

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06753

研究課題名(和文)急性骨髄性白血病の治療抵抗性に寄与する遺伝子変異の同定

研究課題名(英文) Identification of somatic mutation contributing to chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia

研究代表者

本田 晃 (Honda, Akira)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40779394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：この研究は、急性骨髄性白血病(AML)の治療抵抗性に寄与する遺伝子変異を同定し、治療抵抗性AMLに対する新規治療薬を開発することを目標としている。我々は治療抵抗性に寄与する遺伝子としてgeneXに注目した。CRISPR/Cas9によりgeneXをノックアウトしたヒト白血病細胞株はin vitroにおいて抗癌剤感受性が低下することを見出した。また、この細胞株を用いた異種移植モデルにおいてもgeneXのノックアウトにより抗癌剤感受性が低下することを見出した。geneXはAMLの治療抵抗性に寄与する可能性が高く、geneXのノックアウトから治療抵抗性に至る機序の解明を進めている。

研究成果の概要(英文)：We aimed to reveal somatic mutations contributing to chemoresistance in primary refractory acute myeloid leukemia(AML) and to develop novel therapeutic drugs for primary refractory AML. We focused on geneX as a gene contributing to chemoresistance. Firstly, using CRISPR/Cas9 system, we generated geneX knockout human leukemic cell line. Importantly, this cell line showed chemoresistance in vitro. In addition, using xenograft mouse model, we showed that geneX knockout resulted in chemoresistance in vivo. GeneX may be highly likely to contribute to chemoresistance in AML, and we are now working on elucidating mechanisms of chemoresistance.

研究分野：造血器悪性腫瘍

キーワード：急性骨髄性白血病 治療抵抗性 遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia: AML) は造血器悪性腫瘍の一種で、未熟な造血前駆細胞が腫瘍化することにより発症すると考えられている。従来、治癒を目的とした AML に対する治療には多剤併用化学療法が行われている。現在主流となっているのはイダルビシン (idarubicin: IDR) もしくはダウノルビシン (daunorubicin: DNR) にシタラピン (cytarabine: AraC) を加えた 2 剤併用化学療法 (IDR/DNR+AraC) であり、世界的にも標準治療となっている (N Engl J Med 1999; 341: 1051-1062)。本邦からの報告でも IDR+AraC による初回寛解導入療法により 78.2% の症例は完全寛解 (complete remission: CR) に至り、5 年生存率は 48% と比較的良好な治療成績が報告されている (Blood 2011; 117: 2358-2365)。一方、寛解導入療法により CR に至ったもののその後再発した症例や寛解導入療法により CR に至らなかった症例については、その後の多剤併用化学療法に対しても治療抵抗性であることが多い。このような難治性 AML に対しては造血幹細胞移植を含めた強力な救援療法が試みられているが、今のところ十分な治療効果は得られておらず、AML の診療を進める上で未だ大きな問題となっている。

2. 研究の目的

近年、次世代シーケンサーを用いた解析により造血器腫瘍を含む多くの悪性腫瘍において遺伝子変異、遺伝子発現の異常、メチル化の異常など多くの知見が相次いで報告されてきている。AML においては 2008 年にヒトの腫瘍に対する初めての全ゲノムシーケンスが AML のサンプルを用いて行われて以来 (Nature 2008; 456: 66-72)、新たな原因遺伝子の候補が数多く報告されている。2013 年には米国の National Cancer Institute 主導の大規模がんゲノム解析プロジェクトにより 200 例の AML に対する網羅的な遺伝子解析が行われ (N Engl J Med 2013; 368: 2059-2074)、AML における遺伝子異常はほぼ明らかとなったといっても過言ではない。これらの次世代シーケンサーにより得られた大量のデータと、これまでに知られている既知の染色体異常や遺伝子異常を統合することによりこれまで以上にさらに詳細な予後因子の抽出、頻度の高い遺伝子異常に対する特異的な新規治療薬の開発など AML の診断・治療の進展に大きく寄与することが期待されている。しかしながら、現状においては未だ臨床的なブレイクスルーには至っていない。その原因の一つとして、これまでの網羅的な遺伝子解析が明らかにしたように AML 自体が分子学的にも極めて多様性に富んだ疾患であるため、こうした網羅的解析から得られる大量の情報と各症例の詳細な臨床情報を結び付け、そこから意義を見出すことが困難になっている点が挙げられる。今後、次世代シーケンサ

ーによるゲノム解析で得られた大量のデータを実際に臨床に直結させていくためには、臨床的な観点から対象症例を絞り込んでいくことが重要な手法となりうると考えられた。

以上を踏まえ、申請者は AML の中でも臨床的に最も予後が悪いとされる治療抵抗性 AML に注目し、AML の治療抵抗性に寄与する遺伝子変異を同定することを目標とし研究を進めてきた。申請者はこれまでに、治療抵抗性 AML 6 症例に対して全エクソンシーケンスを行い、全体で計 50 個の遺伝子変異を同定した。これら 50 個の遺伝子変異の中に治療抵抗性に寄与する遺伝子変異が存在すると想定し、変異が検出された 50 遺伝子の全 coding sequence (CDS) 領域を対象としたターゲットリシーケンスを、治療抵抗性 AML の治療不応期の 18 サンプルを用いて解析を行った。興味深いことに 18 例中 4 例において geneX のナンセンス変異もしくはフレームシフト変異など、不完全な geneX タンパクが生成される truncate 型の変異が検出された。AML における geneX 変異は既に報告がなされているが、変異の出現パターンはこれまでの報告と矛盾しないものであった。そこで geneX 変異が AML の治療抵抗性に寄与しているとの仮定のもとに、初発時 AML 50 サンプルを用いて、geneX の全 CDS 領域を対象としたターゲットリシーケンスを行った。

治療抵抗性 AML では 15 例中 3 例 (20%)、寛解導入療法により CR に至った AML では 35 例中 1 例 (3%) において geneX の truncate 型変異が検出された。これらの結果より、geneX の truncate 型変異が AML の治療抵抗性に寄与している可能性が示された。続いて申請者は、これらの変異がヒト白血病細胞に与える影響を調べるために、CRISPR/Cas9 システムを用いて geneX ノックアウトヒト白血病細胞株を作成した。まず、geneX ノックアウトによりヒト白血病細胞株の増殖は有意に抑制されることが示された。さらに、この geneX ノックアウト白血病細胞株に IDR もしくは AraC を投与したところ、geneX ノックアウト細胞株においては抗がん剤投与後の生存率が有意に上昇しアポトーシスが抑制されていることが示された。この結果は、geneX の truncate 型変異が AML の治療抵抗性に寄与しているという仮説を支持するものであった。これらの結果をもとに、申請者は geneX の truncate 型変異がどのような機序で AML の耐性化に寄与しているかを解明することで治療抵抗性 AML に対する新規治療薬の開発につながるかと考えた。

3. 研究の方法

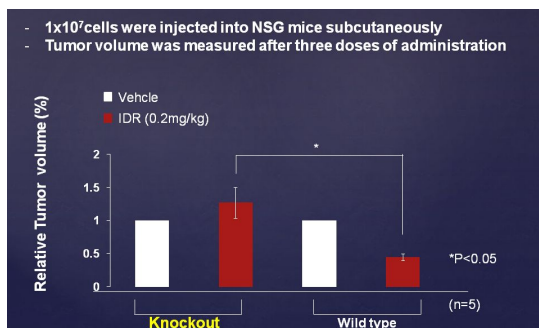
申請者のこれまでの研究成果を踏まえ、まずはさらに多数の AML 患者検体を用いて当施設における geneX 変異の出現頻度を明らかとする。さらに geneX 変異の有無と治療反応性、予後との関連を統計学的に明らかにする。ま

た複数のヒト白血病細胞株より geneX ノックアウト細胞株を作成することにより、白血病細胞における geneX ノックアウトと治療抵抗性との関連を特に細胞周期、DNA 損傷応答の観点からも明らかにする。また NSG マウスを用いた異種移植モデルにより、in vivo における geneX ノックアウトと抗がん剤感受性との関連について検証を行う。さらに網羅的遺伝子発現解析により、geneX 変異に特異的な病態パスウェイを同定し、その結果を足掛かりとして大規模薬剤スクリーニングを行い治療抵抗性 AML に対する新規治療薬の候補となりうる低分子化合物を同定する。最終的に得られた化合物については当施設で保有する AML 患者検体を用いて治療効果の検証を行う。

4. 研究成果

(1) CRISPR/Cas9 システムシステムにより geneX をノックアウトしたヒト白血病細胞株 (Kasumi-1, ME-1, Jurkat) を作成し細胞増殖率、細胞周期解析、抗がん剤感受性試験を行った。細胞周期解析には DAPI を用いた FACS での解析、抗がん剤感受性試験には ATP 試薬とプレートリーダーによるアッセイを行った。これらの実験系においては、geneX ノックアウト細胞株と geneX 野生型細胞株の間には明らかな違いは見られなかった。他のヒト白血病細胞株 (OCIAML3, MOLM-13, K562) を用いて、geneX ノックアウト細胞株の樹立を進めている。

(2) すでに作製している geneX ノックアウト細胞株 (THP-1) を NSG マウスに皮下注射した異種移植モデルを用いて、in vivo における抗がん剤感受性の評価を行った。マウスの腹腔内へ抗がん剤 (イダルビシン、シタラピン) を投与した後に皮下腫瘍径を測定した。geneX ノックアウト細胞株を移植したマウスでは、抗がん剤投与後の皮下腫瘍体積は geneX 野生型のものと比較し有意に増大していることを明らかとした。geneX ノックアウト白血病細胞株は in vivo においても、抗がん剤感受性の低下を認めることが明らかとなった。



(3) 野生型 geneX 遺伝子を強制発現するためのレトロウイルスベクターを作成し、geneX ノックアウト株で認められた表現型 (抗がん剤感受性の低下) の回復がみられるか検証

を進めている。野生型 geneX 遺伝子を強制発現するためのレトロウイルスベクターはすでに完成したため、細胞株に導入し発現確認を行っている。

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0件)

[学会発表](計3件)

Akira Honda, Junji Koya, Akihide Yoshimi, Keisuke Kataoka, Shunya Arai, and Mineo Kurokawa

Identification of somatic mutation contributing to chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia

The 58th Annual Meeting and Exposition The American Society of Hematology

2016年

Akira Honda, Junji Koya, Akihide Yoshimi, Keisuke Kataoka, Shunya Arai, and Mineo Kurokawa

Identification of somatic mutation contributing to chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia

The 78th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology

2016年

Akira Honda, Junji Koya, Akihide Yoshimi, Keisuke Kataoka, Shunya Arai, and Mineo Kurokawa

Identification of somatic mutation contributing to chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia

The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association

2016年

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本田 晃 (HONDA, Akira)
東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40779394

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()