

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16923

研究課題名（和文）小児最未分化型急性骨髄性白血病の病態解析および特異的治療の基盤開発

研究課題名（英文）Pathophysiological analysis of the pediatric minimally differentiated acute myeloid leukemia and development of a specific therapy

研究代表者

才田 聡 (Saida, Satoshi)

京都大学・医学研究科・特定病院助教

研究者番号：70638254

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：小児急性白血病は小児がんの中で最多で、最未分化型急性骨髄性白血病(AML-MO)は、小児の急性骨髄性白血病(AML)の中でも予後不良であることが報告されている。これら難治性小児白血病の病態を明らかにすることは、小児がん治療における重要な課題である。我々は小児急性白血病のコホートおよび、小児AML-MO症例検体を日本全国から収集し、種々のオミックス解析（ゲノム解析、トランスクリプトーム解析、メチローム解析）を行った。これらの解析から小児急性白血病における小児AML-MO特有の遺伝学的特徴や予後不良因子が明らかとなった。本研究成果は小児急性骨髄性白血病のよりよいリスク層別化治療の基盤となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

希少な小児がんの中において、小児急性骨髄性白血病に占めるAML-MOの割合は非常に低い。我々は、小児AML-MO症例を全国から集積して解析を行った。これは過去の小児AML-MOについてのコホート研究の中では最大のもので、世界的にみても大変貴重なコホートとなる。

今回の解析で、小児急性白血病全体における「小児AML-MO」の遺伝学的特徴（融合遺伝子や遺伝子変異の分布）や遺伝子発現の特徴を明らかにすることができた。さらにそれらの中から予後に関わる因子を抽出することができた。本研究成果は、今後の小児急性骨髄性白血病のリスク層別化治療の開発の一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Childhood acute leukemia is the most common childhood cancer, and minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-MO) has been reported to have the poor prognosis among childhood AML cases. Elucidating the pathogenesis of these childhood leukemias is an important issue in the treatment of childhood cancer. We collected samples of childhood acute leukemia cohorts and pediatric AML-MO cases and performed various omics analyses (genomic, transcriptomic, and methylomic analyses). These analyses revealed genetic characteristics and poor prognostic factors specific to pediatric AML-MO. The results of this study provide a basis for better risk stratified treatment of childhood acute myeloid leukemia.

研究分野：小児悪性腫瘍・白血病

キーワード：急性骨髄性白血病 小児

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

白血病は小児の悪性腫瘍の中でおよそ 3 分の 1 を占める最多の疾患であり、うち急性骨髄性白血病 (AML) は、小児期に発症する白血病の約 4 分の 1 を占める。最末分化型急性骨髄性白血病 (AML-M0) は、AML の形態学的病型分類 (FAB 分類) の一型であり、小児 AML の中でも予後不良とされている<sup>1)</sup>。

AML-M0 は、通常 AML では陽性となるミエロペルオキシダーゼ (MPO) 染色が陰性であることから、診断時に急性リンパ性白血病 (ALL) との鑑別に難渋することがある。また AML-M0 や、急性未分化型白血病 (Acute undifferentiated leukemia: AUL) もしくは急性分類不能型白血病 (Acute unclassified leukemia) と呼ばれる (いずれも AUL と略される) 分類不能な白血病が存在し、これらはときに鑑別が困難であり、診断や治療に難渋することが多い。AML と ALL は治療方針が大きく異なるため、これらの鑑別は初期の治療方針決定の際に極めて重要である。また AML-M0 は造血幹細胞系マーカーを発現するなどの特徴を有し、極早期の骨髄球系前駆細胞から発生すると推測されるが、同様に早期の造血前駆細胞が起源と考えられる Early T-cell precursor ALL (ETP-ALL)<sup>2)</sup> や Myeloid-NK 前駆細胞性白血病等との異同や起源細胞の違いなどは明らかでない<sup>3)</sup>。AML-M0 の再発・難治症例は、造血幹細胞移植が唯一の根治治療となるが、救命に至っても重篤な晩期障害が問題となる。また ALL で行われているような CAR-T 細胞療法のような革新的な免疫療法も存在せず、その希少性もあってアンメット・メディカル・ニーズとして取り残されている現状がある。最適な治療法の開発には疾患の病態の把握、すなわち「原因となる遺伝子異常を含めた分子生物学的特徴の理解」が不可欠であり、治療予後改善のための喫緊の課題である。

近年ヒト腫瘍の組織型分類の国際的標準規約である WHO 分類において、白血病は細胞遺伝学・分子生物学的特徴による細分類化が進められているが、AML-M0 においてはその疾患特異的な遺伝学的特徴が未だ明らかにされていない。また成人の AML-M0 に対しては網羅的遺伝学的解析が行われた報告は散見されるが<sup>4)</sup>、小児における包括的な検討は乏しい。成人と小児では同じ AML でも遺伝学的背景が大きく異なることが知られており、より多数の小児例を解析することでこれまで知られていない新しい知見が得られる可能性が高い。

- 1) Jones DTW et al. Nat Rev Cancer. 2019;19(8):420-438.
- 2) DuBois SG et al. Science. 2019;363(6432):1175-1181.
- 3) Short NJ et al. Lancet. 2018;392(10147):593-606.
- 4) Silva FP et al. Blood. 2009;114(14):3001-3007

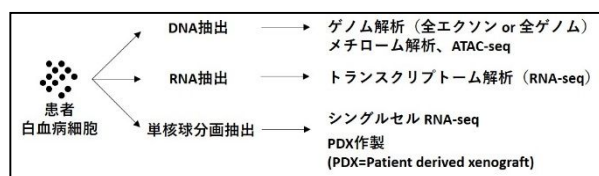
### 2. 研究の目的

これら難治性小児白血病においてはその希少性も相まって、表現型の多様性と複雑さから未だ病態に不明な点が多いのが現状である。AML や AUL の治療が ALL と比べて難しい理由の一つに、その表現型の多様性が挙げられる。ALL は、その表面抗原の解析の結果などから、比較的均一な細胞集団である一方で、AML/AUL は表現型が多様であり、個々の患者の中においてすらもバラエティに富んだ細胞集団を形成する。そのため、少なくとも細胞表面抗原などに関して、治療標的を一つに絞ることが難しく、治療法の開発を妨げる要因となっている。

白血病を含めた「がん」の生命予後の改善には「治療開始前の正しい診断」および「リスク因子や発症機序に即した適切な治療選択」が重要な課題であり、原因となる遺伝学的異常の同定はこれらの課題の解決に大きく寄与する。本研究は臨床的転帰の明らかな小児 AML-M0 の多数の患者検体を用いて種々のオミックス解析を行うことにより、疾患特徴的な遺伝学・生物学的異常の同定を行う。

### 3. 研究の方法

JCCG (日本小児がん研究グループ) の保存検体利用研究として、過去の臨床研究において凍結保存された患者検体を全国規模で収集する。AML 全体の中で M0 は約 2-5% で、年間 AML の発症数が 150 人と考えて、JCCG で収集された約 10 年分の検体 (約 30 例) を対象とし、比較のために公開データも用いる。まずは当研究室に保存してある自験例 AML-M0 症例の白血病細胞を用いてゲノム (全エクソンまたは全ゲノム)・エピゲノムおよびトランスクリプトーム解析を行い、解析手法の最適化を行う。さらに白血病細胞を NOG マウスへ移植し、PDX モデルを作製する。ゲノム解析については、塩基配列決定を行うと同時にコピー数多型 (CNV) 解析を行い、エピゲノム解析としてメチローム (メチル化) 解析、ATAC-seq も行う。トランスクリプトーム解析は RNA-seq を用いて行い、遺伝子発現プロファイリングおよび白血病の原因となる融合遺伝子の検出を行う。



#### 4 . 研究成果

最初に小児急性白血病において、AML-M0 や AUL が、他の AML や ALL と比較して、どのような特徴を有しているかについて検討を行った。遺伝子発現を用いたクラスタリング解析において、B 細胞性 ALL (B-ALL) や T 細胞性 ALL (T-ALL) および AML はそれぞれ比較的均一な集団を形成した。その中で AML-M0 はその多くが AML に包含される集団の中に分布したが、一部、B-ALL や T-ALL に近接する症例も存在した。また AUL については均一な集団を形成せず、多様な分布パターンを示した。

小児 AML における「AML-M0」と「非 AML-M0」の遺伝子発現の比較では、CEBPE, SLPI や顆粒球に関連する遺伝子群 (ELANE, CTSG など)の発現が、AML-M0 において低下していた。また Gene set enrichment analysis(GSEA)では、幹細胞に関連するより未分化な細胞集団であることを反映していると推察された。

さらに小児 AUL 7 例、小児 AML-M0 47 例と成人 AML-M0 35 例の遺伝子異常について比較した。まず全体として RUNX1、ETV6 および WT1 の異常を相互排他的に認め、これらの異常がこれらの比較的未分化な白血病の発症における重要なドライバーであることが示唆された。またこれらの異常はとくに小児 AUL で頻度が高い傾向が見られた。

小児と成人の AML-M0 の比較では、成人において RUNX1 変異が 38%と多く、特徴的と考えられた。小児においては ETV6 関連の異常が 21%と高頻度に認められ、またドライバー異常としての融合遺伝子の検出が成人例と比較して多かった (43% vs. 14%)。

さらに Bulk での遺伝子発現解析において、もっとも多様性を示した AUL について、腫瘍内多様性について詳細に検討すべくシングルセル RNA シーケンスを行った。融合遺伝子から腫瘍細胞の同定が可能であり、Bulk の解析では不明であった腫瘍内多様性が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神鳥達哉
2. 発表標題 The molecular landscape of pediatric and adult minimally differentiated acute myeloid leukemia
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 神鳥達哉
2. 発表標題 小児最未分化型急性骨髄性白血病(FAB分類M0)の遺伝学的特徴に関する包括的検討
3. 学会等名 日本小児血液・がん学会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 神鳥達也
2. 発表標題 最未分化型急性骨髄性白血病（FAB分類M0）の遺伝学的特徴と年齢による差異に関する検討
3. 学会等名 日本血液学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神鳥達哉
2. 発表標題 最未分化型急性骨髄性白血病および急性未分化型白血病の分子遺伝学的特徴に関する検討
3. 学会等名 第81回日本癌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神鳥達哉
2. 発表標題 小兒急性未分化型白血病に対する網羅的遺伝学的解析
3. 学会等名 第126回日本小兒科学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------