

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：82606
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2012～2014
課題番号：24591567
研究課題名(和文) 小児急性骨髄性白血病における新規予後不良サブグループの診断法開発と分子背景解析

研究課題名(英文) Development of a diagnostic test to detect a novel poor prognostic subgroup in pediatric AML

研究代表者
市川 仁 (Ichikawa, Hitoshi)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・部門長

研究者番号：30201924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：小児AMLの多施設共同治療研究AML99研究の登録症例の解析から、小児AMLにおいてEVI1遺伝子もしくはMEL1遺伝子の高発現が約30%の症例に見られること、これらの高発現症例がきわめて極めて予後不良であるとともにほとんどの予後不良症例をカバーすること、幹細胞移植治療によりこれらの症例の予後の改善が期待できること等を見出した。さらに、定量RT-PCRによる検査法を開発するとともに、AML-05研究の登録症例を用いた検証を行い、EVI1/MEL1高発現が小児AMLの層別化治療に非常に有用な予後因子となることを示した。

研究成果の概要(英文)：From gene expression profiling data of 130 Japanese pediatric AML patients registered in AML99 study, we found that EVI1 and MEL1 were overexpressed in approximately 30% of patients, and that their high expression was significantly associated with inferior survival. Because of their mutually exclusive expression, a combined evaluation of their high expression enabled a clear distinction of patients with inferior survival ($P < 0.00001$ in EFS and OS). This association was confirmed by quantitative RT-PCR analysis of 81 patients registered in AML-05 study ($P = 0.00017$ in EFS, $P = 0.00028$ in OS). We believe that the combined estimation of EVI1 and MEL1 expression will be an effective method for risk stratification of pediatric AML patients.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：小児白血病 急性骨髄性白血病 遺伝子発現 予後因子 治療選択 層別化治療 融合遺伝子

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病 (AML) においては、発症に関わる染色体異常、遺伝子変異がこれまでに多数明らかにされ、その一部は治療反応性・予後とも関連することから、リスク分類のための予後マーカーとして用いられている。たとえば、わが国の小児 AML の多施設共同治療研究 AML99 研究、AML-05 研究においては、t(8;21)転座、inv(16)逆位は予後良好マーカーとして、monosomy 7、5q(-)、t(16;21)転座は予後不良マーカーとして用いられ、リスク分類/層別化治療が行われている。これらの他にも、C/EBP 遺伝子変異は予後良好と、FLT3 遺伝子 internal tandem duplication (FLT3-ITD) 変異は予後不良と関連することが知られ、FLT3-ITD 変異は AML-05 研究のリスク分類にも用いられている。一方で、正常核型 AML を始めとする特異的染色体異常を持たない症例の多くに関しては適切な予後マーカーがなく、十分なリスク分類が出来ていない。したがって、小児 AML の層別化治療においては、依然として新たな予後マーカーが必要とされている。

2. 研究の目的

本研究は、小児 AML の多施設共同治療研究 AML99 研究に登録された症例の遺伝子発現プロファイル解析から、我々が新たに見出した予後不良サブグループ [NUP98/NSD1 融合遺伝子陽性症例及びそれらと共通の遺伝子発現プロファイル (N/N signature) を示す NUP98/NSD1-like 症例: N/N signature 陽性症例と総称] の診断技術を開発し、リスク分類における有用性を検証するとともに、その予後不良の分子背景を明らかにすることを当初の目的としていた。しかし、その後のデータ再解析から、N/N signature と重複し、より有望な予後不良因子として EVI1 遺伝子 / MEL1 遺伝子の高発現が同定されたため、EVI1 / MEL1 高発現のリスク分類における有用性の評価と分子背景の解析を本研究の新たな目的とした。

3. 研究の方法

(1) EVI1 / MEL1 高発現と予後との関連の解析

Affymetrix 社 Human Genome U133 Plus 2.0 アレイを用いて以前に取得した、AML99 研究登録症例 130 例の日本人小児 AML 患者の遺伝子発現データを用い、病型、核型・融合遺伝子、遺伝子変異、予後等の情報と比較解析を行った。さらに、幹細胞移植治療を受けた症例と受けなかった症例の予後を比較し、EVI1 / MEL1 高発現症例に対する幹細胞移植治療の有効性を評価した。

(2) EVI1 / MEL1 高発現の定量 RT-PCR 検査法の確立

Thermo Fisher Scientific 社の TaqMan Gene Expression Assay を用い、クローニン

グした cDNA を標準検体として、検体中の ABL1、EVI1、MEL1 遺伝子 mRNA の分子数を測定するアッセイ系を構築した。ABL1 に対する EVI1、MEL1 の mRNA 存在比を用いて発現レベルを判定し、マイクロアレイ解析データとの比較から高発現の境界値を決定した。

(3) EVI1 / MEL1 高発現と予後不良との関連の検証

EVI1 / MEL1 高発現と予後不良との関連の検証は、AML99 研究の後継多施設共同治療研究である AML-05 研究の登録症例 81 例を用いて行った。上記定量 RT-PCR 検査法を用いて EVI1 / MEL1 高発現症例を抽出し、平成 24 年時点での予後調査の結果を用いて EVI1 / MEL1 高発現の有無と予後不良との関連を評価した。

(4) 新規融合遺伝子の探索

新規融合遺伝子の探索は、次世代シーケンサーを用いた mRNA シークエンシングにより行った。Illumina 社の TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 を用いてライブラリーを作製し、Illumina 社の HiSeq シークエンサーを用いて 75 塩基の paired end read で読取りを行った。得られたデータを deFuse 及び TopHat-Fusion プログラムを用いて解析し、新規の融合遺伝子候補を抽出した。これらの融合遺伝子候補については、RT-PCR により検証を行った。

4. 研究成果

(1) AML99 研究登録症例を用いた EVI1 及び MEL1 高発現症例の解析

AML99 研究登録症例 130 例の遺伝子発現データを基に N/N signature に関わる遺伝子を再検討する過程で、N/N signature の中で予後と最も強く関連するものが MEL1 遺伝子の高発現であることを見出した。さらに、MEL1 の相同遺伝子 (paralog) である EVI1 遺伝子も、その高発現が予後不良と関連することが報告されていたため、EVI1 / MEL1 の高発現症例について解析を行った。その結果、

EVI1 の高発現及び MEL1 の高発現は、それぞれ約 15% の症例に見られること

EVI1 / MEL1 の高発現は、低リスク群である t(8;21)、inv(16)、t(15;17) 陽性症例には見られないこと

EVI1 高発現は主に MLL 遺伝子再構成を有する骨髄単球系白血病 (AML-M4、M5) 及び巨核球系白血病 (AML-M7) に、MEL1 高発現は骨髄球系白血病 (AML-M0、M1、M2) 及び MLL 遺伝子再構成を有しない骨髄単球系白血病に見られ、相互排他的であること

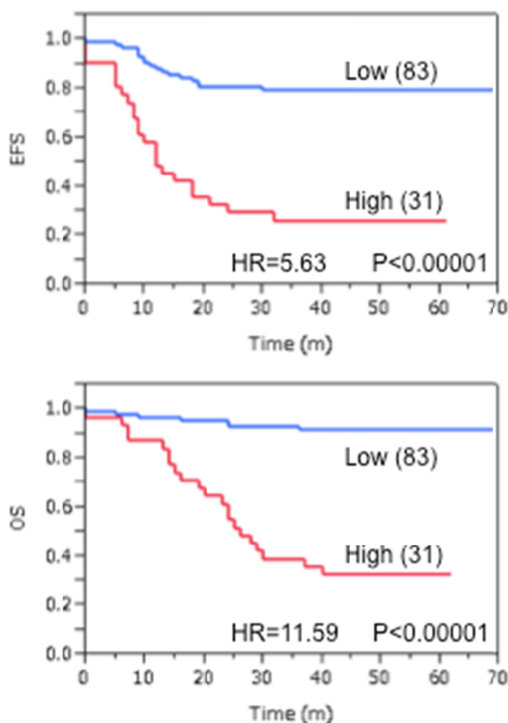
巨核球系白血病を除き、EVI1 / MEL1 高発現症例は極めて予後不良であること (4-year EFS: 26%, 4-year OS: 32%; HR=5.63,

P<0.00001 in EFS; HR=11.59, P<0.00001 in OS)

既存の主要予後マーカーである予後良好核型[t(8;21)、inv(16)、t(15;17)]及びFLT3-ITD変異と比較した多変量解析において、EVI1 / MEL1高発現は有意な予後不良因子であること (HR=4.09, P=0.0020 in EFS; HR=16.82, P=0.00005 in OS)

EVI1 / MEL1高発現症例の中で、幹細胞移植治療を受けた症例の予後は同治療を受けなかった症例に比べ良好なこと [EFS: 73% (8/11) vs 14% (2/14), P=0.0051; OS: 64% (7/11) vs 21% (3/14), P=0.049] 等が、明らかになった。

図1 . 巨核球系白血病を除くAML99研究登録症例114例におけるEVI1 / MEL1高発現症例と低発現症例の予後の比較



(2) 定量RT-PCRによるEVI1 / MEL1高発現症例の検出法の開発

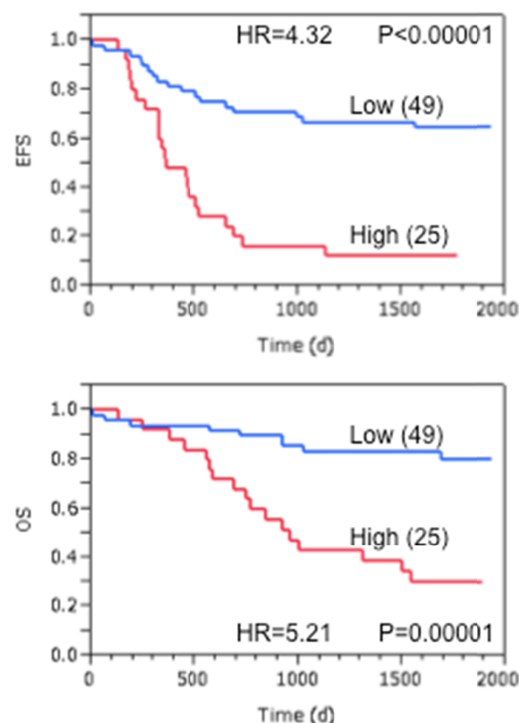
マイクロアレイを用いてEVI1、MEL1の発現レベルを測定することは高コストであることから、定量RT-PCRによりEVI1 / MEL1高発現症例を検出するアッセイ系を開発した。EVI1、MEL1に加え、比較のための基準遺伝子としてABL1の発現レベル (mRNA分子数) を定量RT-PCRにより測定し、EVI1 / ABL1比、MEL1 / ABL1比が0.1以上の時を高発現と判定した。

(3) AML-05研究登録症例を用いたEVI1及びMEL1高発現症例の解析

AML-05研究登録症例81例を用いて、EVI1 / MEL1高発現と予後不良の相関の検証を行

った。EVI1 / MEL1高発現症例は、上記RT-PCR法を用いて行い、81例中12例がEVI1高発現を、15例がMEL1高発現を示した。これらの症例の解析においても、EVI1 / MEL1高発現と予後不良の相関は再現された (4-year EFS: 12%, 4-year OS: 30%; HR=4.32, P<0.00001 in EFS; HR=5.21, P=0.00001 in OS)。この結果から、EVI1 / MEL1高発現は小児AMLの層別化治療に非常に有用な予後因子となると考えられた。

図2 . 巨核球系白血病を除くAML-05研究登録症例74例におけるEVI1 / MEL1高発現症例と低発現症例の予後の比較



(4) AML99研究登録症例を用いたEVI1及びMEL1高発現症例の分子背景の解析

AML99研究登録症例においては、21例のEVI1高発現症例中8例にMLL融合遺伝子が、20例のMEL1高発現症例中6例にNUP98/NSD1融合遺伝子が検出されたため、これらの融合遺伝子がEVI1 / MEL1高発現に関わっている可能性が考えられた。そこで、MLL融合遺伝子陰性EVI1高発現症例及びNUP98/NSD1陰性MEL1高発現症例を中心に、26例の次世代シーケンサー全トランスクリプトーム解析を行い、融合遺伝子を探索した。その結果、見落とされていたMLL融合遺伝子が1例のEVI1高発現症例に、NUP98/NSD1が1例のMEL1高発現症例において見出された。また、いくつかの新規融合遺伝子が同定されたが、EVI1 / MEL1高発現症例の約半数で融合遺伝子は検出できなかった。この結果から、EVI1高発現とMLL融合遺

伝子、MEL1高発現とNUP98-NSD1の強い相関が改めて示されるとともに、EVI1 / MEL1高発現には融合遺伝子以外の要因も関わっていることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Jo A, Mitani S, Shiba N, Hayashi Y, Hara Y, Takahashi H, Tsukimoto I, Tawa A, Horibe K, Tomizawa D, Taga T, Adachi S, Yoshida T, Ichikawa H. High expression of EVI1 and MEL1 is a compelling poor prognostic marker of pediatric AML. *Leukemia* 29: 1076-1083, 2015.

doi: 10.1038/leu.2015.5

Shiba N, Ichikawa H, Taki T, Park MJ, Jo A, Mitani S, Kobayashi T, Shimada A, Sotomatsu M, Arakawa H, Adachi S, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Hayashi Y. NUP98-NSD1 gene fusion and its related gene expression signature are strongly associated with a poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 52: 683-693, 2013.

doi: 10.1002/gcc.22064

[学会発表](計2件)

三谷幸代、坂本裕美、柴 徳生、林 泰秀、吉田輝彦、市川 仁 . RNA シークエンシングによる小児 AML の融合遺伝子探索 . 第 72 回日本癌学会学術総会 . 2013 年 10 月 4 日 . パシフィコ横浜 (横浜市).

三谷幸代、城 青衣、嶋田 明、柴 徳生、月本一郎、鶴澤正仁、林 泰秀、市川 仁 . 2 遺伝子の発現に基づく高リスク小児急性骨髄性白血病の同定 . 第 71 回日本癌学会学術総会 . 2013 年 9 月 19 日 . ホテルロイトン札幌 (札幌市).

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

市川 仁 (ICHIKAWA, Hitoshi)

国立がん研究センター・研究所・部門長

研究者番号 : 30201924

(2) 研究分担者

林 泰秀 (HAYASHI, Yasuhide)

群馬県衛生環境研究所・研究企画係・研究員

研究者番号 : 30238133