

令和 5 年 6 月 14 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：2021～2022

課題番号：21K20937

研究課題名(和文) 小児急性骨髄性白血病における網羅的遺伝子解析による7番染色体上遺伝子の意義の解明

研究課題名(英文) Comprehensive genetic analysis in pediatric acute myeloid leukemia to elucidate the clinical significance of genes on chromosome 7.

研究代表者

鍋木 多映子 (Kaburagi, Taeko)

群馬県衛生環境研究所・研究企画係・研究員

研究者番号：20907084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：小児急性骨髄性白血病(AML)における新規予後因子の同定を目的に、AMLや骨髄異形成症候群において代表的な染色体異常であるMonosomy 7と7番染色体短腕欠損[del(7q)]に着目し、パネルシーケンスによる遺伝子変異解析、コピー数解析を行い7番染色体上の遺伝子異常が有する臨床的意義を検証した。Monosomy 7を有する患者は有意に予後不良である一方、7番染色体短腕欠損[del(7q)]は予後に影響がなく、これらはMECOM高発現の頻度等の分子生物学的背景の違いが要因と考えられた。7番染色体長腕上の遺伝子異常としてはKMT2C変異を有する症例は有意に予後不良であることが明らかとなった。

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)において、これまでもmonosomy 7と7番染色体長腕欠損[del(7q)]は着目され、それらの共通欠失領域に重要な遺伝子が存在することが考えられてきたが、いまだに責任遺伝子の同定には至っていない。本研究ではmonosomy 7と7番染色体長腕欠損[del(7q)]の予後が異なり、背景としてmonosomy 7にはMECOM高発現の合併が多い一方、del(7q)には少ないなど、分子生物学的背景が大きく異なることが考えられた。これらは7番染色体上にはMonosomy 7やdel(7q)の共通欠失領域以外に重要な因子がある可能性を示唆する新たな知見と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Identification of novel prognostic factors is urgently needed to improve the prognosis of pediatric acute myeloid leukemia (AML). We focused on monosomy 7 and deletion of the long arm of chromosome 7[del(7q)], which are representative chromosomal abnormalities in AML, and performed mutation analysis and copy number analysis of genes on chromosome 7 using next-generation sequencing to verify their clinical significance. Monosomy 7 was significantly associated with poor prognosis, while del(7q) was not associated with prognosis. MECOM high expression was significantly more common in monosomy 7 but not in del(7q), suggesting that monosomy 7 and del(7q) have different molecular biological backgrounds. As for genetic mutations on the long arm of chromosome 7, patients with KMT2C mutations had a significantly poorer prognosis, suggesting that KMT2C mutations may be an important prognostic factor in pediatric AML.

研究分野：小児急性骨髄性白血病

キーワード：小児 急性骨髄性白血病 パネルシーケンス 7番染色体 KMT2C

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦の小児急性骨髄性白血病(AML)の治療層別化因子としては monosomy 7, 5 番染色体長腕欠損等の染色体異常、*RUNX1-RUNX1T1*、*CBFB-MYH11*、*NUP98-NSD1* 等の融合遺伝子、*FLT3-ITD* 等の遺伝子変異が用いられている。これらと治療反応性を組み合わせ、適切な治療強度による層別化治療が可能となり長期生存率は 60-70%まで上昇しているが、予後因子となる分子生物学的異常が同定される症例は約半数であり、多くの症例は中間リスク群として扱われる。その一部に再発難治の経過をたどる予後不良群が存在しており、より適切な層別化治療を行うべく詳細な予後因子解析が求められている。

本研究において申請者は小児 AML における予後不良因子のひとつである monosomy 7 に着目した。Monosomy 7 は小児 AML の予後不良因子のひとつであり、成人 AML、骨髄異形成症候群においても認められる代表的な染色体異常である。近年、成人 AML や骨髄異形成症候群(MDS)における monosomy 7 や 7 番染色体長腕欠損[del(7q)]の責任遺伝子として *SAMD9/9L*、*KMT2C*、*EZH2*、*CUX1* 等が注目されている(文献 1-3)。小児 AML においても monosomy 7 は予後不良因子であるが責任遺伝子は同定されておらず、del(7q)との違いや成人で注目されている *SAMD9/9L*、*KMT2C*、*EZH2*、*CUX1* 等の遺伝子異常の頻度、臨床的意義は明らかになっていない。7 番染色体上の遺伝子の詳細な解析により小児 AML における monosomy 7 の意義や他の分子生物学的背景との関連、新たな予後因子の同定につながる可能性を考えた。

2. 研究の目的

申請者は小児 AML の monosomy 7 における責任遺伝子の解明を目指すとともに、新たな予後因子として 7 番染色体上の遺伝子異常が関連する可能性を考え、日本小児白血病リンパ腫グループで実施した AML-05 研究症例全体で 343 遺伝子パネルシーケンスを施行し、7 番染色体上の重要遺伝子の検索と他の遺伝子異常や臨床学的特徴との関連を明らかにすることを目的とした。申請者は 343 遺伝子パネルシーケンスにより小児 AML における 7 番染色体上の遺伝子変異、構造異常、コピー数異常と他の遺伝子異常との関連を網羅的に解析し臨床的意義を検証した。7 番染色体遺伝子の詳細な解析を行うことで、小児 AML における monosomy 7 の重要遺伝子の解明とともに、monosomy 7 以外の症例においても新たな予後因子の同定に寄与することを目的とした。

3. 研究の方法

AML-05 試験に登録された 443 例中、臨床情報および保存検体として初発時ゲノム DNA 余剰検体が利用可能な 330 例を対象とし、次世代シーケンサーを用いパネルシーケンスを行った。今回のパネルシーケンスではこれまで固形腫瘍や造血器腫瘍などの悪性腫瘍においてドライバー遺伝子や治療標的となり得る可能性が報告されている 343 遺伝子を対象とした。7 番染色体上の遺伝子としては短腕(7p)上の遺伝子として *TNRC18*、*IKZF1*、*EGFR*、7q 上の遺伝子として *SBDS*、*CDK6*、*SAMD9*、*SAMD9L*、*TAF6*、*STAG3*、*GNB2*、*GIGYF1*、*CUX1*、*KMT2E*、*PIK3CG*、*DOCK4*、*MET*、*SMO*、*LUC7L2*、*BRAF*、*EZH2*、*SMARCD3*、*KMT2C*、*XRCC*を解析対象とした(図 1)。

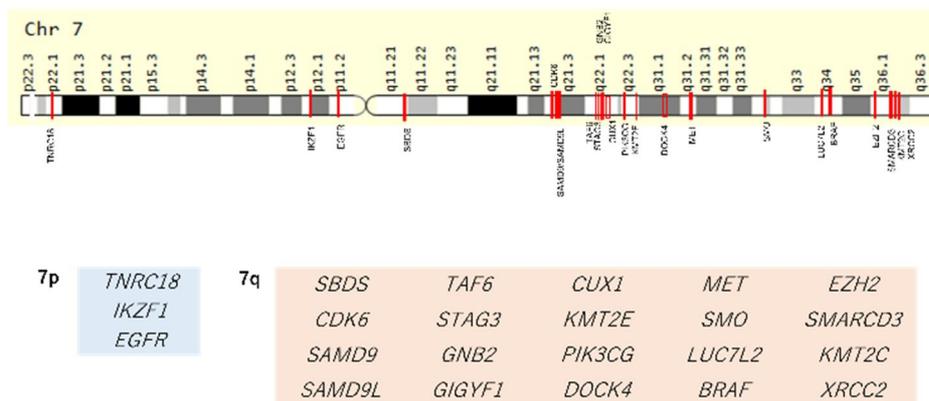


図 1

ターゲットキャプチャー用のベイトを利用し(文献 4)、次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンスを行い、遺伝子変異・構造異常解析、コピー数解析を行った。AML-05 試験の初発時検体についてはこれまでの研究で既に DNA が抽出されており、それらを利用した。ライブラリー調整として、ゲノム DNA を超音波処理により~200bp の断片サイズに切断した(Covaris®)。

その後、既報の方法により DNA にアダプター付加を行い(文献 5)、5'末端ビオチン化 DNA ベイトを用いて hybridization を行った。この DNA ベイトによって目標とする遺伝子を釣り上げ、Hiseq2000®を用いて 100-bp pair reads のスタンダードプロトコルを用いてディープシーケンスを行った。その後、臨床情報との照合を行い、予後を含めた臨床学的特徴について検証した。

4. 研究成果

コピー数解析の結果、monosomy 7 は 7 例、del(7q)は 8 例に認められた(図 2)。del(7q)の共通欠失領域としては主に *LUC7L2*, *BRAF*, *BRAF*, *SMARCD3*, *KMT2C*, *XRCC* が含まれ、これらの領域はこれまでに del(7q)の欠失領域として注目されている 7q34-36.1 に一致していた(文献 6)。

Monosomy 7 は全例が非寛解で造血幹細胞移植を実施しており、全生存率(overall survival, OS)、無イベント生存率(event-free survival, EFS)とも有意に不良であったが(OS, $p = 0.004$, EFS, $p = 0.017$)、del(7q)は再発や非寛解が多く無イベント再発率は不良であるものの、全生存率には有意差を認めなかった(OS, $p = 0.729$, EFS, $p = 0.024$)。

Monosomy 7 と del(7q)の症例が有する分子生物学的背景を比較すると、Monosomy 7 の 7 例中 6 例と高頻度に *MECOM* 遺伝子の高発現が認められる一方($p < 0.001$)、del(7q)では *MECOM* 遺伝子高発現は 8 例中 1 例のみであった。また、del(7q)には複雑核型が 3 例、*RUNX1-RUNX1T1* が 4 例と他の染色体異常を伴う症例が多く、分子生物学的背景が多様であり、これらが monosomy 7 との予後の差を生じる要因である可能性が考えられた。

7 番染色体上の遺伝子変異としては *KMT2C* 変異が 15 例(4.5%)、*EZH2* 変異が 7 例(2.1%)、*BRAF* 変異が 2 例(0.6%)、*CUX1* 変異が 1 例(0.3%)、*SAMD9L* 変異が 4 例(1.2%)、*SAMD9* 変異が 2 例(0.6%) に認められた(図 2)。特に *KMT2C* 変異は 15 例(4.5%)と比較的高頻度に認められ、それらを有する症例は有意に予後不良であり(OS, $p = 0.033$, EFS, $p = 0.020$)、重要な予後因子である可能性が考えられた。

KMT2C 変異は monosomy 7 や del(7q)による欠失で不活化されるがん抑制遺伝子として注目されており(文献 7)、小児 AML の薬剤耐性との関連も報告されている(文献 8)。また、*KMT2C* のハプロ不全は化学療法後の造血幹細胞の回復において有利に機能することも報告されており(文献 9)、本研究の結果は *KMT2C* 変異が小児 AML において予後不良因子である可能性を示唆するものであった。

小児急性骨髄性白血病(AML)において、これまでも monosomy 7 と del(7q)は着目され、それらの共通欠失領域に重要な遺伝子が存在することが想定され解析が進められてきた。本研究では monosomy 7 と del(7q)の予後が異なり、背景として monosomy 7 には *MECOM* 高発現の合併が多い一方、del(7q)には少なく、他の染色体異常を合併する頻度が異なるなど、分子生物学的背景が大きく異なることが考えられた。これらは 7 番染色体上には Monosomy 7 や del(7q)の共通欠失領域以外に重要な因子がある可能性を示唆し、短腕上に重要な遺伝子異常が存在する可能性や、複数の遺伝子異常、エピジェネティックな異常などが複合的に関わる可能性が考えられ、今後さらなる解析が必要と考えられた。

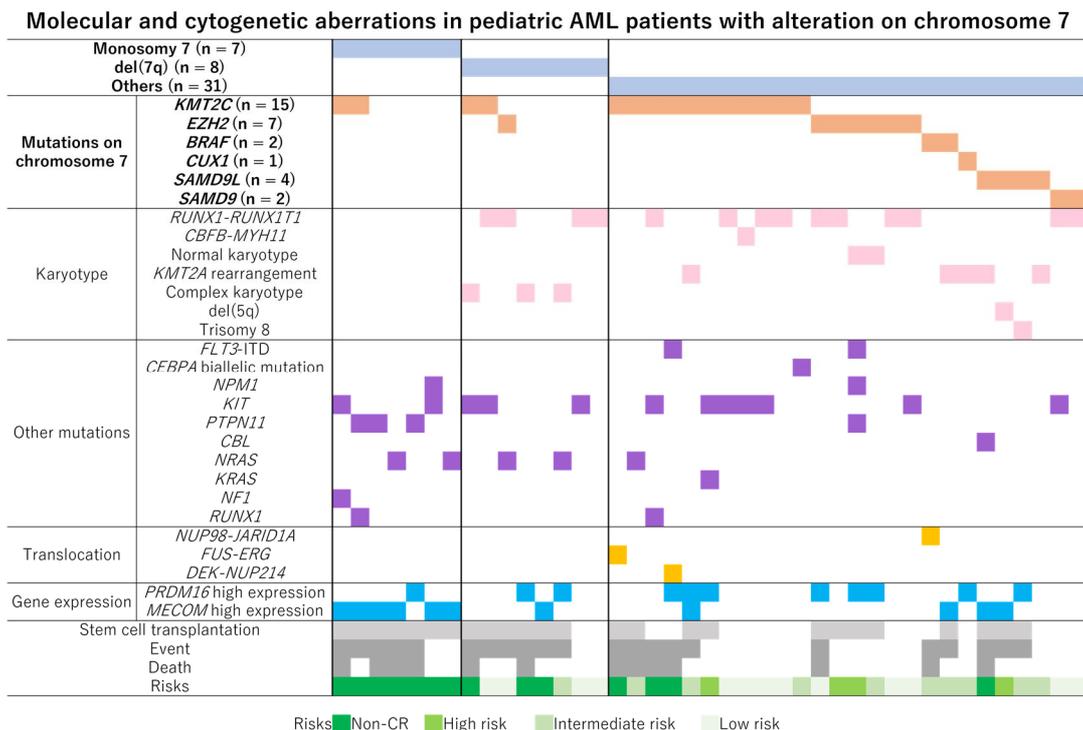


図 2

<引用文献>

1. Inaba T, et al. The enigma of monosomy 7. *Blood*. 2018;131(26):2891-2898.
2. Chen C, et al., MLL3 is a haploinsufficient 7q tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2014 ;25(5):652-65.
3. Asou H, et al., Identification of a common microdeletion cluster in 7q21.3 subband among patients with myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2009;383(2):245-51.
4. He J, et al. Integrated genomic DNA/RNA profiling of hematologic malignancies in the clinical setting. *Blood*. 2016 ;127(24):3004-14.
5. Frampton GM, et al. Development and validation of a clinical cancer genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing. *Nat. Biotechnol.* 2013;31(11):1023-31.
6. Hosono N. Genetic abnormalities and pathophysiology of MDS. *Int J Clin Oncol.* 2019 ;24(8):885-892.
7. Chen C, et al. MLL3 is a haploinsufficient 7q tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2014 ;25(5):652-65.
8. McNeer, NA, et al. Genetic mechanisms of primary chemotherapy resistance in pediatric acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2019 ;33(8):1934-1943.
9. Chen R., et al. Kmt2c mutations enhance HSC self-renewal capacity and convey a selective advantage after chemotherapy. *Cell Press*. 2021 ;34(7):108751.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sasaki K, Tsujimoto S, Miyake M, Uchiyama Y, Ikeda J, Yoshitomi M, Shimosato Y, Tokumasu M, Matsuo H, Yoshida K, Ohki K, Kaburagi T, Yamato G, Hara Y, Takeuchi M, Kinoshita A, Tomizawa D, Taga T, Adachi S, Tawa A, Horibe K, Hayashi Y, Matsumoto N, Ito S, Shiba N	4. 巻 194
2. 論文標題 Droplet digital polymerase chain reaction assay for the detection of the minor clone of <i>KIT</i> D816V in paediatric acute myeloid leukaemia especially showing <i>RUNX1 RUNX1T1</i> transcripts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 414 ~ 422
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bjh.17569	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 Yamato G, Park M, Sotomatsu M, Kaburagi T, Maruyama K, Kobayashi T, Nishi A, Sameshima K, Ohki K, Hayashi Y	4. 巻 113
2. 論文標題 Clinical features of 35 Down syndrome patients with transient abnormal myelopoiesis at a single institution	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 662 ~ 667
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-020-03066-7	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 Kaburagi T, Yamato G, Shiba N, Yoshida K, Hara Y, Tabuchi K, Shiraishi Y, Ohki K, Sotomatsu M, Arakawa H, Matsuo H, Shimada A, Taki T, Kiyokawa N, Tomizawa D, Horibe K, Miyano S, Taga T, Adachi S, Ogawa S, Hayashi Y	4. 巻 107
2. 論文標題 Clinical significance of RAS pathway alterations in pediatric acute myeloid leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 583 ~ 592
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3324/haematol.2020.269431	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 Yamato G, Kawai T, Shiba N, Ikeda J, Hara Y, Ohki K, Tsujimoto SI, Kaburagi T, Yoshida K, Shiraishi Y, Miyano S, Kiyokawa N, Tomizawa D, Shimada A, Sotomatsu M, Arakawa H, Adachi S, Taga T, Horibe K, Ogawa S, Hata K, Hayashi Y.	4. 巻 6
2. 論文標題 Genome-wide DNA methylation analysis in pediatric acute myeloid leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 3207 ~ 3219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2021005381	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 Kaburagi T, Shiba N, Yamato G, Yoshida K, Tabuchi K, Ohki K, Ishikita E, Hara Y, Shiraishi Y, Kawasaki H, Sotomatsu M, Takizawa T, Taki T, Kiyokawa N, Tomizawa D, Horibe K, Miyano S, Taga T, Adachi S, Ogawa S, Hayashi Y.	4. 巻 62
2. 論文標題 <scp> <i>UBTF</i> internal </scp> tandem duplication as a novel poor prognostic factor in pediatric acute myeloid leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes, Chromosomes and Cancer	6. 最初と最後の頁 202 ~ 209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/gcc.23110	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 Y, Shiba N, Yoshida K, Yamato G, Kaburagi T, Shiraishi Y, Ohki K, Shiozawa Y, Kawamura M, Kawasaki H, Sotomatsu M, Takizawa T, Matsuo H, Shimada A, Kiyokawa N, Tomizawa D, Taga T, Ito E, Horibe K, Miyano S, Adachi S, Taki T, Ogawa S, Hayashi Y.	4. 巻 62
2. 論文標題 <i>TP53</i> and <i>RB1</i> 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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 鍋木多映子、大和玄季、柴徳生、吉田健一、松尾英将、富澤大輔、足立壮一、多賀崇、小川誠司、林泰秀
2. 発表標題 小児急性骨髄性白血病における7番染色体上の遺伝子異常と臨床的意義
3. 学会等名 第63回小児血液がん学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大和玄季、河合智子、柴徳生、原勇介、大木健太郎、鍋木多映子、吉田健一、白石友一、宮野悟、清河信敬、富澤大輔、嶋田明、外松学、荒川浩一、足立壮一、多賀崇、堀部敬三、小川誠司、秦健一郎、林泰秀
2. 発表標題 小兒急性骨髓性白血病における全ゲノムDNAメチル化解析
3. 学会等名 第83回日本血液学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鍋木多映子、大和玄季、柴徳生、吉田健一、石北悦子、原勇介、白石友一、大木健太郎、河崎裕英、外松学、滝沢琢己、滝智彦、清河信敬、富澤大輔、堀部敬三、宮野悟、多賀崇、足立壮一、小川誠司、林泰秀
2. 発表標題 UBTF-ITDは小兒急性骨髓性白血病の予後因子である
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大和玄季、河合智子、柴 徳生、原勇介、 大木健太郎、鍋木多映子、石北悦子、吉田健一、白石友一、宮野悟、清河信敬、富澤 大輔、嶋田明、外松学、滝沢琢己、足立壮一、多賀崇、堀部敬三、小川誠司、秦健一郎、林泰秀
2. 発表標題 DNAメチル化パターンによるKMT2A-MLLT3陽性小兒急性骨髓性白血病患者の予後予測
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yamato G, Kawai T, Shiba N, Hara Y, Ohki K, Kaburagi T, Ishikita E, Kawasaki H, Yoshida K, Shiraishi Y, Miyano S, Kiyokawa N, Tomizawa D, Shimada A, Sotomatsu M, Takizawa T, Adachi S, Taga T, Horibe K, Ogawa S, Hata K, Hayashi Y.
2. 発表標題 Prognosis of pediatric acute myeloid leukemia with KMT2A-MLLT3 according to DNA methylation patterns: JCCG JPLSG AML-05 study.
3. 学会等名 64th American Society of Hematology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022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
---------	---------