

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09471

研究課題名(和文) アグレッシブNK細胞白血病の発症関連遺伝子異常の同定と新規治療法開発

研究課題名(英文) Genetic alterations of aggressive NK cell leukemia and identification of molecular target candidates

研究代表者

石田 文宏 (ISHIDA, FUMIHIRO)

信州大学・学術研究院保健学系・教授

研究者番号：80311695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アグレッシブNK細胞白血病(ANKL)は稀ではあるが東アジアに多く若年に発症する予後不良の悪性血液腫瘍のひとつである。ANKLの診断はしばしば困難で治療法も確立しておらず、より適切な診断・治療法の開発を目的にANKLの網羅的な遺伝子解析を行った。細胞内シグナル伝達経路のひとつであるJAK-STAT系分子の遺伝子異常をはじめ、複数の経路の異常を認めた。ANKLを含むNK細胞腫瘍株に対してJAK阻害薬が細胞増殖抑制に有効であった。以上により、ANKLの遺伝子異常を明らかにして、NK細胞腫瘍の分子標的候補を同定した。

研究成果の概要(英文)：Aggressive NK cell leukemia (ANKL) is a malignant hematological disease with poor prognosis which is rare but rather common in young Eastern Asian populations. Diagnostic and therapeutic strategies for ANKL have not been well defined. To elucidate pathogenesis of ANKL and develop novel molecular targets for ANKL, we performed whole-exome sequence analyses of ANKL cells from patients with ANKL. Genetic alterations of several signaling pathways including JAK-STAT and RAS-MAPK, as well as DDX3X and epigenetic modifiers, were identified. Cell lines derived from NK cell malignancies were sensitive to JAK inhibitors, which further demonstrated the importance of JAK-STAT system in the pathogenesis of ANKL. These results provide further insights into molecular pathogenesis of ANKL and target candidates for therapies of NK cell malignancies.

研究分野：血液内科学

キーワード：JAK-STAT系 NK細胞腫瘍

1. 研究開始当初の背景

(1) アグレッシブ NK 細胞白血病の特徴と診療における課題

アグレッシブ NK 細胞白血病(以下、ANKL)はエプシュタイン バー(EB)ウイルスが関連する成熟 NK 細胞腫瘍のひとつで、若年者に急激に発症し、低頻度の疾患であるが東アジアに多く、多臓器不全や血球貪食症候群、播種性血管内凝固症候群を高率に合併して死亡する予後不良の疾患である。ANKL の診断・治療上の課題として、受診時には腫瘍細胞量が末梢血や骨髄で 20%以下と少量で診断までに時間がかかり、臓器障害が進行した例が約 30%あること、腫瘍細胞形態が多彩で、三分の一の例で腫瘍細胞が正常大顆粒リンパ球(LGL)と形態が酷似するため形態診断が困難であること、また、NK 細胞腫瘍には腫瘍細胞特異的マーカーが存在しないこと、があり ANKL の診断を困難にしている。また、日韓多施設共同研究の結果、ANKL の治療法として L-アスパラギナーゼを含む化学療法が有効である可能性が判明したが、生存期間の延長には必ずしもつながっておらず、ANKL に関して迅速で確実な診断法と同種造血幹細胞移植に橋渡しができる有効でかつ有害事象が少ない治療法の開発が望まれている。

(2) NK 細胞腫瘍性疾患の遺伝子異常

これまで、ANKL の病因に関連する遺伝子異常は同定されていない。次世代シーケンシング法を用いて緩徐型の慢性 NK 細胞リンパ増殖異常症(CLPD-NK)の約 4 割に STAT3 遺伝子活性化型変異(Koskela ら、NEJM, 2012, Jerez ら、Blood, 2012)および節外性 NK/T 細胞リンパ腫、鼻型の 60%に JAK3 遺伝子変異(Koo ら、Cancer Discovery 2012)が報告された。ANKL に関してこれまでアレイ CGH 法や一部の遺伝子の直接シーケンシング法で検討された報告があるが、これらの遺伝子を含めて詳細な解析はされておらず ANKL に特徴的な遺伝子異常は明らかになっていない。

以上より、ANKL 腫瘍細胞の網羅的遺伝子解析による体細胞遺伝子変異を同定することは、ANKL の正確かつ迅速な診断法の確立や治療法の適切な評価、新規治療薬開発のための標的遺伝子候補同定の基礎情報を提供する可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では ANKL 症例を対象に、次世代シーケンシング法により網羅的遺伝子解析を行い、ANKL の病因や病像進展に関与する遺伝子異常を同定することを目的とする。遺伝子異常像を明らかにすることで ANKL の適切な診断や治療成績の向上に有用な情報となる。

3. 研究の方法

(1) 症例

WHO 分類 2008 版の診断基準をみたく ANKL 症例を対象とした。腫瘍細胞の表面形質が CD2+CD3-56+ の NK 細胞型で、骨髄または末梢血を含む臓器浸潤があり、急速な臨床経過を呈する例とした。研究計画は研究代表者施設および関連施設の倫理委員会で審査され承認を得た。検体はヘルシンキ宣言に従って同意取得後に採取・保存された。

(2) 全エクソン解析およびターゲット DNA シークエンス解析

末梢血または骨髄の単核球から腫瘍細胞が 90%以上の場合にはそのまま、それ以下の場合には CD3-56+ の細胞分画を FACSAria により腫瘍細胞として分取し、腫瘍細胞ゲノム DNA として抽出した。非腫瘍ゲノム DNA は非造血細胞組織ないしは NK 細胞陰性分画を単核球から採取して DNA を抽出した。

エキソーム キャプチャーは Nextera Rapid Capture Exome キットにて行った。腫瘍細胞のみの検体では単核球ないしホルマリン固定パラフィン包埋骨髄組織標本から腫瘍ゲノム DNA を抽出し、Agilent Sure XT Clinical Research Exome キットにて行った。

ターゲット シークエンスは 578 腫瘍関連遺伝子を搭載した SeqCap EZ Cancer Design パネルを用いた。ライブラリのシーケンシングは Illumina HiSeq 2000 にて実施した。

(3) 変異解析

BWA-MEM にてマッピング、Picard で重複リードを除去した後、GATK IndelRealigner で Indel の再アラインメント、塩基クオリティを再計算した。ヴァリアント コールは GATK Mutect2 にて行い、その後フィルタリングした。カバレッジを計算すると、ANKL 腫瘍検体およびコントロール検体でそれぞれ平均 48x、72x であった。変異アノテーションは Annovar tool にて RefGene データベースに対して行った。1%以上の多型ほかをフィルタリング、タンパク機能に影響する変異を同定し、最終的に Integrative Genomics Viewer にて生物学的重要性を考慮して確認した。

(4) コピー数変異解析

リードを統合、トリムし、Burrows-Wheeler Aligner にてヒトゲノムにアラインメントした。フィルター後、FPKM コピー数値を計算し、リファレンスで除して log2 コピー数比を求めた。

4. 研究成果

(1) ANKL の体細胞変異スペクトラム

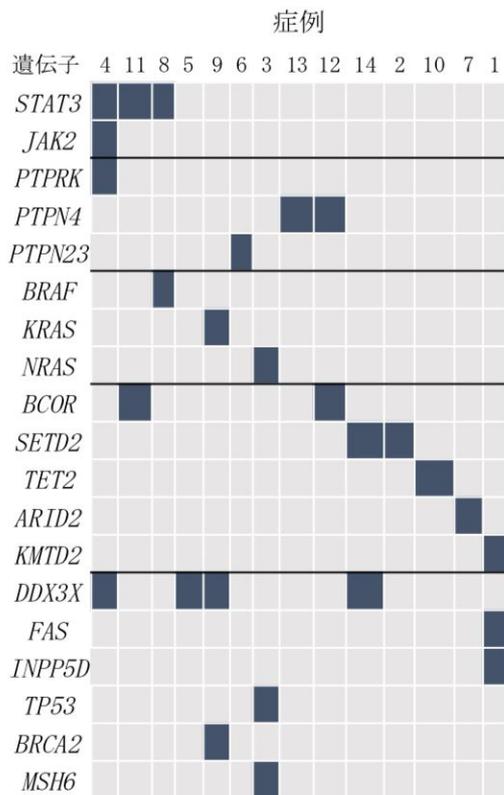


図. ANKL における遺伝子異常

今回解析可能であった ANKL 症例は、腫瘍とコントロールペア 4 例、腫瘍細胞のみの検体 10 例であった。1 塩基変異パターンは C>T、C>A、A>G 置換が多く他の腫瘍と同様であった。3 塩基変異パターンではシグニチャー 3 の頻度が低かった。

(2) ANKL の体細胞変異

ANKL 腫瘍 - コントロールペアにおける synonymous 体細胞変異数中央値は 105(43-190)であった。全 14 例で認められた主たる変異としては *STAT3*(3 例、21%)があった。*STAT3* 変異陽性例のうち 2 例は SH2 ドメインの活性化変異)であり、また、1 例は *JAK2* を含む 9p ゲインを認めた。タンパク質チロシンフォスファターゼ(PTP)の *PTPRK*、*PTPN4*、*PTPN23* の変異も認められた(図)。以上は ANKL における JAK-STAT 系の異常を示唆する。

さらに、RAS-MAPK 経路関連の変異が 3 例にあり、RAS 活性化型変異や *BRAF* 変異であった。エピゲノム制御関連やヒストン修飾遺伝子の変異も 7 例に認められ、*BCOR*、*KMT2D*(*MLL2*)、*SETD2*、*TET2* を含んでいた。RNA ヘリカーゼである *DDX3X* 変異は 4 例に陽性で 2 例で C 末ヘリカーゼドメインの点変異、1 例フレームシフト変異、1 例でインフレーム欠失であった。以上の遺伝子のうち、*DDX3X*、*STAT3*、*PTPRK*、*BCOR*、*KMT2D* は NK/T 細胞リンパ腫で比較的高頻度に認められる変異として、*SETD2* は腸管型 T 細胞リンパ腫の変異として

これまで報告されている。そのほか NK/T 細胞リンパ腫関連の遺伝子として *FAS* のノンセンス変異、*INPP5D* 変異も認められた。これらの変異遺伝子のうち、*DDX3X*、*STAT3*、*BCOR* 変異は再現性がある機能に影響する変異であり、それぞれ NK 細胞に豊富に発現しているため ANKL の病態に関連している可能性が高いと考えられた。

(3) EB ウイルス遺伝子との関連

EB ウイルスゲノムにマップされる配列は全例に陽性であった。しかしながら、EB ウイルスゲノムと変異シグニチャーとの相関は明らかでなかった。

(4) NK 細胞腫瘍における遺伝子変異との関係

以上の結果は、ANKL における JAK-STAT 系の変化を示しており、NK/T 細胞リンパ腫と類似性を認めるものの、相違点もある。そのため、既報告の NK/T 細胞リンパ腫、鼻型の網羅的遺伝子解析の結果(Jiang ら、Nature Genet, 2015)を再解析して比較検討した。25 例で *STAT3* 変異 5 例、*STAT3* を含む 17q21.2 コピー数ゲイン 3 例、*JAK2* 変異または増幅 3 例、新規の *PTPRK* 欠失 6 例が同定された。これらの変異はいずれも JAK-STAT 系の異常を来す可能性があり、ANKL と NK/T 細胞リンパ腫に共通して JAK-STAT 系異常が病因および病態に深く関与することが示唆された。

(5) NK 細胞腫瘍細胞株と薬剤感受性

JAK-STAT 系を含む分子異常が成熟 NK 細胞腫瘍に関係することを確認するため、NK 細胞腫瘍細胞株を用いて検討した。ANKL 由来細胞株と NK 細胞リンパ腫および関連疾患細胞株 9 株で JAK 阻害薬を含む分子標的薬との反応を調べた。NK 細胞腫瘍株は JAK 阻害薬の ruxolitinib 添加により有意に増殖が抑制された。また、この抑制は ruxolitinib に BCL2 阻害薬 venetoclax または AURK 阻害薬 alisertib を併用することで増強した。JAK 阻害薬に対する反応は正常 NK 細胞でも認められた。

以上、ANKL の網羅的遺伝子解析により JAK-STAT 系シグナル伝達系分子を含む複数の経路に関わる遺伝子異常を同定した。ANKL の遺伝子変異像は NK/T 細胞リンパ腫の変異像と共通する部分もあるものの、ANKL ではシグニチャーが異なり、*TP53* 変異が少ない一方 RAS-MAPK 系遺伝子変異が多いといった異なる点も認められ、NK 細胞腫瘍の不均一性を示唆すると考えられた。NK/T 細胞リンパ腫と ANKL の違い、特に ANKL は NK/T 細胞リンパ腫の白血病型ではないか、との疑問に関しては

検討症例数の問題もあり、いまだ明確な答えは得られておらず、今後の課題である。

ANKL と NK/T 細胞リンパ腫に共通して JAK-STAT 系の異常は認められ、分子標的薬としての JAK 阻害薬が成熟 NK 細胞腫瘍株に有意に抑制的に働くことが確認された。JAK 阻害薬を主体とした分子標的薬が ANKL を含む NK 細胞腫瘍に対する新規治療法の候補となりうることを明らかにできた。

また、ANKL の対照群として T 細胞 LGL 白血病症例の解析を行った。その中で、6 例で JAK-STAT 系シグナル伝達分子のひとつである STAT5B に変異を認めた。変異部位は SH-2 ドメインと transactivation ドメインにありホットスポット部位の N642H を含め、いずれも活性化型変異であった。6 例全例で CD4+CD56+T 細胞受容体 (TCR) 型 T 細胞の免疫形質を示し、血球減少の合併はなく、緩徐な経過を示した。STAT5B 変異陽性の T 細胞 LGL 白血病は特徴的で新たな一亜群として分類可能と考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

1. Dufva O, Kankainen M, Kelkka T, Sekiguchi N, Awad S, Eldfors S, Yadav B, Kuusanmäki H, Malani D, Andersson E, Pietarinen P, Saikko L, Kovanen P, Ojala T, Lee D, Loughran TJr., Nakazawa H, Suzumiya J, Suzuki R, Ko YH, Kim W, Chuang SS, Aittokallio T, Chan WC, Ohshima K, Ishida F, Mustjoki S. Mutational landscape of aggressive natural killer-cell leukemia and drug profiling highlight JAK-STAT signaling as a therapeutic target in natural killer-cell malignancies. *Nature Commun* 9,1567, 2018, 査読有 DOI: 10.1038/s41467-018-03987-2
2. Andersson E, Tanahashi T, Sekiguchi N, Gasparini VR, Bortoluzzi S, Kawakami T, Matsuda K, Mitsui T, Eldfors S, Bortoluzzi S, Coppe A, Binatti A, Lagström S, Ellonen P, Fukushima N, Nishina S, Senoo N, Sakai H, Nakazawa H, Kwong YL, Loughran TP, Maciejewski JP, Mustjoki S, Ishida F. High incidence of activating *STAT5B* mutations in CD4-positive T-cell large granular lymphocyte leukemia. *BLOOD* 128 2465-2468, 2016, 査読有 DOI: 10.1182/blood-2016-06-724856

[学会発表](計 3 件)

1. Kawakami T, Otsuka T, Sekiguchi N, Nishina S, Senoo N, Senoo Y, Sakai H, Nakazawa H, Kwong Y-L, Ishida F. Treatment options for LGL leukemia

based on STAT3 mutational analysis. 第 79 回日本血液学会. 2017

2. Dufva O, Kankainen M, Kelkka T, Awad SA, Sekiguchi N, Yadav B, Eldfors S, Kuusanmäki H, Andersson E, Malani D, Pietarinen P, Saikko L, Kovanen P, Suzumiya J, Suzuki R, Ko YH, Kin WS, Chuang SS, Loughran Jr TP, Chan WC, Ohshima K, Aittokallio T, Ishida F, Mustjoki S. Mutational landscapes of aggressive natural killer cell leukemia and drug sensitivity profiling reveal therapeutic options in natural killer cell malignancies. 第 58 回米国血液学会 2016

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 文宏 (ISHIDA, Fumihiro)
信州大学・学術研究院保健学系・教授
研究者番号: 80311695

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

関口 和 (SEKIGUCHI, Nodoka)
信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・講師
研究者番号: 80720953

(4) 研究協力者

大島 孝一 (OHSHIMA, Koichi)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号: 50203766

鈴宮 淳司 (SUZUMIYA, Junji)
島根大学・医学部・教授
研究者番号: 70206556

サトゥ ムストキ (MUSTJOKI, Satu)
ヘルシンキ大学・血液学研究ユニット・教授
研究者番号: なし

ウォン ソウ キム (KIM, Wong Seog)
ソングョンガン大学・医学部・教授
研究者番号: なし