

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461579

研究課題名(和文) ダウン症関連急性巨核芽球性白血病の発がんメカニズムの解明

研究課題名(英文) The investigation into the leukemogenesis in patients with Down syndrome associated acute megakaryoblastic leukemia

研究代表者

濱 麻人 (Hama, Asahito)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30566964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ダウン症(DS)児において、一過性異常骨髄増殖症(TAM)から急性巨核芽球性白血病(AMKL)を発症するメカニズムを解明するために、DSの新生児期の血液検体において次世代シーケンサーを用いて遺伝子解析を行った。DS新生児39例のうちTAMを発症した27例中18例(67%)でGATA1遺伝子変異が確認された。DS-AMKL30例のうちGATA1遺伝子変異は26例(87%)で確認された。さらに、GATA1変異に加えて、JAK3変異、p53変異、およびRAD21変異がそれぞれ3例ずつ確認された。

研究成果の概要(英文)：To reveal the mechanism of the development from transient abnormal myelopoiesis (TAM) to acute megakaryoblastic leukemia (AMKL) in neonates with Down syndrome (DS), we performed gene mutation analysis for blood of DS neonates using the next generation sequencing. Of 39 neonates with DS, 27 developed TAM. Out of them, 18 (67%) had GATA1 gene mutation in their blood. Out of 30 children with DS-AMKL, 26 (87%) had GATA1 gene mutation. In addition, JAK3, p53, and RAD21 gene mutations were found in 3 children each.

研究分野：小児血液腫瘍学

キーワード：ダウン症 一過性異常骨髄増殖症 急性巨核芽球性白血病 GATA1 コヒーシン CTCF 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

ダウン症 (DS) 児の約 10% が、新生児期に一過性異常骨髄増殖症 (TAM) を発症し、一旦は自然軽快するものの、その約 20% が 4 歳までに急性巨核芽球性白血病 (DS-AMKL) を発症することが知られている。2002 年、Wechsler らは DS-AMKL において *GATA1* 遺伝子の後天的変異を、検討した全症例に認めたと報告した (Wechsler J, et al. *Nat Genet* 2002)。その後、TAM においても同様に、*GATA1* 変異の存在が確認された。白血病の多段階発症説から推察すると、TAM から DS-AMKL への進展には、*GATA1* の変異に加えて、新たな driver 変異の獲得が関与していると考えられる。

最近、我々は、TAM 15 例、DS-AMKL 14 例において、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析 (全エクソーム解析) を施行し、TAM から DS-AMKL への進展に関与する遺伝子群を発見した (Yoshida K, Okuno Y, Hama A et al. *Nat Genet* 2013)。TAM で検出される変異のほとんどは、*GATA1* 変異であった。DS-AMKL では、*GATA1* 変異に加えて、*RAD21*、*STAG2*、*NRAS*、*CTCF*、*DCAF7*、*EZH2*、*KANSL1* および *TP53* 遺伝子変異が複数の検体で確認された。これら 8 つの遺伝子について、より多数の検体 (TAM 41 例、DS-AMKL 49 例) を解析した。コヒーシオン関連遺伝子 (*RAD21*、*STAG2*) 変異は TAM では確認されなかったが、DS-AMKL では 53% (26 例) で確認された。*CTCF* 遺伝子変異は TAM では 2% (1 例)、DS-AMKL では 20% (10 例) で確認された。エピジェネティクス関連遺伝子 (*EZH2*、*KANSL1*) はそれぞれ DS-AMKL の 33% (16 例)、6% (3 例) で確認された。

また、TAM から DS-AMKL への進展における clonal evolution を明らかにするために、4 症例で全ゲノム解析を行った。3 例については TAM 検体における *GATA1* 変異のメジャークローンが新たな遺伝子変異を獲得して DS-AMKL に進展していることが確認された。残りの 1 症例については TAM 検体における *GATA1* 変異のメジャークローンは DS-AMKL 検体では消失し、一方で *GATA1* 変異のマイナークローンが新たな遺伝子変異を獲得して DS-AMKL に進展していた。これらの結果から、DS 児において、21 番染色体の過剰に *GATA1* 変異が加わることで TAM が発症し、その後、*GATA1* 変異クローンが新たな遺伝子変異を獲得して DS-AMKL の発症に至ることを明らかにした。しかし、この研究においては、TAM 発症時点と DS-AMKL 発症時点のみを検討しており、これらの遺伝子変異の詳細な経時変化は明らかにされていない。すなわち、TAM における自然軽快の経過や、DS-AMKL への進展、特に DS-AMKL の変異を携えたクローン発生のタイミングは解明されていない。

最近、Roberts らは DS 児 200 例の出生時の末梢血検体を用いて、芽球の割合と *GATA1* 遺伝子変異の有無を検討した結果を報告した

(Roberts I, et al. *Blood* 2013)。芽球は 195 例 (98%) で確認された。*GATA1* 遺伝子変異はサンガー法では 17 例 (9%) で確認され、いずれも芽球割合が 10% 以上の症例であった。一方、次世代シーケンサーを用いて *GATA1* 遺伝子についてターゲットシーケンスを行ったところ、*GATA1* 遺伝子変異は芽球 10% 以上の全症例 (16 例) に加えて、芽球 10% 未満の症例 88 例中 18 例 (20%) においても検出された。このことは、従来、行われてきたサンガー法では、芽球数の少ない症例においては *GATA1* 遺伝子変異の検出に限界があることを示しており、少数の *GATA1* 遺伝子変異クローンを検出し、TAM を正確に診断するためには、より感度の高い次世代シーケンサーによる解析が有用であることを示している。

これらのことから、DS 児の出生時の末梢血において次世代シーケンサーを用いて *GATA1* 変異を解析し、*GATA1* 変異が確認された症例について、経時的に DS-AMKL で変異が確認された遺伝子を解析することによって、DS 児における TAM の正確な発症頻度を明らかにするとともに、TAM における自然軽快のメカニズムおよび TAM から DS-AMKL に進展するメカニズムが明らかになるのではないかと、いう着想に至った。

2. 研究の目的

(1) DS 児の末梢血を用いて、出生時から経時的に、DS-AMKL で変異が確認された遺伝子を対象として次世代シーケンサーで解析することにより、TAM における自然軽快のメカニズムおよび TAM から DS-AMKL に進展するメカニズムを明らかにする。

(2) DS 児における TAM の正確な発症頻度、DS-AMKL におけるそれぞれの遺伝子変異の出現頻度および DS-AMKL の進展に関与する危険因子を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 対象

当施設および関連施設において出生した DS 児において、本研究に対する両親の同意が得られた DS 児の末梢血検体を収集した。臨床情報の収集検体が得られた DS 児については、出生時の末梢血血液検査データ (白血球数、白血球分画、芽球数、ヘモグロビン値、血小板数)、G-band 法による染色体分析結果を収集した。末梢血塗抹標本の評価検体が得られた DS 児の末梢血塗抹標本 (May-Giemsa 染色) を収集し、芽球割合、芽球形態およびその他の血球形態異常を評価した。末梢血検体より単核球を分離し、DNA extraction kit (QIAGEN) を用いてゲノム DNA を、RNeasy Mini

Kit (QIAGEN)を用いて RNA を抽出した。

(2) GATA1 遺伝子変異解析

次世代シーケンサー(Illumina 社, MiSeq)を用いて GATA1 遺伝子のターゲットシーケンスを行った。GATA1 遺伝子の全エクソンを Not1 制限酵素サイト付きプライマーで PCR 増幅し、Not1 による処理後に、T4 DNA Ligase により連結した。超音波処理を行い、平均 200 塩基のランダムな DNA 断片を作成した。断片化産物を NEBNext DNA sample Prep Reagent (New England Biolabs) 用いて調製した。MiSeq によるシーケンスを行い、各領域を 5,000 回以上読み取った。データは BLAT(Kent WJ. *Genome Res* 2002) をベースとした、確立済みの deep sequencing 解析パイプライン (Yoshida K, Okuno Y, Hama A et al. *Nat Genet* 2013) を用いて解析した。GATA1 遺伝子発現解析 SuperScript 逆転写酵素 (Life Technologies) を用いて cDNA を合成した。GATA1 TaqMan デザイン済みアッセイキット (Life Technologies) を用いて、ABI 7000 リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) により測定した。

(3) 経時的に採取された検体における遺伝子解析

GATA1 遺伝子変異が検出された症例については、末梢血検体を 3 カ月ごとに収集する。DNA と RNA を抽出した時点で凍結保存し、適宜解析を行う。16 標的遺伝子に対するターゲットシーケンス経時的に収集された検体のゲノム DNA を用いて、16 の遺伝子 (GATA1、RAD21、STAG2、NRAS、CTCF、DCAF7、EZH2、KANS1、TP53、KRAS、PTPN11、JAK1、JAK2、JAK3、MPL および SH2B3) について、次世代シーケンサーによるターゲットシーケンスを行う。変異を有する腫瘍細胞の割合 (variant allele frequency: VAF) を決定する。時系列的な VAF の推移から、clonal evolution を推定する。DS 児における TAM の正確な発症頻度を検討する。それぞれの遺伝子変異と臨床情報との相関を統計学的に解析する。

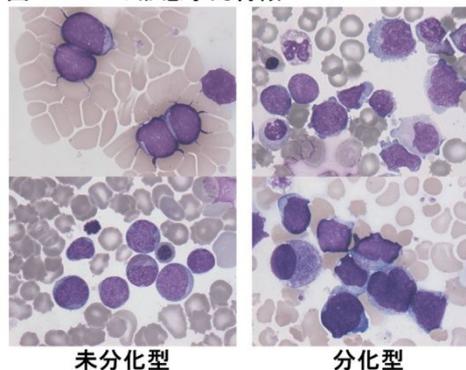
4. 研究成果

(1) DS 児の新生児期の検体における GATA1 遺伝子解析

DS 児の新生児期の血液検体は 39 例収集された。TAM を発症しなかった DS 児の末梢血白血球数の中央値は 9,200/uL であったのに対して、TAM を発症した DS 児の白血球数中央値は 28,000/uL であった。末梢血芽球割合中央

値も TAM を発症しなかった DS 児では 0%であったのに対して、TAM を発症した DS 児の末梢血芽球割合中央値は 31%であった。TAM の芽球形態は核細胞質比が高く、核網が繊細な未分化な芽球と、細胞質にプレブを形成し、巨核球への分化傾向を示す芽球の 2 種類の芽球形態が確認された (図 1)。

図 1. TAM の形態学的特徴



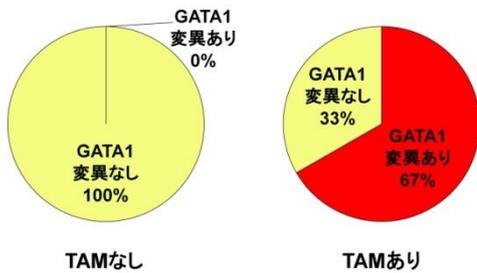
また、TAM の末梢血血液像を詳細に検討したところ、赤芽球、顆粒球系前駆細胞、巨大血小板、および赤血球奇形の出現を高頻度に認めることが明らかになった (表 1)。さらに、一部に好酸球や好塩基球の増加を認める症例があることが明らかになった。

表 1. TAM の末梢血における形態学的特徴

① 赤芽球の出現	67%
① 顆粒球前駆細胞の出現	67%
③ 巨大血小板	45%
④ 赤血球奇形	42%
⑤ 偽ベルゲル核異常	19%
⑥ 微小巨核球の出現	15%
⑦ 好酸球増加	6%
⑧ 好塩基球増加	6%

TAM を発症していた 27 例中 18 例 (67%) でサンガー法により、GATA1 遺伝子変異が確認された。一方で、TAM を発症していなかった 12 例については、全例で GATA1 遺伝子変異は検出されなかった (図 2)。このうち、6 例については次世代シーケンサーを用いて GATA1 遺伝子変異解析を行ったが、GATA1 遺伝子変異は検出されなかった。また、これらの検体において GATA1 遺伝子以外の付加的な遺伝子異常を検索したが、1 例も検出されなかった。

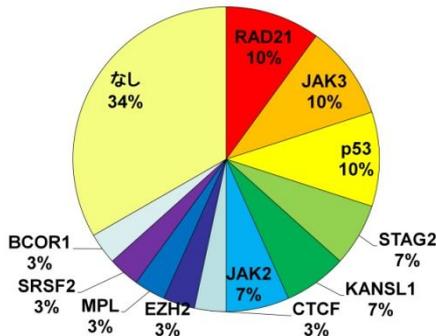
図2. ダウン症新生児末梢血のGATA1変異の頻度



(2) DS-AMKL 発症時の骨髄検体における遺伝子解析

DS-AMKL の骨髄検体は 30 例収集された。このうち GATA1 遺伝子変異は 26 例 (87%) で確認された。さらなる付加的な遺伝子異常を解析したところ、コヒーシン関連遺伝子については RAD21 変異が 3 例 (10%)、STAG2 変異が 2 例 (7%)、CTCF 遺伝子変異が 1 例 (3%)、エピジェネティクス関連遺伝子については EZH2 変異が 1 例 (3%)、KANSL1 変異が 2 例 (7%)、シグナル伝達遺伝子については JAK3 変異が 3 例 (10%)、JAK2 変異が 2 例 (7%)、MPL 変異が 1 例 (3%)、その他、p53 変異が 3 例 (10%)、SRSF2 変異が 1 例 (3%)、BCOR 変異が 1 例 (3%) 確認された (図 3)。

図3. DS-AMKLの付加的遺伝子異常



(3) 本研究のまとめと今後の展望

TAM 検体においては GATA1 遺伝子変異以外の遺伝子異常は確認されなかったのに対して、DS-AMKL 検体においては GATA1 遺伝子変異に加えて様々な遺伝子変異が検出された。このことは、TAM に新たな遺伝子異常が加わることによって DS-AMKL を発症することを示している。本研究はその DS-AMKL 発症のメカニズムを解明するために TAM を発症した症例について、経時的に末梢血血液検体を収集し、どの段階で新たな遺伝子異常が加わるのかを検討する予定であったが、研究期間内にそ

れらの検体を収集することができなかった。引き続き、TAM 発症後の経時的検体の収集を継続し、今回明らかにできなかった DS-AMKL 発症のメカニズムを明らかにしていく予定である。

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

濱 麻人、CBFA2T3-GLIS2 融合遺伝子を有する急性巨核芽球性白血病の臨床像、第 57 回日本小児血液・がん学会学術集会、2015 年 11 月 28 日、甲府富士屋ホテル(山梨県・甲府市)

濱 麻人、ダウン症における一過性異常骨髄増殖症の形態学的特徴：JPLSG TAM-10 形態中央診断の解析、第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会、2014 年 11 月 28 日、岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱 麻人 (HAMA ASAHITO)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：30566964

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

小川 誠司 (Ogawa Seishi)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：60292900

(4) 研究協力者

奥野 友介 (Okuno Yusuke)
名古屋大学・医学部附属病院・特任講師
研究者番号：00725533