

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2013～2015  
課題番号：25461608  
研究課題名(和文) ゲノム情報および遺伝子発現に基づく小児Ph染色体陽性白血病の創薬標的候補探索研究

研究課題名(英文) Genome- and gene expression-based drug discovery for pediatric Philadelphia chromosome positive leukemia

研究代表者  
嶋田 博之 (SHIMADA, HIROYUKI)  
慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：80265868  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：難治性白血病であるフィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病(Ph+ALL)の約80%にIKZF1遺伝子の欠失を認めたとの報告があり、小児Ph+ALL患者を対象に、IKZF1欠失の有無と予後との関係を調べた。再発のない4年生存率は、IKZF1欠失のない患者が89%であったのに対し、IKZF1欠失のある患者は42%だった。IKZF1欠失のある患者の方が有意に再発率が高く、Ph+ALLが難治性であるのは、Ph染色体の形成より、IKZF1欠失に強く関係することが分かった。

研究成果の概要(英文)：Deletion of IKZF1 gene was reported to be found in 80% of pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ALL), which is known to be refractory leukemia. We examined the association between IKZF1 deletion and prognosis of 40 Ph+ALL patients, who was registered into the JPLSG Ph+ALL04 study. As a result, 4-year event-free survival was 89% in patients without IKZF1 deletion and 42% in patients with IKZF1 deletion. Patients with IKZF1 deletion had a significantly higher rate of relapse than those without IKZF1 deletion. These results suggest that the reason why Ph+ALL is refractory is not the appearance of Ph-chromosome but deletion of IKZF1.

研究分野：小児血液・腫瘍

キーワード：慢性骨髄性白血病 フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病 IKZF1遺伝子 ゲノム解析

### 1. 研究開始当初の背景

フィラデルフィア (Ph) 染色体陽性白血病は BCR-ABL キメラ遺伝子が形成されることによって発症する白血病で、Ph 染色体陽性急性リンパ性白血病 (Ph+ALL) および慢性骨髄性白血病 (CML) の 2 つに大別される。

小児 ALL 全体の無イベント生存率は 80% を超えるが、Ph 染色体陽性白血病は最近まで Ph+ALL、CML いずれも造血幹細胞移植なしでは治癒が見込めない極めて難治性の白血病であった。しかし、チロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) であるイマチニブの導入により、小児 Ph+ALL は造血幹細胞移植なしで治癒が見込めるようになり、小児 CML は造血幹細胞移植なしで分子遺伝学的寛解を維持できるようになった。イマチニブは BCR-ABL 融合遺伝子産物を特異的に阻害する薬物であり、TKI として開発された小分子化合物である。Ph 染色体陽性白血病の病因となる BCR-ABL 融合タンパクの ABL 部分の ATP 結合部位に、イマチニブが ATP に代わってはまりこむことにより、ABL 部位のリン酸化を阻害する。

このように、Ph 染色体陽性白血病の治療成績は近年著しく向上しているが、Ph+ALL では TKI 抵抗例への新規分子標的薬の導入、TKI 反応良好例への移植全廃や従来の化学療法の減弱といった課題、CML では CML 幹細胞根絶もしくは制御による TKI 中止といった課題が残されている。小児 Ph 染色体陽性白血病は、年間の発症数が約 50 例 (Ph+ALL 25 例、CML 25 例) と稀少疾患であるため、多数の臨床検体を使ったトランスレーショナルな研究への取り組みは遅れている。一方、他の小児白血病に先駆けて TKI 導入が成功を収めていることから、小児 Ph 染色体陽性白血病の研究から得られる成果は、他の小児白血病研究のブレークスルーを起こす足掛かりとなり得る。このような背景から、小児 Ph 染色体陽性白血病における、白血病幹細胞を標的とした分子標的薬の開発、治療抵抗性白血病細胞に対する新規分子標的薬の開発、特異抗原を標的とした免疫療法の開発などが切望されている。今後、小児 Ph 染色体陽性白血病に対して一層の治療成績向上を目指すためには、そのゲノム構造、エピゲノム情報、遺伝子発現の特性を明らかにして、発症機構や病態を分子レベルで解明することが不可欠である。本研究では、小児 Ph+ALL および小児 CML の臨床検体を用いて、その特性を分子レベルで網羅的に明らかにして創薬標的候補を探索、同定し、得られた成果を小児 Ph 染色体陽性白血病の発症機構解明や新規治療法開発に応用することを目指す。

### 2. 研究の目的

小児 Ph 染色体陽性白血病の臨床検体を用いて、ゲノム解析、トランスクリプトーム解析などを行い、小児 Ph 染色体陽性白血病細胞の特性を多角的に明らかにし、創薬・診断・予後判定等の標的候補探索を行ない、そ

の成果を小児 Ph 染色体陽性白血病細胞の発症機構解明や新規診断・治療法開発に応用する。

### 3. 研究の方法

本研究では、全国規模の小児 Ph+ALL 臨床研究 (日本小児白血病リンパ腫研究グループ (JPLSG) Ph+ALL04 研究、ALL-Ph13 研究) および小児 CML 臨床研究 (JPLSG CML08 研究、STKI-14 研究) を通して、国内で発生する大多数の小児 Ph 染色体陽性白血病患者の臨床検体を収集し、初発時や再発時などの白血病細胞を用いて網羅的なゲノム解析、トランスクリプトーム解析などを実施する。得られた白血病細胞の異常を臨床研究の臨床情報や治療成績と照合して、有意な分子レベルの異常を同定する。創薬・診断・予後判定等の標的候補となる遺伝子については、強制発現やノックダウン、マウスモデルなどを用いて機能解析を行い、その成果を小児 Ph 陽性白血病細胞の発症機構解明や新規診断・治療法開発に応用する。本研究は、疫学研究に関する倫理指針または臨床研究に関する倫理指針を遵守した上で、慶大を含む、全国の臨床研究参加施設において、倫理委員会による承認を得たのち、被験者に十分な説明を行い、インフォームドコンセントを得てから解析を開始する。提供者が未成年者の場合、親権者を代諾者とする。本研究に用いられる検体は連結可能匿名化されており、個人情報に該当する情報、およびその匿名化番号との照合表は各検体提供者が診療を受けている医療機関において管理されている。

### 4. 研究成果

JPLSG Ph+ALL04 研究に登録された小児 Ph+ALL 40 例を対象に後方視的に MLPA 法による IKZF1 欠失の解析を行った。登録症例の年齢は中央値 6.5 歳 (2 歳 ~ 15 歳)、性別は男 31 例、女 9 例であった。40 例中、IKZF1 欠失を認めた症例は 31 例 (78%) であり、IKZF1 欠失あり群となし群 (9 例) に分けて、IKZF1 欠失の有無と予後との関連を検証した。その結果、4 年生存率は、IKZF1 欠失なし群が 100% であったのに対し、IKZF1 欠失あり群は 71% だった ( $P=0.0989$ )。また 4 年無イベント生存率 (EFS) は IKZF1 欠失なし群が 89% であったのに対し、IKZF1 欠失あり群は 42% と有意 ( $P=0.0345$ ) に低かった。EFS の多変量解析では、IKZF1 欠失あり (相対リスク 8.89) とブレドニゾロン反応性不良 (相対リスク 3.58) が独立した予後不良因子となった。さらに、IKZF1 欠失あり群をドミナント・ネガティブおよび両アレル欠失による機能消失型 (21 例) とハプロ不全型 (10 例) に分けて予後を検討した結果、4 年 EFS はハプロ不全型が 75% であったのに対し、機能消失型は 39% と有意 ( $P=0.0189$ ) に予後不良であった。4 年生存率もハプロ不全型が 90% であったのに対し、機能消失型は 62% で予後不良

の傾向を認めた (P=0.0555)。図 1、図 2 に結果を示す。

図 1

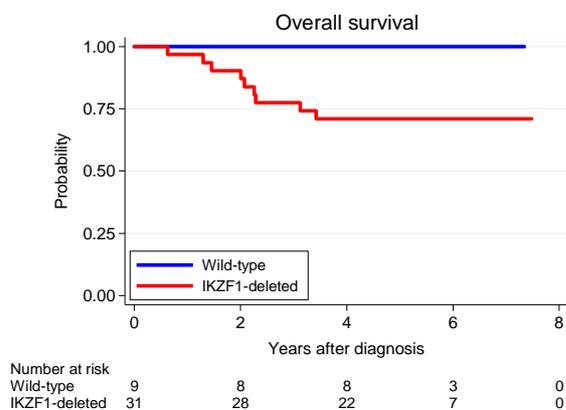
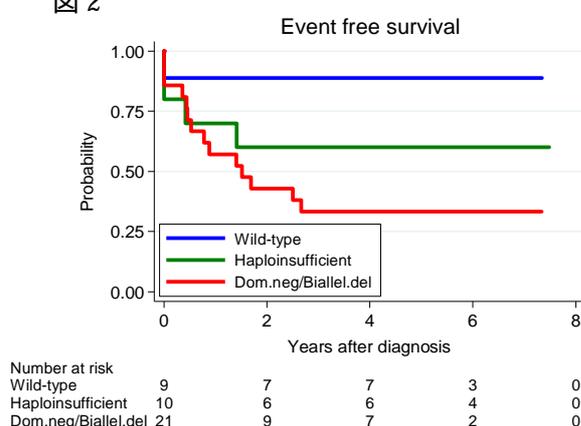


図 2



これらの結果により、本邦の初発小児 Ph+ALL において、IKAROS 欠失が、既報告と同様に高頻度 (78%) に認められることが明らかになった。また、IKAROS 欠失なし群の方が IKAROS 欠失あり群より良好な成績が得られることも同様の結果であり、Ph+ALL が難治性であるのは Ph 染色体の形成よりも、予後不良因子である IKZF1 欠失の頻度が高いからと考えられた。この解析での IKAROS 欠失なし群の生存率は非常に高く、全例が移植を行ったとは言え、キードラッグであるイマチニブをほとんど使っていないプロトコルであるにもかかわらず、イマチニブを併用した国外の EsPhALL 研究における治療反応良好群の生存率と比較して同等以上の成績であった。イマチニブの投与方法や TKI の選択方法の改善によって、IKZF1 欠失なし群の生存率は今後向上していくものと予想されるが、造血幹細胞移植は依然として重要な役割を果たすと考えられ、IKZF1 欠失なし群に移植を行う場合には骨髄非破壊的移植を検討する価値があると考えられた。

IKAROS 欠失のタイプでは、ハプロ不全型の生存率が比較的良好で、ドミナント・ネガティブおよび両アレル欠失による機能消失型

の生存率が低かった。この結果は、国外の報告とは異なる結果であるため、IKAROS 欠失のタイプと予後との関係については、今後さらにデータを蓄積して解析する必要がある。IKAROS 欠失なし、IKAROS 欠失ハプロ不全型、IKAROS 欠失機能消失型によって、予後予測が可能になれば、これらを将来、化学療法の治療強度の層別化に用いることができるようになる。

さらに、JPLSG ALL-Ph13 研究に登録された小児 Ph+ALL 27 例の初発時の骨髄検体を収集して、前方視的に MLPA 法による IKZF1 欠失などの解析を行った。Ph+ALL04 研究ではほとんどイマチニブが投与されないのに対し、ALL-Ph13 研究では寛解導入療法から維持療法まで連続してイマチニブが投与される違いがある。登録症例の年齢は中央値 8 歳 (5.5 歳 ~ 12.5 歳)、性別は男 17 例、女 10 例であった。27 例中、IKZF1 欠失を認めた症例は 18 例 (66.7%) であり、Ph+ALL04 研究とほぼ同じ頻度であった。ALL-Ph13 は現在実施中の臨床研究のため、治療反応や予後との関連は明らかにできなかったが、将来、生存率と IKZF1 欠失との関連を解析することによって、IKZF1 欠失あり群に対するイマチニブ併用療法の有効性を明らかにすることが可能となる。IKZF1 も含めて解析した遺伝子の欠失頻度を表 1 に記す。本研究により、IKZF1 以外の遺伝子欠失と予後との関連も将来明らかにすることができるだろう。

表 1

N=27		
ZBP1欠失	5	18.5 %
IKZF1欠失	18	66.7 %
DDC欠失	5	18.5 %
IKZF2欠失	0	0 %
IKZF3欠失	0	0 %
JAK2欠失	7	25.9 %
MIR31欠失	6	22.2 %
CDKN2A欠失	15	55.6 %
CDKN2B欠失	12	44.4 %
PAX5欠失	16	59.3 %
ETV6欠失	3	11.1 %
RB1欠失	4	14.8 %
EBF1欠失	2	7.4 %
BTG1欠失	4	14.8 %
IGH欠失	9	33.3 %

また、ダイレクトシーケンシング法によって白血病関連遺伝子の変異の有無を解析したところ、CRLF2, JAK1, JAK2 に変異を認めた症例はなく、RT-PCR 法によって P2RY8-CRLF2 キメラ遺伝子も認めなかった。これは、Ph+ALL 白血病細胞においては、責任遺伝子の BCR-ABL によって JAK キナーゼ異常が起こっているため、新たに CRLF2-JAK 経路の異常は

必要としないことを意味する妥当な結果と考えられた。また、JPLSG CML-08 研究に登録された小児 CML 78 例の初発時骨髓検体を収集したが、本研究期間内ではゲノム解析、トランスクリプトーム解析を実施することができなかった。将来、解析を行い、臨床研究データとの関連を検討するための基盤作りを行った。

小児 Ph+ALL に対する TKI の薬剤感受性を評価する系を作成するために、京都大学との共同研究で、小児 Ph+ALL 患者由来の白血病細胞を NOG マウスに移植して、マウス内で白血病を発症させ、Ph+ALL 白血病細胞を増殖させることに成功した。白血病マウス由来の Ph+ALL 白血病細胞において、TKI 添加前後の白血病細胞内の分子のリン酸化の変化を、フローサイトメトリーにより観察することによって、TKI の阻害活性を評価することが可能であった。今後、Ph+ALL 白血病マウスに TKI を投与して、TKI の効果を評価するとともに、フローサイトメトリーによる invitro の薬剤感受性の結果、および臨床上の患者における TKI の効果をそれぞれ比較して、TKI の効果を予測する系の確立につなげていきたい。

本研究で得られた IKAROS 欠失と予後との関連は、小児 ALL のうち 'Ph-like ALL' と呼ばれる疾患群の臨床においても応用することができる。Ph-like ALL は、欧米の研究グループにより Ph+ALL と類似した遺伝子発現プロファイルをもつ集団として同定され、治療成績においても Ph+ALL と同様に予後不良であることから注目されている。Ph-like ALL においても、IKAROS 欠失の頻度、欠失のタイプと予後との関連を検証することによって、治療の層別化が可能になると考えられる。また、TKI の標的となるキメラ遺伝子を有する Ph-like ALL に対しては、Ph+ALL と同様に、TKI 併用療法が有効である可能性が高く、フローサイトメトリーによる TKI の薬剤感受性の系を発展させることにより、これらの疾患群の治療選択に有用な情報をもたらすことが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

- 1) Hiroyuki Shimada, Hidemitsu Kurosawa, Akihiro Watanabe, Masaki Ito, Chikako Tono, Haruko Shima, Yuki Yuza, Hideki Muramatsu, Noriko Hotta, Masahiko Okada, Akihiko Tanizawa. Interim Analysis of a Multicenter, Prospective Study for Pediatric Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase: The JPLSG CML-08 Study. アメリカ血液学会、2015 年 12

月 06 日、オーランド(アメリカ)

- 2) 嶋田博之、佐藤 篤、河崎裕英、松本公一、加藤 格、児玉祐一、加藤啓輔、工藤寿子、齋藤明子、足立壮一、堀部敬三、水谷修紀、真部淳。小児フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病(Ph+ALL)における IKZF1 遺伝子欠失と予後との関連。日本造血細胞移植学会総会、2014 年 03 月 07 日~2014 年 03 月 09 日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

嶋田 博之(HIROYUKI SHIMADA)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号: 80265868

### (2) 研究分担者

嶋 晴子(HARUKO SHIMA)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号: 80424167

### (3) 連携研究者

清河 信敬(NO BUTAKA KIYOKAWA)  
独立行政法人国立成育医療研究センター・小児血液・腫瘍研究部・部長  
研究者番号: 60195401