

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790975

研究課題名（和文）ゲノムワイドなメチル化解析による若年性骨髄単球性白血病のリスク分類の開発

研究課題名（英文）

Genomewide methylation analysis of juvenile myelomonocytic leukemia.

研究代表者

村松 秀城 (MURAMATSU HIDEKI)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00572570

研究成果の概要（和文）：若年性骨髄単球性白血病（Juvenile myelomonocytic leukemia; JMML）はまれな小児特有の白血病である。メチル化アレイによるゲノムワイドな遺伝子プロモータ領域メチル化解析に引き続いて、候補遺伝子座についてパイロシーケンス法によるバリデーションを行った。正常検体と比較して、*CDKN2A*、*H19*、*CALCA*、*IGF2*、*BMP4* の各遺伝子プロモータ領域の有意なメチル化亢進が確認されたが、本研究による日本人 JMML 検体での検討では、遺伝子メチル化と全生存率との有意な相関は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：We analyzed JMML patients' genomic DNA with the methylation array for whole genome methylation analysis, and validated by pyrosequencing technique. As a result, promoters of *CDKN2A*, *H19*, *CALCA*, *IGF2*, and *BMP4* are significantly highly methylated in JMML patients compared to normal control, but methylation status of those genes are not associated with clinical outcome.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：小児血液学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：若年性骨髄単球性白血病、メチル化解析

## 1. 研究開始当初の背景

若年性骨髄単球性白血病（Juvenile myelomonocytic leukemia; JMML）はまれな小児特有の白血病であるが、化学療法のみでは治癒が望めず、全例を対象として同種造血幹細胞移植による治療が行われているものの、なお長期生存率は 40-50% と不良である。一方、一部症例は無治療で長期間生存が得られていることが報告されており

（Matsuda K et al. Blood 2009）、適切なリスク分類に基づく治療層別化が求められている。JMML の原因遺伝子として PTPN11、NRAS、KRAS、NF1 の変異が知られており、当科から PTPN11 変異 JMML が他の JMML 症例と比較して有意に予後が不良であることを報告した（Yoshida N et al. Pediatric Res 2009）。しかし、同種造血幹細胞移植が不要な群を抽出するためには、原因遺伝子に

よる分類のみでは、十分ではない。

成人 MDS においては、遺伝子のプロモータ領域のメチル化が見られることが知られており、脱メチル化薬や HDAC 阻害剤などの遺伝子のエピジェネティック異常に対する薬剤の臨床効果が確認されている (Stone RM. Blood 2009)。一方 JMML においては p15 遺伝子プロモータ領域のメチル化が小児 MDS と比較して少ないことが報告され (Hasegawa D, et al. Br J Haematology 2005)、JMML の病態に遺伝子メチル化はあまり関与していないのではないかと考えられていた。しかし、ドイツのグループにより脱メチル化薬が著効した JMML 症例が報告された (Furlan et al. Blood 2009) ことから、成人 MDS と同様に遺伝子メチル化が JMML においても重要な役割を果たしていることが予想された。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、JMML を対象にメチル化アレイおよびパイロシークエンス法によるゲノムワイドなエピジェネティック情報解析を行い、JMML の病態生理における遺伝子メチル化の関与の解明および新規リスク分類の開発を目指すことにある。

## 3. 研究の方法

メチル化アレイ法 (Infinium Human Methylation 27 BeadChip (イルミナ社))、パイロシークエンス法で同定された遺伝子について、プロモータ領域のメチル化の確認を行う。遺伝子メチル化と JMML の臨床予後との相関を統計学的に検討する。

## 4. 研究成果

JMML22 例においてメチル化アレイ (Infinium Human Methylation 27 BeadChip (イルミナ社)) の解析を行い、14,000 遺伝子の 27,578 の CpG サイトのメチル化を評価した。この解析で、JMML において高度メチル化が起きていると考えられた候補 10 遺伝子 (CDKN2A、H19、CALCA、IGF2、BMP4、CDKN2B、RASSF1、RARβ、MLH1、MGMT) について、JMML49 症例 (図 1) の検体を用いてパイロシークエンス法によるバリデーションを行った (図 2)。

## Patients Characteristics

Variables	N = 49	Variables	N = 49
Age at diagnosis (m.o.)	median 32 range 1 - 75	Cytogenetics	Normal Karyotype 35 Monosomy 7 8 Trisomy 3 1 Others 3 Unknown 2
Gender	Male 32 Female 16 Unknown 1	Genetic mutation	PTPN11 26 NRAS 2 KRAS 1 CBL 5
Hb at diagnosis (g/dL)	median 9.6 range 4.9 - 12.0	HSCT	Yes 32 No 13 Unknown 4
WBC at diagnosis (x10 <sup>9</sup> /L)	median 28 range 10.9 - 126.2	Clinical Outcome	Alive 24 Dead 21 Unknown 4
Monocyte at diagnosis (x10 <sup>9</sup> /L)	median 4.5 range 1.4 - 32.0	Observation Period (m.o.)	median 14 range 1 - 216
Platelet at diagnosis (x10 <sup>9</sup> /L)	median 49 range 1.4 - 320		
NF1 clinical diagnosis	Yes 2 No 47		

図 1. 患者背景

## Pyrogram of CpG in CDKN2A

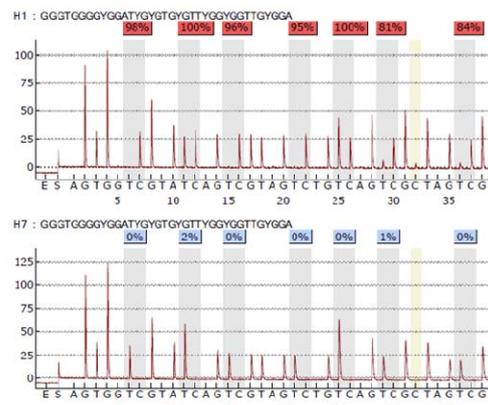


図 2. パイロシークエンス法による CDKN2A 遺伝子メチル化解析結果

上記 10 遺伝子のうち、CDKN2A、H19、CALCA、IGF2、BMP4 の 5 遺伝子は正常コントロールと比較して有意に JMML 患者検体において高度メチル化が確認できたが (図 3)、他の 5 遺伝子においては正常コントロールと差異は認められなかった。

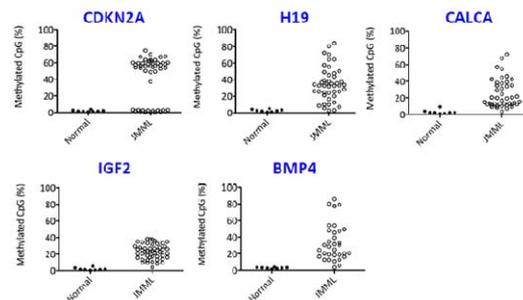


図 3. JMML で有意な高メチル化を認めた 5 遺伝子の解析結果

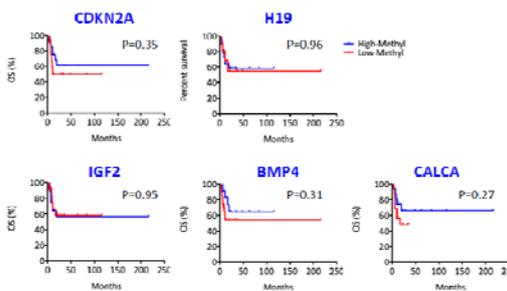


図 4. 遺伝子メチル化による生命予後解析

これら5つの遺伝子のメチル化状態と生命予後を含めた臨床情報との関連について統計学的に解析を行った。海外からの報告 (Olk-Batz C, et al. Blood 2011) とはことなり、いずれの遺伝子座においても遺伝子メチル化と臨床予後との有意な相関は認められなかった (図4)。また、年齢・責任遺伝子変異等の臨床情報との相関も認められなかった。

特に RAS 遺伝子変異を有する JMML 症例の中には造血幹細胞移植を施行せずに長期生存が得られている症例が報告されているが、他の JMML と同様に非常に悪性度が高い RAS 変異症例も存在する。今回の検討では、RAS 遺伝子変異例の症例は少数しか含まれておらず、十分な検討ができていないため、今後 RAS 変異 JMML の症例を蓄積させ、同群における遺伝子メチル化の程度によるリスク層別化の可能性について検討予定である

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文 (すべて査読あり)] (計 15 件)

1. Hama A, Muramatsu H, Makishima H, Sugimoto Y, Szpurka H, Jasek M, O'Keefe C, Takahashi Y, Sakaguchi H, Doisaki S, Shimada A, Watanabe N, Kato K, Kiyoi H, Naoe T, Kojima S, Maciejewski JP. Molecular lesions in childhood and adult acute megakaryoblastic leukaemia. *British journal of haematology* 2012;156:316-325.
2. Sakaguchi H, Takahashi Y, Watanabe N, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Shimada A, Yagasaki H, Kudo K, Kojima S. Incidence, clinical features, and risk factors of idiopathic pneumonia syndrome following hematopoietic stem cell transplantation in children. *Pediatric blood & cancer* 2012; 58:780-784.
3. Muramatsu H, Makishima H, Maciejewski JP. Chronic myelomonocytic leukemia and atypical chronic myeloid leukemia: novel pathogenetic lesions.

*Seminars in oncology* 2012;39:67-73.

4. Muramatsu H, Takahashi Y, Sakaguchi H, Shimada A, Nishio N, Hama A, Doisaki S, Yagasaki H, Matsumoto K, Kato K, Kojima S. Excellent outcomes of children with CML treated with imatinib mesylate compared to that in pre-imatinib era. *International journal of hematology* 2011;93:186-191.

5. Muramatsu H, Takahashi Y, himoyama Y, Doisaki S, Nishio N, Ito Y, Hama A, Shimada A, Yagasaki H, Ito M, Kojima S. CD20-negative Epstein-Barr virus-associated post-transplant lymphoproliferative disease refractory to rituximab in a patient with severe aplastic anemia. *International journal of hematology* 2011;93:779-781.

6. Watanabe N, Takahashi Y, Matsumoto K, Horikoshi Y, Hama A, Muramatsu H, Yoshida N, Yagasaki H, Kudo K, Horibe K, Kato K, Kojima S. Total body irradiation and melphalan as a conditioning regimen for children with hematological malignancies undergoing transplantation with stem cells from HLA-identical related donors. *Pediatr Transplant* 2011;15:642-649.

7. Watanabe N, Takahashi Y, Matsumoto K, Hama A, Muramatsu H, Doisaki S, Horibe K, Kato K, Kojima S. Prognostic factors for outcomes of pediatric patients with refractory or relapsed acute leukemia undergoing allogeneic progenitor cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17:516-523.

8. Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsuiki N, Matsuda K, Muramatsu H, Doisaki S, Nagasawa M, Morio T, Kasahara Y, Koike K, Kojima S, Takao A, Mizutani S. Autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease with somatic KRAS mutation. *Blood* 2011;117:2887-2890.

9. Shima H, Tokuyama M, Tanizawa A, Tono C, Hamamoto K, Muramatsu H, Watanabe A, Hotta N, Ito M, Kurosawa H, Kato K, Tsurusawa M, Horibe K, Shimada H. Distinct impact of imatinib on growth at prepubertal and pubertal ages of children with chronic myeloid leukemia. *J Pediatr* 2011;159:676-681.

10. Nishio N, Takahashi Y, Tanaka M, Xu Y, Yoshida N, Sakaguchi H, Doisaki S, Hama A, Muramatsu H, Shimada A, Kojima S. Aberrant phosphorylation of STAT5 by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in infant

cytomegalovirus infection mimicking juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia research* 2011;35:1261-1264.

11. Nishio N, Takahashi Y, Ohashi H, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Shimada A, Yagasaki H, Kojima S. Reduced-intensity conditioning for alternative donor hematopoietic stem cell transplantation in patients with dyskeratosis congenita. *Pediatr Transplant* 2011;15:161-166.

12. Narita A, Muramatsu H, Takahashi Y, Sakaguchi H, Doisaki S, Nishio N, Hama A, Shimada A, Ito M, Kojima S. Autoimmune-like hepatitis following unrelated BMT successfully treated with rituximab. *Bone marrow transplantation* 2011(in press).

13. Kamio T, Ito E, Ohara A, Kosaka Y, Tsuchida M, Yagasaki H, Mugishima H, Yabe H, Morimoto A, Ohga S, Muramatsu H, Hama A, Kaneko T, Nagasawa M, Kikuta A, Osugi Y, Bessho F, Nakahata T, Tsukimoto I, Kojima S. Relapse of aplastic anemia in children after immunosuppressive therapy: a report from the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. *Haematologica* 2011;96:814-819.

14. Ismael O, Shimada A, Hama A, Sakaguchi H, Doisaki S, Muramatsu H, Yoshida N, Ito M, Takahashi Y, Akita N, Sunami S, Ohtsuka Y, Asada Y, Fujisaki H, Kojima S. Mutations profile of polycythemia vera and essential thrombocythemia among Japanese children. *Pediatric blood & cancer* 2011(in press).

15. Asai E, Wada T, Sakakibara Y, Toga A, Toma T, Shimizu T, Nampoothiri S, Imai K, Nonoyama S, Morio T, Muramatsu H, Kamachi Y, Ohara O, Yachie A. Analysis of mutations and recombination activity in RAG-deficient patients. *Clin Immunol* 2011;138:172-177.

[学会発表] (計 2 件)

坂口大俊 他

若年性骨髄単球性白血病における DNA メチル化の臨床的意義

第 73 回日本血液学会学術集会  
2011 年 10 月 15 日 名古屋

土居崎小夜子 他

NRAS 体細胞モザイク変異 (G12D) により若年性骨髄単球性白血病を発症した一例

第 73 回日本血液学会学術集会

2011 年 10 月 15 日 名古屋

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村松秀城 (MURAMATSU HIDEKI)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00572570

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし