

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 8日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790989

研究課題名（和文） NUP98-HOX融合遺伝子を有する白血病における発症機序
及び標的分子の解明研究課題名（英文） Investigation of pathogenesis of leukemia with NUP98-HOX fusion
gene

研究代表者

竹谷 健（TAKETANI TAKESHI）

島根大学・医学部・講師

研究者番号：30359880

研究成果の概要（和文）：

*NUP98-HOX*融合遺伝子を有する急性骨髄性白血病にみられる遺伝子異常を明らかにして、これらが協調することで白血病化にどのように影響を及ぼすかを明らかにした。染色体11p15転座型を有する造血器腫瘍20例。13例は*HOXA*群遺伝子、2例は*HOXD*群遺伝子と*DDX10*遺伝子、その他、*HOXC11*遺伝子、*NSD3*遺伝子、不明がそれぞれ1例が*NUP98*遺伝子と融合遺伝子を形成していた。遺伝子変異において、*FLT3-ITD*が9例（45%）、*KIT*遺伝子変異が4例（20%）、*WT1*遺伝子変異が8例（40%）、*RAS*遺伝子変異が6例（30%）、*IDH*遺伝子変異が3例（15%）で認められた。*CEBPA*, *AML1*, *MLL*, *IDH1*, *MPL*, *TET2*, *CBL*, *ASXL1*遺伝子変異は認めなかった。

研究成果の概要（英文）：

We examined the relationships between clinical features and somatic mutations in 20 patients with hematologic malignancies carrying the *NUP98* fusion gene, including 13 patients with *NUP98-HOXAs*, 2 with *NUP98-HOXDs* and *NUP98-DDX10*, and one each with *NUP98-HOXC11*, and *NUP98-NSD3*. Notably, *FLT3*-internal tandem duplication (ITD) was found in 9 (45%), and *KIT*, *NRAS*, *KRAS*, *WT1*, *IDH1*, and *IDH2* mutations were found in 4(20%), 4(20%), 2 (10%), 8 (40%), 2(10%), and 1(5%) patients, respectively. Fourteen patients (88%) had at least one mutation in cell proliferation-related gene (*FLT3*, *KIT*, or *RAS*). Seven (83%) of 9 patients with *FLT3*-ITD and 2 (50%) of 4 patients with *NRAS* mutations died. These results suggest that a high frequency of cell proliferation gene mutations may contribute to leukemogenesis in *NUP98*-related leukemia, existence of mutations on the preferential genes strongly suggests that leukemogenesis induced by *NUP98*-fusions may depend on the mutations on selective genes. While *FLT3* or *NRAS* mutations that were identified at high frequency in the patients with *NUP98*-fusion genes showed poorer prognosis of the patients with *NUP98*-fusion leukemia, concomitant existence of *KIT*, *WT1*, *IDH1*, or *IDH2* mutations strongly suggest that they may also play pathological roles in the hematological malignancies with *NUP98*-fusion.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：小児血液学、小児腫瘍学、小児遺伝子
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：NUP98、HOX、白血病、FLT3、RAS、WT1、急性骨髄性白血病

1. 研究開始当初の背景

小児 AML は治療の進歩により予後が改善したが、治癒率は 60%前後と低いため、AML の治療については改善の必要がある。これまでのさまざまな研究で AML の発症に寄与する遺伝子異常が同定されてきたが、それぞれが AML にどのように関与しているか明らかになっているものは少ない。また、AML の発症には機能的に異なる 2 つの遺伝子異常が同時に存在する必要があると考えられているが、同時に発症する遺伝子異常がはっきりしている AML は少ない。これら AML で認められる遺伝子異常を同定してその機能を証明することは、AML の発生メカニズムだけでなく、臨床像との相関、特に治療反応性や予後との関連を明らかにするために重要である。その結果、テラーメイド治療への応用、さらに、原因遺伝子および原因タンパク質を標的とした治療法（分子標的療法）の確立によって、小児 AML の治癒に貢献できる。

2. 研究の目的

我々はこれまで、白血病および骨髄異形成症候群 (MDS) に認められる 11p15 転座型白血病/MDS の研究に従事してきた。この 11p15 転座型白血病/MDS において、11p15 の切断部位から単離された NUP98 遺伝子の関与が報告されている。これまでに NUP98 遺伝子の転座相手は約 30 の染色体領域に及び、20 個の遺伝子が単離された。このうち、NUP98-HOX 融合遺伝子が 80%以上を占める。我々はこのうち t(2;11)(q31;p15), t(7;11)(p15;p15), t(11;12)(p15;q13)において 2q31 より *HOXD11* 遺伝子 (Taketani T, et al: Cancer Res 2002) を、7p15 より *HOXA13* 遺伝子 (Taketani T, et al: Genes Chromosomes Cancer 2002) を、12q13 より *HOXC11* 遺伝子 (Taketani T, et al: Cancer Res 2002) を単離・同定した。

近年、機能的に異なる 2 つ以上の遺伝子異常が同時に存在することが AML の発症を引き起こすことが報告されている。それらは①細胞増殖に関わる遺伝子異常、②細胞の分化に関わる遺伝子異常、③細胞周期やアポトーシスに関わる遺伝子異常である。これまで、さまざまな AML でこれらの解析が行われているが、*NUP98-HOX* 融合遺伝子を有する白血病については同時に発生する遺伝子異常は明らかとなっていない。今回、我々は *NUP98-HOX* 融合遺伝子を有する白血病に同時に起こる遺伝子異常を同定し、その機能を明らかにす

ることにより、AML 発症のメカニズムを明らかにし、将来の治療法の発展に貢献することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

対象は、染色体 11p15 転座型を有する造血器腫瘍 20 例。RT-PCR を行い、*NUP98* 遺伝子と融合する遺伝子を同定した。遺伝子変異は、*FLT3*, *KIT*, *WT1*, *NRAS*, *CEBPA*, *AML1*, *MLL*, *IDH1*, *MPL*, *TET2*, *CBL*, および *ASXL1* 遺伝子について、RT-PCR、subcloning、direct sequencing、RFLP、PCR-SSCP 法を用いて検討した。

4. 研究成果

11p15 転座を有する造血器腫瘍 20 例の患者は、男性が 12 例、女性が 8 例であった。年齢は、3 歳から 69 歳 (中央値 35 歳)。13 例が急性骨髄性白血病 (AML) で、FAB 分類は M2 が 7 例、M4 が 5 例、M1 が 1 例であった。3 例が骨髄異形成症候群 (MDS) で、2 例が RA、1 例が RAEB であった 3 例は、骨髄増殖性疾患 (MPD) で、CMML、フィラデルフィア染色体陰性 CML、JMML がそれぞれ 1 例ずつであった。残りの 1 例は、T 細胞性悪性リンパ腫であった。*NUP98* 遺伝子との融合する遺伝子を検索したところ、10 例が *NUP98-HOXA9* 融合遺伝子、2 例が *NUP98-HOXA13* 融合遺伝子、2 例が *NUP98-HOXA11* 融合遺伝子、2 例が *NUP98-HOXD13* 融合遺伝子、2 例が *NUP98-DDX10* 融合遺伝子、1 例が *NUP98-HOXC11* 融合遺伝子、1 例が *NUP98-HOXD11* 融合遺伝子、1 例が *NUP98-NSD3* 融合遺伝子を有していた。このうち、2 例でそれぞれ、*NUP98-HOXA9* 融合遺伝子と *NUP98-HOXA11* 融合遺伝子、*NUP98-HOXA9* 融合遺伝子と *NUP98-HOXA13* 融合遺伝子の 2 つの融合遺伝子を認めた。*NUP98-DDX10* 融合遺伝子を認めた 2 例が 2 次性造血器腫瘍であったのに対し、それ以外の 18 例は de novo 造血器腫瘍であった。AML の患者のうち、*NUP98-HOXA* 融合遺伝子を有する患者の多くが組織学的に FAB 分類の M2 の表現型を呈していた。一方、*NUP98-HOXD* 融合遺伝子を有する患者は FAB 分類の M4 の表現型を呈していた。付加的遺伝子異常の検討では、*FLT3*-internal tandem duplication (ITD) 遺伝子変異、*KIT* 遺伝子変異、*NRAS* 遺伝子変異、*KRAS* 遺伝子変異、*WT1* 遺伝子変異をそれぞれ、9 例 (45%)、4 例 (20%)、4 例 (20%)、

2例(11%)、8例(40%)に認めた。*IDH1* および *IDH2* 遺伝子変異は、それぞれ2例(10%)、1例(5%)に認めた(図1)。一方、*FLT3* のチロシンキナーゼ遺伝子変異、*AML1* 遺伝子変異、*CEBPA* 遺伝子変異、*NPM1* 遺伝子変異、*MLL* 遺伝子-partial tandem duplication、*MPL1* 遺伝子変異、*TET2* 遺伝子変異、*ASXL1* 遺伝子変異、*CBL* 遺伝子変異は認められなかった。

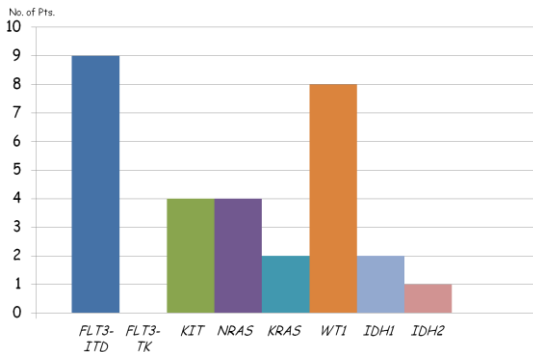


図1 NUP98関連造血器腫瘍が持つ付加的遺伝子異常の頻度

20例のうち、15例(75%)で *FLT3*-ITD 変異あるいは *RAS* 遺伝子変異のどちらかを有していた。しかも、これらの遺伝子変異は同時にみられることはなかった。*WT1* 遺伝子変異を有する8例中6例で *FLT3*-ITD 遺伝子変異を有しており、残りの2例は、*RAS* 遺伝子変異を有していた。*KIT* 遺伝子変異あるいは *WT1* 遺伝子変異を持つ全例、*IDH* 遺伝子変異を有する3例中2例で、他の付加的遺伝子異常を有していた。*FLT3*-ITD 遺伝子変異を持つ患者は、女性より男性の方が有意に多く認められ ($p=0.01$)、初診時白血球数も多かった。*RAS* 遺伝子変異を有する症例は、*RAS* 遺伝子変異のない症例よりも優位に発症年齢が若かった ($p=0.04$) (表1)。

表1 NUP98関連造血器腫瘍が持つ付加的遺伝子異常の臨床像への影響

				p value
WBC at onset (/ μ l)	<i>FLT3</i> -ITD	<i>FLT3</i> -WT	10,9905	0.08
Age (years)	<i>RAS</i> -MT		15	0.04
	<i>RAS</i> -WT		56	
<i>FLT3</i> -ITD	Sex	Male	8	0.01
		Female	1	
Prognosis	Prognosis	Alive	2	0.15
		Death	7	
Simultaneous mutations	Prognosis	Alive	2	0.30
		Death	6	

FLT3-ITD 遺伝子変異を持つ9例のうち、7例(78%)が死亡した。同様に、*NRAS* 遺伝子変異を有する4例中2例(50%)が死亡した。

一方、*KRAS* 遺伝子変異、*IDH1* 遺伝子変異、*IDH2* 遺伝子変異を有する症例は全例生存している。以上より、*FLT3*-ITD 遺伝子変異あるいは *NRAS* 遺伝子変異を有する患者は *KRAS* 遺伝子変異、*IDH1* あるいは *IDH2* 遺伝子変異を有する患者よりも予後不良である可能性が示唆された(図2)。しかし、*FLT3*-ITD 遺伝子変異あるいは *NRAS* 遺伝子変異を有しているが、*NUP98*-*HOXD* 融合遺伝子を持った患者3例全例が生存している。

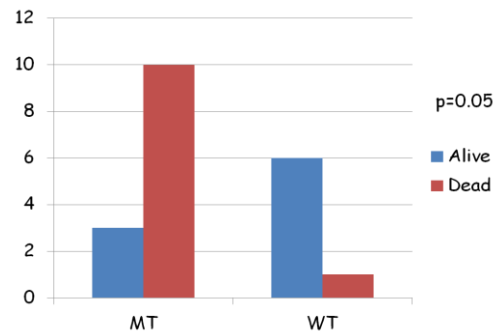


図2 *FLT3*-ITD 変異・*NRAS* 変異を有する患者は予後不良である。

以上の結果から、*NUP98* 融合遺伝子を持つ白血病の予後は、付加的遺伝子異常に加えて、融合遺伝子の種類に依存することが示唆された。また、*NUP98* 融合遺伝子を有する患者には、*FLT3*-ITD 遺伝子変異、*RAS* 遺伝子変異、*WT1* 遺伝子変異を高頻度に認めることから、*NUP98* 融合遺伝子を有する白血病は細胞増殖に関わる遺伝子異常(*FLT3*-ITD 遺伝子変異、*RAS* 遺伝子変異、*WT1* 遺伝子変異)が同時に起こることが必要である可能性が示唆された。

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2件)

1. Fukuda S, Abe M, Onishi C, Taketani T, Purevsuren J, Yamaguchi S, Conway EM, Pelus LM. Survivin selectively modulates genes deregulated in human leukemia stem cells. *Journal of Oncology*. 査読有, 946936, 2011.
2. Taketani T, Taki T, Nakamura T, Kobayashi Y, Ito E, Fukuda S, Yamaguchi S, Hayashi Y. High frequencies of simultaneous *FLT3*-ITD, *WT1* and *KIT* mutations in hematological malignancies with *NUP98*-fusion genes. *Leukemia*. 査読有, 24, 2010, 1975-1977.

[学会発表] (計6件)

1. Takeshi Taketani, Tomohiko Taki, Miz

uki Hyuga, Chie Onishi, Seiji Fukuda, Seiji Yamaguchi, Yasuhide Hayashi. The Concurrent Mutations in Hematological Malignancies with NUP98-Fusion Genes are Associated with Clinical Prognosis of the Patients. 53rd American Society of Hematology Annual Meeting. 2011年12月10日, San diego, USA

2. 竹谷健、滝智彦、日向瑞貴、安部真理子、福田誠司、山口清次、林泰秀. 染色体11p15異常を有する造血器腫瘍における遺伝子変異と臨床像の関連. 第53回日本小児血液・がん学会. 2011年11月25日, ベイシア文化ホール (群馬県高崎市)

3. 竹谷健、服部美保、日向瑞貴、安部真理子、大西千恵、福田誠司. 骨髄性造血器腫瘍の遺伝子解析の検討. 第42回島根造血器腫瘍研究会. 2011年7月29日, ホテル武志山荘 (島根県出雲市)

4. Takeshi Taketani, Tomohiko Taki, Mariko Abe, Chie Onishi, Seiji Fukuda, Seiji Yamaguchi, Yasuhide Hayashi. High frequencies of FLT3-ITD, WT1, and KIT, mutations in hematologic malignancies with NUP98-fusion genes. 51th American Society of Hematology. 2009年12月6日, New Orleans, USA.

5. 竹谷健、滝智彦、山口清次、林泰秀. NUP98遺伝子再構成を有する小児造血器腫瘍に同定された遺伝子変異とその臨床的意義. 第51回日本小児血液学会. 2009年11月28日, 東京ベイホテル東急 (千葉県浦安市).

6. Takeshi Taketani, Tomohiko Taki, Seiji Fukuda, Seiji Yamaguchi, Yasuhide Hayashi. Clinical significance of somatic mutations in hematological malignancies with NUP98-fusion genes. The 71st Annual meeting of the Japanese society of Hematology. 2009年10月23日, 京都国際会館 (京都市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹谷 健 (TAKETANI TAKESHI)

島根大学・医学部・講師

研究者番号 : 30359880

(2) 研究分担者 : なし

(3) 連携研究者 : なし