

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591527

研究課題名(和文) ダウン症候群関連急性リンパ性白血病における細胞増殖機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of abnormal cell proliferation in acute lymphoblastic leukemia of Down syndrome

研究代表者

照井 君典 (TERUI, KIMINORI)

弘前大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00333740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本邦のダウン症候群の急性リンパ性白血病(DS-ALL)における細胞増殖機構を解明するために本研究を行い、以下の成果を得た。

1. 本邦のDS-ALLでは、欧米のDS-ALLと比べてCRLF2-JAK経路の遺伝子異常の頻度がやや低く、CRLF2-JAK経路以外に分子標的となる主要な経路が存在する可能性も考えられた。
2. 本邦のDS-ALLではEBF1遺伝子欠失の頻度が高いことが明らかとなった。EBF1遺伝子欠失の頻度はP2RY8-CRLF2融合遺伝子陽性例で有意に高く、本邦のDS-ALLの一部の症例ではこれら2つの遺伝子異常が協調して白血病の発症に関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We performed this study to clarify molecular mechanisms of abnormal cell proliferation in acute lymphoblastic leukemia of Down syndrome (DS-ALL) in Japan, and found the following results.

1. The frequencies of genetic alterations involving the CRLF2-JAK pathway in Japanese DS-ALL patients were slightly lower than those in Western countries. There may be other important pathways involved in pathogenesis of DS-ALL in Japan.
2. EBF1 deletions were found at an unexpectedly high frequency, and associated with the P2RY8-CRLF2 fusion. It is suggested that P2RY8-CRLF2 and EBF1 deletions may cooperate in leukemogenesis in a subset of Japanese DS-ALL patients.

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：ダウン症候群 急性リンパ性白血病 JAK2 CRLF2 分子標的治療 EBF1 IKZF1 BTG1

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 21 番染色体の過剰により生じるダウン症候群 (ダウン症) は急性白血病を高率に発症し、その頻度は健常人の約 20 倍である。その約半数を占める急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia, AML) は抗癌剤に高い感受性を示すため、ダウン症に関連のない AML よりも予後良好であるが、残りの半数を占める急性リンパ性白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL) は、ダウン症に関連のない ALL よりも予後不良である。そのため、ダウン症関連 ALL (DS-ALL) に対して多剤併用の強力な化学療法が行われているが、ダウン症の患者では健常人に比べて抗癌剤に対する認容性が低く副作用が強く現れるため、治療関連死の割合が高いことが問題となっており、より安全で効果的な治療が求められている。近年、腫瘍細胞の増殖促進に関わる分子を標的とした分子標的薬の開発は目覚しく、多くの分子標的薬が実用化された。分子標的治療は、ALL に対する強力な多剤併用化学療法と比較してはるかに毒性が低いと見られ、治療関連死亡が問題となる DS-ALL において、非常に魅力的な治療法と考えられる。

(2) DS-ALL の分子標的治療の標的となる候補分子は十分に明らかにされていなかったが、最近、*JAK2* の活性化変異が DS-ALL 症例の約 20% に生じていることが報告された。*JAK2* 変異を高率に有する原発性骨髄線維症において *JAK1/2* 阻害薬の有効性と安全性が確認されるなど、*JAK* 阻害薬の臨床応用は順調に進んでおり、*JAK* 変異が高頻度で見られるようであれば、*JAK* 阻害薬は DS-ALL に対する分子標的治療の有力な候補になると考えられる。

(3) *JAK2* 変異の報告に引き続き、DS-ALL の約 60% の症例で、サイトカインレセプターの 1 つである *CRLF2* が高発現していることが報告された。また、*CRLF2* の高発現がみられる症例のほとんど (DS-ALL 全体の約半数) において、性染色体の部分欠失により *P2RY8-CRLF2* 融合遺伝子が形成されていることが報告された。さらに、一部の症例では *P2RY8-CRLF2* 融合遺伝子ではなく *IgH-CRLF2* 融合遺伝子や *CRLF2* の 232 番目のアミノ酸の置換が認められることも報告された。*CRLF2* の遺伝子異常を認める例では、下流の *JAK-STAT* 経路が活性化されていることが知られており、これらの症例に対しても *JAK* 阻害薬の有効性が期待される。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、DS-ALL における細胞増殖促進機構を解明し、分子標的治療の実験的根拠を提示することである。具体的には、以下の 4 点に焦点を絞り研究を行う。

(1) DS-ALL の患者検体を用いて *JAK2* の遺伝子解析を行い、本邦における *JAK2* の遺伝子変異の頻度、特徴を決定する。

(2) *JAK2* 遺伝子に変異を認めなかった検体を用いて、他の *JAK* ファミリーメンバー、*JAK1*、*JAK3*、*TYK2* について遺伝子解析を行う。

(3) *JAK* ファミリーの新規変異遺伝子をサイトカイン依存性細胞株に導入し、変異が活性化変異であることを証明する。*JAK* 阻害薬を添加し、細胞増殖が抑制され、細胞死が誘導されることを確認する。

(4) 定量的 RT-PCR にて *CRLF2* 遺伝子の発現レベル、PCR 法にて *CRLF2* 融合遺伝子の有無、直接シーケンス法にて *CRLF2* の遺伝子変異解析を行い、本邦における *CRLF2* 遺伝子異常の頻度、特徴を決定する。新規遺伝子変異が見つかった場合には、上記 (3) と同様の解析も行う。

## 3. 研究の方法

(1) DS-ALL の患者検体を用いた *JAK2*、*JAK* ファミリーおよび *CRLF2* の遺伝子変異の解析  
DS-ALL 患者の骨髄液から常法に従い全 RNA を抽出し、cDNA を合成する。PCR 産物の長さが 300 ~ 400bp になるように *JAK2* の cDNA 全長にわたりプライマーセットをデザインし PCR を行い、ダイレクトシーケンス法により遺伝子変異を確認する。

(2) DS-ALL 細胞における *CRLF2* 遺伝子の発現レベルの解析

DS-ALL 患者の骨髄液から常法に従い全 RNA を抽出し、cDNA を合成する。PCR 産物の長さが 100 ~ 150bp になるように、*CRLF2* 遺伝子の異なる 2 つのエクソンにプライマーを設計し、サイバークリーンと Bio-Rad 社の CFX96 Real-Time system を用いて定量的 RT-PCR を行う。内部標準遺伝子としては、*GAPDH* を用いる。

(3) *P2RY8-CRLF2* 融合遺伝子の解析

RT-PCR 法にて、*P2RY8-CRLF2* 融合遺伝子の有無を解析する。ダイレクトシーケンス法により切断点の塩基配列を確認する。

(4) 新規遺伝子変異の機能解析

新規遺伝子変異が見つかった場合には、変異遺伝子をサイトカイン依存性細胞株に遺伝子導入し、活性化変異であるかどうか解析する。活性化変異であった場合には、下流の *JAK-STAT* 経路が活性化していることを確認し、*JAK* 阻害薬の影響を解析する。

## 4. 研究成果

(1) 本邦の DS-ALL 38 例について、*CRLF2*-*JAK* 経路に関わる遺伝子の解析を行った。*JAK2* 遺伝子変異は 38 例中 6 例 (16%) で認められ、

欧米から報告されている頻度と同じかやや低頻度であった。欧米の DS-ALL では R683G というアミノ酸置換を引き起こす変異の頻度が最も高いと報告されているが、本邦の DS-ALL でみられた変異も全例で R683G 変異であった。JAK1, JAK3, CRLF2 には遺伝子変異は 1 例も認められなかった。P2RY8-CRLF2 遺伝子再構成が認められたのは 38 例中 11 例 (29%) であり、欧米からの報告 (約 50%) よりもやや低頻度であった。また、cDNA の得られた DS-ALL の 27 例 (P2RY8-CRLF2 陽性 7 例、P2RY8-CRLF2 陰性 20 例) と非ダウン ALL の 25 例について CRLF2 の発現量の解析を行った。非ダウン ALL 群の CRLF2 発現量の中央値の 10 倍以上を高発現と定義した場合、DS-ALL の 27 例中 9 例 (33%) (P2RY8-CRLF2 陽性例 7 例中 6 例、P2RY8-CRLF2 陰性例 20 例中 3 例) で高発現が認められ、欧米からの報告 (約 60%) よりも低頻度であった。CRLF2-JAK 経路の遺伝子異常と臨床像との間に相関はみられなかった。

以上、本邦の DS-ALL では欧米の DS-ALL と比べて CRLF2-JAK 経路の遺伝子異常の頻度がやや低いことが明らかとなった。本邦の DS-ALL では、CRLF2-JAK 経路以外に分子標的となる主要な経路が存在する可能性もあり、今後次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子解析などにより、新たな治療標的を探索することが重要であると考えられた。

(2) 最近、欧米のグループから、DS-ALL の 20-30% で IKZF1 の欠失が認められ、IKZF1 欠失例は予後不良であることが報告された。そこで、十分な DNA サンプルがある 32 例について、MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) 法を用いて、IKZF1, BTG1, EBF1, CDKN2A/B, PAX5 などの ALL の発症に関わっている遺伝子のコピー数解析を行った。IKZF1 欠失は 32 例中 8 例 (25%) で認められ、IKZF1 欠失例は IKZF1 非欠失例と比較して有意に全生存期間が短いことが明らかとなった。DS-ALL における BTG1 欠失の頻度は報告者によって異なるが (6.9-29%)、本邦の DS-ALL では 32 例中 8 例 (25%) と高頻度であった。EBF1 欠失は今まで DS-ALL では稀 (~2%) と考えられてきたが、本邦の DS-ALL では 32 例中 5 例 (16%) で認められた。さらに、EBF1 遺伝子欠失の頻度は、P2RY8-CRLF2 融合遺伝子陽性例で有意に高いことが明らかとなった (44% vs. 4%,  $P = 0.015$ )。フィラデルフィア染色体陽性 ALL では、BCR-ABL と IKZF1 欠失が協調して白血病の発症に関わっていると考えられている。同様に、本邦の DS-ALL の一部の症例では、P2RY8-CRLF2 融合遺伝子と EBF1 欠失が協調して白血病の発症に関わっている可能性が示唆された。一方で、CDKN2A/B 欠失と PAX5 欠失は P2RY8-CRLF2 融合遺伝子陰性例ではそれぞれ 48%、39% と高頻度でみられたが、P2RY8-CRLF2 融合遺伝子陽性例ではいずれも

11% と低頻度であった (統計学的有意差なし)。IKZF1 欠失例が予後不良であったこと以外には、遺伝子欠失と臨床像との間に相関はみられなかった。

(3) 以上、本邦の DS-ALL では欧米の DS-ALL と比べて CRLF2-JAK 経路の遺伝子異常の頻度がやや低く、CRLF2-JAK 経路以外に分子標的となる主要な経路が存在する可能性もあると考えられた。また、本邦の DS-ALL では EBF1 遺伝子欠失の頻度が高いことが明らかとなった。EBF1 遺伝子欠失の頻度は P2RY8-CRLF2 融合遺伝子陽性例で有意に高く、本邦の DS-ALL の一部の症例ではこれら 2 つの遺伝子異常が協調して白血病の発症に関わっている可能性が示唆された。

## 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 19 件)

Coenen EA, Zwaan CM, Reinhardt D, Harrison CJ, Haas OA, de Haas V, Mihál V, De Moerloose B, Jeison M, Rubnitz JE, Tomizawa D, Johnston D, Alonzo TA, Hasle H, Auvrignon A, Dworzak M, Pession A, van der Velden VH, Swansbury J, Wong KF, Terui K, Savasan S, Winstanley M, Vaitkeviciene G, Zimmermann M, Pieters R, van den Heuvel-Eibrink MM. Pediatric acute myeloid leukemia with t(8;16)(p11;p13), a distinct clinical and biological entity: a collaborative study by the International-Berlin-Frankfurt-Munster AML-study group. Blood 2013; 122: 2704-13. 査読有.

Tomizawa D, Tawa A, Watanabe T, Saito AM, Kudo K, Taga T, Iwamoto S, Shimada A, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Takahashi H, Nakayama H, Koh K, Kigasawa H, Kosaka Y, Miyachi H, Horibe K, Nakahata T, Adachi S. Excess treatment reduction including anthracyclines results in higher incidence of relapse in core binding factor acute myeloid leukemia in children. Leukemia 2013; 12: 2413-6. 査読有.

Yoshida K, Toki T, Okuno Y, Kanazaki R, Shiraishi Y, Sato-Otsubo A, Sanada M, Park MJ, Terui K, Suzuki H, Kon A, Nagata Y, Sato Y, Wang R, Shiba N, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Muramatsu H, Hasegawa D, Nakamura K, Kanegane H, Tsukamoto K, Adachi S, Kawakami K, Kato K, Nishimura R, Izraeli S, Hayashi Y, Miyano S, Kojima S, Ito E, Ogawa S. The

landscape of somatic mutations in Down syndrome-related myeloid disorders. *Nat Genet* 2013; 45: 1293-9. 査読有.

Tomizawa D, Tawa A, Watanabe T, Saito AM, Kudo K, Taga T, Iwamoto S, Shimada A, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Takahashi H, Nakayama H, Kiyokawa N, Isoyama K, Mizutani S, Hara J, Horibe K, Nakahata T, Adachi S. 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: 578-88. 査読有.

Nagai K, Ochi F, Terui K, Maeda M, Ohga S, Kanegane H, Kitoh T, Kogawa K, Suzuki N, Ohta S, Ishida Y, Okamura T, Wakiguchi H, Yasukawa M, Ishii E. Clinical characteristics and outcomes of chédiak-Higashi syndrome: A nationwide survey of Japan. *Pediatr Blood Cancer* 2013; 60: 1582-6. 査読有.

Saida S, Watanabe K, Sato-Otsubo A, Terui K, Yoshida K, Okuno Y, Toki T, Wang R, Shiraishi Y, Miyano S, Kato I, Morishima T, Fujino H, Umeda K, Hiramatsu H, Adachi S, Ito E, Ogawa S, Ito M, Nakahata T, Heike T. Clonal selection in xenografted TAM recapitulates the evolutionary process of myeloid leukemia in Down syndrome. *Blood* 2013; 121: 4377-87. 査読有.

Toki T, Kanazaki R, Kobayashi E, Kaneko H, Suzuki M, Wang R, Terui K, Kanegane H, Maeda M, Endo M, Mizuuchi T, Adachi S, Hayashi Y, Yamamoto M, Shimizu R, Ito E. Naturally occurring oncogenic GATA1 mutants with internal deletions in transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome. *Blood* 2013; 121: 3181-4. 査読有.

照井君典, 花田勇, 土岐力, 伊藤悦朗. ダウン症候群関連急性リンパ性白血病における *JAK2* および *CRLF2* 遺伝子異常. *日本小児血液・がん学会雑誌* 2013; 50: 11-14. 査読無.

伊藤悦朗, 金崎理香, 王汝南, 照井君典, 土岐力. 新生児科医のための TAM 診療ガイドライン TAM 発症の分子機構. *日本周産期・新生児医学会雑誌* 2013; 49: 20-22. 査読無.

伊藤悦朗, 土岐力. Down syndrome associated myeloid disorders. *血液フロンティア* 2013; 24: 47-53. 査読無.

Imamura T, Iwamoto S, Kanai R, Shimada A, Terui K, Osugi Y, Kobayashi R, Tawa A, Kosaka Y, Kato K, Horie H, Horibe K, Oda M, Adachi S; Japan Association of

Childhood Leukaemia Study. Outcome in 146 patients with paediatric acute myeloid leukaemia treated according to the AML99 protocol in the period 2003-06 from the Japan Association of Childhood Leukaemia Study. *Br J Haematol* 2012; 159: 204-10. 査読有.

Taga T, Saito AM, Kudo K, Tomizawa D, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Iwamoto S, Nakayama H, Takahashi H, Tawa A, Shimada A, Taki T, Kigasawa H, Koh K, Adachi S. Clinical characteristics and outcome of refractory/relapsed myeloid leukemia in children with Down syndrome. *Blood* 2012; 120: 1810-5. 査読有.

Kanegane H, Yang X, Zhao M, Yamato K, Inoue M, Hamamoto K, Kobayashi C, Hosono A, Ito Y, Nakazawa Y, Terui K, Kogawa K, Ishii E, Sumazaki R, Miyawaki T. Clinical features and outcome of X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (SAP deficiency) in Japan identified by the combination of flow cytometric assay and genetic analysis. *Pediatr Allergy Immunol* 2012; 23: 488-493. 査読有.

Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, Wang R, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kitoh T, Goi K, Kudo K, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 2012; 119: 2376-84. 査読有.

Yazaki M1, Kamei M, Ito Y, Konno Y, Wang R, Toki T, Ito E. A novel mutation of ribosomal protein S10 gene in a Japanese patient with diamond-Blackfan anemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2012; 34: 293-5. 査読有.

伊藤悦朗, 土岐力. Down 症に伴う骨髄増殖症. *日本臨床* 2012; 70: 687-91. 査読無.

Kudo K, Terui K, Sasaki S, Kamio T, Sato T, Ito E. CD7-positive acute myelomonocytic leukemia with trisomy 21 as a sole acquired chromosomal abnormality in two adolescents. *Leuk Res* 2011; 35: e167-168. 査読有.

Zhao M, Kanegane H, Kobayashi C, Nakazawa Y, Ishii E, Kasai M, Terui K, Gocho Y, Imai K, Kiyasu J, Nonoyama S, Miyawaki T. Early and rapid detection of X-linked lymphoproliferative syndrome with SH2D1A mutations by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2011; 80: 8-13. 査読有.

土岐力, 伊藤悦朗. 一過性骨髓異常増殖症(TAM)発症の分子機構. 日本小児血液学会雑誌 2011; 25: 171-8. 査読無.

〔学会発表〕(計9件)

Yoshida K, Toki T, Park MJ, Okuno Y, Shiraishi Y, Sanada M, Kon A, Nagata Y, Sato-Otsubo A, Sato Y, Wang RN, Terui K, Kanazaki R, Shiba N, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Hasegawa D, Nakamura K, Kanegane H, Tsukamoto K, Adachi S, Miyano S, Kojima S, Izraeli S, Hayashi Y, Ito E, and Ogawa S. Genetic basis of myeloid proliferation related to Down syndrome. 54<sup>th</sup> American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. 2012.12.8-11. Atlanta, GA.

才田 聡, 渡邊 健一郎, 佐藤 亜以子, 照井 君典, 吉田 健一, 奥野 友介, 土岐力, 王 汝南, 白石 友一, 宮野 悟, 加藤 格, 森嶋 達也, 梅田 雄嗣, 平松 英文, 藤野 寿典, 足立 壮一, 丹羽 明, 中畑 龍俊, 伊藤 悦朗, 小川 誠司, 平家 俊男. NOG マウスを用いた TAM の病態解析. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2012.11.30-12.2, 横浜.

伊藤 悦朗, 金崎 理香, 王 汝南, 照井 君典, 土岐力. 新生児科医のための TAM 診療ガイドライン TAM 発症の分子機構. 第 48 回日本周産期・新生児医学会学術集会, 2012.7.8-10, 大宮市.

伊藤 悦朗, 金崎 里香, 王 汝南, 佐藤 知彦, 照井 君典, 土岐力. 小児科悪性腫瘍 Down 症候群に伴う TAM 発症の分子機構. 第 22 回日本産婦人科・新生児血液学会学術集会, 2012.6.29-30, 津市.

Hanada I, Terui K, Toki T, Kudo K, Sato T, Kamio T, Sasaki S, Takahashi Y, Hayashi Y, Sugita K, Kojima S, Koike K, Kosaka Y, Kobayashi M, and Ito E. *JAK2* mutations and *CRLF2* rearrangements in Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia in Japan. 53<sup>th</sup> American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. 2011.12.10-13. San Diego, CA.

Toki T, Kobayashi E, Kanazaki R, Wang RN, Terui K, Kanegane H, Maeda M, Endo M, Mizuochi T, Adachi S, Hayashi Y, Shimizu R, Yamamoto M, and Ito E. *GATA1* mutants lacking Rb-binding motif observed in transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome. 53<sup>th</sup> American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. 2011.12.10-13. San Diego, CA.

花田 勇, 照井 君典, 土岐力, 工藤 耕, 佐藤 知彦, 神尾 卓哉, 佐々木 伸也, 高橋 良博, 林 泰秀, 杉田 完爾, 小島

勢二, 小池 健一, 小阪 嘉之, 小林 正夫, 伊藤 悦朗. 小児 ALL における *CRLF2*, *IKZF1*, *JAK2* 遺伝子の臨床的意義 ダウン症候群関連 ALL の発症における *JAK2*, および *CRLF2* 遺伝子異常の解析. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2011.11.25-27, 前橋.

吉田 健一, 土岐力, 朴 明子, 永田 安伸, 王 汝南, 白石 友一, 真田 昌, 昆 彩菜, 佐藤 亜衣子, 長崎 正朗, 宮野 悟, 金兼 弘和, 川上 清, 加藤 剛二, 小島 勢二, 林 泰秀, 伊藤 悦朗, 小川 誠司. ダウン症候群に合併した一過性骨髓増殖症(TAM)および急性巨核芽球性白血病(AMKL)の全エクソシーケンス. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2011.11.25-27, 前橋.

多賀 崇, 齋藤 明子, 工藤 寿子, 富澤 大輔, 照井 君典, 盛武 浩, 木下 明俊, 岩本 彰太郎, 中山 秀樹, 高橋 浩之, 多和 昭雄, 嶋田 明, 気賀沢 寿人, 康勝好, 滝 智彦, 足立 壮一, JPLSG AML 委員会. ダウン症候群に発症した急性骨髓性白血病(AML-DS)の寛解導入不能・再発例の多施設共同後方視的研究. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2011.11.25-27, 前橋.

〔図書〕(計1件)

土岐力, 伊藤悦朗. ダウン症に合併した一過性骨髓異常増殖症における *GATA1* 変異と急性白血病への進展. Annual Review 血液 2012. 高久史磨ら編. 中外医学社, 87-91, 2012.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~pedia/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

照井 君典 (TERUI KIMINORI)

弘前大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 00333740

(2) 研究分担者

土岐 力 (TOKI TSUTOMU)

弘前大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号: 50195731