

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461431

研究課題名(和文)急性骨髄性白血病の再発における遺伝子異常の解析

研究課題名(英文)Genetic abnormalities in acute myeloid leukemia at relapse

研究代表者

麻生 範雄 (Asou, Norio)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：50175171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：急性骨髄性白血病症例の初発時と再発時における遺伝子異常の解析を行った。AMLにおいて遺伝子変異の頻度が高いNPM1、FLT3、CEBPA、IDH1、IDH2、DNMT3A、WT1およびTP53などの遺伝子変異の有無を検索した。NPM1変異例ではDNMT3A、FLT3、IDH1あるいはIDH2変異との共存を認めることが多かった。初発時と再発時のペア検体において、これらの共存する遺伝子変異が再発時に消失したり、新たに出現する場合は数例に認められた。再発時に新たに獲得した遺伝子変異が初発時に微小なサブクローンとして存在したかどうか、全エクソンシーケンスおよび単一細胞PCR法により解析中である。

研究成果の概要(英文)：Gene mutations in patients with acute myeloid leukemia (AML) at initial diagnosis and relapse were examined. Mutations in the NPM1, FLT3, CEBPA, IDH1, IDH2, DNMT3A, WT1 and TP53 genes, that were frequently identified in AML patients, were mainly analyzed. Most AML patients with NPM1 mutation concomitantly had DNMT3A, FLT3, IDH1 or IDH2 mutation. Some gene mutations were withdrawn and others were acquired at relapse. In pair samples at diagnosis and relapse, it is analyzing whether an acquired gene mutation at relapse presents as a minor subclone at initial diagnosis by using whole exon sequencing and single cell PCR. These sequential molecular studies may yield valuable insights into the mechanism of leukemic recurrence.

研究分野：血液内科学

キーワード：急性骨髄性白血病 再発 遺伝子変異 サブクローン 単一細胞PCR

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 成人の急性骨髄性白血病 (AML) の完全寛解率は 60~80%と改善しているが、長期生存率は 65 歳未満で約 40%、65 歳以上では 10%に満たず、長期予後は依然厳しい疾患である。完全寛解例の 50~70%が再発する現状にあり、予後不良の最大の原因は再発にある。染色体異常と遺伝子異常は最も有効な予後予測因子として最新の WHO 分類にも取り入れられている。たとえば、t(8;21)、inv(16)陽性例は予後良好、3 番、5 番、7 番染色体異常や複雑核型例は予後不良である。また、NPM1 や CEBPA 遺伝子変異例の予後は良好で、FLT3 の重複変異 (ITD) は予後不良とされる。さらに、網羅的な解析により、RNA スプライシングの関連分子や cohesin 複合体の関連分子の異常、以前より知られている TP53、WT1 や AML1 (RUNX1) の異常も普遍的に認められ、予後と相関することが明らかになってきた。AML において平均 5 個の遺伝子異常が共存し、その病態や病型の形成とともにそれぞれ治療反応性に関与していると想定される。

(2) これまでの報告の多くは初発時の検体による解析であり、初発時と再発時の検体を用いた網羅的な遺伝子解析は世界的にも少ない。AML の治療予後を最も左右する再発の分子病態の解明は今日においても重要な課題である。ひとつの遺伝子異常については初発時と再発時のペア検体による解析も行われてきた。NPM1 変異は再発時 5~10%に消失することがあり、FLT3-ITD 変異は再発時に新たに獲得する場合もしばしば認められる。治療抵抗性となって再発してくる症例では初発時にメインクローン以外にマイナーなサブクローンが隠れている可能性が高い。再発時の遺伝子異常を十分に解析し、初発時におけるこのようなサブクローンを同定することは予後予測を可能とし、より適切な治療方針の決定に寄与すると考えられる。

## 2. 研究の目的

成人の急性骨髄性白血病 (AML) 症例において初発時と再発時の検体が得られた症例を対象に以下の研究を行う。初発時と再発時の検体において、AML で遺伝子異常の頻度が比較的高い分子の異常を検索する。これらの解析結果から、再発時に新たに獲得された異常と喪失した異常について以下の解析を行う。再発時に新たに獲得した遺伝子異常については初発時にマイナーなサブクローンとして存在したか否かを詳細な解析により明らかにする。再発時に喪失した遺伝子異常については初発時にはサブクローンであった可能性があるため初発時の異常クローンの割合を検討する。④①~③の結果に基づいて、初発時および再発時の詳細な遺伝子異常を検討して、再発に関わる分子病態を明らかにし、再発モデルを構築して予後予測を確立することを目的とする。再発モデルに応じた治療戦略を立案し、治療成績の向上に寄与することを最終目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では成人急性骨髄性白血病 (AML) において初発時と再発時のペア検体が利用可能な症例を対象に AML で遺伝子異常の頻度が比較的高い分子の異常を通常の PCR 法、単一細胞 PCR 法および全エクソンシーケンシング法により解析する。AML で最も異常の頻度が高い NPM1 に加えて、転写因子では AML1、CEBPA、PU.1 など、チロシンキナーゼ受容体刺激伝達経路では FLT3、KIT、JAK2 など、腫瘍抑制遺伝子では TP53、WT1 など、DNA メチル化関連分子では DNMT3A、TET2、IDH1、IDH2 など、クロマチン修飾分子では EZH2、ASXL1、BCOR、BCORL1 など、cohesin 複合体では SMC1A、SMC3、STAG2、RAD21 など、RNA スプライス関連分子では SRSF2、SF3B1、U2AF1 などの検索を行う。これらの異なる方法による初発時と再発時の遺伝子異常の解析結果を比較検討して再発に関わる分子病態を明らかにする。とくに、

再発時に認める新たな遺伝子異常について、初発時に微少なサブクローンとして存在していないか詳細に検討する。また、再発時喪失する遺伝子異常についても初発時にサブクローンでなかったかどうか検討する。このように、再発時に獲得する異常、喪失する異常について詳細に検討し、共存する複数の遺伝子異常に着目して再発の分子モデルを提唱する。

#### 4. 研究成果

(1) 急性骨髄性白血病症例の初発時と再発時における遺伝子異常の解析を行った。既知の遺伝子変異として、AML において遺伝子変異の頻度が高い遺伝子変異の有無を検索した。NPM1 変異例では DNMT3A、FLT3、IDH1 あるいは IDH2 変異との共存を認めることが多かった。初発時と再発時のペア検体において、これらの共存する遺伝子変異が消失したり、新たに出現する場合は数例に認められた。これらの再発時に新たに獲得した遺伝子変異が初発時に微少なサブクローンとして存在したか、全エクソンシーケンス法および単一細胞 PCR 法を用いて解析中である。また、再発時に消失した遺伝子変異についても初発時にメインクローンとは別のサブクローンではなかったか検討中である。これらの結果をもとに遺伝子レベルの再発モデルを構築して、初発時における再発の予後予測が可能かどうかを検討する臨床応用を計画している。国内外においてそのような臨床研究はまだなく、再発の早期予測により治療戦略を変更することが有用であれば、再発率の減少へつながるものと期待される。

(2) 急性リンパ性白血病症例において数度の再発を繰り返すうちに急性骨髄性白血病へ転化した症例の遺伝子解析を行った。5 回目の再発時に t(6;11)染色体転座を認め、MLL-MLLT4 融合遺伝子が同定された。急性骨髄性白血病への転化時にも MLL-MLLT4 キメラ

遺伝子が確認され、切断点のシーケンス解析も一致し、同一クローンによる転化であることが示された。さらに、初発時にも同融合遺伝子を同定し、染色体では同定できなかったが、初発時にすでに MLL-MLLT4 キメラ遺伝子クローンが存在したことを明らかにした。本例の急性リンパ性白血病から急性骨髄性白血病への形質転化に関わる遺伝子変異について全エクソン解析により検索中である。

(3) 家族性の急性骨髄性白血病の原因となる CEBPA 遺伝子変異の解析を英国のグループとの共同研究によって行った。自施設症例を含む 10 家系 24 例の解析において、N 端の胚細胞変異に加えて C 端の体細胞変異を有する例がほとんどであった。全エクソン解析により、共存する遺伝子変異として、通常の急性骨髄性白血病とは異なり、GATA2 および WT1 遺伝子変異が多いという特徴を認めた。比較的再発の頻度は高いが、家族性 CEBPA 変異例の予後は散発例と比較して有意に良好であった。診断時と再発時の検体の解析により、多くの例で再発時には異なる体細胞変異を認め、診断時のクローンの再発ではなく胚細胞変異に伴う 2 回目の急性骨髄性白血病の新規発症であることが証明された。これらの特徴は急性骨髄性白血病の約 10% を占める散発の CEBPA 変異例の解析にも有用と考えられ、再発の分子モデルとなることが示唆された。

#### 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 12 件)

Togasaki E, Asou N, Nakaseko C, Naoe T. (他 28 名、25 番目) Frequent somatic mutations in epigenetic regulators in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. Blood Cancer J. 2017 Apr 28;7(4):e559. doi: 10.1038/bcj.2017.36. (査読あり)

Ebihara Y, Kobayashi K, Ishida A, Maeda T, Takahashi N, Taji Y, Asou N, Ikebuchi K. Diagnostic performance of procalcitonin, presepsin, and C-reactive protein in patients with hematological malignancies. *J Clin Lab Anal*. 2017 Jan 30. doi: 10.1002/jcla.22147. [Epub ahead of print] (査読あり)

Iriyama N, Asou N, Kawaguchi T. (他11名、13番目) Incidences and outcomes of therapy-related chronic myeloid leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitors: Surveillance of the CML Cooperative Study Group. *Leuk Res*. 2017 Jan 5;54:55-58. doi: 10.1016/j.leukres.2017.01.003. (査読あり)

Yanada M, Asou N, Kanda Y. (他16名、11番目) Unrelated bone marrow transplantation or immediate umbilical cord blood transplantation for patients with acute myeloid leukemia in first complete remission. *Eur J Haematol* 2016 Sep;97(3):278-287. doi: 10.1111/ejh.12723. (査読あり)

Higuchi Y, Tokunaga K, Watanabe Y, Kawakita T, Harada N, Yamaguchi S, Nosaka K, Mitsuya H, Asou N. Lineage switch with t(6;11)(q27;q23) from T-cell lymphoblastic lymphoma to acute monoblastic leukemia at relapse. *Cancer Genet* 2016 Jun;209(6):267-71. doi: 10.1016/j.cancergen.2016.05.070. (査読あり)

Ogura M, Imaizumi Y, Uike N, Asou N, Utsunomiya A, Uchida T, Aoki T, Tsukasaki K, Taguchi J, Choi I, Maruyama D, Nosaka K, Chen N, Midorikawa S, Ohtsu T, Tobinai K. Lenalidomide in relapsed

adult T-cell leukaemia-lymphoma or peripheral T-cell lymphoma (ATLL-001): a phase 1, multicentre, dose-escalation study. *Lancet Haematol* 2016 Mar;3(3):e107-18. doi: 10.1016/S2352-3026(15)00284-7. (査読あり)

Kawai N, Matsuda A, Jinnai I, Ichimura T, Kayano H, Okamura D, Ishikawa M, Maeda T, Hata T, Miyazaki Y, Asou N, Bessho M, Tomonaga M. Proposal of criteria for dyserythropoiesis in the diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol* 2016 Feb;103(2):227-33. doi: 10.1007/s12185-015-1916-8. (査読あり)

Tawana K, Asou N, Uike N, Fitzgibbon J. (他37名、12番目) Disease evolution and outcomes in familial AML with germline CEBPA mutations. *Blood* 2015 Sep;126(10):1214-1223. DOI 10.1182/blood-2015-05-647172. (査読あり)

Shinagawa K, Yanada M, Sakura T, Ueda Y, Sawa M, Miyatake J, Dobashi N, Kojima M, Hatta Y, Emi N, Tamaki S, Gomyo H, Yamazaki E, Fujimaki K, Asou N, Matsuo K, Ohtake S, Miyazaki Y, Ohnishi K, Kobayashi Y, Naoe T. Tamibarotene as maintenance therapy for acute promyelocytic leukemia: Results from a randomized controlled trial. *J Clin Oncol* 2014;32(33):3729-35. doi: 10.1200/JCO.2013.53.3570. (査読あり)

Okamura D, Matsuda A, Ishikawa M, Maeda T, Tanae K, Kohri M, Takahashi N, Kawai N, Asou N, Bessho M. Hematologic improvements in a myelodysplastic syndromes with myelofibrosis (MDS-F) patient treated with azacitidine. *Leuk Res Rep* 2014;3(1):24-7. doi:

10.1016/j.lrr.2014.03.002. (査読あり)  
Kihara R, Asou N, Naoe T. (他30名、8番  
目) Comprehensive analysis of genetic  
alterations and their prognostic  
impacts in adult acute myeloid leukemia  
patients. *Leukemia*  
2014;28(8):1586-1595. doi:  
10.1038/leu.2014.55. (査読あり)  
Yamaguchi S, Iwanaga E, Tokunaga K,  
Nanri T, Shimomura T, Suzushima H,  
Mitsuya H, Asou N. IDH1 and IDH2  
mutations confer an adverse effect in  
patients with acute myeloid leukemia  
lacking the NPM1 mutation. *Eur J*  
*Haematol* 2014;92(6):471-477. doi:  
10.1111/ejh.12271. (査読あり)

[学会発表](計 12 件)

南谷泰仁、吉田健一、片岡圭亮、永田安  
伸、吉里哲一、木口亨、土橋史明、白杵  
憲祐、直江知樹、清井仁、千葉滋、麻生  
範雄、宮崎泰司、田中洋子、千葉健一、  
白石友一、宮野悟、小川誠司. Landscape  
of MDS genomes as revealed by whole  
genome sequencing. 第78回日本血液学  
会学術集会、一般口演、2016年10月13日、  
パシフィコ横浜、(神奈川県・横浜市)  
木村由起子、徳永賢治、松野直史、麻生  
範雄、川口辰哉、岩永栄作. 3' UTR  
methylation of the *CEBPA* gene in acute  
myeloid leukemia. 第78回日本血液学会  
学術集会、ポスター発表、2016年10月14  
日、パシフィコ横浜、(神奈川県・横浜市)  
佐伯豪士、岡村大輔、石川真穂、前田智也、  
川井信孝、松田晃、麻生範雄. APL  
harboring the *PML-RARA* fusion gene  
detected by RT-PCR, which was negative  
by FISH analysis. 第78回日本血液学会  
学術集会、ポスター発表、2016年10月14  
日、パシフィコ横浜、(神奈川県・横浜市)  
麻生範雄、AMLの層別化治療、第78回日本

血液学会学術集会、教育講演、2016年10  
月13日、パシフィコ横浜、(神奈川県・横  
浜市)

Takeda J, Yoshida K, Makishima H,  
Yoshizato T, Shiozawa Y, Shiraishi Y,  
Okuno Y, Kon A, Nagata Y, Kataoka K,  
Chiba K, Tanaka H, Sanada M,  
Sakata-Yanagimoto M, Obara N, Nakamaki  
T, Ishiyama K, Haigaishi A, Chiba S,  
Mori H, Asou N, Kiyoi H, Hirase C, Imai  
K, Dobashi N, Kiguchi T, Miyazaki Y,  
Naoe T, Miyano S, Usuki K, Miyawaki S,  
Kamatani Y, Momozawa Y, Kubo M,  
Polprasert C, Maciejewski JP, Ogawa S. Genetic Predispositions to Myeloid  
Neoplasms Caused By Germline DDX41  
Mutations. 57<sup>th</sup> ASH Annual Meeting &  
Exposition 5-8 Dec 2015 Orlando,  
U.S.A.、(オランダ・米国)

Kamijo R, Itonaga H, Kihara R, Nagata  
Y, Hata T, Asou N, Ohatake S, Ogawa S,  
Naoe T, Kiyoi H, Miyazaki Y. Relationship between morphological  
features and gene mutations in de novo  
AML. (oral) The 77<sup>th</sup> Annual Meeting of  
the Japanese Society of Hematology,  
President Nakao S. October 16-18, 2015,  
Ishikawa Ongakudo, (石川県金沢市)

Ishikawa M, Okamura D, Maeda T, Kawai  
N, Matsuda A, Minauchi K, Imai K, Asou  
N. Successful treatment with dasatinib  
and chemotherapy for an ALL harboring  
a rare e14a3 *BCR-ABL*. (oral) The 77<sup>th</sup>  
Annual Meeting of the Japanese Society  
of Hematology, President Nakao S.  
October 16-18, 2015, Ishikawa Ongakudo,  
(石川県金沢市)

Maeda T, Matsuda A, Okamura D, Ishikawa  
M, Kohri M, Takahashi N, Niitsu N,  
Kawai N, Asou N, Bessho M. WT1 mRNA

levels in peripheral blood may be a predictive marker on response to azacitidine in MDS. (oral) The 77<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, President Nakao S. October 16-18, 2015, Ishikawa Ongakudo, (石川県金沢市)

Kawai N, Matsuda A, Jinnai I, Ichimura T, Kayano H, Okamura D, Ishikawa M, Maeda T, Hata T, Miyazaki Y, Asou N, Bessho M, Tomonaga M. Morphologic analysis to create suitable criteris for dyserythropoiesis in the diagnosis of myelodysplastic syndromes. The 6<sup>th</sup> JSH International Symposium 2015, Preisident Ohyashiki K. May 22 and 23 2015, Karuizawa、軽井沢プリンスホテルウエスト (長野県北佐久郡軽井沢町)

Maeda T, Matsuda A, Okamura D, Ishikawa M, Kohri M, Takahashi N, Niitsu N, Kawai N, Asou N, Bessho M. Predicitive impact of baseline WT1 mRNA expression level in peripheral blood on response to azacitidine in MDS patients. The 6<sup>th</sup> JSH International Symposium 2015, Preisident Ohyashiki K. May 22 and 23 2015, Karuizawa、軽井沢プリンスホテルウエスト (長野県北佐久郡軽井沢町)

Adachi M, Takeshita A, Taki T, Ohtake S, Shinagawa K, Kiyoi H, Matsuda M, Takahashi M, Emi N, Kobayashi Y, Miyamura K, Fujita H, Sakura T, Iwanaga M, Usui N, Miyawaki S, Asou N, Ohnishi K, Miyazaki Y, Naoe T. Prognostic Impact of Chromosomal Variation in Patients with Acute Promyelocytic Leukemia (APL); Analysis of 775 Cases Enrolled in the Japan Adult Leukemia Study Group APL Studies. 56<sup>th</sup> ASH Annual

Meeting and Exposition. Moscone Center, 6-9 Dec 2014、サンフランシスコ (米国)  
Tokunaga K, Yamaguchi S, Shimomura T, Suzushima H, Mitsuya H, Asou N. Alterations of TP53, CREBBP and EED genes in adult patients with acute lymphoblastic leukemia. The 76<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. 31.10- 2.11.2014 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)

〔図書〕(計 1 件)

Asou N. Retinoic acid, all-trans retinoic acid (ATRA), and tamibarotene. Differentiating agents. Chemotherapy for leukemia. Novel drugs and treatment. Edited by Ueda T. Springer Nature Singapore Pte Ltd. ISBN 978-981-10-3330-8. DOI 10.1007/978-981-10-3332-2. 2017;183-211.

〔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

麻生 範雄 (ASOU, Norio)

埼玉医科大学・医学部・教授、研究者番号：  
50175171

(2) 研究分担者

なし。

(3) 連携研究者

なし。

(4) 研究協力者

三島 眞代 (MISHIMA, Masayo)

藤波 美紀 (FUJINAMI, Miki)