

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16083

研究課題名(和文)新規急性リンパ性白血病におけるステロイド抵抗性機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism for corticosteroid resistance in acute lymphoblastic leukemia carrying MEF2D fusion gene

研究代表者

奥野 友介 (Okuno, Yusuke)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：00725533

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)：急性リンパ性白血病(ALL)の新規原因遺伝子として同定されたMEF2D融合遺伝子を有するALL(MEF2D-ALL)は、治療の鍵となるステロイド薬に抵抗性を示す。抵抗性の機序を遺伝子発現分析から検討した結果、MEF2D-ALLではステロイドによる細胞内シグナルが十分に活性化せず、細胞死に至らないことが明らかになった。シグナルが十分に活性化しない原因として、ステロイド受容体(NR3C1)遺伝子の欠失や、IKZF1遺伝子の欠失が判明した。欠失を有さない例でもNR3C1遺伝子の発現が低下しており、MEF2D-ALLのステロイド抵抗性は、NR3C1遺伝子の発現低下を経由して生じることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MEF2D融合遺伝子を持つALL(MEF2D-ALL)は、2016年に私たちの研究グループを含めた複数のグループが発見した新たなALLである。ALL全体の長期生存率は90%に達しているが、アジアにおけるMEF2D-ALLの治療成績は25%未満であり、非常に予後が悪い一群である。私たちの研究グループは、MEF2D-ALLの予後が悪い原因の1つとして、ALL治療の鍵となる抗がん剤であるステロイド薬が全く作用しないこと(ステロイド抵抗性)を明らかにした。このALLにおけるステロイド抵抗性の機序は今回の研究によりかなり明らかになったが、ステロイド抵抗性を解除し、治療に導く方法の開発が必要である。

研究成果の概要(英文)：Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common neoplasm in children. The MEF2D fusion genes have been identified as a causative chromosomal aberration in ALL. Patients with ALL carrying the MEF2D fusion genes (MEF2D-ALL) have shown resistance to corticosteroid chemotherapy. We performed a global expression analysis of MEF2D-ALL blasts in the presence of corticosteroids and found that intracellular steroid signaling was insufficient to induce cell death. In a fraction of patients with MEF2D-ALL, this insufficiency was caused by a deletion of the NR3C1 steroid receptor gene and/or a deletion of the IKZF1 gene, which are known causes of corticosteroid resistance. In the remaining patients, NR3C1 expression was also significantly decreased. In conclusion, patients carrying MEF2D-ALL have corticosteroid resistance, which was caused by way of a decreased NR3C1 expression.

研究分野：血液内科学

キーワード：急性リンパ性白血病 小児がん MEF2D融合遺伝子 ステロイド抵抗性 次世代シーケンス

1. 研究開始当初の背景

急性リンパ性白血病(ALL)は、最も頻度の高い小児がんである。本邦において年間 500~600 人が発症し、小児がん死における最大の原因となっている。臨床的指標、あるいは遺伝子変異に基づいてリスク分類が行われ、それに基づく層別化治療が予後を改善してきた。全体としての長期生存率は 85~90%と比較的良好であるが、一部の高リスク ALL の予後は依然として不良である。

ALL の腫瘍としての特徴に、非常に多様な遺伝子変異を原因として発症することが挙げられる。約 85%の症例では原因遺伝子変異が決定できるが、残りの症例では依然として原因遺伝子変異が特定できない (B-other ALL)。研究代表者らは再発 ALL の網羅的遺伝子解析を行い、予後不良を規定する新規原因遺伝子変異として、MEF2D 融合遺伝子を発見した (Okuno Y, Journal of Clinical Oncology 2016)。この融合遺伝子を有する症例は 10 歳以上の青年期発症 (ALL 発症のピークは 2 歳) B-cell precursor の免疫表現型、超早期再発 (治療中再発) などの特徴を有し、全例が死亡していた (図 1)。

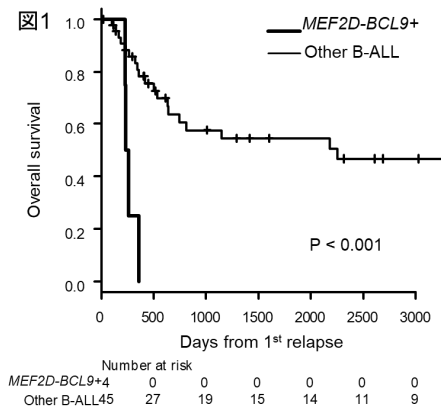


図 1 : MEF2D-BCL9 陽性 ALL 患者の予後
小児再発 ALL 患者 52 例における、再発時点からの生存曲線を示す。MEF2D-BCL9 融合遺伝子を有さない ALL 症例の長期生存率が 50%前後期待されることは対照的に、MEF2D-BCL9 融合遺伝子を有する ALL 症例は、1 年前後で全例が死亡していた。

また、他のグループから、MEF2D 融合遺伝子が ALL を引き起こす分子病態として、B 細胞分化の停止が引き起こされること、細胞増殖が亢進することが示された (Liu YF, et al. EBioMedicine 2016;8:173)。MEF2D 融合遺伝子を有する ALL (MEF2D-ALL) のアジアにおける生存率は 25%未満であり、高リスクの ALL であると考えられた。

研究代表者らの解析によって、MEF2D 融合遺伝子を有する細胞は、ALL 治療のキードラッグであるステロイド薬に完全な抵抗性を示すことが判明した (図 2)。対照的に、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害薬、プロテアソーム阻害薬等の分子標的薬に対しては、他の ALL と同等の感受性を有していた。試験管内の解析ではあるが、ステロイド抵抗性は、MEF2D-ALL が予後不良であることの少なくとも一部を説明すると考えられた。

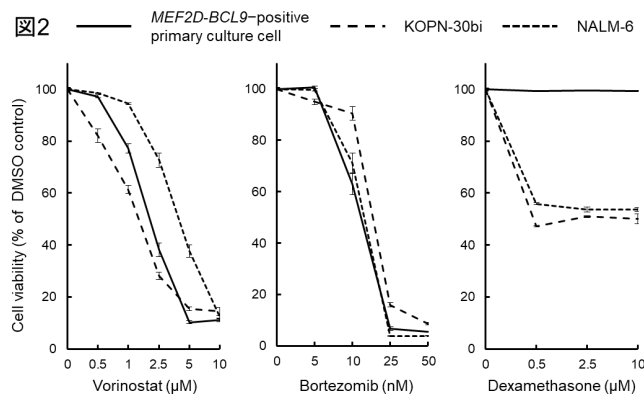


図 2 : MEF2D-BCL9 陽性 ALL 細胞の in vitro における薬剤感受性
MEF2D-BCL9 症例から樹立した細胞株 (実線) と他の ALL 細胞株 (点線) の薬剤感受性を検討した。MEF2D-BCL9 陽性細胞株はポリノスタット、ボルテゾミブには感受性を示すが、デキサメタゾンには感受性を示さなかった。

2. 研究の目的

ここまでの研究に基づいて、MEF2D-ALL の治療法を確立するための戦略として、(i) HDAC 阻害薬とプロテアソーム阻害薬を用いた多剤併用化学療法を治療に組み入れた臨床試験を行うこと、あるいは、(ii) MEF2D 融合遺伝子によるステロイド抵抗性惹起の機構を明らかにすること、を考えた。しかしながら、(i) については、同様の治療が、MLL 融合遺伝子を有する ALL で既に臨床試験が進行中であり、一部の症例でのみ有効であることが示唆されていることから、MEF2D-ALL においても、この治療だけで十分な効果が得られる可能性は高くないと考えた。

一方で、ステロイド抵抗性は、*MEF2D* 融合遺伝子を有さない症例においても観察される。その頻度は B 細胞性 ALL の 10%未満と低いが、予後不良と強く相関している (Haematologica 2012;97(7):1048-56)。これまでに明らかにされているステロイド抵抗性の機序として、*CREBBP* 遺伝子変異 (Nature 2011;417(7337):235-9)、RAS/MAPK 経路の活性化 (Haematologica 2015;100(4):e132-6)、*CASP1/NLRP3* の活性化 (Nat Genet 2015;47(6):607-14) 等が挙がるが、全ての症例において機序が明らかになっているわけではない。検査した *MEF2D*-ALL の全例においてステロイド抵抗性が確認されるが、この機序を明らかにすることで、*MEF2D*-ALL に対して、あるいは全てのステロイド抵抗性を示す ALL への新規治療戦略を構築することが可能であると考えた。

3. 研究の方法

(1) 全エクソーム解析

MEF2D-ALL 患者の診断時の骨髄検体 (過半が腫瘍細胞) と、寛解期の末梢血検体 (ほぼ正常細胞のみ) から DNA を抽出し、SureSelect システム (Agilent 社) を用いてエクソーム濃縮を行った。HiSeq2500 システム (Illumina 社) によりシーケンスを行い、in-house のパイプライン (Burrows-Wheeler Aligner によるアラインメント、VarScan2 によるバリエーションコール、ANNOVAR によるアノテーション) を用いてデータ解析を行った。加えて、各エクソンのリード数をコピー数変化がない多数のリファレンスサンプルと比較する in-house のプログラムを用いて、エクソンごとのコピー数を推定した。

(2) *MEF2D*-ALL 細胞株の樹立

MEF2D-ALL 患者の診断時の骨髄検体を 20% FBS 添加 RPMI1640 完全培地にて 60 日間培養し、自律的に増殖する初代培養を得た。これをさらに 60 日間培養し、フローサイトメトリーによる表面抗原解析と遺伝子発現分析において変化がみられない細胞株を樹立した。

(3) 薬剤感受性試験

MEF2D-ALL 細胞株に各濃度 (1 μ M、10 μ M) のデキサメタゾン、あるいは同量のデキサメタゾンの溶媒 (ジメチルスルホキシド) を投与した。48 時間後に、フローサイトメトリーによって細胞数 (CountBright、ベックマンコールター社) と生存率 (7-AAD、BD 社) を測定した。同時点で RNA を抽出し、RNA シークエンス解析に用いた。

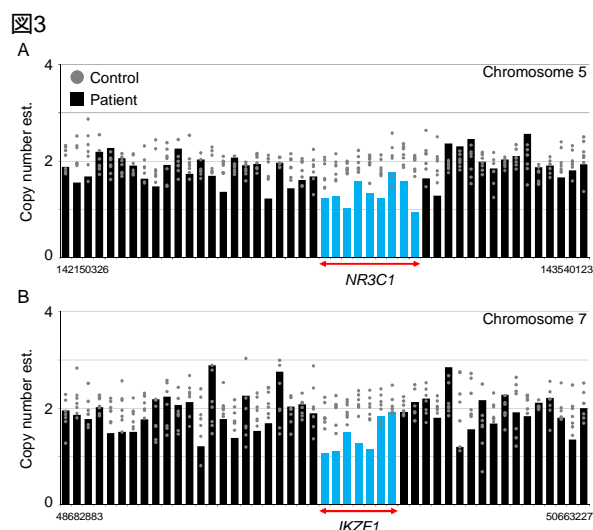
(4) RNA シークエンス解析

臨床検体、あるいは細胞株から抽出したトータル RNA から、mRNA シークエンスライブラリーを調製した (NEBNext Ultra RNA Prep Kit for Illumina、NEB 社)。シーケンスデータを in-house のパイプライン (Tophat によるアラインメント、HTSeq によるリード数測定) で解析し、発現量データを算出した。サンプル間での発現量比較は、DESeq を用いて行った。

4. 研究成果

(1) *MEF2D*-ALL のステロイド抵抗性に関する体細胞変異の解析

MEF2D-ALL 患者の腫瘍細胞・正常細胞をペアにして全エクソーム解析を行い、体細胞変異を検出した。点変異検出に加え、コピー数解析も行った。4 例中 1 例について、グルココルチコイド (ステロイド) 受容体遺伝子 (*NR3C1*) の片アレルの欠失を検出した (図 3A)。*NR3C1* 遺伝子の欠失は、他の ALL において、ステロイド抵抗性の機序の 1 つとして報告されている。



加えて、1 例において、*IKZF1* 遺伝子の片アレルの欠失を検出した (図 3B)。*IKZF1* 遺伝子は Ikaros をコードし、これもまた既知のステロイド抵抗性を生じる機序の 1 つである。

図 3 : 患者腫瘍検体より検出された *NR3C1* 遺伝子欠失と *IKZF1* 欠失

灰色の点は対照検体における推定コピー数を、棒グラフは患者検体における推定コピー数を示す。(A) *NR3C1* 遺伝子の欠失。9 エクソン全てにおいて、片アレルが欠失していると推定された。(B) *IKZF1* 遺伝子の欠失。7 エクソン中 5 エクソンにおいて、片アレルが欠失していると推定された。

これらの体細胞変異はステロイド抵抗性を説明しうるが、一方で、*MEF2D* 融合遺伝子を遺伝子導入することで、ALL 細胞株にステロイド抵抗性を惹起できるという実験結果が得られている (図 4)。MEF2D-ALL におけるステロイド抵抗性は、複数の機序によって複合的に惹起されている可能性が考えられた。

図4

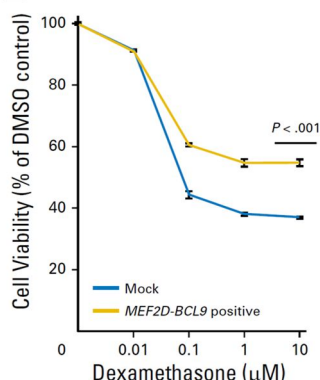


図4：MEF2D融合遺伝子によるステロイド抵抗性の獲得

MEF2D 融合遺伝子を有さない ALL 細胞株 (NALM-6 細胞、Mock) に MEF2D-BCL9 融合遺伝子を遺伝子導入 (MEF2D-BCL9 positive) し、デキサメタゾンに対する感受性を検討した。0.1 μM 以上の濃度において、MEF2D-BCL9 融合遺伝子を導入した細胞株においてステロイド抵抗性が観察された (Suzuki et al. J Clin Oncol 2016)。

(2) MEF2D-ALL 細胞株の遺伝子発現分析によるステロイドシグナルの検討

MEF2D-ALL 患者より樹立した細胞株 (*NR3C1* 遺伝子も *IKZF1* 遺伝子も欠失していない) ならびに *MEF2D* 融合遺伝子を有する Kasumi-9 ALL 細胞株について、ほとんどのステロイド感受性 ALL 細胞株が細胞死をきたす濃度のデキサメタゾン存在下で、増殖と遺伝子発現プロファイルを検討した (図 5)。48 時間後に、増殖と遺伝子発現プロファイルを測定した。結果として、増殖はデキサメタゾン濃度に全く依存しなかったうえ、遺伝子発現プロファイルについても、有意水準 (多重検定補正後の p 値 < 0.1) の変化を示した遺伝子数が、約 2 万遺伝子中 33 ~ 117 遺伝子のみであり、強いシグナルは伝達されていないことが示唆された。実際に、ステロイドシグナルのよい指標として用いられる *TSC22D3* 遺伝子の発現増加もデキサメタゾン濃度にほぼ依存せず 3.53 ~ 4.5 倍であり (十分なシグナル伝達時には 20 倍以上の発現上昇がみられる)、*NR3C1* 遺伝子が発現を調節する標的遺伝子について、有意な集積を認めなかった。また、細胞死に関与する遺伝子についても、有意に発現量が変化したものは認められなかった。

図5

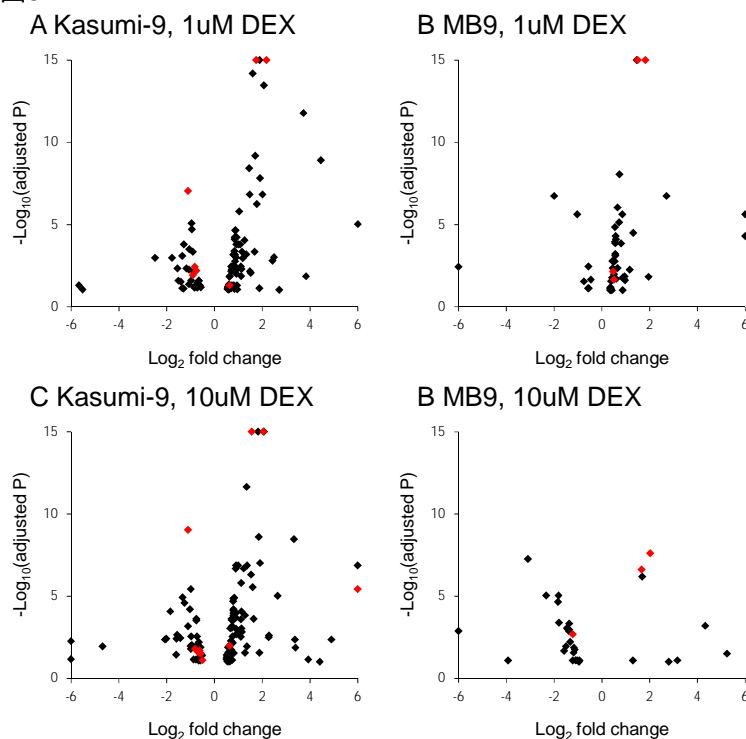


図5：デキサメタゾン存在下における MEF2D-ALL 細胞株の遺伝子発現分析 各実験における volcano plot を示す。各点は各遺伝子を示し、赤色は NR3C1 によって発現が調節されることが知られている遺伝子を示す。横軸が対数変換した遺伝子の発現量変化 (右に行くほどデキサメタゾン存在下で発現が上昇している)、縦軸が多重検定補正後の p 値 (上にいくほど有意) を示す。遺伝子は、補正後 p 値 < 0.1 のもののみを表示している。

この結果からは、MEF2D-ALL 細胞株におけるステロイド抵抗性は、ステロイドによるシグナルは十分に伝達されないことから起こることが考えられた。また、この十分でないシグナルは、MEF2D-ALL 細胞株に細胞死を惹起するには不十分である可能性が考えられた。

(3) MEF2D-ALL の臨床検体を用いた遺伝子発現分析

MEF2D-ALL を含む、65 検体の ALL の臨床検体を用いた遺伝子発現分析を行った。MEF2D-ALL で高発現であることが知られている *PTPRZ1* 遺伝子、*DPYSL4* 遺伝子、*HDAC9* 遺伝子等を確認できた。加えて、MEF2D-ALL において、*NR3C1* 遺伝子の発現が、他の ALL と比べて 0.49 倍に低下していることが明らかになった ($p=0.028$)。 *NR3C1* 遺伝子の片アレルの欠失、あるいは発現量の半減が、ステロイド抵抗性を惹起することが報告されており、MEF2D-ALL のステロイド抵抗性は、*NR3C1* 遺伝子の発現低下を經由して起こることが示唆された。この結果は、(2)の細胞株におけるステロイドシグナルの減弱と矛盾しない結果であると考えられた。

結語

MEF2D-ALL は 2016 年に私たちの研究グループを含めた複数のグループが発見した新たな ALL であるが、アジアにおける MEF2D-ALL の治療成績は 25%未満であり、非常に予後が悪い一群である。今回の研究によって、MEF2D-ALL の予後が悪い原因の 1 つとして考えられる、ステロイド抵抗性が生じる機序をある程度まで明らかにすることができた。薬剤の併用、あるいは全遺伝子スクリーニングなどの検討を進めて、このステロイド抵抗性を解除し、治癒に導く方法の開発する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----