

令和 元年 6 月 12 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20951

研究課題名(和文) 高リスク小児急性骨髄性白血病における多角的な遺伝子解析を用いた分子標的の同定

研究課題名(英文) Identification of molecular target of high risk pediatric AML by comprehensive genetic analysis

研究代表者

柴 徳生 (SHIBA, NORIO)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：50600615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年の次世代シーケンサーの登場により、様々な遺伝子異常が同定され、予後層別化因子として利用されるようになってきている。今回の網羅的DNAメチル化解析によって、急性骨髄性白血病の予後を高精度に予測可能にした。特に、予後不良因子とされているFLT3-ITDに対し、DNAメチル化パターンから予後良好例の抽出に成功した。またPRDM16高発現の予後不良群ではPRDM16遺伝子全体にわたってDNAがメチル化されることで、H3K27me3の誘導を調節する抑制性ポリコームの異常を誘発していることが予測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児、成人を問わず、急性骨髄性白血病は予後不良疾患であるが、今回の解析結果は、今後、不必要な造血幹細胞移植を回避したり、新たな分子標的薬の導入やメチル化阻害剤の適応症例の抽出などを可能とする可能性がある。その結果、治療成績の向上、移植治療関連死亡や治療関連の後遺症、合併症を減らすことができ、QOL向上に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Lots of gene alterations were identified and used for risk stratification by next generation sequencing. We investigated genome-wide DNA methylation patterns in pediatric patients with AML, and enabled to predict the prognosis particular in patients with FLT3-ITD which was known as adverse prognostic marker.

Surprisingly, when we examined the relation between high PRDM16 expression and PRDM16 methylation sites, most of hypermethylated sites were gene body, and located at important regions which were the targets of repressed polycomb in leukemic blast cells.

研究分野：血液腫瘍

キーワード：小児 急性骨髄性白血病 DNAメチル化 抑制性ポリコーム

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

## 1. 研究開始当初の背景

本邦において新規に小児がんを発症する患者は年間2000名程度と考えられている。そのうち小児急性骨髄性白血病 (AML) 患者は180名前後であり、約30%が再発をきたし、5年全生存率 (OS) は60%程度と予後不良な小児がんのひとつである。AMLは様々な遺伝子異常を背景に有するヘテロな疾患であり、未だ細胞遺伝学的背景のリスク評価が困難で、治療層別化や造血幹細胞移植の適応決定に苦慮する症例が多数存在し、その病態解明は急性リンパ性白血病に比べ大きく遅れている。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまでの遺伝子変異、染色体異常、遺伝子発現パターンに加えて、網羅的なDNAメチル化解析を行い、AMLの細胞遺伝学的な背景を明らかにし、リスク層別化の高精度化を図るとともにメチル化阻害剤等の新規薬剤の標的を模索することを目的とする。また、我々の先行研究である遺伝子発現解析では、成人AMLにおいても予後層別化を可能にしており、メチル化解析の成果も同様に年間数千人程度発症する成人AMLにも有効な可能性が高いと考えられる。

## 3. 研究の方法

日本小児白血病リンパ腫研究グループ (JPLSG) のAML-05臨床試験に登録され検体の得られた小児AML患者369例から、これまでの遺伝子解析プロファイルに基づいて、遺伝子変異、融合遺伝子、発現の見地からその差異を十分に比較検討が可能となるように様々な遺伝子異常を有する64症例を抽出した。解析はイルミナ社のINFINIUM METHYLATION EPIC KITを用いて施行した。

## 4. 研究成果

今回の網羅的DNAメチル化解析によって、高精度な予後層別化を可能にしたと同時に造血幹細胞移植を施行しても救命できないような絶対的予後不良症例群に対し、メチル化アレイから得られた結果よりエピゲネティクス関連の新規分子標的薬等を組み合わせることで、治療成績向上に寄与できる可能性が示唆された。特に予後予測が確立していない *KMT2A* 融合遺伝子や予後不良因子としてよく知られている *FLT3-ITD* に関して、DNAメチル化パターンから予後良好例を抽出することが可能となり、今後、不必要な造血幹細胞移植を回避することが可能になる可能性がある。その結果、移植治療関連死亡や治療関連の後遺症、合併症を減らすことができ、QOL向上に繋がることが期待される。

我々の先行研究において、予後不良群ではPRDM16ないしEVI1遺伝子が高発現を呈していることが明らかとなっており、今回の解析において、これらの群で高度にDNAメチル化が起こっていることを確認した。今後、CHIPシーケンスやパスウェイ解析を通してAML発症およびAMLの難治性に関わると考えられる経路で何が起きているのかを明らかにし、標的因子の同定および薬剤の開発に繋げていきたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計12件)

1. Ikeda J, [Shiba N](#), Tsujimoto SI, Yoshida M, Nakabayashi K, Ogata-Kawata H, Okamura K, Takeuchi M, Osumi T, Tomizawa D, Hata K, Kiyokawa N, Ito S, Kato M. Whole transcriptome sequencing reveals a *KMT2A-USP2* fusion in infant acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2019 Mar 14. doi: 10.1002/gcc.22751. [Epub ahead of print] (査読あり)
2. 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 Apr;185(2):284-288. (査読あり)

3. Matsuo H, Yoshida K, Fukumura K, Nakatani K, Noguchi Y, Takasaki S, Noura M, Shiozawa Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Okada A, Nannya Y, Takeda J, Ueno H, Shiba N, Yamato G, Handa H, Ono Y, Hiramoto N, Ishikawa T, Usuki K, Ishiyama K, Miyawaki S, Itonaga H, Miyazaki Y, Kawamura M, Yamaguchi H, Kiyokawa N, Tomizawa D, Taga T, Tawa A, Hayashi Y, Mano H, Miyano S, Kamikubo Y, Ogawa S, Adachi S. Recurrent *CCND3* mutations in *MLL*-rearranged acute myeloid leukemia. *Blood Adv*. 2018 Nov 13;2(21):2879-2889. ( 査読あり )
4. Shiba N. Genetic aberrations and new treatment strategies for pediatric acute myeloid leukemia. *臨床血液* 2018;59(10):2260-2267. ( 査読あり )
5. Sakaguchi H, Muramatsu H, Hasegawa D, Kudo K, Ishida H, Yoshida N, Koh K, Noguchi M, Shiba N, Tokimasa S, Fukuda T, Goto H, Miyamura T, Nakazawa Y, Hashii Y, Inoue M, Atsuta Y; Comparison of conditioning regimens for autologous stem cell transplantation in children with acute myeloid leukemia: A nationwide retrospective study in Japan. Pediatric AML Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Pediatr Blood Cancer*. 2019 Jan;66(1):e27459. ( 査読あり )
6. Tomizawa D, Yoshida M, Kondo T, Miyamura T, Taga T, Adachi S, Koh K, Noguchi M, Kakuda H, Watanabe K, Cho Y, Fukuda T, Kato M, Shiba N, Goto H, Okada K, Inoue M, Hashii Y, Atsuta Y, Ishida H. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for children and adolescents with high-risk cytogenetic AML: distinctly poor outcomes of FUS-ERG-positive cases. *Bone Marrow Transplant*. 2019 Mar;54(3):393-401. ( 査読あり )
7. Yamato G, Shiba N, Yoshida K, Hara Y, Shiraishi Y, Ohki K, Okubo J, Park MJ, Sotomatsu M, Arakawa H, Kiyokawa N, Tomizawa D, Adachi S, Taga T, Horibe K, Miyano S, Ogawa S, Hayashi Y. *RUNX1* mutations in pediatric acute myeloid leukemia are associated with distinct genetic features and an inferior prognosis. *Blood*. 2018 May 17;131(20):2266-2270. ( 査読あり )
8. Shimada A, Iijima-Yamashita Y, Tawa A, Tomizawa D, Yamada M, Shiba N, 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 May;107(5):586-595. ( 査読あり )
9. Yamato G, Shiba N, Yoshida K, Shiraishi Y, Hara Y, Ohki K, Okubo J, Okuno H, Chiba K, Tanaka H, Kinoshita A, Moritake H, Kiyokawa N, Tomizawa D, Park MJ, Sotomatsu M, Taga T, Adachi S, Tawa A, Horibe K, Arakawa H, Miyano S, Ogawa S, Hayashi Y. *ASXL2* mutations are frequently found in pediatric AML patients with t(8;21)/ *RUNX1-RUNX1T1* and associated with a better prognosis. *Genes Chromosomes Cancer*. 2017 May;56(5):382-393. ( 査読あり )
10. 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 May;56(5):394-404. ( 査読あり )
11. Shiba N, Yoshida K, Shiraishi 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 Nov;175(3):476-489. ( 査読あり )

12. 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 Feb;172(4):581-91. (査読あり)

〔学会発表〕(計8件)

1. Koji Sasaki, **Norio Shiba**, Yuri Uchiyama, Junji Ikeda, Masahiro Yoshitomi, Yuko Shimosato-Wada, Mayu Tokumasu, Hidemasa Matsuo, Kenichi Yoshida, Kentaro Ohki, Genki Yamato, Yusuke Hara, Masanobu Takeuchi, Akitoshi Kinoshita, Daisuke Tomizawa, Takashi Taga, Sohichi Adachi, Akio Tawa, Keizo Horibe, Naomichi Matsumoto, Shuichi Ito, Yasuhide Hayashi. The detection of minor clones with somatic *KIT* D816V mutations in pediatric de novo acute myeloid leukemia. 日本血液学会, 大阪, 2018, 10.
2. 松尾 英将, 吉田 健一, 福村 知隆, 塩澤 裕介, 南谷 泰仁, 竹田 淳恵, 上野 浩生, **柴 徳生**, 大和 玄季, 半田 寛, 小野 祐一郎, 平本 展大, 石川 隆之, 臼杵 憲祐, 石山 謙, 宮脇 修一, 糸永 英弘, 宮崎 泰司, 川村 眞智子, 山口 博樹, 清河 信敬, 富澤 大輔, 多賀 崇, 多和 昭雄, 林 泰秀, 間野 博行, 宮野 悟, 上久保 靖彦, 小川 誠司, 足立 壯一 MLL 転座急性骨髄性白血病における CCND3 遺伝子変異の同定 日本血液学会, 大阪, 2018, 10.
3. **柴 徳生**. 小児 AML の遺伝子異常と今後の治療の展望 (教育講演) 日本血液学会, 大阪, 2018, 10.
4. 嶋 晴子, 谷澤 昭彦, 黒澤 秀光, 渡辺 輝浩, 伊藤 正樹, 遠野 千佳子, 湯坐 有希, 村松 秀城, 浜本 和子, 岡田 雅彦, 加藤 剛二, 松本 公一, **柴 徳生**, 嶋田 博之. 小児慢性期 CML におけるチロシンキナーゼ阻害剤が成人身長に及ぼす影響(JPLSG CML11 研究) 日本血液学会, 大阪, 2018, 10.
5. Taeko Kaburagi, Genki Yamato, **Norio Shiba**, Yusuke Hara, Kentaro Ohki, Manabu Sotomatsu, Hirokazu Arakawa, Nobutaka Kiyokawa, Daisuke Tomizawa, Souichi Adachi, Takashi Taga, Keizo Horibe, Yasuhide Hayashi. Clinical significance and prognostic analyses of *PTPN11*, *RAS*, and *CBL* mutations in pediatric AML –the JCCG study, JPLSG AML-05– 日本血液学会, 大阪, 2018, 10.
6. Genki Yamato, Tomoko Kawai, **Norio Shiba**, Kentaro Ohki, Yusuke Hara, Nobutaka Kiyokawa, Daisuke Tomizawa, Akira Shimada, Manabu Sotomatsu, Hirokazu Arakawa, Souichi Adachi, Takashi Taga, Keizo Horibe, Kenichiro Hata, Yasuhide Hayashi. Prognosis of pediatric AML patient with *FLT3*-ITD is predicted by DNA methylation pattern –the JCCG study, JPLSG AML-05– 世界小児がん学会 (SIOP), 京都, 2018, 11.
7. Taeko Kaburagi, Genki Yamato, **Norio Shiba**, Kenichi Yoshida, Yusuke Hara, Yuichi Shiraishi, Kentaro Ohki, Manabu Sotomatsu, Hirokazu Arakawa, Hidemasa Matsuo, Akira Shimada, Nobutaka Kiyokawa, Daisuke Tomizawa, Takashi Taga, Keizo Horibe, Satoru Miyano, Seishi Ogawa, Souichi Adachi, Yasuhide Hayashi. Comprehensive Analysis of 343 Genes using Targeted Sequencing Panel by Next-Generation Sequencer In 77 Pediatric AML Patients with Normal and Complex Karyotypes: JCCG Study, JPLSG AML-05 米国血液学会(ASH), San Diego, 2018, 12.

8. Yuko Shimosato-Wada, Reo Tanoshima, Shin-ichi Tsujimoto, Masanobu Takeuchi, **Norio Shiba**, Tohru Kobayashi, and Shuichi Ito. Allogeneic bone marrow versus peripheral blood stem cell transplantation for hematological malignancies in children: systematic review and meta-analyses. 米国血液学会 (ASH), San Diego, 2018, 12.

〔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〕

ホームページ等：なし

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者：なし

(2)研究協力者

研究協力者：なし

※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。