

令和 6 年 7 月 2 日現在

機関番号：83904  
研究種目：基盤研究(C)（一般）  
研究期間：2021～2023  
課題番号：21K08384  
研究課題名（和文）成人B細胞性急性リンパ性白血病における新規サブタイプ同定とその分子病態の解明  
  
研究課題名（英文）Identification of New Subtypes and Elucidation of Molecular Pathogenesis in Adult B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia  
  
研究代表者  
安田 貴彦（Yasuda, Takahiko）  
  
独立行政法人国立病院機構（名古屋医療センター臨床研究センター）・その他部局等・分子診断研究室長  
  
研究者番号：20723977  
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）：成人B-ALL（ $n = 354$ ）に対し、遺伝子発現情報と遺伝子変異情報を統合的に解析した結果、約85%の症例において18種類の独立した病型に分類が可能となった。最も頻度が高かったのは、ZNF384融合遺伝子を特徴とする病型（ZNF384病型）であり、全体の約20%を占め、日本人最大病型であることが判明した。また、今までに報告されていない新規の2病型（CDX2病型、IDH1/2病型）を発見し、それぞれCDX2遺伝子の高発現とIDH1/2変異が特徴であることを明らかにした。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

新規両病型は、小児と比較してAYA・成人に好発し、予後が極めて不良であることから、AYA・成人の急性リンパ性白血病が小児と比べて予後不良である一つの原因になっていると考えられた。これらの成果により、病型の特徴に応じた最適な治療戦略の確立が期待される。特に一部の予後不良な病型に対しては、治療成績向上のため、同種造血幹細胞移植を積極的に実施するなど、治療の強化が必要と考えられる。

研究成果の概要（英文）：Of the 354 adult B-ALL cases analyzed by integrating gene expression and gene mutation information, approximately 85% of the cases could be classified into 18 distinct subtypes. The most frequent subtype was characterized by the ZNF384 fusion gene (ZNF384 subtype), accounting for about 20% of the total cases and identified as the largest subtype among Japanese patients. Additionally, two novel subtypes, not previously reported (CDX2 subtype and IDH1/2 subtype), were discovered, characterized by high expression of the CDX2 gene and mutations in IDH1/2, respectively.

研究分野：血液学

キーワード：acute leukemia subtype RNA-seq

## 1. 研究開始当初の背景

急性リンパ性白血病(ALL)は小児から高齢者まで幅広い世代で発症する造血器腫瘍である。小児 ALL (0-14 歳)では、治療プロトコルの最適化・層別化治療の実践により、治療成績が著しく向上し、現在では長期生存率 90%以上が見込まれている。一方、成人 B-ALL (15-64 歳)は、その半数以上が再発し、長期生存率は 30%台と満足のいく成績は得られていない。小児と成人 ALL の治療成績が異なる要因として、白血病細胞の分子生物学的な特性の違いが指摘されている(図1)。近年、米国・中国から 1000 症例規模の大規模なゲノム解析研究による新たな分子病型の提示がなされているが、主な解析対象は小児に偏っており、予後不良な成人 B-ALL における白血病の分子生物学的特徴は依然として不明である。我々は AYA 世代 (Adolescents and Young Adults : 15-24 歳) ALL を対象に網羅的な融合遺伝子解析を実施し、DUX4, ZNF384, MEF2D などの融合遺伝子の新規発見と、各融合遺伝子が白血病発症能を有することを報告した (Yasuda T. et al, Nat Genet, 2016)。

我々はさらなる研究の発展を目指し、B-ALL の解析対象を成人 (~64 歳)に広げ、AYA・成人 B-ALL (n=323)症例を対象に RNA-seq を実施した。その結果、B-ALL に存在する融合遺伝子の全貌を解明し、さらに遺伝子発現プロファイルに基づく新たな病型分類を考案するに至った。上記研究成果により、約 75%の患者は ZNF384 融合遺伝子、Ph-like ALL、TCF3-PBX1 融合遺伝子など既知のサブタイプに該当し、残りの約 25%の患者は、手持ちのデータで判定できない既知のサブタイプに該当する患者か、既知のサブタイプに該当しない新規サブタイプ患者であることがわかった。興味深いことに、t-SNE (t-distributed Stochastic Neighbor Embedding)法によるクラスター解析を実施したところ、この 25%の患者の中に 2 種類の新規サブタイプの存在を示唆するデータが得られた。一つは、HOX 関連遺伝子の制御因子である CDX2 (CDX2 は白血病発症能を持つことが報告されている)の高発現を特徴とするサブタイプ (CDX2 サブタイプ)であり、もう一つは、IDH1/2 変異 (IDH1/2 変異は一般にがん発症の早期に生じる遺伝子異常として知られている)で構成されるサブタイプ (IDH1/2 サブタイプ)である。これらの新規サブタイプは、RNA-seq のデータから強く存在を疑わせるものであるが、その存在を証明するためにはさらなるデータの蓄積が必要である。

## 2. 研究の目的

本研究は、Target-capture DNA sequencing (TC-DNA-seq)を実施することにより、新たなゲノム異常の情報を収集し、RNA-seq で同定された成人 B-ALL の新規サブタイプの存在を再検証する。さらに、founding ドライバー変異を同定 (CDX2 サブタイプ)し、その下流の遺伝子を明らかにすることにより、分子病態の解明 (両サブタイプ)を目指す。研究コホートで収集された臨床情報を用いて、これらの新規サブタイプがもつ特徴的な臨床像を明らかにする

## 3. 研究の方法

上記目的達成のため、ALL 発症に関連する約 160 遺伝子を選定し、解析対象遺伝子を濃縮するためのパネルを作成する。Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG)の ALL202 研究ならびに ALL213 研究で登録のあった B-ALL 患者 323 症例 (RNA 利用可)のうち、

既知サブタイプに該当しない 78 症例に対し、TC-DNA-seq を実施する。TC-DNA-seq は、一塩基変異/挿入欠失 (SNVs/indel)、コピー数異常、染色体構造異常を 1 回の解析で同時に取得可能である。得られた解析結果をもとに下記の 4 項目を明らかにする。

#### (1) 成人 B-ALL のサブタイプの再分類と新規サブタイプ存在の妥当性検証

RNA-seq 解析では、コピー数異常の判定が困難であり、本研究開始前の分類は、Hyperdiploid, Hypodiploid など染色体の異数性で規定されるサブタイプの判定が不十分である。TC-DNA-seq で得られるコピー数異常や他の併存遺伝子異常の情報を解析し、新たな情報を加味したうえで、成人 B-ALL サブタイプを再分類する。新規サブタイプに属する症例が既存のサブタイプと排他的関係にあるのかを改めて検証する。

#### (2) CDX2 サブタイプを規定する原因遺伝子の同定と分子病態の解明

tSNE 解析で同定された CDX2 サブタイプは CDX2 遺伝子の高発現を特徴とするサブタイプである。しかし、RNA-seq で同サブタイプに共通する融合遺伝子は同定されず、原因となるゲノム異常が明らかになっていない。TC-DNA-seq でサブタイプに共通するゲノム異常 (CDX2 遺伝子を含む) の発見が期待されるが、明らかにならない場合は、さらに全エクソン解析 (6 例程度) を追加実施する。また、併存する二次的遺伝子異常の全貌を明らかにする。CDX2 の下流に位置する HOX 遺伝子の発現解析ならびに Gene set enrichment analysis (GSEA) を用いたパスウェイ解析を実施することにより、同サブタイプの分子病態を明らかにする。

#### (3) IDH1/2 サブタイプの分子病態解明

IDH1/2 の遺伝子異常は、脳腫瘍や急性骨髄性白血病で高頻度に見られる異常であり、腫瘍発症の早期に生じるゲノム異常であることが知られている。本研究では、TC-DNA-seq で得られる IDH1/2 変異の variant allele frequency (VAF) を測定し、他の併存遺伝子変異の VAF と比較することにより、IDH1/2 変異が同サブタイプの founding 変異として矛盾がないか検討する。また、IDH1/2 変異に異常があるサンプルは一般に高メチル化をきたすことが報告されており、メチル化の異常とそれに伴う遺伝子の発現異常が腫瘍発症の要因になっている可能性がある。そのため、本研究では IDH1/2 サブタイプに属する症例とコントロールサンプルに対しメチル化アレイを実施する (全 16 症例の予定)。メチル化プロファイルを用いてクラスター解析を実施し、同サブタイプ存在の妥当性をメチル化の観点から検証する。さらに、RNA-seq で得られた発現とプロモーター領域のメチル化との統合解析により、メチル化の標的遺伝子 (プロモーター領域の高メチル化 + 発現低下) を探索する。

#### (4) 新規サブタイプの臨床的特徴の解明

前向きに収集された臨床データを用い、新規サブタイプの好発年齢、予後などの臨床像を統計学的手法により明らかにする。

### 4. 研究成果

本研究ではサブタイプに分類することが困難であった 78 症例の B-ALL 患者に対し、TC-DNA-seq を実施した。その結果、遺伝子変異、コピー数、構造異常などのゲノム異常の情報が加わった。最終的に、コホート全体の 354 症例のうち、約 85% の症例に対し、18 種類

の独立した病型に分類することが可能となった。

本コホートでは、ZNF384 融合遺伝子を特徴とする ZNF384 病型が約 20%を占め、本邦の最大の病型であることを明らかにした。この結果は欧米の報告（～3%程度）とは大きく異なっており、日本人もしくはアジア人固有の特徴である可能性が考えられた。

新規病型である CDX2 サブタイプでは、CDX2 遺伝子のプロモーター領域が脱メチル化しており、病型特異的に CDX2 遺伝子の高発現が確認され、特徴的な発現パターンを示すことを確認した。今回の解析で 11 症例がこのグループに該当し、B 細胞性急性リンパ性白血病の約 3%に見られることを明らかにした。

IDH1 と IDH2 変異を特徴とする病型（IDH1/2 サブタイプ）も過去に報告されていな新規の病型である。研究コホートにおいて、3 症例に IDH1 R132C 変異、4 症例に IDH2 R140Q 変異（ともにホットスポット変異）を認めた。発現解析の結果、これらの変異を有する症例は全例で特徴的なグループを形成するとともに、メチル化解析においても他の B 細胞性急性リンパ性白血病とは明瞭に区別される DNA 高メチル化を示すグループであることを明らかにした。

CDX2 サブタイプと IDH1/2 サブタイプの頻度を AYA・成人と小児で比較したところ、AYA・成人で両新規病型の頻度が有意に高いことが確認された。

最後に分類された病型ごとに予後解析を実施した。最大病型である ZNF384 病型は 5 年全生存率 70%以上と予後良好な傾向をもつことが判明した。一方で、新規に同定した 2 つの病型（CDX2 サブタイプと IDH1/2 サブタイプ）は 5 年全生存率 30%以下と極めて予後不良であり、予後不良として知られる Ph-like 病型と同程度であることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3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 Odaira Koya, Yasuda Takahiko, Okada Kentaro, Shimooka Takuya, Kojima Yukino, Noura Mina, Tamura Shogo, Kurahashi Shingo, Iwamoto Eisuke, Sanada Masashi, Matsumura Itaru, Miyazaki Yasushi, Kojima Tetsuhito, Kiyoi Hitoshi, Tsuzuki Shinobu, Hayakawa Fumihiko	4. 巻 114
2. 論文標題 Functional inhibition of MEF2 by C/EBP is a possible mechanism of leukemia development by <i>CEBP IGH</i> fusion gene	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 781 ~ 792
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15641	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 Yasuda Takahiko, Sanada Masashi, Tsuzuki Shinobu, Hayakawa Fumihiko	4. 巻 114
2. 論文標題 Oncogenic lesions and molecular subtypes in adults with B cell acute lymphoblastic leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 8 ~ 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15583	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 Dai Yu-Ting, Zhang Fan, Fang Hai, Li Jian-Feng, Lu Gang	4. 巻 119
2. 論文標題 Transcriptome-wide subtyping of pediatric and adult T cell acute lymphoblastic leukemia in an international study of 707 cases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	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) 10.1073/pnas.2120787119	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 Yasuda Takahiko, Sanada Masashi, Kawazu Masahito, Kojima Shinya, Tsuzuki Shinobu	4. 巻 139
2. 論文標題 Two novel high-risk adult B-cell acute lymphoblastic leukemia subtypes with high expression of <i>CDX2</i> and <i>IDH1/2</i> mutations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1850 ~ 1862
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2021011921	査読の有無 無
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 Yasuda Takahiko, Sanada Masashi, Kawazu Masahito, Kojima Shinya, Tsuzuki Shinobu, Hatta Yoshihiro, Kiyoi Hitoshi, Matsumura Itaru, Horibe Keizo, Mano Hiroyuki, Naoe Tomoki, Miyazaki Yasushi, Hayakawa Fumihiko	4. 巻 139
2. 論文標題 Two novel high-risk adult B-cell acute lymphoblastic leukemia subtypes with high expression of <i>CDX2</i> and <i>IDH1/2</i> mutations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1850 ~ 1862
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2021011921	査読の有無 無
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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Akinao Okamoto 1, Masashi Sanada 2, Takahiko Yasuda 2, Akihiro Tomita 1
2. 発表標題 Prospective Study on the Usefulness of Liquid Biopsy in Patients with Unknown Fever Suspected of Malignant Lymphoma
3. 学会等名 ASH2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

1. 発表者名 大平晃也 (1)、安田貴彦 (2)、岡田健太郎 (1)、下岡拓弥 (1) 小嶋有希乃 (1)、田村彰吾 (1)、小嶋哲人 (1,3)、清井仁 (4)、都築忍 (5)、早川文彦 (1)
2. 発表標題 Aberrant expression of CEBP inhibits MEF2 transcriptional activity in B cell acute lymphoblastic leukemia
3. 学会等名 第84回日本血液学会
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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