

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791054

研究課題名(和文)小児骨髄系造血悪性腫瘍疾患におけるRAS変異体細胞モザイクの解析

研究課題名(英文)Somatic mosaicism of RAS pathway gene mutations in pediatric myeloid malignancies

研究代表者

村松 秀城 (Muramatsu, Hideki)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00572570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：若年性骨髄単球性白血病(JMML)はまれな小児固有の白血病である。JMMLの原因遺伝子として、PTPN11、NRAS、KRAS、NF1、CBLの体細胞変異が知られているが、同じ遺伝子の生殖細胞系列変異が各種の先天性遺伝疾患の原因ともなる。我々は血液細胞以外の検体(爪・毛髪・口腔粘膜)由来のDNAにおける遺伝子変異の解析を通じて、世界発となる2例のoncogenic NRAS mutationの体細胞モザイク症例2例を同定し、英文誌上(Doisaki S, et al., Blood 2012)で報告した。さらに多数例のJMML症例で解析を行い、合計6例の体細胞モザイクが疑われる症例を同定した。

研究成果の概要(英文)：Juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) is an aggressive myeloid neoplasm of early childhood characterized by the excessive proliferation of myelomonocytic cells. Somatic mutations in PTPN11, NRAS, KRAS, NF1, or CBL, which induce deregulation of the RAS signaling pathway, are responsible for the pathogenesis of JMML. We screened mutational status of JMML patients, and reported 2 patients with somatic mosaicism of oncogenic NRAS mutation (Doisaki S, et al., Blood 2012). In total, we could identify 6 patients of JMML with somatic mosaicism of RAS pathway genes.

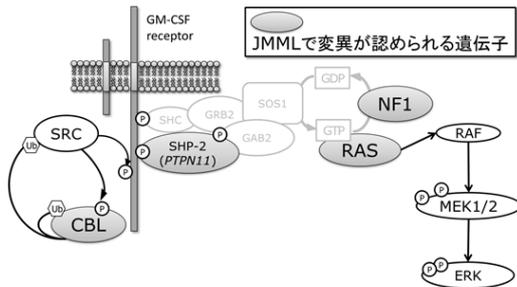
研究分野：小児科学

キーワード：若年性骨髄単球性白血病 RAS 体細胞モザイク

1. 研究開始当初の背景

若年性骨髄単球性白血病 (Juvenile myelomonocytic leukemia; JMML) はまれな小児特有の白血病である。JMML の原因遺伝子として、PTPN11、NRAS、KRAS、NF1、CBL の変異が知られており、約 90% の症例でこれらの遺伝子変異がほぼ相互排他的に認められる (図 1)。

図 1. JMML で変異が認められる遺伝子群



これらの遺伝子変異は体細胞変異 (somatic mutation) であるが、同じ遺伝子の生殖細胞系列変異 (germline mutation) が Noonan 症候群 (PTPN11)、Cardio-Facio-Cutaneous (CFC) 症候群 (RAS)、germline CBL 症候群 (CBL) などの先天性遺伝疾患の原因であることが近年相次いで明らかとなった。一方、Noonan 症候群の一部症例においては、新生児期に自然寛解する JMML 様の白血球増多症が見られることが知られており、RAS pathway 関連遺伝子の germline 変異および somatic 変異は、お互いに非常に興味深い関係にあると考えられる。

2. 研究の目的

JMML をはじめとした多数例の小児骨髄系造血悪性腫瘍疾患における RAS 変異の体細胞モザイクの有無を検索・解析し、その臨床的意義を検討することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

小児骨髄系造血腫瘍の患者検体 (JMML、小児急性骨髄性白血病、小児慢性骨髄単球性白血病) を対象に、パイロシーケンス法などにより患者の血液細胞以外の検体 (爪・毛髪・口腔粘膜) 由来の DNA を用いて遺伝子変異解析を実施し、RAS 経路の遺伝子変異の体細胞モザイクのスクリーニングを行い、その臨床的意義について検討を行った。

4. 研究成果

世界発となる 2 例の oncogenic NRAS mutation の体細胞モザイク症例 2 例を同定し、英文誌上で報告した (Doisaki S, et al., Blood 2012) (表 1)。

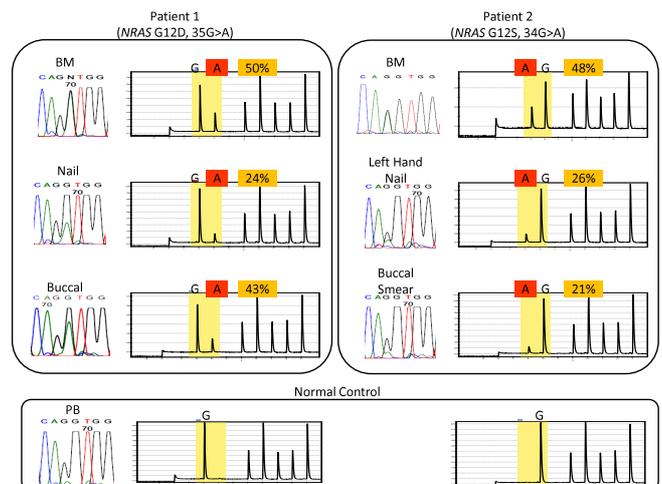
表 1 NRAS モザイク例の 2 例の患者背景

	Patient 1	Patient 2
Age (Months)	10	10
Sex	Male	Male
Liver, cm	12	5
Spleen, cm	8	10
White blood cells, $\times 10^9/L$	72.1	31.8
Monocytes, %	18.5	20
Blasts, %	4	2
Hb, g/dL	8.9	5.4
Platelets, $\times 10^9/L$	59	100
HbF, %	2.1	1.7
Bone marrow blasts, %	7	5
Karyotype	46,XY [20/20]	46,XY [20/20]
Monosomy 7 (FISH)	Negative	Negative
Spontaneous colony formation	Positive	Positive
Gene mutation	NRAS, G12D 35G>A	NRAS, G12S 34G>A
Treatment	IFN-alpha-2b, 6-MP	None
Observation period, months	231	103
Outcome	Alive	Alive

2 例はともに JMML としても低年齢 (生後 10 か月) で発症した男児例であった。染色体異常は認めず、同種造血幹細胞移植なしで長期間の生存が得られていた (231 か月、103 か月)。

変異アリの定量的解析が可能なパイロシーケンス法による解析を行ったところ、NRAS 変異が様々な割合で爪・口腔粘膜から検出された。患者 1 では、骨髄由来 DNA で 50% に変異が認められた NRAS c.35G>A 変異が、爪由来 DNA では 24% に、口腔粘膜由来 DNA では 43% に検出された。患者 2 では、骨髄由来 DNA で 48% に認められた NRAS c.34G>A 変異が、爪由来 DNA では 26% に、口腔粘膜由来 DNA では 21% で検出された (図 2)。

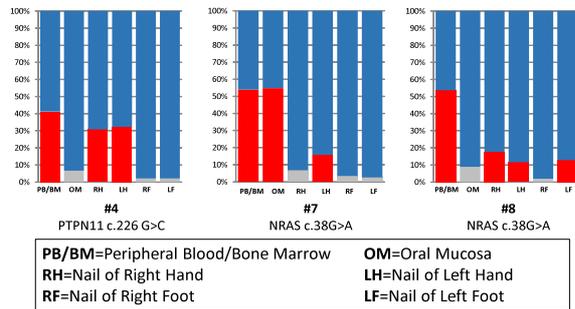
図 2. Oncogenic NRAS モザイクの 2 例のパイロシーケンス法による解析



さらに新規 JMML 症例で爪・口腔粘膜 DNA を用いてスクリーニングを行い、新たに 4 例の RAS 経路遺伝子の体細胞モザイクが疑わ

れる症例を解析した (図 3・4・5)。

図 3. 新たに同定された RAS 経路遺伝子の体細胞モザイクのうち 3 症例のまとめ



はじめに同定した 2 例とあわせ、合計 6 例 (PTPN11 変異 2 例、NRAS 変異 4 例) の体細胞モザイク症例が同定された。

PTPN11 変異例のうち 1 例は同種臍帯血移植を施行しており、移植前後の変化を評価することが可能であった。移植前には両足手足の爪・口腔粘膜に異なる割合の PTPN11 変異が検出されていたが (図 3)、移植後 17 か月時点での爪・口腔粘膜由来 DNA からは、PTPN11 変異は検出されなかった。また、移植後に採取した皮膚由来線維芽細胞 DNA では、PTPN11 変異アリルは認められなかった。

図 4. 移植前 (症例 6) の遺伝子解析結果

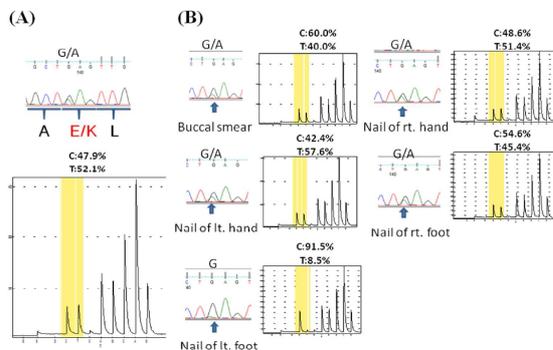
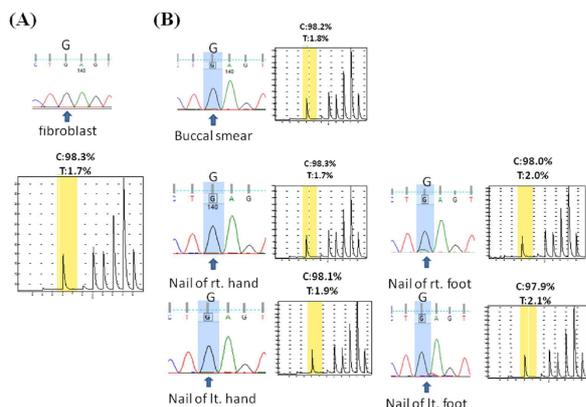


図 5. 移植後 (症例 6) の遺伝子解析結果



造血幹細胞移植後の患者の爪検体から、造血幹細胞移植ドナー由来の DNA がキメリズム解析で検出されることがあることが報告されている。本症例では、移植前から JMML 由来の骨髄細胞が、口腔粘膜のみならず爪細胞に分化・混入していたことが推察された。また、同種造血幹細胞移植後には JMML 細胞が根絶され、PTPN11 変異が爪 DNA から消失した可能性が考えられる。RAS 経路遺伝子変異が血液細胞以外の組織 (爪・口腔粘膜) で低頻度に認められる事象の原因を考察するうえで、重要な所見であると考えられた。

これら JMML の一部の症例で認められる血液以外の組織における低頻度 RAS 経路遺伝子変異アリルの由来が、発生直後の遺伝子変異に由来する狭義の体細胞モザイクによるものか、症例 6 のように JMML 細胞が血液以外の細胞に分化・混入しているのか、今後慎重に検討を重ねる必要があるものと考えられた。

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 20 件) (全て査読あり)

- Hyakuna N, Muramatsu H, Higa T, Chinen Y, Wang X, Kojima S. Germline mutation of CBL is associated with moyamoya disease in a child with juvenile myelomonocytic leukemia and Noonan syndrome-like disorder. *Pediatr Blood Cancer*. 2015 62(3):542-544.
- Kar SA, Jankowska A, Makishima H, Visconte V, Jerez A, Sugimoto Y, Muramatsu H, Traina F, Afable M, Guinta K, Tiu RV, Przychodzen B, Sakaguchi H, Kojima S, Sekeres MA, List AF, McDevitt MA, Maciejewski JP. Spliceosomal gene mutations are frequent events in the diverse mutational spectrum of chronic myelomonocytic leukemia but largely absent in juvenile myelomonocytic leukemia. *Haematologica*. 2013 98(1):107-113.
- Makishima H, Yoshida K, Nguyen N, Przychodzen B, Sanada M, Okuno Y, Ng KP, Gudmundsson KO, Vishwakarma BA, Jerez A, Gomez-Segui I, Takahashi M, Shiraishi Y, Nagata Y, Guinta K, Mori H, Sekeres MA, Chiba K, Tanaka H, Muramatsu H, Sakaguchi H, Paquette RL, McDevitt MA, Kojima S, Sauntharajah Y, Miyano S, Shih LY, Du Y, Ogawa S, Maciejewski JP. Somatic SETBP1 mutations in myeloid malignancies. *Nat Genet*. 2013 45(8):942-946.
- Sakaguchi H, Okuno Y, Muramatsu H, Yoshida K, Shiraishi Y, Takahashi M,

- Kon A, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Makishima H, Wang X, Xu Y, Doisaki S, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Yoshida N, Maciejewski JP, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Exome sequencing identifies secondary mutations of SETBP1 and JAK3 in juvenile myelomonocytic leukemia. *Nat Genet.* 2013 45(8):937-941.
5. Yoshida K, Toki T, Okuno Y, Kanezaki 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(11):1293-1299.
 6. Yoshimi A, Kamachi Y, Imai K, Watanabe N, Nakadate H, Kanazawa T, Ozono S, Kobayashi R, Yoshida M, Kobayashi C, Hama A, Muramatsu H, Sasahara Y, Jakob M, Morio T, Ehl S, Manabe A, Niemeyer C, Kojima S. Wiskott-Aldrich syndrome presenting with a clinical picture mimicking juvenile myelomonocytic leukaemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2013 60(5):836-841.
 7. Yoshida N, Doisaki S, Kojima S. Current management of juvenile myelomonocytic leukemia and the impact of RAS mutations. *Paediatr Drugs.* 2012 14(3):157-163.
 8. Doisaki S, Muramatsu H, Shimada A, Takahashi Y, Mori-Ezaki M, Sato M, Kawaguchi H, Kinoshita A, Sotomatsu M, Hayashi Y, Furukawa-Hibi Y, Yamada K, Hoshino H, Kiyoi H, Yoshida N, Sakaguchi H, Narita A, Wang X, Ismael O, Xu Y, Nishio N, Tanaka M, Hama A, Koike K, Kojima S. Somatic mosaicism for oncogenic NRAS mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood.* 2012 120(7):1485-1488.
- [学会発表] (計15件)
1. Okuno Y, Kawashima N, Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Screening of candidate RAS pathway-related genes in juvenile myelomonocytic leukemia using CRISPR/Cas system. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会. 2014年11月28日. 岡山県岡山市 (岡山コンベンションセンター) .
 2. Wang X, Nishikawa E, Muramatsu H, Okuno Y, Sekiya Y, Kawashima N, Xu Y, Narita A, Doisaki S, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Mutational analysis of RRAS in Japanese juvenile myelomonocytic leukemia patient. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会. 2014年11月28日. 岡山県岡山市 (岡山コンベンションセンター) .
 3. 川島 希、関屋 由子、成田 敦、王 希楠、土居崎 小夜子、奥野 友介、村松 秀城、入江 正寛、濱 麻人、高橋 義行、小島 勢二 . Quantification of GM-CSF hypersensitivity and suppression by an MEK1/2 inhibitor of JMML cells. 第76回日本血液学会学術集会. 2014年11月1日. 大阪府大阪市 (大阪国際会議場) .
 4. Muramatsu H, Sakaguchi H, Wang X, Yoshida K, Okuno Y, Sanada M, Xu Y, Doisaki S, Narita A, Kawashima N, Hama A, Takahashi Y, Yoshida N, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Makishima H, Maciejewski J.P, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Clinical and Genetic Characterization Of Patients With C-CBL Mutated Juvenile Myelomonocytic Leukemia By Whole-Exome/Deep Sequencing. The 55th ASH Annual Meeting and Exposition. Dec.7, 2013. New Orleans, USA.
 5. Sakaguchi H, Muramatsu H, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Makishima H, Wang X, Xu Y, Doisaki S, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Yoshida N, Maciejewski JP, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Molecular Spectrum of Juvenile Myelomonocytic Leukemia Identified by Whole exome sequencing. The 18th Congress of EHA. Jun.14, 2013. Stockholm, Sweden.
 6. Muramatsu H, Sakaguchi H, Xu Y, Yoshida K, Okuno Y, Hama A, Takahashi Y, Makishima H, Maciejewski J.P, Ogawa S, Kojima S. Clinical and genetic characterization of 17 Juvenile myelomonocytic leukemia patients with c-CBL mutations. The 12th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes. May.10, 2013. Berlin, Germany.
 7. Muramatsu H, Okuno Y, Sakaguchi H, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Makishima H, Wang X, Xu Y, Doisaki S, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Yoshida N, Maciejewski J.P, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Whole exome analysis reveals spectrum of gene mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. 54th Annual Meeting of the American Society of Hematology. Dec.9, 2012. Atlanta, USA.
 8. Muramatsu H, Doisaki S, Shimada A, Takahashi Y, Ezaki M, Sato M, Kawaguchi

H, Kinoshita A, Sotomatsu M, Hayashi Y, Furukawa Y, Yamada K, Hoshino H, Kiyoi H, Yoshida N, Sakaguchi H, Narita A, Wang X, Ismael O, Xu Y, Nishio N, Tanaka M, Hama A, Koike K, Kojima S. Somatic mosaicism for oncogenic NRAS mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. 6th International Symposium on MDS and Bone Marrow Failure Syndromes in Childhood. Prague, Nov. 7, 2012. Czech Republic.

9. Muramatsu H, Sakaguchi H, Koike K, Sanada M, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Makishima H, Wang X, Xu Y, Doisaki S, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Yoshida N, Maciejewski JP, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Comprehensive genetic analysis by deep sequencing in juvenile myelomonocytic leukemia. 6th International Symposium on MDS and Bone Marrow Failure Syndromes in Childhood. Prague, Nov. 7, 2012. Czech Republic.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村松 秀城 (MURAMATSU, Hideki)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00572570