

令和元年5月23日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16249

研究課題名(和文) MEF2D融合遺伝子陽性急性リンパ性白血病における研究基盤の構築

研究課題名(英文) Scientific research of MEF2D-rearranged acute lymphoblastic leukemia

研究代表者

鈴木 喬悟 (Suzuki, Kyogo)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：00794538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：MEF2D遺伝子の再構成は、急性リンパ性白血病(acute lymphoblastic leukemia; ALL)の予後不良な一群を特徴づける遺伝子変異である。本課題においては、MEF2D遺伝子再構成陽性ALLの診断法を確立するとともに、治療法開発への足がかりを得るための研究を行った。初発ALL患児でスクリーニングを行い、新たに3例の再構成陽性例を同定し、これらの症例でMEF2D遺伝子のsplit FISH解析の有用性を確認した。また、細胞株を用いた試験管内の薬剤感受性試験により、このタイプのALLに対する分子標的薬、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤とプロテアソーム阻害剤の相乗効果を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年飛躍的に進歩した、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子解析の技術を利用して、ALLにおける新規の遺伝子変異が次々と同定されている。本課題の研究対象であるMEF2D遺伝子再構成もその一つで、precision medicineにおける分子マーカーとしての応用が期待される。本研究成果をリスク層別化や新規治療へとつなげることにより、この予後不良なALLの一群の治療成績向上に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：MEF2D gene rearrangement (MEF2Dr) is a critical genetic aberration in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (ALL), which is predominantly observed in adolescent and young adult patients, and confers dismal prognosis. This scientific research aimed to establish diagnostics and provide a clue to the development of novel treatment strategies for this ALL subtype. We performed genetic analyses including direct sequencing and RNA sequencing, and identified three additional MEF2Dr positive cases. MEF2D split fluorescence in situ hybridization analysis showed its diagnostic relevance in detecting MEF2Dr. In a previous study, we demonstrated two molecular targeted drugs, histone deacetylase inhibitor and proteasome inhibitor have antitumor effects against MEF2D-BCL9-positive leukemia cells. Further drug sensitivity testing revealed these drugs possess synergic effect in vitro.

研究分野：小児科学

キーワード：急性リンパ性白血病 MEF2D 遺伝子再構成 融合遺伝子

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 急性リンパ性白血病 (acute lymphoblastic leukemia; ALL) は、小児期において最も頻度が高い血液悪性腫瘍で、日本では年間約 600 人の小児が新たに発症する。白血病の悪性度に基づく層別化治療の適正化、多剤併用化学療法の改良、造血細胞移植の組み入れにより治療成績が向上し、80~90%の患者において長期生存が得られるようになった一方で、依然として予後が不良な患者群が存在する。

(2) ALL はさまざまな遺伝子の異常を伴って発症することが知られている。近年飛躍的に進歩した、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子解析の技術を利用して、ALL においても新規の遺伝学的異常が次々と同定されている。それらの機能を明らかにし、さらに、リスク層別化や新規治療へとつなげることにより、さらなる治療成績の向上を目指すことが急務となっている。

(3) 遺伝子再構成の結果として生じる融合遺伝子は、白血病発症の分子生物学的メカニズムにおいて重要な役割を果たすとともに、臨床においては再発リスクを予測する分子マーカーとして用いられ、また、一部ではこれをターゲットとした治療薬が開発されている。我々は、小児再発 ALL 患者コホートにおいて網羅的遺伝子解析を行った結果、新規 *MEF2D-BCL9* 融合遺伝子を同定した (Suzuki K, Okuno Y, et. al. *Journal of Clinical Oncology* 2016;34(28):3451-3459)。同時期に複数の研究グループから *MEF2D* 遺伝子再構成陽性 (*MEF2D-rearranged; MEF2D-r*) ALL に関する報告がなされ、このサブタイプは思春期・若年成人に好発し、B 前駆細胞性 ALL (B-ALL) に分類される免疫表現型を呈し、従来の治療に抵抗性で予後が悪いという共通した臨床的特徴が示された。さらに、より大規模なコホートでの発生頻度も明らかになり、成人 B-ALL の約 7%、小児 B-ALL の 1~4% を占めることが報告された。

(4) 我々は以前の研究で、*MEF2D-BCL9* の機能を解析するため、B-ALL の細胞株 (NALM-6 細胞) にこの融合遺伝子を導入し強制発現させたモデル細胞を作成した。結果、このモデル細胞ではコントロールと比較して細胞の増殖が速くなるとともに、ALL 治療のキードラッグである副腎皮質ステロイドが効きにくくなることが確認された。一方、*MEF2D-BCL9* 陽性 ALL 患者由来の初代培養細胞を用いた *in vitro* での薬剤感受性試験により、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (histone deacetylase inhibitors; HDACi) であるポリノスタット (SAHA)、キシノスタット、プロテアソーム阻害剤 (proteasome inhibitors; PI) であるボルテゾミブ (BOR) の効果が期待できることを示した。

2. 研究の目的

MEF2D 遺伝子再構成は予後を規定する遺伝子変異であり、precision medicine における分子マーカーとしての応用が期待される。本研究は、*MEF2D-r* ALL の研究基盤の構築を目的として、その診断法を確立するとともに、生物学的性質を明らかにし、治療法開発への足がかりを得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 本研究施設における初発 ALL 患児の骨髄もしくは末梢血検体からゲノム DNA/RNA を抽出し、*MEF2D-BCL9* および *MEF2D-HNRNPUL1* 検出用に設計したゲノム DNA/cDNA のプライマーを用いて、PCR 法およびダイレクトシーケンスによるスクリーニングを行った。あわせて、同じ検体で RNA シーケンスによる網羅的な融合遺伝子の検出、および遺伝子発現解析を行った。

(2) *MEF2D* の融合パートナーとして、最も頻度が高い *BCL9* 以外にも、*HNRNPUL1*、*STAT6*、*SS18*、*DAZAP1*、*FOXJ2*、*CSF1R* などが同定されている。このように複数のパートナー遺伝子が存在する場合、*MEF2D* の split fluorescence in situ hybridization (FISH) 解析が臨床におけるスクリーニング検査として実用的と考えられる。そこで、*MEF2D* の上下流それぞれ約 750 塩基をターゲットとしてカスタムプローブを作成し (図 1)、患者検体もしくは細胞株から作製したサイトスピン標本を用いて本検査の有用性を検証した。

(3) *MEF2D-BCL9* 陽性 (自施設にて樹立)、および *MEF2D-HNRNPUL1* 陽性 (Kasumi-9 細胞) の B-ALL 細胞株を用いて、*in vitro* の薬剤感受性試験を行った。抗腫瘍効果の判定は、薬剤添加から 48 時間後にフローサイトメトリーで cell viability を測定して行った。

(4) 上記の細胞株と免疫不全マウス (NSG マウス; NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) を用いた cell line-derived xenograft モデルを作製した。これを利用して、*in vitro* で有効性が確認された分子標的薬の生体内における効果を検証した。治療効果の判定は、白血病細胞輸注 4 週間

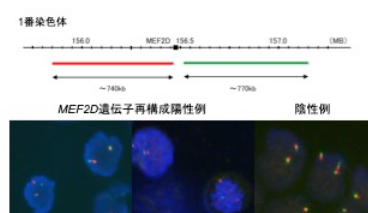
後までのマウスの生存、各臓器の肉眼所見、およびフローサイトメトリーを用いた残存腫瘍の測定を行った。

4. 研究成果

(1) 新規に発症した B-ALL 患者 30 例でスクリーニングを施行したところ、新たに 3 例において *MEF2D-BCL9* 融合遺伝子を検出した。発症時の年齢は 4~14 歳であった。設計したプライマーを用いたダイレクトシーケンスで、全例においてゲノム DNA および mRNA の切断点を確認された。RNA シーケンス解析では、*MEF2D-r* ALL 固有の遺伝子発現プロファイル、*HDAC9* の高発現など、以前の研究と一致した知見が得られた。

(2) 患者検体もしくは B-ALL 細胞株から作製したサイトスピン標本を用いて、*MEF2D* の split FISH 解析を施行したところ、*MEF2D-r* ALL 患者検体 (n=7) と細胞株 (n=2) の全例において *MEF2D* 遺伝子の break-apart シグナルが検出された (図 1)。一方、コントロールの患者検体・細胞株においては異常シグナルが検出されなかった。すなわち、スクリーニングの解析結果との完全一致をもって、両検査の整合性が確認された。

図1. *MEF2D* 遺伝子の split FISH 解析



(3) 我々は以前の研究において、*in vitro* の薬剤感受性試験により、*MEF2D-BCL9* 陽性白血病細胞における副腎皮質ステロイドへの抵抗性と、HDACi および PI の単剤での抗腫瘍効果を示した。この結果を受けて、本研究においても *in vitro* における各種薬剤の効果の検証を継続した。副腎皮質ステロイドへの抵抗性は、*MEF2D-HNRNPUL1* 陽性 ALL 細胞株 (Kasumi-9 細胞) においても確認された (図 2)。一方で、HDACi と PI の代表的薬剤、SAHA と BOR を併用したところ、これらの相乗効果が確認された (図 3)。

図2. *MEF2D-r* ALL 細胞のステロイド抵抗性

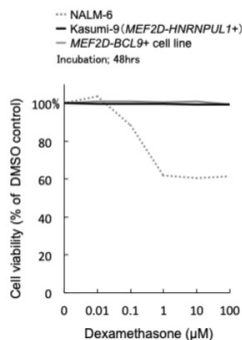
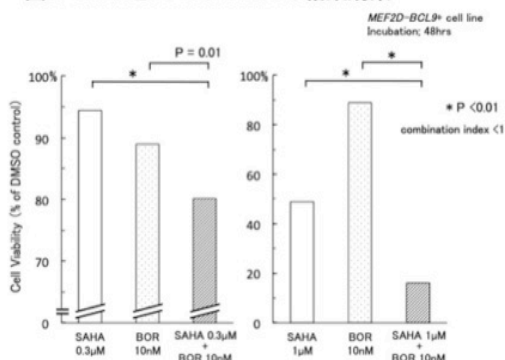


図3. SAHAとBORの *in vitro* の相乗効果



(4) 自施設で樹立した、患者由来の *MEF2D-BCL9* 陽性 ALL 細胞株を NSG マウスに輸注し、cell line-derived xenograft モデルを作成した (図 4)。このモデルを用いて、生体内における SAHA と BOR の単剤および併用での抗腫瘍効果を検証した。結果、本研究においてこれまで行った実験においては、マウスの生存、骨髄および脾臓における腫瘍細胞浸潤の制御に関して、単剤・併用治療群の優位性は認められなかった (図 5)。今後、治療効果の判定法 (luminescence を利用した生体内イメージングを利用など)、薬剤投与量・投与間隔を見直し比較検討する。

図4. Cell line-derived xenograftモデル

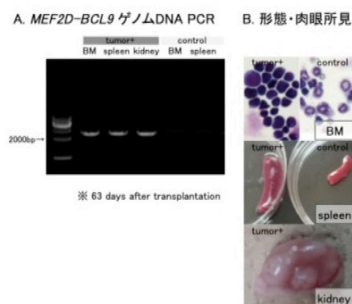
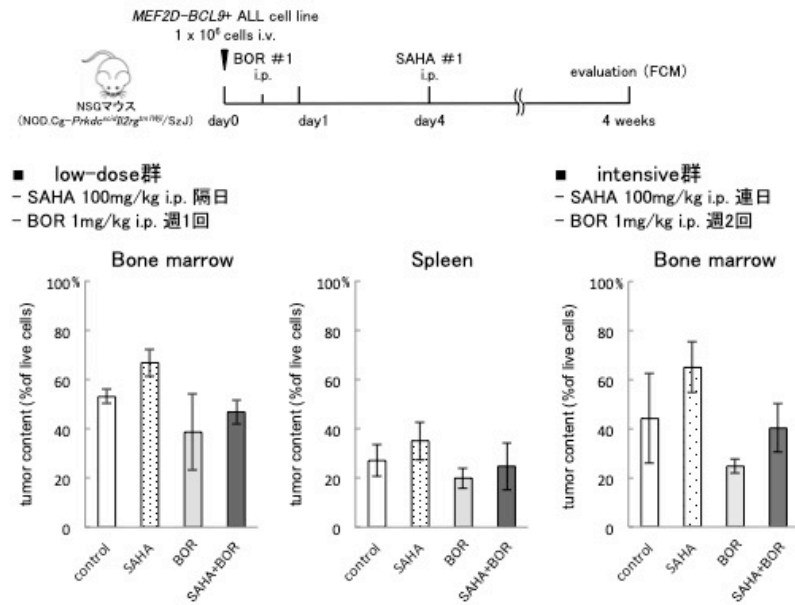


図5. *in vivo*の薬剤感受性試験



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

The clinical application of NGS for acute lymphoblastic leukemia in children. Motoharu Hamada, Nobuhiro Nishio, Kyogo Suzuki, Yusuke Okuno, Hideki Muramatsu, Seiji Kojima, and Yoshiyuki Takahashi. The 4th Oriental Congress of Pediatrics. 2019年9月15日 Shanghai, China

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：急性リンパ性白血病関連の新規遺伝学的異常及びその利用
 発明者：奥野 友介、小島 勢二、鈴木 喬悟、川島 希、関屋 由子
 権利者：国立大学法人名古屋大学
 種類：特許権
 番号：特願 2017-558310・JP2016088570
 出願年：2016年
 国内外の別：国内・国際

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

奥野 友介 (OKUNO, Yusuke)

名古屋大学・医学部附属病院・先端医療・臨床研究支援センター・特任講師

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。