは 11 例の discovery コホートについて、初発白血病細胞と再発白血病細胞、および寛解期検体の組み合わせを用いて全エクソン解析を行った。髄外再発白血病のゲノムプロファイルは、それらの初発時のものと異なっており、診断時のマイナークローンが再発に寄与していることが示唆された。すなわち、頭蓋再発に寄与するゲノム異常は、従来の分子病態探索で主眼的に検索されてきた「増殖優位性」を必ずしももたらすものではなく、治療抵抗性や、髄外環境での長期生存性をもたらすものであることが示唆された。

さらに、この髄外再発白血病細胞 11 個中 5 個に遺伝子 X の異常があることを見いだした。この遺伝子の異常のある ALL は、一般の (unselected) な 95 例の ALL を対象とした validation コホートにおいても予後不良であった (図 2)。

さらに、コメットアッセイにより、遺伝子をノックダウンした細胞では DNA 修復が速やかに行われることが確認された (図 3)。

遺伝子の機能喪失が化学療法によって誘発される DNA 損傷に対して白血病細胞の生存を有利にする可能性があると考えられた。

< 文献 >

- Shirai R, Osumi T, Sato-Otsubo A, Nakabayashi K, Mori T, Yoshida M, Yoshida K, Kohri M, Ishihara T, Yasue S, Imamura T, Endo M, Miyamoto S, Ohki K, Sanada M, Kiyokawa N, Ogawa S, Yoshioka T, Hata K, Takagi M, Kato M. Genetic features of B-cell lymphoblastic lymphoma with TCF3-PBX1. **Cancer Rep (Hoboken)** 2022, 5, e1559, doi:10.1002/cnr.2.1559.
- Sato-Otsubo A, Osumi T, Yoshida M, Iguchi A, Fukushima T, Nakabayashi K, Ogawa S, Hata K, Kato M. Genomic analysis of two rare cases of pediatric Ph-positive T-ALL. **Pediatr Blood Cancer** 2022, 69, e29427, doi:10.1002/pbc.29427.

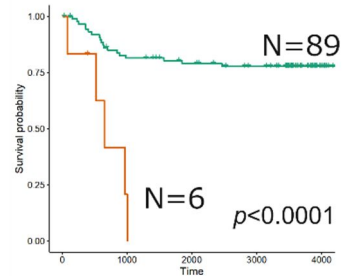


図2. 遺伝子異常の有無と予後

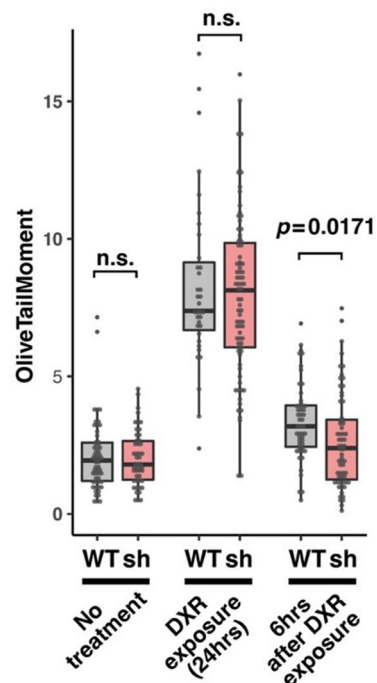


図3. コメットアッセイによる遺伝子修復の変化
遺伝子のノックダウンにより有意に修復速度が速くなる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Shirai R et al. | 4. 巻 Sep 23 |
| 2. 論文標題 Genetic features of B cell lymphoblastic lymphoma with TCF3 PBX1 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Reports | 6. 最初と最後の頁 e1559 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cnr2.1559 | 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 Sato Otsubo A et al. | 4. 巻 69 |
| 2. 論文標題 Genomic analysis of two rare cases of pediatric Ph positive T ALL | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Pediatric Blood & Cancer | 6. 最初と最後の頁 e29427 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pbc.29427 | 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 Yoshida M et al. | 4. 巻 191 |
| 2. 論文標題 Prevalence of germline GATA2 and SAMD9/9L variants in paediatric haematological disorders with monosomy 7 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 British Journal of Haematology | 6. 最初と最後の頁 835 ~ 843 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bjh.17006 | 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 - |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

| |
|------------------------------|
| 1. 発表者名 佐藤亜以子 |
| 2. 発表標題 小児白血病の薬剤耐性獲得の分子病態 |
| 3. 学会等名 第81回日本癌学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022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 |
|-----------|---|--|----|
| 研究 分担者 | 内山 徹 (Uchiyama Toru) (10436107) | 国立研究開発法人国立成育医療研究センター・成育遺伝研究部・室長 (82612) | |
| 研究 分担者 | 加藤 格 (Kato Itaru) (10610454) | 京都大学・医学研究科・助教 (14301) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|