

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390262

研究課題名(和文) 若年性骨髄単球性白血病に対する新規分子標的療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel molecular targeted therapy for juvenile myelomonocytic leukemia

研究代表者

小島 勢二 (Kojima, Seiji)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20313992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,300,000円

研究成果の概要(和文)：若年性骨髄単球性白血病(JMML)は治療抵抗性の症例が多く、新規薬剤の開発が望まれる。92例のJMML患者検体を用いて次世代シーケンサーによる解析を行い、SETBP1およびJAK3変異が新規原因遺伝子であることを明らかにした。また、これらの遺伝子変異を有する症例は有意に生命予後が不良であることが判明した(Sakaguchi H, et al., Nature Genetics 2013)。

また、患者検体を用いた検討で、チロシンキナーゼ阻害薬であるDasatinibやMEK阻害剤であるMEK162が濃度依存性に造血コロニー形成抑制、細胞増殖抑制、アポトーシス細胞数を増加させることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) is an intractable pediatric myeloid malignancy, and the development of novel molecular target therapy is strongly warranted. Here, we analyzed 92 JMML patients with next-generation sequencing technique, and identified that patients with newly identified SETBP1 and JAK3 mutations as secondary genetic events showed inferior survival rates (Sakaguchi H, et al, Nature Genetics 2013).

In addition, we assessed the effects of tyrosine kinase inhibitor (Dasatinib) and MEK inhibitor (MEK162) for bone marrow mononuclear cells from JMML patients. Dasatinib and MEK162 are significantly suppressed the colony forming of JMML cells. Flowcytometry-based BrdU/SubG1 analysis revealed that these drugs significantly suppress cell proliferation and induce cell apoptosis. Our findings support that Dasatinib and MEK inhibitor would be promising agents for treatment of JMML patients.

研究分野：医歯薬学

キーワード：若年性骨髄単球性白血病 原因遺伝子 白血病幹細胞 エピジェネティクス エクソーム解析

1. 研究開始当初の背景

若年型骨髄単球性白血病 (JMML) は乳幼児期に発症する骨髄異形成症候群と骨髄増殖性疾患の両方の性格を併せ持つ稀な疾患である。造血幹細胞移植が唯一の根治的治療法であるが、移植後も再発が多く、その予後は不良である。このため、分子標的薬などによる新規治療法の開発が求められている。RAS/MAPK シグナル伝達経路にある NRAS/KRAS、CBL、PTPN11、NF1 遺伝子変異が原因であることが知られているが、約 20% の症例では原因遺伝子が不明であった。

2. 研究の目的

JMML の発症に関わる分子メカニズムの解明および、JMML 細胞を標的とする分子標的療法の開発を目的とした。

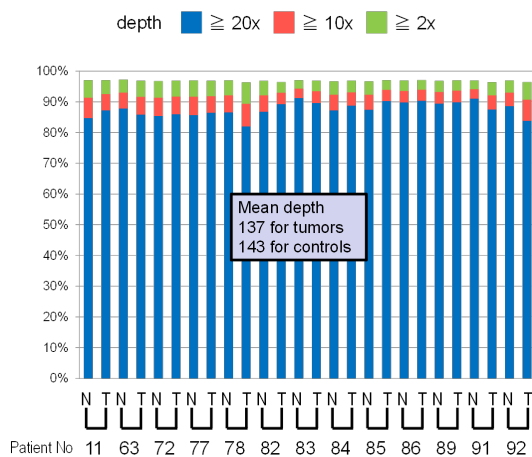
3. 研究の方法

JMML 患者の臨床検体を用いて、次世代シーケンサーによる解析を行い、新規病原遺伝子変異を同定した。また、効果が予想される各種薬剤について、コロニーアッセイ法、フローサイトメトリを用いた BrdU、SubG1 法を用いて、コロニー形成能・細胞増殖能・アポトーシスに与える薬剤の影響を検討した。

4. 研究成果

JMML の分子遺伝学的発症機構の全容を明らかにする目的で、13 例の JMML 症例に対し、骨髄 DNA および CD3 陽性 T 細胞 DNA の全エクソーム解析を行った (Sakaguchi H, et al., Nature Genetics 2013) (図 1)。

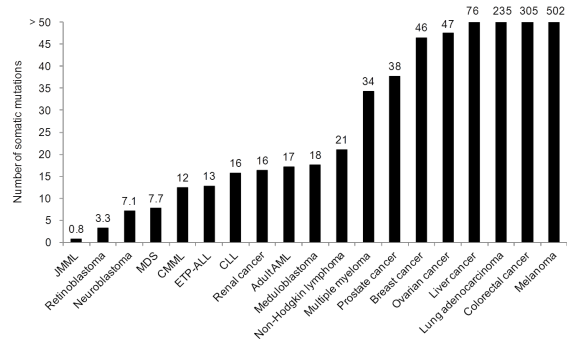
図 1. JMML 13 例の全エクソーム解析の概要



生殖細胞系列変異および体細胞変異について網羅的に検出を試みたところ、全エクソーム解析で同定された体細胞変異数は JMML 1 症例あたりわずか 0.8 個であり、これは他の様々な腫瘍において全エクソーム解析で同定される体細胞変異数と比較してはるかに

少数であった (図 2)。

図 2 全エクソーム解析による体細胞数変異数の他のがん種との比較



13 例のうち、RAS 経路遺伝子変異が 12 例 (生殖細胞系列変異 6 例、体細胞変異 6 例) で確認されるとともに、これまでに報告のない 3 遺伝子 (SETBP1 (p.Asp868Asn)、JAK3 (p.Arg657Gln)、SH3BP1 (p.Ser277Leu)) の体細胞変異が 4 例から検出された (表 1)。

表 1. JMML 13 例の全エクソーム解析の結果

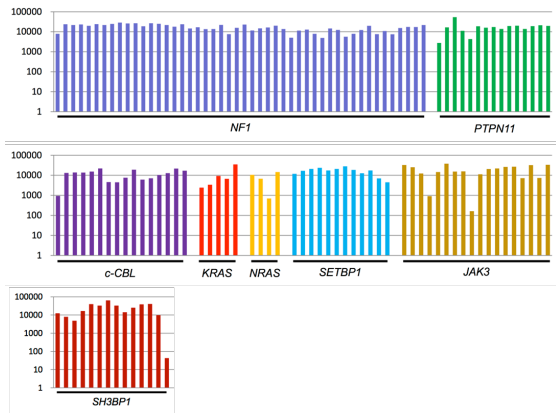
Patient No.	RAS pathway mutations			Newly identified somatic mutations		
	Somatic	Tumor / control (%)	Germline	Tumor / control (%)	Somatic	
11	NF1 (p.R1513X)	40.1 / 24.2	NF1 (p.W1976fs)	44.0 / 47.1	SETBP1 (p.D868N)	32.6 / 27.0
63	KRAS (p.G13D)	44.3 / 0.0	-	-	-	-
72	PTPN11 (p.N59Y)	48.2 / 5.7	-	-	SETBP1 (p.D868N) JAK3 (p.R657Q) SH3BP1 (p.S277L)	45.9 / 2.5 30.5 / 2.2 47.8 / 5.1
77	-	-	-	-	SETBP1 (p.D868N)	33.4 / 2.1
78	NRAS (p.G12A)	45.5 / 9.5	-	-	-	-
82	-	-	c-CBL (p.T406fs)	34.7 / 38.9	-	-
83*	-	-	NF1 (p.Y1657C)	50.0 / 51.0	-	-
84	-	-	c-CBL (p.E366_F468del)	NA / NA	-	-
85	PTPN11 (p.E76K)	47.5 / 4.4	-	-	-	-
86	KRAS (p.G13D)	38.9 / 3.1	-	-	-	-
89*	-	-	PTPN11 (p.S502A)	50.0 / 49.9	-	-
91*	-	-	PTPN11 (p.T73I)	49.0 / 48.0	-	-
92*	-	-	-	-	-	-

SETBP1 遺伝子がコードする SETBP1 は、170-kDa の核蛋白であり、SET と結合してがん抑制遺伝子である PP2A の働きを阻害することが知られている。また、SETBP1 は T 細胞性白血病において染色体転座による融合遺伝子形成 (NUP98-SETBP1) に関与している症例が存在すること、急性骨髄性白血病において、SETBP1 が高発現を示す症例が存在し、予後不良であることが報告されていた。また非常に興味深いことに、特徴的な顔貌異常・精神発達遅滞を示す先天奇形症候群である Schinzel-Giedion 症候群の疾患原因遺伝子異常として、まったく同一の SETBP1 変異 (p.Asp868Asn) が報告されている。Schinzel-Giedion 症候群に骨髄系造血器腫瘍を合併した報告は認められないが、神経上皮系腫瘍の合併が知られている。

全エクソーム解析の結果を確認するため、新規に変異が同定された各遺伝子に対しても RAS 経路遺伝子群と同様に 92 例の JMML 患者検体において、ターゲットディープシーケンシングを行い、既知の PTPN11、N/KRAS、

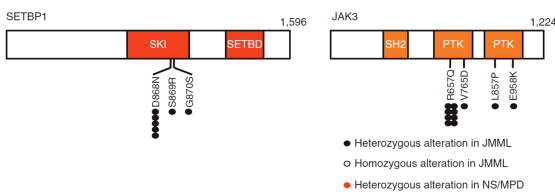
NF1, CBLに加えて、今回同定された SETBP1、JAK3 変異の各エクソンにつき 1,000 回以上のシーケンスデータを得た (図 3)。

図 3 JMMLで検出された遺伝子のディープシーケンスの概要



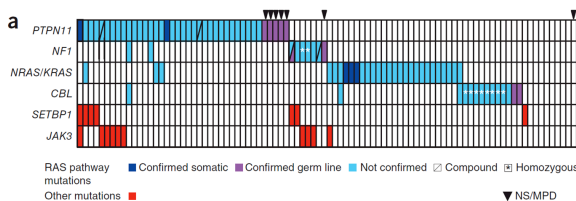
92 例の JMML 症例のうち、SETBP1 変異 (n=7) および JAK3 変異 (n=11) が、16 症例で認められた。同定された SETBP1 変異はいずれも SKI ドメインのヘテロ変異であった (図 4)。

図 4 検出された SETBP1・JAK3 変異の分布



これらの変異は、NRAS・KRAS・CBL 変異 JMML と比較して、PTPN11・NF1 変異 JMML により集積していた (図 5)。

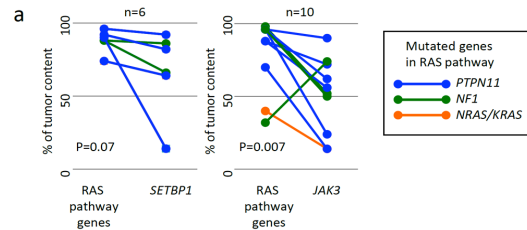
図 5 JMML92 例における遺伝子変異の概要



ターゲットディープシーケンスで得られた、各エクソン 1,000 回以上のシーケンスデータのうち、変異アリルと正常アリルが読まれる割合を計算することで、高い確度でそれぞれの遺伝子変異ごとに変異アリル頻度を算出した。RAS 経路に属する遺伝子変異と、新たに同定された SETBP1 ないし JAK3 遺伝子変異とを同時に有する JMML 症例におい

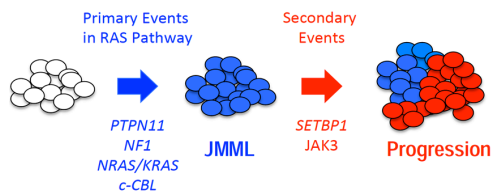
て、それぞれの遺伝子の変異アリル頻度を比較することで、腫瘍クローンの成立過程について検討した。ほとんどの症例で SETBP1 および JAK3 遺伝子のほうが RAS 経路遺伝子変異と比較して低い変異アリル頻度であった (図 6)。

図 6. RAS 経路遺伝子と SETBP1・JAK3 遺伝子変異のアリル頻度の比較



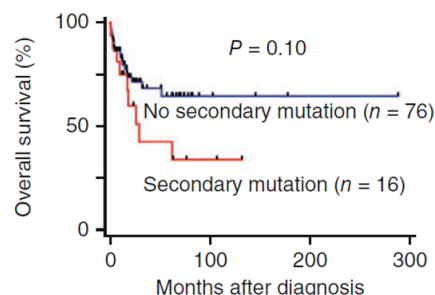
このことから、SETBP1 および JAK3 遺伝子変異が、RAS 経路遺伝子変異獲得による腫瘍クローンの成立の後に、セカンドヒットとして腫瘍の進展に関与しているものと考えられた (図 7)。

図 7. SETBP1・JAK3 と RAS 経路遺伝子変異の関係



実際に、これらの遺伝子変異を有する症例 (n=16) は、有さない症例 (n=76) と比較して 5 年全生存率は低い傾向 (Hazard ratio = 1.90, 95% confidence interval (CI) = 0.87-4.19, p=0.10) を示した (図 8)。

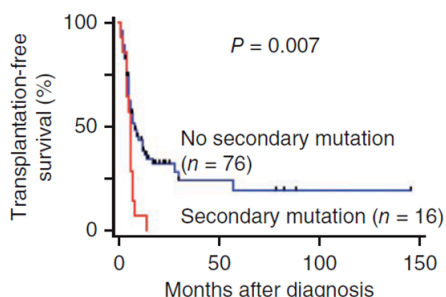
図 8. セカンダリー変異の有無と全生存率



更に、同種造血幹細胞移植を施行することなく長期生存が得られている 26 例ではこれらのセカンドヒット遺伝子変異は一例も認められず、5 年無移植生存率は SETBP1・JAK3 遺伝子変異を有する例で有意に不良であった (Hazard ratio = 2.18, 95% confidence

interval (CI) =1.18-4.02), p=0.007) (図 9)。

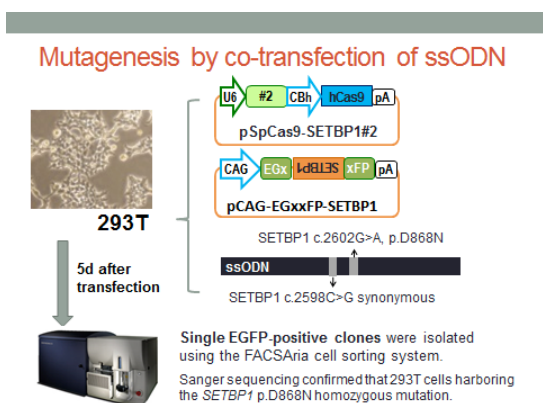
図 9. セカンダリー変異の有無と無移植生存率



また、分子標的療法の候補として、チロシンキナーゼ阻害薬である **Dasatinib** や細胞増殖シグナル伝達経路 (ERK MAP キナーゼ経路) に存在するリン酸化酵素 **MEK** の阻害剤である **MEK162** について **JMML** の治療薬となる可能性について検討したところ、**Dasatinib** や **MEK162** の濃度依存性に **JMML** 患者骨髄血の造血コロニー形成の抑制が認められた。更にフローサイトメトリを用いた **BrdU**、**SubG1** 法を用いて、これらの薬剤が細胞増殖を抑制しアポトーシス細胞数を増加させることを確認した。フローサイトメトリを用いた **BrdU**、**SubG1** 法は簡便で、定量性にも優れ、分子標的薬のスクリーニング法として有用であると考えられる。

また、**CRISPR/Cas** 法を用いて、**SETBP1** 変異導入細胞株を樹立した (図 10)。

図 10. SETBP1 変異導入細胞株の樹立



SETBP1 変異が **RAS** 経路に与える影響について検討した。変異 **SETBP1** を標的とした薬剤 (**PP2A activator** など) の効果について、今後さらなる検討が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 26 件) (全て査読有り)

- Hyakuna N, Muramatsu H, Higa T, Chinen Y, Wang X, Kojima S. Germline mutation of CBL is associated with moyamoya disease in a child with juvenile myelomonocytic leukemia and Noonan syndrome-like disorder. *Pediatr Blood Cancer*. 2015 62(3):542-544.
- Honda Y, Tsuchida M, Zaike Y, Masunaga A, Yoshimi A, Kojima S, Ito M, Kikuchi A, Nakahata T, Manabe A. Clinical characteristics of 15 children with juvenile myelomonocytic leukaemia who developed blast crisis: MDS Committee of Japanese Society of Paediatric Haematology/Oncology. *Br J Haematol*. 2014 165(5):682-687.
- Kar SA, Jankowska A, Makishima H, Visconte V, Jerez A, Sugimoto Y, Muramatsu H, Traina F, Afable M, Guinta K, Tiu RV, Przychodzen B, Sakaguchi H, Kojima S, Sekeres MA, List AF, McDevitt MA, Maciejewski JP. Spliceosomal gene mutations are frequent events in the diverse mutational spectrum of chronic myelomonocytic leukemia but largely absent in juvenile myelomonocytic leukemia. *Haematologica*. 2013 98(1):107-113.
- Makishima H, Yoshida K, Nguyen N, Przychodzen B, Sanada M, Okuno Y, Ng KP, Gudmundsson KO, Vishwakarma BA, Jerez A, Gomez-Segui I, Takahashi M, Shiraishi Y, Nagata Y, Guinta K, Mori H, Sekeres MA, Chiba K, Tanaka H, Muramatsu H, Sakaguchi H, Paquette RL, McDevitt MA, Kojima S, Sauntharajah Y, Miyano S, Shih LY, Du Y, Ogawa S, Maciejewski JP. Somatic SETBP1 mutations in myeloid malignancies. *Nat Genet*. 2013 45(8):942-946.
- Sakaguchi H, Okuno Y, Muramatsu H, Yoshida K, Shiraishi Y, Takahashi M, Kon A, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Makishima H, Wang X, Xu Y, Doisaki S, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Yoshida N, Maciejewski JP, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Exome sequencing identifies secondary mutations of SETBP1 and JAK3 in juvenile myelomonocytic leukemia. *Nat Genet*. 2013 45(8):937-941.
- Yoshida K, Toki T, Okuno Y, Kanazaki R, Shiraishi Y, Sato-Otsubo A, Sanada M, Park MJ, Terui K, Suzuki H, Kon A, Nagata Y, Sato Y, Wang R, Shiba N, Chiba

- K, Tanaka H, Hama A, Muramatsu H, Hasegawa D, Nakamura K, Kanegane H, Tsukamoto K, Adachi S, Kawakami K, Kato K, Nishimura R, Izraeli S, Hayashi Y, Miyano S, Kojima S, Ito E, Ogawa S. The landscape of somatic mutations in Down syndrome-related myeloid disorders. *Nat Genet.* 2013 45(11):1293-1299.
7. Yoshimi A, Kamachi Y, Imai K, Watanabe N, Nakadate H, Kanazawa T, Ozono S, Kobayashi R, Yoshida M, Kobayashi C, Hama A, Muramatsu H, Sasahara Y, Jakob M, Morio T, Ehl S, Manabe A, Niemeyer C, Kojima S. Wiskott-Aldrich syndrome presenting with a clinical picture mimicking juvenile myelomonocytic leukaemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2013 60(5):836-841.
 8. Yoshida N, Doisaki S, Kojima S. Current management of juvenile myelomonocytic leukemia and the impact of RAS mutations. *Paediatr Drugs.* 2012 14(3):157-163.
 9. Doisaki S, Muramatsu H, Shimada A, Takahashi Y, Mori-Ezaki M, Sato M, Kawaguchi H, Kinoshita A, Sotomatsu M, Hayashi Y, Furukawa-Hibi Y, Yamada K, Hoshino H, Kiyoi H, Yoshida N, Sakaguchi H, Narita A, Wang X, Ismael O, Xu Y, Nishio N, Tanaka M, Hama A, Koike K, Kojima S. Somatic mosaicism for oncogenic NRAS mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood.* 2012 120(7):1485-1488.
- [学会発表] (計26件)
1. Kawashima N, Okuno Y, Sekiya Y, Wang X, Xu Y, Narita, Doisaki S, Kamei M, Muramatsu H, Irie M, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Generation of Cell Lines Harboring SETBP1 Mutations By the Crispr/Cas9 System. 56th ASH Annual Meeting and Exposition. Dec. 8, 2014. San Francisco, USA.
 2. Sakaguchi H, Muramatsu H, Wang X, Xu Y, Hibi Y, Kawashima N, Narita A, Doisaki S, Yoshida N, Hama A, Takahashi Y, Makishima H, Yamada K, Maciejewski JP, Kojima S. Aberrant DNA Methylation Is Associated With Poor Outcomes In Juvenile Myelomonocytic Leukemia. The 55th ASH Annual Meeting and Exposition. Dec. 7, 2013. New Orleans, USA.
 3. Muramatsu H, Sakaguchi H, Wang X, Yoshida K, Okuno Y, Sanada M, Xu Y, Doisaki S, Narita A, Kawashima N, Hama A, Takahashi Y, Yoshida N, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Makishima H, Maciejewski J.P, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Clinical and Genetic Characterization Of Patients With C-CBL Mutated Juvenile Myelomonocytic Leukemia By Whole-Exome/Deep Sequencing. The 55th ASH Annual Meeting and Exposition. Dec. 7, 2013. New Orleans, USA.
 4. Sakaguchi H, Muramatsu H, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Makishima H, Wang X, Xu Y, Doisaki S, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Yoshida N, Maciejewski JP, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Molecular Spectrum of Juvenile Myelomonocytic Leukemia Identified by Whole exome sequencing. The 18th Congress of EHA. Jun. 14, 2013. Stockholm, Sweden.
 5. Muramatsu H, Sakaguchi H, Xu Y, Yoshida K, Okuno Y, Hama A, Takahashi Y, Makishima H, Maciejewski J.P, Ogawa S, Kojima S. Clinical and genetic characterization of 17 Juvenile myelomonocytic leukemia patients with c-CBL mutations. The 12th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes. May. 10, 2013. Berlin, Germany.
 6. Muramatsu H, Okuno Y, Sakaguchi H, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Makishima H, Wang X, Xu Y, Doisaki S, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Yoshida N, Maciejewski J.P, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Whole exome analysis reveals spectrum of gene mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. 54th Annual Meeting of the American Society of Hematology. Dec. 9, 2012. Atlanta, USA.
 7. Muramatsu H, Sakaguchi H, Koike K, Sanada M, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Makishima H, Wang X, Xu Y, Doisaki S, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Yoshida N, Maciejewski JP, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Comprehensive genetic analysis by deep sequencing in juvenile myelomonocytic leukemia. 6th International Symposium on MDS and Bone Marrow Failure Syndromes in Childhood. Prague, Nov. 7, 2012. Czech Republic.
 8. Muramatsu H, Doisaki S, Shimada A, Takahashi Y, Ezaki M, Sato M, Kawaguchi H, Kinoshita A, Sotomatsu M, Hayashi Y, Furukawa Y, Yamada K, Hoshino H, Kiyoi H, Yoshida N, Sakaguchi H, Narita A, Wang X, Ismael O, Xu Y, Nishio N, Tanaka M, Hama A, Koike K, Kojima S. Somatic mosaicism for oncogenic NRAS mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. 6th International Symposium

9. on MDS and Bone Marrow Failure Syndromes in Childhood. Prague, Nov. 7, 2012. Czech Republic.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 勢二 (KOJIMA, Seiji)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20313992

(2) 研究分担者

高橋 義行 (TAKAHASHI, Yoshiyuki)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：40432273

(3) 連携研究者

嶋田 明 (SHIMADA, Akira)
岡山大学・大学病院・講師
研究者番号：70391836