

令和元年6月7日現在

機関番号：12301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06554

研究課題名(和文) 乳幼児の急性骨髄性白血病における分子生物学異常の解析及び新たな治療戦略の構築

研究課題名(英文) Analysis of molecular abnormalities and development of risk-stratified therapy in infants with acute myeloid leukemia

研究代表者

原 勇介 (Hara, Yusuke)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20806434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では小児急性骨髄性白血病(AML)のうち乳幼児に特化した遺伝子異常の同定やリスク層別化治療の構築を目的とした。AML-05研究に参加した症例の検体を使用した。既知の遺伝子異常においては、融合遺伝子のCBFA2T3-GLIS2やNUP98-KDM5Aが予後不良因子であった。各年齢層で高頻度に検出される融合遺伝子であるKMT2A遺伝子再構成やCBFB-MYH11は乳児と年長児で予後に違いがあった。有意な遺伝子異常が検出されなかった症例は次世代シーケンサーによる解析を行い、これまで報告のない遺伝子異常が複数検出された。今後、乳幼児AMLのより精密なリスク層別化治療が構築されることが望まれた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児の急性骨髄性白血病(AML)の治療成績は60%程度であり、治療成績の改善が望まれている。また、小児AMLの中でも各年齢でその特徴や治療成績は異なり、各年齢層の特徴に応じた治療の強化や減弱を行うことで、より治療成績は改善すると予測される。本研究では特に乳幼児例に主眼を置いて詳細な遺伝子解析及び臨床的意義の解析を行った。一部の遺伝子異常は乳幼児と年長児で異なる予後を辿ることが判明し、年齢を考慮せずに小児AMLを画一的に治療することは、症例によっては治療強度を誤ってしまう可能性が示された。また、新規の遺伝子異常を多数発見したため、治療に応用できるよう今後より詳細な解析を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to identify genetic abnormalities specific to infant acute myeloid leukemia (AML), and to make more appropriate risk-stratified therapy for this disease. We analyzed clinical samples obtained from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group AML-05 trial. We found CBFA2T3-GLIS2 and NUP98-KDM5A fusion genes as poor prognostic markers. Whereas, the prognosis of KMT2A-rearrangement and CBFB-MYH11 fusion genes, which are found in all age-groups of pediatric AML, were different between infants and older pediatric patients. Moreover, we performed next generation sequencing using clinical samples of patients lacking well-known genetic prognostic markers, and identified various novel genetic abnormalities. These findings will contribute to make the refined risk-stratified therapy for infant AML.

研究分野：小児白血病

キーワード：小児急性骨髄性白血病 遺伝子解析 リスク層別化治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 急性骨髄性白血病(acute myeloid leukemia; AML)は本邦では年間 100 例程度発症する比較的稀な疾患である。AML は多くの場合は多施設共同研究による臨床試験として治療が行われているが、その長期予後は 60%程度といまだ十分ではなく標準治療は確立されていない。現行の臨床試験では、臨床的意義が確立されている分子生物学的異常や初期治療反応性を元にリスク層別化が行われる。低リスク群、高リスク群、及び中間リスク群(低リスク群・高リスク群に含まれない群)の 3 群に層別化され、長期予後はそれぞれ 90%、50%、60%程度であり、強力な治療を持ってしても未だに救命が困難な集団が存在する。しかし次世代シーケンサー(next generation sequencing; NGS)の登場によって既存の検査手法では同定不可能であった新規の分子生物学的異常が多数同定され、その臨床的意義の検討や分子標的薬の創薬が進められており、これまで治療が困難であった症例においても徐々に予後が改善しつつある。

(2) 小児 AML は乳幼児期に発症することが比較的多く、小児 AML のうち約 1/3 が乳幼児期発症である。乳幼児の AML は年長児の AML と同様の治療が行われているが、年長児と比べ治療関連有害事象や治療関連死亡が多いことが知られる。また、多くの乳幼児では確立された分子生物学的予後因子が検出されず、特徴的な分子生物学的背景があると予想される。

2. 研究の目的

乳幼児の AML における網羅的な分子生物学的異常の解析を行い、より精密なリスク層別化治療の構築及び治療成績の向上に寄与する。

3. 研究の方法

(1) PCR、RT-PCR、MLPA 法により同定した遺伝子異常の臨床的意義の検討

JPLSG AML-05 プロトコルで治療された小児 AML 患者 443 例のうち臨床検体及び臨床情報が得られた 369 例(4歳以下の症例 133 例及び 5 歳以上の症例 236 例)について PCR、RT-PCR、及び MLPA 法を用いて、13 種類の融合遺伝子解析(*CBFA2T3-GLIS2*、*NUP98-KDM5A*、*KMT2A-MLLT1*、*KMT2A-MLLT3*、*KMT2A-MLLT4*、*KMT2A-MLLT10*、*KMT2A-ELL*、*RBM15-MKL1*、*RUNX1-RUNX1T1*、*CBFB-MYH11*、*NUP98-NSD1*、*FUS-ERG*、*DEK-NUP214*)、及び 11 種類の遺伝子変異解析(*FLT3-ITD*、*NRAS*、*KRAS*、*KIT*、*WT1*、*NPM1*、*CEBP α* 、*CSF3R*、*KMT2A-PTD*、*ASXL1*、*ASXL2*)を行った。

(2) 次世代シーケンサーによる解析

次世代シーケンサーは大量の DNA 塩基配列情報の高速な解読を可能とし、近年の遺伝子解析において中心的な役割を果たしている解析手法である。本研究では RNA sequence を中心とした解析を行う。RNA sequence は特に小児 AML 等の融合遺伝子が発症の主因となる疾患において重要な研究手法である。既知の融合遺伝子や遺伝子変異が同定されなかった症例において新規の遺伝子異常の探索を行った。

4. 研究成果

(1) 4 歳以下の AML における既知の分子生物学的異常の分布

4 歳以下の症例 133 例において、*KMT2A-rearrangements (KMT2A-R)* (23%)、*RUNX1-RUNX1T1* (14%)、*CBFB-MYH11* (10%)、*CBFA2T3-GLIS2* (8%)を高頻度で認めた。一方で年長児で多く検出される *NUP98-NSD1* や *DEK-NUP214* は 1 例もなかった。*KMT2A-R* と *CBFA2T3-GLIS2* は 0~1 歳でより高頻度であり、一方で *RUNX1-RUNX1T1* は年齢が上がるにつれて頻度が上昇した。遺伝子変異としては *KIT* と *NRAS* が高頻度であった。31 例中 21 例(68%)の core-binding factor AML (CBF-AML: *RUNX1-RUNX1T1* もしくは *CBFB-MYH11* が陽性)例は併存する遺伝子変異を有していたが、non-CBF-AML 症例は 51 例中 43 例(84%)が併存する遺伝子変異を持たなかった。

(2) 乳幼児例(3 歳未満)と年長児例(3 歳以上 18 歳未満)の特徴の比較

次に年齢による融合遺伝子の頻度に注目し、分子生物学的に類似した集団の探索を行った。31 例中 28 例(90%)の *KMT2A-R* 陽性例は 3 歳未満であり、またこの年齢には全ての *CBFA2T3-GLIS2* 陽性例が含まれていた。逆に 18 例中 17 例(94%)の *RUNX1-RUNX1T1* 陽性例は 3 歳以上であった。以上から 3 歳未満と 3 歳以上 AML には異なる分子生物学的特徴があると考えられ、以降は 3 歳未満の症例(n=99)を乳幼児 AML と定義し追加解析を行い、またその集団の特徴を年長児と比較することとした。

乳幼児 AML(3 歳未満、n=99)と年長児 AML(3 歳以上 18 歳未満、n=270)の特徴を比較した(表 1)。*KMT2A-R*、*CBFA2T3-GLIS2*、及び *NUP98-KDM5A* は乳幼児において有意に高頻度であり、*RUNX1-RUNX1T1* と *NUP98-NSD1* は年長児において高頻度であった。遺伝子変異は年長児例では *KIT*、*WT1*、*KMT2A-PTD* を高頻度に認めた。

表1. 乳幼児と年長児のAMLにおける分子生物学的特徴の比較

Year of age	<3	3 to <18	p
Total number of patients	99	270	
Fusion gene, n (%)*			
<i>KMT2A</i> -rearrangements**	28 (28.3)	27 (10.0)	< 0.001
- <i>MLL73</i>	15 (15.2)	15 (5.6)	0.005
- <i>MLL10</i>	4 (4.0)	2 (0.7)	0.047
- <i>ELL</i>	2 (2.0)	3 (1.1)	0.614
- <i>MLL1</i>	1 (1.0)	1 (0.4)	0.465
- <i>MLL74</i>	2 (2.0)	1 (0.4)	0.177
-Others	4 (4.0)	5 (1.9)	0.257
<i>CBFA2T3-GLIS2</i>	11 (11.1)	0	< 0.001
<i>CBFB-MYH11</i>	10 (10.1)	21 (7.8)	0.526
<i>NUP98-KDM5A</i>	5 (5.1)	1 (0.4)	0.006
<i>RBM15-MKL1</i>	2 (2.0)	0	0.071
<i>RUNX1-RUNX1T1</i>	1 (1.0)	105 (38.9)	< 0.001
<i>FUS-ERG</i>	1 (1.0)	4 (1.5)	1.000
<i>DEK-NUP214</i>	0	3 (1.1)	0.567
<i>NUP98-NSD1</i>	0	11 (4.1)	0.041
Gene mutation, n (%)***			
<i>FLT3</i> -ITD	8 (8.1)	39 (14.4)	0.115
<i>NRAS</i>	11 (11.1)	38 (14.1)	0.495
<i>KRAS</i>	3 (3.0)	10 (3.7)	1.000
<i>KIT</i>	9 (9.1)	58 (21.5)	0.006
<i>WT1</i>	2 (2.0)	23 (8.5)	0.033
<i>NPM1</i>	3 (3.0)	13 (4.8)	0.574
<i>KMT2A</i> -PTD	0	11 (4.1)	0.041
<i>ASXL1</i>	1 (1.0)	8 (3.0)	0.454
<i>ASXL2</i>	3 (3.0)	14 (5.2)	0.576
<i>CEBPA</i>	7 (7.1)	30 (11.1)	0.329
<i>CSF3R</i>	0	8 (3.0)	0.115

FLT3-ITD, *FLT3* internal tandem duplication; *KMT2A*-PTD, *KMT2A* partial tandem duplication

*All the variables are mutually exclusive.

***KMT2A*-PTD is not included.

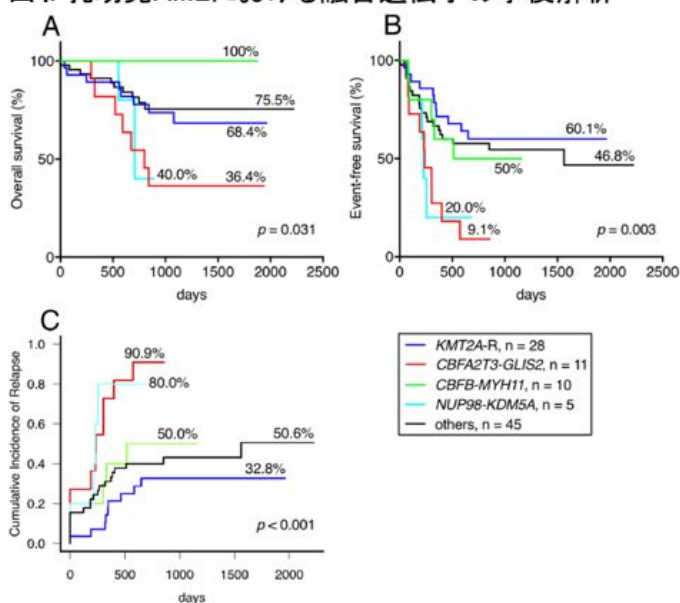
***Number of patients who have any of these aberrations.

(3) 乳幼児 AML における予後因子となる融合遺伝子の探索

99 例の乳幼児例における融合遺伝子のうち、5 例以上で同定された *KMT2A*-R (n = 28)、*CBFA2T3-GLIS2* (n = 11)、*CBFB-MYH11* (n = 10)、*NUP98-KDM5A* (n = 5) の予後を検討した(図 1)。OS、EFS、CIR は *CBFA2T3-GLIS2* 陽性例と *NUP98-KDM5A* 例において不良であった。*CBFB-MYH11* は極めて良好な OS (100%)であったが、EFS(50%)と CIR(50%)は十分ではなく、再発頻度が高いことが示唆された。多変量解析では *CBFA2T3-GLIS2* は OS と EFS の独立した予後不良因子であり、また *NUP98-KDM5A* は EFS の独立した予後不良因子であった。

CBFA2T3-GLIS2 と *NUP98-KDM5A* は既報でも予後不良因子とされているため、今後は早期の造血幹細胞移植が適応になると予想される。しかし乳幼児への移植は治療有害事象や晩期後遺症が生じやすいため、移植適応や前処置のレジメンについて今後十分に検討する必要がある。

図1. 乳幼児AMLにおける融合遺伝子の予後解析



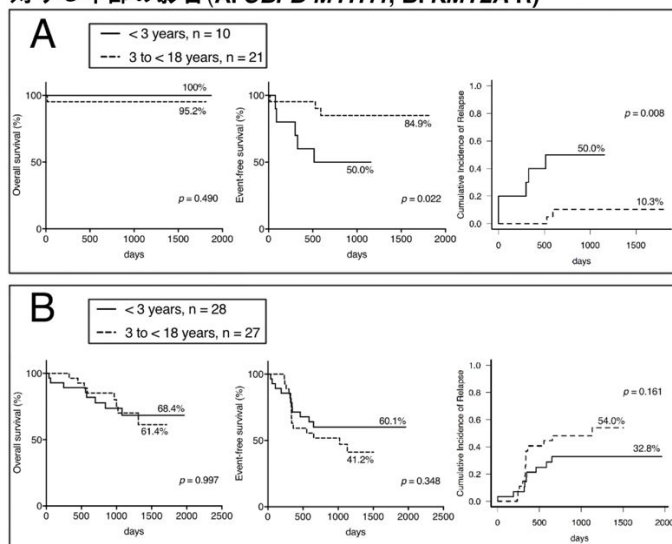
(4) *CBFB-MYH11* と *KMT2A*-R は乳幼児と年長児で異なる予後をもつ

CBFB-MYH11 と *KMT2A*-R はいずれの年齢層においても幅広く検出される特徴を持つため、両融合遺伝子の予後因子としての有用性に対する年齢の影響について解析した。乳幼児(3 歳未満)と年長児(3 歳以上 18 歳未満)での予後比較では、*CBFB-MYH11* 陽性例では、乳幼児で

EFS(50.0% vs 84.9%, $p = 0.022$)と CIR(50.0% vs 10.3%, $p = 0.008$)が有意に低く、乳幼児の方が再発しやすいことが示唆された(図 2A)。一方 *KMT2A-R* 陽性例では、EFS(60.1% vs 41.2%, $p = 0.348$)と CIR(32.8% vs 54.0%, $p = 0.161$)は乳幼児で良好な傾向であり(図 2B)、融合遺伝子によって予後に対する年齢の影響が異なることがわかった。

本邦だけでなく欧米の主要な臨床試験グループの AML の治療レジメンは年齢をリスク因子とせず、層別化治療が行われている。しかし本研究の結果、同一の遺伝子異常であっても年齢で予後因子としての有用性が大きく異なることが判明したため、年齢によってより細分化された集団での治療は治療成績を改善し得ると思われた。また、同一の融合遺伝子を持っていても乳幼児と年長児では並存する遺伝子変異数が異なることは小児急性リンパ性白血病の遺伝子解析で近年報告されており、AML においても今後網羅的遺伝子解析を行い、異なる視点から本研究の妥当性を再度示す必要がある。

図2. *CBFB-MYH11*と*KMT2A-R*の予後因子としての有用性に
対する年齢の影響(A: *CBFB-MYH11*, B: *KMT2A-R*)



(5) 既知の融合遺伝子陰性例における RNA sequence による解析

乳幼児のうち既知の融合遺伝子が同令されなかった 41 例中 16 例で RNA sequence を施行した。計 39 種類の in frame/out of frame のこれまで報告のない融合遺伝子を同定した。*MKL1* や *RUNX1* といった、既知の融合遺伝子の相手遺伝子を持つ新規の融合遺伝子も同定され、これらの融合遺伝子は白血化に強く関連すると予想された。またこれまで造血器腫瘍の遺伝子異常として報告のない遺伝子で構成された融合遺伝子も多数同定され、これらに造腫瘍能があるか今後解析予定である。しかし高頻度に同定された融合遺伝子はなく、今後は異なるアプローチでの遺伝子解析が必要である。

< 引用文献 >

文献

1. Tomizawa D, Tawa A, Watanabe T, et al. Appropriate dose reduction in induction therapy is essential for the treatment of infants with acute myeloid leukemia: a report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Int J Hematol.* 2013;98(5):578-588.
2. Hara Y, Shiba N, Ohki K, et al. Prognostic Impact of Specific Molecular Profiles in Pediatric Acute Megakaryoblastic Leukemia in Non-Down Syndrome. *Genes Chromosomes Cancer.* 2017.
3. de Rooij JD, Masetti R, van den Heuvel-Eibrink MM, et al. Recurrent abnormalities can be used for risk group stratification in pediatric AMKL: a retrospective intergroup study. *Blood.* 2016;127(26):3424-3430.
4. de Rooij JD, Branstetter C, Ma J, et al. Pediatric non-Down syndrome acute megakaryoblastic leukemia is characterized by distinct genomic subsets with varying outcomes. *Nat Genet.* 2017;49(3):451-456.
5. Andersson AK, Ma J, Wang J, et al. The landscape of somatic mutations in infant MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemias. *Nat Genet.* 2015;47(4):330-337.

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計4件)

1. Identification of prognostic markers in inv(16)(p13q22)/CBFB-MYH11-positive patients in pediatric acute myeloid leukemia -the JCCG study, JPLSG AML-05-

第 59 回日本小児血液・がん学会学術集会、2017 年

Yusuke Hara, Norio Shiba, Kentaro Ohki, Genki Yamato, Jun Ohkubo, Myoung-ja Park, Manabu Sotomatsu, Daisuke Tomizawa, Tomohiko Taki, Akitoshi Kinoshita, Nobutaka Kiyokawa, Hirokazu Arakawa, Akio Tawa, Keizo Horibe, Takashi Taga, Souichi Adachi, and Yasuhide Hayashi

2. Biology and Prognostic Markers in Young Children with Acute Myeloid Leukemia -the Jccg Study, JPLSG AML-05-

59th ASH Annual Meeting & Exposition, 2017

Yusuke Hara, Norio Shiba, Genki Yamato, Jun Okubo, Kentaro Ohki, Myoung-Ja Park, Manabu Sotomatsu, Daisuke Tomizawa, Tomohiko Taki, Akitoshi Kinoshita, Nobutaka Kiyokawa, Takashi Taga, Hirokazu Arakawa, Akio Tawa, Keizo Horibe, Souichi Adachi and Yasuhide Hayashi

3. Age and NRAS mutation status are possible prognostic markers in pediatric acute myeloid leukemia with CBFB-MYH11 fusion gene

The 50th Annual Congress of the International Society of Paediatric Oncology, 2018

Yusuke Hara, Norio Shiba, Kentaro Ohki, Genki Yamato, Manabu Sotomatsu, Daisuke Tomizawa, Tomohiko Taki, Akitoshi Kinoshita, Nobutaka Kiyokawa, Hirokazu Arakawa, Akio Tawa, Keizo Horibe, Takashi Taga, Souichi Adachi, and Yasuhide Hayashi

4. Effect of age on the prognosis of molecular abnormalities in pediatric acute myeloid leukemia

The 60th ASH Annual Meeting & Exposition, 2018

Yusuke Hara, Norio Shiba, Genki Yamato, Kentaro Ohki, Manabu Sotomatsu, Ken Tabuchi, Daisuke Tomizawa, Tomohiko Taki, Akitoshi Kinoshita, Nobutaka Kiyokawa, Hirokazu Arakawa, Masabumi Shibuya, Takashi Taga, Akio Tawa, Keizo Horibe, Souichi Adachi and Yasuhide Hayashi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。