

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：12301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893028

研究課題名(和文) 小児急性骨髄性白血病における網羅的な遺伝子プロファイルの解明

研究課題名(英文) Comprehensive genetic analysis of pediatric acute myeloid leukemia

研究代表者

柴 徳生 (SHIBA, NORIO)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50600615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：日本小児白血病リンパ腫研究グループのAML-05臨床研究で加療され、検体の得られた369例について遺伝子変異、遺伝子発現解析を施行した。先のAML99研究の遺伝子発現アレイ解析から、我々は予後不良因子であるNUP98-NSD1遺伝子再構成例がPRDM16遺伝子の高発現と強く関連していることを報告しており、AML-05でPRDM16遺伝子を検討したところ、84例(23%)でPRDM16遺伝子は高発現であり、有意に予後不良であった。PRDM16の発現はFLT3-ITD陽性例や正常核型症例において特に予後予測に有用で、FLT3-ITD陽性例であってもPRDM16の低発現例は有意に予後良好であった。

研究成果の概要(英文)：The genetic alterations responsible for adverse outcomes in patients with pediatric acute myeloid leukemia (AML) remain obscure. Recent reports described NUP98-NSD1 fusion as an adverse AML prognostic marker and PRDM16 (also known as MEL1) as the representative overexpressed gene in patients harboring NUP98-NSD1 fusion. In 369 pediatric patients with de novo AML from the Japanese AML-05 clinical trial, PRDM16 gene expression levels were measured via real-time PCR, and correlations between these and other genetic alterations were investigated to clarify the clinical significance and prognostic impact. Overall, 84 of 369 patients (23%) exhibited PRDM16 overexpression. The overall (OS) and event-free survival (EFS) among PRDM16-overexpressing patients were significantly worse than those among patients with low PRDM16 expression irrespective of other cytogenetic alterations except for NPM1. PRDM16 gene expression was especially useful for stratifying FLT3-ITD-positive patients with AML.

研究分野：急性骨髄性白血病

キーワード：PRDM16 AML 小児 FLT3-ITD

1. 研究開始当初の背景

近年、急性白血病に対する治療技術は飛躍的な向上を遂げており、また抗菌薬等の支持療法の急速な進歩に伴って、より積極的な治療が可能となり、小児急性骨髄性白血病(AML)の予後は飛躍的に向上してきているが、依然として約30%は予後不良である。1990年代頃より、AMLの病因として、染色体異常や遺伝子異常が相次いで報告されるようになり、小児では染色体異常の頻度が成人よりも高く、その中でも $t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1$ または $inv(16)/CBF-MYH$ を有するAMLはCore-binding-factor (CBF) AMLと呼ばれ、予後良好なAMLとされている。そのため、これらの異常を有するAMLは、本邦で実施されているAML05やAML12臨床試験では低リスク群に割り付けられている。一方、monosomy 7やフィラデルフィア染色体、微細な転座であるため通常の染色体G-banding法では検出されない $t(5;11)/NUP98-NSD1$ (約4%)は予後不良とされており、高リスク群に割り付けられている。さらに、これらの染色体異常を認めない正常核型の多くは中間リスク群として割り付けをされているが(一部FLT3-ITDなどの遺伝子異常を認める症例は高リスク群に割り付け)、AMLはヘテロな疾患群の集合体と考えられることから、その全体像は未知であり、病態解明には至っていないのが現状である。一方、2000年代に入り、これらの細胞遺伝学的な異常を背景としたリスク分類による治療層別化に加え、遺伝子解析技術の進歩に伴い、FLT3-ITDがAMLの予後不良因子として同定され、本邦の小児AMLの臨床試験においても予後不良因子として採用されている。しかし、FLT3-ITD以外には十分な信頼のおける遺伝子異常は未だ同定できていない。さらに2000年代後半に入り、SNPアレイ、大量並列シーケンス技術(次世代シーケンサー)の開発により、遺

伝子変異の網羅的な解析が可能となり、成人AML症例では、DNMT3AやTET2に代表される予後に大きな影響をもたらす様々な遺伝子異常が次々と同定されており、治療層別化や治療標的として実臨床への応用が急速に進んでいる。その一方で、小児AMLにおいては成人領域で見つかる予後予測に役立つこれらの遺伝子変異はほとんど検出されず、その解明は遅れており、遺伝学的背景は大きく異なっているものと考えられ、未だ不明な部分が多い。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、小児AML99研究に登録された124例で、NUP98-NSD1遺伝子再構成を6例(4.8%)に見出し、有意に予後不良(4年全生存率; 33%)であることを突き止めた(図1)。

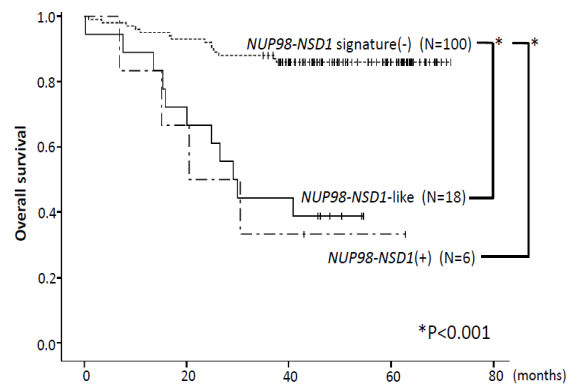


図1

さらに、マイクロアレイを用いた遺伝子発現アレイ解析の結果とあわせて検討を行ったところ、NUP98-NSD1遺伝子再構成6例は特徴的な遺伝子発現パターンを示し、NUP98-NSD1遺伝子再構成陰性例118例中18例でも、この6例と同様の発現パターンを示すことを見出した。

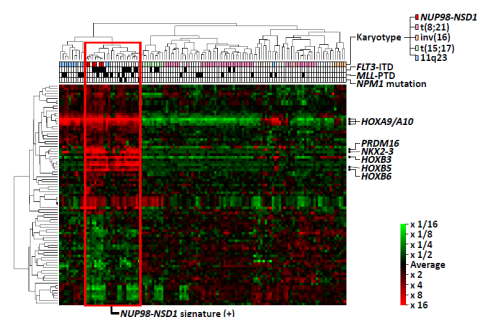


図2

この一群 24 例(*NUP98-NSD1* signature 群)の予後も *NUP98-NSD1* 遺伝子再構成例同様不良であった(4年全生存率;37.5%) (図2)。また、この解析を通して、*NUP98-NSD1* signature 群 24 例全例で *MEL1* 遺伝子が高発現であった (図2)。一方、*NUP98-NSD1* signature 陰性群 100 例の中で、予後不良症例の多くで *EVII* 遺伝子が高発現であることを見出した。このことから、*MEL1* と *EVII* の発現に注目した予後予測が可能かを検討した。

3. 研究の方法

日本小児白血病リンパ腫研究グループ (JPLSG)AML05 臨床研究に登録された患者 485 例のうち、診断間違いなどで試験から除外された 42 例、および検体の得られなかった 74 例を除いた AML の初発患者 369 例の検体を用いて、白血病細胞から RNA を抽出した後、cDNA を作成し、*MEL1* 遺伝子および *EVII* 遺伝子の発現量をリアルタイム PCR で測定した。遺伝子発現のコントロールには *ABL1* 遺伝子を使用し、*MEL1/ABL1*、*EVII/ABL1* の値を計測した。

他方、369 例の AML 患者に対して、*KIT*、*KRAS*、*NRAS*、*NPM1*、*WT1* の遺伝子変異解析、および、*FLT3-ITD*、*NUP98-NSD1* 遺伝子再構成、*MLL*-partial tandem duplication (PTD) の遺伝子異常についての解析を行った。得られたデータから、臨床情報や他の遺伝子異常との照合を行い、臨床像との関係を明らかにした。

4. 研究成果

MEL1 と *EVII* および *ABL1* の測定の結果をもとに、*MEL1/ABL1*、*EVII/ABL1* の値を算定し、ROC 曲線を作成したところ、*MEL1/ABL1* では 1.0、*EVII/ABL1* では 3.0 をカットオフ値にするのが最も感度、特異度ともに良好な結果であり、1.0 以上、3.0 以上をそれぞれ高発現と定義した。

*MEL1*高発現例は、369例中84例(22.7%)に認

められた。また、初期リスク別に *MEL1*高発現例の占める割合を検討すると、低リスク群では、わずか3.3%(4/123)なのに対し、中間リスク群では、24%(36/147)、高リスク群では42%(21/50)、寛解導入不能群では47%(23/49)とリスクがあがるにつれ、その頻度は多くみられた。また、 Kaplan-Meier 法による3年生存率の比較では、全生存率(OS)、無病生存率(EFS)それぞれ、(OS: 51% vs. 82%, $P < 0.001$; EFS: 32% vs. 64%, $P < 0.001$) という結果であり、他の遺伝子異常や染色体異常の影響は受けなかった (ただし、*NPM1*変異陽性例だけは例外的に *MEL1*高発現でも予後良好であった) (図3)。*MEL1*高発現は特に、*FLT3-ITD*陽性例の予後層別化に有効で、3年生存率の比較で、(OS: high = 30% vs. low = 70%, $P < 0.001$; 3-year EFS: high = 25% vs. low = 65%, $P < 0.001$)と *MEL1*高発現の *FLT3-ITD*陽性例は予後不良であった(図3)。

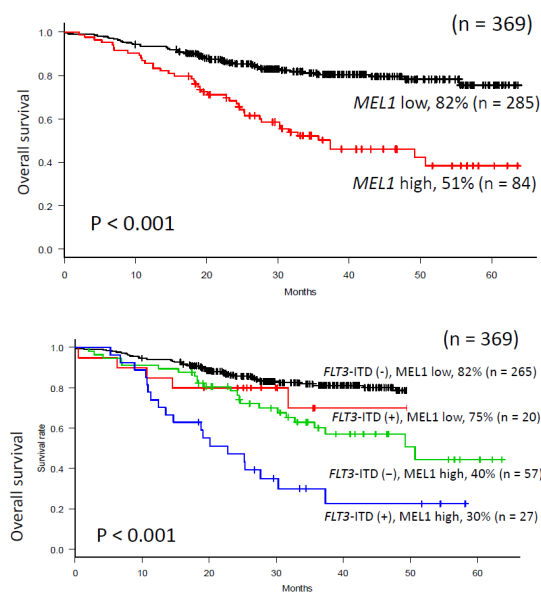


図3

このように *MEL1* 高発現症例は、AML99 研究同様、予後不良な病態をもつ特異な AML のサブグループを形成していた。*MEL1* または *EVII* を高発現している症例は、*MEL1* および *EVII* をともに高発現していない症例に比べ有意に予後が不良であった。*MEL1* 高発現例は、低リスク群にはほとんど認められず、中

間リスクまたは高リスク群に多く同定されていた。一方、369例中58例(16%)に *EVII* の高発現例が認められ、3年全生存割合、無病生存割合がそれぞれ60.3%、39.6%であり、特に再発イベントとの強い関連が認められた。AML-05研究でも、AML99研究同様、*MEL1* 高発現と *EVII* 高発現の間には相互排他的な傾向が認められた。

MEL1 の発現と臨床的な特徴としては、年長時に多く見られる傾向があり、FAB分類のM5と関連が強かった。*MEL1* の発現と他の遺伝子異常を検討したところ、*MEL1* 高発現症例と低発現症例の間には、他の遺伝子異常との間で、大きな相違が見受けられた。*MEL1* 低発現 vs. 高発現：t(8;21), 96% vs. 4%, $p < 0.001$; inv(16), 100% vs. 0%, $p < 0.001$; *MLL*-PTD, 0% vs. 100%, $P < 0.001$; *NUP98-NSD1*, 0% vs. 100%, $P < 0.001$; *KIT*, 88% vs. 12%, $p = 0.005$ 。

また、*MEL1* 高発現症例は、これまで、治療層別化が困難とされていた正常核型(高発現：33/84 [39%] vs. 低発現：37/285 [13%], $P < 0.001$)、および、近年、予後因子としての有用性が見直され始めている *FLT3*-ITD 陽性例において特に有用であった。*FLT3*-ITD 陽性例47例のうち、27例(57%)で *MEL1* が高発現であり、その予後は優位に不良であった。さらに *MEL1* の発現に基づいて、後方視的に移植施行例の検討を行ったところ、*MEL1* 高発現の84例中、寛解に達したのは59例(70%)にとどまり、63例(75%)が造血幹細胞移植を受けているが、生存例は27例(43%)であった。一方、*MEL1* 低発現の285例中、90%は寛解導入に成功しており、112例(39%)が造血幹細胞移植を受け、72名(64%)が生存していた。

Cox 回帰分析を用いた単変量、多変量解析の結果、各遺伝子異常、染色体異常とハザードリスクとの関係は以下の通りであった。

単変量解析の結果、*PRDM16* overexpression (HR = 3.09)、t(8;21) (HR = 0.19)、inv(16) (HR =

0.11)、*KIT* (HR = 0.52)、*FLT3*-ITD (HR = 2.92) *NUP98-NSD1* (HR = 5.07)、*MLL*-PTD (HR = 2.62)が予後に大きな影響をもたらす因子であった。一方、多変量解析では、有意な独立した予後因子として、*PRDM16* overexpression, t(8;21), inv(16), *NPM1*, *FLT3*-ITD が抽出された。これらの中で、予後良好な予後因子として抽出された t(8;21), inv16, *NPM1* に関しては、今回の解析では相互排他的であった。

これまで、正常核型 AML など、既知の予後因子(明確な染色体異常や遺伝子異常)が同定できない症例は、現在のプロトコールでは中間リスク群に層別化されており、この群の再発、原病死亡は大きな課題である。本研究において *MEL1* 遺伝子と *EVII* 遺伝子の発現に注目した予後予測方法は、明確な染色体異常、遺伝子異常を同定できない症例に対しても非常に有効かつ簡便にリアルタイムに行える手法であり、早期に予後不良群を抽出することが可能である。予後不良群に対して、造血幹細胞移植などの強力かつ適切な治療を行うことは、再発症例の予後が極めて不良であることから、救命の可能性が向上するものと考えられた。また、今後、治療中の微小残存病変の検出への応用が期待され、治療効果判定にも有用となる可能性があり、さらなる検討を続けていきたいと考えている。

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](計3件) 査読あり

Jo A, Mitani S, Shiba N, Hayashi Y, Hara Y, Takahashi H, Tsukimoto I, Tawa A, Horibe K, Tomizawa D, Taga T, Adachi S, Yoshida T, Ichikawa H. High expression of *EVII* and *MEL1* is a compelling poor prognostic marker of pediatric AML. *Leukemia*. 2015;29(5):1076-83.doi: 10.1038/leu.2015.5. (査読あり)

柴 徳生、林 泰秀。急性骨髄性白血病における遺伝子異常。日本小児血液・がん学会雑誌 51(5), 397-405, 2014.

<http://search.jamas.or.jp/link/ui/2015111796>

(査読あり)

Matsuo H, Kajihara M, Tomizawa D, Watanabe T, Saito AM, Fujimoto J, Horibe K, Kodama K, Tokumasu M, Itoh H, Nakayama H, Kinoshita A, Taga T, Tawa A, Taki T, Shiba N, Ohki K, Hayashi Y, Yamashita Y, Shimada A, Tanaka S, Adachi S. *EVII* overexpression is a poor prognostic factor in pediatric patients with mixed lineage leukemia-*AF9* rearranged acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2014 Nov;99(11):e225-7. doi: 10.3324/haematol.2014.107128. (査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

— Shiba N, Hara Y, Ohki K, Yamato G, Park MJ, Kobayashi T, Ichikawa H, Tomizawa D, Taki T, Shimada A, Sotomatsu M, Arakawa H, Horibe K, Taga T, Adachi S, Tawa A, Hayashi Y. The prognostic impact of high *EVII*-related genes expression in pediatric acute myeloid leukemia 第 76 回日本血液学会学術集会 2014.10.31-11.2, 大阪。

— Shiba N, Hara Y, Ohki K, Yamato G, Park MJ, Kobayashi T, Ichikawa H, Tomizawa D, Taki T, Shimada A, Sotomatsu M, Arakawa H, Horibe K, Taga T, Adachi S, Tawa A, Hayashi Y. The prognostic impact of *EVII*-associated gene expression in pediatric acute myeloid leukemia 第 56 回日本小児・血液がん学会学術集会 2014.11.28-11.30, 岡山。

— Shiba N, Ohki K, Hara Y, Yamato G, Park MJ, Ichikawa H, Kobayashi T, Tomizawa D, Sotomatsu M, Arakawa H, Horibe K, Taga T, Adachi S, Tawa A, Hayashi Y. The prognostic impact of *MELI* gene expression

in pediatric acute myeloid leukemia. 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology (ASH). Dec 6-9, 2014. San Francisco.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

柴 徳生 (SHIBA, NORIO)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 50600615