

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20913

研究課題名（和文）高齢者白血病に対するBCL2阻害剤、メチル化阻害剤治療の治療予測マーカーの探索

研究課題名（英文）Exploration of Predictive Biomarkers for Combined BCL2 and Methylation Inhibitor Therapies in Elderly Leukemia Patients

研究代表者

山谷 琴子（YAMATANI, KOTOKO）

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：90909805

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：BCL2阻害剤ベネトクラクスとDNAメチル化酵素阻害剤デシタピンの併用療法を受けた患者の白血病細胞をRNAシーケンス解析した結果、治療が効かない患者群では、脂肪酸代謝に關与するPPARGの発現が治療後に有意に亢進していた。次に、PPARGを高発現させた細胞株ではVEN/DECに対する感受性が低下することを確認した。また、細胞エネルギー代謝解析により、PPARG高発現細胞では脂肪酸代謝が活発化していることが明らかになった。これらの結果は、PPARGの高発現が細胞のエネルギー代謝に影響を与え、治療抵抗性に關与していることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、高齢者白血病に対するベネトクラクスとデシタピン併用療法の治療抵抗性の分子機構を解明し、がん治療における新たな知見を提供する。PPARGを含むエネルギー代謝に關与する遺伝子発現パターンを識別マーカーとして利用することで、個別化医療に応用できる可能性を示唆する。さらに、PPARGおよび脂肪酸代謝経路が治療抵抗性に關与することを示し、新たな治療標的を提案する。本研究は、治療効果を最大化し、患者の生存率と生活の質を向上させ、医療コストの削減にも寄与し、がん治療の選択肢を広げる基盤を提供する。

研究成果の概要（英文）：The combination of venetoclax (VEN), an inhibitor of the anti-apoptotic factor BCL2, with the hypomethylating agent, decitabine (DEC) is the current frontline standard of care for elderly patients with acute myeloid leukemia (AML). Despite the success of VEN/DEC in inducing remission in AML, a significant proportion of patients remain refractory to combination therapy. Our RNA sequencing analysis revealed that genes related to fatty acid metabolism were significantly upregulated in leukemia cells obtained from non-responders after treatment with VEN/DEC. We identified significantly increased expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma (PPARG) in these non-responders after treatment. Furthermore, AML cells overexpressing PPARG acquired VEN/DEC resistance with up-regulation of fatty acid metabolism. These findings suggest that elevated PPARG expression affects cellular energy metabolism and contributes to treatment resistance.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：急性骨髄性白血病 ベネトクラクス デシタピン 治療抵抗性

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

若年急性骨髄性白血病(AML)患者では標準的な化学療法で7~8割の完全寛解率とおよそ4割程度に5年無再発生存期間が得られる。しかし、高齢AML患者(60歳以上)では併存疾患や臓器予備能低下のため抗癌剤の選択や投与量が制限されることに加え、複雑核型の染色体異常、2次性白血病の頻度、薬剤耐性関連遺伝子異常を有している率が高く、標準治療における長期生存率は極めて不良である。AMLの発症年齢中央値は67歳であり、高齢AML患者に対して副作用の低減と治療効果の向上の両立される新しい治療法の開発が喫緊の課題である。

米国では従来から非強力化学療法としてDNAメチル基転移酵素(DNMT)阻害剤(アザシチジンもしくはデシタピン)が使用されており、本邦では2021年よりアザシチジンがAMLに適応拡大となった。研究開発当初、抗アポトーシス因子であるBCL2の阻害剤ベネトクラクスとアザシチジンの併用療法がアザシチジン単独よりも良好な結果を示し、強力化学療法が困難な高齢AML患者の標準治療となりうることが期待され(*DiNardo et al. NEJM. 2020*)、現在ではunfit AML患者に対する治療の柱となりつつある。共同研究チームのMD Anderson Cancer Centerが主導している第 臨床研究(ベネトクラクスとデシタピンの併用療法)でも、生存期間中央値と奏効率に有望な結果が示された(*DiNardo et al. Lancet Haematol. 2020*)。しかし、併用療法によってもなお再発例が多く、また25%の症例で寛解導入に至らず、特に、再発患者や2次性AML患者での成績は低下する。

2. 研究の目的

治療反応性を予測し、適した患者に適した治療を選別することが課題であるが、患者選択や治療効果を裏付ける分子的基盤は不明な点が多い。本研究では、臨床研究を目的として採取された治療前後の患者サンプルを用いて、奏効群と非奏効群での遺伝子発現・変異パターン、エピジェネティクス変化を解析し、治療効果予測マーカーの探索や治療抵抗性を生じるメカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1)ベネトクラクスとデシタピン併用療法の臨床研究(第 臨床研究 NCT03404193)に参加した患者サンプルを使用し、RNA-sequence (seq) 解析による遺伝子発現プロファイリングを解析した。AML患者から、ヘルシンキ宣言の原則に基づき、テキサス大学MDアンダーソン癌センター倫理審査委員会の規定に従って書面によるインフォームドコンセントを取得した後、末梢血および骨髄サンプルを取得した。単核細胞を分離するために、密度勾配遠心法を使用した。RNA-seq解析では、新規に診断された患者(ND)11検体と再発もしくは難治性患者(R/R)10検体の計21の治療前検体を使用した。また、治療後検体としてND群では2検体、R/R群では3検体を用いた。また、ベネトクラクスとデシタピン併用治療に奏効した群は完全寛解(CR)もしくは血球数の回復を伴わない完全寛解(CRi)に達した患者とし、非奏効群はCR/CRiを得られなかった患者もしくは1.5年以内に再発した患者として分類した(図1)。治療奏効群・非奏効群、治療前・治療後検体の遺伝子発現を比較し、2群間で有意に変動した遺伝子群をGene ontology (GO) 解析手法も用いて、責任遺伝子候補を抽出した。

RNA解析で使用した患者群

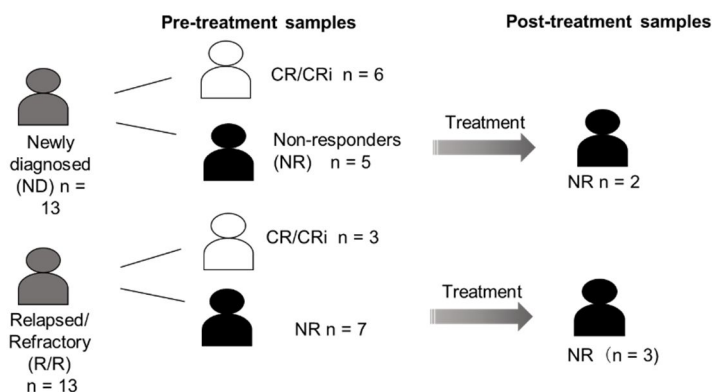


図 1

(2) wide-genome DNAメチル化解析(Methylation BeadChip array)によるエピジェネティックの変調を解析した。DNAメチル化解析では、治療前検体として計23検体を解析し、14のND検体、9のR/R検体が含まれる。治療後検体は、計9検体を解析し、ND群の6検体、R/R群の3検体を用いた(図2)。

(3) 遺伝子の転写が活性化しているオープンクロマチン領域を認識し、1細胞レベルでのエピ

ジェネティックな転写動態を捉えることができる single cell ATAC-seq 解析を組み合わせ、遺伝子発現の変調を解析した。再発 AML の患者から取得したサンプルと健康な対照群の骨髄細胞を使用し、合計 23,803 個の細胞をシーケンスした。データの初期処理は Cell Ranger を使用し、細胞は UMAP によりクラスタリングされ、Azimuth アプリケーションを用いてアノテーションを行った。

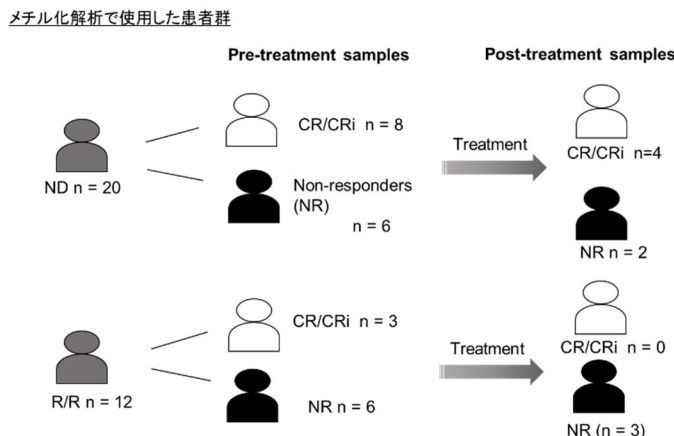


図 2

(4) 上記の結果に基づいて治療抵抗性の責任候補遺伝子を抽出し、in vitro での検証を行った。ターゲット遺伝子を過剰発現させた細胞を作製し、ベネトクラクスおよびデシタピンへの感受性試験を行った。

4. 研究成果

(1) RNA-seq 解析

ND 群では、6 名が奏効、5 名が非奏効、R/R 群では 3 名が奏効、7 名が非奏効であった。ND 群の非奏効グループと奏効グループの治療前サンプルの比較では、182 の遺伝子が有意に発現亢進、126 の遺伝子が有意に発現低下していた (FDR < 0.05)。GSEA による GO 解析では非奏効グループで酸化リン酸化 (OXPHOS) および細胞移動/接着プロセスに関連する遺伝子が有意に上昇していることが示された。R/R 群では、奏効グループと比較して非奏効グループでは、114 の遺伝子が発現亢進と 207 の遺伝子が発現低下していた。これらには、免疫関連にかかわる遺伝子の顕著な発現低下とリボソーム生合成関連遺伝子の発現上昇を確認した。

奏効グループ内の R/R と ND 群の比較分析では、R/R 群で 69 の発現上昇遺伝子と 64 の発現低下遺伝子があり、GO 解析において免疫応答に関連する遺伝子の顕著な上昇とリボソーム生合成関連遺伝子の発現低下が ND 群と比較して R/R 群で認められた。非奏効グループの R/R と ND 患者の比較では、特に R/R 患者で 798 の発現上昇遺伝子と 1294 の発現低下遺伝子があり、ND 患者と比較して R/R 患者の免疫応答関連遺伝子の顕著な発現低下が示された。

これらの発見は、VEN/DEC 治療の効果が免疫応答関連遺伝子の発現に関連している可能性があり、特に R/R 群の非奏効グループで最も顕著な減衰が観察された。さらに、非奏効グループでエネルギー生成関連遺伝子の発現上昇を認めた。

VEN/DEC 治療の免疫応答およびエネルギー代謝に関連する遺伝子発現への影響をさらに評価するため、ND および R/R 群の非奏効グループから採取した治療前後の遺伝子発現を比較した。ND 群 (治療後 n=2、治療前 n=5) では、VEN/DEC 治療後に 326 遺伝子が発現上昇し、155 遺伝子が発現低下していた。さらに、GO 解析により、特に脂肪酸代謝に関連する遺伝子の上昇が示され、治療後に脂肪酸利用増加へのシフトが示唆された。同様に、R/R 群 (治療後 n=3、治療前 n=7) では、治療後に 60 遺伝子が発現上昇し、47 遺伝子が発現低下していた。治療後のサンプルでは、免疫応答に関連する遺伝子の発現が亢進しており、治療後に免疫経路の活性化が示唆された。

治療反応と免疫応答およびエネルギー代謝の変化との間に明らかな相関が見られたため、次に我々の調査はインターフェロン誘発遺伝子 (ISG) のセットに焦点を当てた。これらの ISG の中で、いくつかの差異発現遺伝子が特定された。尿素サイクルの律速酵素である ASS1 の遺伝子発現が治療非奏効グループ群の治療前サンプルで有意に上昇していた。また、脂肪酸代謝の活性化および IFN- 標的遺伝子の調節で知られる転写因子ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (PPARG) は、ND および R/R 群の非奏効グループの治療後サンプルで顕著な発現上昇を示した。

(2) wide-genome DNA メチル化解析

非奏効グループの治療前サンプルにおいて、ある一定の遺伝子で奏効グループよりも脱メチル化している遺伝子群を見出した。その遺伝子群に PPARG が含まれていた。

(3) single cell ATAC-seq 解析

合計 23,803 個の細胞をシーケンスし、細胞は UMAP によりクラスタリングし、Azimuth アプリケ

ーションを用いてアノテーションを行った。白血病関連クラスターでは、他のクラスターと比較して *PPARG* モチーフが顕著に豊富であることが示された。つまり *PPARG* 関連遺伝子の転写が活性化している可能性が示された。

(4) in vitro での検証

PPARG を過剰発現させた細胞株を用いて実験を行った。*PPARG* 高発現細胞では VEN/DEC による細胞増殖抑制とアポトーシス誘導が著しく減少した。さらに、bisulfite pyrosequencing による DNA メチル化解析から、DEC によって *PPARG* が脱メチル化され、それが発現の亢進につながることを示された。最後に、細胞外フラックスアナライザーを使用した細胞エネルギー代謝解析から、VEN/DEC 投与時に *PPARG* 高発現細胞では脂肪酸酸化が亢進し、エネルギー産生の変化が観察された。

これらの結果は、*PPARG* の高発現が細胞のエネルギー代謝に影響を与え、治療抵抗性に関与していることを示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamatani K, Ai T, Saito K, Suzuki K, Hori A, Kinjo S, Ikeo K, Ruvolo V, Zhang W, Mak PY, Kaczkowski B, Harada H, Katayama K, Sugimoto Y, Myslinski J, Hato T, Miida T, Konopleva M, Hayashizaki Y, Carter BZ, Tabe Y, Andreeff M	4. 巻 18
2. 論文標題 Inhibition of BCL2A1 by STAT5 inactivation overcomes resistance to targeted therapies of FLT3-ITD/D835 mutant AML	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Transl Oncol.	6. 最初と最後の頁 101354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2022.101354.	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Kotoko Yamatani, Tatsuro Watanabe, Kaori Saitoh, Kazuhiro Nitta, Kanako Kinjo, Kazuho Ikeo, Takashi Miida, Shinya Kimura, Su Xiaoping, Marina Konopleva, Yoko Tabe
2. 発表標題 Diverse mechanisms of resistance to Decitabine and Venetoclax therapy in newly diagnosed and relapsed/refractory AML inferred by transcriptome analysis
3. 学会等名 The 17th Congress of Asian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kotoko Yamatani, Abhishek Maiti, Tatsuro Watanabe, Kaori Saitoh, Kala Hayes, Sonoko Kinjo, Kazuho Ikeo, Takashi Miida, Shinya Kimura, Courtney D. DiNardo, Su Xiaoping, Yoko Tabe, Marina Konopleva
2. 発表標題 Biomarkers of clinical resistance to Decitabine and Venetoclax therapy inferred by transcriptome and methylation analyses
3. 学会等名 64th ASH Annual Meeting and Exposition (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kotoko Yamatani, Yoko Tabe, Abhishek Maiti, Tomohiko Ai, Kaori Saitoh, Kazuhiro Nitta, Kanako Kinjo, Kazuho Ikeo, Takashi Miida, Courtney D. DiNardo, Su Xiaoping, Marina Konopleva
2. 発表標題 Diverse mechanisms of resistance to Decitabine and Venetoclax therapy in newly diagnosed vs relapsed/refractory AML inferred by transcriptome analysis
3. 学会等名 63rd ASH Annual Meeting and Exposition (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kotoko Yamatani, Bing Z. Carter, Marina Konopleva, Yoko Tabe, Michael Andreeff
2. 発表標題 BCL2A1: A Novel Target in Refractory/Relapsed AML with FLT3-ITD/D835 Double Mutations
3. 学会等名 SOHO 2021 Annual Meeting (国際学会)
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