

急性骨髄性白血病の移植後再発における新規 GNB2 遺伝子異常の解明

牧島秀樹

京都大学大学院医学研究科 腫瘍生物学講座

【研究の背景】

急性骨髄性白血病(AML)に対する治療は、時に短期的に有効ではあるが、AML が抵抗性を獲得し再発することも多く、その場合高頻度に早期死亡に至る。従来、そのメカニズムとして、治療前後で AML 細胞が異なる形質を持つという腫瘍の多様性に着目し、エピジェネティクスの異常が明らかにされているが、脱メチル化薬などエピジェネティクスの異常を標的にした薬剤の効果は限定的である。一方、ゲノム異常に関しては、特に、ボトルネック効果に関連したクローン構造の変化について、十分検討されていないため、再発・治療抵抗性に関わる遺伝子異常が明らかにされていない。本研究の目標は、再発・治療抵抗性を示す AML に対して、有効な標的治療を開発することである。そこで、我々が培ってきたゲノム解析技術とボトルネック効果に関する成果を活用し、再発・治療抵抗性獲得前後の多様性を明らかにするために再発期間が短縮される前後で獲得される遺伝子異常を明らかにする。

【目 的】

急性骨髄性白血病(AML)は難治性の骨髄悪性腫瘍であり、造血幹細胞移植により一時的な効果は認められるものの、再発した場合治療抵抗性を獲得する。われわれはこれまで、ヒトがん遺伝子を導入した AML のマウス移植モデルを解析し、RAS パスウェイなどの既知の遺伝子に加えて新規 Gnb2 変異を発見した。そこで本研究では、ヒト AML における再発・治療抵抗性に関与する新規候補分子として、GNB2 の変異の検索により病態を解明する。

【方 法】

AML における再発・治療抵抗性に関与する新規候補分子の検索を目的として、連続的に白血病細胞を移植することによりマウスの骨髄中で腫瘍が再発するのに必要な時間が短縮される、マウスの白血病モデルを作成した。この系は、臨床の場で抗がん剤治療や造血幹細胞移植後に起因するボトルネック効果とその後の再発・治療抵抗性を獲得する臨床経過を単純化したモデルである。我々はこれまでに、AML を対象に網羅的なゲノム解析を極めて多数例において解析して成果を上げており、その際に培った解析技術を活用し、連続移植により再発期間が短縮した前後の検体を、網羅的にシーケンス解析することにより、再発・治療不応性の原因遺伝子を同定する。再発前後のマウスから白血病細胞を採取し、全エクソームシーケンスにより解析する。その結果、検出される体細胞変異を、初発時と再発後のマウス白血病において比較する。抽出された体細胞変異を、新規候補標的として、すでに共同研究施設において確立されているゲノムワイドの CRISPR/CAS9 マウスモデルの系により、標的遺伝子がノックアウトした結果そのガイド RNA が検出されなくなることを利用して、その作用を検証する。その結果得られた新規治療標的分子の候補に関して、100 例以上のヒトの MLL キメラ遺伝子陽性 AML において検討し、ゲノム異常あるいはトランスクリプトームの異常を来す可能性を、標的シーケンス、発現アレイ、RNA シーケンスにより検討する。ヒト AML 細胞にて同様の変異を示す遺伝子、あるいは発現の異常を認めた遺伝子に関しては、これまで我々が報告してきた様々なゲノム異常の解析手法を用いて機能解析を行う。

【結 果】

代表的な AML のマウスモデルである MLL/AF9 融合遺伝子を強制発現したマウス幹細胞を連続移植することにより、白血病発症期間が短縮するモデルを確立した。全エクソームシーケンスを、胚細胞コントロールとペアで 42 匹に関して行い、RAS パスウェイの変異を含む、新規 GNB2 遺伝子に変異を認めた。特に、PTPN11 変異、BRAF 変異はヒト白血病と全く同一のアミノ酸に変異を認めた。さらには、GNB2 変異を持つ AML クローンは連続移植による白血病再発までの期間短縮に有意な関連を示し、そのクローンサイズも有意に拡大した。新規 GNB2 に関しては強制発現により腫瘍増殖能の有意な増加、生存期間の有意な短縮と関連し、ノックアウトによりその効果は減弱し、再発 AML における不良な予後の原因となっている可能性が考えられた。また、機能解析により GNB2 変異は下流の ERK/AKT パスウェイの活性化を起こしていた。

【考 察】

MLL/AF9 融合遺伝子陽性 AML のマウス連続移植において全コーディング領域を網羅的に解析した結果、ヒト白血病と同一の変異および新規 GNB2 変異を認めた。これらは、白血病再発までの期間短縮と不良な予後と関連していた。これらの分子は、新規治療ターゲットの候補である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

難治性の AML の再発例において、RAS パスウェイの遺伝子が重要であることは、これらの遺伝子異常をバイオマーカーとして再発を予測可能であることを示唆している。また、新規 GNB2 遺伝子異常は、下流のパスウェイと共に、有望な新規治療ターゲット候補である。

【参考・引用文献】

以上の結果は、アメリカ血液学会、ヨーロッパ血液学会にて講演し、以下の論文に発表した。
Molecular pathogenesis of disease progression in MLL-rearranged AML. Kotani S, Yoda A, Kon A, Kataoka K, Ochi Y, Shiozawa Y, Hirsch C, Takeda J, Ueno H, Yoshizato T, Yoshida K, Nakagawa MM, Nannya Y, Kakiuchi N, Yamauchi T, Aoki K, Shiraishi Y, Miyano S, Maeda T, Maciejewski JP, Takaori-Kondo A, Ogawa S, **Makishima H**. *Leukemia*. 33(3):612-624 2019.