

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16895

研究課題名（和文）小児・AYA世代AMLにおけるヒストン修飾に着目した予後因子の確立と治療開発

研究課題名（英文）Establishment of the prognostic factor and the development of therapeutic strategy based on histone modifications in CAYA AML

研究代表者

後藤 洋徳（Goto, Hironori）

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：70727966

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究により、小児期の急性骨髄性白血病（以下：AML）では、遺伝子発現を調整するヒストンというタンパク構造のうち、H3K27のトリメチル化（以下：me3）の低下が予後不良に関連するという結果を得た。また、H3K27me3の低下したAML細胞では、治療抵抗性遺伝子の発現が上昇しているという結果をRNA-seq解析により得た。さらに、細胞株を用いて、H3K27me3の脱メチル化阻害剤を用いることで、治療抵抗性遺伝子の発現が低下し、治療抵抗性の改善がもたらされるという結果を得た。また、AML以外の固形腫瘍でも解析を行い、ヒストンメチル化と難治化の関連性について解析を行い、病態を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、小児期のAMLにおいて、遺伝子発現を調整するヒストンタンパクのうち、H3K27me3の低下が、予後の悪化に關することを明らかにした初めての報告である。また、H3K27me3の低下により治療抵抗性遺伝子の発現が増加し、H3K27me3脱メチル化阻害剤により治療抵抗性遺伝子の発現が低下し、治療抵抗性が改善することも示した。小児期AMLにおけるH3K27me3という新たな視点による予後の層別化と同時にH3K27me3をターゲットとした新たな治療開発の可能性を示した研究であり、小児期難治・再発AML例に貢献し得る研究である。

研究成果の概要（英文）：We found that in childhood acute myeloid leukemia (AML), low H3K27 trimethylation (me3), a protein structure called histone that regulates gene expression, is associated with poor prognosis. In addition, RNA-seq analysis showed that AML cells with low H3K27me3 had elevated expression of therapeutic resistance genes. Furthermore, using cell lines, we found that H3K27me3 demethylation inhibitors reduced the expression of therapeutic resistance genes, resulting in improvement of therapeutic resistance. We also performed analysis in pediatric solid tumors other than AML and analyzed the association between histone methylation and refractoriness to elucidate the pathogenesis.

研究分野：小児血液、がん

キーワード：小児 急性骨髄性白血病 ヒストンメチル化

## 1. 研究開始当初の背景

小児・AYA 世代の白血病、特に AML は遺伝子異常に基づく層別化による治療がなされてきたが、依然として 30%の難治・再発例が存在し、多様性に基づき、個々に対応した治療が望まれる(第3期がん対策推進基本計画)。近年、一部のがんや成人期 AML ではエピゲノムに基づいた治療法が導入され治療開発が発展しつつある。エピゲノムは DNA のメチル化、ヒストンの化学修飾などにより遺伝子発現を制御するメカニズムである。ヒストンは DNA を折り畳む構造タンパク質としての役割があるだけでなく、メチル化などの化学修飾を介した構造変化により、遺伝子発現の制御にも重要な役割を担っている。このエピジェネティックな遺伝子発現の制御により細胞の運命決定が行われるが、その異常は細胞のがん化を引き起こす。造血器腫瘍における代表的なヒストン修飾は MLL などのトライソックス群による H3K4 メチル化や EZH2 などのポリコーム群複合体による H3K27 メチル化などが挙げられる。

これまでに成人期 AML において H3K27 の低メチル化群(EZH2 低下群)が予後不良であること(Göllner S et al. Nat Med 2017)が報告されているが、小児・AYA 世代の AML におけるヒストンのメチル化と臨床像との関連性は未確立であり、我々はヒストン修飾が及ぼす小児・AYA 世代の AML の臨床像の変化に着目し研究を進めている。さらに、成人期 AML において、プロテオソーム阻害剤によるメチル化酵素の保持が薬剤感受性を維持すること(Göllner S et al. Nat Med 2017)や脱メチル化阻害剤の有効性が報告されている(Maes T et al. Cancer Cell 2018)。プロテオソーム阻害剤や脱メチル化阻害剤は従来の抗腫瘍薬に比して副作用が少なく、治療合併症を生じやすい小児・AYA 世代の AML でも治療導入が期待されるが、治療導入が進んでいないのが現状である。

研究代表者は、小児期に発症した NUP98-HOXC13 融合遺伝子を有す難治性の AML 症例(Goto H et al. Pediatr Int 2017)を経験した。NUP98-HOX 遺伝子群の白血化にヒストンメチル化の関与が指摘されており、免疫染色したところ、H3K4 の低メチル化がみられた。さらに、予後良好な RUNX1-RUNX1T1 融合遺伝子例で難治だった自験例でも H3K4 の低メチル化がみられ、H3K4 の低メチル化の治療抵抗性への関与が示唆され、同様な検討方法で H3K27 の低メチル化群は成人同様に予後不良な傾向であった(平成 30 年度第 1 回 JCCG 血液腫瘍分科会(JPLSG)にて報告)。

これらの結果より「小児・AYA 世代の難治 AML を、初発白血病細胞のヒストンメチル化に注目する事によって予見できるか」、さらに「小児・AYA 世代の AML に対してヒストンメチル化に着目し、副作用の少ない、全く新しい治療戦略(プロテオソーム阻害剤や脱メチル化酵素阻害薬)を提唱できるか」が、本研究における学術的な問いである。

## 2. 研究の目的

本研究では、小児・AYA 世代の AML 症例におけるヒストン修飾(H3K4 と H3K27 の低メチル化)が治療抵抗性に影響を及ぼすかどうか確認し、次に各々の脱メチル化を阻害することで治療抵抗性を改善できるか明らかにすることを目的とする。順に、以下の事象を明らかにしていく。

- (1) 共同研究施設から提供された小児・AYA 世代の AML 症例の骨髓サンプルを用いて、免疫染色を行い、H3K4 と H3K27 メチルの発現と予後との相関を明らかにする。
- (2) 上記の免疫染色により得られた知見を基に、メチル化のステータスの違いによる小児期発症の AML 患者の細胞における遺伝子発現の変化を RNA シークエンス、CHIP シークエンスなどを用いて評価を行う。
- (3) AML 細胞株や自施設に保存する患者 AML 細胞において、脱メチル化阻害薬を投与することにより、ヒストンメチル化の回復を試みて、その効果を in vitro (細胞培養)で評価する。

## 3. 研究の方法

(1) 小児 AML 症例の臨床データと検体の集積・収集：JCCG (Japan Children's Cancer Group) に集積されている AML 症例のうち、同意が得られた施設の臨床データを収集しデータベース管理する。全体で約 100 例を予定しており、骨髓クロット検体も収集する。

(2) 免疫組織学的検査：初発骨髓クロット標本を用いて H3K4 および H3K27 トリメチル抗体で免疫染色を行う。発現評価スコア (IRS) は、Remmele の方法に準じる (Int J Clin Exp Pathol 2012)。

(3) ヒストン修飾状態(メチル化酵素の発現の程度)と臨床像との比較：H3K4 と H3K27 メチル化状態と臨床データを比較解析し、予後に関連する因子を抽出する。

(4) 凍結保存されている患者 AML 細胞を用いて、H3K27me3 あるいは H3K4me3 のメチル化の状態をウエスタンブロッティング法により、選別し、層別化した後に、各群間での遺伝子発現の差異について、RNA シークエンスあるいは、CHIP シークエンスを用いて、遺伝子発現の差異を評価する。

(5) 治療薬の反応性評価：既に細胞株化している既知の AML 細胞株や患者凍結細胞を用いてヒストン修飾(H3K4、H3K27 トリメチル化)の状態を確認し、ヒストン脱メチル化阻害薬投与によ

る AML に対する効果を *in vitro* (細胞培養) で評価する。

#### 4. 研究成果

本研究の研究成果としては JCOG に所属する共同研究施設で加療された小児期発症の AML 症例の臨床データ、骨髄クロット検体を収集し、AML 細胞の H3K4 および H3K27me3 について免疫染色を行なった後に、発現評価スコア (IRS) による評価を行い、小児 AML において H3K27me3 低下が予後不良に関連するという結果を得た。

また、H3K27me3 の低下した患者 AML 細胞と H3K27me3 の高い群とをウエスタンブロッティング法を用いて選別を行った。H3K27me3 低下群と H3K27me3 の高い群から、各々、RNA を抽出し、RNA-seq を用いて遺伝子発現の差異が生じているか検討を行った。H3K27me3 が高い群に比して、H3K27me3 低下群では、治療抵抗性遺伝子の発現が上昇しているという結果を得た。

さらに、H3K27me3 が低下している白血病細胞株を用いて、H3K27me3 の脱メチル化阻害剤を用いることで、H3K27me3 を回復させて、遺伝子発現に変化が生じ、治療抵抗性遺伝子の発現が低下し、治療抵抗性の改善がもたらされるという結果を得た。これらの結果について、現在、論文報告に向けて投稿準備を進めている。

また、白血病以外の腫瘍の病態とヒストンメチル化との関連性を明らかにするために、稀な小児期膵芽腫例において H3K27me3 の状態を評価し、RAS-MAP キナーゼパスウェイの亢進を示し、その病態を解明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hironori Goto, Yuhki Koga, Kenichi Kohashi, Hiroaki Ono, Junkichi Takemoto, Toshiharu Matsuura, Tatsuro Tajiri, Kenji Ihara, Yoshinao Oda, Shouichi Ohga	4. 巻 70
2. 論文標題 Pancreatoblastoma with a novel fusion gene of IQSEC1-RAF1	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pediatric Blood & Cancer	6. 最初と最後の頁 e30155
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pbc.30155.	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 Goto H, Hirano N, Inoue M, Takano K, Ogata M, Kishida T, Arakane M, Daa T, Nishida Y, Suenobu S, Ihara K.	4. 巻 189
2. 論文標題 Immune escape by loss of heterozygosity of HLA genes facilitated the transmission of diffuse large B cell lymphoma from mother to offspring.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 e234-e237
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bjh.16662. Epub 2020 Apr 17.	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 Suenobu S, Goto H, Hirano N, Sonoda T, Izumi T, Ihara K.	4. 巻 42
2. 論文標題 Early Recovery of Height Velocity in Prepubertal Children With Acute Lymphoblastic Leukemia Treated by a Short Intensive Phase Without Cranial Radiation Therapy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Hematology/ Oncology	6. 最初と最後の頁 271-274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MPH.0000000000001695.	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 Hirano N, Goto H, Suenobu S, Ihara K.	4. 巻 50
2. 論文標題 Bone marrow metastasis of neuroblastoma mimicking purulent osteomyelitis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1227-1228
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jjco/hyaa046.	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 Fudaba H, Momii Y, Kawasaki Y, Goto H, Nobusawa S, Fujiki M.	4. 巻 7
2. 論文標題 Well-differentiated Astroblastoma with Both Focal Anaplastic Features and a Meningioma 1 Gene Alteration.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 NMC Case Report Journal	6. 最初と最後の頁 205-210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2176/nmccrj.cr.2020-0028.	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 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 後藤洋徳
2. 発表標題 新規IQSEC1-RAF1融合遺伝子異常を伴った小児腭芽腫
3. 学会等名 第63回 日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2021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