

令和元年6月19日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10052

研究課題名(和文) 小児AMLにおけるEV11/MEL1高発現の臨床的意義の検証とその作用機構の解析

研究課題名(英文) Clinical potentiality of high expression of EV11 and MEL1 in pediatric AML

研究代表者

市川 仁 (Ichikawa, Hitoshi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・ユニット長

研究者番号：30201924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究代表者らがAML99研究登録症例の遺伝子発現プロファイル解析から見出した、小児AMLの新規予後不良因子EV11/MEL1高発現について、治療層別化マーカーとして臨床導入するための検査法の開発を行った。PCR反応を経ずにRNA検体から直接発現量の測定が可能なnCounterシステムについて、臨床検査法としての適性を検討した。その結果、簡便・迅速に測定できること、マイクロアレイ測定値、定量RT-PCR測定値と高い相関性を示すこと、高い再現性を示すことが確認された。nCounterシステムは、EV11/MEL1高発現を評価する臨床検査法として有望と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児AMLにおいてEV11/MEL1高発現症例は極めて予後不良であるが、第一寛解期に同種造血幹細胞移植を行った場合に生存例が多く認められ、造血幹細胞移植治療を行うことで予後がかなり改善されることが示唆されている。通常遺伝子発現をバイオマーカーとして使用することには再現性の面から困難な場合が多いが、nCounterシステムを用いることで安定した検査が可能であることが示された。実際に治療層別化マーカーとして臨床導入することで、小児AMLの予後の改善が期待される。

研究成果の概要(英文)：Microarray analysis of the AML99 study patients showed that the high expression of the EV11 or MEL1 genes was significantly associated with inferior survival. Their high expression was expected to be a good biomarker for therapy stratification. However, the qRT-PCR assay potentially has a risk of systematic error or bias derived from cDNA synthesis and enzymatic amplification, and is not easy to use in clinical settings. As a more practical testing method, we evaluated the nCounter system that directly measure target mRNA molecules without cDNA synthesis or enzymatic amplification. Our evaluation revealed high concordance between the nCounter assay and the qRT-PCR or microarray assay, and reproducibility of the nCounter assay. These results indicate that nCounter assay is a reliable and reproducible method to assess high EV11 or MEL1 expression in AML patients.

研究分野：分子腫瘍学、がんゲノム医療

キーワード：小児AML 小児急性骨髄性白血病 予後マーカー 治療選択マーカー EV11 MEL1 nCounter 臨床検査

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

### 1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病 (AML) においては、発症にかかわる染色体異常、遺伝子変異がこれまでに多数明らかにされ、その一部は治療反応性・予後と関連することから、予後マーカーとしても用いられている。わが国の小児 AML の多施設共同治療研究 (AML99 研究、AML05 研究、AML12 研究) においては、t(8;21)(q22;q22)、inv(16)(p13.1q22)、t(16;16)(p13.1;q22)、モノソミー7、5q-、t(16;21)(p11;21q22)、t(9;22)(q34;q11.2)、FLT3-ITD (internal tandem duplication)、NUP98-NSD1 融合遺伝子、t(6;11)(q27;q23) 等が予後マーカーとして層別化に用いられて来た。一方、正常核型 AML を始めとする特異的染色体異常を持たない症例に関しては適切な予後マーカーがないものが多く、未だ十分な層別化ができていない。本研究代表者らは、AML99 研究に登録された 130 症例の遺伝子発現プロファイル解析から、EVI1 (PRDM3、MECOM) 遺伝子と MEL1 (PRDM16) 遺伝子の高発現が相互排他的に認められ、いずれも予後不良と関連することを明らかにした (Jo et al, Leukemia, 2015) (図 1)。EVI1 高発現は t(6;11)(q27;q23) と、MEL1 高発現は NUP98-NSD1 及び FLT3-ITD の一部と重複するが、これらの既知の予後不良因子を持たない症例においても EVI1/MEL1 高発現が見られる例が多く存在する。また、EVI1/MEL1 高発現の症例全体の予後は不良であるが、第一寛解期に同種造血幹細胞移植を行った場合に生存例が多く認められる (表 1) ことから、治療選択マーカーとしての意義が期待された。

EVI1 と MEL1 は高い相同性を有するパラログ遺伝子である。共に白血病転座遺伝子として同定され、その発現亢進が白血病発症に関わることが知られている一方、正常組織においては造血幹細胞画分に特異的に発現し、その維持に重要な役割を果たしている。これらのことから、EVI1/MEL1 高発現が小児 AML の予後不良の直接の原因となっていることが強く示唆された。この EVI1/MEL1 高発現が AML99 研究症例全体の約 1/3 に相互排他的に見られている事実は、小児 AML の予後不良例の大部分が一つのパスウェイの異常により説明できる可能性を示唆するものと考えられた。

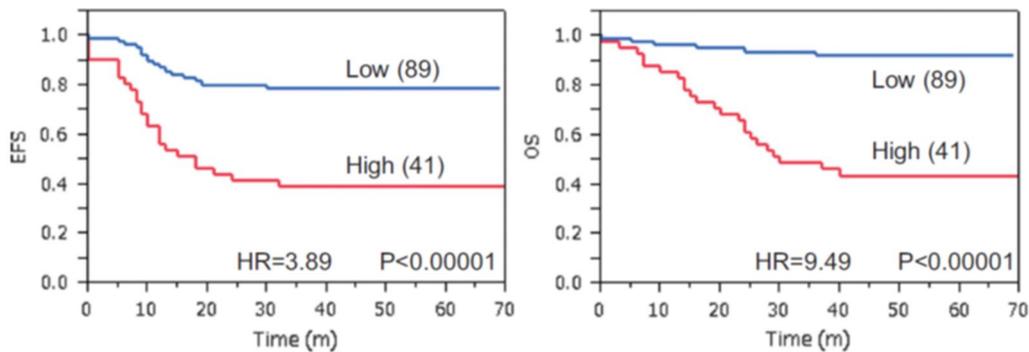


図 1. AML99 研究登録症例における EVI1/MEL1 高発現症例と低発現症例の予後

	Total (n=25)	Allo-SCT (n=11)	Chemotherapy (n=14)	P-value
Relapse				0.0051
CR	10 (40%)	8 (73%)	2 (14%)	
Relapsed	15 (60%)	3 (27%)	12 (86%)	
Survival				0.049
Alive	10 (40%)	7 (64%)	3 (21%)	
Dead	15 (60%)	4 (36%)	11 (79%)	

Abbreviations: allo-SCT, allogeneic stem cell transplantation; CR, complete remission.

表 1. EVI1/MEL1 高発現症例における造血幹細胞移植の有無と予後

### 2. 研究の目的

AML99 研究登録症例の解析から、EVI1/MEL1 高発現症例は予後不良であるが、第一寛解期に同種造血幹細胞移植を行った場合に予後がかなり改善されることが示唆されている (表 1)。しかし、EVI1 遺伝子及び MEL1 遺伝子の高発現により造血幹細胞移植の適応とするような、治療層別化因子として臨床応用する際には、高い精度と再現性が求められる。一般に、定量 RT-PCR において、長期にわたってコンタミネーションを排除し高い再現性を持ってアッセイを行うことは簡単ではない。そこで、より簡便で、PCR 反応を経ずに RNA 検体から直接測定可能な nCounter システムに着目し、実臨床における検査法として妥当かを検討する。

また、EVI1 と MEL1 はともに、転写開始点とスプライシングの違いにより、PR ドメインあり [PR(+)] / なし [PR(-)] の異なる isoform を産生する。両者は機能的に異なることが示唆されており、特に成人の検討では EVI1 高発現症例のうち PR(-) isoform を主に発現している症例が

特に予後不良であることも知られている。小児 AML において高発現している EVI1、MEL1 遺伝子がどのような isoform であるのかを、nCounter アッセイ、RT-PCR、RNA シークエンシングなどにより検討する。

### 3. 研究の方法

nCounter による EVI1 と MEL1 の発現評価には、N 末端側の PR ドメイン部分と各 isoform に共通する C 末端部分にそれぞれオリゴプローブを設計した。また、多くの isoform が知られる EVI1 に関しては、各種 isoform が区別できるプローブを追加した。その他に、既に AML においてその高発現が予後と関係することが報告されている遺伝子 (MMRN1、MEF2C、SOCS2、GPR56、BAALC、FLT3、WT1) と、これまでに報告はないものの AML99 研究登録症例のマイクロアレイ解析から予後への影響が示唆された遺伝子 (SPINK2、COL4A5、C2orf88) についてもプローブを設計した。これらをまとめて、小児 AML 予後評価用のプローブセットを構築した。内部標準用の遺伝子としては、ABL1、EDC3、EIF2B4、SF3A3、USP39 を用いた。

nCounter 検査の評価には、AML99 研究登録症例の RNA を用いた。1 アッセイ当たり 100 ng の RNA を使用して測定を行い、得られたカウントデータは nSolver Analysis Software を用いてノーマライズを行った。ノーマライズされたカウントデータを用いて、マイクロアレイ測定値、定量 RT-PCR 測定値との相関や、nCounter アッセイの再現性の評価等を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) nCounter とマイクロアレイで測定された EVI1、MEL1 の発現量の相関

MEL1 高発現症例 17 例と EVI1 高発現症例 16 例を含む AML99 研究登録症例 88 例について nCounter アッセイを行い、以前に取得したマイクロアレイ測定発現量と比較を行った。nCounter 測定 EVI1、MEL1 発現量は、マイクロアレイ測定発現量と高い相関を示した (EVI1 :  $r = 0.96$ 、MEL1 :  $r = 0.83$ ) (図 2)。また、この nCounter 測定発現量は、定量 RT-PCR 測定値とも高い相関を示した (EVI1 :  $r = 0.92$ 、MEL1 :  $r = 0.94$ )。

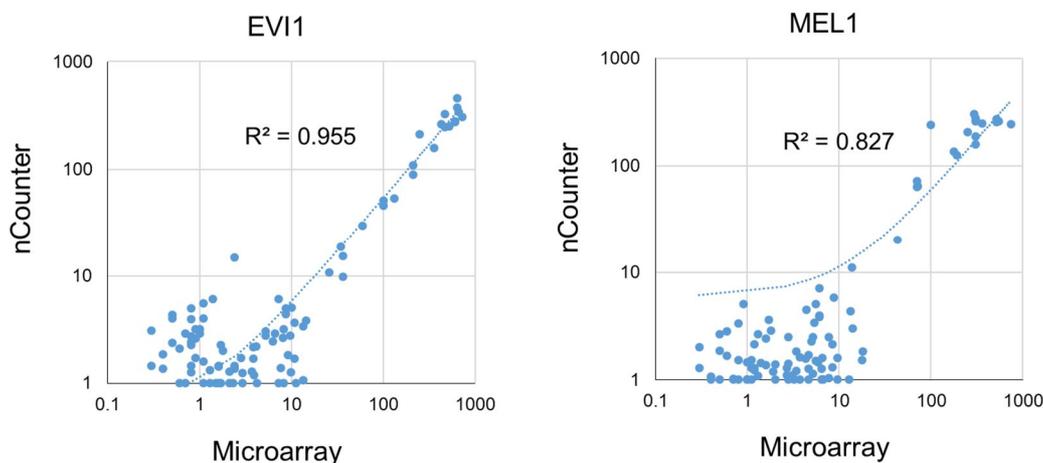


図 2. nCounter とマイクロアレイで測定された EVI1、MEL1 発現量の比較

#### (2) nCounter アッセイの再現性の評価

nCounter アッセイの再現性は、測定時期、使用する試薬のロット等を変えて、同一検体を複数回測定し、評価を行った。何れも高い再現性を示した。8 症例を 2 回測定した結果を、図 3 に示す (EVI1 :  $r = 0.97$ 、MEL1 :  $r = 0.99$ )。

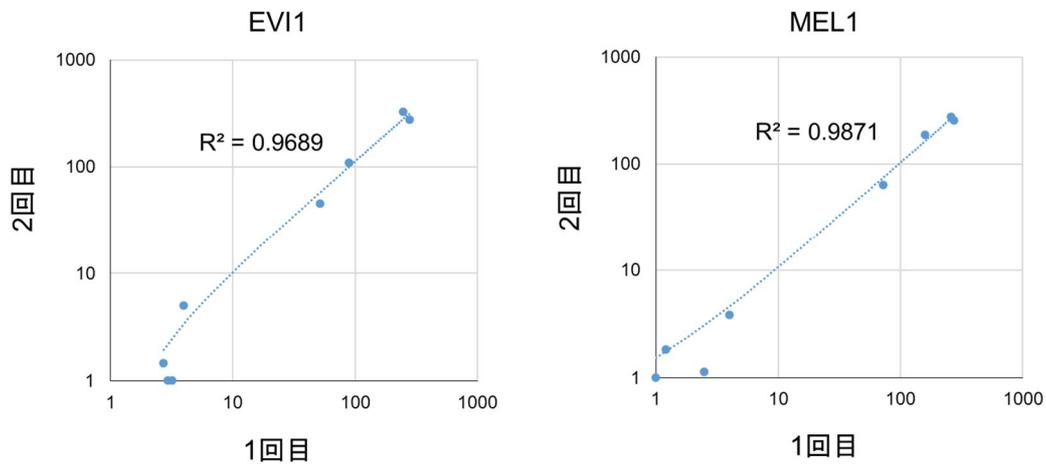


図3. nCounter 測定 EVI1、MEL1 発現量の再現性

### (3) PR(+)/PR(-) isoform の発現量の比較

EVI1、MEL1 高発現症例において、EVI1、MEL1 それぞれの PR(+) isoform を主に発現している症例と PR(-) isoform を主に発現している症例の有無を調べるため、C 末端側に設計したプローブと、N 末端側の PR ドメイン部に設計したプローブの発現量の相関を検討した(図4)。EVI1 高発現例では PR(-) isoform を発現している 6 例、PR(+) isoform を発現している 7 例に分かれたが、MEL1 高発現例では PR(+) isoform を発現している症例しか見られなかった。EVI1 高発現例で PR(-) isoform を発現している 6 例中 4 例が無病生存、PR(+) isoform を発現している 7 例中 4 例が無病生存であり、検討した症例数においては予後について差は明らかでなかった。

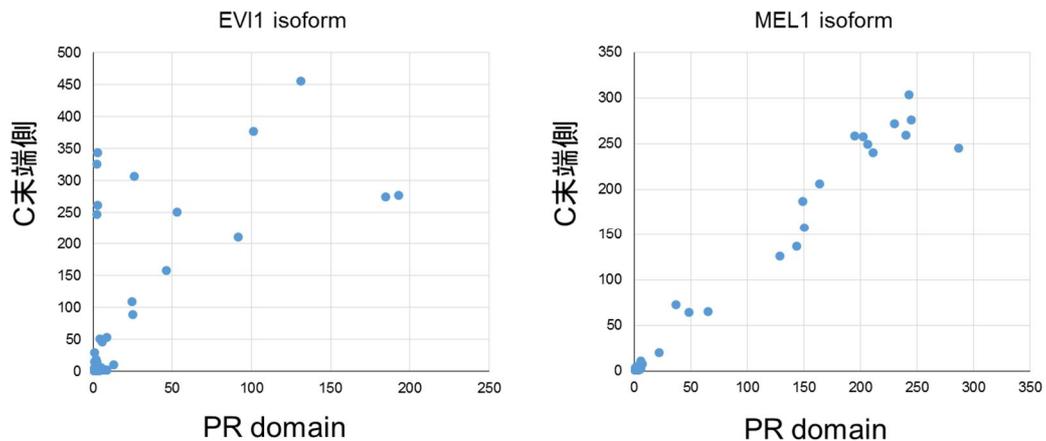


図4. EVI1、MEL1 の総発現量と PR(+) isoform 発現量の比較

### (4) 結論

今回の検討により、nCounter は極めて簡便・迅速に測定できること、EVI1、MEL1 発現解析においてマイクロアレイ測定値、定量 RT-PCR 測定値と高い相関性を示すこと、同一検体の複数回測定において高い再現性を示すことを確認した。nCounter アッセイは、EVI1、MEL1 高発現の評価において臨床実装しうる検査法として有望と考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

山崎文登、柴 徳生、林 泰秀、市川 仁、小児 AML における nCounter を用いた EVI1/PRDM16 発現解析の臨床応用の検討、第 59 回日本小児血液・がん学会学術集会、松山、2017

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：三谷幸代

ローマ字氏名：(MITANI, sachiyo)

研究協力者氏名：山崎文登

ローマ字氏名：(YAMAZAKI, fumito)

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。