

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461599

研究課題名(和文) 小児急性骨髄性白血病の次世代シーケンサーとMLPA法を用いた予後因子の解析

研究課題名(英文) The study of the prognostic factor search in pediatric acute myeloid leukemia using the next generation sequencing and MLPA method

研究代表者

大木 健太郎 (Ohki, Kentaro)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・小児血液・腫瘍研究部・室長

研究者番号：50400966

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)：我々は小児急性骨髄性白血病(AML)症例で次世代シーケンサーによる全エクソン解析を行い、コヒーシン複合体(RAD21、SMC3)、BCORL1、ASXL2遺伝子に新規の変異を見出した。得られた複数の新規遺伝子異常について、日本小児白血病リンパ腫グループ(JPLSG)のAML-05臨床試験に登録された370例で標的深読み塩基配列解析を行い、遺伝子異常の頻度や臨床的特徴について検討した。また、小児AML47症例で全トランスクリプトーム解析を行うとともに、リアルタイムPCR法を用いて複数の遺伝子の発現解析を行いPRDM16遺伝子高発現症例が有意に予後不良であることが見出した。

研究成果の概要(英文)：Acute myeloid leukemia (AML) is a molecularly and clinically heterogeneous disease. In this study, whole-exome sequencing (WES) of 63 pediatric AML patients revealed mutations in components of the cohesin complex (RAD21 and SMC3), BCORL1 and ASXL2 in addition to previously known gene mutations. We also revealed intratumoural heterogeneities in many patients, implicating multiple clonal evolution events in the development of AML. Whole-transcriptome sequencing (WTS) and real-time polymerase chain reaction of pediatric de novo AML patients revealed PRDM16 gene overexpression. The overall survival (OS) and event-free survival (EFS) among PRDM16-overexpressing patients were significantly worse than in patients with low PRDM16 expression (3-year OS: 51% vs. 81%, $p < 0.001$, 3-year EFS: 32% vs. 64%, $p < 0.001$) irrespective of other cytogenetic alterations except for NPM1.

研究分野：Oncology

キーワード：遺伝子 小児がん 急性骨髄性白血病 次世代シーケンス解析 MLPA解析

1. 研究開始当初の背景

(1)近年の治療法の進歩により小児急性リンパ性白血病(ALL)では約 80%が長期生存、治癒するようになってきたが、小児急性骨髄性白血病(AML)では依然として約 50%が再発、死亡している。また近年の分子遺伝学の進歩により、小児白血病では、多数の癌関連遺伝子が染色体転座切断点近傍に座位することが判明しており、さらに全ゲノムのシーケンスの解読にとまない、マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現プロファイルの検索と SNP アレイにより各染色体の細かい異常が同定されるようになった。さらに次世代シーケンサー技術の進歩により全エクソンの異常が詳細に同定されるようになった。

(2)我々はこれまでに小児 AML において、発現アレイを用いた解析から *NUP98-NSD1* 融合遺伝子が予後不良の一群であることを示し、今後治療の層別化に利用される予定である。multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 解析を用いた解析から *MLL-PTD* 陽性が、既存の RT-PCR 法による解析に比べて、正確な診断を行うことによって、強力な予後不良因子であることを示した。また、初発と再発、原発巣と転移巣では、腫瘍のクローンが異なり、枝状に変化していく clonal evolution が認められることを示した。しかし、AML の発症機序においては、これらのゲノム異常単独では AML を発症するには至らず、何らかの付加的遺伝子異常が必要であり、従来方法では遺伝子異常を検出できない症例もあることから、十分な解析が行われていない。

(3)我々はこれまでに SNP アレイを用いて成人の骨髄増殖性疾患(MDS/MPN)でも 11 番の UPD から *CBL* 遺伝子を同定した (Nature 459:712-716, 2009)。さらに研究協力者の京都大学吉田らは、次世代シーケンサーを用いて骨髄異形成症候群(MDS)において RNA スプライシングに関係する一群の遺伝子が関与することをみ出した (Nature 478:64-69, 2011)。我々は吉田らとダウン症候群に合併した TAM から AMKL に進展に関連する遺伝子を同定した (Nature Genet 2013 in press)。これらのことは、我々の SNP アレイや次世代シーケンサーを用いた手法が新規の重要な遺伝子をみい出すことができることを示している。

2. 研究の目的

小児急性骨髄性白血病(AML)は集学的治療にもかかわらず予後不良な疾患である。最近の SNP アレイにより各染色体の細かい異常が同定されるようになり、さらに次世代シーケンサー技術の進歩により全エクソンの異常が同定されるようになった。我々はこれまでに SNP アレイを用いて MDS/MPN では *CBL* 遺伝子を (Nature, 2009) をみだし、さらに次世代シーケンサーによるダウン症候群に合併した一過性骨髄増殖症 (TAM) から急性巨核芽球性白血病 (AMKL) に進展に関連する遺伝子を同定した (Nature Genet 2013 in press)。本研究は小児 AML の次

世代シーケンサーによる全エクソン解析を 63 例で行い、second cohort として日本小児白血リンパ腫グループ (JPLSG) の AML 370 例の target deep sequencing (標的深読み塩基配列解析) を行い、小児 AML の未知の原因遺伝子を探る。また MLPA 法により既知の *MLL-PTD* や *CDKN2A/2B*、*RB1* 等のコピー数の検索を AML-05 プロトコール症例で行う。また *NUP98-NSD1* 融合遺伝子とその類似発現の症例において全トランスクリプトーム解析を行う。また、変異を有する症例の臨床的特徴について解析を行い、予後不良因子となる遺伝子変異を同定して治療成績の向上に役立て、さらにその遺伝子産物の機能解析を行い、小児急性白血病の発症、進展の分子機構を解明する。これらを通じて治療の層別化と予後の向上に役立てる。

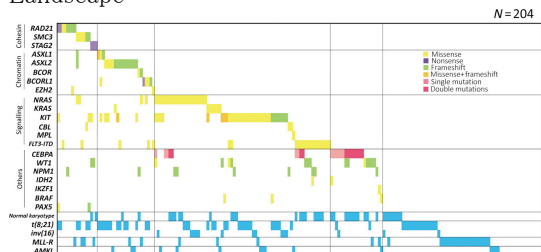
3. 研究の方法

全エクソン解析が終了した 20 例に加え、さらに小児 AML 43 例について、イルミナ社の次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析により候補遺伝子を抽出し、Sanger Sequencing で validation を行い、遺伝子を絞り込み、遺伝子異常を同定する。抽出された遺伝子について AML-05 の 370 症例で標的 deep sequencing を行い、異常のパターンや頻度を検索する。また既知の遺伝子についても頻度を明らかにする。さらに MLPA 法により既知の *MLL-PTD* や *CDKN2A/2B*、*RB1* 等の検索を AML-05 プロトコール症例で行う。また小児 AML47 症例において全トランスクリプトーム解析を行う。次に小児 AML64 症例で Infinium Methylation EPIC BeadChip array によるエピゲノム異常の網羅的解析を行う。これらの解析から、各腫瘍における発がんに関与する遺伝子を絞り込み、候補として抽出された遺伝子について発現解析を行い、遺伝子の性状および造腫瘍性の解析を行う。さらに有用なものに関しては細胞株を用いて機能解析を行い、治療の層別化と治療成績の向上に役立てる。

4. 研究成果

(1) 小児 AML63 症例で次世代シーケンサーによる全エクソン解析を行い、既知の予後に関連する遺伝子異常 (*KIT*, *NPM1*, *CEBPA*, *FLT3* 等) に加えて、コヒーシ複合体 (*RAD21*、*SMC3*)、*BCORL1*、*ASXL2* 遺伝子に新規の変異を見出した。得られた複数の新規遺伝子異常について、日本小児白血リンパ腫グループ (JPLSG) の AML-05 臨床試験に登録された 370 例で標的深読み塩基配列解析を行うとともに、MLPA 法による既知の *MLL-PTD* や *CDKN2A/2B*、*RB1*、*IKZF1* 等のコピー数解析を行った。(図 1)

図 1. 小児 de novo AML 症例の Genetic Landscape



(2) 小児 AML47 症例で全トランスクリプトーム解析を行うとともに、リアルタイム PCR 法を用いて AML99 研究における発現アレイ解析から抽出された複数の遺伝子の発現解析を行い、AML99 研究における発現アレイ解析から抽出された複数の遺伝子の発現解析を行い、NUP98-NSD1 融合遺伝子症例で見出された PRDM16 遺伝子の高発現が 23%で認められ、生存率と無イベント生存率は PRDM16 遺伝子高発現症例で有意に不良であることが見出された(図 2, 3)。

図 2. PRDM16 発現レベルと既知遺伝子異常との関連

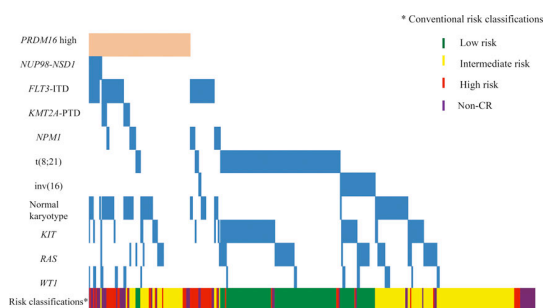
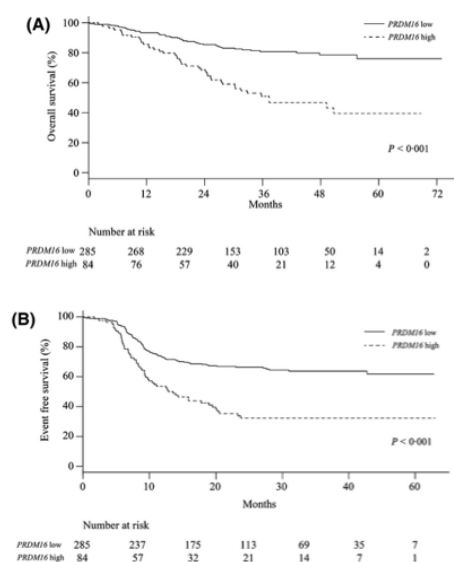


図 3 AML-05 trial における PRDM16 発現量毎の全生存率(A), 無イベント生存率(B)



(3) 上記解析の結果、予後不良例では、クロマチン修飾関連遺伝子等の異常による複雑なエピジェネティックな変化が起きていると想定され、小児 AML64 症例で、Infinium Methylation EPIC

BeadChip array による網羅的メチル化解析を行った。AML1-MTG8 再構成や MLL 遺伝子再構成などの治療層別化に関わる病型毎にメチル化状態は異なるクラスターに分けられ、複数の新規メチル化異常が認められた。

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 11 件)

1. Kinoshita A, Miyachi H, Ohki K (17 人中 13 番目), Hayashi Y, Tawa A, Horibe K, Adachi S. Acute myeloid leukaemia with myelodysplastic features in children: a report of Japanese Paediatric Leukaemia/Lymphoma Study Group. Br J Haematol. 査読あり. 167 : 80-6, 2014. DOI: 10.1111/bjh.12993
2. Matsuo H, Kajihara M, Tomizawa D, Shiba N, Ohki K(22 人中 17 番目), Hayashi Y, Yamashita Y, Shimada A, Tanaka S, Adachi S. EVI1 overexpression is a poor prognostic factor in pediatric patients with mixed lineage leukemia-AF9 rearranged acute myeloid leukemia. Haematologica. 査読あり. 99 : 225-7, 2014. Doi:10.3324/haematol.2014.107128
3. Shiba N, Funato M, Ohki K(14 人中 3 番目), Hayashi Y. Mutations of the GATA2 and CEBPA genes in paediatric acute myeloid leukaemia. Br J Haematol. 査読あり. 164 : 142-5, 2014. DOI: 10.1111/bjh.12559
4. Shiba N, Ohki K(9 人中 2 番目), Park MJ, Sotomatsu M, Hayashi Y. SETBP1 mutations in juvenile myelomonocytic leukaemia and myelodysplastic syndrome but not in paediatric acute myeloid leukaemia. Br J Haematol. 査読あり. 164 : 156-9, 2014. DOI: 10.1111/bjh.12595
5. Sano H, Ohki K(12 人中 2 番目), Park MJ, Shiba N, Hara Y, Sotomatsu M, Hayashi Y. CSF3R and CALR mutations in paediatric myeloid disorders and the association of CSF3R mutations with translocations, including t(8; 21). Br J Haematol. 査読あり. 170(3):391-7, 2015. DOI: 10.1111/bjh.13439

6. Tokumasu M, Murata C, Shimada A, Ohki K(18人中4番目), Hayashi Y, Adachi S. Adverse prognostic impact of KIT mutations in childhood CBF-AML: the results of the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group AML-05 trial. *Leukemia*. 査読あり. 29(12):2438-41, 2015. DOI:10.1038/leu.2015.121

7. Shiba N, Yoshida K, Ohki K(27人中13番目), Ogawa S, Hayashi Y. Whole-exome sequencing reveals the spectrum of gene mutations and the clonal evolution patterns in paediatric acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 175(3):476-489. 2016, DOI: 10.1111/bjh.14247

8. Hirabayashi S, Ohki K(38人中2番目), Kiyokawa N. ZNF384-related fusion genes consist of a subgroup with a characteristic immunophenotype in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 102:118-127, 2017. Doi:10.3324/haematol.2016.151035

9. Shiba N, Ohki K(16人中2番目), Hayashi Y. High PRDM16 expression identifies a prognostic subgroup of pediatric acute myeloid leukaemia correlated to FLT3-ITD, KMT2A-PTD, and NUP98-NSD1: the results of the Japanese Paediatric Leukaemia/ Lymphoma Study Group AML-05 trial. *Br J Haematol*. 172(4):581-91. 2016, Doi: 10.1111/bjh.13869

10. Hara Y, Shiba N, Ohki K(18人中3番目), and Hayashi Y. Prognostic impact of specific molecular profiles in pediatric acute megakaryoblastic leukemia in non-Down syndrome. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 14 February 2017, Doi: 10.1002/gcc.22444

11. Yamato G, Shiba N, Yoshida K, Ohki K(24人中6番目), Ogawa S, Hayashi Y. ASXL2 mutations are frequently found in pediatric AML patients with t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1 and associated with a better prognosis. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 14 February 2017, Doi:

10.1002/gcc.22443

[学会発表](計15件)

1. Hara Y, Ohki K, Shiba N, Shimada A, Tomizawa A, Taga T, Adachi S, Arakawa H, Tawa A, Hayashi Y. Genetic analysis of patients who did not achieve complete remission after induction therapy. 第76回日本血液学会学術集会, 大阪, 2014.10.31-11.2

2. Shiba N, Hara Y, Ohki K, Yamato G, Park MJ, Kobayashi T, Ichikawa H, Tomizawa D, Taki T, Shimada A, Sotomatsu M, Arakawa H, Horibe H, Adachi S, Tawa A, Hayashi Y. The prognostic impact of high EVI1-related genes expression in pediatric acute myeloid leukemia. 第76回日本血液学会学術集会, 大阪, 2014.10.31-11.2

3. 大木 健太郎, 朴 明子, 原 勇介, 柴 徳生, 外松 学, 富澤 大輔, 多賀 崇, 齋藤 明子, 藤本 純一郎, 多和 昭雄, 堀部 敬三, 足立 壮一, 林 泰秀. 小児AMLにおけるIKZF1欠失の頻度と予後解析 JPLSG AML-05(Frequency and prognosis of IKZF1 deletions in pediatric acute myeloid leukemia: The Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG) AML-05 Trial). 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 岡山, 2014.11.28-30

4. Shiba N, Ohki K, Hara Y, Yamato G, Park M, Ichikawa H, Kobayashi T, Tomizawa D, Sotomatsu M, Arakawa H, Horibe K, Taga T, Adachi S, Tawa A, Hayashi Y. The Prognostic Impact of High MEL1 Gene Expression in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. 56th ASH Annual Meeting and Exposition, San Francisco, 2014.12.6-9

5. Hara Y, Shiba N, Ohki K, Park M, Shimada A, Tomizawa D, Moriya Saito M, Fujimoto J, Taki T, Kinoshita A, Taga T, Arakawa H, Tawa A, Horibe K, Adachi S, Hayashi Y. Poor Prognosis Associated with FAB Subtypes M4 and M5 in Japanese Pediatric Acute Myeloid Leukemia Patients with FLT3-ITD. 56th ASH Annual

- Meeting and Exposition, San Francisco, 2014.12.6-9
6. Yamato G, Shiba N, Yoshida K, Ohki K, Park M, Hara Y, Tomizawa D, Sotomatsu M, Taga T, Adachi S, Tawa A, Horibe K, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. Clinical Features of Patients with ASXL1 and ASXL2 Mutations in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. 56th ASH Annual Meeting and Exposition, San Francisco, 2014.12.6-9
7. Yamato G, Shiba N, Hara Y, Park M, Sotomatsu M, Ohki K, Ichikawa H, Tomizawa D, Taga T, Horibe K, Tawa A, Arakawa H, Adachi S, Hayashi Y. A Combination of EVI1 and PRDM16 Expression Clarified the Clinical Features of Intermediate/High Risk Patients in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. 57th ASH Annual Meeting and Exposition, December 5-8, 2015. Orland, USA
8. Shiba N, Yoshida K, Shiraishi Y, Hara Y, Yamato G, Kaburaki T, Sanada M, **Ohki K**, Tomizawa D, Sotomatsu M, Arakawa H, Horibe K, Park M, Taga T, Adachi S, Tawa A, Miyano S, Ogawa S, Hayashi Y. Detection of Novel Pathogenic Gene Rearrangements in Pediatric Acute Myeloid Leukemia By RNA Sequencing. 57th ASH Annual Meeting and Exposition, December 5-8, 2015. Orland, USA
9. Hara Y, Yamato G, Shiba N, **Ohki K**, Park M, Tomizawa D, Taki T, Taga T, Arakawa H, Tawa A, Horibe K, Adachi S, Hayashi Y. High BMP2 Expression Is a Poor Prognostic Factor and a Good Candidate to Identify CBFA2T3-GLIS2-like High-Risk Subgroup in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. 57th ASH Annual Meeting and Exposition, December 5-8, 2015. Orland, USA
10. Yamato G, Yamaguchi H, Handa H, Shiba N, Wakita S, Inokuchi K, Hara Y, Ohki K, Park M, Sotomatsu M, Ichikawa H, Tomizawa D, Taga T, Adachi S, Horibe K, Tawa A, Arakawa H, Hayashi Y. The prognostic impact of PRDM16 gene expression in both adult and pediatric acute myeloid leukemia. 第 77 回日本血液学会学術総会, 金沢, 2015.10.16-18
11. Shiba N, Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Hara Y, Yamato G, Ohki K, Park M, Tomizawa D, Sotomatsu M, Arakawa H, Horibe K, Taga T, Adachi S, Tawa A, Miyano S, Ogawa S, Hayashi Y. RNA sequencing reveals the comprehensive gene alterations of pediatric acute myeloid leukemia. 第 77 回日本血液学会学術総会, 金沢, 2015.10.16-18
12. Ueno T, Yamato G, Shiba N, Hara Y, Ohki K, Ichikawa H, Park MJ, Shimada A, Sotomatsu M, Arakawa H, Horibe K, Adachi S, Taga T, Tawa A, Hayashi Y. Retrospective Evaluation of Correlations Between Genetic Backgrounds and Stem Cell Transplantation for De Novo Pediatric Acute Myeloid Leukemia: A Study from the Japan Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG) AML-05 Clinical Trial. 58th ASH Annual Meeting and Exposition, San Diego, 2016.12.3-6
13. Hara Y, Shiba N, Yamato G, Okubo J, Ohki K, Park MJ, Sotomatsu M, Tomizawa D, Taki T, Kinoshita A, Kiyokawa N, Taga T, Arakawa H, Tawa A, Horibe K, Adachi S, Hayashi Y. Identification of Two Distinct Poor Prognostic Subgroups Related to High Expression of BMP2 or PRDM16 in Pediatric AML. 58th ASH Annual Meeting and Exposition, San Diego, 2016.12.3-6
14. Yamato G, Yamaguchi H, Handa H, Shiba N, Wakita S, Inokuchi K, Hara Y, Ohki K, Okubo J, Sotomatsu M, Arakawa H, Hayashi Y. The Clinical Features and Prognostic Impact of PRDM16 gene Expression in Adult Acute Myeloid Leukemia. 58th ASH Annual Meeting and Exposition, San Diego, 2016.12.3-6
15. Shiba N, Yoshida K, Shiraishi Y, Hara Y, Yamato G, Kaburagi T, Sanada M, Ohki K, Park

MJ, Tomizawa D, Chiba K, Tanaka H, Sotomatsu M, Arakawa H, Horibe K, Taga T, Adachi S, Tawa A, Miyano S, Ogawa S, Hayashi Y. Transcriptome Analysis Revealed the Entire Genetic Understanding of Pediatric Acute Myeloid Leukemia with a Normal Karyotype. 58th ASH Annual Meeting and Exposition, San Diego, 2016.12.3-6

[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

JCCG ホームページ

<http://iccg.jp>

JPLSG ホームページ

<http://jplsg.jp/index.htm>

国立研究開発法人 国立成育医療研究センター

ホームページ

<https://www.ncchd.go.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大木健太郎(OHKI KENTARO)

国立研究開発法人 国立成育医療研究センター・小児血液・腫瘍研究部・室長

研究者番号:50400966

(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

朴明子(PARK MYOUNG-JA)

群馬県衛生環境研究所・研究企画係・研究員

研究者番号: 50450375

外松学(SOTOMATSU MANABU)

群馬県衛生環境研究所・研究企画係・研究員

研究者番号: 70251113

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

原勇介(HARA YUSUKE)

群馬大学・小児科

吉田健一(YOSHIDA KENICHI)

京都大学