

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09645

研究課題名(和文) オーダーメイド治療を目指した日本人白血病細胞株バンクの整備と抗がん剤感受性の解析

研究課題名(英文) Establishment of ALL cell line bank to identify genetic factors involving in drug-sensitivity for future precision medicine

研究代表者

犬飼 岳史 (INUKAI, Takeshi)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：30293450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：小児急性リンパ性白血病(ALL)の薬剤感受性に関与するゲノム要因を同定するために、93株のBCP-ALL株と24株のT-ALL株(うち86株と7株が日本人由来)からなる、他に類のない大規模な細胞株バンクを構築し、さまざまな遺伝学的解析方法を用いて各細胞株のゲノム・レベルでの特徴を明らかにした。また、実際に細胞株バンクを用いて標準的な化学療法剤および新規治療薬の感受性と関連するゲノム要因を同定し、その研究成果を3つの英文論文を発表した。こうした研究成果から、本細胞株バンクが小児ALLの薬剤感受性に関与するゲノム要因を同定する上で有用であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To identify genetic factors that involve in the drug-sensitivity of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL), we established cell line bank. We collected 93 BCP-ALL and 24 T-ALL cell lines including 86 and 7 cell lines that were established from Japanese patients, respectively. In these cell lines, we performed genetic analyses including multiplex ligation-dependent probe amplification assay, gene mutation analyses using next-generation sequencer, SNP array analyses, and digital karyotyping by array CGH analyses. Using the cell line bank, we verified that glucocorticoid sensitivity was associated with gene expression levels of glucocorticoid receptor (Hematol Oncol 2018) and BIM (Leuk Res 2017). We also revealed that higher sensitivity to bortezomib was associated with IKZF1 gene deletion (PLoS One 2017). These observations suggested a usefulness of cell line bank for identification of genetic factors involving in the drug-sensitivity of ALL.

研究分野：小児科学

キーワード：急性リンパ性白血病 化学療法 薬剤感受性 遺伝子変異 一塩基多型

## 1. 研究開始当初の背景

小児急性リンパ性白血病(ALL)の in vitro での薬剤感受性が強力な予後因子であることは 20 年以上前に明らかにされていたが、臨床検体の培養が困難なために各症例の in vitro における薬剤感受性を系統的な前方視的治療に応用することは試みられていない。本研究は、白血病細胞株バンクを整備し、細胞株を活用して各種抗がん剤に対する感受性規定因子を同定し臨床応用を目指すという、今までにない発想に基づく研究である。

## 2. 研究の目的

本研究では、当科が樹立・保有している豊富な細胞株をベースにして日本人由来白血病細胞株バンクを整備し、培養・解析が容易である細胞株を活用して各種抗がん剤に対する感受性を規定する因子を多角的にアレイ解析し、同定された各因子の予後への影響を臨床検体で検証することによって、将来的には各症例の感受性因子のパターンに応じて治療薬を選択できるテーラーメイド治療への応用を目指す。

## 3. 研究の方法

白血病細胞バンクの整備、既存および新規薬剤に対する感受性解析の三本立てで研究を進めた。白血病細胞バンクの整備では、細胞株の樹立と収集を継続的に行いながら、大規模災害等にも備えた。既存薬剤に対する感受性因子の解析では、細胞株の解析から同定された感受性規定因子の意義を検証した。既存の化学療法剤に対する感受性加えて、新規薬剤として臨床応用が期待されているクロファラビンやボルテゾミブに対する感受性解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 白血病細胞株バンクの整備

自施設で樹立され凍結状態にあった細胞株に加えて、全国の施設からも提供を受けて、BCP-ALL 細胞株は日本人由来 86 株を含む 93 株が、T-ALL 細胞株は日本人由来 7 株を含む 24 株が解析可能となった。これら細胞株の凍結細胞は、自施設に加えて大規模災害に備えて広島大学においても保管を行っている。

一方、各細胞株の分子遺伝学的な解析として、(1) Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)法による代表的な欠失遺伝子のコピー数解析、(2) 次世代シーケンサーによるゲノムの変異解析、(3) 遺伝子多型(SNP)の網羅的アレイ解析、(4) (3)のデータを二次利用した array CGH による digital karyotyping 解析を行い、データ・ベース化を進めた。

### (2) 既存化学療法剤に対する感受性の解析

細胞株バンクの薬剤感受性解析ツールとしての有用性を検証するために、既知の薬剤感受性遺伝子について解析を進めた。その結果、ステロイド感受性におけるグルココルチ

コイド受容体 NR3C1 遺伝子(研究成果論文 3) および BIM 遺伝子(研究成果論文 5)の意義を確認した。また、AraC の感受性と関連する DCK 遺伝子の意義については、CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集技術によるノック・アウトによって AraC 耐性を獲得することを明らかにした(Epub ahead of print)。さらに、ロイナーゼ(L-asparaginase)に対する感受性が、ALL 細胞における ASNS 遺伝子のメチル化状態と強く相関し、L-asparaginase 感受性の指標となる可能性を明らかにした。現在は、臨床応用を目指して HPLC 法による解析方法を企業と共同開発中である。

一方、日本人由来の B 前駆細胞型 ALL 細胞株の 72 株を対象にして、薬剤感受性における GWAS(genome-wide association study)を imputation による高精度解析によって進めており、各種の化学療法剤に対する感受性との関連性が示唆される SNP を抽出し、その意義の細胞遺伝学的な検証を進めている。

### (3) 新規薬剤に対する感受性の解析

ALL の治療薬として保険収載された新規のクロファラビンに対する感受性解析を進め、同系統の AraC よりも高い抗白血病効果を、特に予後不良な 11q23 転座を有する ALL 細胞株に示すことを明らかにした(Epub ahead of print)。また、再発 ALL に対する臨床的な有効性の報告が散見されるボルテゾミブと、その次世代薬であるカルフィルゾミブに対する感受性の解析を進め、予後不良因子として注目されている IKZF1 遺伝子の欠失を有する細胞株が高感受性を示すことを明らかにした。一方で、P-gp 陽性の ALL 細胞株はカルフィルゾミブに選択的に耐性を示し、P-gp 阻害剤との併用および CRISPR-Cas9 による P-gp のノック・ダウンによってカルフィルゾミブ耐性が克服されることを明らかにした(研究成果論文 2)。

## 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 13 件)

(1) Urayama KY, Inukai T (14), et al [3 5]. Regional evaluation of childhood acute lymphoblastic leukemia genetic susceptibility loci among Japanese. Sci Rep. 2018;8, e789. 査読有  
doi: 10.1038/s41598-017-19127-7.

(2) Takahashi K, Inukai T(2), Shinohara T(12), Watanabe A(13), et al [23]. Anti-leukemic activity of bortezomib and carfilzomib on B-cell precursor ALL cell lines. PLoS One. 2017;12, e0188680. 査読有  
doi: 10.1371/journal.pone.0188680.

(3) Huang M, Inukai T(2), Shinohara T (5), Watanabe A(6), et al [14]. Splicing variant profiles and single nucleotide polymorphisms of the glucocorticoid receptor

r gene in relation to glucocorticoid sensitivity of B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Hematol Oncol.* 2018;36: 245-251. 査読有  
doi: 10.1002/hon.2471.

(4) Tamai M, Inukai T(7), et al [11]. TG Fβ1 synergizes with FLT3 ligand to induce chemoresistant quiescence in acute lymphoblastic leukemia with MLL gene rearrangements. *Leuk Res.* 2017;61:68-76. 査読有  
doi: 10.1016/j.leukres.2017.08.013.

(5) Huang M, Shinohara T(5), Watanabe A(6), Inukai T(15), et al [15]. Lack of association between deletion polymorphism of BIM gene and in vitro drug sensitivity in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res.* 2017;60:24-30. 査読有  
doi: 10.1016/j.leukres.2017.06.003.

(6) Kasai S, Inukai T(8), et al [14]. Inflammatory mediator ultra-low-molecular-weight hyaluronan triggers necrosis of B-precursor leukemia cells with high surface CD44 expression. *Cell Death Dis.* 2017;8:e2857. 査読有  
doi: 10.1038/cddis.2017.249.

(7) Piao J, Inukai T(4), et al [10]. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors selectively induce cytotoxicity in TCF3-HLF-positive leukemic cells. *Cancer Lett.* 2017;386:131-140. 査読有  
doi: 10.1016/j.canlet.2016.11.021.

(8) Kato M, Inukai T(11), et al [31]. Long-term outcome of 6-month maintenance chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia in children. *Leukemia.* 2017;31(3):580-584. 査読有  
doi: 10.1038/leu.2016.274.

(9) Watanabe A(1), Inukai T(8), et al [9]. Erythrophagocytosis in T-cell type acute lymphoblastic leukaemia with near-tetraploidy. *J Clin Pathol.* 2016;69(12):1129-1132. 査読有  
doi: 10.1136/jclinpath-2016-203915.

(10) Sera Y, Inukai T(6), et al [8]. Identification of cooperative genes for E2A-PBX1 to develop acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Sci.* 2016;107(7):890-8. 査読有  
doi: 10.1111/cas.12945.

(11) Nemoto A, Inukai T (19) et al [19]. Specific Antileukemic Activity of PD0332991, a CDK4/6 Inhibitor, against Philadelphia Chromosome-Positive Lymphoid Leukemia. *Mol Cancer Ther.* 2016;15:94-105. 査読有  
doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-1065.

(12) Tomizawa D, Inukai T(5), et al [10]. Favorable outcome in non-infant childr

en with MLL-AF4-positive acute lymphoblastic leukemia: a report from the Tokyo Children's Cancer Study Group. *Int J Hematol.* 2015;102:602-10. 査読有  
doi: 10.1007/s12185-015-1869-y.

(13) Wu Z, Inukai T(6), et al [9]. HMG A2 as a potential molecular target in KMT2A-AFF1-positive infant acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 2015;171:818-29. 査読有  
doi: 10.1111/bjh.13763.

〔学会発表〕(計 18 件)

(1) Watanabe A, Inukai T, et al. Association between asparaginase synthetase gene methylation status with karyotypes in childhood BCP-ALL. 第 59 回日本小児血液がん学会, 2017.

(2) 篠原 珠緒, 犬飼 岳史ら. ALL 細胞株の Ara-C 感受性における DCK 遺伝子多型と変異の意義. 第 59 回日本小児血液がん学会, 2017.

(3) 高橋和也, 犬飼 岳史ら. 細胞質内 μ 鎖陽性の B 前駆細胞性 ALL に対する Idelalisib の抗白血病活性. 第 79 回日本血液学会, 2017.

(4) 杉津 晋平, 犬飼 岳史ら. BCP-ALL 細胞株の thiopurine 感受性における NT5C2 遺伝子変異の意義. 第 79 回日本血液学会, 2017.

(5) Watanabe A, Inukai T, et al. Involvement of allele-specific methylation of asparagine synthetase gene in asparaginase sensitivity of BCP-ALL. 第 58 回アメリカ血液学会, 2016.

(6) Huang M, Inukai T, et al. Molecular mechanism for synergistic anti-Leukemic activity of tyrosine kinase inhibitors and glucocorticoids against Ph+ALL. 第 58 回アメリカ血液学会, 2016.

(7) 篠原 珠緒, 犬飼 岳史ら. B 前駆細胞型 ALL 細胞株の薬剤感受性における CASP8 遺伝子の ins/del 多型の意義. 第 58 回日本小児血液がん学会, 2016.

(8) 杉津 晋平, 犬飼 岳史ら. BCP-ALL 細胞株の thiopurine 感受性における NUDT15 遺伝子多型の意義. 第 58 回日本小児血液がん学会, 2016.

(9) 黄 媚賢, 犬飼 岳史ら. B 前駆細胞性 ALL の AraC 感受性における deoxycytidine kinase の意義. 第 58 回日本小児血液がん学会, 2016.

(10) 黒田 格, 犬飼 岳史ら. BCP-ALL 細胞株の ABT737 感受性における Bcl2 ファミリー遺伝子の意義. 第 58 回日本小児血液がん学会, 2016.

(11) 加藤 大貴, 犬飼 岳史ら. B 前駆細胞型 ALL の MTX 感受性における TYMS 遺伝子の tandem duplication 多型の意義. 第 58 回日本小児血液がん学会, 2016.

(12) Inukai T. Molecular aspects of che

resistance in poor prognostic ALL. 第 57 回日本小児血液がん学会, 2015.

(13) 篠原 珠緒, 犬飼 岳史ら. Association of GSTM1 and GSTT1 deletion polymorphisms with MTX-sensitivity of BCP-ALL. 第 57 回日本小児血液がん学会, 2015.

(14) 加藤 大貴, 犬飼 岳史ら. Significance of 19-bp deletion polymorphism of DHFR gene in MTX-sensitivity of B-cell precursor ALL. 第 57 回日本小児血液がん学会, 2015.

(15) 小鹿 学, 犬飼 岳史ら. Association of rs924607 polymorphism located in CEP72 gene promoter with vincristine sensitivity of BCP-ALL in Japanese population. 第 57 回日本小児血液がん学会, 2015.

(16) 黄 媚賢, 犬飼 岳史ら. Association of receptor isoform profiling and SNP typing of glucocorticoid(GC) with GC-sensitivity of BCP-ALL. 第 57 回日本小児血液がん学会, 2015.

(17) 玉井 望雅, 犬飼 岳史ら. Association of germline polymorphisms in the ARID5B gene with its gene expression level and chemoresistance of BCP-ALL. 第 57 回日本小児血液がん学会, 2015.

(18) 犬飼 岳史ら. 白血病細胞株を用いた小児 ALL における抗がん剤感受性解析システムの確立. 第 118 回日本小児科学会, 2015.

〔図書〕(計 2 件)

(1) 犬飼 岳史. 日本臨床社. 免疫症候群 II (急性リンパ性白血病), 2016. 859(5).

(2) 犬飼 岳史. 診断と治療社. 小児血液・腫瘍学 (がんの細胞生物学), 2015. 585(3).

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

犬飼 岳史 ( INUKAI, Takeshi )

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号 : 30293450

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

渡邊 敦 ( WATANABE, Atsushi )

山梨大学・大学院総合研究部・診療助教

研究者番号 : 30610498

篠原 珠緒 ( SHINOHARA, Tamao )

山梨大学・大学院総合研究部・医学研究員

研究者番号 : 80747452

(4) 研究協力者

なし