

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461560

研究課題名(和文) ダウン症候群関連急性リンパ性白血病の発症機構の解明と新規分子標的の探索

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of development of Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia and novel therapeutic targets for this disease

研究代表者

照井 君典(Terui, Kiminori)

弘前大学・医学研究科・准教授

研究者番号：00333740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ダウン症候群の急性リンパ性白血病(DS-ALL)の発症機構を解明し新規分子標的を同定するために本研究を行い、以下の成果を得た。

1. 本邦のDS-ALLの約40%にレセプターチロシンキナーゼ(RTK)-RAS経路、約20%にCRLF2-JAK経路の遺伝子異常が認められ、両者は相互排他的であった。RTK-RAS経路とCRLF2-JAK経路は分子標的治療の有力な候補と考えられた。
2. エピゲノム制御因子の遺伝子変異は、RTK-RAS経路の変異もCRLF2-JAK経路の変異も持たない症例の約半数に認められた。これらの症例にはエピジェネティック治療薬が有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We performed this study to clarify molecular mechanisms of development of Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia (DS-ALL) and to find novel therapeutic targets, and obtained the following results.

1. Gene alterations in the receptor tyrosine kinase (RTK)-RAS and the CRLF2-JAK pathways were found in about 40% and 20% of Japanese DS-ALL patients, respectively, and they were mutually exclusive. It is suggested that these pathways are potential therapeutic targets.
2. Gene mutations in epigenetic regulators were found in about half of Japanese DS-ALL patients lacking both RTK-RAS and CRLF2-JAK pathway mutations. Epigenetic agents may be useful for these patients.

研究分野：小児科学

 キーワード：ダウン症候群 急性リンパ性白血病 レセプターチロシンキナーゼ RAS CRLF2 JAK 分子標的治療
 エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

(1) 21 番染色体の過剰により生じるダウン症候群 (ダウン症) は急性白血病を高率に発症し、その頻度は健常人の約 20 倍である。その約半数を占める急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia, AML) は抗癌剤に高い感受性を示すため、ダウン症に関連のない AML よりも予後良好であるが、残りの半数を占める急性リンパ性白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL) は、ダウン症に関連のない ALL よりも予後不良である。そのため、ダウン症関連 ALL (DS-ALL) に対して多剤併用の強力な化学療法が行われているが、ダウン症の患者では健常人に比べて抗癌剤に対する認容性が低く副作用が強く現れるため、治療関連死の割合が高いことが問題となっており、より安全で効果的な治療が求められている。近年、腫瘍細胞の増殖促進やエピジェネティック異常に関わる分子を標的とした分子標的治療薬の開発は目覚しく、多くの分子標的治療薬が実用化された。分子標的治療は、ALL に対する強力な多剤併用化学療法と比較してはるかに毒性が低いため、治療関連死亡が問題となる DS-ALL において、非常に魅力的な治療法と考えられる。

(2) DS-ALL の発症機構は十分解明されていなかったが、最近、欧米の DS-ALL 患者の約 20% でシグナル伝達分子の 1 つである JAK2、半数以上でサイトカインレセプターの 1 つである CRLF2 の遺伝子異常がみられることが報告された。両者は協調して CRLF2-JAK という細胞内シグナル伝達経路を活性化することにより白血病の発症に関わっていると考えられており、JAK 阻害薬は有力な分子標的治療の候補と考えられる。そこで本邦の DS-ALL 症例 38 例について CRLF2-JAK 経路の遺伝子異常の解析を行ったところ、異常が認められたのは 11 例 (29%) のみであり、本邦の DS-ALL では CRLF2-JAK 経路の異常の頻度が低いことが明らかとなった (Hanada I, Terui K, et al, Genes Chromosomes Cancer 2014)。そこで、分子標的治療の標的となりうる CRLF2-JAK 経路以外のシグナル伝達経路を見出すために、CRLF2 と JAK2 に遺伝子異常を認めない 5 例について RNA シークエンスを行ったところ、4 例で受容体型チロシンキナーゼ (receptor tyrosine kinase, RTK) -RAS 経路の遺伝子変異を認めた (FLT3 1 例、NRAS 1 例、PTPN11 2 例)。現時点では、RTK-RAS 経路が本邦の DS-ALL に対する分子標的治療の標的として最も有望と考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、本邦の DS-ALL の発症機構を解明し、分子標的治療の標的となりうる新たな分子や細胞内シグナル伝達経路を同定することである。具体的には、以下の 4 点に焦点を絞り研究を行う。

(1) DS-ALL の患者検体を用いて RTK-RAS 経路の遺伝子解析を行い、本邦の DS-ALL における RTK-RAS 経路の遺伝子変異の頻度、特徴を決定する。

(2) RTK-RAS 経路に新しい遺伝子変異が見つかった場合には、変異遺伝子を細胞株に導入し、機能を解析する。

(3) CRLF2-JAK 経路と RTK-RAS 経路に遺伝子異常を認めない症例について網羅的遺伝子解析を行い、未知の遺伝子異常を同定する。

(4) トリソミー-21 と CRLF2-JAK 経路の遺伝子異常を持つ細胞株を用いて、新規白血病治療薬の効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) 患者検体を用いた RTK-RAS 経路の遺伝子変異の解析

DS-ALL 患者の診断時骨髄液から常法に従い全 RNA を抽出し、cDNA を合成する。PCR 産物の長さが 300 ~ 400bp になるように RTK-RAS 経路に関わる遺伝子 (NRAS, KRAS, PTPN11, CBL, FLT3 など) の cDNA 全長にわたりプライマーセットをデザインし PCR を行い、ダイレクトシーケンス法により遺伝子変異を確認する。

(2) RTK-RAS 経路の新規変異遺伝子の機能解析

RTK-RAS 経路に新しい遺伝子変異が見つかった場合には、レトロウイルスベクターを用いて変異遺伝子をサイトカイン依存性細胞株に遺伝子導入し、サイトカイン依存性の消失や RTK-RAS 経路の恒常的活性化について解析を行う。さらに、マルチキナーゼ阻害薬や FLT3 阻害薬、MEK 阻害薬などを添加し、細胞増殖の抑制や細胞死の誘導について解析を行う。

(3) 患者検体を用いた網羅的遺伝子解析

CRLF2-JAK 経路と RTK-RAS 経路に遺伝子異常を認めない DS-ALL 患者の診断時骨髄液と寛解時末梢血から常法に従いゲノム DNA を抽出する。白血病関連遺伝子のパネルを用いたターゲットシーケンスや全エクソンシーケンスを行い、未知の遺伝子異常を同定する。

(4) 細胞株を用いた新規白血病治療薬の効果の解析

YCUB-5 はダウン症と関連のない ALL から樹立された細胞株であるが、トリソミー-21 と CRLF2 遺伝子異常、JAK2 変異を持っており、白血病の発症機構が CRLF2-JAK 経路の遺伝子異常を持つ DS-ALL と類似していると考えられる。YCUB-5 に JAK 阻害薬、エピジェネティック治療薬、プロテアソーム阻害薬などを添加し、細胞増殖、アポトーシス、細胞内シグナル伝達経路の活性化、遺伝子発現などへの

影響を解析する。

4. 研究成果

(1)当初の計画通り、本邦のDS-ALLの診断時骨髄を用いてRTK-RAS経路の遺伝子変異の解析を開始した。ダイレクトシーケンス法による解析を予定していたが、数十種類の遺伝子を一度に解析でき、正確な変異アレルの頻度の決定も可能なイルミナ社のHaloPlexターゲットエンリッチメントシステムとMiSeqを用いたターゲットシーケンス法を採用した。RTK-RAS経路以外の解析対象遺伝子としては、分子標的治療の標的となりうるエピゲノム制御因子と、DS-AMLで高頻度に変異が認められるコヒーシオン複合体をコードする遺伝子群を選択し、合計32遺伝子について一度に解析する方法を構築した。

(2)上記のターゲットシーケンス法により、本邦のDS-ALL37例の診断時骨髄を用いてRTK-RAS経路の遺伝子変異の解析を行った。RTK-RAS経路の変異は37例中15例(41%)と高頻度で認められ、その頻度は最近欧州のグループから報告された頻度(36%)とほぼ同様であった。RTK-RAS経路の変異の中で最も多かったのはFLT3の変異であり、37例中6例で認められた(16%)。欧米のDS-ALLではFLT3の変異は比較まれ(7%)であり、FLT3の変異が多いのは本邦のDS-ALLの特徴かもしれない。CRLF2-JAK経路の遺伝子変異は37例中7例(19%)で認められ、RTK-RAS経路の変異とは相互排他的であった。エピゲノム制御因子の遺伝子変異は、RTK-RAS経路の変異もCRLF2-JAK経路の変異も持たない症例15例中7例(47%)に認められた。これらの症例にはエピジェネティック治療薬が有用である可能性が示唆された。コヒーシオン複合体とその関連因子の遺伝子変異は37例中5例(14%)で認められ、DS-AMLと比べて明らかに低頻度であった。

(3)遺伝子異常と臨床像との関連を明らかにするために、CRLF2-JAK経路に変異を持つ症例、RTK-RAS経路に変異を持つ症例、その他の3群に分類し解析を行ったが、年齢、性別、診断時白血球数、NCIリスク分類、染色体・遺伝子異常、無イベント生存率、全生存率に違いはみられなかった。CRLF2-JAK経路の変異陽性例と陰性例の2群で比較した場合、従来の報告通り変異陽性例は陰性例よりも低年齢であったが、有意差はみられなかった(中央値5.5歳 vs 7.3歳、 $P=0.07$)。

(4)新規融合遺伝子を同定するためにDS-ALL21例についてRNAシーケンスを行ったところ、1例で新規融合遺伝子が同定された。次に遺伝子発現のデータを用いてクラスター解析を行ったところ、CRLF2-JAK2経路の変異陽性例とETV6-RUNX1融合遺伝子陽性例は別々のクラスターに分類され、両者の遺伝

子発現プロファイルは明らかに異なると考えられた。一方、RTK-RAS経路の変異陽性例はいくつかのクラスターに分かれて分類され、遺伝子発現プロファイルの面からは不均一な集団であることが示唆された。従来の報告通り、ETV6-RUNX1陽性例ではIGF2BP1やEPORの高発現が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計11件)

Taga T, Watanabe T, Tomizawa D, Kudo K, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Iwamoto S, Nakayama H, Takahashi H, Shimada A, Taki T, Toki T, Ito E, Goto H, Koh K, Saito AM, Horibe K, Nakahata T, Tawa A, Adachi S. Preserved High Probability of Overall Survival with Significant Reduction of Chemotherapy for Myeloid Leukemia in Down Syndrome: A Nationwide Prospective Study in Japan. *Pediatr Blood Cancer* 2016; 63: 248-54. DOI: 10.1002/pbc.25789. 査読有.

Banno K, Omori S, Hirata K, Nawa N, Nakagawa N, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Sakuma T, Yamamoto T, Toki T, Ito E, Yamamoto T, Kokubu C, Takeda J, Taniguchi H, Arahori H, Wada K, Kitabatake Y, Ozono K. Systematic Cellular Disease Models Reveal Synergistic Interaction of Trisomy 21 and GATA1 Mutations in Hematopoietic Abnormalities. *Cell Rep* 2016; 15: 1228-41. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.04.031. 査読有.

照井君典, 土岐力, 伊藤悦朗. 一過性異常骨髄増殖症. 小児疾患診療のための病態生理 3. 小児内科増刊号 2016; 48: 953-6.

<http://www.tokyo-igakusha.co.jp/f/b/show/b01/978/zc01/4.html> 査読無.

照井君典, 伊藤悦朗. ダウン症に伴う急性巨核芽球性白血病の分子的理解と臨床応用. 血液フロンティア 2016; 26: 1533-40.

https://www.iyaku-j.com/index.php?main_page=index&cPath=5_1_17_4715 査読無.

照井君典, 伊藤悦朗. 小児急性巨核芽球性白血病の生物学的特性. 血液内科 2016; 72: 737-42.

<http://www.kahyo.com/item/KS201605-725> 査読無.

Takahashi T, Inoue A, Yoshimoto J, Kanamitsu K, Taki T, Imada M, Yamada M, Ninomiya S, Toki T, Terui K, Ito E, Shimada A. Transient myeloproliferative disorder with

partial trisomy 21. *Pediatr Blood Cancer* 2015; 62: 2021-4. DOI: 10.1002/pbc.25624. 査読有.

Ono R, Hasegawa D, Hirabayashi S, Kamiya T, Yoshida K, Yonekawa S, Ogawa C, Hosoya R, Toki T, Terui K, Ito E, Manabe A. Acute megakaryoblastic leukemia with acquired trisomy 21 and GATA1 mutations in phenotypically normal children. *Eur J Pediatr* 2015; 174: 525-31. 31. DOI: 10.1007/s00431-014-2430-3. 査読有.

照井君典, 金崎里香, 土岐力, 伊藤悦朗. ダウン症候群に伴うTAM発症の分子機構. *日本産婦人科・新生児血液学会誌* 2015; 25: 49-54. http://www.medicalonline.jp/search?v%3afile=viv_7DZCZS&v:state=root|root-80-10|0& 査読無.

Hanada I, Terui K, Ikeda F, Toki T, Kanazaki R, Sato T, Kamio T, Kudo K, Sasaki S, Takahashi Y, Hayashi Y, Inukai T, Kojima S, Koike K, Kosaka Y, Kobayashi M, Imaizumi M, Mitsui T, Hori H, Hara J, Horibe K, Nagai J, Goto H, Ito E. Gene alterations involving the CRLF2-JAK pathway and recurrent gene deletions in Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia in Japan. *Genes Chromosomes Cancer* 2014; 53: 902-10. DOI: 10.1002/gcc.22201. 査読有.

王汝南, 金崎里香, 土岐力, 照井君典, 佐々木伸也, 工藤耕, 神尾卓哉, 佐藤知彦, 池田史圭, 荒木亮, 落合英俊, 伊藤悦朗. 非ダウン症小児急性巨核芽球性白血病にみとめられた新規GATA1インフレーム変異. *弘前医学* 2014; 65: 227-237.

<http://repository.ul.hirosaki-u.ac.jp/dspace/handle/10129/5431> 査読有.

照井君典, 土岐力, 伊藤悦朗. ダウン症に合併した骨髄性腫瘍の分子病態. *血液内科* 2014; 69: 200-206. <http://www.kahyo.com/item/KS201408-692> 査読無.

[学会発表](計14件)

Terui K, Toki T, Hama A, Muramatsu H, Hasegawa D, Park MJ, Iwamoto S, Taga T, Yanagisawa R, Koh K, Saito AM, Horibe K, Hayashi Y, Adachi S, Mizutani S, Watanabe K and Ito E. Analysis of GATA1 Mutations in Down Syndrome Infants with Transient Abnormal Myelopoiesis and Clinical Impacts of GATA1 Mutation Types: A Report from the JPLSG TAM-10 Study. 58th American Society of Hematology

Annual Meeting and Exposition. 2016. 12. 3-6. San Diego (USA).

Kubota Y, Uryu K, Kawai T, Ito T, Hanada I, Toki T, Seki M, Yoshida K, Kataoka K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Oka A, Hayashi Y, Ogawa S, Terui K, Sato A, Hata K, Ito E and Takita J. Gene Expression Profiles and Methylation Analysis in Down Syndrome Related Acute Lymphoblastic Leukemia. 58th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. 2016. 12. 3-6. San Diego (USA).

照井君典, 土岐力, 濱 麻人, 村松秀城, 長谷川 大輔, 朴 明子, 岩本 彰太郎, 多賀 崇, 柳澤 龍, 康 勝好, 林 泰秀, 足立 壯一, 水谷 修紀, 渡邊 健一郎, 伊藤 悦朗. 一過性異常骨髄増殖症におけるGATA1遺伝子変異 JPLSG TAM-10登録症例の解析. 第58回日本小児血液・がん学会学術集会. 2016.12. 15-17. 品川プリンスホテル(東京・品川区).

久保田 泰央, 瓜生 久美子, 河合 智子, 伊東 竜也, 花田 勇, 土岐力, 関 正史, 吉田 健一, 佐藤 悠佑, 白石 友一, 千葉 健一, 田中 洋子, 宮野 悟, 岡 明, 林 泰英, 小川 誠司, 照井君典, 佐藤 篤, 秦 健一郎, 伊藤 悦朗, 滝田 順子. ダウン症候群児における急性リンパ性白血病のメチル化解析. 第58回日本小児血液・がん学会学術集会. 2016.12. 15-17. 品川プリンスホテル(東京・品川区).

久保 かほり, 土岐力, 金崎里香, 伊東 竜也, 池田 史圭, 佐藤 知彦, 神尾 卓哉, 工藤 耕, 佐々木 伸也, 照井君典, 伊藤 悦朗. 小児急性リンパ性白血病再発例に頻発するRAS経路の体細胞突然変異. 第58回日本小児血液・がん学会学術集会. 2016.12. 15-17. 品川プリンスホテル(東京・品川区).

Saida S, Nakamura M, Toki T, Nishinaka-Arai Y, Terui K, Yoshida K, Ogawa S, Nakahata T, Heike T, Watanabe K, Watanabe A, Ito E. Dysregulation of DNA Methylation Involves in Progression of Myeloid Leukemia in Down Syndrome. 57th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. 2015. 12. 5-8. Orlando (USA).

Muramatsu H, Watanabe T, Hasegawa D, Park MJ, Iwamoto S, Taga T, Ito E, Toki T, Terui K, Yanagisawa R, Koh K, Saito AM, Horibe K, Hayashi Y, Adachi S, Mizutani S, Watanabe K. Prospective Study of 168 Infants with Transient Abnormal Myelopoiesis with Down Syndrome: Japan Pediatric

Leukemia/Lymphoma Study Group, TAM-10 Study. 57th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. 2015. 12. 5-8. Orlando (USA).

Ito T, Terui K, Hanada I, Ikeda F, Toki T, Kanezaki R, Sato T, Kamio T, Kudo K, Sasaki S, Takahashi Y, Hayashi Y, Inukai T, Hori H, Ito E. RAS Pathway Mutations in Down Syndrome-Associated Acute Lymphoblastic Leukemia in Japan. 57th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. 2015. 12. 5-8. Orlando (USA).

Terui K, Hanada I, Ikeda F, Ito T, Toki T, Kanezaki R, Sato T, Kamio T, Kudo K, Sasaki S, Takahashi Y, Hayashi Y, Inukai T, Hori H, Ito E. Gene alterations in Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia in Japan. 第77回日本血液学会学術集会. 2015.10. 16-18. 石川県立音楽堂他(石川県・金沢市).

Inukai T, Ito T, Terui K, Imamura T, Goi K, Kagami K, Abe M, Toki T, Ito E, Sugita K. Cytogenetic characteristics of YAMN93 cell line established from ALL with Down syndrome. 第77回日本血液学会学術集会. 2015.10. 16-18. 石川県立音楽堂他(石川県・金沢市).

伊東 竜也, 照井 君典, 花田 勇, 池田 史佳, 土岐 力, 金崎 里香, 佐藤 知彦, 神尾 卓哉, 工藤 耕, 佐々木 伸也, 高橋 良博, 林 泰秀, 犬飼 岳史, 堀 浩樹, 伊藤 悦朗. 本邦のダウン症候群関連急性リンパ性白血病におけるRAS経路の遺伝子変異. 第57回日本小児血液・がん学会学術集会. 2015.11. 27-29. 甲府富士屋ホテル他(山梨県・甲府市).

Taga T, Watanabe T, Kudo K, Tomizawa D, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Iwamoto S, Nakayama H, Takahashi H, Shimada A, Taki T, Toki T, Ito E, Goto H, Koh K, Saito A, Horibe K, Nakahata T, Tawa A and Adachi S. Risk-Oriented Therapy for Myeloid Leukemia of Down Syndrome: A Nationwide Prospective Study By the Japanese Pediatric Leukemia / Lymphoma Study Group (JPLSG). 56th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. 2014. 12. 6-9. San Francisco (USA).

Kanezaki R, Wang R, Toki T, Terui K, Sasaki S, Kudo K, Kamio T, Sato T, Ikeda F, Ito E. In-frame deletion of GATA1 in pediatric acute megakaryoblastic leukemia without Down syndrome. 第76回日本血液学会学

術集会. 2014.10. 31-11. 2. 大阪国際会議場(大阪府・大阪市).

照井 君典, 金崎 里香, 土岐 力, 伊藤 悦朗. 新生児の白血球異常症 ダウン症候群に伴う TAM 発症の分子機構. 第24回日本産婦人科・新生児血液学会学術集会. 2014. 6. 13-14. ワークピア横浜(神奈川県・横浜市).

〔図書〕(計1件)

照井君典, 土岐力, 伊藤悦朗. 急性骨髄性白血病をめぐる最新の話題 Molecular genetics. Hematology AGORA. 毘沙門堂, 5-7, 2014.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~pedia/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

照井 君典 (TERUI KIMINORI)

弘前大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 00333740

(2) 研究分担者

土岐 力 (TOKI TSUTOMU)

弘前大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号: 50195731