

令和元年6月13日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09653

研究課題名(和文) 小児骨髄異形成症候群(RAEB, RAEBT)の分子病態解析

研究課題名(英文) Molecular analysis of pediatric MDS/AML

研究代表者

嶋田 明(Shimada, Akira)

岡山大学・大学病院・准教授

研究者番号：70391836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：小児のMDS/AMLのメチル化状態は依然不明で、MS-MLPA法を用いて、25種類のがん抑制遺伝子のpromotor領域のメチル化状態を解析した。Low-grade MDS(n=7)ではメチル化はみられず、high-grade MDS(n=5)では、ESR1とCADM1遺伝子のメチル化がみられた。AMLでは、12/22(54.5%)でメチル化がみられた。特にCBF-AMLは高頻度にメチル化がみられた。epigenetic modifierとして有名な遺伝子群の変異はみられなかった。以上よりがん抑制遺伝子のメチル化はhigh-grade MDSの状態から始まっていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成人と比較して、小児の骨髄異形成症候群(MDS)/急性骨髄性白血病(AML)でもがん抑制遺伝子のメチル化がみられたことは、今後小児でも抗メチル化薬の応用が期待できる。また成人とは異なりepigenetic modifier遺伝子の変異はみられなかったことは重要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Epigenetic status of the promotor region on tumor suppressor genes (TSGs) in pediatric myelodysplastic syndrome (MDS)/acute myeloid leukemia (AML) are still remains unknown. We analyzed the aberrant methylation of promotor region of 25 TSGs in pediatric 7 low grade MDS, 4 advanced MDS and 22 AML patients by FAB classification by MS-MLPA method. Total 12/22(54.5%) patients had more than one methylated TSGs (number of methylated TSGs was 0-5 in each patient, median 1). More than 20% of patients had methylated TSGs including CDKN2B, CADM1, CDH13 and ESR1. Especially, all (4/4) t(8;21) patients had CDH13 methylation, 3/4 (75%) patients with inv(16) had ESR1 methylation and normal karyotype did not. Complete remission samples, and low grade MDS samples were not methylated. All advanced MDS patients had 1 or 2 methylated TSGs. In this study, many genes related to epigenetic modification such as ASXL1, TET2 and EZH2 were not mutated. Aberrant methylation was started in advanced MDS.

研究分野：小児血液腫瘍学

キーワード：骨髄異形成症候群 急性骨髄性白血病 がん抑制遺伝子 メチル化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

小児の骨髄異形成症候群 (MDS/急性骨髄性白血病 (AML)) は依然として難治である。これまで遺伝子解析技術の進歩により、予後予測につながる遺伝子変異の同定が行われてきたが、メチル化異常などは不明のままである。特にがん抑制遺伝子 (Tumor suppressor genes, TSGs) の promoter 領域のメチル化異常は、がん抑制遺伝子蛋白の産生を抑制し、病態に関与しているものと考えられるが、小児 MDS/AML では不明のままである。

#### 2. 研究の目的

小児の MDS/AML の遺伝子変異とメチル化異常を明らかとする。

#### 3. 研究の方法

25 個の TSGs のプロモーター領域のメチル化異常に関して、Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MS-MLPA) 法を用いて解析をおこなった。対象は 0-15 歳、MDS 計 11 名 (low grade MDS 7 名、advanced MDS 4 名) と AML 22 名 (男子 10 名、女子 12、年齢中央値 6 歳)。また白血病に関連する 160 遺伝子を搭載した白血病パネルを作成し、次世代シーケンサーによる target sequence で SNVs, In/del, copy number variants などを同時に解析した。

対象の TSGs 一覧: TIMP3, APC, CDKN2A, MLH1, ATM, RARB, CDKN2B, HIC1, CHFR, BRCA1, CASP8, CDKN1B, KLLN, BRCA2, CD44, RASSD1, DAPK1, VHL, ESR1, TP73, FHIT, CADM1, CDH13, GSTP1

#### 4. 研究成果

AML に関しては、計 12/22 (54.5%) の患者で少なくとも 1 個以上の TSG のメチル化が確認された (0 - 5 個、中央値 1 個)。20% 以上の患者で、CDKN2A, CADM1, CDH13, ESR1 などのメチル化が認められた。特に t(8;21)-AML では 4 例中 4 例で CDH13 のメチル化がみられ、inv(16) の 4 例中 3 例で ESR1 のメチル化がみられたが、正常核型では全例メチル化は認められなかった。正常検体や、AML 患者の寛解期検体ではメチル化はみられなかった。MDS では low grade MDS ではメチル化はみられなかったが、advanced MDS では全例 1 - 2 個の TSGs のメチル化が認められた。同時に行ったターゲットシーケンス解析結果では、GATA1, IKZF1, KRAS, KIT, FLT3, SH2B3, PIK3CD, PU.1, SMARC1, ALK 遺伝子などの変異と、CTCF, RB1, SRP72, ATM, NF1, U2AF1 遺伝子の欠損がみられた。

成人の MDS では AML 進展に伴い TSGs のメチル化が増加し、予後不良と関連することが知られており、今回の結果は、成人 AML 検体で MS-MLPA 解析を同様に行った結果と類似していた (Hess CJ., Leuk Lymphoma 2008)。成人 MDS/AML で変異頻度の高い epigenetic modifier と呼ばれる ASXL1, TET2, EZH2 遺伝子などは変異はみられなかった点は、成人と異なっていた。成人 MDS/AML で抗メチル化薬が使用されており、今後小児 MDS/AML でも臨床応用が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 18 件)

Miyamura T, Moritake H, Nakayama H, Tanaka S, Tomizawa D, Shiba N, Saito AM, Tawa A, Shimada A, Iwamoto S, Hayashi Y, Koike T, Horibe K, Manabe A, Mizutani S, Taga T, Adachi S. Clinical and biological features of paediatric acute myeloid leukaemia (AML) with primary induction failure in the Japanese Paediatric Leukaemia/Lymphoma Study Group AML-05 study. *Br J Haematol.* 2019;185:284-288. doi: 10.1111/bjh.15799. 査読有

Shimada A, Iijima-Yamashita Y, Tawa A, Tomizawa D, Yamada M, Norio S, Watanabe T, Taga T, Iwamoto S, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Takahashi H, Nakayama H, Koh K, Goto H, Kosaka Y, Saito AM, Kiyokawa N, Horibe K, Hara Y, Oki K, Hayashi Y, Tanaka S, Adachi S. Risk-stratified therapy for children with FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia: results from the JPLSG AML-05 study. *Int J Hematol.* 2018;107:586-595. doi: 10.1007/s12185-017-2395-x. 査読有

Iijima-Yamashita Y, Matsuo H, Yamada M, Deguchi T, Kiyokawa N, Shimada A, Tawa A, Takahashi H, Tomizawa D, Taga T, Kinoshita A, Adachi S, Horibe K. Multiplex fusion gene testing in pediatric acute myeloid leukemia. *Pediatr Int.* 2018;60:47-51. doi: 10.1111/ped.13451. 査読有

Matsuo H, Iijima-Yamashita Y, Yamada M, Deguchi T, Kiyokawa N, Shimada A, Tawa A, Tomizawa D, Taga T, Kinoshita A, Adachi S, Horibe K. Monitoring of fusion gene transcripts to predict relapse in pediatric acute myeloid leukemia. *Pediatr Int*. 2018;60:41-46. doi: 10.1111/ped.13440. 査読有

Kuwatsuka Y, Tomizawa D, Kihara R, Nagata Y, Shiba N, Iijima-Yamashita Y, Shimada A, Deguchi T, Miyachi H, Tawa A, Taga T, Kinoshita A, Nakayama H, Kiyokawa N, Saito AM, Koh K, Goto H, Kosaka Y, Asou N, Ohtake S, Miyawaki S, Miyazaki Y, Sakura T, Ozawa Y, Usui N, Kanamori H, Ito Y, Imai K, Suehiro Y, Kobayashi S, Kitamura K, Sakaida E, Ogawa S, Naoe T, Hayashi Y, Horibe K, Manabe A, Mizutani S, Adachi S, Kiyoi H. Prognostic value of genetic mutations in adolescent and young adults with acute myeloid leukemia. *Int J Hematol*. 2018;107:201-210. doi: 10.1007/s12185-017-2340-z. 査読有

Nakayama H, Tomizawa D, Tanaka S, Iwamoto S, Shimada A, Saito AM, Yamashita Y, Moritake H, Terui K, Taga T, Matsuo H, Kosaka Y, Koh K, Hosoi H, Kurosawa H, Isoyama K, Horibe K, Mizutani S, Adachi S. Fludarabine, cytarabine, granulocyte colony-stimulating factor and idarubicin for relapsed childhood acute myeloid leukemia. *Pediatr Int*. 2017;59:1046-1052. doi: 10.1111/ped.13378. 査読有

Iwasaki Y, Nishiuchi R, Aoe M, Takahashi T, Watanabe H, Tokorotani C, Kikkawa K, Shimada A. Positive Minimal Residual Disease of FLT3-ITD before Hematopoietic Stem Cell Transplantation Resulted in a Poor Prognosis of an Acute Myeloid Leukemia. *Acta Med Okayama*. 2017;71:79-83. doi: 10.18926/AMO/54829. 査読有

Moritake H, Tanaka S, Nakayama H, Miyamura T, Iwamoto S, Shimada A, Terui K, Saito A, Shiba N, Hayashi Y, Tomizawa D, Taga T, Goto H, Hasegawa D, Horibe K, Mizutani S, Adachi S. Outcome of relapsed core binding factor acute myeloid leukemia in children: A result from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG) AML-05R study. *Pediatr Blood Cancer*. 2017;64. doi:10.1002/pbc.26491. 査読有

Hara Y, Shiba N, Ohki K, Tabuchi K, Yamato G, Park MJ, Tomizawa D, Kinoshita A, Shimada A, Arakawa H, Saito AM, Kiyokawa N, Tawa A, Horibe K, Taga T, Adachi S, Taki T, Hayashi Y. Prognostic impact of specific molecular profiles in pediatric acute megakaryoblastic leukemia in non-Down syndrome. *Genes Chromosomes Cancer*. 2017;56:394-404. doi: 10.1002/gcc.22444. 査読有

嶋田 明. AML with recurrent genetic abnormality in WHO2016 遺伝子変異を伴う小児急性骨髄性白血病、臨床血液 58 巻 8 号 Page983-990, 2017 査読有

Shiba N, Yoshida K, Shiraiishi Y, Okuno Y, Yamato G, Hara Y, Nagata Y, Chiba K, Tanaka H, Terui K, Kato M, Park MJ, Ohki K, Shimada A, Takita J, Tomizawa D, Kudo K, Arakawa H, Adachi S, Taga T, Tawa A, Ito E, Horibe K, Sanada M, Miyano S, 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*. 2016;175:476-489. doi: 10.1111/bjh.14247. 査読有

Yamada A, Moritake H, Kinoshita M, Sawa D, Kamimura S, Iwamoto S, Yamashita Y, Inagaki J, Takahashi T, Shimada A, Obara M, Nuno H. Relapsed childhood acute myeloid leukemia patient with inversion of chromosome 16 harboring a low FLT3 internal tandem duplication allelic burden and KIT mutations. *Pediatr Int*. 2016;58:905-8. doi:

10.1111/ped.13010. 査読有

Takahashi H, Watanabe T, Kinoshita A, Yuza Y, Moritake H, Terui K, Iwamoto S, Nakayama H, Shimada A, Kudo K, Taki T, Yabe M, Matsushita H, Yamashita Y, Koike K, Ogawa A, Kosaka Y, Tomizawa D, Taga T, Saito AM, Horibe K, Nakahata T, Miyachi H, Tawa A, Adachi S. High event-free survival rate with minimum-dose-anthracycline treatment in childhood acute promyelocytic leukaemia: a nationwide prospective study by the Japanese Paediatric Leukaemia/Lymphoma Study Group. *Br J Haematol*. 2016;174:437-43. doi: 10.1111/bjh.14068. 査読有

Shiba N, Ohki K, Kobayashi T, Hara Y, Yamato G, Tanoshima R, Ichikawa H, Tomizawa D, Park MJ, Shimada A, Sotomatsu M, Arakawa H, Horibe K, Adachi S, Taga T, Tawa A, 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*. 2016;172:581-91. doi: 10.1111/bjh.13869. 査読有

Hanada T, Kanamitsu K, Chayama K, Miyamura T, Kanazawa Y, Muraoka M, Washio K, Imada M, Kageyama M, Takeuchi A, Tamai K, Oda M, Shimada A. A Long-term Survivor after Congenital Acute Myeloid Leukemia with t(8 ; 16)(p11 ; p13). *Acta Med Okayama*. 2016;70:31-5. PubMed PMID: 26899607. 査読有

Taga T, Watanabe T, Tomizawa D, Kudo K, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Iwamoto S, Nakayama H, Takahashi H, Shimada A, Taki T, Toki T, Ito E, Goto H, Koh K, Saito AM, Horibe K, Nakahata T, Tawa A, Adachi S. Preserved High Probability of Overall Survival with Significant Reduction of Chemotherapy for Myeloid Leukemia in Down Syndrome: A Nationwide Prospective Study in Japan. *Pediatr Blood Cancer*. 2016;63:248-54. doi: 10.1002/pbc.25789. 査読有

Tomizawa D, Watanabe T, Hanada R, Horibe K, Horikoshi Y, Iwamoto S, Kinoshita A, Moritake H, Nakayama H, Shimada A, Taga T, Takahashi H, Tawa A, Terui K, Hori H, Kawano Y, Kikuta A, Manabe A, Adachi S. Outcome of adolescent patients with acute myeloid leukemia treated with pediatric protocols. *Int J Hematol*. 2015;102:318-26. doi: 10.1007/s12185-015-1825-x. 査読有

嶋田 明、先天性白血病(新生児白血病)、日本産婦人科・新生児血液学会誌 24 巻 2 号 Page53-59, 2015. 査読有

[学会発表](計 7 件)

Shimada A, 他 Aberrant Methylation of Tumor Suppressor Genes in Pediatric Myelodysplastic Syndrome / Acute Myeloid Leukemia. 109th Annual Meeting of American Association of Cancer Research, Chicago, USA, 2018

Shimada A, 他、 Germline variants in pediatric leukemia detected by next generation sequence. International Congress of Human Genetics, Kyoto, 2016

嶋田 明 AML with recurrent genetic abnormality in WHO2016 遺伝子変異を伴う小児急性骨髄性白血病、日本血液学会 2016

Shimada A., 他、 AML-oriented chemotherapy is effective for RAEB and RAEBT in

children. 7th International Symposium on JMML, MDS and bone marrow failure Syndrome in children, Aarhus, Denmark, 2015

Shimada A. Retrospective Analysis of Infant AML in Japan. 26th International BFM Annual Meeting, Budapest, Hungary, 2015

Shimada A, 他、Adults with germline CBL mutation complicated with Juvenile Myelomonocytic Leukemia at Infancy, International Society of Hematology Annual Symposium, Karuizawa, Japan, 2015

Shimada A, 他、The challenge of risk-reclassification of Pediatric AML with FLT3 wild type –JPLSG AML05 study, Annual Meeting of International BFM study group, Athens, Greece, 2016

〔図書〕(計2件)

嶋田 明【Down 症を見つめる】血液疾患(解説/特集)小児科 60 巻 1 号 Page21-24(2019.01)

嶋田 明【小児疾患診療のための病態生理 3 改訂第 5 版】血液・腫瘍性疾患 急性骨髄性白血病(解説/特集)、小児内科 48 巻増刊 Page921-927(2016.11)

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 特になし

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。