

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15694

研究課題名（和文）特徴的な細胞マーカー所見を示す白血病/リンパ腫症例に対する網羅的遺伝子解析研究

研究課題名（英文）The elucidation of the genetic abnormalities of leukemia/lymphoma indicating characteristic cell marker and the establishment of new disease entity

研究代表者

大木 健太郎 (Ohki, Kentaro)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・小児血液・腫瘍研究部・室長

研究者番号：50400966

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：特徴的な細胞マーカー所見を持つ初発時急性B前駆細胞性リンパ芽球性白血病(ALL)40症例とリンパ腫2症例、再発ALL8症例について、全トランスクリプトーム解析による網羅的ゲノム解析を行い、MEF2D遺伝子関連融合遺伝子やZNF384関連融合遺伝子、DUX4融合遺伝子、PDGFRB遺伝子やJAK2遺伝子、ABL1遺伝子、PAX5遺伝子に関連した融合遺伝子、ETV6-RUNX1融合遺伝子、等の小児急性リンパ芽球性白血病の細胞マーカー所見と遺伝子異常との関連について明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児急性白血病/リンパ腫は、小児期の死亡原因の上位を占める。全国規模の臨床試験により治療成績が向上してきたが、白血病/リンパ腫が有する遺伝子異常は病型や予後に強い関係があることがわかってきた。本研究で、診断時に検査として行う細胞マーカー所見と遺伝子異常の組み合わせが明らかになることで、診断時に治療の層別化や治療標的に関わる遺伝子異常が正確かつ速やかに診断することが可能になり、白血病/リンパ腫の予後を改善することが可能になる。

研究成果の概要（英文）：We analyzed a comprehensive genomic analysis using Whole transcriptome Sequencing analysis in the patients with acute B outrider cellularity lymphoblast-related leukemia (40 cases), lymphoma (2 cases), and relapsed all (8 cases) at diagnosis with characteristic cell marker findings. We clarified the relation between characteristics of cell marker and genetic abnormalities, such as fusion genes related with MEF2D, ZNF384, DUX4, PDGFRB, JAK2, ABL1, PAX5, and ETV6-RUNX1.

研究分野：小児がん

キーワード：小児 急性リンパ芽球性白血病 リンパ腫 細胞マーカー 遺伝子異常 次世代シーケンス解析

1. 研究開始当初の背景

急性白血病/リンパ腫は、種々の複合的遺伝子異常によって生ずる多様な疾患群の集合であり、急性リンパ芽球性白血病/リンパ腫(ALL/LBL)や急性骨髄性白血病(AML)では、発症の主要原因と考えられる遺伝子異常によって、白血病細胞の生物学的特性や臨床特性が規定されている。2012 年末から本格的に開始された日本小児がん研究グループ血液腫瘍分科会 (JPLSG)の細胞マーカーおよびキメラ遺伝子中央診断によって、わが国のほぼすべての小児白血病/リンパ腫症例が共通のプラットフォームによる詳細な分子診断を受ける体制が確立され、その診断情報が蓄積されている。この中央診断によって、わが国における白血病発症の実態の解明が進んでおり、主要な既知の遺伝子異常については、それぞれの特徴的な細胞マーカー所見と臨床特性についての知見が集積されている。例えば、B 前駆細胞性 ALL (BCP-ALL)は、B 細胞系に特異的な抗原発現を示す細胞マーカー所見上の共通の特徴によって診断、分類されている。その中で、*BCR-ABL1* 陽性の Ph1-ALL の場合は、CD66c および骨髄系抗原陽性で初発時末梢血白血球数が高く、通常の化学療法に抵抗性を示す症例が多いが、チロシンキナーゼ阻害剤が有効であるという特徴を有する。しかし、BCP-ALL の約 1/3~1/4 の症例は B-others と総称され、発症にかかわる遺伝子異常が明らかでない。また、ALL と AML の双方の性格を同時に示す混合性白血病やどちらにも合致しない分類不能型白血病が存在しており、その発症原因と想定される遺伝子異常はもとより、発症の実態や病態も不明であるとともに、既存の臨床試験の登録基準を満たさず、治療法が確立されていないため、診断や治療に苦慮する症例が一定の割合で存在することが明らかになっている。

近年、次世代シーケンス解析等の解析技術の進歩によって、従来、遺伝子異常が検出されなかった症例群について、その遺伝子異常の背景が次々と解明され、新たな疾患 entity の存在が明らかになってきた。もっとも代表的な例は Ph-like ALL であり、B-others の中で *BCR-ABL1* 以外のチロシンキナーゼ関連キメラ遺伝子を有する予後不良な亜群が一定の割合を占めることが明らかにされ、チロシンキナーゼ阻害剤が有効である可能性が示されている。申請者も、小児急性白血病の新たな疾患 entity についての解明を行なってきており、Ph-like ALL に属する新規キメラ遺伝子として *ATF7IP-PDGFRB* を世界で始めて報告した (*Exp Hematol*, 2016)。また、Ph-like ALL 以外に、小児 ALL の 1%を占める新たな新規キメラ遺伝子として、*EP300-ZNF384* を世界に先駆けて報告し、さらに *ZNF384* 関連融合遺伝子陽性 ALL が、小児 BCP-ALL の 4.1%を占める白血病における新たな疾患 entity であることを示している (*Haematologica*, 2016)。

2. 研究の目的

本研究では、JPLSGの細胞マーカー中央診断によって同定された、特徴的な細胞マーカー所見を示す新たな疾患 entity の候補と考えられる症例群について詳細な遺伝子解析を行い、その遺伝子異常の背景を明らかにし、疾患 entity としての確立を図る。その成果により、急性白血病/リンパ腫の発症実態の解明に結びつくことが期待される。さらに、得られた解析結果を予後情報と統合的に解析し、治療標的となる遺伝子異常の検索や治療の層別化に利用することで、予後の向上に役立てる。

申請者の研究のユニークな点は、単に遺伝子異常のみの探索でなく、細胞マーカー所見の特徴と関連づけて解析を行なっていることである。例えば、Ph-like ALL はマーカー所見でも Ph1-ALL に類似した特徴を示しており、*ZNF384* 関連キメラ遺伝子陽性症例は CD10 陰性

あるいは弱陽性かつ CD13 あるいは CD33 等の骨髄系抗原陽性といった極めて特徴的な細胞マーカー所見を示すため、細胞マーカー所見の結果から容易にそのキメラ遺伝子の存在が予測可能であることを示している。今後、新たな疾患 entity についても細胞マーカー所見から推測が可能になれば、早期に治療標的を狙った治療介入や層別化に利用が可能になる。

3. 研究の方法

本研究の対象は、既知の遺伝子異常(融合遺伝子や染色体数の異常)がなく、細胞マーカーに一定の特徴がある急性白血病/リンパ腫で、「JPLSG における小児血液腫瘍性疾患を対象とした前方視的研究」において、検体の研究利用のインフォームドコンセントが得られ、検体が保存されている症例である。具体的には、1)特徴的な細胞マーカー所見を示し既知の遺伝子異常が検出されない ALL/リンパ腫症例、2)混合性白血病、3)分類不能型白血病等で年間に 20 例前後と推測される。申請者は、1) 特徴的な細胞マーカー所見を示し既知の遺伝子異常が検出されない ALL/リンパ腫 22 例、2)混合性白血病 33 例、3)分類不能型白血病 7 例の RNA、DNA、細胞の保存検体について JPLSG 検体保存センターから分与を受ける。これらはいずれも臨床情報が紐付けされている。今回の研究では、白血病/リンパ腫の DNA と RNA について、イルミナ社の次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析と全トランスクリプトーム解析を行い、候補遺伝子を抽出し、特徴的な細胞マーカー所見に関わるゲノム異常について検討を行う。次世代シーケンス法で見出されたゲノム異常について、ddPCR 法やサンガーシーケンス法で validation を行い、ゲノム異常を同定する。同定された遺伝子について発現解析、変異解析、FISH 解析などを行い、遺伝子の性状および造腫瘍性の解析を行う。有用なゲノム異常に関しては細胞株や Ba/F3 細胞等に遺伝子導入を行い、樹立した株を用いて機能解析を行う。本研究で集積した細胞マーカー所見データと大量の遺伝子データ、臨床データの統合解析を行い、細胞マーカー所見とゲノム異常の特性を明らかにすることにより、予後因子や治療標的に結びついた早期診断マーカー等の新規予後予測因子に基づくリスク層別化も試み、治療成績の向上に役立てる。

4. 研究成果

(1) 特徴的な細胞マーカー所見を示し既知の遺伝子異常が検出されない急性リンパ芽球性白血病 10 症例とリンパ腫 2 症例について、次世代シーケンサーによる全トランスクリプトーム解析による網羅的ゲノム解析を行い、細胞質内 μ 鎖陽性で、細胞表面 CD5 や CD33 が陽性である特徴的な細胞マーカー所見が、MEF2D 遺伝子関連融合遺伝子 (MEF2D-BCL9 や MEF2D-HNRNPUL1、等)陽性の ALL/リンパ腫で認められることを明らかにし、さらに同症例の臨床的特徴についても明らかにした(図 1, 図 2, Ohki K, et al. Haematologica. 2019 104: 128-137)。

図 1. MEF2D 関連融合遺伝子を有する小児 B 前駆細胞型 ALL の細胞マーカー所見の特徴

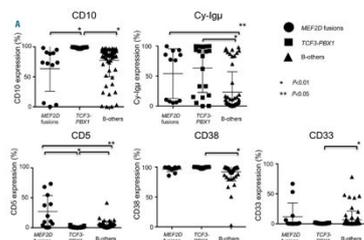
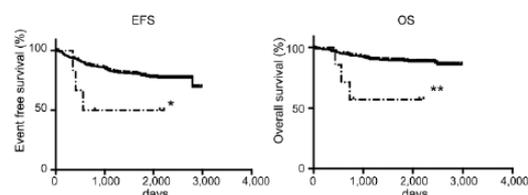


図 2. MEF2D 関連融合遺伝子症例の予後 EFS; 無イベント生存率, OS; 全生存率

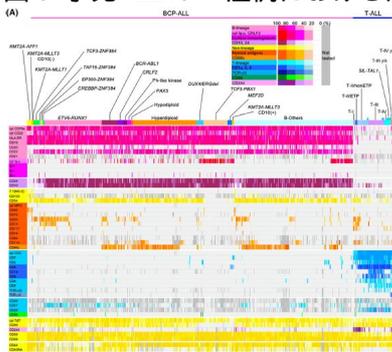


(2) 特徴的な細胞マーカー所見を示し、既存の解析法で遺伝子異常が検出されない初発時急性 B 前駆細胞性リンパ性白血病 (BCP-ALL) 40 症例とリンパ腫 2 症例、再発 BCP-ALL 8 症例について、全トランスクリプトーム解析による網羅的ゲノム解析を行い、MEF2D 遺伝子関連融合遺伝子 (細胞質内 Ig- μ 鎖陽性、細胞表面 CD5、CD33 陽性)、ZNF384 関連融合遺伝子 (CD10 陰性、myeloid 抗原陽性)、DUX4 融合遺伝子 (CD371 陽性)、PDGFRB 遺伝子や JAK2 遺伝子、ABL1 遺伝子、PAX5 遺伝子に関連した融合遺伝子 (フィラデルフィア遺伝子陽性白血病と近似した細胞マーカー所見)、ETV6-RUNX1 融合遺伝子 (CD10 や CD13、CD33、CD27 陽性、CD44 低発現)

が検出された。それぞれの融合遺伝子について、RT-PCR 法や FISH 法を用いて validation を行った。さらに、小児急性リンパ芽球性白血病の細胞マーカー所見と遺伝子異常との関連について明らかにした。

(図 3, Ohki K, et al. Genes Chromosomes and Cancer. 2020 May 05; Epub ahead of print. Doi: 10.1002/gcc/22858.)。

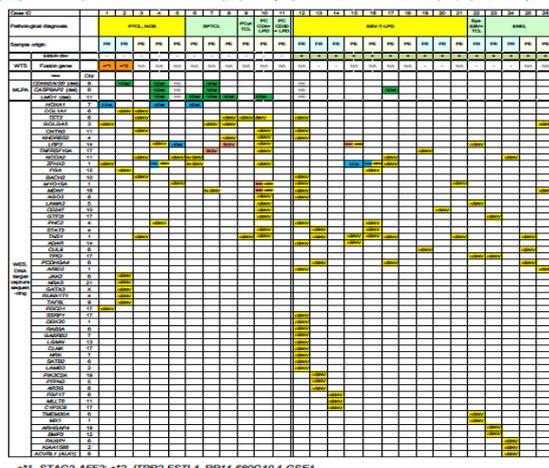
図 3 小児 ALL1044 症例における遺伝子異常と細胞マーカーとの関連



(3) 特徴的な細胞マーカー所見を有する小児末梢性 T 細胞性リンパ腫 (PTCL) 26 例について、全エクソン解析と全トランスクリプトーム解析による網羅的ゲノム解析を行い、既知の遺伝子変異 (TET2, CDKN2A, STAT3, TP53) に加えて、PTCL ではこれまで報告されていないが、他の腫瘍で発癌に関連していることが報告されている遺伝子の変異 (TNS1, ZFH3, LRP2, NCOA2, HOXA1) を複数例で同定した。さらに、新規融合遺伝子として、STAG2-AFF2 と ITPR2-FSTL4 融合遺伝子を同定した。それぞれの遺伝子異常について、病型と EB ウイルス感染との関連について明らかにした。

(図 4, Ohki K, et al. British Journal of Haematology. 2021 May accept)

図 4. 小児 PTCL 26 例で同定された遺伝子異常



*1. STAG2-AFF2, *2. ITPR2-FSTL4, RP11-680G10.1-GSE1

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 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ohki Kentaro, Takahashi Hiroyuki, Kiyokawa Nobutaka. et.al.	4. 巻 59
2. 論文標題 Impact of immunophenotypic characteristics on genetic subgrouping in childhood acute lymphoblastic leukemia: Tokyo Children's Cancer Study Group (TCCSG) study L04 16	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes, Chromosomes and Cancer	6. 最初と最後の頁 551 ~ 561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/gcc.22858	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ueno Hiroo, Kiyokawa Nobutaka, Ohki Kentaro, Sanada Masashi. et.al	4. 巻 4
2. 論文標題 Landscape of driver mutations and their clinical impacts in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 5165 ~ 5173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2019001307	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sakurai Yukari, Sarashina Takeo, Toriumi Naohisa, Hatakeyama Naoki, Kanayama Takuyo, Imamura Toshihiko, Osumi Tomoo, Ohki Kentaro, Kiyokawa Nobutaka, Azuma Hiroshi	4. 巻 43
2. 論文標題 B-Cell Precursor?Acute Lymphoblastic Leukemia With EBF1-PDGFRB Fusion Treated With Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Imatinib: A Case Report and Literature Review	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Hematology/Oncology	6. 最初と最後の頁 e105 ~ e108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPH.0000000000001743	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hirabayashi Shinsuke, Ohki Kentaro, Manabe Atsushi. et.al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Clinical characteristics and outcomes of B-ALL with ZNF384 rearrangements: a retrospective analysis by the Ponte di Legno Childhood ALL Working Group	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-021-01199-0	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 該当する

1. 著者名 Ohki Kentaro, Takahashi Hiroyuki, Fukushima Takashi, Kiyokawa Nobutaka. et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Impact of immunophenotypic characteristics on genetic subgrouping in childhood acute lymphoblastic leukemia: Tokyo Children's Cancer Study Group (TCCSG) study L04 16	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes, Chromosomes and Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/gcc.22858	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakurai Yukari, Sarashina Takeo, Toriumi Naohisa, Hatakeyama Naoki, Kanayama Takuyo, Imamura Toshihiko, Osumi Tomoo, Ohki Kentaro, Kiyokawa Nobutaka, Azuma Hiroshi	4. 巻 -
2. 論文標題 B-Cell Precursor?Acute Lymphoblastic Leukemia With EBF1-PDGFRB Fusion Treated With Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Imatinib	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Hematology/Oncology	6. 最初と最後の頁 1~1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPH.0000000000001743	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 Nishimura Akira, Hasegawa Daisuke, Hirabayashi Shinsuke, Kanabuchi Shoichiro, Yamamoto Kaoru, Aiga Saori, Nishitani Misa, Hosoya Yosuke, Noguchi Yasushi, Ohki Kentaro, Kiyokawa Nobutaka, Mori Shinichiro, Manabe Atsushi	4. 巻 66
2. 論文標題 Very late relapse cases of TCF3 ZNF384 positive acute lymphoblastic leukemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatric Blood & Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pbc.27891	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 Ohki Kentaro, Kiyokawa Nobutaka, Ohara Akira, et al. for the Tokyo Children's Cancer Study Group (TCCSG)	4. 巻 104
2. 論文標題 Clinical and molecular characteristics of MEF2D fusion-positive B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in childhood, including a novel translocation resulting in MEF2D-HNRNP11 gene fusion	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 128 ~ 137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2017.186320	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平野 直樹, 後藤 洋徳, 末延 聡一, 玉井 資, 大木 健太郎, 井原 健二
2. 発表標題 KMT2A-MLLT1融合遺伝子と成熟B細胞の細胞表面形質を伴うBリンパ芽性リンパ腫の再発例
3. 学会等名 第62回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清河信敬、大木健太郎、高橋浩之、福島敬、加藤元博
2. 発表標題 B前駆細胞性急性リンパ芽球性白血病既知異常陰性例の遺伝子発現に基づく階層化：TCCSG L04-16研究登録症例の解析
3. 学会等名 第61回日本小児血液・がん学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡部悟、大木健太郎、出口隆生、清河信敬
2. 発表標題 小児急性リンパ性白血病の融合遺伝子検出のためのパネル開発
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大木健太郎、清河信敬、小原明、TCCSG
2. 発表標題 Treatment outcome of children with acute lymphoblastic leukemia harbouring newly identified genetic abnormalities: Results from TCCSG Study L04-16
3. 学会等名 第60回小児血液・がん学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 林 泰秀, 大木 健太郎, 滝 智彦	4. 発行年 2020年
2. 出版社 日本臨床	5. 総ページ数 10
3. 書名 【造血器腫瘍学(第2版)-基礎と臨床の最新研究動向-】造血器腫瘍の診断と治療 診断・検査法 白血病とリンパ腫の染色体・FISH分析と臨床への応用	

〔産業財産権〕

〔その他〕

JCCGホームページ http://jccg.jp JPLSGホームページ http://jplsg.jp/index.htm 国立研究開発法人国立成育医療研究センターホームページ https://www.ncchd.go.jp
--

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
連携研究者	清河 信敬 (Kiyokawa Nobutaka) (60195401)	国立成育医療研究センター・小児血液・腫瘍研究部・部長 (82612)	
連携研究者	出口 隆生 (Deguchi Takao) (70345990)	国立成育医療研究センター・小児がんセンター・診療部長 (82612)	

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
---------	---------