

令和 2 年 5 月 2 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04234

研究課題名(和文) 非典型小児白血病を対象とした体細胞変異と生殖細胞系列変異の統合解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of somatic and germline genomic alterations for atypical leukemia in children

研究代表者

加藤 元博 (Kato, Motohiro)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・小児血液・腫瘍研究部・診療部長

研究者番号：40708690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、小児白血病の中で非典型的な経過をとる"outlier"に焦点を絞ってゲノム解析を行い、"outlier"たる背景を明らかにすることである。
主な成果として、典型的な転座を持たない急性前骨髄球性白血病の白血病細胞から、RARB遺伝子の異常がその病態に關与していることを見出した。また、白血病治療に用いるメルカプトプリンに対する感受性を精密に予測するために、NUDT15遺伝子の詳細な多型解析が有用であることを確認した。
非典型的な臨床像や治療経過を取る白血病の病態を理解するために、ゲノム特性を把握することが有用であることが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非典型的な経過を取る小児白血病の病態には、それぞれ特有のゲノム異常が強くかかわっていることが確認された。ゲノム解析は標準的な検査では病態が把握できない、もしくは通常の臨床経過と異なる非典型例の病態を理解することにつながり、白血病の診療にあたってゲノム診断を実施することの重要性を検証する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this project is to investigate underlying mechanism of clinical "outlier" among pediatric leukemia, using detailed genomic analysis.
As major findings of this project, we identified a novel fusion of RARB in acute promyelocytic leukemia which lacked typical translocation, and confirmed the pathogenic role for leukemogenesis.
We also established a precise genotyping method of NUDT15 variants conferring sensitivity to mercaptopurine, a one of the key drugs for acute lymphoblastic leukemia.
Through these findings, we confirmed an importance of genomic analysis to understand clinical outlier.

研究分野：小児白血病、ゲノム解析

キーワード：癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 小児白血病に対する治療の現状と課題

この数十年で小児白血病の治療成績は向上したが、その治療にはまだ改善の余地がある。依然として、白血病に罹患した小児の最大の死亡要因はやはり再発であり、再発率をさらに低下させることは小児白血病治療における継続的な課題である。一方で、化学療法による合併症は生活の質の低下を招くだけでなく、時に重篤な合併症により生命の危機に瀕することもある。小児白血病の治療開発戦略として、再発率の低下と合併症の抑制を同時に達成するためには、残された「非典型例」に対する病態の理解を深めることが必要である。

(2) 小児白血病のゲノム解析

近年のゲノム解析技術の進歩に伴い、悪性腫瘍の発症に関わるゲノム異常をとらえることで病態を理解する研究が広く行われている。このような研究の成果により悪性腫瘍の発症や進展の背景にある分子病態についての理解が深まり、疾患の分子病態特性に基づいた診断法や治療骨格の最適化にむけた取り組みにつながっている。

さらに、小児白血病を中心とした小児がんにおいて、患者本人の正常細胞、すなわち生殖細胞系列のゲノム配列 (= ホスト細胞のゲノム) が、その発症や臨床経過に深くかかわっていることが報告されるようになった。生殖細胞系列の一塩基多型と白血病の発症との関連が示されたことや、生殖細胞系列の遺伝的異常を背景とした白血病の発症例が報告されたことはその代表的な例である。

2. 研究の目的

本研究では、非典型的な病型や経過をとった臨床的な "outlier" の小児白血病症例に重点を置き、「白血病細胞のゲノム病態 (= 腫瘍細胞のゲノム) の解析」だけでなく、「生殖細胞系列のゲノム病態 (= ホスト細胞のゲノム) の解析」とあわせた統合的な検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 「非典型的な白血病」のゲノム解析

本研究では、「病型や臨床経過が非典型的」な小児白血病の病態解明を目指し、全ゲノム/ゼンエクソーム/全トランスクリプトーム解析を行う。

さらに、患者の寛解期検体などを用い、生殖細胞系列のゲノム解析を合わせて行うことで、病態や治療感受性の背景にあるゲノム情報を収集する。

(2) 検出された遺伝子異常の意義の確認

非典型例のゲノム解析を通じて特定されたゲノム異常について、非典型的な臨床像を持たない一般的な (unselected な) 白血病患者のゲノム特性と比較を行い、臨床像との関連を探索し頻度の点から意義を確認する。

さらに、ゲノム異常については細胞に導入することで形質転換の有無などを評価することで機能的な確認を行い、その意義を検証する。

4. 研究成果

(1) 非典型的な急性前骨髄球性白血病における RARβ 転座

急性前骨髄球性白血病は PML-RARA に代表される RARA 遺伝子の転座を伴うことが特徴であるが、稀に RARA 転座を伴わない非典型例が経験される。この「RARA 転座陰性の急性前骨髄球性白血病」は標準治療の全トランスレチノイン酸などが無効である臨床的特徴を持つ。RARA 転座を持たない急性前骨髄球性白血病の 5 例について詳細なゲノム解析を行い、新規の融合遺伝子である TBL1XR1-RARβ を 4 例で特定した (図 1)。

この TBL1XR1-RARβ を細胞に導入したところ、PML-RARA と同様にホモダイマーを形成することでレチノイン酸経路を dominant negative に抑制し、細胞の分化を抑制し白血病化に寄与していることが確認できた。また、この分化阻害がレチノイン酸で解除されないことが確認され、臨床的な特定とも一致がみられた¹。

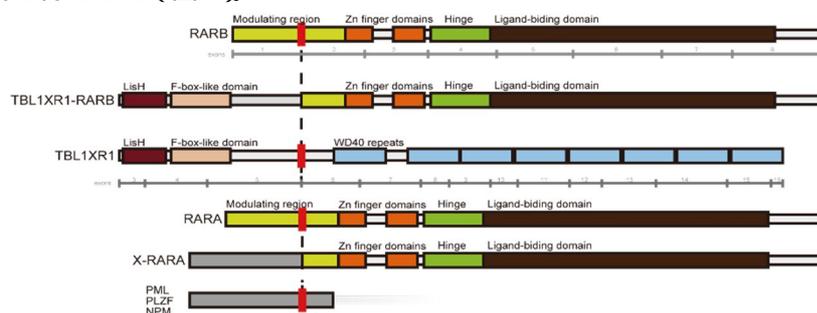


図 1. 非典型的な急性前骨髄球性白血病から特定された TBL1XR1-RARβ 融合遺伝子の構造

この成果は、レチノイン酸経路の異常が急性前骨髄球性白血病において重要であることを確認するとともに、このような非典型的な急性前骨髄球性白血病に対して層別化因子として治療に有用であるだけでなく、有効な薬剤の開発につながることを期待される。

(2) 6MP に高感受性をもたらす NUDT15 遺伝子多型の正確な diplotype 法の確率

急性リンパ性白血病の治療に必須の薬剤である 6-メルカプトプリン(6-MP)は、その感受性に個人差があること、またその感受性が人種によっても異なることが経験的に知られていた。先行研究で NUDT15 遺伝子の多型が 6-MP の感受性に差異をもたらすことが特定されいたが、複数の多型があることから、感受性を正確に予測するためには多型の haplotype に分けた構成、すなわち diplotype の把握が必要であった。

本研究では、droplet digital PCR の技術を活用し、微細な droplet の中で多型特異的なプローブを利用した PCR を実施することで、haplotype を区別可能な解析系を確立した。実際に、138 人の急性リンパ性白血病患者で NUDT15 多型の diplotype を把握した結果、6-MP の耐用量と密接に関連していることが確認できた(図2)²。

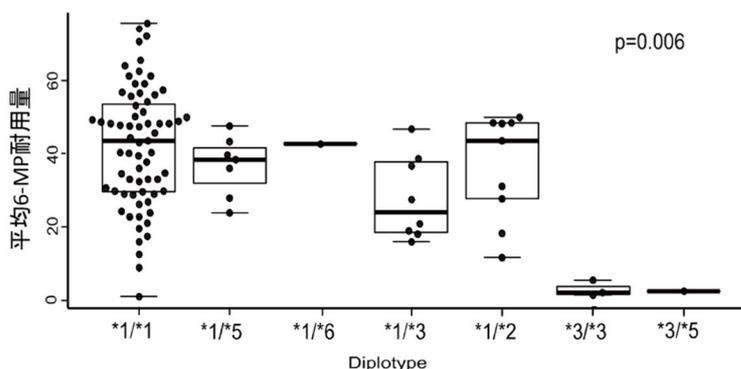


図2. NUDT15多型のdiplotypeと6-MP耐用量の関連

NUDT15 多型に基づく 6-MP の用量設定の重要性を確認する成果であり、これらの研究を積み重ねた結果、NUDT15 多型解析な 2019 年 2 月に本邦で保険適用となり診療に実装された。

(3) 既存の転座が確認されない急性白血病のゲノム解析

白血病の治療において、転座を中心とした融合遺伝子を検出することは、病型診断を行うだけでなく予後予測にも有用であり、診療においてゲノム検査が標準的に実施されている。

本研究では、既存の転座が検出されなかった急性白血病の白血病細胞を全ゲノム解析・全トランスクリプトーム解析をすることで、KMT2A-ACTN2 融合遺伝子など新規のものや、TBL1XR1-RARA 融合遺伝子、KMT2A-USP2 融合遺伝子、NUP214-ABL1 融合遺伝子など、これまで稀にしか報告されていないものがその背景にあることを確認した³⁻⁶。

特に本研究を通じて特定した TBL1XR1-RARA 融合遺伝子は、ゲノム上の RARA 遺伝子をコードしているわずかな領域が TBL1XR1 領域に挿入されることで生じており、核型分析などでは検出が困難なゲノム異常であった。このように、病態の把握のためには詳細なゲノム解析が有用であることが確認できた。

<引用文献>

1. Osumi T, Tsujimoto SI, Tamura M, et al. Recurrent RARB Translocations in Acute Promyelocytic Leukemia Lacking RARA Translocation. *Cancer research* 2018; 78(16): 4452-8.
2. Tsujimoto S, Osumi T, Uchiyama M, et al. Diplotype analysis of NUDT15 variants and 6-mercaptopurine sensitivity in pediatric lymphoid neoplasms. *Leukemia* 2018; 32(12): 2710-4.
3. Yoshida M, Nakabayashi K, Ogata-Kawata H, et al. A novel KMT2A-ACTN2 fusion in infant B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2019; 66(8): e27821.
4. Osumi T, Watanabe A, Okamura K, et al. Acute promyelocytic leukemia with a cryptic insertion of RARA into TBL1XR1. *Genes, chromosomes & cancer* 2019; 58(11): 820-3.
5. Ikeda J, Shiba N, Tsujimoto SI, et al. Whole transcriptome sequencing reveals a KMT2A-USP2 fusion in infant acute myeloid leukemia. *Genes, chromosomes & cancer* 2019; 58(9): 669-72.
6. Tsujimoto SI, Nakano Y, Osumi T, et al. A Cryptic NUP214-ABL1 Fusion in B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2018; 40(6): e397-e9.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Osumi T, Tsujimoto SI, Tamura M, et al.	4. 巻 78
2. 論文標題 RecurrentRARBTranslocations in Acute Promyelocytic Leukemia LackingRARATranslocation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 4452 ~ 4458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-18-0840	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsujimoto S, Osumi T, Uchiyama M, Shirai R, Moriyama T, Nishii R, Yamada Y, Kudo K, Sekiguchi M, Arakawa Y, Yoshida M, Uchiyama T, Terui K, Ito S, Koh K, Takita J, Ito E, Tomizawa D, Manabe A, Kiyokawa N, Yang JJ, Kato M.	4. 巻 32
2. 論文標題 DiploTYPE analysis of NUDT15 variants and 6-mercaptopurine sensitivity in pediatric lymphoid neoplasms	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 2710 ~ 2714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-018-0190-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ikeda Junji, Shiba Norio, Tsujimoto Shin ichi, Yoshida Masanori, Nakabayashi Kazuhiko, Ogata Kawata Hiroko, Okamura Kohji, Takeuchi Masanobu, Osumi Tomoo, Tomizawa Daisuke, Hata Kenichiro, Kiyokawa Nobutaka, Ito Shuichi, Kato Motohiro	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Whole transcriptome sequencing reveals a KMT2A USP2 fusion in infant acute myeloid leukemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes, Chromosomes and Cancer	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/gcc.22751	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Seki M et al.	4. 巻 49
2. 論文標題 Recurrent SPI1 (PU.1) fusions in high-risk pediatric T cell acute lymphoblastic leukemia	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Genetics	6. 最初と最後の頁 1274 ~ 1281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/ng.3900	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsujiimoto Shin-ichi, Nakano Yoshiko, Osumi Tomoo, Okada Keiko, Ouchi-Uchiyama Meri, Kataoka Keisuke, Fujii Yoichi, Ohki Kentaro, Seki Masafumi, Tamagawa Nobuyoshi, Takita Junko, Ogawa Seishi, Kiyokawa Nobutaka, Hara Junichi, Kato Motohiro	4. 巻 na
2. 論文標題 A Cryptic NUP214-ABL1 Fusion in B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Hematology/Oncology	6. 最初と最後の頁 1~1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPH.0000000000001007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Osumi Tomoo, Kato Motohiro, Ouchi-Uchiyama Meri, Tomizawa Daisuke, Kataoka Keisuke, Fujii Yoichi, Seki Masafumi, Takita Junko, Ogawa Seishi, Uchiyama Toru, Ohki Kentaro, Kiyokawa Nobutaka	4. 巻 64
2. 論文標題 Blastic transformation of juvenile myelomonocytic leukemia caused by the copy number gain of oncogenic KRAS	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pediatric Blood & Cancer	6. 最初と最後の頁 e26496 ~ e26496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pbc.26496	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Osumi Tomoo, Tsujimoto Shin-ichi, Nakabayashi Kazuhiko, Taniguchi Maki, Shirai Ryota, Yoshida Masanori, Uchiyama Toru, Nagasawa Junko, Goyama Susumu, Yoshioka Takako, Tomizawa Daisuke, Kurokawa Mineo, Matsubara Yoichi, Kiyokawa Nobutaka, Matsumoto Kimikazu, Hata Kenichiro, Kato Motohiro	4. 巻 65
2. 論文標題 Somatic MECOM mosaicism in a patient with congenital bone marrow failure without a radial abnormality	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatric Blood & Cancer	6. 最初と最後の頁 e26959 ~ e26959
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pbc.26959	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yoshida M et al.
2. 発表標題 Germline Genetic Predisposition to Secondary Malignant Neoplasms in Children
3. 学会等名 The 50th Congress of International Society of Pediatric Oncology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kato M et al.
2. 発表標題 RARB translocations in acute promyelocytic leukemia without RARA translocation.
3. 学会等名 The 59th Annual meeting of the American Society of Hematology (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 新規なポリヌクレオチド及びその利用	発明者 加藤元博	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-211205	取得年 2017年	国内・外国の別 国内

〔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
研究分担者	中林 一彦 (Nakabayashi Kazuhiko) (10415557)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・周産期病態研究部・室長 (82612)	
研究分担者	内山 徹 (Uchiyama Toru) (10436107)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・成育遺伝研究部・室長 (82612)	