

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591396

研究課題名(和文)成人急性リンパ性白血病の遺伝子異常による予後予測

研究課題名(英文)Prognostic implications of the genetic abnormalities in adult patients with acute lymphoblastic leukemia

研究代表者

麻生 範雄 (Asou, Norio)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：50175171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は成人急性リンパ性白血病における遺伝子異常に基づく予後予測システムの構築である。小児例で最近同定されたIKZF1遺伝子異常は成人例では53%と高頻度に同定された。ヒストンDNAのエピゲノム修飾因子、UTX、SUZ12、RPD3、EZH2には異常を認めなかったが、EEDとCREBBPの変異を認めた。フィラデルフィア染色体陰性例において、IKZF1、EED、CREBBPおよびTP53遺伝子異常のうち、全く認めない例、ひとつの異常例、ふたつ以上の異常例の5年無再発生存率はそれぞれ47%、22%および0%であり、これらの遺伝子異常の数が多いほど予後不良であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim in this study is to establish a prognostic scoring system based on the genetic abnormalities in adult patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL). Recently, comprehensive gene analysis in pediatric ALL brought new genetic abnormalities such as IKZF1 and CREBBP. In this study, alterations in the IKZF1 gene were frequently detected in adult ALL (53%) compared to that of pediatric ALL. Although no mutation in the epigenetic modifiers such as UTX, SUZ12, RPD3 or EZH2 was found, mutations in the EED and CREBBP were detected in adult ALL. 5-year relapse-free survival in patients without mutation, with one mutation and with two or more mutations in the IKZF1, EED, CREBBP or TP53 genes was 47%, 22% and 0%, respectively, indicating that these gene mutations confer a poor clinical outcome in adult Philadelphia chromosome-negative ALL.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：急性リンパ性白血病 IKZF1遺伝子 エピゲノム EED遺伝子 CREBBP遺伝子 TP53遺伝子 フィラデルフィア染色体 予後予測

1. 研究開始当初の背景

急性リンパ性白血病 (ALL) は白血病全体の約 2 割を占め、全年齢層に発症する。小児 ALL の 70~80% に治癒が期待される一方、成人 ALL は予後不良であり、10~30% の長期生存率である。ALL の予後予測因子として、年齢 35 歳以上、白血球数高値およびフィラデルフィア染色体 (Ph) 陽性がハイリスクとされる。小児と成人の治療反応性の差は治療コンプライアンスの差に加えて、小児と成人 ALL の発症に關与する遺伝子異常の差が大きいと考えられる。小児 ALL のそれぞれ 1/4 を占める t(12;21) および染色体高 2 倍性 (hyperdiploid) は治療反応良好であるが、成人では数% にしか認めない。一方、化学療法の予後が不良な Ph 陽性の ALL は小児では 5% 以下、成人では約 30% を占める。このように、小児と成人の ALL ではその発症機構に關わる遺伝子異常に大きな差がある。最近、小児 ALL では正常染色体例において高密度 single nucleotide polymorphism (SNP) アレイを用いたゲノムプロファイリングにより B 細胞の分化に關わる分子の異常が同定されて来た。しかしながら、成人 ALL においては Ph の他には、同定された異常は少なく、過半数の遺伝子異常が不明なままである。したがって、成人 ALL の遺伝子異常による病型分類の確立は急務と考えられる。

2. 研究の目的

成人急性リンパ性白血病 (ALL) は抗がん化学療法の治療予後が不良な悪性腫瘍のひとつである。本研究では成人 ALL の遺伝子異常による病型分類の確立を目的に、成人 B 細胞性 ALL を対象に以下の研究を行う。1) 既知の染色体および遺伝子異常の解析、2) 小児 ALL で同定された遺伝子異常の成人例における異常の有無の解析、3) 遺伝子異常を認めない例を対象に B 細胞の分化に關連する分子の変異の有無を解析する。4) 遺伝子異常を認めない例を対象に高密度 SNP アレイにより候補遺伝子を絞って、新しい遺伝子異常を同定する。5) これらの遺伝子異常と病態とくに治療予後との関係の解析を行って、予後予測因子としての有用性を検討する。本研究により我が国の成人 ALL 症例の遺伝子異常による病型分類が確立し、遺伝子異常に基づく予後予測因子が確立されれば至適な治療の指標と成りうる可能性が高く、临床上の有用性は大きいと予想される。

3. 研究の方法

(1) 成人 B 細胞性急性リンパ性白血病 (B-ALL) 症例における遺伝子異常の解析：

成人 B-ALL 症例の白血病細胞において、既知の遺伝子変異として染色体転座由来の BCR-ABL、MLL-AF4、MLL-AF9、TCF3-PBX1 等の融合遺伝子の有無を解析する。また、小児 ALL において見いだされた PAX5、IKZF1、EBF1、CRLF2、JAK2 等の遺伝子変異の有無を

解析する。ALL 症例の末梢血液あるいは骨髓液の単核細胞から DNA および RNA を抽出し、PCR 法により目的の遺伝子を増幅し、その塩基配列を直接シーケンス法で決定する。

(2) 新たな遺伝子変異の同定：

正常染色体 ALL 例のうち遺伝子変異を認めない症例を対象に新たな遺伝子変異の同定を行う。まず、B 細胞の分化増殖を調節する転写因子の変異の有無を網羅的に検索する。PAX5 や IKZF1 以外に B 細胞の分化に關わる転写因子と考えられている PU.1、BCL11A、TCF3、FOXP1、LEF1 および BLNK などの遺伝子変異の有無を解析する。さらに、遺伝子異常を認めない例を対象に高密度 SNP アレイにより候補遺伝子を絞って、新しい遺伝子異常を同定する。

(3) ALL 症例における遺伝子変異と病態、治療反応性との関係：

ALL 症例の遺伝子変異と臨床病態および治療成績との関係を統計学的に検討する。年齢、WHO 分類あるいは染色体異常別に検討し、遺伝子変異の診断および予後予測因子としての有用性を解析する。

以上の結果を通して、遺伝子変異による新たな ALL の病型診断および治療反応性の予測を確立する。

4. 研究成果

(1) 成人 B 細胞性急性リンパ性白血病 (B-ALL) における IKZF1、PAX5 および JAK2 遺伝子異常

小児 B-ALL において同定された IKZF1、PAX5、JAK2 遺伝子異常を成人 B-ALL において検討した。IKZF1 のドミナントネガティブアイソフォーム Ik6 と Ik10 の同定は RT-PCR 法により、大きな欠失は DNA の RQ-PCR 定量法により検索した。その結果、IKZF1 遺伝子異常を 78 例中 41 例 (53%) に認めた。IKZF1 異常はフィラデルフィア染色体 (Ph) 陽性例では 24 例中 20 例 (83%) と Ph 陽性 ALL に有意に高頻度であった。しかし、Ph 陰性例でも 54 例中 21 例 (41%) と小児と比較して有意に高頻度であった。一方、PAX5 遺伝子変異は 71 例中 5 例 (7%)、JAK2 変異は 1 例も認めず、小児に比してまれであった。IKZF1 遺伝子異常は小児では予後不良とされているが、成人 B-ALL では IKZF1 遺伝子異常の有無によって 5 年全生存率に有意差を認めなかった。このように、小児と成人 B-ALL において、遺伝子異常の頻度のみならず、その生物学的な意義に差異を認めた。また、成人 B-ALL の約 4 割に遺伝子異常を認めない症例が存在することが明らかになった。

(2) 成人急性リンパ性白血病 (ALL) におけるヒストン DNA の修飾に關連する遺伝子異常の解析

エピゲノムの遺伝子発現を調節するヒストン DNA の H3K27 の修飾に關与する遺伝子異常を

ALLにおいて解析した。78例のALL症例において、H3K27のメチル化を促進するポリコーム抑制複合体 (PRC2) のEZH2、EED、RbAp46/48およびSUZ12遺伝子、H3K27の脱メチル化を来すUTX、H3K27のアセチル化を来すCREBBP、さらに脱アセチル化を促進するRPD3遺伝子の変異の有無を検索した。これまでに、EZH2はリンパ腫と骨髄異形成症候群に変異が報告され、UTXおよびCREBBP変異は小児ALLにおいて同定されている。検索の結果、UTX、SUZ12、RPD3およびEZH2遺伝子には変異を認めなかったが、8例 (10%) にCREBBP遺伝子変異を同定し、2例 (3%) にEED遺伝子変異を認めた。それぞれ種々の病型に変異が認められ、CREBBP変異の2例はPh陽性B-ALLであり、1例はT細胞性ALL (T-ALL) であった。また、EED変異も1例はB-ALLであり、1例はT-ALLであった。このことから、これらのエピゲネティック調節に関わる分子の変異は疾患の進展に関わることが予想された。また、EEDおよびCREBBP変異例は変異がない群と比較して、全生存率が不良の傾向を認めた。さらに、これらの分子の異常は治療の標的となりうる可能性が示唆された。

(3) がん抑制遺伝子TP53遺伝子異常の解析
がん抑制遺伝子 TP53 の変異の有無を成人ALL例において解析した。87例中6例 (7%) に TP53 遺伝子変異を認めた。変異例の完全寛解率および全生存率は野生型例に比較して有意に不良であった。

(4) 遺伝子異常に基づく成人 ALL の予後予測

これまでの結果を踏まえて、成人 ALL の遺伝子異常に基づく予後予測モデルを確立するために、遺伝子異常によるスコア化を試みた。Ph陰性ALL33例において、IKZF1、CREBBP、EEDおよび TP53 遺伝子異常のうち、全く認めない症例は13例、ひとつの異常は18例、異常がふたつ以上の症例は2例であった。それぞれの5年無再発生存率は47%、22%および0%と遺伝子異常数が多いほど有意に予後不良であった。以上より、遺伝子異常に基づく成人 ALL の予後予測モデルを提唱する。

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 14 件)

Yamaguchi S, Iwanaga E, Tokunaga K, Nanri T, Shimomura T, Suzushima H, Mitsuya H, Asou N. IDH1 and IDH2 mutations confer an adverse effect in patients with acute myeloid leukemia lacking the NPM1 mutation. *Eur J Haematol* 2014;92(6):471-477. doi: 10.1111/ejh.12271. (査読あり)
Iriyama N, Asou N, Miyazaki Y, Yamaguchi

S, Sato S, Sakura T, Maeda T, Handa H, Takahashi M, Ohtake S, Hatta Y, Sakamaki H, Honda S, Taki T, Taniwaki M, Miyawaki S, Ohnishi K, Kobayashi Y, Naoe T. Normal karyotype acute myeloid leukemia with the CD7+ CD15+ CD34+ HLA-DR + immunophenotype is a clinically distinct entity with a favorable outcome. *Ann Hematol* 2014;93(6):957-963. doi: 10.1007/s00277-014-2013-4. (査読あり)

Ono T, Takeshita A, Kishimoto Y, Kiyoi H, Okada M, Yamauchi T, Emi N, Horikawa K, Matsuda M, Shinagawa K, Monma F, Ohtake S, Nakaseko C, Takahashi M, Kimura Y, Iwanaga M, Asou N, Naoe T; The Japan Adult Leukemia Study Group. Expression of CD56 is an unfavorable prognostic factor for acute promyelocytic leukemia with higher initial white blood cell counts. *Cancer Sci* 2014;105(1):97-104. doi: 10.1111/cas.12319. (査読あり)

Nin DS, Ali AB, Okumura K, Asou N, Chen CS, Chng WJ, Khan M. Akt-Induced Phosphorylation of N-CoR at Serine 1450 Contributes to Its Misfolded Conformational Dependent Loss (MCDL) in Acute Myeloid Leukemia of the M5 Subtype. *PLoS One* 2013 Aug 5;8(8):e70891. doi: 10.1371/journal.pone.0070891. (査読あり)

Fujita H, Asou N, Iwanaga M, Hyo R, Nomura S, Kiyoi H, Okada M, Inaguma Y, Matsuda M, Yamauchi T, Ohtake S, Izumi T, Nakaseko C, Ishigatsubo Y, Shinagawa K, Takeshita A, Miyazaki Y, Ohnishi K, Miyawaki S, Naoe T; the Japan Adult Leukemia Study Group. Role of hematopoietic stem cell transplantation for relapsed acute promyelocytic leukemia: A retrospective analysis of JALSG-APL97. *Cancer Sci* 2013;104(10):1339-1345. doi: 10.1111/cas.12230. (査読あり)

Tokunaga K, Yamaguchi S, Iwanaga E, Nanri T, Shimomura T, Suzushima H, Mitsuya H, Asou N. High frequency of IKZF1 genetic alterations in adult patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Haematol* 2013;91(3):201-208. doi: 10.1111/ejh.12155. (査読あり)

Yanada M, Ohtake S, Miyawaki S, Sakamaki H, Sakura T, Maeda T, Miyamura K, Asou N, Oh I, Miyatake J, Kanbayashi H, Takeuchi J, Takahashi M, Dobashi N, Kiyoi H, Miyazaki Y, Emi N, Kobayashi Y, Ohno R, Naoe T. The demarcation between younger and older acute myeloid

leukemia patients. *Cancer* 2013;119(18):3326-3333. doi: 10.1002/cncr.28212. (査読あり)
麻生範雄、AML の分子病態と診断. *臨床血液* 2012;53:1549-1559. PMID: 23037727 (査読なし)
Ono T, Takeshita A, Kishimoto Y, Kiyoi H, Okada M, Yamauchi T, Tsuzuki M, Horikawa K, Matsuda M, Shinagawa K, Monma F, Ohtake S, Nakaseko C, Takahashi M, Kimura Y, Iwanaga M, Asou N, Naoe T; the Japan Adult Leukemia Study Group. Long-term outcome and prognostic factors of elderly patients with acute promyelocytic leukemia. *Cancer Sci* 2012;103(11):1974-1978. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02390.x. (査読あり)
Enomoto Y, Kitaura J, Hatakeyama K, Watanuki J, Akasaka T, Kato N, Shimanuki M, Nishimura K, Takahashi M, Taniwaki M, Haferlach C, Siebert R, Dyer MJS, Asou N, Aburatani H, Nakakuma H, Kitamura T, and Sonoki T. E1/miR-125b transgenic mice develop lethal B-cell malignancies. *Leukemia* 2011;25:1849-56. doi: 10.1038/leu.2011.166. (査読あり)
Miyawaki S, Ohtake S, Fujisawa S, Kiyoi H, Shinagawa K, Usui N, Sakura T, Miyamura K, Nakaseko C, Miyazaki Y, Fujieda A, Nagai T, Yamane T, Taniwaki M, Takahashi M, Yagasaki F, Kimura Y, Asou N, Sakamaki H, Handa H, Honda S, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R. A randomized comparison of four courses of standard-dose multiagent chemotherapy versus three courses of high-dose cytarabine alone in post-remission therapy for acute myeloid leukemia in adults: the JALSG AML201 study. *Blood* 2011;117:2366-2372. doi: 10.1182/blood-2010-07-295279. (査読あり)
Ohtake S, Miyawaki S, Fujita H, Kiyoi H, Shinagawa K, Usui N, Okumura H, Miyamura K, Nakaseko C, Miyazaki Y, Fujieda A, Nagai T, Yamane T, Taniwaki M, Takahashi M, Yagasaki F, Kimura Y, Asou N, Sakamaki H, Handa H, Honda S, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R. Randomized study of induction therapy comparing standard-dose idarubicin with high-dose daunorubicin in adult patients with previously untreated acute myeloid leukemia: JALSG AML201 Study. *Blood* 2011;117:2358-2365. doi: 10.1182/blood-2010-03-273243. (査読あり)
Iwanaga E, Nanri T, Mitsuya H, Asou N. Mutation in the RNA binding protein

TIS11D/ZFP36L2 is associated with the pathogenesis of acute leukemia. *Int J Oncol* 2011;38:25-31. PMID: 21109922 (査読あり)

Ono T, Takeshita A, Iwanaga M, Asou N, Naoe T, Ohno R. Impact of additional chromosomal abnormalities in patients with acute promyelocytic leukemia - 10 years' results of the Japan Adult Leukaemia Study Group APL97 study - *Haematologica* 2011;96:174-176. doi: 10.3324/haematol.2010.030205. (査読あり)

[学会発表](計 16 件)

Iriyama N, Asou N, Sakura T, Maeda T, Handa H, Takahashi M, Ohtake S, Hatta Y, Sakamaki H, Honda S, Miyazaki Y, Miyawaki S, Taniwaki M, Taki T, Yamaguchi S, Satou S and Naoe T. Normal Karyotype-Acute Myeloid Leukemia With The CD4- CD7+ CD15+ CD34+ Immunophenotype Is a Clinically Distinct Entity With a Favorable Outcome. 55th ASH Annual Meeting and Exposition, December 8, 2013, New Orleans, U.S.A.

Tokunaga K, Yamaguchi S, Shimomura T, Suzushima H, Okuno Y, Mitsuya H, and Asou N. Accumulation Of Gene Alterations Of TP53, Crebbp and IKZF1 Is a Prognostic Factor In Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. 55th ASH Annual Meeting and Exposition, December 7, 2013, New Orleans, U.S.A. Tokunaga K, Yamaguchi S, Shimomura T, Suzushima H, Mitsuya H, Asou N. Mutations of the modifiers of H3K27 (CREBBP and EED) in adult acute lymphoblastic leukemia. 第75回日本血液学会学術総会 2013年10月11日、ロイトン札幌、さっぽろ芸文館、札幌市教育文化会館、札幌

Higuchi Y, Watanabe Y, Tokunaga K, Nosaka K, Mitsuya H, Asou N. Lineage switch with t(6;11)(q27;q23) from T-cell lymphoblastic lymphoma to AMoL at relapse. 第75回日本血液学会学術総会 2013年10月11日、ロイトン札幌、さっぽろ芸文館、札幌市教育文化会館、札幌

Yamaguchi S, Iwanaga E, Tokunaga K, Nanri T, Shmamura T, Suzushima H, Mitsuya H, Asou N. IDH1 and IDH2 mutations confer adverse prognosis in acute myeloid leukemia with wild-type NPM1. 第75回日本血液学会学術総会 2013年10月11日、ロイトン札幌、さっぽろ芸文館、札幌市教育文化会館、札幌

Kihara R, Hoshino H, Suzuki K, Chen F, Kato T, Miyawaki S, Asou N, Taki T, Taniwaki M, Naoe T, Kiyoi H. Clonal heterogeneity and evolution of acute myeloid leukemia during disease progression. 第 75 回日本血液学会学術総会 2013年10月11日、ロイトン札幌、さっぽろ芸文館、札幌市教育文化会館、札幌

Tokunaga K, Yamaguchi S, Iwanaga E, Nanri T, Shimomura T, Suzushima H, Mitsuya H, and Asou N. Crebbp HAT domain mutations are frequently detected in adult acute lymphoblastic leukemia. 54th ASH Annual Meeting. Atlanta 8-11 December 2012

Yamaguchi S, Tokunaga K, Iwanaga E, Nanri T, Shimomura T, Suzushima H, Mitsuya H, and Asou N. Prognostic impact and concurrent genetic alterations of CEBPA double mutations in adults with cytogenetically intermediate-risk acute myeloid leukemia. 54th ASH Annual Meeting. Atlanta 8-11 December 2012

麻生範雄. 「AML の分子病態と診断」第 74 回日本血液学会学術総会. 19-21 October 2012 Kyoto.

Tokunaga K, Yamaguchi S, Iwanaga E, Nanri T, Shimomura T, Suzushima H, Mitsuya H, and Asou N. IKZF1 alterations in adults with B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL). 第 74 回日本血液学会学術総会 19-21 October 2012 Kyoto.

Yamaguchi S, Iwanaga E, Tokunaga K, Nanri T, Shimomura T, Suzushima H, Mitsuya H, Asou N. Prognostic impact of FLT3, CEBPA, NPM1, IDH1 and IDH2 gene mutations in patients with AML. 第 74 回日本血液学会学術総会 19-21 October 2012 Kyoto.

Fujita H, Asou N, Iwanaga M, Hyo R, Nomura S, Kiyoi H, Okada M, Tsuzuki M, Matsuda M, Yamauchi T, Ohtake S, Izumi T, Nakaseko C, Mitani K, Shinagawa K, Takeshita A, Miyazaki Y, Ohnishi K, Miyawaki S, and Naoe T. Role of Hematopoietic Stem Cell Transplantation As Salvage Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia Initially Treated with All-Trans-Retinoic Acid: A Retrospective Analysis of the Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) APL97 Study 53rd ASH Annual Meeting. December 10-13, 2011, San Diego Convention Center, San Diego, CA, U.S.A.

Ono T, Takeshita A, Kishimoto Y, Kiyoi

H, Okada M, Yamauchi T, Tsuzuki M, Horikawa K, Matsuda M, Shinagawa K, Monma F, Ohtake S, Nakaseko C, Takahashi M, Yagasaki F, Kimura Y, Fujita H, Iwanaga M, Asou N, Ohnishi K, and Naoe T. Clinical Features and Prognostic Impact of CD56 Expression in Acute Promyelocytic Leukemia: Long Term Follow up Data From the Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) APL97. 53rd ASH Annual Meeting. December 10-13, 2011, San Diego Convention Center, San Diego, CA, U.S.A.

Yamaguchi S, Iwanaga E, Tokunaga K, Nanri T, Suzushima H, Shimomura T, Mitsuya H, and Asou N. IDH2 mutations have an unfavorable impact in elderly patients with acute myeloid leukemia. 53rd ASH Annual Meeting. December 10-13, 2011, San Diego Convention Center, San Diego, CA, U.S.A.

Yamaguchi S, Iwanaga E, Tokunaga K, Nanri T, Shimomura T, Suzushima H, Mitsuya H, Asou N. IDH1 and IDH2 mutations in Japanese patients with acute myeloid leukemia. 第 73 回日本血液学会総会 2011年10月14日～16日 名古屋国際会議場、名古屋

Tokunaga K. IKZF1 deletions in adult B-cell acute lymphoblastic leukemia. 第73回日本血液学会総会 2011年10月14日～16日 名古屋国際会議場、名古屋

〔図書〕(計 0 件)

〔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

麻生 範雄 (ASOU Norio)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号：50175171

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：