

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23249052

研究課題名(和文) 白血病幹細胞の維持と再発・治療抵抗性に関わる遺伝学的基盤の解明

研究課題名(英文) Analysis on genetic basis of leukemia relapse and therapy resistance

研究代表者

小川 誠司 (OGAWA, SEISHI)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60292900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,900,000円、(間接経費) 11,070,000円

研究成果の概要(和文)：近年、急性白血病の治療成績には大きな進展が認められたが、白血病の治癒率は未だ50%に満たない。本研究では、白血病の治癒率向上の原因となっている難治性白血病および再発・治療抵抗性白血病の遺伝学的な基盤を解明することを目的として、次世代シーケンスを用いた白血病(とくに難治性白血病)の網羅的な変異解析を行うとともに、同定された新規変異標的について多数症例を用いた標的シーケンスを行った。その結果、コヒーシン複合体、SETBP1の変異を含む多数の新規変異標的遺伝子を同定し、これらの多くが難治性白血病と関連すること、また、主要な標的遺伝子の変異の同定により白血病のより正確な予後予測が可能なが示された。

研究成果の概要(英文)：During the past two decades, significant advance has been made in therapeutics of leukemia. However, overall cure rates for many leukemia types have been less than 50%. In this study, to reveal genetic basis for relapsed or therapy-resistant leukemias, we performed comprehensive mutation studies for different types of leukemia, followed by targeted deep sequencing of newly identified as well as common mutational targets, using massively parallel sequencing in large cohorts of leukemias. We identified a number of new mutational targets, including multiple components of the cohesion complex and the RNA splicing machinery as well as SETBP1, DDX41, and DNA repair genes, many of which were associated with poor clinical outcomes. We further demonstrated that information of mutational status of multiple mutational targets could be used for better prediction of the clinical outcome of patients with AML, enabling their stratification for choice of therapeutics.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：白血病 幹細胞 リシーケンス 遺伝子変異 エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

過去 30 年間に白血病の治療技術は格段の進歩を遂げ、従来不治の疾患と考えられていた白血病の治療成績は長足の進展を遂げた。しかし、造血幹細胞移植を含めた現行の白血病治療技術の改良による治療成績の向上は 1990 年代末から明らかに限界に達しており、急性骨髄性白血病の治療率は、一部の予後良好な病型を除いて、50%に満たない。白血病の治療率改善を阻む最大の要因となっているのは、1)治療の決定打となる優れた抗白血病薬の欠如、および、2)現行の治療に対する抵抗性の存在・獲得とこれによる再発の問題である。この優れた抗白血病薬の開発のためには白血病の成因に本質的に関与している遺伝的変異を明らかにした上で、それらを標的にした薬剤開発が有効であることが多数の実例で示されているが、白血病の発症に関わる遺伝子変異の全貌は未だ明らかではない。他方、再発・治療抵抗性に関しては、近年、白血病集団内に認められる遺伝的多様性が重要な役割を担っていることが、慢性骨髄性白血病のイマチニブ耐性クローンの研究から示唆されているが、こうした白血病集団におけるクローンの多様性の遺伝的基盤については十分な理解が得られていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、近年導入させた高速シーケンスの手法を用いて白血病で生じている遺伝子変異を網羅的に解析することにより、1)白血病(とくに難治性白血病)における新規分子標的を同定すること、また、2)予後不良群を特徴づける遺伝子プロファイルを同定することにより、白血病の治療成績の改善に資することである。

3. 研究の方法

1) 難治性白血病における治療標的変異分子の同定

60 例の難治性白血病症例(de novo AML N = 33, 二次性 AML N = 7 例、若年性骨髄単球性白血病(JMML) N=12, 急性リンパ性白血病(ALL) N =12)を対象として、高速リシーケンスを用いた全ゲノム配列の解析により白血病特異的な変異を同定した。また、JALSG の AML における変異の頻度・分布、予後との相関を検討した。

2) 治療抵抗性・再発に関わる白血病の遺伝的多様性の解析

経時的(初診時、再発時、治療的抗性白血病移行時)に白血病試料が得られている白血病症例(N=9)、全エクソンシーケンスにより、白血病細胞集団内に生じている遺伝子変異を同定した。また集団内での経時的・集団的な挙動を詳細に検討することにより、白血病の再発や治療抵抗性に関わる遺伝子変異の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) 難治性白血病の全エクソン解析

難治性急性骨髄性白血病(AML)の再発に関わる遺伝子変異を探索する目的で、初発時、再発時、および正常(寛解期) DNA 検体の得られる種々の病型を含む成人再発 AML 33 例(t(8;21):10 例, t(15;17):8 例, FLT3-ITD: 10 例, 正常核型ないし MLL-PTD: 5 例)について、全エクソン解析を行った。同定された変異候補についてはすべてサンガーシーケンスによる検証を行った。正常核型 AML を除く各病型で 5-10 個の非同義置換を伴う体細胞変異が同定された。一方、正常核型 AML では 25-35 個の変異が同定された。t(8;21)転座陽性 AML(N=10)の解析では計 92 個の非同義置換変異が同定された。うち 47 変異は初発・再発に共通する変異であったが、10 変異は初発時のみ、35 変異は再発時のみに認められる変異であった。KIT, TET2, TTN, および MGA の変異が繰り返し認められた。FLT3-ITD 陽性 AML(N=10)では DNMT3A, WT1, RUNX1 and IDH1 遺伝子を含む 50 個の遺伝子に計 60 個の非同義置換変異が同定され、うち 38 遺伝子は初発・再発で共通する遺伝子であった。急性前骨髄球性白血病(N=8)では、61 遺伝子に計 63 mutations が同定された。MLL-PTD AML(N=5)では、42 遺伝子に変異が認められ、うち、24 遺伝子が初発時と再発時で共通していた。APL 以外の症例では再発時クローンは初発時に認められた主要なクローンに由来していたが、APL の 4 例では初発時と再発時で全く異なるクローンに由来することが確認された。一方、再発 ALL については 12 例の解析が完了しており、

(2) 難治性白血病に特徴的な変異の発見

二次性 AML は難治性白血病の代表的な病型であるが、今回の全エクソン解析および標的シーケンスの結果、二次性白血病に特徴的な変異標的として、RNA スプライシング因子、SETBP1 遺伝子、および DDX41 遺伝子を同定した。特に、SETBP1 変異を有する症例の予後は著しく不良であり、早期により強力な治療を考慮する必要があることが示唆された。

(3) 急性白血病における大規模標的シーケンスによる網羅的な変異解析

急性骨髄性白血病(AML)の大規模コホートを対象として、H24 年度までの解析で新たに同定したコヒーシ、PHF6、BCOR/BCORL1 等を含む AML の主要な標的遺伝子 51 遺伝子について、次世代シーケンスを用いた deep sequencing による網羅的な変異解析を行い、変異の頻度と分布、予後との相関を検討した。解析に用いたコホートは Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) AML201 研究で治療された急性前骨髄性白血病を除く 197 例の AML 患者で、RT-PCR 法による腫瘍な関連転座の解析も併せて行った。解析の結果 44 遺伝子に計 505 個の遺伝子変異が同定された。10%を超える変異頻度を示す遺伝子は FLT3, NPM1, DNMT3A, CEBPA, KIT を含む 5 つのみで、変異頻度の少ない多数の遺伝子が変異の標

的となっており、変異の観点から AML の多様性が示唆された。これらの変異は、年齢、核型、白血球数、CR 率や予後、他の遺伝子変異と有意な相関が認められることから、変異と臨床像との間の密接な関連が示唆された。とくに TP53 変異、MLL-PTD 変異、DNMT3A 変異、FLT3-ITD 変異、RUNX1 変異を有する症例は予後不良で、難治性白血病の遺伝子マーカーとして有用であると考えられ、実際これらの変異に基づいて患者のリスクの層別化が可能であることが示された。

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 19 件)

1. Matsunawa, M. Yamamoto, R. Sanada, M. Sato-Otsubo, A. Shiozawa, Y. Otsu, M. Isono, K. Koseki, H. Nakauchi, H. Ogawa, S. Haploinsufficiency of Sf3b1 leads to compromised stem cell function but not to myelodysplasia. *Leukemia* 有 inpress 10.1038/leu.2014.73 (2014)
2. Haferlach, T. Nagata, Y. Grossmann, V. Okuno, Y. Bacher, U. Nagae, G. Schnittger, S. Sanada, M. Kon, A. Alpermann, T. Yoshida, K. Roller, A. Nadarajah, N. Shiraishi, Y. Shiozawa, Y. Chiba, K. Tanaka, H. Koeffler, H. P. Klein, H. U. Dugas, M. Aburatani, H. Kohlmann, A. Miyano, S. Haferlach, C. Kern, W. Ogawa, S. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 有 28:4241-7 10.1038/leu.2013.336 (2014)
3. Yoshida K, Sato-Otsubo A (6/33), Sanada M (7/33), Ito E, Ogawa S (33/33). The landscape of somatic mutations in Down syndrome-related myeloid disorders. *Nat Genet* 有. 452 :1293-9(2013) 10.1038/ng.2759
4. Sakaguchi, H. Okuno, Y. Muramatsu, H. Yoshida, K. Shiraishi, Y. Takahashi, M. Kon, A. Sanada, M. Chiba, K. Tanaka, H. Makishima, H. Wang, X. Xu, Y. Doisaki, S. Hama, A. Nakanishi, K. Takahashi, Y. Yoshida, N. Maciejewski, J. P. Miyano, S. Ogawa, S. Kojima, S. Exome sequencing identifies secondary mutations of SETBP1 and JAK3 in juvenile myelomonocytic leukemia. *Nat Genet* 有 45:3937-41(2013) 10.1038/ng.2698
5. Muto, T. Sashida, G. Oshima, M. Wendt, G. R. Mochizuki-Kashio, M. Nagata, Y. Sanada, M. Miyagi, S. Saraya, A. Kamio, A. Nagae, G. Nakaseko, C. Yokote, K. Shimoda, K. Koseki, H. Suzuki, Y. Sugano, S. Aburatani, H. Ogawa, S. Iwama, A. Concurrent loss of Ezh2 and Tet2 cooperates in the pathogenesis of myelodysplastic disorders. *J Exp Med* 有 210:2627-39(2013)10.1084/jem.20131144
6. Makishima H, Sanada M (5/30), Ogawa S (29/30) Somatic SETBP1 mutations in myeloid malignancies. *Nat Gene* 有 45 2:942-6(2013)10.1038/ng.2696
7. Kon A, Sanada M (4/41), Sato-Otsubo A (12/41), *Ogawa S (41/41). Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. *Nat Genet* 有 . 452:1232-7(2013) 10.1038/ng.2731
8. Kihara R, S. Ogawa, S. (32/33) Naoe, T. Comprehensive analysis of genetic alterations and their prognostic impacts in adult acute myeloid leukemia patients. *Leukemia* 有 inpress. 10.1038/leu.2014.55(2014)
9. Junko Takita Novel splicing-factor mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia* 有 26:1879-1881(2012) 10.1038/leu.2012.45.
10. Takashi Kohno KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nature Medicine* 有 18:375-7(2012) 10.1038/nm.2644
11. Makoto Yamagishi Polycomb-Mediated Loss of miR-31 Activates NIK-Dependent NF-kappaB Pathway in Adult T Cell Leukemia and Other Cancers. *Cancer Cell* 有. 21:121-35(2012)10.1016/j.ccr.2011.12.015.
12. Satoshi Saida Clonal selection in xenografted TAM recapitulates the evolutionary process of myeloid leukemia in Down syndrome. *Blood* 有 (2013)10.1182/blood-2012-12-474387
13. Shinji Kunishima ACTN1 Mutations Cause Congenital Macrothrombocytopenia *American Journal of Human Genetics* 有 92: 431-8 (2013)10.1016/j.ajhg.2013.01.015
14. Yuichi Shiraishi An empirical Bayesian framework for somatic mutation detection from cancer genome sequencing data. *Nucleic Acid Research* 有 41:e89(2013) 10.1093/nar/gkt126
15. Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, Yamochi T, Kagami Y, Tsutsiuni A, Matsuda Y, Sato-Otsubo A, Muto S, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru K, Ogawa S, Watanabe T: "Polycomb-Mediated Loss of miR-31 Activates NIK-Dependent NF-kap paB Pathway in Adult T Cell Leukemia and

- Other Cancers" Cancer cell. 有 21. 121-135 (2011)
16. Okubo J, Takita J, Chen Y, Oki K, Nishimura R, Kato M, Sanada M, Hiwatari M, Hayashi Y, Igarashi T, Ogawa S: "Aberrant activation of ALK kinase by a novel truncated form ALK protein in neuroblastoma" Oncogene. 有 (2011)
 17. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, Sato Y, Sato-Otsubo A, Kon A, Nagasaki M, Chalkidis G, Suzuki Y, Shiosaka M, Kawahata R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Ishiyama K, Mori H, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Sugano S, Haferlach C, Koeffler HP, Shih LY, Haferlach T, Chiba S, Nakauchi H, Miyano S, Ogawa S: "Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia" Nature. 有.478. 64-69 (2011)
 18. Yoshida K, Sanada M, Kato M, Kawahata R, Matsubara A, Takita J, Shih LY, Mori H, Koeffler HP, Ogawa S: "A nonsense mutation of IDH1 in myelodysplastic syndromes and related disorders" Leukemia 有 25. 184-186 (2011)
 19. Shiba N, Park MJ, Taki T, Takita J, Hiwatari M, Kanazawa T, Sotomatsu M, Ishii E, Arakawa H, Ogawa S: "Hayashi Y.CBL mutations in infant acute lymphoblastic leukaemia" Br J Haematol, 有 156(5). 672-674 (2011)

1. 〔学会発表〕 計(9)件 うち招待講演 計(5)件

1. Ayana Kon, Ogawa S. et al. Recurrent pathway mutations of multiple components of cohesin complex in myeloid neoplasms.AACR Annual meeting 2013.4.9 Washington, DC (USA)
2. Ogawa S. et al. Recent advance in molecular genetics of MDS as revealed by massively parallel sequencing.2013.6.13 18thCongress of EHA.Stockholm(Sweden)
3. Ogawa S. et al. Comprehensive genome analysis of pediatric myeloid neoplasms.2013.6.15.18th Congress of EHA.Stockholm(Sweden)
4. Kihara R, Ogawa S. et al.RE-CLASSIFICATION OF ADULT ACUTE MYELOID LEUKEMIA BASED ON THE COMPREHENSIVE GENETIC ANALYSIS. 2013.6.14.18th Congress of EHA.Stockholm(Sweden)
5. Ayana Kon, Ogawa S. et al. Recurrent somatic SETBP1 mutations in

myeloid neoplasms.2013.10.5.第. 72 回日本癌学会学術総会(横浜)

6. Ayana Kon, Ogawa S. et al.Recurrent somatic SETBP1 mutations in myeloid neoplasms.2013.10.1.第. 75 回日本血液学会学術集会(北海道)
7. Seishi Ogawa Pathway Mutations in the Splicing Machinery in Myeloid Neoplasms.2012 ASH Annual Meeting and Exposition.2012年 12月 08日 (Atlanta, USA)
8. Seishi Ogawa Genetic analysis of myelodysplastic syndromes.The 2013 Joint Symposium: multi-Omics in KSBMB WinterWorkshop 2013年 01月 16日.High-One Resort, (Korea)
9. Seishi Ogawa Genetic analysis of myelodneoplasms in childhood .Cambridge Research Institute Annual International Symposium 2012年 11月 02日(Cambridge, UK)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 骨髄異形成症候群または骨髄性腫瘍素因の評価方法、そのポリペプチド及び抗体

発明者: 小川誠司、真田昌、吉田健一

権利者: 国立大学法人東京大学

種類: 特願 2011-169662

出願年月日: 20110802

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

小川 誠司(OGAWA SEISHI)

東京大学医学部附属病院・届出診療医

研究者番号: 60292900