

平成 28 年 5 月 22 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670503

研究課題名(和文) 小児急性白血病の発症前診断法の開発

研究課題名(英文) Establishment of preclinical screening methods of childhood leukemia with fusion genes

研究代表者

石井 榮一 (Ishii, Eiichi)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20176126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：小児急性リンパ性白血病におけるMLL-AF4およびTEL-AML1融合遺伝子のDNAを用いた迅速な検出・同定の方法を確立した。それぞれの遺伝子の転座切断点が集中するイントロン領域に一定の間隔でPCRプライマーを設定した。その際融合遺伝子の検出時におけるPCR産物の予想サイズが6kb以下になるようにPCRプライマーを設定した。これら複数のPCRプライマーを混合してPCRを行うことにより、必要なDNA量を少なくすることができる。今後白血病のスクリーニングのためにガスリー血などの濾紙血を用いてDNA抽出を必要としない検出法の確立を目指す。

研究成果の概要(英文)：Methods for rapid identification of leukemia-specific fusion genes, MLL-AF4 and TEL-AML1, by polymerase chain reaction (PCR) with DNA samples were established. MLL-AF4 and TEL-AML1 are two frequent fusion genes observed in pediatric acute lymphoblastic leukemia and both fusion genes are often generated in utero preceding the development of overt leukemia. In utero generation of these fusion genes could be a possible candidate for preclinical diagnosis of leukemia with these fusion genes. Multiple primers were designed on introns in which most of the translocation breakpoints are present. By setting the distance between two adjacent primers to less than 3kb, expected sizes of PCR products with these primers could be set at less than 6kb length. Establishment of efficient preclinical screening methods of childhood leukemia by early detection of these fusion genes are now pursued as a next step.

研究分野：小児科学

キーワード：小児血液学 白血病 融合遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

Greaves らは *MLL-AF4* 融合遺伝子の DNA 上の再構成配列が白血病の双生児例では同一、すなわち白血病細胞が同一(双生児の一方に生じた白血病細胞が胎盤を介して他方に移行)であることから、*MLL-AF4* 陽性白血病の胎生起源を証明した。さらに先天代謝異常スクリーニング用のガスリー濾紙上の採取血液を用いた解析から、*TEL-AML1* 陽性 ALL や T 細胞性 ALL、*AML1-ETO* 陽性の急性骨髄性白血病の一部も胎生期に生じることを証明した。これらの研究では、発症後の白血病細胞から患者特異的な DNA 上の転座切断点を同定した後に、同一症例の臍帯血やガスリー血を用いて解析を行っており、全て後方視的な研究である。*MLL-AF4* 融合遺伝子は白血病特異的であり、白血病を発症した患者の発症前の検体である保存臍帯血やガスリー血などの新生児血から *MLL-AF4* は検出されるが、非白血病児の臍帯血等からは検出されない。これは新生児血での *MLL-AF4* の検出により、*MLL-AF4* 陽性 ALL の早期(発症前)診断が可能であることを示している。RT-PCR 等、RNA を用いた解析は、多くの細胞数と手間を要し、スクリーニングには適当ではない。白血病の発症前診断(早期の白血病特異的融合遺伝子の検出)のためには、DNA を用いたより簡便な融合遺伝子の検出法の開発が必要である。

小児急性白血病の治療成績は化学療法の改善、造血幹細胞移植の普及により近年飛躍的に向上した。しかしながら複数の抗癌剤の投与を長期間にわたり必要とする白血病の治療は、成長途上の患児にとって大きな負担となり、後遺障害を残すことも少なくない。また *MLL-AF4* 融合遺伝子陽性の乳児 ALL は化学療法に抵抗性の難治性白血病であることが多い。このように非常に予後不良な白血病を早期発見により腫瘍量の少ない段階で治療を開始することができれば、患者の予後の改善が期待できる。

## 2. 研究の目的

白血病特異的融合遺伝子の検出を指標とした小児白血病の発症前診断(早期スクリーニング)の方法を確立する。まず白血病症例での白血病特異的融合遺伝子(主に *MLL-AF4*、*TEL-AML1* 融合遺伝子を対象とする)の DNA を用いた簡便かつ迅速な検出・同定法を確立し、その後白血病細胞の混入がごく少ない状態での検出が可能となるように方法を改善・発展させる。最終的に新生児血(ガスリー血など)でのスクリーニングに応用可能な技術の開発を行う。白血病特異的融合遺伝子の簡便・確実な検出法が確立し、将来的に出生時の臍帯血や、末梢血(ガスリー血)等を用いた白血病のスクリーニングが可能になれば、発症前や腫瘍量の少ない発症早期での治療が可能となり、予後不良の白血病の治療成績の改善や、治療強度の抑制から治療後遺症

の軽減が見込まれる。

## 3. 研究の方法

(1) *MLL-AF4*、*TEL-AML1* 融合遺伝子のゲノム転座切断点の迅速な同定方法の確立

*MLL-AF4* 融合遺伝子のゲノム上の転座切断点は、*MLL* 遺伝子上の転座切断点集中領域(イントロン 5 からエクソン 11 までの約 8.3 kb)と、*AF4* 遺伝子のイントロン 3 から 6 (約 48 kb)に集中している。これらの領域に一定の間隔で PCR プライマーを設定し、DNA を用いた PCR で *MLL-AF4* 融合遺伝子の検出を試みた。

*TEL-AML1* 融合遺伝子の場合には、ほとんどの症例で、ゲノム上の転座切断点は、*TEL* のイントロン 5 (約 15 kb)と *AML1/RUNX1* 遺伝子のイントロン 1 ないしはイントロン 2 の約 150 kb の領域に集中している。*MLL-AF4* のゲノム上の切断点の同定方法と同様に、これらの領域に一定の間隔で PCR プライマーを設定した。

(2) 微小病変(白血病細胞の混入が非常に少ない場合)を検出できる実験系の確立

(1)にて実験条件の設定後、ごく少数の白血病細胞を含む血液検体から同様にゲノム上の切断点の同定を試みる。血液検体からごく少数の白血病細胞を検出(融合遺伝子を検出)できれば、臍帯血での白血病のスクリーニングなどに応用可能となる。

検体としては、患者検体から得られた白血病細胞あるいは細胞株を  $10^{-3}$  以下の割合で正常細胞と混合し、(1)で確立した方法を用いて検出可能な条件を検討する。

(3) ガスリー血へ応用するためのスクリーニング方法の改良

ガスリー濾紙上の血液を用いたスクリーニングに応用できるように(1)で確立した方法を改良する。PCR 産物のサイズが長い場合には直接に血液を用いた PCR では目的の産物の増幅は困難であると考えられる。そのため、PCR の前段階として Multiple Displacement Amplification 法 (MDA、多重置換増幅法)等を用いて核酸増幅を行う方法を試みる。あるいは PCR 産物のサイズを短くするために、使用するプライマーの数を増やす(プライマーの設定間隔を短くする)方法も考慮する。

## 4. 研究成果

(1) *MLL-AF4*、*TEL-AML1* 融合遺伝子のゲノム転座切断点の迅速な同定方法の確立

*MLL-AF4* 融合遺伝子のゲノム上の転座切断点は、*MLL* 遺伝子上のイントロン 5 からエクソン 11 までの約 8.3 kb と、*AF4* 遺伝子のイントロン 3 から 6 (約 48 kb)に集中している。これらの領域に 0.7~2kb の間隔で複数のプライマー(*MLL* 側に 12 個、*AF4* 側に 32 個)を設計し、PCR にて転座切断点の検出を試みた。*MLL-AF4* 融合遺伝子陽性白血病細胞株を霖体として用いた。*AF4* 遺伝子上の 32 個のリバースプライマーを 8 個ずつ 4 セットに分け

て *MLL* 遺伝子上の 12 個のフォワードプライマー全てを混合して行った PCR では各細胞株で少なくとも一つのセットで増幅産物が得られ、*MLL-AF4* 融合遺伝子を検出可能であった。12 個のフォワードプライマーと 32 個のリバースプライマーを混合して 1 本のチューブで行った PCR でも各細胞株で同様に *MLL-AF4* 融合遺伝子を検出可能であった。

*TEL-AML1* 融合遺伝子に関しては、ゲノム上の転座切断点はほとんどの症例で、*TEL* のイントロン 5 (約 15 kb) と *AML1* 遺伝子のイントロン 1 (約 150 kb) に集中している。*TEL* 遺伝子のイントロン 5 に 15 個のフォワードプライマーを設定し、*AML1* 遺伝子のイントロン 1 に 52 個のリバースプライマーを設定した。*MLL-AF4* 融合遺伝子と同様に、*AML1* 遺伝子上のリバースプライマーを 13 個ずつ 4 セットに分けて *TEL* 遺伝子上の 15 個のフォワードプライマーと混合して行った PCR では十分にゲノム上の *TEL-AML1* 融合遺伝子を検出可能であった。これらの方法は白血病細胞株のみでなく、患者検体を用いた解析にも問題なく応用でき、迅速にゲノム上の転座切断点を同定できる実験系を作製できた。これらの PCR の検出感度は白血病細胞の DNA 100 pg 程度までであり、この方法での融合遺伝子の検出には白血病細胞が 20 個程度必要であると思われた。

*MLL-AF4*、*TEL-AML1* 融合遺伝子以外にも急性骨髄性白血病で認められる *AML1-ETO* や *PML-RARA* 融合遺伝子、小児軟部腫瘍で認められる *EWS-FLI1* などの *EWS* 関連の融合遺伝子についても同様の方法で迅速な検出・同定とする方法をほぼ確立できた。

さらにこれらの白血病や軟部腫瘍でゲノム上の融合遺伝子の配列を同定することで、患者血清中に存在する腫瘍由来 DNA を増幅・検出することが可能である。今後、患者特異的な融合遺伝子配列の PCR による検出に基づく患者血清を用いた腫瘍のモニタリング(微小残存病変の検出など)の可能性についても検討していく。

(2) 微小病変(白血病細胞の混入が非常に少ない場合)を検出できる実験系の確立

微小病変の検出を目的とした実験では、これらの融合遺伝子を有する白血病症例の治療後の検体や白血病細胞株を非白血病細胞と混合した培養液などを用いた。白血病細胞が概ね 1 万分の 1 以下のレベルでは、融合遺伝子の PCR 産物のサイズによって検出の可否が影響され、PCR 産物のサイズがある程度大きな場合には検出率は低下した。

現在 *MLL-AF4* 融合遺伝子で 44 個のプライマー、*TEL-AML1* 融合遺伝子で 67 個のプライマーを用いてそれぞれの転座集中領域のほぼ全域をカバーしているが、PCR 産物のサイズを小さくするために、プライマーの数をさらに増やして、プライマー同士の間隔をより短くすることで結果を改善できると思われる、今後検討を続けていく。

(3) ガスリー血へ応用するためのスクリーニング方法の改良

検出方法をより簡便にするために、ガスリー血などの濾紙血を用いて、DNA 抽出を行わずにゲノム上の融合遺伝子検出を試みたが、同様に PCR 産物のサイズが大きき場合には増幅産物を得ることは困難であった。この点に関しても前述のごとく改善を試み検討を続けていく。

#### 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 13 件)

1. Morimoto A, Shioda Y, Imamura T, Ishii E (15 名, 10 番目). Intensified and prolonged therapy comprising cytarabine, vincristine and prednisolone improves outcome in patients with multisystem Langerhans cell histiocytosis: results of the Japan Langerhans Cell Histiocytosis Study Group-02 Protocol Study. *Int J Hematol* 2016 年 (in press). 査読有り DOI: 10.1007/s12185-016-1993-3
2. Kurosawa H, Tanizawa A, Tono C, Ishii E (18 名, 17 番目). Leukostasis in Children and Adolescents with Chronic Myeloid Leukemia: Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Pediatr Blood Cancer* 2016 年; 63 巻: 406-411 頁. 査読有り DOI:10.1002/pbc.25803
3. Imamura T, Kiyokawa N, Kato M, Ishii E (32 名, 31 番目). Characterization of pediatric Philadelphia-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with kinase fusions in Japan. *Blood Cancer J* 2016 年; 6 巻: e419 頁. 査読有り DOI:10.1038/bcj.2016.28
4. 江口真理子, 石前峰斉, 石井榮一. 小児白血病研究の現状と展望 白血病幹細胞を中心として. *臨床血液* 2015 年; 56 巻: 1871-1881 頁. 査読有り DOI: 10.11406/rinketsu.56.1871
5. Wu Z, Eguchi-Ishimae M, Ishii E, Eguchi M (10 名, 2, 9, 10 番目). HMGA2 as a potential molecular target in KMT2A-AFF1-positive infant acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2015 年; 171 巻: 818-829 頁. 査読有り DOI:10.1111/bjh.13763
6. Koh K, Tomizawa D, Ishii E (19 名, 19 番目). Early use of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for infants with MLL gene-rearrangement-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2015 年; 29 巻: 290-296 頁. 査読有り DOI: 10.1038/leu.2014.172
7. Hatanaka M, Miyamura T, Koh K, Ishii E

- (10名, 9番目). Respiratory syncytial virus infection in infants with acute leukemia: a retrospective survey of the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Int J Hematol* 2015年; 102巻: 697-701 頁. 査読有り DOI:10.1007/s12185-015-1890-1
8. Tokuda K, Eguchi-Ishimae M, Ishii E, Eguchi M (7名, 2, 6, 7番目). Lineage-dependent skewing of loss of heterozygosity (LOH) of KRAS gene in a case of juvenile myelomonocytic leukemia. *European journal of haematology* 2015年; 94巻: 177-181 頁. 査読有り DOI: 10.1111/ejh.12355
9. Gao W, Higaki T, Eguchi-Ishimae M, Ishii E, Eguchi M (11名, 3, 10, 11番目). DGCR6 at the proximal part of the DiGeorge critical region is involved in conotruncal heart defects. *Human Genome Variation* 2015年; 2巻: 15004 頁. 査読有り DOI:10.1038/hgv.2015.4
10. Aoki Y, Watanabe T, Saito Y, Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Ishii E (20名, 8, 9, 10番目). Identification of CD34+ and CD34-leukemia-initiating cells in MLL-rearranged human acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2015年; 125巻: 967-980 頁. 査読有り DOI:10.1182/blood-2014-03-563304
11. Honda S, Arakawa S, Nishida Y, Yamaguchi H, Ishii E, Shimizu S. Ulk1-mediated Atg5-independent macroautophagy mediates elimination of mitochondria from embryonic reticulocytes. *Nat Commun* 2014年; 5巻: 4004 頁, 査読有り DOI:10.1038/ncomms5004
12. 江口真理子, 石前峰斉. TEL-AML1 型小児急性リンパ性白血病の分子遺伝学的機序. *血液内科* 2014年; 69巻: 644-651 頁, 査読無し
13. Tokuda K, Eguchi-Ishimae M, Yagi C, Ishii E, Eguchi M (9名, 2, 8, 9番目). CLTC-ALK fusion as a primary event in congenital blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Genes, chromosomes & cancer* 2014; 53: 78-89. 査読有り DOI: 10.1002/gcc.22119
- [学会発表] (計 15 件)
1. 石井榮一、日本における HLH-2004 プロトコールによる血球貪食性リンパ組織球症の治療成績、第 57 回日本小児血液・がん学会、2015 年 11 月 27~29 日、山梨県甲府市
2. 井上真依子、非寛解期に臍帯血移植を行った先天性急性単球生白血病の一例、第 57 回日本小児血液・がん学会、2015 年 11 月 27~29 日、山梨県甲府市
3. 久保田真理、びまん性橋グリオーマ(DIPG)の治療経過中にサイトメガロウイルス感染から血球貪食症候群を発症した 1 剖検例、第 57 回日本小児血液・がん学会、2015 年 11 月 27~29 日、山梨県甲府市
4. 米澤早知子、単一施設における小児がん患者の死亡例に関する検討、第 57 回日本小児血液・がん学会、2015 年 11 月 27~29 日、山梨県甲府市
5. 石前峰斉、Infant acute bilineal leukemia with MLL-AF4 fusion gene、第 77 回日本血液学会、2015 年 10 月 16~18 日、石川県金沢市
6. 新田美里、当科で経験した小児がん経験者の二次がん 4 症例の検討、第 118 回日本小児科学会、2015 年 4 月 17~19 日、大阪府大阪市
7. Minenori Eguchi-Ishimae、HMGA2 as a potential molecular target in MLL-AF4 positive infant acute lymphoblastic leukemia. The 56th annual meeting of the American Society of Hematology、2014 年 12 月 6~9 日、San Francisco, USA
8. 武洲英、生後早期に発症した MLL-AF4 陽性乳児急性骨髄性白血病の一例、第 56 回日本小児血液・がん学会、2014 年 11 月 28~30 日、岡山県岡山市
9. 森谷京子、骨髄炎との鑑別が困難であった前駆 B 細胞性リンパ芽球型リンパ腫の一例、第 56 回日本小児血液・がん学会、2014 年 11 月 28~30 日、岡山県岡山市
10. 山内俊史、まれな複雑心奇形として大動脈肺動脈窓と Fallot 四徴症を認めたトリソミー 14 モザイクの 1 例、第 59 回日本人類遺伝学会、2014 年 11 月 19~22 日、東京都江戸川区
11. 涌井 敬子、CGH+SNP アレイを用いた特定染色体領域の genotyping 評価の試み：トリソミー 14 モザイク症例の 2 細胞系列の 14 番染色体親由来推定、第 59 回日本人類遺伝学会、2014 年 11 月 19~22 日、東京都江戸川区
12. 村尾紀久子、全サブテロメア FISH 法により 4p16.2 欠失が判明した Wolf Hirschhorn 症候群の一例、第 59 回末熟児新生児学会、2014 年 11 月 10~12 日、愛媛県松山市
13. 石前峰斉、HMGA2 阻害剤による MLL-AF4 陽性乳児急性リンパ性白血病細胞の増殖抑制効果、第 76 回日本血液学会、2014 年 10 月 31 日~11 月 2 日、大阪府大阪市
14. Nakano N, A case of late onset FHL with missense mutation in UNC13D gene, The 16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID 2014)、2014 年 10 月 29 日~11 月 1 日、Prague, Czech Republic
15. 伊藤正範、開放骨生検後、慢性再発性多発性骨髄炎(CRMO)として加療中に悪性リンパ腫として診断した一例、第 24 回日本小児リウマチ学会、2014 年 10 月 3~5 日、

宮城県仙台市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 榮一 (Ishii, Eiichi)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：20176126

(2) 研究分担者

江口 真理子 (Eguchi, Mariko)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：40420781

江口 峰斉 (Eguchi, Minenori)  
愛媛大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：50420782