

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15384

研究課題名(和文) ダウン症のTAMにおける白血病発症高リスク群の画期的同定法の開発

研究課題名(英文) Development of an epoch-making method for identification of Down syndrome patients with TAM who will subsequently develop acute megakaryoblastic leukemia

研究代表者

伊藤 悦朗 (Ito, Etsuro)

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号：20168339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、DS-AMKLに進展するTAM患者を正確に同定する画期的な方法を開発し、白血病予防法を開発するための基礎を築くことである。本研究により、以下の成果が得られた。全てのTAMとDS-AMKLの患者はGATA1変異を有している。GATA1変異を用いてTAM寛解期における微小残存病変の検出をするために、次世代シーケンサーを用いて0.02%の感度で変異の検出する方法を開発した。次に、40例のDS-AMKLとその寛解期の細胞を用いて全エクソンシーケンスを行い、MRD解析のマーカーとなる新規原因遺伝子を数個見出した。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study is to develop an epoch-making method for identification of Down syndrome patients with transient abnormal myelopoiesis (TAM) who will subsequently develop acute megakaryoblastic leukemia (DS-AMKL) and establish the base for developing the prophylaxis for DS-AMKL. The results of this study are as follows. All patients with TAM and DS-AMKL have GATA1 mutations. To detect minimal residual diseases (MRD) of TAM, we developed highly sensitive methods to detect GATA1 mutations (sensitivity 0.02%) using target next-generation sequencing. We next performed whole exome sequencing of 40 sets of samples from DS-AMKL patients at diagnosis of AMKL and remission phases, and identified several novel mutational targets, which will be useful as MRD markers.

研究分野：小児血液学

キーワード：TAM Down症候群 急性巨核芽球性白血病 GATA1

1. 研究開始当初の背景

ダウン症 (21 トリソミー) は白血病のリスクが高く、5~10%の新生児はTAMと呼ばれる前白血病を発症し、その20%は生後4歳までに真の白血病 (DS-AMKL) へ進展する。これまでに、申請者らは、大部分のTAMとDS-AMKLに赤血球・巨核球系転写因子GATA1の遺伝子変異が生じていることを見出した (Blood 2003)。さらに、最近我々は、GATA1変異を持つTAM細胞にコヒーシン複合体/CTCF、EZH2などのエピゲノム制御因子、およびシグナル伝達系分子をコードする遺伝子群に高頻度の変異が生じていることを発見した (Nature Genetics 2013)。DS-AMKLを発症するTAM症例は、最初からコヒーシンなどの遺伝子異常を持つマイナークローンが存在するか、あるいは、TAM細胞が長期間生き残った場合に付加的な遺伝子変異を獲得するかのいずれかの可能性が示唆される。しかし、どのTAMの症例がDS-AMKLに進展するかを正確に予測する方法はない。

DS-AMKLは、化学療法によく反応し、ダウン症と関連のない急性骨髄性白血病に比べて治療成績も良好である。最近の報告では、80%以上の5年無病生存率が得られている (JCO 2007)。しかし、副作用の強い化学療法を行うため、長期の入院が必要で患者と家族の負担は大きい。また、再発例では造血幹細胞移植を行っても救済されず、予後不良であることが問題になっている (Blood 2012)。前白血病の段階であるTAMクローンを根絶することができれば、DS-AMKLの発症を予防できると考えられる。しかし、TAMのほとんどは自然寛解し、80%は無治療で治癒する。従って、白血病発症の予防を目的とした治療法の開発のためには、不必要な治療を避けるために白血病に進展する症例を正確に同定することが必要である。以上の学術的背景から、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、DS-AMKLに進展するTAMの患者を正確に同定する画期的な方法を開発し、白血病予防法を開発するための基礎を築くことである。具体的には以下の2点の目的に焦点を絞って研究を行う。

1) 次世代シーケンサーを用いて、GATA1変異を指標にした微小残存病変 (MRD) 解析法を開発し、多数の症例を解析する。GATA1変異は大変理想的な分子マーカーとなるが、極めて変異が多様であるため、通常の定量的PCRを用いた方法ではMRD解析は難しい。

2) 次世代シーケンサーでディープシーケンスを行い、コヒーシン遺伝子など変異を持つマイナークローンを検索する。

3. 研究の方法

本研究では、DS-AMKLに進展するTAMの患者を正確に同定する画期的な方法を開発するために、以下の2点に焦点を絞って研究を行う。

1) GATA1変異を用いた微小残存病変の検出：寛解後の患者末梢血よりゲノムDNAを抽出し、それを鋳型にGATA1遺伝子の一部を増幅する。増幅産物のうち第二エクソン部分を、次世代シーケンサーを用いて100,000以上のカバレッジで検索し0.02%の感度で変異の検出する方法を開発する。

2) コヒーシンなどのDS-AMKL関連遺伝子変異の検出：DS-AMKLに進展したTAMの検体および微小残存病変が検出されたサンプルを用いて、DS-AMKL関連遺伝子 (RAD21, STAG2, NIPBL, CTCF, JAK3, JAK2など) のターゲットシーケンスを行い、DS-AMKLクローンの早期検出を試みる。

我々が10年以上かけて収集したTAMおよびDS-AMKLの世界有数の検体バンクを用いて、GATA1変異を指標とした微小残存病変やDS-AMKL関連遺伝子の変異検出がDS-AMKLに進展するTAM症例を同定するのに有用かどうかを検証する。

4. 研究成果

ダウン症は白血病のリスクが高く、5~10%の新生児はTAMと呼ばれる前白血病を発症し、その20%は生後4歳までに真の白血病 (DS-AMKL) へ進展する。最近我々は、GATA1変異を持つTAM細胞にコヒーシン複合体/CTCF、EZH2などをコードする遺伝子群に高頻度に変異が生じていることを発見した。本研究の目的は、DS-AMKLに進展するTAM患者を正確に同定する画期的な方法を開発し、白血病予防法を開発するための基礎を築くことである。本研究により、以下の成果が得られた。

GATA1変異を用いた微小残存病変の検出：寛解後の患者末梢血よりゲノムDNAを抽出し、それを鋳型にGATA1遺伝子の一部を増幅し、増幅産物のうち第二エクソン部分を、次世代シーケンサーを用いて100,000以上のカバレッジで検索し0.02%の感度で変異の検出する方法を開発した。さらに高感度なエラーコレクティド・シーケンス法を用いて、 10^{-4} ~ 10^{-5} の感度でMRDを検出できる方法の開発を進めた。

JPLSGのTAMの前方視的観察研究 (TAM-10)では、すでに160名以上のTAM症例を蓄積されている。表面マーカーによるMRDを検索した残余検体入手し、GATA1MRDの解析を試みた。しかし、残念ながら多くの症例の診断後1ヶ月と3ヶ月の末梢血は保存されていなかった。このため、今回

開発した方法が、使用可能かどうかを確認するために、DS-AMKL の MRD 用検体について次世代シーケンサーを用いて解析した。その結果、多くの症例で 0.02% の感度で GATA1 変異クローンを検出することが可能であることが明らかになった。

コヒーシンなどの DS-AMKL 関連遺伝子変異の検出：AMKL を発症する症例では、既に TAM 診断時検体に GATA1 以外の DS-AMKL 特異的遺伝子変異を有するマイナークローンが存在する可能性がある。TAM 寛解後に DS-AMKL を発症した 8 症例の AMKL を含む 40 例の AMKL とその寛解期の細胞を用いて全エクソンシーケンスを行い、MRD 解析のマーカーとなる新規原因遺伝子を数個見出した。また、TAM から DS-AMKL に進展した 1 症例の全ゲノムシーケンスを行い、CTCF の欠失部位の塩基配列を確定した。その情報をもとに、TAM 発症時の微少残存腫瘍の存在を Droplet Digital PCR 法で解析し、TAM の時期に既に CTCF 欠失陽性細胞が約 0.1% 存在していることが明らかになった。

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(以下全て査読有)](計 28 件)

1. Matsuo H, Shiga S, Imai T, Kamikubo Y, Toki T, Terui K, Ito E, Adachi S. Purification of leukemic blast cells from blood smears using laser microdissection. **Int J Hematol**. 2017. [Epub ahead of print]
2. 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(6):1228-1241.
3. 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;63:248-254.

4. 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; 62:2021-2024.
5. 伊藤悦朗, 土岐力, 照井君典. Down 症候群 . 白血病学 (上) 最新の基礎・臨床研究 . **日本臨床増刊号** 2016;74: 97-102.
6. 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: 953-956.
7. 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: 1533-1540.
8. 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; 72:737-742.
9. 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.
10. 野村優子, 宮内潤, 太田栄治, 柳井文男, 宮下俊之, 照井君典, 伊藤悦朗, 廣瀬伸一. 2 カ月後に芽球が再増加した一過性骨髄異常増殖症の超早産児例 . **日本小児血液・がん学会雑誌** 2015;52:36-39.

[学会発表](計 9 件)

1. 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 (GATA1 mutation status in infants with transient abnormal myelopoiesis: A report from the JPLSG TAM-10 study). **第 58 回日本小児血液・がん学会学術集会** (2016 年 12 月 15 日, 品川プリンスホテル/東京都).
2. Kubota Y, Uryu K, Kawai T, Ito T, Hanada I, Toki T, Seki M, Yoshida K, Sato Y, Shiraiishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S,

- Oka A, Hayashi Y, Ogawa S, Terui K, Sato A, Hata K, Ito E, Takita J. DNA methylation analysis in acute lymphoblastic leukemia of Down syndrome. **第 58 回日本小児血液・がん学会学術集会** (2016 年 12 月 15 日, 品川プリンスホテル / 東京都) .
3. Kanezaki R, Toki T, Terui K, Sasaki S, Kudo K, Kamio T, Sato T, Ikeda F, Ito E . Dysegregation of *KIT* expression by GATA1s in TAM and acute megakaryoblastic leukemia in Down syndrome. **第 78 回日本血液学会学術集会**(2016 年 10 月 15 日, パシフィコ横浜 / 神奈川県・横浜市) .
 4. Kubota Y, Uryu K, Kawai T, Ito T, Hanada I, Toki T, Seki M, Yoshida K, Sato Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Oka A, Hayashi Y, Ogawa S, Terui K, Sato A, Hata K, Ito E, Takita J. Gene expression profiles and methylation analysis in Down syndrome related acute lymphoblastic leukemia. **58th Annual Meeting & Exposition** (2016 年 12 月 3-6 日, 米国・サンディエゴ) .
 5. Terui K, Toki T, Hama A, Muramatsu H, Hasegawa D, Park MJ, Iwamoto S, Taga T, Yanagisawa R, Koh K, M. Saito A, Horibe K, Hayashi Y, Adachi S, Mizutani S, Watanabe K, 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 Annual Meeting & Exposition**(2016 年 12 月 3-6 日, 米国・サンディエゴ) .
 6. Ito E, Yoshida K, Toki T, Saida S, Watanabe K, Nakamura M, Terui K, Nakahata T, Miyano S, Watanabe A, Ogawa S. Genetic and Epigenetic Alterations in Acute Megakaryoblastic Leukemia in Down Syndrome. **Fifth JCA- AACR Special Joint Conference -The Latest Advances in Hematological Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics**(招待講演) (2016 年 7 月 15 日, 東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート / 千葉県・舞浜市) .
 7. 伊藤悦朗 .TAM の最新情報(教育講演) . **第 60 回日本新生児生育医学会** (2015 年 10 月 22-23 日, 盛岡地域交流センター「マリオス / 岩手県・盛岡市) .
 8. Muramatsu H, Watanabe T, Hasegawa D, Park M, Iwamoto S, Taga T, Ito E, Toki T, Terui K, Yanagisawa R, Koh K, Saito A, 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. **第 57 回アメリカ血液学会**(2015 年 12 月 8-11 日, 米国・オーランド) .
 9. Saida S, Nakamura M, Toki T, Arai Y, Terui K, Yoshida Y, Ogawa S, Nakahata T, Heike T, Watanabe K, Watanabe A, Ito E. DNA methylation state correlates with progression of myeloid leukemia in Down syndrome. **第 57 回アメリカ血液学会** (2015 年 12 月 8-11 日, 米国・オーランド) .
- 〔図書〕(計 2 件)
1. 伊藤悦朗 .ダウン症候群における造血器腫瘍と遺伝子突然変異 . 血液腫瘍アトラス (第 5 版) .日本医事新報社 234-240 ,2016 .
 2. 伊藤悦朗 . Down 症候群に伴う血液腫瘍性疾患 . 小児血液・腫瘍学 (日本小児血液・がん学会編集) . 診断と治療社 , 492-495 , 2015 .
- 〔産業財産権〕
- 出願状況 (計 0 件)
- 名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 出願年月日 :
 国内外の別 :
- 取得状況 (計 0 件)
- 名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 取得年月日 :
 国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤悦朗 (ITO, Etsuro)
弘前大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：20168339

(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

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

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし