

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：82302

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06234・19K21333

研究課題名(和文)小児急性骨髄性白血病における網羅的変異解析とプレジジョンメディスンへの応用

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of gene mutations for precision medicine in pediatric acute myeloid leukemia

研究代表者

大和 玄季(Genki, Yamato)

群馬県衛生環境研究所・研究企画係・研究員

研究者番号：90825720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：小児急性骨髄性白血病(AML)の長期生存率は現在60-70%まで向上した。近年の次世代シーケンサーの登場によって、がん領域におけるクリニカルシーケンスが急速に普及しており、小児AMLにおいても腫瘍の原因遺伝子となる、より多くのゲノム情報が必要とされている。申請者は小児AMLの正常核型および複雑核型症例を中心に343遺伝子のパネルシーケンスを行い、PTPN11やTET2、TP53など予後に関連しうる遺伝子変異を複数の症例で同定した。2018、2019年度の米国血液学会においてそれらの遺伝子変異と予後についての発表を行った。得られた結果について臨床情報との更なる比較検討や、論文文化を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年がん領域で米国を中心にクリニカルシーケンスが実臨床に用いられるようになり、国内においても普及し始めている。クリニカルシーケンスは解析で得られた網羅的な患者ゲノム情報を基に治療方針や治療薬の選択が行われ、プレジジョンメディスンとほぼ同義である。治療方針の決定は過去の学術論文や構築されたデータベースを基盤としている。小児急性骨髄性白血病(AML)においても予後因子となりうる遺伝子変異の同定は急務である。本研究は小児AMLの網羅的遺伝子解析を行い、予後に関連しうる複数の遺伝子を同定した今後のプレジジョンメディスンへの基礎となりうる研究であり、将来の小児AML予後改善へつながる可能性を持っている。

研究成果の概要(英文)：Currently, the long-term survival rate of pediatric acute myeloid leukemia (AML) improved 60-70%. Recently, clinical sequences are used to determine the therapeutic methods of many cancers. Pediatric AML is also needed more genome information to perform clinical sequences for precision medicine. Here, we performed targeted sequencing using a 343-gene custom panel and next-generation sequencer in pediatric patients with de novo AML. As a result, we found recurrent gene mutations such as PTPN11, TET2, and TP53 which might be associated with outcome of AML. And we reported these results in the 60th and 61st American Society of Hematology Annual Meeting. Now, we have performed further analyses to determine the relations between genetic mutations and clinical features and prepared for submitting these significant results.

研究分野：血液腫瘍学

キーワード：急性骨髄性白血病 小児 遺伝子異常

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年がん領域においては米国を中心にクリニカルシーケンスが実臨床に用いられるようになり、国内においても普及し始めている。クリニカルシーケンスはシーケンスで得られた網羅的な患者ゲノム情報を基に、治療方針や治療薬の選択が行われる。小児急性骨髄性白血病(AML)においても国内でクリニカルシーケンスが計画されているが、クリニカルシーケンスによる治療方針の決定は過去の成果である学術論文や構築されたデータベースを基盤としている。本邦において小児AMLの30-40%が予後良好因子である *RUNX1-RUNX1T1*、*CBF -MYH11* 融合遺伝子を有しており、これらは CBF-AML としてまとめられている。一方で代表的な予後不良因子である *FLT3-ITD* は 10-15%で認められる。今後クリニカルシーケンスによる治療決定の根拠として、今後クリニカルシーケンスによる治療決定の根拠として、小児AMLにおいて予後因子・治療標的となりうる遺伝子変異の更なる同定は必要不可欠となっており、特に確立されたリスク因子である CBF-AML (*RUNX1-RUNX1T1* または *CBF -MYH11* 融合遺伝子を有するAML) や *FLT3-ITD* 以外の症例における予後因子の同定は急務である。

2. 研究の目的

申請者らはこれまで RNA sequencing, targeted deep sequencing, real-time PCR などを用いて *RUNX1* 遺伝子変異や *CBFA2T3-GLIS2* 融合遺伝子、*PRDM16(MEL1)* 遺伝子高発現が小児AMLで予後不良となることを報告してきた¹⁻³。また、申請者らは過去に同様の手法で *KMT2A(MLL)* 再構成AMLおよそ50例を対象とした解析を行い、その結果を昨年 Blood advances に報告した⁴。本研究では、本邦の小児AML臨床研究で最大規模であるAML-05臨床試験に登録された複雑核型とその他の核型を中心とした予後不明の集団77例に対して次世代シーケンサーを用いた変異解析を行う。本研究によりAML発症の原因や予後と関連する遺伝子変異、クリニカルシーケンスの根拠となりうる遺伝子変異を同定することで、小児AMLの予後向上への寄与を目的とする。

3. 研究の方法

対象はAML-05臨床試験に登録された複雑核型およびその他の核型(正常核型、CBF-AML、複雑核型、MLL再構成、モノソミー7を除いたもの)で、計77例(正常核型59例、複雑核型18例)が主な解析対象である。我々はこれまでがん領域で原因遺伝子として報告されている遺伝子および治療標的となりうる遺伝子を網羅的にカバーした343遺伝子パネルを用いて、ターゲットディープシーケンスを行った。具体的な手順は以下の通りである。

ゲノムDNA抽出

本研究ではゲノムDNA ≥ 200ngを必要とする。これまでの研究で各サンプルのゲノム抽出はすでに行われており、初発AML検体の十分量のゲノムDNAが確保されている。

ライブラリー調製

抽出されたDNAを全て超音波処理によって、~200bpの断片サイズに切断する(Covaris®)。その後これまでに報告された方法によってDNAにアダプター付加を行い(Frampton GMら、Nat. Biotechnol. 2013)、hybridizationは5'末端ビオチン化DNAベイトを用いて行う。このDNAベイトによって目標とする343の遺伝子を釣り上げ、次のtargetシーケンスのプロセスへ進む。

次世代シーケンサーによる解析(Targetシーケンス)

次世代シーケンサー(超大量並列シーケンサー)は近年開発された高速塩基配列決定技術で、一回の解析により約6000億塩基(ヒトゲノムの200回分に相当)の塩基配列が解読でき、網羅的に遺伝子変異解析を施行し、そのプロファイルを明らかにすることが可能である。また、同時にアレル頻度を測定することで、白血病細胞の成因(進化の過程、クローナリティの評価)について分子遺伝学的な検討をあわせて行うことが可能である。Target sequenceは十分な施行実績があるため、その実施は支障がないと考えられる。ライブラリー調製後のサンプルに対しイルミナ社のHiSeq2000®を用いて100-bp pair readsのスタンダードプロトコールを用いてdeep sequencingを行う。ValidationはSanger sequencing法で行った。

また、2019年度にはその他の核型を含む約50例の追加解析を行い、プレリミナリーな結果ではあるが複数症例に認められた遺伝子変異のみについては対象症例を更に広げて追加で解析を行った。

4. 研究成果

【2018年度研究結果】

AML-05臨床試験に登録された初発AML症例のうち、検体の得られた77例に対して343遺伝子パネルを用いた網羅的変異解析を行った。その結果、61種類187個の遺伝子変異を同定することができた。一人あたりの平均の変異数は2.42個であった。また、全体のうちの72名(93%)の小児AML患者に少なくとも一つの変異を同定することができた。

正常核型59例のうち、51名(86%)においては白血病発症因子として知られている*FLT3-ITD*、*KMT2A-PTD*、*CEBPA* 遺伝子変異、*NPM1* 遺伝子変異のいずれか一つまたは重複して遺伝子異常を持

っていることがわかった。また、それ以外の遺伝子変異としては *PTPN11* 遺伝子変異が5例(8%)、*TET2* 遺伝子変異も5例(8%)と比較的高頻度であった。更に *PTPN11* 遺伝子は予後不良の傾向があり、*TET2* は成人と異なり予後良好の傾向を認めた。興味深いことには我々は白血病発症の原因となりうると思われるいくつかの重複遺伝子異常(ITD)を同定した。*KIT* 遺伝子、*BCOR* 遺伝子の重複遺伝子異常など、これまでに報告が少ないもの、ほとんどないものなど、いくつかの重複遺伝子異常を正常核型 AML 症例において発見することができた。また、既報では全く報告がなく、他の癌腫においても報告がされていない X 遺伝子、Y 遺伝子、Z 遺伝子の新規重複遺伝子異常をそれぞれ1例ずつ同定した。これらの結果を図1に示す。

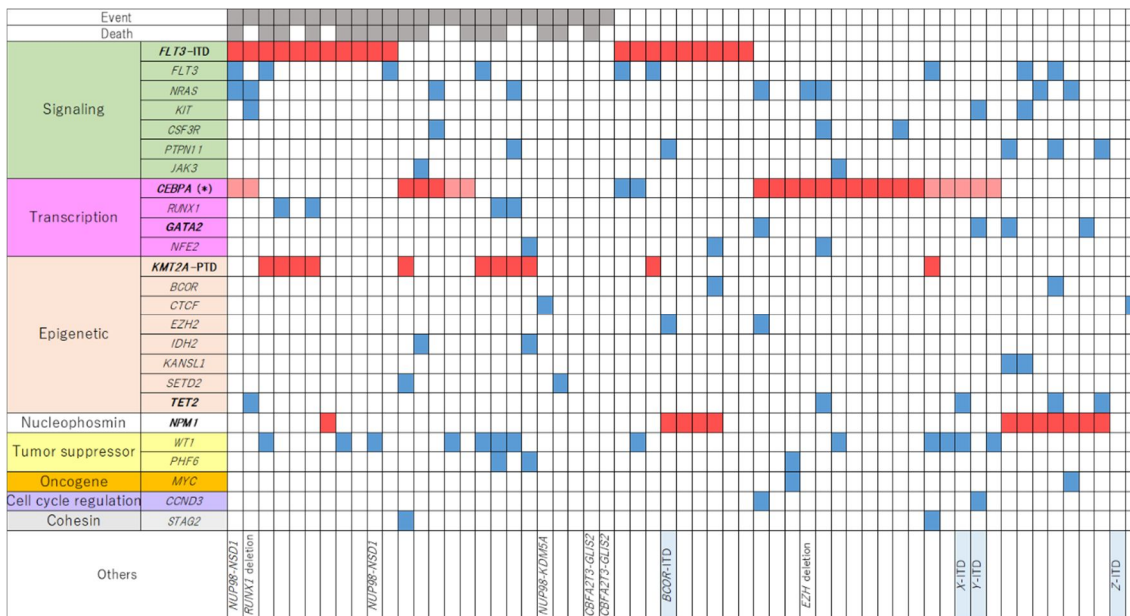


図1. 正常核型 AML 症例 59 例における遺伝学的背景

また、複雑核型 18 例の解析においては、*TP53* 遺伝子変異を3例(17%)、*JAK2* 遺伝子変異を2例(11%)、*ASXL1* 遺伝子変異を2例(11%)、*U2AF1* 遺伝子変異を1例(7%)、*SF3A1* 遺伝子変異を1例(7%)、*RUNX1* 遺伝子変異を2例(11%)、*BCOR/BCORL1* 遺伝子変異を3例(17%)に、それぞれ同定した(図2)。これらの遺伝子は骨髄異形成症候群(MDS)で特に確認されやすい遺伝子変異である。今回の解析では複雑核型 18 例中、実に15例(83%)に MDS 関連遺伝子変異が同定されるという結果に至った。また、遺伝子の機能面からみると10例に転写因子またはエピジェネティック調節因子の変異を認め、そのうちの80%は再発または死亡をしていた。また、我々は3例で *RUNX1* 融合遺伝子(*RUNX1-CBFA2T2*, *RUNX1-CBFA2T3*, *RUNX1-FNBP1*)を同定した。加えて、*PICALM-MLL10* 融合遺伝子、*MYB-GATA1* 融合遺伝子をそれぞれ1例の患者で同定した。面白いことにこれらの融合遺伝子をもつ患者は転写因子やエピジェネティック調節因子の変異をほとんど持たず、全例が再発なしで生存をしていた。

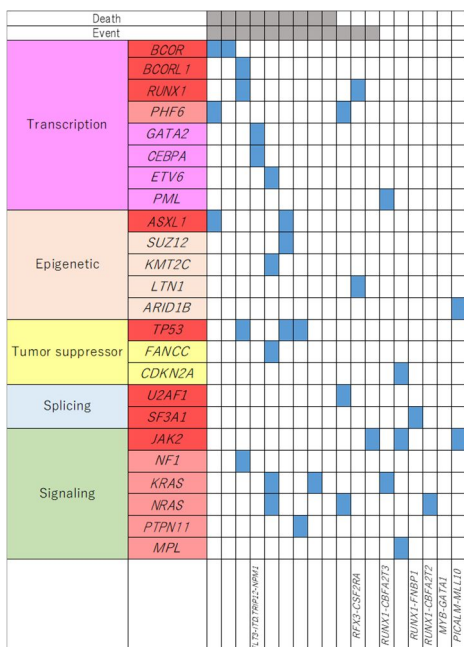


図2. 複雑核型 AML 症例 18 例における遺伝学的背景

【2019 年度研究結果】

以上の結果は 2018 年度に得られた結果が中心であり、2019 年度にはプレリミナリーな結果ではあるが解析症例数を更に増やし、そこから複数症例に同定された遺伝子について症例数を増やして解析を行い、2019 年度米国血液学会にて報告を行った。解析を行った症例数は小児初発 AML302 例となった。同定された変異は *TET2* に加えて *KMT2C*、*MGA*、*PHF6* 遺伝子である。先に述べた通り *TET2* 変異は正常核型に多く、加えて *KMT2C* 変異は *RUNX1-RUNX1T1* 融合遺伝子、*KIT* 遺伝子変異との合併が多く、*PDF6* は複雑核型、*MGA* 遺伝子は *DEK-NUP214* 融合遺伝子との合併が多い傾向があった（図 3）。これらはいずれも予後に関与する可能性があり、更に解析を進めていく予定である。

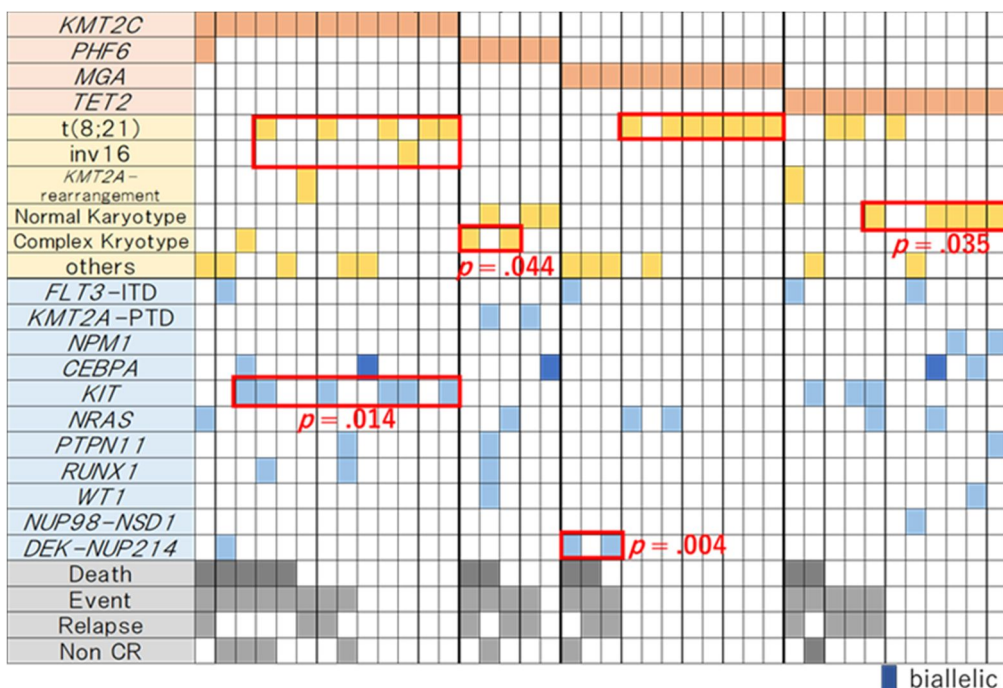


図 3. *KMT2C*、*PHF6*、*MGA*、*TET2* 遺伝子変異とその他分子生物学的背景の相関図

【まとめ】

小児 AML に対してカスタムパネルを用いたターゲットディープシーケンスを行った。その結果、新規に予後因子となる可能性のある遺伝子変異を複数同定し、また、白血病発症の原因となりうる可能性のあるいくつかの重複遺伝子異常を同定した。今後も得られた解析結果から予後との詳細をより明らかにし、また、更に解析症例数を増やしプレジジョンメディスンの根拠となるような論文報告を行うことで、我々の研究が小児 AML 全体の予後向上に繋がることを目標としていく。

引用文献

1. Yamato G., Hayashi Y., et al. *RUNX1* mutations in pediatric acute myeloid leukemia are associated with distinct genetic features and an inferior prognosis. *Blood*. 131:2266-2270. 2018.
2. Hara Y., Yamato G., Hayashi Y., et al. Prognostic impact of specific molecular profiles in pediatric acute megakaryoblastic leukemia in non-Down syndrome. *Genes Chromosomes Cancer*, 56, 394-404. 2017.
3. Shiba N., Yamato G., Hayashi Y., et al. 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*, 172, 581-591. 2016.
4. Matsuo H., Yamato G., et al. Recurrent *CCND3* mutations in *MLL*-rearranged acute myeloid leukemia. *Blood Adv.* 2:2879-2889. 2018.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1 . 発表者名 Taeko Kaburagi, Genki Yamato, et al.
2 . 発表標題 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
3 . 学会等名 60th Annual Meeting of the American Society of Hematology (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Taeko Kaburagi, Genki Yamato, et al.
2 . 発表標題 Recurrent gene mutations in pediatric patients with AML by targeted sequencing -the JCCG study, JPLSG AML-05-
3 . 学会等名 61st Annual Meeting of the American Society of Hematology (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