

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07759

研究課題名（和文）難治性小児白血病の病態解析と新規治療標的の探索

研究課題名（英文）Investigation of leukemogenic mechanism of intractable pediatric leukemia

研究代表者

今村 俊彦（Imamura, Toshihiko）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：30444996

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では難治性急性骨髄性白血病(AML)の発症に関わり、予後不良因子として知られるNUP98::NSD1がマウスAMLの32DのCD123 (IL-3RA)の発現を誘導する事を明らかにした。我々の作成したNup98::Nsd1陽性32D細胞は、CD123の発現増加から、IL-3に対する高感受性を獲得し、化学療法抵抗性を示している可能性が示された。また、CD123の高発現はNUP98::NSD1陽性の小児AML検体でも確認され、我々のデータを支持するものであった。NUP98::NSD1陽性AMLの予後は現在も不良であり、CD123の阻害が治療につながる可能性を示した点が本研究の研究成果である

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では難治性急性骨髄性白血病の発症に関わる融合遺伝子の機能を遺伝子導入実験を行って解析した。近年の遺伝子解析技術の進歩により、白血病の発症や予後に関わる遺伝子異常が多数同定されているが、そうした異常がどのようにして白血病の発症や治療の効きにくさに関連しているかは十分には解析されていない。本研究では、そうした遺伝子異常のひとつとしてNUP98::NSD1融合遺伝子に着目し研究を行い、CD123という分子が新規の治療標的の一つとなる可能性を示すことができた。難治性疾患の新規治療の開発につながる可能性があり、本研究の学術的価値はここにあると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we demonstrated that NUP98::NSD1, a known critical prognostic factor involved in the development of refractory acute myeloid leukemia (AML), induces the expression of CD123 (IL-3RA) in the mouse myeloid leukemia cell line 32D. Our NUP98::NSD1-positive 32D cells showed increased expression of CD123, suggesting heightened sensitivity to IL-3 and potential resistance to chemotherapy. Additionally, the high expression of CD123 was confirmed in pediatric AML samples with NUP98::NSD1 positivity, supporting the data obtained from our in vitro studies. The prognosis for NUP98::NSD1-positive AML remains notably poor, and our research highlights the academic significance of the potential for CD123 inhibition to contribute to the treatment of this refractory leukemia.

研究分野：胎児医学および小児成育医学関連

キーワード：急性骨髄性白血病 融合遺伝子 NUP98::NSD1 FUS::ERG

## 1. 研究開始当初の背景

近年の網羅的ゲノム解析技術の進歩により、小児の急性リンパ性白血病 (ALL) および急性骨髄性白血病 (AML) の発症に深くかかわるとされる「融合遺伝子」が数多く同定されている。こうした「融合遺伝子」は、化学療法に対する反応性に密接にかかわっており、患者の予後に大きく影響する事が、これまでの数多くの研究で明らかとなっている。しかしながら、こうした「融合遺伝子」が白血病発症に関わる機序や、薬剤耐性に関わるメカニズムについては、十分に解明されているとは言えず、より有効な治療法の開発につなげるためには、「融合遺伝子」の生物学的な機能を明らかにし、それを制御する方法を確立することが不可欠である。近年、主に Ph-like ALL 症例より同定されたチロシンキナーゼタイプの融合遺伝子については、機能解析が進み、分子標的療法が開発され、治療成績の改善が期待されるが、転写因子として機能する「融合遺伝子」の機能解析は充分には進んでいない。こうした転写因子型の融合遺伝子の中でも、特に、AML 特異的融合遺伝子である、*NUP98::NSD1*、*FUS::ERG* は、両融合遺伝子陽性 AML の予後が極めて不良である事から、その機能の解明と制御が有効な治療法の確立に不可欠であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は *NUP98::NSD1*、*FUS::ERG* が造血細胞に与える変化を明らかにし、その機能を特異的に抑制する方法を明らかにし、新たな治療法の開発につなげる事を本研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

難治性 AML の発症に関わる *NUP98::NSD1* および *FUS::ERG* 融合遺伝子に相同性を有するマウス *Nup98::NSD1* および *Fus::Erg* 融合遺伝子を作成し、レトロウイルスベクターにクローニングし、IL-3 依存性に増殖するマウス AML 細胞株である 32D に導入し、32D の IL-3 非依存性増殖が誘導されるか検討する。

*Nup98::Nsd1* および *Fus::Erg* 融合遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて、マウス造血幹細胞に導入し、各融合遺伝子を恒常的に発現するマウス造血幹細胞を作成する。作成した *Nup98::Nsd1* または *Fus::Erg* 発現マウス造血幹細胞を用いて、メチルセルロース中でサイトカイン (IL-3, IL-6, SCF) 存在下で培養し、自己複製能を獲得するか観察する。

*Nup98::Nsd1* または *Fus::Erg* を発現する 32D またはマウス造血幹細胞を用いて、全トランスクリプトーム解析を行い、*Nup98::Nsd1* や *Fus::Erg* が制御するシグナル伝達経路を明らかにし、新たな治療標的を同定する。

## 4. 研究成果

ヒト *NUP98::NSD1* および *FUS::ERG* 融合遺伝子と相同性を有するマウス *Nup98::Nsd1* (図 1) および *Fus::Erg* をレトロウイルスベクターにクローニングし、パッケージング細胞から蛋白を抽出し、その発現を確認した (図 2)。

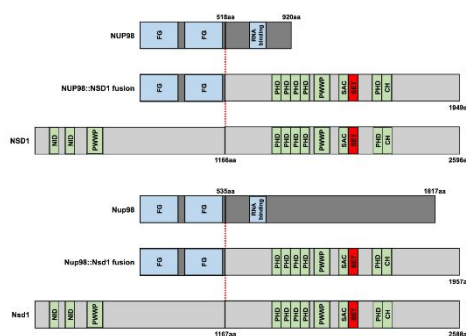


図 1 Nup98::Nsd1 融合蛋白模式図

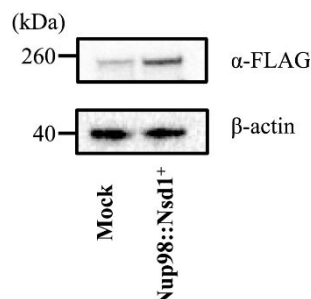


図 2 Nup98::Nsd1 融合蛋白の発現の確認

*Nup98::Nsd1* は 32D 細胞の Mac-1 の発現を低下させることが明らかとなった (図 3a, b)。この結果は、*Nup98::Nsd1* が 32D 細胞の分化能を阻害する事を示唆した。また、*Nup98::Nsd1* が 32D 細胞に IL-3 非依存性増殖を誘導するか評価したところ、IL-3 非依存性増殖を誘導する事はなかったが、32D 細胞の IL-3 存在下での増殖優位性を誘導する事が明らかとなった (図 4)。以上の結果から、*Nup98::Nsd1* は 32D 細胞の IL-3 依存性を高めている事が示唆された。

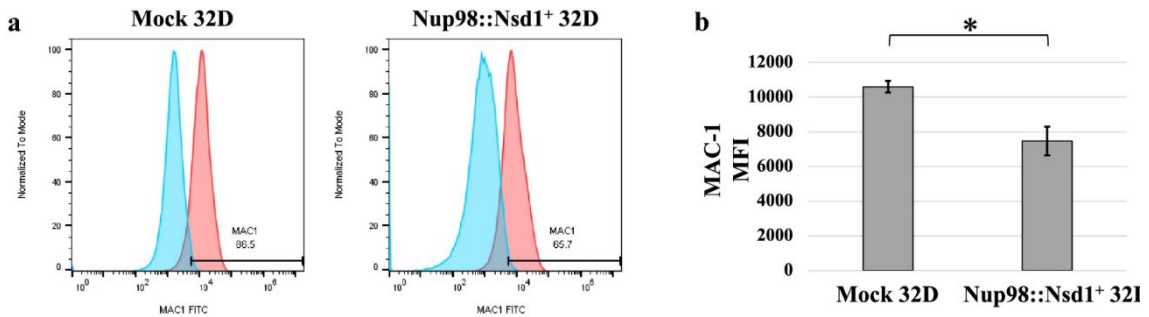


図3 a: ヒストグラム、b: MFI(mean fluorescence intensity)による MAC-1 の発現量の比較  
\*:  $p < 0.05$

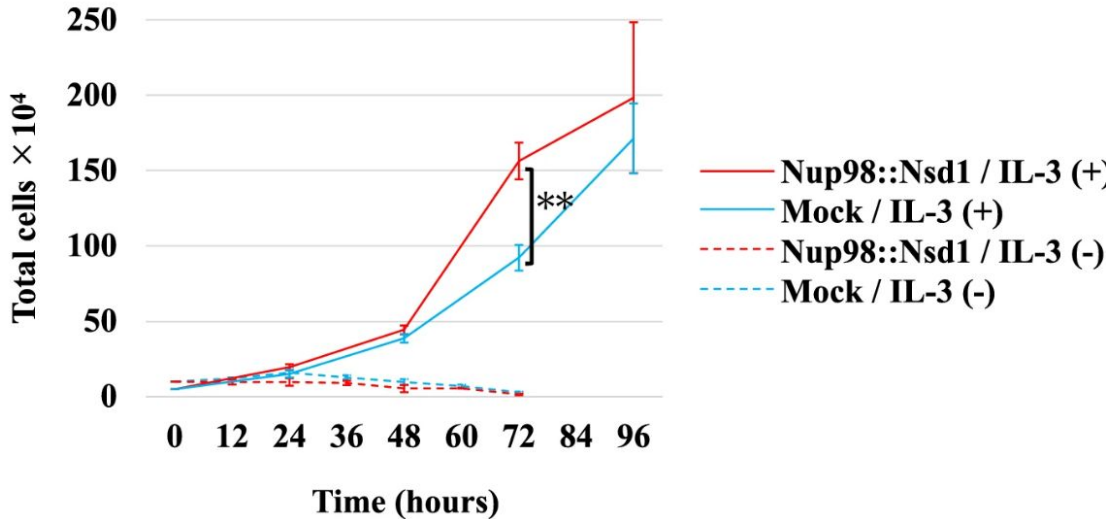


図4 細胞増殖曲線 . Nup98::Nsd1 は IL-3 存在下で増殖優位性を付与する

Nup98::Nsd1 が 32D 細胞に IL-3 高感受性を付与するメカニズムについて、より詳細に解析するため、細胞周期解析を行った。その結果、Nup98::Nsd1 陽性 32D 細胞は IL-3 非存在下で sub G1 領域が増加する事が明らかとなり (図5) Annexin V アッセイでも、より強くアポトーシスが誘導される事が示された (図6)。

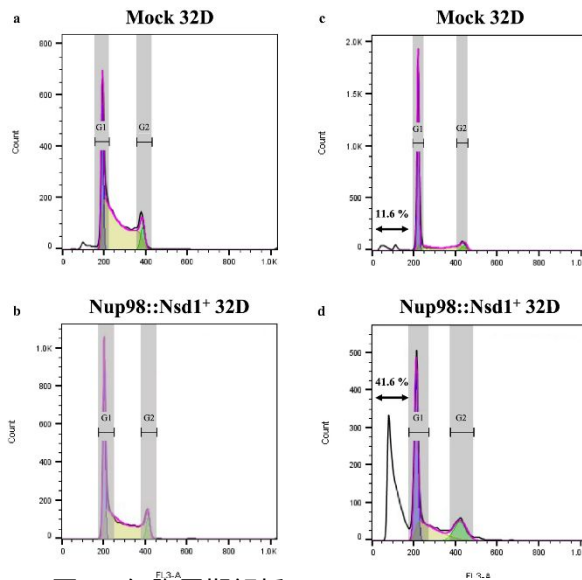


図5 細胞周期解析

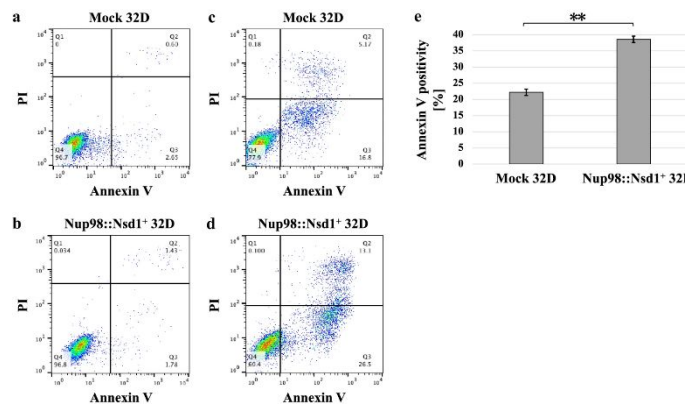


図6 Annexin V アッセイ \*\*,  $p < 0.01$

Nup98::Nsd1 が 32D に IL-3 高感受性を誘導するメカニズムとして、IL-3 の受容体である CD123 (IL-3RA) の発現誘導の可能性を検討するため、Nup98::Nsd1 の発現が 32D 細胞の CD123 の発現に与える影響をフローサイトメトリーで検討した。その結果、Nup98::Nsd1 が 32D 細胞の CD123 の発現を増強する事が明らかとなった (図7)。また、Nup98::Nsd1 陽性 32D 細胞のマイク

ロアレイ解析でも、IL-3ra の発現上昇が確認された ( 図 8 )

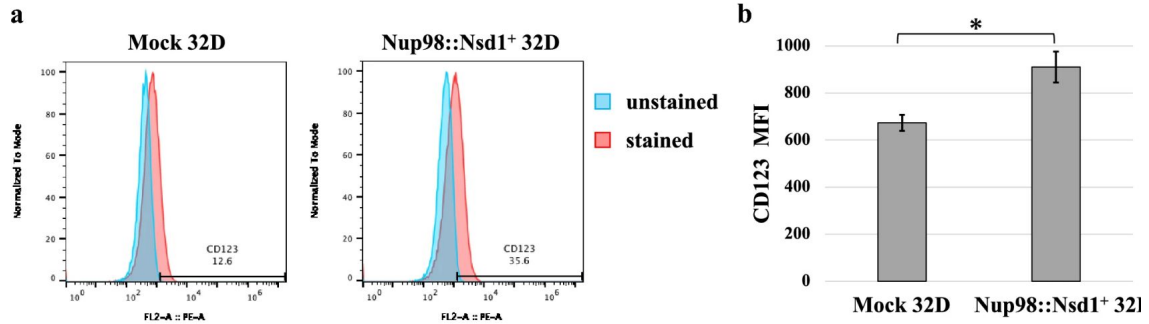


図 7 a, ヒストグラム, b, MFI \*, P,0.05

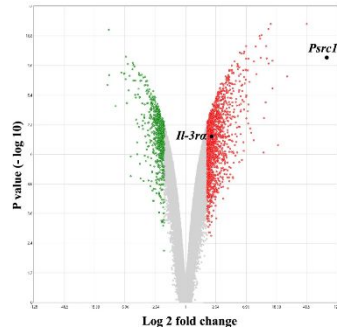


図 8 マイクロアレイ解析によるボルケーノプロット  
Nup98::Nsd1 の発現により IL-3RA の発現上昇がみられる

本研究で Nup98::Nsd1 が 32D 細胞の CD123 (IL-3RA) の発現増加を通じて IL-3 感受性を高める事が明らかとなったため、臨床検体を用いて、NUP98::NSD1 陽性 AML は陰性 AML に比して CD123 (IL-3RA) の発現が高値であるか検証した。初発の小児 AML の 140 名 (NUP98::NSD1 陽性 AML 7 名を含む) の全トランスクリプトーム解析のデータをもとに、NUP98::NSD1 の有無と CD123 (IL-3RA) の発現量の関係を検討したところ、CD123 (IL-3RA) の発現量は NUP98::NSD1 陽性 AML 症例で有意に高く、我々の in vitro の研究データと一致する結果であった ( 図 9 )。

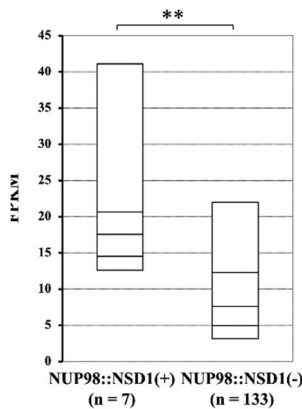


図 9 小児 AML140 例の IL-3RA の発現レベル  
\*\*, p<0.01

最後に、我々はマウス造血幹細胞に Nup98::Nsd1 遺伝子を導入し、サイトカイン存在下で自己複製能を獲得するか検討したが、Nup98::Nsd1 はマウス造血幹細胞に自己複製能を付与する事はできなかった。

以上をまとめると、我々が作成した Nup98::Nsd1 陽性 32D 細胞は CD123 (il-3ra) を高発現し、IL-3 存在下で増殖優位性を示した。こうした IL-3 高感受性が、NUP98::NSD1 陽性 AML の生体内での増殖優位性や、これに起因する化学療法抵抗性に関わる可能性が考えられた。以上の結果から、IL-3RA の阻害が NUP98::NSD1 陽性 AML の治療として有用である可能性が示唆されるが、

NUP98::NSD1 陽性 AML の新規治療の評価のためには、よりヒトの NUP98::NSD1 陽性 AML を忠実に再現したマウスモデルや patient derived xenograft model の利用が必要であると思われる。

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 2件）

1. 著者名 Mayumi A, Tomii T, Kanayama T, Mikami T, Tanaka K, Ueno H, Yoshida H, Kato I, Kawamura M, Nakahata T, Takita J, Hosoi H, Imamura T	4. 巻 12
2. 論文標題 The combination of ruxolitinib and Bcl-2/Mcl-1 inhibitors has a synergistic effect on leukemic cells carrying a SPAG9::JAK2 fusion.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Gene Ther	6. 最初と最後の頁 1930-1938
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41417-022-00511-z.	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 Mayumi Azusa, Imamura Toshihiko, Yoshida Hideki, Osone Shinya, Yasuda Takahiko, Iehara Tomoko	4. 巻 -
2. 論文標題 Leukaemic cells expressing ETV6::FRK are sensitive to dasatinib in vivo	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eJHaem	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） 10.1002/jha2.701	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 Okamoto K, Imamura T, Tanaka S, Urata T, Yoshida H, Shiba N, Iehara T.	4. 巻 118
2. 論文標題 The Nup98::Nsd1 fusion gene induces CD123 expression in 32D cells.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Int J Hematol	6. 最初と最後の頁 277-287
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-023-03612-z	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 眞弓あずさ, 今村俊彦, 富井敏宏, 三上貴司, 田中邦昭, 吉田秀樹, 加藤 格, 川村眞智子, 滝田順子, 細井 創
2. 発表標題 SPAG9-JAK2融合遺伝子を有する白血病細胞はSTAT1-BCL-2/MCL-1 axisを活性化する.
3. 学会等名 第124回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mayumi A, Yoshida H, Mitsuno K, Nishida N, Osone S, Yasuda T, Imamura T.
2. 発表標題 Leukemic cells expressing ETV6-FRK identified in a refractory B-ALL patient are sensitive to dasatinib in vitro.
3. 学会等名 第63回日本小児血液・がん学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Okamoto K, Kubo H, Miyagaki S, Yoshida H, Osone S, Imamura T.
2. 発表標題 Functional assay for NUP98-NSD1 fusion gene.
3. 学会等名 第63回日本小児血液・がん学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浦田貴代, 今村俊彦, 田中誠治, 岡本賢治, 末松正也, 眞弓あずさ, 吉田秀樹, 大曾根眞也, 家原知子
2. 発表標題 急性骨髄性白血病におけるFus-Erg融合遺伝子の造腫瘍能の解析
3. 学会等名 第126回日本小児科学会学術総会
4. 発表年 2023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
---------	---------