

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17414

研究課題名(和文) 小児急性骨髄性白血病における全ゲノムDNAメチル化解析による新規予後因子の同定

研究課題名(英文) Identification of novel prognostic factors genome-wide DNA methylation analysis in pediatric acute myeloid leukemia.

研究代表者

大和 玄季 (Yamato, Genki)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90825720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：小児急性骨髄性白血病(AML)は分子生物学的異常と治療反応性をもとにして層別化治療が行われ長期生存率は60-70%まで上昇してきたが、その予後は未だ良好とは言えない。近年、AMLに対してもDNAメチル化が新たなバイオマーカーとして注目され始めている。我々は小児AMLにおけるDNAメチル化パターンと臨床像、分子生物学的背景、予後との関係を明らかにするために、AML-05臨床試験に登録された64例に対してDNAメチル化解析を施行した。

その結果DNAメチル化パターンと分子生物学的背景の強い相関関係を証明し、また、高メチル化パターンで特徴づけられた一群が特に予後不良であることを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在がん領域においては次世代シーケンサーを使用した網羅的な解析が主流となってきたが、小児急性骨髄性白血病(AML)の40%近くはまだ予後を層別するバイオマーカーが見つからない状態であり、治療決定の根拠として新たなバイオマーカーの同定は必要不可欠となってきている。本研究ではDNAメチル化パターンがAMLの分子生物学的特徴と相関し、更には予後と密接に関連することを報告した。この成果は今後小児AMLにおいて治療層別化のための重要なバイオマーカーとなる可能性を示しており、より適切なりスク層別を行うことで小児AMLの予後を改善する可能性を示した重要な結果である。

研究成果の概要(英文)：Although the long-term survival rate of pediatric acute myeloid leukemia (AML) has increased to 60-70% with stratified therapy based on molecular abnormalities and response to therapy, the prognosis is still not good. Recently, DNA methylation has begun to attract attention as a new biomarker for AML. To clarify the relationship between DNA methylation patterns and clinical presentation, molecular biological background, and prognosis in pediatric AML, we performed DNA methylation analysis on 64 patients enrolled in the AML-05 clinical trial.

We found a strong correlation between DNA methylation patterns and molecular background, and identified a group of patients characterized by high DNA methylation patterns as having a particularly poor prognosis.

研究分野：小児血液学

キーワード：DNAメチル化 小児急性骨髄性白血病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小児急性骨髄性白血病(AML)は分子生物学的異常と治療反応性をもとして3つのグループにリスク層別が行われ、それぞれのリスク分類に応じて治療が決定される。これらのプロトコール治療により、長期生存率は60-70%まで上昇してきたが、小児急性リンパ性白血病が長期生存率90%であることと比較するとその予後は未だ良好とは言えず、更なる予後の改善が期待されている。近年がん領域においては次世代シーケンサーを使用した、網羅的遺伝子変異解析、トランスクリプトーム解析、全エクソン解析、全ゲノム解析などが行われている。また、クリニカルシーケンスが実臨床に用いられ始め、シーケンスで得られた網羅的な患者ゲノム情報を基にして、治療方針や治療薬の選択が行うプレジジョンメディスンが普及し始めてきた。しかしながら、AMLは他の固形腫瘍と比較して遺伝子変異の割合が非常に低く、その傾向は小児AMLで特に顕著である。小児AML全体の40%近くはまだ予後を層別するバイオマーカーが見つからない状態であり、今後治療決定の根拠として新たなバイオマーカーの同定は必要不可欠となってきている。近年、DNAメチル化パターンがAMLの分子生物学的特徴や予後と相関するという報告が複数の論文から出されている。しかしながら、これまでの論文はプロモーター領域のDNAメチル化についてのみ言及したものがほとんどである上、小児AMLの領域ではそもそもDNAメチル化解析の論文報告自体が少ないのが現状である。

申請者らはこれまでの解析でRNA sequencing, targeted deep sequencing, real-time PCR, 発現アレイなどを用いてRUNX1遺伝子変異やCBFA2T3-GLIS2融合遺伝子、PRDM16(MEL1)遺伝子の高発現が、それぞれ小児AMLで予後不良となることを報告してきた(Yamato, et al. Blood. 131.2266-2270. 2018., Hara, Yamato, et al. Genes Chromosomes Cancer, 56, 394-404. 2017., Shiba, Yamato, et al. Br J Haematol, 172, 581-591. 2016.)。今回これまで行ってきた遺伝子変異解析、融合遺伝子解析、発現解析に加え、全ゲノムDNAメチル化解析を行うことで、小児AMLにおけるDNAメチル化パターンと臨床像、分子生物学的背景、予後との関係を明らかにする。

2. 研究の目的

小児AMLは本邦において年間約150例の発症があり、30-40%が予後良好因子であるRUNX1-RUNX1T1、CBF β -MYH11融合遺伝子を有している。一方で代表的な予後不良因子であるFLT3-ITDは10-15%で認められるが、これらを合わせても全体の50%に過ぎない。残りの半数は主に正常核型、複雑核型、KMT2A遺伝子再構成症例が占めている。KMT2A遺伝子再構成はパートナーとなる遺伝子によって予後が決定されるなどの報告がなされているが、正常核型、複雑核型における予後の報告は少ない。本研究では、全国研究である日本小児白血病リンパ腫研究グループ(JPLSG)のAML-05臨床試験に登録された小児AML患者のうち、保存検体として初発時のゲノムDNA余剰検体が利用可能であった64症例を対象に、Infinium MethylationEPIC BeadChip (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA)を用いた網羅的メチル化解析を行う。64例の内訳は正常核型24例、t(8;21)12例、inv(16)8例、MLL再構成12例、複雑核型8例、また、FLT3-ITD、KIT変異、CEBPAbiallelic変異をそれぞれ16例、6例、8例含めることで、分子生物学的背景とメチレーションパターンの相互関係を比較可能とした。

本邦でこれまでに行われた小児AML臨床研究の中で、AML-05研究は最も大規模な研究であり、十分な臨床検体数を誇り、これまでの遺伝子解析データや臨床情報との照合が可能である。我々は国立成育医療研究センター研究所周産期病態研究部との共同研究により、これまで小児AMLで報告がほとんどない全ゲノムDNAメチル化解析を行うことで、過去に報告されてこなかった小児AML患者のDNAメチル化状態の評価とプロモーター領域以外のメチル化状態の評価を行い、DNAメチル化と臨床像の関係性を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

JPLSGのAML-05臨床試験に登録された小児AML患者のうち、64例を対象として共同研究先である国立成育医療研究センター周産期病態研究部と共同で全ゲノムDNAメチル化解析を行い、得られた解析データと臨床データ、これまで解析してきた分子生物学的異常との関係を検証する。群馬県立小児医療センターには約20種類のAML細胞株が保存されており、これらのメチル化解析も行う。群馬大学医学部小児科学分野ではこれまで薬剤感受性試験が行われており、細胞株に対してメチル化阻害剤の薬剤感受性試験を行い、メチル化パターンとメチル化阻害剤の効果の検討を行う。解析によりメチル化パターンからの予後層別化を検討し、小児AMLの予後向上に寄与することを目指す。具体的な研究手順は以下の通りである。

(1)ゲノム DNA 抽出

ALLPrep DNA/RNA Mini Kit(Qiagen, Hilden, Germany)を用いてゲノム DNA の抽出を行う。各サンプル、ゲノム DNA 250 ng/ul に調節を行う。対象である 64 検体のゲノム DNA は十分量保存されている。

(2)全ゲノム DNA メチル化解析

抽出された DNA を全て用いて、Infinium MethylationEPIC BeadChip の manufacturer 's protocol に従って全ゲノム DNA メチル化解析を行う。メチル化アッセイではバイサルファイト変換したゲノム DNA に対して、マルチプレックスでメチル化シトシンの検出を行う。メチル化検出のために 2 つのビーズを使用しており、U タイプのビーズは非メチル化サイトを、M タイプのビーズはメチル化サイトと対応して、CpG 領域を deep に解析することが可能である。

(3)データ解析

得られたメチル化データを基に、統計解析ソフト “R” を使用した unsupervised clustering を行い、メチル化パターンによる分類が臨床データや分子生物学的背景とどのように相関してくるかを評価する。また、supervised clustering で予後良好群と不良群を分けるメチル化領域を同定し、抽出された CpG サイトのメチル化が増殖能やメチル化阻害剤反応性に影響するか、細胞株を用いて評価を行う。

4 . 研究成果

2020 年度はその解析に着手（症例選定、検体準備、サンプリング、DNA メチル化ラン施行、抽出データクリーニングおよび臨床データとの統合解析）を行った。その結果 64 例の小児 AML は DNA メチル化パターンにより 4 つのクラスターに分類することができ、それぞれのクラスターは RUNX1-RUNX1T1 融合遺伝子や CEBPA 遺伝子変異などといった分子生物学的背景と強い相関を示した。更に 4 群のうち高メチル化で特徴づけられたクラスターは、低メチル化で特徴づけられたクラスターに比較して有意に予後不良であった。また、AML で予後不良の遺伝子異常とされている FLT3-ITD について、DNA メチル化で予後不良の群と予後良好の群の二つのグループに分類することができた。次に申請者らは PRDM16 遺伝子と MECOM 遺伝子の発現と DNA メチル化との関連を検証した。AML においてこれらの遺伝子の高発現は予後不良と報告されている。今回の解析では、いずれの遺伝子についても高発現と低発現を境に DNA メチル化パターンが大きく変化していることが同定された。これらの結果について申請者らは 2021 年の日本血液学会で報告を行った(大和ら、小児急性骨髄性白血病における全ゲノム DNA メチル化解析 -The JCCG-JPLSG AML-05 study-、第 83 回日本血液学会)。

その後転写因子結合部位解析(TF 解析)、ATAC シーケンスなどの解析を施行した。TF 解析では FLT3-ITD を持つ症例とそうでない症例で有意に差のある DNA メチル化サイトにおいて、多くのメチル化サイトで STAT5 転写モチーフが近傍に存在することが示された。また、ATAC シーケンスでは HOXB-AS3 遺伝子のいくつかのオープンクロマチン領域は、FLT3-ITD と PRDM16 遺伝子高発現の患者でのみ同定された。以上の結果について、申請者らは 2022 年に Blood advances 誌にその結果を報告した(Yamato G., Genome-wide DNA methylation analysis in pediatric acute myeloid leukemia. Blood adv.2022;6:3207-3219)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Genki Yamato, Tomoko Kawai, Norio Shiba, Junji Ikeda, Yusuke Hara, Kentaro Ohki, Shin-Ichi Tsujimoto, Taeko K., Kenichi Y., Yuichi S., Satoru M., Nobutaka K., Daisuke T., Akira S., Manabu S., Hirokazu A., Souichi A., Takashi T., Keizo H., Seishi Ogawa, Kenichiro Hata, Yasuhide Hayashi	4. 巻 6
2. 論文標題 Genome-wide DNA methylation analysis in pediatric acute myeloid leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood advances	6. 最初と最後の頁 3207-3219.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2021005381.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamato Genki, Deguchi Takao, Terui Kiminori, Toki Tsutomu, Hasegawa Daisuke, Ueda Takahiro, Yokosuka Tomoko, Tanaka Shiro, Yanagisawa Ryu, Koh Katsuyoshi, Saito Akiko M., Horibe Keizo, Hayashi Yasuhide, Adachi Souichi, Mizutani Shuki, Taga Takashi, Ito Etsuro, Watanabe Kenichiro, Muramatsu Hideki. et al.	4. 巻 35
2. 論文標題 Predictive factors for the development of leukemia in patients with transient abnormal myelopoiesis and Down syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 1480 ~ 1484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-021-01171-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamato Genki, Park Myoung-ja, Sotomatsu Manabu, Kaburagi Taeko, Maruyama Kenichi, Kobayashi Tomio, Nishi Akira, Sameshima Kiyoko, Ohki Kentaro, Hayashi Yasuhide	4. 巻 113
2. 論文標題 Clinical features of 35 Down syndrome patients with transient abnormal myelopoiesis at a single institution	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 662 ~ 667
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-020-03066-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kaburagi Taeko, Yamato Genki, Shiba Norio, Yoshida Kenichi, Hara Yusuke, Tabuchi Ken, Shiraishi Yuichi, Ohki Kentaro, Sotomatsu Manabu, Arakawa Hirokazu, Taki Tomohiko, Kiyokawa Nobutaka, Tomizawa Daisuke, Horibe Keizo, Miyano Satoru, Taga Takashi, Adachi Souichi, Ogawa Seishi, Hayashi Yasuhide. et al.	4. 巻 Online ahead of print
2. 論文標題 Clinical significance of RAS pathway alterations in pediatric acute myeloid leukemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2020.269431	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大和玄季, 河合智子, 柴 徳生, 原勇介, 大木健太郎, 鎗木多映子, 吉田健一, 白石友一, 宮野悟, 清河信敬, 富澤 大輔, 嶋田明, 外松学, 荒川 浩一, 足立壮一, 多賀崇, 堀部敬三, 小川誠司, 秦健一郎, 林泰秀
2. 発表標題 小児急性骨髄性白血病における全ゲノムDNAメチル化解析 -The JCCG-JPLSG AML-05 study-
3. 学会等名 第83回日本血液学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大和玄季
2. 発表標題 急性骨髄性白血病におけるDNAメチル化の意義と層別化への有用性 Significance and usefulness of DNA Methylation Analysis for risk stratification in Acute Myeloid Leukemia
3. 学会等名 第63回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------