

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670277

研究課題名(和文) 卓上型次世代シーケンサーを用いた AMLの迅速かつ安価な予後予測システムの開発

研究課題名(英文) Establishment of new system for genomic analysis for AML using by desk-top next generation sequencer

研究代表者

足立 壯一 (Adachi, Souichi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10273450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：質の高い臨床研究は、多数の遺伝子解析が必須であり、迅速かつ安価な遺伝子解析法の開発が急務である。本研究では、小児急性骨髄性白血病(AML)の予後に関連性の高い遺伝子を選別し、卓上型次世代シーケンサーを用いて、予後予測パネルの作成を行った。小児AMLの初発、寛解、再発検体よりDNAを抽出し、Agilent社のHiSeq カスタマイズドパネルを用い、約150遺伝子を選定した。8例を解析し、4例からIKZF1, KRAS, GATA1, KIT, PU.1の遺伝子異常が検出され、残りの4例からもSH2B3, SMARCB2のlarge deletionが検出された。今後、多数例で解析を行う。

研究成果の概要(英文)：It is necessary for clinical studies to analyze many genomic genes analysis at the same time by using next-generation sequencer. For the purpose of establishing new methods to analyze many genes quickly and less expensively, we made gene analysis panels for child acute myeloid leukemia patients by desk-top next generation sequencer. We selected 150 genes from DNA samples of AML (primary, remission and relapse) by using HiSeq customized panel of Agilent Co. We analyzed 8 cases of AML and detected IKZF1, KRAS, GATA1, KIT, PU.1 mutation in four cases. We also detected large deletions of SH2B3 and SMARCB3 genes in the other four cases. We are going to analyze many samples from JPLSG AML-05 studies by the panel using desk-top next generation sequencer.

研究分野：病態検査学

キーワード：次世代シーケンサー 予後因子 AML

1. 研究開始当初の背景

日本の小児急性骨髄性白血病 (AML) の **治療成績は世界のトップ** (JCO, 27;4007, 2009, Leukemia, 27: 2413, 2013) であり、研究代表者が運営委員長をしている日本小児白血病リンパ腫研究グループ(JPLSG)AML委員会では、余剰検体を用いて精力的に遺伝子解析を行い、**遺伝子変異と予後との関連**が明らかとなってきた。(Leukemia in Press, Haematologica 99: e225, 2014, Blood Cancer J 4: e226, 2014)

一方、**次世代シーケンサーを利用した解析**技術は高度に進化し、従来のサンガーシーケンスによる遺伝子 1 個ずつの解析から、**一度に多数の遺伝子解析が可能**となっている。臨床研究の遂行には、多数の遺伝子解析が必須であるため、迅速かつ安価な遺伝子解析法の開発が急務となっている。

2. 研究の目的

小児 AML 多施設共同研究プロトコルの治療層別化に、必須の多数の遺伝子解析を、迅速かつ安価に遂行する検査法を開発する。これまでの研究で AML の予後に関連性の高い遺伝子を約 50 個選別し、**卓上型次世代シーケンサーを用いた予後予測 AML パネルの作成**を目指す。これは 1 検体あたり 2-3 万円と割合**安価で遺伝子解析が可能**となり、将来的にはきめ細かい治療の層別化など、臨床応用できる可能性が高いものと考えられる。

3. 研究の方法

今回我々はこれまでの研究で小児 AML の予後に関連性の高い遺伝子を約 50 個選別し、**卓上型次世代シーケンサーを用いた予後予測 AML パネルの作成**を目指す。小児 AML の初発、寛解、再発検体より DNA を常法通り抽出し、以後の検討に用いた。白血病パネルは Agilent 社の Haloplex カスタマイズドパネルを用い、約 150 遺伝

子を選定した。これは成人の白血病パネルと異なり、これまで小児白血病で変異があるとされている遺伝子以外に、骨髄異形成症候群関連の遺伝子、染色体再構成に関わる遺伝子、免疫不全関連の遺伝子なども加えた。実際の解析は、卓上型次世代シーケンサー (MiSeq, Illumina) を用いた。

4. 研究成果

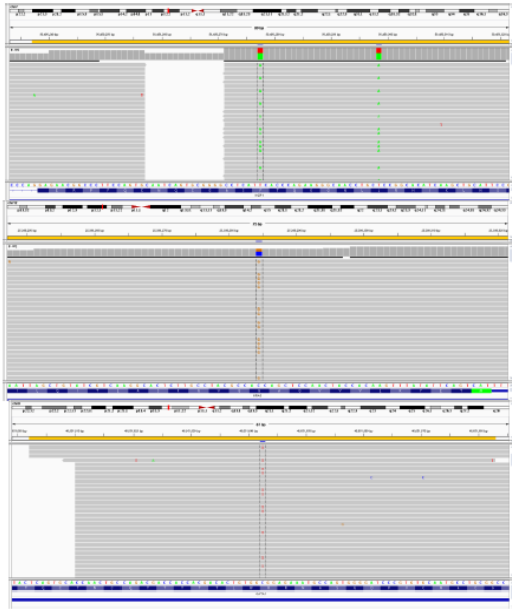
現在 8 例の AML 検体で検討が終了した。症例 1)非 Down 症の FAB-M7 の初診時 2 歳の女兒、AML05 protocol で治療後 8 ヶ月で再発、同胞からの血縁者間骨髄移植術を実施、現在無病生存中である。OTT-MAL や NUP98-NSD1, CBFA2T3-GLIS などのキメラ遺伝子は陰性だった。本解析で初発時と再発時検体から IKZF1 p.F154Y、KRAS p.G12A、GATA1 p.R270W が検出された。

症例 2) 初診時 7 歳男児、FAB-M2 で AML1-MTG8 キメラ陽性、AML99 protocol で治療し、現在無病生存中である。本例からは KRAS p.G12D が Allele frequency (AF) 0.46、p.G12A が AF 0.053 みつかった。

症例 3) 15 歳男児 FAB-M2, 初診時、染色体異常 inv(16)(p13.1q22)と FLT3-ITD を低率(AF 0.035)に認めた。治療中再発を来したが、再発検体では FLT3-ITD は検出されなかった。本方法で、KIT p.D816V が初診時検体で検出された。

症例 4) 非 Down 症の FAB-M7 の寛解導入不能な 1 歳女兒例、OTT-MAL, NUP98-NSD1, CBFA2T3-GLIS などのキメラ遺伝子は陰性、本方法で転写因子の PU.1 p.G156R が検出された。

残りの 4 例では初発と寛解期の検討で、point mutation は見つからなかったが、SH2B3 と SMARCB2 に large deletion がみつき、現在解析中である。



考案: このパネルの利点はわずか 225ng の DNA から解析可能、実際の解析は 1-1.5 日で終了、専用解析ソフトを用いるため、bioinformatics に詳しくない研究者でもデータ解析可能な点にある。1 検体の解析費用は 3 万円程度と安く抑えられる点は有益であった。欠点として、各個人特有の SNP が多く検出されるため、寛解期検体の解析結果で引き算しないと、なかなか本物の変異にたどりつけないこと、また血液学的寛解（骨髄中白血球細胞 5%未満）であっても、寛解が浅い場合は多数の変異を有することなどがあげられ、引き算する寛解期検体で何を選ぶかは重要であった。このため AML 診断後早期に、予後予測を可能とし、実臨床への応用も可能ではないかと考えられた。

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 4 件)

1. Matsuo H, Adachi S. et al. *EVII* overexpression is a poor prognostic factor in pediatric patients with *MLL-AF9* rearranged acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2014 Nov;99(11):e225-7
2. Ismael O, Shimada A, et al. RUNX1

mutation associated with clonal evolution in relapsed pediatric acute myeloid leukemia with t(16;21)(p11;q22). *Int J Hematol.* 2014;99:169-174

3. Jo A, Adachi S, et al. High expression of *EVII* and *MEL1* is a compelling poor prognostic marker of pediatric AML Leukemia doi: 10.1038/leu.2015.5. *in press*
4. Tokumasu M, Adachi S. et al. Adverse Prognostic Impact of *KIT* Mutations in Childhood CBF-AML: the Results of the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group AML-05 Trial. *Leukemia in press*

〔学会発表〕(計 件)

1. Shimada A, Adachi S. et al. Pediatric AML with *FLT3-ITD/WT* allelic ratio, *NUP98-NSD1* chimera, *NPM1*, and *WT1* mutations - JPLSG AML05 study. 25th Annual Meeting of the I-BFM Study Group Prague, April 27, 2014
2. Hara Y, Adachi S, et al. Poor prognosis associated with FAB subtypes M4 and M5 in Japanese pediatric acute myeloid leukemia patients with *FLT3-ITD*. 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Francisco, USA, December 6-9, 2014.
3. Yamato G, Adachi S, et al. Clinical features of patients with *ASXL1* and *ASXL2* mutations in pediatric acute myeloid leukemia. 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Francisco, USA, December 6-9, 2014.
4. 佐野 仁志, 足立 壮一, 他 小児 AML における G-CSF receptor(CSF3R)遺伝子異常の解析. 第 117 回日本小児科学会 学術集会, 名古屋, 2014.4.11-13

5. 原 勇介, 足立 壮一, 他 小児急性骨髄性白血病における GATA2 変異の解析. 第 117 回日本小児科学会学術集会, 名古屋, 2014.4.11-13
 6. 柴 徳生, 足立 壮一, 他 JPLSG AML 委員会. 小児急性骨髄性白血病における分子生物学的背景を用いた新たな治療層別化への試み. 第 117 回日本小児科学会学術集会, 名古屋 2014.4.11-13
 7. 原 勇介, 足立 壮一, 他 小児急性骨髄性白血病における寛解導入療法終了後非寛解例の分子生物学的異常の同定と臨床像の検討 第 73 回日本癌学会学術総会 (横浜市) (2014.9.25-27)
 8. Sano H, Adachi S, et al. CSF3R and CALR mutations and cytogenetic findings in pediatric myeloid malignancies. 第 76 回日本血液学会総会, 2014 年 11 月 1 日, 大阪
 9. Hara Y, Adachi S, et al. Genetic analyses of patients who did not achieve complete remission after induction therapy. 第 76 回日本血液学会総会, 2014 年 11 月 1 日, 大阪
 10. Shimada A, Adachi S. et al. Pediatric AML with FLT3-ITD/WT, NUP98-NSD1, NPM1, and WT1 mutations affected the clinical outcome. 第 76 回日本血液学会総会, 2014 年 11 月 1 日, 大阪
 11. Shiba N, Adachi S, et al. The prognostic impact of high EVI1-related genes expression in pediatric acute myeloid leukemia. 第 76 回日本血液学会総会, 2014 年 11 月 2 日, 大阪
 12. 大和玄季, 足立 壮一, 他 小児急性骨髄性白血病における ASXL1、ASXL2 遺伝子変異と臨床像. 第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会 (岡山県) (2014.11.28-30)
 13. 大木健太郎, 足立 壮一, 他 小児 AML における IKZF1 欠失の頻度と予後解析: JPLSG AML-05. 第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会 (岡山県) (2014.11.28-30)
 14. 原勇介, 足立 壮一, 他 小児急性骨髄性白血病における寛解導入療法非寛解例の遺伝子解析による予後不良因子の同定. 第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会 (岡山県) (2014.11.28-30)
 15. Shimada A, Adachi S: Chemotherapy is effective for pediatric RAEB/RAEB-T: Results from the JPLSG AML 05 and JSPHO MDS studies 第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会 (岡山県) (2014.11.28-30)
 16. Yamashita Y, Shimada A, Adachi S: Incidence and clinical impact of FLT3 mutation in childhood acute promyelocytic leukemia ; JPLSG AML-P05 study 第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会 (岡山県) (2014.11.28-30)
- 〔図書〕(計 1 件)
1. 足立 壮一 他 造血細胞移植学会ガイドライン 第 3 巻 日本造血細胞移植学会ガイドライン委員会(編) 急性骨髄性白血病(小児)第 2 版 医薬ジャーナル社 28-42, 2014
- 〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

http://www.med.kyoto-u.ac.jp/organization-staff/research/human_health/mt0302/
<http://adachilab.web.fc2.com/member.html>

6．研究組織

(1)研究代表者 足立 壯一

(ADACHI SOUICHI) 京都大学・医学研究科・
教授

研究者番号： 1 0 2 7 3 4 5 0

(2)研究分担者 嶋田 明

(SHIMADA AKIRARA) 岡山大学・医学研究科・
講師

研究者番号： 7 0 3 9 1 8 3 6

(3)連携研究者 なし