

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08157

研究課題名(和文) 小児非ダウン症急性巨核芽球性白血病の新規分子標的探索

研究課題名(英文) Molecular analysis of pediatric acute megakaryoblastic leukemia without Down syndrome

研究代表者

嶋田 明 (SHIMADA, AKIRA)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：70391836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：10例のAMKL検体について遺伝子パネル解析を行ったところ、KIT, SPI1, GATA1, NCOR2, SETBP1, CSF3R, など様々な遺伝子変異が見つかったが、共通性はなく、heterogenousな疾患と考えられた。AMKL細胞株で新規薬剤の効果を調べたところ、JAK阻害剤が有望だったので、6つのAMKL細胞株で、cytarabineとJAK阻害剤の効果について検討した。我々の開発した骨髄微小環境を模した間葉系細胞との3D共培養系では、MOLM16とMKPL1の2種類の細胞株でシナジー効果を見られたため、この2株についてマウスの移植実験で検証中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非ダウン症の急性巨核芽球性白血病 (AMKL) は予後不良であるが、遺伝子パネル解析から、変異は個々の症例で異なっていた。AMKL細胞株6種類でcytarabineとJAK阻害剤の効果について検討したところ、MOLM16とMKPL1の2種類の細胞株でシナジー効果を見られたため、この2株についてマウスの移植実験で検証中である。

研究成果の概要(英文)：Gene panel analysis of 10 AMKL specimens revealed various gene mutations such as KIT, SPI1, GATA1, NCOR2, SETBP1, CSF3R, etc., but no commonality, suggesting a heterogenous disease.

We investigated the effects of novel agents in AMKL cell lines and found that JAK inhibitors were promising, so we investigated the impact of cytarabine and JAK inhibitors in six AMKL cell lines. In our 3D co-culture system with mesenchymal cells that mimics the bone marrow microenvironment, synergistic effects were observed in two cell lines, MOLM16 and MKPL1, and these two cell lines are now being tested in transplantation experiments in mice.

研究分野：小児科

キーワード：AMKL JAK阻害剤 次世代シーケンサー解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

ダウン症に合併する急性巨核芽球性白血病（Acute megakaryoblastic leukemia, AMKL）に比べて、非ダウン症に合併する AMKL は予後不良である。近年非ダウン症 AMKL の中でもキメラ遺伝子（*CBFA2T3-GLIS2*、*NUP98-KDM5A*、*RBM15-MKL1*）により予後に差がみられることが明らかとなった。

2. 研究の目的

現在の所 AMKL は他の急性骨髄性白血病（Acute myeloid leukemia, AML）と同一の抗がん剤を使用している。さらなる治療成績の向上のために AMKL の新規分子標的と治療薬の探索を行った。

3. 研究の方法

まず *CBFA2T3-GLIS2* キメラ遺伝子陽性 4 例、*NUP98-KDM5A* キメラ遺伝子陽性 1 例、*RBM15MKL1* キメラ遺伝子陽性 2 例、キメラ遺伝子検出せず 2 例を含む AMKL 10 例（10 例中 6 例で再発、5 例が死亡例）の初診時臨床検体について、白血病関連 163 遺伝子を搭載したターゲットシーケンス解析を行った（Ishida H., *Biomed Rep* 2020）。

次に新規治療薬探索のため、AMKL 細胞株をドイツの細胞バンクである DSMZ から購入し、複数の新規薬剤の効果について検討した。

4. 研究成果

AMKL10 例のターゲットシーケンス解析では、KIT, SPI1, GATA1, NCOR2, SETBP1, CSF3R, EZH2, TET2, PIK3CG, SMARCA2, SH2B3, GATA1, KRAS, IKZF1 などの遺伝子変異がみつかったが、共通性はみられなかった。このため AMKL と言っても heterogenous な疾患群と考えられた。

AMKL 細胞株を使用した、新規薬剤探索実験では、HSP90 阻害剤や SMACmimetics は、残念ながら著しい効果がみられなかった。DSMZ のオープンデータで各種蛋白発現の検索を行ったところ、JAK1/2/3 と Tyk2 や STAT3/5 の高発現が認められたため、JAK 阻害剤が有望そうと判断した。また海外から JAK 阻害剤が、AML ではなく AMKL で有効とのデータが出ており（Drenberg CD. et al. *Nat Commun*, 2019）、6 つの AMKL 細胞株（CMK, CMY, UT7, Mo7e, MOLM16, MKPL1）で、cytarabine (AraC) と JAK 阻害剤のシナジー効果について検討した。JAK 阻害剤は tofatinib、ruxolitinib、AZD1480、pefitinib の 4 種類を検討したが、ruxolitinib が最適と考えこれを使用した（図 1）。通常の液体培養系ではすべての細胞株で AraC と JAK 阻害剤のシナジー効果がみられたが、我々が独自で開発した骨髓微小環境を模した間葉系細胞（MSC）との 3D 共培養系では、MOLM16 と MKPL1 の 2 種類の細胞株しかシナジー効果を見いだせなかった（図 2、3）。細胞周期の解析でも MSC との 3D 共培養系は G0/G1 細胞比率を増加させていた。このため現在この 2 株についてマウスの白血病移植実験で検証中で、本年 12 月の日本小児血液がん学会での発表と論文作成中である。

また新生児期に肝不全を来し、生体肝移植を行ったが、最終的に *RBM15-AMKL1* キメラ遺伝子が検出された AMKL 症例を経験した。PubMed などで AMKL で肝不全を来した症例につい

て文献検索を行ったところ、同様の症例がこの他5例みつかり、そのすべてに *RBMK15-AMKL1* キメラ遺伝子が検出された。他の AMKL とは異なり *RBMK15-AMKL1* キメラ遺伝子陽性の AMKL は母胎内発症しており、その病態が肝不全を来す Down 症の重症 TAM に類似していると想定された。こちらも学会発表と論文投稿中である。

図1) 各種 AMKL 細胞株への ruxolitinib の殺細胞効果

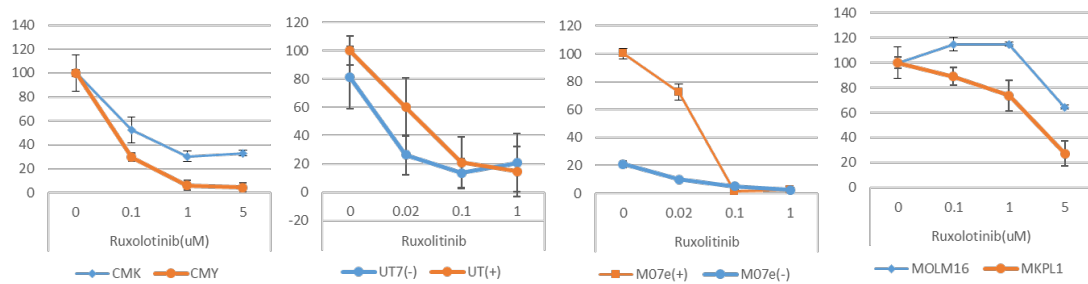
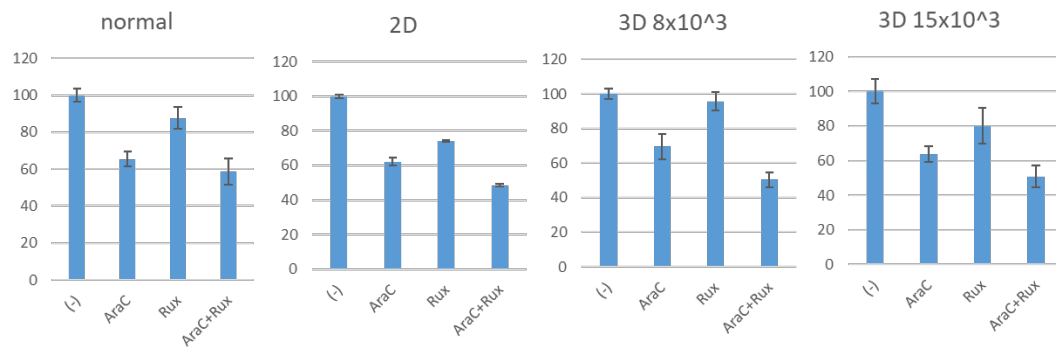


図2) MOLM16 と MKPL1 の通常の液体培養、2D 培養、3D 培養系でのシナジー効果
MOLM16



MKPL1

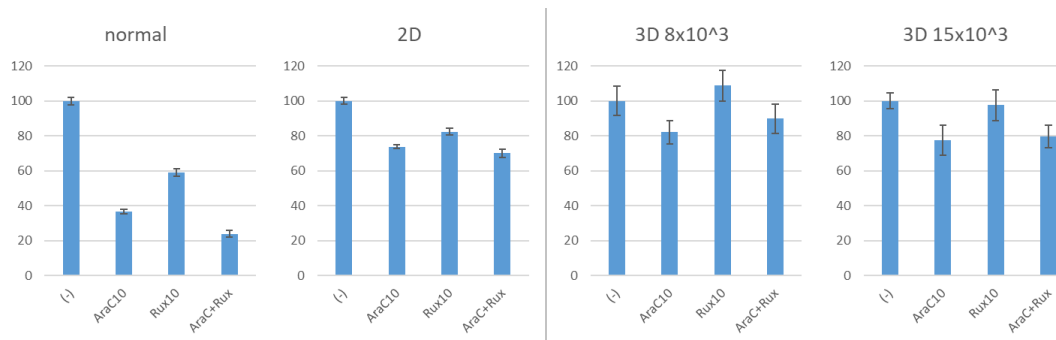
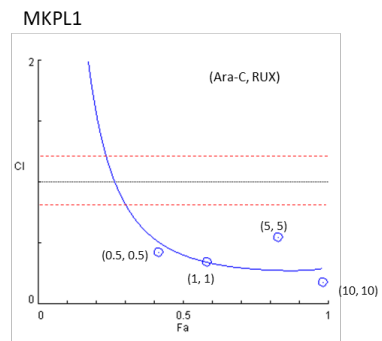
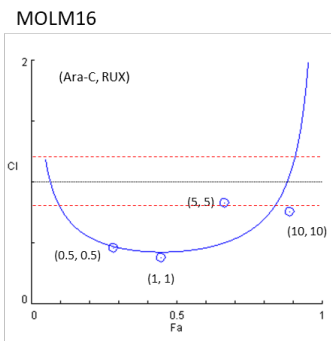
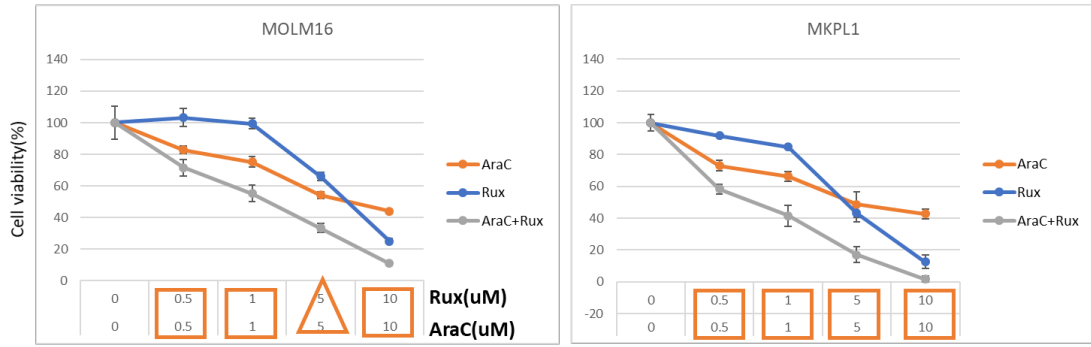


図3) MOLM16 と MKPL1 の 3D 培養系での cytarabine と ruxolitinib のシナジー効果



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamato G, Kawai T, Shiba N, Ikeda J, Hara Y, Ohki K, Tsujimoto SI, Kaburagi T, Yoshida K, Shiraishi Y, Miyano S, Kiyokawa N, Tomizawa D, Shimada A, Sotomatsu M, Arakawa H, Adachi S, Taga T, Horibe K, Ogawa S, Hata K, Hayashi Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Genome-wide DNA Methylation Analysis in Pediatric Acute Myeloid Leukemia.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood Adv.	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) 10.1182/bloodadvances.2021005381.	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 該当する
1. 著者名 Fukui Y, Hayano S, Kawanabe N, Wang Z, Shimada A, Saito MK, Asaka I, Kamioka H.	4. 巻 71
2. 論文標題 Investigation of the molecular causes underlying physical abnormalities in Diamond-Blackfan anemia patients with RPL5 haploinsufficiency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathol Int.	6. 最初と最後の頁 803-813
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13168.	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 該当する
1. 著者名 Taga T, Tanaka S, Hasegawa D, Terui K, Toki T, Iwamoto S, Hiramatsu H, Miyamura T, Hashii Y, Moritake H, Nakayama H, Takahashi H, Shimada A, Taki T, Ito E, Hama A, Ito M, Koh K, Hasegawa D, Saito AM, Adachi S, Tomizawa D.	4. 巻 35
2. 論文標題 Correction to: Post-induction MRD by FCM and GATA1-PCR are significant prognostic factors for myeloid leukemia of Down syndrome.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 2508-2516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-021-01397-w.	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 該当する
1. 著者名 Kaburagi T, Yamato G, Shiba N, Yoshida K, Hara Y, Tabuchi K, Shiraishi Y, Ohki K, Sotomatsu M, Arakawa H, Matsuo H, Shimada A, Taki T, Kiyokawa N, Tomizawa D, Horibe K, Miyano S, Taga T, Adachi S, Ogawa S, Hayashi Y.	4. 巻 107
2. 論文標題 Clinical significance of RAS pathway alterations in pediatric acute myeloid leukemia.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 583-592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2020.269431.	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 Moritake H, Tanaka S, Miyamura T, Nakayama H, Shiba N, Shimada A, Terui K, Yuza Y, Koh K, Goto H, Kakuda H, Saito A, Hasegawa D, Iwamoto S, Taga T, Adachi S, Tomizawa D.	4. 巻 68
2. 論文標題 The outcomes of relapsed acute myeloid leukemia in children: Results from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group AML-05R study.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatric Blood and Cancer	6. 最初と最後の頁 e28736
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pbc.28736. Epub 2020 Sep 29.	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 Hasegawa D, Tawa A, Tomizawa D, Watanabe T, Saito AM, Kudo K, Taga T, Iwamoto S, Shimada A, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Takahashi H, Nakayama H, Koh K, Goto H, Kosaka Y, Miyachi H, Horibe K, Nakahata T, Adachi S.	4. 巻 67
2. 論文標題 Attempts to optimize postinduction treatment in childhood acute myeloid leukemia without core-binding factors: A report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG).	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatric Blood and Cancer	6. 最初と最後の頁 e28692
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pbc.28692. Epub 2020 Sep 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 Ishida H, Iguchi A, Aoe M, Nishiuchi R, Matsubara T, Keino D, Sanada M, Shimada A	4. 巻 10
2. 論文標題 Panel-based next-generation sequencing facilitates the characterization of childhood acute myeloid leukemia in clinical settings	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Reports	6. 最初と最後の頁 14859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/br.2020.1353. Epub 2020 Aug 28.	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
研究 分 担 者	林 泰秀 (Hayahi Yasuhide) (30238133)	群馬県衛生環境研究所・研究企画係・研究員 (82302)	

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