

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07816

研究課題名(和文) 次世代シーケンサーを用いた若年性骨髄単球性白血病のメチル化解析法の開発

研究課題名(英文) Development of a methylation analysis method for juvenile myelomonocytic leukemia using next-generation sequencing

研究代表者

村松 秀城 (Muramatsu, Hideki)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00572570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：若年性骨髄単球性白血病(JMML)は予後不良な小児骨髄増殖性疾患である。イルミナ社の450kメチル化アレイによる国際メチル化分類を構築したが、実臨床の現場に実装する上では、より低コストかつハイスループットな検査法の開発が求められる。本研究では、メチル化の有無を区別する二つの制限酵素と次世代シーケンスの技術を組み合わせたDigital restriction enzyme analysis of methylation (DREAM)法によるメチル化解析を実施した。450kメチル化アレイの結果を高精度に再現する結果が得られ、JMMLに対する臨床検査法として確立することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在でも治療が難しいまれな小児白血病である、若年性骨髄単球性白血病(JMML)は、その治療方法を決めるためにメチル化アレイという方法による「遺伝子のメチル化」の評価が重要であることが、最近明らかとなりました。しかしながら、実際に患者さんのために遺伝子のメチル化の情報を利用するためには、より安価かつ迅速に結果が得られる方法で、JMML患者さんのメチル化評価をすることが必要です。今回の研究では、DREAM法という遺伝子を切断する制限酵素と次世代シーケンサーを組み合わせた方法を用いることで、メチル化アレイと同等の検査結果が得られることを明らかにすることができました。

研究成果の概要(英文)：Juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) is a pediatric myeloproliferative disease with a poor prognosis. We have constructed an international methylation classification using Illumina's 450k methylation array, but development of a lower-cost, high-throughput test method is required for implementation in actual clinical practice. In this study, we performed methylation analysis using the digital restriction enzyme analysis of methylation (DREAM) method, which combines two restriction enzymes that distinguish the presence or absence of methylation with next-generation sequencing technology. The DREAM method reproduces the results of the 450k methylation array with high accuracy, and has been established as a clinical test method for JMML.

Translated with www.DeepL.com/Translator (free version)

研究分野：小児血液腫瘍

キーワード：若年性骨髄単球性白血病 遺伝子メチル化

1. 研究開始当初の背景

若年性骨髄単球性白血病 (juvenile myelomonocytic leukemia; JMML) は、主に 5 歳未満の小児に発症する予後不良な造血器腫瘍である。JMML の国内における年間発症数は 20 ~ 30 例であり、希少小児がんに属する。通常の化学療法のみで治癒が得られることはなく、唯一の根治療法は同種造血細胞移植である。しかしながら、移植合併症や再発の問題があり、JMML 患者の 5 年生存率は依然として 50%前後にとどまっており、分子標的薬等の導入による新規治療法の開発が必須である。さらに、一部の症例は無治療で長期生存することも知られており、ゲノム異常などのバイオマーカーによる最適医療 (Precision Medicine) の実現が必須のがん種である。近年のゲノム解析技術の進歩により、JMML の原因遺伝子変異の全容が明らかとなってきた。約 90%の症例で RAS 経路に關与する遺伝子群 (PTPN11、NRAS、KRAS、NF1、CBL) の変異が認められる。また、予後不良な一群の患者においては JAK3・SETBP1 などのセカンドヒット遺伝子変異が認められる (Sakaguchi H, Muramatsu H, Okuno Y, *Nature Genetics* 2013)。JMML に対する同種造血幹細胞移植による生存率は十分なものではなく、分子学的標的療法の開発が求められているが、DNA 脱メチル化薬 (メチルトランスフェラーゼ阻害剤) であるアザシチジンは、成人 MDS のみならず、少数例ではあるが JMML 患者の有効例が報告されている (Furlan I, *Blood* 2009, Cseh A, *Blood* 2015)。JMML の一部の JMML 症例では遺伝子プロモーター領域の高メチル化が認められ、予後不良と關連することが明らかとなっている (Sakaguchi H, Muramatsu H, Okuno Y, *PLOS ONE* 2015)、これまでゲノムワイドなメチル化解析は行われていなかった。

我々は、JMML 100 例以上の臨床検体を用いて網羅的遺伝子解析 (全エクソンシーケンス解析・RNA シーケンス解析・イルミナ社 450k メチル化アレイを用いたメチル化アレイ解析) を行い、世界で初めて網羅的メチル化プロファイリングによる予後予測モデルを構築した (Murakami N, et al. *Blood* 2018)。JMML 患者は大きく高メチル化群・低メチル化群に分類され、ヌーナン症候群合併例 (Noonan syndrome associated myeloproliferative disorder; NS/MPD) は全例、低メチル化群に分類された。生存解析では、高メチル化群は有意に全生存率・無移植生存率が低く、これまでに報告されてきた予後予測因子 (PTPN11 変異、セカンドリー遺伝子変異、AML-type の遺伝子発現プロファイル、LIN28B 遺伝子高発現、高月齢、血小板減少、HbF 高値) と強く關連していた。同様の解析をドイツおよびサンフランシスコの研究グループも進めていることが判明し (2017 年 9 月 ローマで開催された EWOG-MDS シンポジウムで発表) 国際共同研究によるメチル化プロファイリングに基づくリスク分類のハーモナイゼーションが必要であると考えられた。また、実臨床の現場に応用していく上では、より低コストかつハイスループットな検査法の開発が必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、次世代シーケンサーを用いた安価なメチル化解析に基づくメチル化プロファイリング法を開発し、JMML のメチル化プロファイリングの国際標準検査法とすることである。

3. 研究の方法

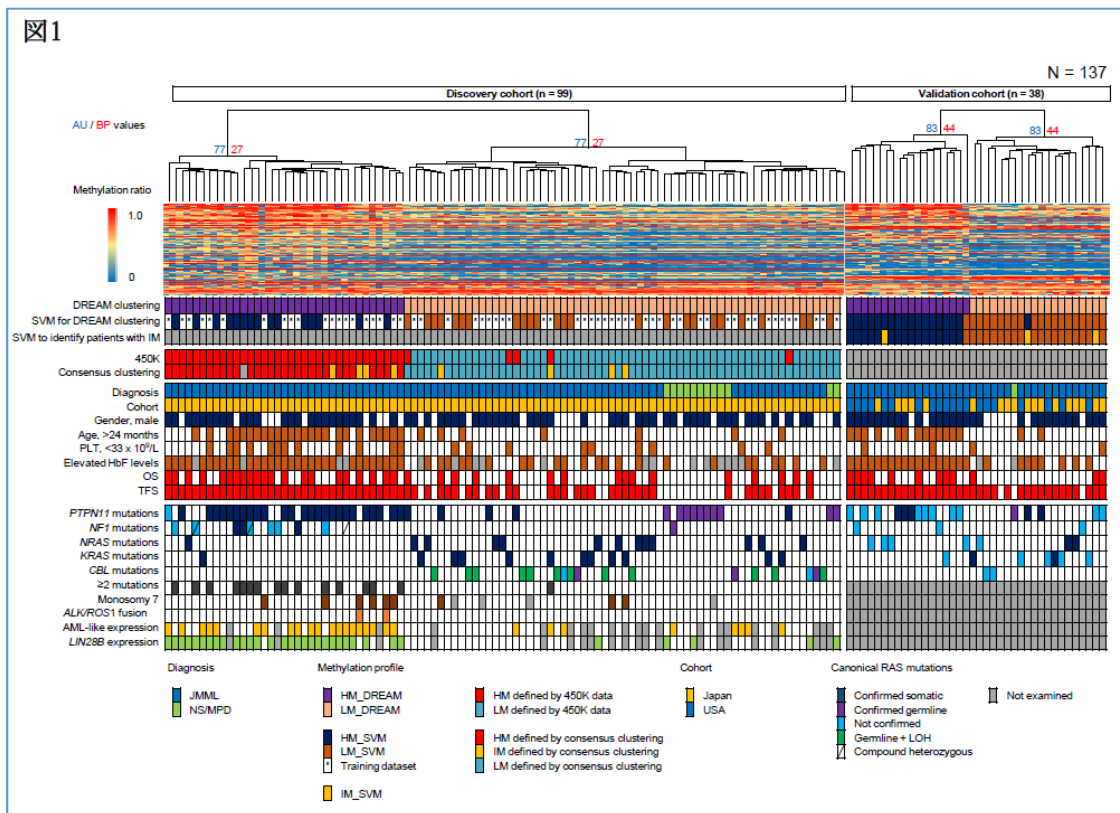
450k メチル化アレイ解析を実施済みの臨床検体を用いて、Digital restriction enzyme analysis of methylation (DREAM) 法によるメチル化解析を実施する。DREAM 法は、同じ CCCGGG 配列を認識するが、シトシンがメチル化していると切断しない制限酵素 (SmaI) およびメチル化していても切断する制限酵素 (XmaI) で順番に DNA を処理し、その後イルミナ社の次世代シーケンサー (HiSeq2500) でショートリードシーケンスを行う方法である。二つの制限酵素の切断端配列の違いを次世代シーケンサーで大量に読み取ることで、安価かつハイスループットに全ゲノム上の 39,000 か所の CpG アイランドの定量的メチル化解析を行うことが可能である。先行研究では、イルミナ社 450k メチル化アレイとの良好な結果の相関が確認されている (Jelinek J, *Epigenetics* 2012)。研究代表者らが有する、450k メチル化アレイで解析済の JMML 検体を用いて DREAM 法によるメチル化解析を実施する。また、450k メチル化アレイに基づく国際標準のリスク分類の再現性を合わせて評価する。

4. 研究成果

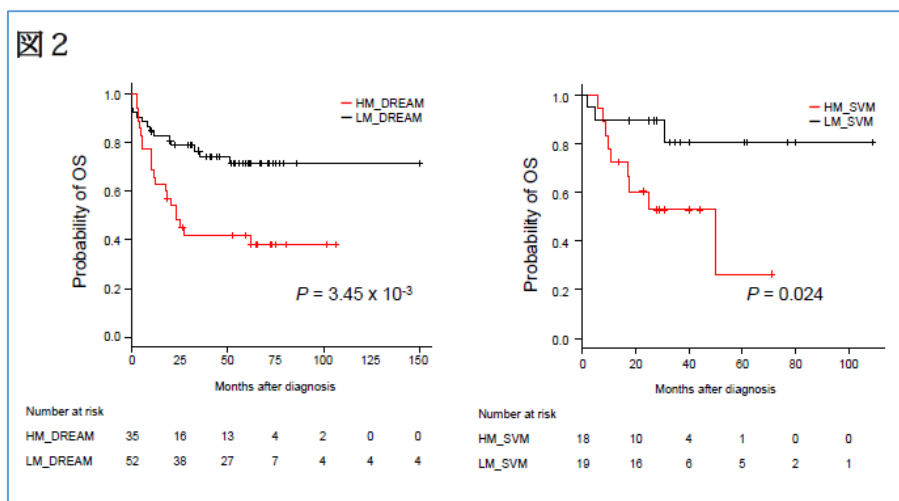
本研究では、137 名の患者 [発見コホート (n=99) および検証コホート (n=38)] に DREAM を実施した。137 名の患者のうち、90 名 (66%) が同種造血幹細胞移植を受け、追跡調査期間の中央値は 33 か月 (範囲: 0 ~ 291 か月) であった。

プロモーター關連 CpG サイト 7,360 個分の DREAM データを用いて、発見コホートの教師なし階層型クラスタリングを行ったところ、以前に報告された 450K クラスタリング結果と 95% の一致率 (99 サンプル中 94 サンプル) を持つ高メチル化 (HM_DREAM, n = 35) および低メチル化サ

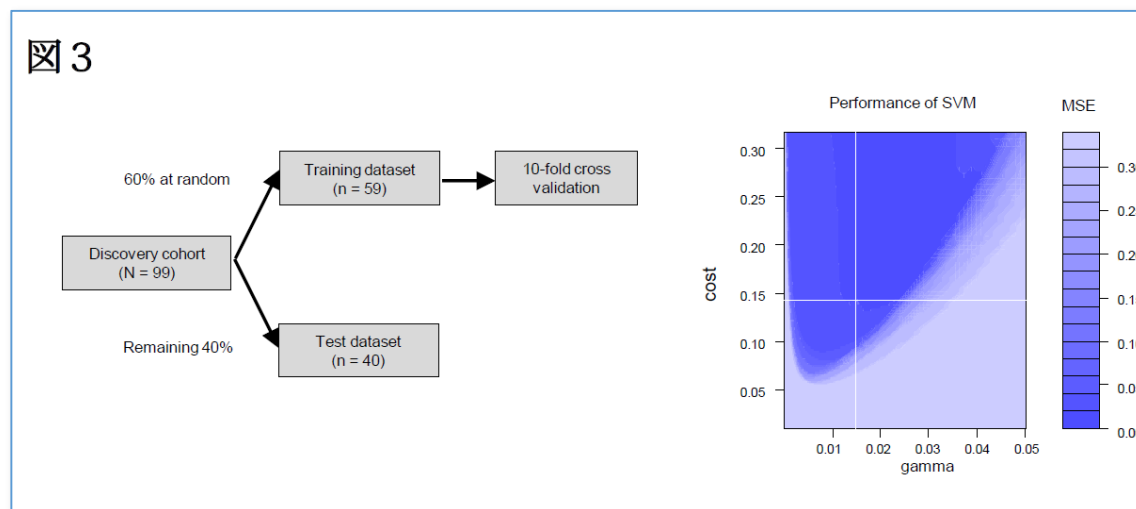
ブグループ (LM_DREAM, n = 64) が特定された (図 1)。国際的なコンセンサス分類との比較が可能な 98 例のうち、HM (n = 30) と LM (n = 60) の 90 例はすべて DREAM のクラスタリング結果と 100% の一致を示した。国際的なコンセンサス分類で IM 群に分類された 8 例については、4 例が HM_DREAM 群に、4 例が LM_DREAM 群に分類された。また、検証コホート (n = 38) についても DREAM データを用いて、教師なしのクラスタリングを行い、HM_DREAM (n = 18) と LM_DREAM (n = 20) のサブグループに分類された。



発見コホート (NS/MPD を除く) の HM_DREAM プロファイルの JMML 患者は、LM_DREAM プロファイルの患者に比べて、OS と TFS が有意に悪く、HM_DREAM の 5 年 OS は 41.9% (95%CI : 25.3~57.6%) に対し、LM_DREAM は 71.4% (95%CI : 56.2~82.1%) であった ($P = 3.45 \times 10^{-3}$, 図 2)。同様に、この 2 つのコホートの 5 年間の TFS 率は、それぞれ 0% 対 37.4% (95%CI : 23.6% - 51.1%) で、P 値は 2.17×10^{-10} だった。



つぎに、機械学習の分類モデルであるサポートベクターマシン(SVM)分類器の構築を行った。JMML 関連の HM_DREAM と LM_DREAM のプロファイル間で平均メチル化レベルに明確な差 (>0.3) を示したもののなかから 84 の CpG サイトを選択した。探索コホートのサンプルをトレーニングデータセット ($n = 59$) とテストデータセット ($n = 40$) に無作為に割り当て、R の e1071 パッケージの tune.svm 関数とともに使用して、パラメータを最適化した。最適なガンマパラメータは 0.015, 最適なコストパラメータは 0.14 であった。また、平均二乗誤差が最も小さい ($MSE = 0$) 分類器を作成した (図 3)。



この SVM を用いて、検証コホートに割り当てられた患者を、高メチル化 (HM_SVM; $n = 18$) または低メチル化 (LM_SVM; $n = 20$) のいずれかに分類した。クラスタリング分析と SVM の間でプロファイリング結果に不一致が生じたのは、検証コホートの 38 例中 2 例 (5%) であった。HM_SVM プロファイルを持つ患者は、LM_SVM プロファイルを持つ患者 [80.5%; 95% CI: 49.1%-93.6%] に比べて、5 年 OS [26.3%; 95% CI: 1.9%-64.0%] が有意に悪く、P 値は 0.024 であった (図 2 右)。この結果は、現在論文投稿中である。

さらに、ドイツおよびサンフランシスコのグループとの国際共同研究により、255 例の JMML 患者検体の 450k メチル化アレイデータの共同解析を行い、解析方法のハーモナイゼーションを完了し、国際コンセンサス分類を確立した結果を論文化した (Schoenung M, et al. *Clin Cancer Res.* 2021)。また、患者年齢、HbF、RAS 経路遺伝子変異など、シンプルな臨床情報によるメチル化分類の予測統計モデルについても確立し、現在論文投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Shigemura T, Matsuda K, Kurata T, Sakashita K, Okuno Y, Muramatsu H, Yue F, Ebihara Y, Tsuji K, Sasaki K, Nakahata T, Nakazawa Y, Koike K	4. 巻 187
2. 論文標題 Essential role of PTPN11 mutation in enhanced haematopoietic differentiation potential of induced pluripotent stem cells of juvenile myelomonocytic leukaemia.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Br J Haematol	6. 最初と最後の頁 163-173
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bjh.16060	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Akahane K, Watanabe A, Furuichi Y, Somazu S, Oshiro H, Goi K, Sakashita K, Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Koike K, Kojima S, Sugita K, Inukai T	4. 巻 23
2. 論文標題 Successful hematopoietic stem cell transplantation from an HLA-mismatched parent for engraftment failure after unrelated cord blood transplantation in patients with juvenile myelomonocytic leukemia: Report of two cases.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatr Transplant	6. 最初と最後の頁 e13378
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/petr.13378	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Murakami Norihiro, Okuno Yusuke, Yoshida Kenichi, Shiraishi Yuichi, Nagae Genta, Suzuki Kyogo, Narita Atsushi, Sakaguchi Hiroto, Kawashima Nozomu, Wang Xinan, Xu Yinyan, Chiba Kenichi, Tanaka Hiroko, Hama Asahito, Sanada Masashi, Ito Masafumi, Kojima Seiji, Ogawa Seishi, Takahashi Yoshiyuki, Muramatsu Hideki, et al	4. 巻 131
2. 論文標題 Integrated molecular profiling of juvenile myelomonocytic leukemia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1576 ~ 1586
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/blood-2017-07-798157	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Akahane Koshi, Watanabe Atsushi, Furuichi Yoshiyuki, Somazu Shinpei, Oshiro Hiroko, Goi Kumiko, Sakashita Kazuo, Muramatsu Hideki, Hama Asahito, Takahashi Yoshiyuki, Koike Kenichi, Kojima Seiji, Sugita Kanji, Inukai Takeshi	4. 巻 なし
2. 論文標題 Successful hematopoietic stem cell transplantation from an HLA-mismatched parent for engraftment failure after unrelated cord blood transplantation in patients with juvenile myelomonocytic leukemia: Report of two cases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatric Transplantation	6. 最初と最後の頁 e13378 ~ e13378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/petr.13378	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakaguchi Hiroto, Muramatsu Hideki, Hasegawa Daiichiro, Kudo Kazuko, Ishida Hiroyuki, Yoshida Nao, Koh Katsuyoshi, Noguchi Maiko, Shiba Norio, Tokimasa Sadao, Fukuda Takhiro, Goto Hiroaki, Miyamura Takako, Nakazawa Yozo, Hashii Yoshiko, Inoue Masami, Atsuta Yoshiko, et al	4. 巻 66
2. 論文標題 Comparison of conditioning regimens for autologous stem cell transplantation in children with acute myeloid leukemia: A nationwide retrospective study in Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatric Blood & Cancer	6. 最初と最後の頁 e27459 ~ e27459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pbc.27459	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kurosawa Hidemitsu, Tanizawa Akihiko, Muramatsu Hideki, Tono Chikako, Watanabe Akihiro, Shima Haruko, Ito Masaki, Yuza Yuki, Hamamoto Kazuko, Hotta Noriko, Okada Masahiko, Saito Akiko, Moriya, Manabe Atsushi, Mizutani Shuki, Adachi Souichi, Horibe Keizo, Ishii Eiichi, Shimada Hiroyuki	4. 巻 65
2. 論文標題 Sequential use of second-generation tyrosine kinase inhibitors following imatinib therapy in pediatric chronic myeloid leukemia: A report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatric Blood & Cancer	6. 最初と最後の頁 e27368 ~ e27368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pbc.27368	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kouzuki Kagehiro, Umeda Katsutsugu, Saida Satoshi, Kato Itaru, Hiramatsu Hidefumi, Funaki Takeshi, Kanda Kenji, Muramatsu Hideki, Yoshida Kenichi, Ogawa Seishi, Adachi Souichi	4. 巻 40
2. 論文標題 Sudden Intracranial Hemorrhage in a Patient With Atypical Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Hematology/Oncology	6. 最初と最後の頁 e553 ~ e556
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPH.0000000000001061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okuno Yusuke, Murata Takayuki, Sato Yoshitaka, Muramatsu Hideki, Ito Yoshinori, Murakami Norihiro, Chiba Kenichi, Tanaka Hiroko, Miyano Satoru, Narita Yohei, Yoshida Masahiro, Goshima Fumi, Kawada Jun-ichi, Nishida Tetsuya, Kiyoi Hitoshi, Takahashi Yoshiyuki, Kojima Seiji, Ogawa Seishi, Kimura Hiroshi, et al	4. 巻 4
2. 論文標題 Defective Epstein-Barr virus in chronic active infection and haematological malignancy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Microbiology	6. 最初と最後の頁 404 ~ 413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41564-018-0334-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 2件/うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Manabu Wakamatsu, Norihiro Murakami, Yusuke Okuno, Nobuhiro Kitazawa, Hideki Muramatsu, Seiji Kojima, Yoshiyuki Takahashi
2. 発表標題 Detection of Subclonal SETBP1 and JAK3 Mutations in Patients with Juvenile Myelomonocytic Leukemia Using Droplet Digital PCR
3. 学会等名 The 10th JSH International Symposium 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideki Muramatsu
2. 発表標題 Integrated molecular profiling of juvenile myelomonocytic leukemia
3. 学会等名 The 29th Symposium of the International Association for Comparative Research on Leukemia and Related Diseases (IACRLRD 2019) (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 若松学、村上典寛、奥野友介、北澤宏展、山森彩子、今屋雅之、吉田太郎、三輪田俊介、成田幸太郎、北澤展典、濱田太立、市川大輔、谷口理恵子、西川英里、川島希、成田敦、西尾信博、村松秀城、小島勢二、高橋義行
2. 発表標題 droplet digital PCRを用いた若年性骨髄単球性白血病におけるサブクローナルなSETBP1とJAK3変異の検出
3. 学会等名 第277回日本小児科学会東海地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Manabu Wakamatsu, Norihiro Murakami, Yusuke Okuno, Nobuhiro Kitazawa, Hideki Muramatsu, Seiji Kojima, Yoshiyuki Takahashi
2. 発表標題 Detection of subclonal SETBP1 and JAK3 mutations in patients with juvenile myelomonocytic leukemia using droplet digital PCR
3. 学会等名 61th American Society of Hematology Annual Meeting & Exposition (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Okuno, Hideki Muramatsu, Norihiro Murakami, Nozomu Kawashima, Manabu Wakamatsu, Hironobu Kitazawa, Tomoo Ogi, Yoshiyuki Takahashi
2. 発表標題 Comprehensive Mutational Analysis of Juvenile Myelomonocytic Leukemia using Whole-genome Sequencing
3. 学会等名 61th American Society of Hematology Annual Meeting & Exposition (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hironobu Kitazawa, Hideki Muramatsu, Norihiro Murakami, Yusuke Okuno, Manabu Wakamatsu, Taro Yoshida, Masayuki Ima, Ayako Yamamori, Shunsuke Miwata, Kotaro Narita, Motoharu Hamada, Daisuke Ichikawa, Rieko Taniguchi, Nozomu Kawashima, Eri Nishikawa, Atsushi Narita, Nobuhiro Nishio, Seiji Kojima, Yoshiyuki Takahashi
2. 発表標題 Genome-wide Methylation Analysis using the Digital Restriction Enzyme Analysis of Methylation for Stratification of Patients with Juvenile Myelomonocytic Leukemia
3. 学会等名 61th American Society of Hematology Annual Meeting & Exposition (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Muramatsu H.
2. 発表標題 Integrated molecular profiling of juvenile myelomonocytic leukemia.
3. 学会等名 The 6th TSH International Symposium (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Murakami N, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Nagae G, Suzuki K, Narita A, Sakaguchi H, Kawashima N, Wang X, Xu Y, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Sanada M, Ito M, Hirayama M, Watanabe A, Ueno T, Kojima S, Aburatani H, Mano H, Miyano S, Ogawa S, Takahashi Y, Muramatsu H.
2. 発表標題 Integrated molecular profiling of juvenile myelomonocytic leukemia.
3. 学会等名 第9回日本血液学会国際シンポジウム(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北澤宏展, 村上典寛, 奥野友介, 村松秀城, 若松 学, 三輪田俊介, 成田幸太郎, 片岡伸介, 濱田太立, 市川大輔, 谷口理恵子, 鈴木喬悟, 川島 希, 西川英里, 成田 敦, 西尾信博, 小島勢二, 高橋義
2. 発表標題 DREAM法を用いた若年性骨髄単球性白血病に対するメチル化解析
3. 学会等名 第60回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	奥野 友介 (Okuno Yusuke) (00725533)	名古屋大学・医学部附属病院・病院講師 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------