

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K17322

研究課題名（和文）小児急性骨髄性白血病の分子病態と発症年齢に基づく新たなリスク層別化治療の構築

研究課題名（英文）Refinement of the risk-stratified therapy for pediatric acute myeloid leukemia based on genetic abnormalities and onset age

研究代表者

原 勇介（Hara, Yusuke）

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20806434

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）：本研究により、年齢に注目して小児急性骨髄性白血病の分子生物学的異常の特徴を解析した。乳幼児と年長児で分子生物学的異常の頻度に大きな偏りがあり、また同一の遺伝子異常を有する症例であっても年齢によって予後予測が大きく異なることが判明した。この結果により、乳幼児と年長児を異なる集団として治療や解析を行うことで、より精密なリスク層別化治療を考案することができる可能性が示された。年長児の一部ではTP53が検出され、これらの症例は成人のAMLと類似した発症病態を有すると予測された。TP53を有する症例は極めて予後不良な転帰を取っており、予後因子としてリスク層別化に組み込めば検討が必要と思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児急性骨髄性白血病（AML）は稀な小児がんであり、長期生存率は60-70%程度のいまだ予後不良の疾患である。成人の白血病とは異なる発症機序を持ち、また治療法も成人とは異なるため、小児に特化した治療が必要になる。そのためには小児例の詳細な研究が必要であるが、世界的に見ても小児AMLの研究の進展は十分ではない。本研究では小児AMLの遺伝子解析を網羅的に行い、特に年齢に着目することで、小児AMLと一括りにされている疾患を更に乳幼児と年長児に分けて解析することができた。乳幼児と年長児のAMLは細かい点で異なることも多く、今回得た知見を治療に応用することで更に治療成績が向上することが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study allowed us to analyze the characteristics of molecular abnormalities in pediatric acute myeloid leukemia based on onset age. It was found that there was a large bias in the frequency of molecular abnormalities between infants and older children, and that prognostic predictions differed significantly by age, even in cases with the same genetic abnormality. The results indicate that treatment and analysis of infants and older children as a distinct population may allow us to make more precise risk-stratified therapy. TP53 was detected in a subset of the older children, and these patients were expected to have a similar pathogenesis to that of adults with AML; those with TP53 had a very poor prognostic outcome and should be considered for inclusion in risk stratification as a poor prognostic factor.

研究分野：小児がん

キーワード：小児がん 急性骨髄性白血病

1. 研究開始当初の背景

小児急性骨髄性白血病(acute myeloid leukemia, AML)に対しては分子生物学異常に基づいたリスク層別化治療が行われているが、未だ長期生存率は60~70%程度であり、より精密なリスク層別化治療の構築やその先のプレシジョンメディシンの進展が期待されている。癌領域の基礎研究ではマイクロアレイ、SNP アレイ、次世代シーケンサー(NGS)等の遺伝子解析機器の登場により次々に新規の分子生物学異常が同定され、これらの知見を元に様々な分子標的薬、抗体療法、免疫細胞療法の開発が進んでいるが、小児 AML は稀な疾患(本邦では年間 100 例程度の発症数)であり特有の分子病態を持つことから、その恩恵を享受する機会は少ない。申請者らは本邦における小児 AML の臨床試験データや余剰検体を使用した研究をこれまで継続しており、近年では *PRDM16*、*MECOM*、*CSF3R*、*CALR*、*RUNX1* 等の遺伝子異常の予後解析や、小児急性巨核芽球性白血病の融合遺伝子解析、NGS を用いた全エクソン解析等の結果を報告し、小児 AML の分子病態の解明や本邦での臨床試験の考案に貢献してきた。しかし詳細な分子病態が不明な疾患群が存在し、また既知の分子生物学異常を持っていながら予測と全く異なる転帰を辿る症例も多く、未だその全貌は明らかになっていない。また小児 AML においても乳幼児と年長児では大きく異なる分子生物学異常を持つことを申請者は報告しており、更に同研究では同じ分子生物学異常を持つ小児 AML においても乳幼児と年長児は異なる予後を持つ可能性が示され(第 60 回アメリカ血液学会, abstract #1506)、その背景にある未知の分子生物学異常の存在が示唆された。一方、日本小児がん研究グループ(JCCG)で近年行われた治療研究である AML12 研究や欧米の臨床研究では、乳児の場合に寛解導入療法の抗がん剤投与量の減量が行われるが、年齢による治療層別化は行われておらず、まだ十分には年齢に応じた最適化治療はなされていない。本研究の成果により発症年齢に強く関連した分子生物学異常を考慮したリスク層別化治療が可能となれば、更に予後を改善することができると予想される。

2. 研究の目的

本研究では、小児 AML の次世代シーケンサーによる遺伝子解析と臨床像の解析を行い、年齢によって異なる特徴的な分子病態とその臨床的特徴を解明し、より高精度な治療層別化の構築及びプレシジョンメディシンの発展に寄与することを目的とする。

3. 研究の方法

AML99 研究、及び日本小児白血病リンパ腫研究グループ AML-05 研究で治療された 503 例の臨床検体及び臨床データを用いて遺伝子及び臨床像の解析を行う。

1)既知の各種融合遺伝子や遺伝子変異の解析

PCR、RT-PCR、サンガーシーケンス等を用い、既知の報告で高頻度に検出されることが知られて遺伝子異常や予後因子としての臨床的意義が検討されている遺伝子異常の解析を行う。

2)NGS によるターゲット遺伝子シーケンスパネルを用いた網羅的な遺伝子変異の解析

NGS は遺伝子解析における中心的な役割を果たしており、新規分子生物学異常の同定には必須の解析手法である。特に NGS によるターゲット遺伝子シーケンスパネルを用いた遺伝子解析は現在クリニカルシーケンスで用いられている中心的な手法であり、本研究においても同様の手法で網羅的な解析を行う。

3)RNA シーケンスによる新規融合遺伝子の探索及び遺伝子発現解析

RNA シーケンスは染色体 G-banding や FISH 等の古典的な染色体解析の手法では同定することが不可能であった融合遺伝子や大きな構造変化を同定することが可能であり、既知の融合遺伝子が検出されなかった検体を中心に行う。また RNA シーケンスによる遺伝子発現解析も合わせて施行する。

4)新規に同定した分子生物学異常の多数検体での検索及び臨床的特徴の検討

AML-05 研究と AML99 研究の余剰検体 503 例を用い、同定した分子生物学異常の臨床的特徴や予後因子の有用性を検討する。

5)新規に同定した分子生物学異常を基にした予後解析と新規リスク層別化治療の提案

上記の実験から臨床的に有用と判断された新規分子生物学異常を用い、既知の治療成績と比較して乳幼児 AML の予後を大きく改善し得るリスク層別化治療モデルを構築する。

6)新規遺伝子異常の機能解析

上記解析から最終的に抽出された遺伝子異常の候補について、細胞株やマウスを用いた機能解析を施行する。

4. 研究成果

小児 AML の年齢から見た遺伝子異常の特徴

臨床検体 503 例における既知の融合遺伝子及び遺伝子変異の解析結果を示す(図 1、2)。乳幼児では 1 歳に、年長児では 13 歳で最も高頻度に融合遺伝子を認めた。乳幼児では *KMT2A* 遺伝子再構成を最も頻回に認め、0-2 歳での 1/3 程度を占める一方、4 歳以上の症例では

*RUNX1::RUNX1T1*が1/3~1/2程度を占め、年齢による明確な頻度差を認めた。また、乳幼児でのみ *CBFA2T3::GLIS2*を認める一方、正常核型は10歳以上の年長児で比較的高頻度であった。頻度の高い既知の遺伝子変異については、*FLT3-ITD*や*NPM1*が年長児にやや高頻度な傾向であったが、年齢との強い相関はなかった。

図1 Number of patients

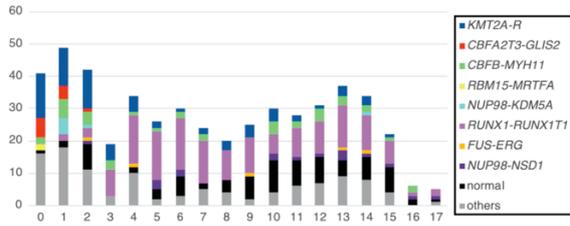
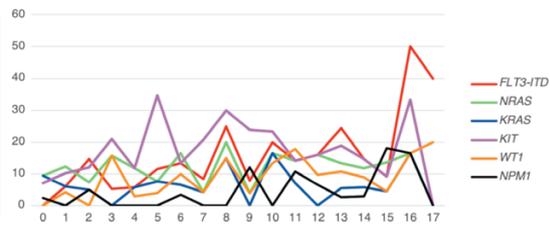


図2 Percentage



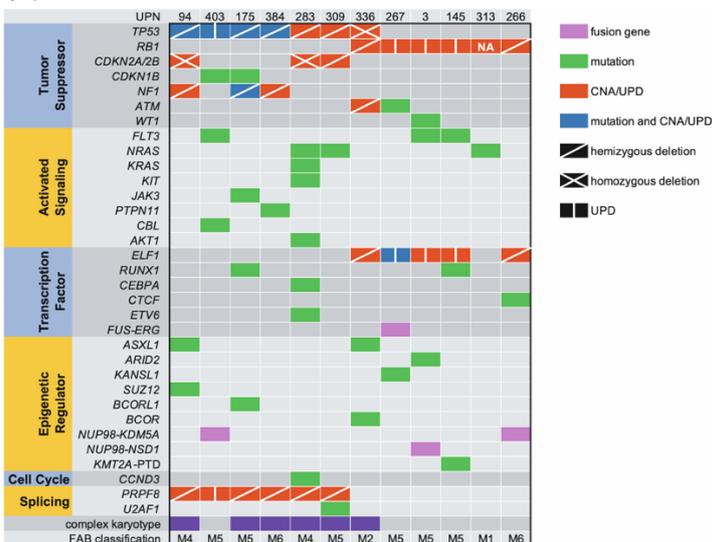
融合遺伝子の頻度や種類、更には FAB 分類に着目すると、0-2歳と3歳以上の疾患群で分子生物

融合遺伝子の頻度や種類、更には FAB 分類に着目すると、0-2歳と3歳以上の疾患群で分子生物学的な違いが明らかであった。これら2群に大別した臨床像と分子生物学的異常の比較を図3に示す。白血球数、FAB-M2・M7、*KMT2A* 遺伝子再構成、*CBFA2T3::GLIS2*、*NUP98::KDM5A*、*RUNX1::RUNX1T1*、*FLT3-ITD*、*KIT*、*WT1*、正常核型の頻度に統計学的有意差を認めた。0-2歳では融合遺伝子の頻度が高かったが、3歳以上では *RUNX1::RUNX1T1*を除くと高頻度の融合遺伝子が少なく種々の遺伝子変異を高頻度に認めた。通常融合遺伝子は白血病発症の分子病態における最も重要な遺伝子異常であると考えられていることから、0-2歳児では融合遺伝子が発症病態の主因と考えられた。一方、3歳以上で既知の融合遺伝子が検出されない症例においては、未知の分子病態が白血病発症に深く関与している可能性が示され、NGSを用いた網羅的遺伝子解析を行う意義が高いと予想された。

ターゲット遺伝子シーケンスパネル解析による *TP53* と *RB1* 遺伝子異常の同定

次に、AML-05 研究のサンプル(n=328)を用いて NGS によるターゲット遺伝子シーケンスパネルの解析を施行した。既知の遺伝子変異に加え、年長児には成人 AML で高頻度に同定される *TP53* の変異や欠失を7例で認めた。*TP53* 異常を有する症例は6/7例で既知の融合遺伝子認めず、*TP53* が発症の主因である可能性が示された。また、がん抑制遺伝子として他の癌での意義が確立されている *RB1* 遺伝子についても解析を行い、6例で欠失を認めた。*TP53* 異常と *RB1* 異常を有する症例の遺伝子異常の分布を示す(図3)。*TP53* は隣接遺伝子である *PRPF8* が同時に欠失しており、*RB1* は *ELF1* と同時に欠失していた。*PRPF8* と *ELF1* の異常は骨髄性腫瘍で報告されていることから、*TP53* や *RB1* は隣接遺伝子との共欠失により AML 発症に寄与している可能性が示唆された。

図3



RNA シーケンスによる遺伝子発現解析及び *SLC2A5* と *CD300LF* 遺伝子発現異常の同定

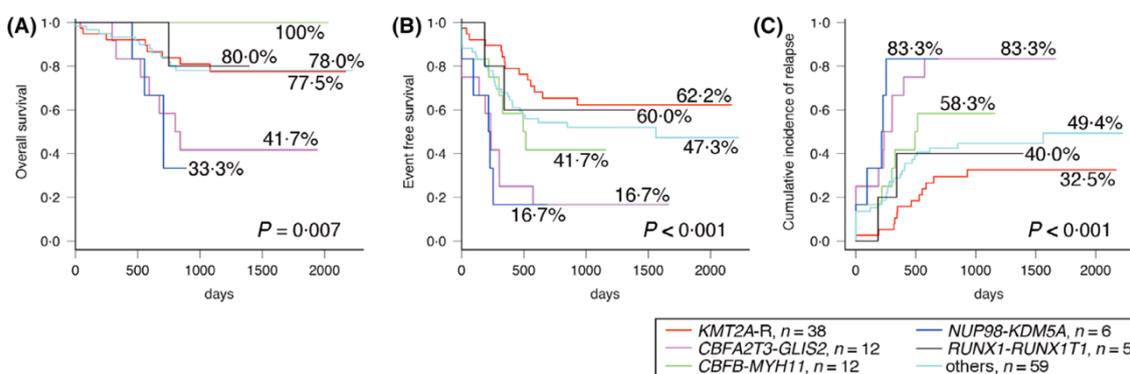
次に、AML-05 研究のサンプルのうち、既知の融合遺伝子が同定されなかったサンプル(n=128)を用いて RNA シーケンスを行い、新規融合遺伝子の検索及び遺伝子発現解析を行った。残念ながら高頻度の新規融合遺伝子は検出されなかったが、上記の *TP53* 異常を有する症例全例(7例)と *RB1* 異常を有する症例のうち4/6例が RNA シーケンスの対象であったため、これらの遺伝子異常を有する症例に注目し更に詳細な発現解析を行った。Gene set enrichment 解析(GSEA)を行ったところ、酸化的リン酸化や解糖に関わるパスウェイの遺伝子セットの亢進を認めた。ま

た、*TP53* 異常を有する症例と *RBI* 異常を有する症例の遺伝子発現を比較すると、*SLC2A5* や *CD300LF* が共通して高発現となっていた。*SLC2A5* はフルクトースの輸送体 *GLUT5* をコードしており、癌代謝の異常が *TP53* 異常を有する AML の発症に関連している可能性が示された。*CD300LF* は血液前駆細胞に発現しており、*CD33* と同様の発現パターンを有すると報告されている。これらの遺伝子の機能解析は新たな治療戦略の開発につながる可能性が示された。

年齢を考慮した遺伝子異常の予後因子としての有用性の検討

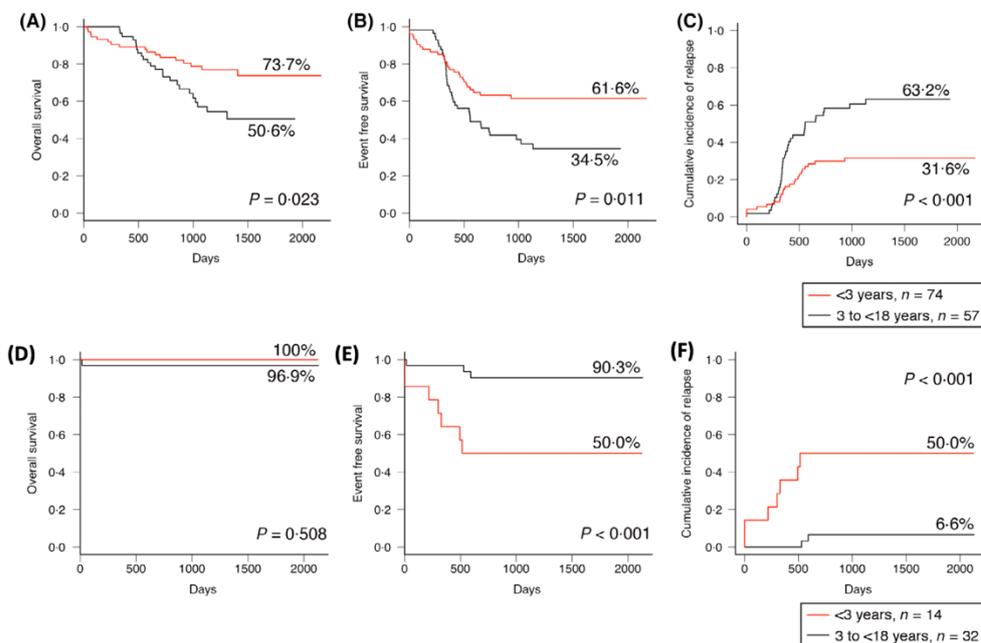
続いて、本研究で同定した遺伝子異常の予後解析を行った。これまでの結果から 0-2 歳は特有の遺伝子異常を持った集団であることが示されたため、まずは 0-2 歳の乳幼児(n=132)に症例を絞り解析を行った(図 4)。*CBFA2T3::GLIS2* と *NUP98::KDM5A* は予後不良因子であった。0-2 歳と 3 歳以上の両群で広く検出される *CBFB::MYH11* と *KMT2A* 遺伝子再構成については、*CBFB::MYH11* の全生存率は良好だが無イベント生存率が低かった一方で、*KMT2A* 遺伝子再構成の予後は中間リスク程度と思われた。

図4



次に、0-2 歳と 3 歳以上の両群で広く検出される *KMT2A* 遺伝子再構成と *CBFB::MYH11* について、年齢の予後への影響を検討した(図 5)。

図5

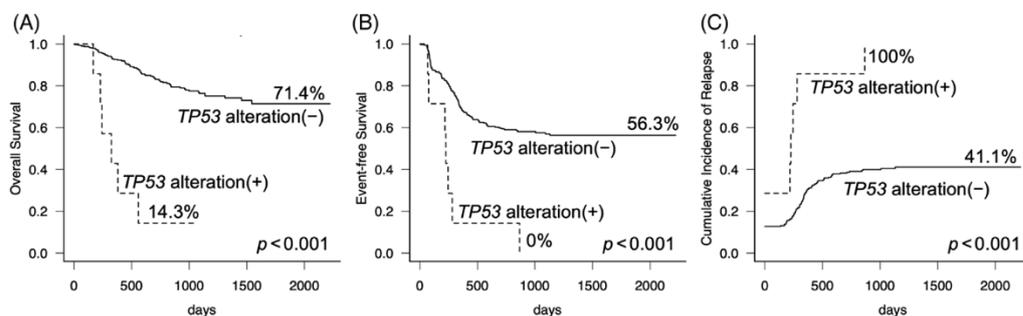


KMT2A 遺伝子再構成は、0-2 歳の群が有意に予後良好であった(A-C)。一方 *CBFB::MYH11* は全生存率では差がなかったが、無イベント生存率で 0-2 歳の群が有意に予後不良であった(D-F)。これらの結果から、小児 AML の予後・遺伝子異常・年齢の関連性は、遺伝子異常の種類によって異なることが示され、年齢による一律のリスク層別化は不相当である可能性が示唆された。しかし、ターゲット遺伝子シーケンスパネルの解析では同一の融合遺伝子を有する乳幼児と年長児における付加的遺伝子異常の差異を同定することができなかつたため、今後さらに網羅的に解析する必要がある。

TP53 異常、*SLC2A5* 高発現、*CD300LF* 高発現の予後解析

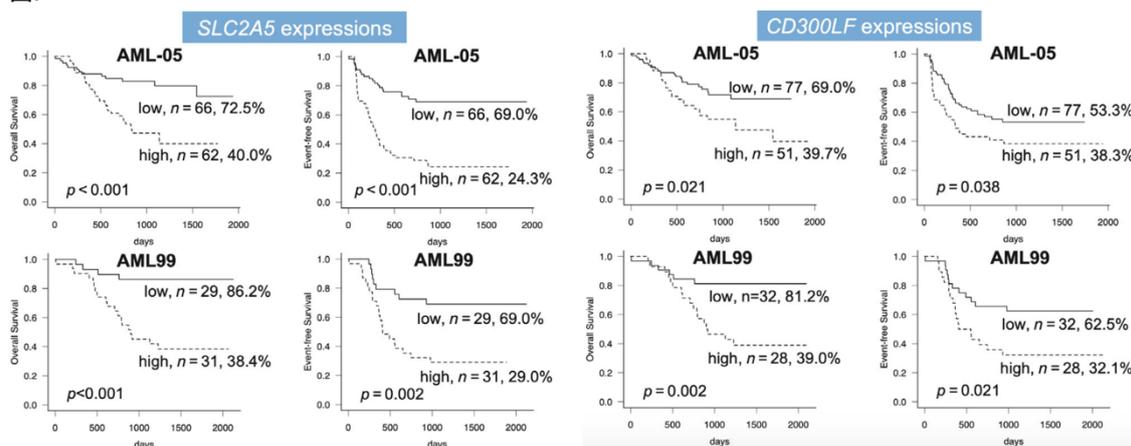
次に、融合遺伝子が検出されなかった年長児で主に検出された *TP53* 異常の予後解析の結果を示す(図 6)。 *TP53* 異常を有する例の予後は極めて不良であり、頻度は低いが独立した予後因子となると思われた。

図6



また、遺伝子発現解析で同定した *SLC2A5* と *CD300LF* の高発現症例の予後を AML99 研究 (n=60、先行研究で用いた発現アレイデータを使用) と AML-05 研究(n=128)の両者で検討したところ、両遺伝子の高発現例は生存率が低く、特に *SLC2A5* 高発現例の予後はより不良と示唆された。

図7



まとめ

本研究により、年齢に注目して小児 AML の分子生物学的異常の特徴を解析した。乳幼児と年長児で分子生物学的異常の頻度に大きな偏りがあり、また同一の遺伝子異常を有する症例であっても年齢によって予後予測が大きく異なることが判明した。この結果により、乳幼児と年長児を異なる集団として治療や解析を行うことで、より精密なリスク層別化治療を考案することができる可能性が示された。年長児では *RUNX1::RUNX1T1* を除いた既知の融合遺伝子の頻度が低い、*TP53* が一部の症例で検出され、これらの症例は成人の AML と類似した発症病態を有すると予測された。*TP53* を有する症例は極めて予後不良な転帰を取っており、低頻度ではあるが予後因子としてリスク層別化に組み込こむべく検討が必要と思われた。

本研究で達成することができなかった研究目的としては、年齢を踏まえたより精密な予後予測モデルを作成すること、同一の融合遺伝子を有する集団においての年齢による付加的遺伝子異常の違いの同定、新規に同定した遺伝子異常の機能解析、の3点である。1点目については比較的頻度の高い遺伝子異常である *CBFB::MYH11* と *KMT2A* 遺伝子再構成についてのみ年齢の違いによる予後への影響の解析を行うことができたが、小児 AML 自体がまれな疾患であるためその他の低頻度な遺伝子異常については解析が不可能であった。2点目については、症例の蓄積が必要なことと、ターゲット遺伝子シーケンスパネルの解析では限界があるため全エクソン解析や DNA メチル化解析等が必要になる。3点目については白血病に関連した *SLC2A5* の機能解析が過去に少数ではあるが報告されており、より詳細な解析や創薬につながる研究が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Hara Yusuke, Shiba Norio, Yoshida Kenichi, Yamato Genki, Kaburagi Taeko, Shiraishi Yuichi, Ohki Kentaro, Shiozawa Yusuke, Kawamura Machiko, Kawasaki Hirohide, Sotomatsu Manabu, Takizawa Takumi, Matsuo Hidemasa, Shimada Akira, Kiyokawa Nobutaka, Tomizawa Daisuke, Taga Takashi, Ito Etsuro, Horibe Keizo, et al. | 4. 巻 62 |
| 2. 論文標題 TP53 and RB1 alterations characterize poor prognostic subgroups in pediatric acute myeloid leukemia | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Genes, Chromosomes and Cancer | 6. 最初と最後の頁 412 ~ 422 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/gcc.23147 | 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 Hara Yusuke, Shiba Norio, Yamato Genki, Ohki Kentaro, Tabuchi Ken, Sotomatsu Manabu, Tomizawa Daisuke, Kinoshita Akitoshi, Arakawa Hirokazu, Saito Akiko M., Kiyokawa Nobutaka, Tawa Akio, Horibe Keizo, et al. | 4. 巻 188 |
| 2. 論文標題 Patients aged less than 3 years with acute myeloid leukaemia characterize a molecularly and clinically distinct subgroup | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 British Journal of Haematology | 6. 最初と最後の頁 528 ~ 539 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.16203 | 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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yusuke Hara, Tomohiko Taki, Genki Yamato, Kenichi Yoshida, Yusuke Shiozawa, Norio Shiba, Taeko Kaburagi, Yuichi Shiraishi, Kentaro Ohki et al |
| 2. 発表標題 Clinical Features of Pediatric Acute Myeloid Leukemia with TP53 and CDKN2A/2B copy Number Alterations |
| 3. 学会等名 61st ASH Annual Meeting & Exposition (国際学会) |
| 4. 発表年 2019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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|