

平成 21 年 4 月 30 日 現 在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790714
 研究課題名（和文） 若年性骨髄単球性白血病の遺伝子異常の検索と免疫療法に関する検討
 研究課題名（英文） Genetic abnormalities and immuno-therapy in juvenile myelogenous leukemia
 研究代表者
 吉見 礼美 (YOSHIMI AYAMI)
 名古屋大学・医学部・寄附講座助教
 研究者番号：70432276

研究成果の概要：

若年性骨髄単球性白血病（JMML）患者（71例）の血液検体を用いて *PTPN11*、*RAS*、*NF1* 遺伝子の異常を検討し、それぞれ 45%、16%、4%の患者において遺伝子異常を認めた。臨床所見および予後との相関を検討したところ、*PTPN11* 遺伝子異常のある患者は、診断時の年齢が高く、HbFが高値で、かつ生存率が低く、JMMLの予後不良因子となると考えられた。また JMML の疑いにて骨髄像の中央診断を受けた患者の中に、4例の男児において先天性免疫不全症候群である Wiskott-Aldrich 症候群（WAS）を WASP 遺伝子検査および WASP 蛋白のフォローサイトメトリー検査により診断した。WAS 患者において JMML に類似した血液異常が認めうる事が初めて明らかになった。また JMML において、従来のコロニー方法に変わる、GM-CSF 過剰反応性の測定方法として (3)H-thymidine アッセイを用い方法を開発した。この方法は簡便でかつ定量的に GM-CSF 過剰反応性を測定でき、JMML の診断に有用であると考えられた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：若年性骨髄単球性白血病(JMML)、*PTPN11* 遺伝子、*RAS* 遺伝子、Wiskott-Aldrich 症候群

1. 研究開始当初の背景

若年性骨髄単球性白血病(JMML)は乳幼児に発症するまれな骨髄異形成/骨髄増殖性疾患(MDS/MPD)であり、かつ非常に予後不良な疾

患である。1997年にJMMLという病名、および診断基準が国際的な同意のもとに作られてから、この疾患は広く認知されるようになり、研究が進んできた。

JMML では白血病細胞の GM-CSF 過剰反応性が特徴である。この現象は GM-CSF を添加した白血病細胞のコロニー検査を行うことにより検出可能で診断にも用いられている。しかしこのコロニー検査は煩雑で熟練を要すること、さらに施設間で方法や解釈に差があり客観性に乏しいことが問題であった。より簡便かつ定量的・客観的な方法が望まれていた。

JMML 細胞の GM-CSF 過剰反応性は、この疾患の重要な特徴であるが、この原因は GM-CSF/RAS/MAPK 系伝達経路に位置する遺伝子の異常により、この経路が異常に活性化することであると分かってきた。最近この経路に関連する3つの遺伝子：*PTPN11*、*RAS*、*NF1* のいずれかの変異が70%の患者で認められることが明らかになった。しかしこれらの遺伝子異常と臨床像や予後との関係はまだ報告がなかった。

JMML は予後不良な疾患であり、現在のところ造血幹細胞移植以外に完治する手段はない。一方で JMML は臨床像や骨髄像が非特異的で CMV、EBV などのウイルス感染症、大理石病などさまざまな疾患との鑑別が必要である。

最近の遺伝子異常についての研究の進歩が分子標的療法の開発に結びつくことが期待されている。

2．研究の目的

JMML の既存および新規遺伝子異常について検索を行うとともに、診断方法の確立、免疫療法等の新しい治療法の可能性について研究すること。

3．研究の方法

JMML に関する3つの課題について分けて記載する。

課題1) JMML 細胞の GM-CSF 過剰反応性の測定方法として従来のコロニー方法に代わる、(3)H-thymidine アッセイを用いたより簡便でかつ定量的な方法を検討した。11例の JMML 患者の骨髄または末梢血単核球よりキットを用いて CD34 陽性細胞を分離し、これに 0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 ng/ml の各濃度の GM-CSF を添加して10日間培養した。そしてこの培養系に(3)H-thymidine を加えた後、培養した細胞への(3)H-thymidine の取り込みを scintillation counter にて測定した。

課題2) 71例の JMML 患者の骨髄または末梢血から分離した単核球の凍結保存検体を用いて遺伝子異常の検索が名古屋大学小児科および信州大学小児科において行われた。DNA を抽出し、*PTPN11* 遺伝子の Exon

2, 3, 4, 7, 8, 12, 13 を PCR により増幅し、シーケンスを行った。NRAS および KRAS 遺伝子に関しては codon 12, 13, 61 をシーケンスを行った。またこれらの症例の臨床所見および経過について各施設に問い合わせをした。

課題3) 日本小児血液学会、MDS 委員会において小児 MDS および JMML の中央診断を行っている。研究代表者も担当者となっている。2006年から2007年にかけて、中央診断に JMML または MDS の疑いで登録された4例の男児において、臨床症状および経過から先天性免疫不全症候群である Wiskott-Aldrich 症候群 (WAS) が疑われた。これらの患者において末梢血から単核球を分離し、フローサイトメトリーによる WASP 蛋白発現の検討を行い、DNA を抽出して WASP 遺伝子のシーケンスを行った。また過去に JMML と診断された症例のなかで *PTPN11*、*RAS*、*NF1* 遺伝子の異常のみられなかった8例の患者の保存検体を用いて WASP 蛋白の発現を検討した。

4．研究成果

課題1) 検討した11例すべての JMML 患者において、培養細胞は健常人のカットオフレベルに比べて(3)H-thymidine の取り込みの増加、すなわち GM-CSF 過剰反応性を認めた。増殖した細胞はフローサイトメトリーにて検討したところ、CD33, CD14, CD11b 陽性であり、サイトスピン標本においても形態学的にも単球系であった。

(3)H-thymidine アッセイ法では通常のコロニーアッセイに比較して定量性があることが利点である。これまでに、通常のコロニーアッセイでは JMML 細胞の遺伝子異常と GM-CSF 過剰反応の程度との関係については報告がなかった。今回用いた(3)H-thymidine アッセイ法では、*RAS* 遺伝子変異をもつ JMML 患者は *PTPN11* 遺伝子異常を持つ患者に比較して強い GM-CSF 過剰反応性が見られた。

(3)H-thymidine アッセイ法は従来のコロニー検査に比べて簡単であることに加えて定量性・客観性があり、JMML の診断に有用であると考えられた。

課題2) 71例の JMML 患者のうち32例(45%)に *PTPN11* 遺伝子、13例(18%)に *RAS* 遺伝子の異常が認められた。また3例は臨床的に神経線維腫症 (NF1) と診断されている。いずれの遺伝子異常も重複が認められなかったことから、この GM-CSF/RAS/MAPK 系伝達経路の異常が JMML の発症に重要であることを強く示唆している。

遺伝子異常と臨床像との関係を見ると、*PTPN11* 遺伝子異常のある患者は、*RAS* 遺伝子異常を認める群、遺伝子異常を認めない群と

比較して有意に診断時の年齢が高かった。それぞれの群の年齢の中央値は35ヶ月、10ヶ月($p < 0.000$)、10ヶ月($p = 0.0037$)である。またHbFもPTPN11群で高値であった。それぞれの群のHbFの中央値は25.6、8.6%($p = 0.0026$)、9.8%($p = 0.0014$)であった。年齢が高いこととHbFの高値は、従来から、ともにJMMLの予後不良因子として知られている。このことから予想されるようにPTPN11遺伝子のある群ではその他の患者に比較して生存率が低かった(5年生存率25%(95% CI:17-33) vs. 64%(95% CI:56-72), $p = 0.003$)。このうち造血細胞移植を受けた患者48例に限定した解析においても、PTPN11遺伝子を有する患者はそれ以外に比較して予後不良で(5年生存率30%(95% CI:21-39) vs. 69%(95% CI:59-80))、移植後の再発率も高かった(49%(95% CI:39-60) vs. 0%)。これらからPTPN11遺伝子異常を有する患者は予後不良と考えられ、早期移植の適応になると考えられた。

課題3 4例の当初JMMLまたはMDSが疑われ、後にWASが示唆された男児においてフローサイトメトリーにてWASP蛋白発現の欠損が認められた。そしてWASP遺伝子のシーケンスにおいて遺伝子異常を認め、WASと確定診断した。第一例目ではJMMLの診断基準を満たし、著明な白血球増多を認め、6-メルカプトプリンと投与されて造血細胞幹細胞が予定されていた。生直後の血便、徐々にアトピー性皮膚炎が悪化したことから我々はWASを疑った。過去にこのようなWASの患者におけるMDSやJMML様の臨床および血液所見を呈した報告はないため症例報告を行った。その後同様の症例が小児MDS委員会の中央診断で3例見つかったため、まれな現象ではないと考えられた。現在これら4例の臨床像、遺伝子異常の所見をまとめて論文作成中である。WASはJMMLの重要な鑑別診断であると考えられた。

我々は過去にJMMLと診断された中にWASが見逃されていた可能性があると考え、名古屋大学小児科において過去にJMMLの遺伝子検査を行った症例のうち、PTPN11、RAS遺伝子異常を認めなかった8例において、凍結保存末梢血単核球WASP蛋白の発現を検討したが、異常のある症例は認められなかった。しかしJMML疑いの患者のうちPTPN11、RAS遺伝子の異常の見られない男児においてはWASの可能性を念頭に入れるべきであると考えられた。

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〕(計12件)

- (1) Yoshimi A, Kojima S, Hirano N, Juvenile Myelomonocytic Leukemia: Epidemiology and Management Considerations, Pediatric Drug 2009 in press 査読有り
- (2) Xu Y, Takahashi Y, Yoshimi A, Tanaka M, Yagasaki H, Kojima S. Immunosuppressive activity of mesenchymal stem cells is not decreased in children with aplastic anemia. Int J Hematol. 2009; 89(1):126-7 査読有り
- (3) Nisio N, Yagasaki H, Takahashi Y, Muramatsu H, Hama A, Tanaka M, Yoshida N, Watanabe N, Kudo K, Yoshimi A, Kojima S, Late-onset non-infectious pulmonary complications following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children. Bone marrow Transplant. 2009 Epub ahead of print. 査読有り
- (4) Yoshimi A, Suzuki R, Atsuta Y, Lu D-P, Ghavamzadeh A, Alimoghaddam K, Lie A, Liang R, Chan LL, Haipeng L, Tan PL, Hwang WYK, Chiou TZ, Chen PM, Binh VT, Minh NN, Chang KM, Hwang TJ, Kodera Y, on behalf of Asia-Pacific Blood and Marrow Transplantation Group (APBMT), The Activity of Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Asia: The Report from the Asian Pacific Blood and Marrow Transplantation Group. 2009 submitted. 査読有り
- (5) Yoshida N, Yagasaki H, Xu Y, Matsuda K, Yoshimi A, Kojima S et al. Correlation of clinical features with the mutational status of GM-CSF signaling pathway-related genes in juvenile myelomonocytic leukemia. Pediatr Res. 2008 65:334-340 査読有り
- (6) Tanaka M, Takahashi Y, Xu Y, Yoshida N, Yoshimi A, Villalobos IB, Hama A, Nishio N, Hidaka H, Wang Y, Yagasaki H, Kojima S. Quantification of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor hypersensitivity in juvenile myelomonocytic leukemia by 3H-thymidine assay. Leuk Res. 2008;32(7):1036-42 査読有り
- (7) Yoshimi A, Kojima S, Taniguchi S, et. Al, Unrelated cord blood transplantation for severe aplastic anemia. Biol Blood Marrow Transplant 14 2008 1057-63 査読有り

- (8) Nishio N, Yagasaki H, Takahashi Y, Hama A, Muramatsu H, Tanaka M, Yoshida N, Yoshimi A, Kudo K, Ito M, Kojima S. Engraftment syndrome following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children. *Pediatr Transplant*. 2008 査読有り
- (9) Watanabe N, Matsumoto K, Yoshimi A, Horibe K, Matsuyama T, Kojima S, Kato K. Outcome of bone marrow transplantation from HLA-identical sibling donor in children with hematological malignancies using methotrexate alone as prophylaxis for graft-versus-host disease. *Int J Hematol*. 2008 88(5):575-82 査読有り
- (10) Mufti GJ, Bennett JM, Goasguen J, Bain BJ, Baumann I, Brunning R, Cazzola M, Fenaux P, Germing U, Hellström-Lindberg E, Jinnai I, Manabe A, Matsuda A, Niemeyer CM, Sanz G, Tomonaga M, Vallespi T, Yoshimi A; International Working Group on Morphology of Myelodysplastic Syndrome. Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. *Haematologica*. 2008;93(11):1712-7 査読有り
- (11) Hama A, Yagasaki H, Takahashi Y, Nishio N, Muramatsu H, Yoshida N, Tanaka M, Hidaka H, Watanabe N, Yoshimi A, Matsumoto K, Kudo K, Kato K, Horibe K, Kojima S. Acute megakaryoblastic leukaemia (AMKL) in children: a comparison of AMKL with and without Down syndrome. *Br J Haematol*. 2008;140(5):552-61 査読有り
- (12) Watanabe N, Yoshimi A, Kamachi Y, Kawabe T, Muramatsu H, Matsumoto K, Manabe A, Kojima S, Kato K. Wiskott-Aldrich syndrome is an important differential diagnosis in male infants with juvenile myelomonocytic leukemia-like features. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2007; 9(12):836-8 査読有り

〔学会発表〕(計1件)

- (1) 吉見礼美ら、骨髄異形成症候群・骨髄増殖性疾患用の臨床像を合併した Wiskott-Aldrich 症候群、第一回免疫不全研究会 2008 年 1 月 19 日東京

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

吉見 礼美 (YOSHIMI AYAMI)
名古屋大学・医学部(保健学科)・助教
研究者番号: 70432276