

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26713037

研究課題名(和文) 小児難治性白血病を対象としたDNA・RNAの包括的構造解析

研究課題名(英文) Integrative analysis of DNA and RNA structural analysis in refractory leukemia in children

研究代表者

加藤 元博 (Kato, Motohiro)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・小児血液・腫瘍研究部・医長

研究者番号：40708690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,200,000円

研究成果の概要(和文)：全エクソーム解析や全トランスクリプトーム解析などを通じ、小児造血器腫瘍の発症や臨床経過の基盤になる分子遺伝学的異常の探索を行った。

小児急性リンパ性白血病においては、短縮した維持療法下での予後因子となるゲノムの構造異常を特定し、維持療法の最適化につながる成果を得た。また、非寛解白血病の解析を通じ、NUP214-ABL1転座が偽陰性となる機序を特定し、加えて、若年性骨髄単球性白血病の解析からはKRAS変異アレルの倍加により急性転化が生じることを報告した。さらに、T細胞性急性リンパ性白血病のRNA構造解析を通じ、転写因子SPI1の転座が病態に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We investigated molecular biology underlying development of pediatric leukemia, through whole exome sequencing and whole transcriptome sequencing.

In acute lymphoblastic leukemia in children, using intron capture analysis, we identified translocations which predicted clinical outcome under short maintenance therapy, which could contribute to optimization of therapy duration. Furthermore, we reported mechanisms in false-negative in FISH analysis for NUP214-ABL1 fusion in refractory leukemia, and we also reported that duplication of mutant KRAS by gain of chromosome 12 caused blastic crisis of Juvenile myelomonocytic leukemia. Additionally, via transcriptome sequencing, we identified a novel fusion including SPI1, a transcription factor, in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia.

研究分野：小児血液・腫瘍学

キーワード：癌 小児白血病 分子遺伝学

1. 研究開始当初の背景

白血病は小児期に発症する悪性腫瘍の中で最多の造血器腫瘍である。小児白血病の治療成績は飛躍的な改善が得られ、約 80%の患児で長期生存が得られるようになった。しかし、従来の化学療法の強化はほぼ飽和し、現在の多剤併用化学療法を以てしても難治な白血病（初期反応不良例、乳児例、年長例、再発例など）の長期生存率をさらに向上させるためには、新たな治療戦略の構築が必要と考えられている。

2. 研究の目的

進歩したゲノム解析技術を用いた造血器腫瘍の病態解明は国内外でも広く行われている。特に革新的なゲノム解析技術である次世代シーケンサーは、これまでのゲノム解析技術をはるかに上回る効率と検出力を持つため、その発症の基盤となるゲノム異常の全貌を明らかにする試みが報告されるようになった。

しかし、これらの成果は疾患全体の病態の理解には大きく貢献しているが、治療成績の実際的な改善につながるような知見はまだ得られていない。そこで本研究では、現在の治療では十分な長期生存率を得ることが困難な難治性の小児白血病に特に重点をおき、次世代シーケンサーを軸とした包括的なゲノム解析技術を用い、白血病の病態と動態について詳細な検討を行うことを計画した。

3. 研究の方法

(1) 小児白血病を対象として、次世代シーケンサーを用いた包括的な DNA・RNA 構造の異常を検出し、同時に変異解析を行う。治療成績の改善につながる知見により効率的に到達するために、これまでの臨床試験によって難治性と認識されている集団に特に重点をおいて詳細な解析を行う。

(2) 次世代シーケンサーの特性を生かし、白血病細胞に生じた変異を細胞に特徴的な指紋(finger print)ととらえれば、ごく微小な白血病細胞の存在を検出することが可能である。この技術を用いて、診断時と再発時の検体を含んだ複数の検体も含めて得られている症例を対象として、白血病の診断から再発までの kinetics を把握する。

4. 研究成果

(1) 短期維持療法下での予後を規定する分子遺伝学的異常の探索

小児急性リンパ性白血病(ALL)の治療の最後の相である維持療法は長期にわたり、治療強度そのものは強くないものの、感染症や二次がんなど、様々な合併症と関連することが認識されるようになり、維持療法の最適化につながる知見が求められていた。

東京小児がん研究グループ(TCCSG) L92-13 研究に登録された患者 347 人を対象に臨床経

過を再整理し、かつ骨髄塗抹標本から抽出した DNA を試料とし、転座遺伝子の検出を目的として intron を特異的に抽出し、次世代シーケンサーで配列解析を行った。

その結果、図 1 のように、分子遺伝学的な特性が短期維持療法下での予後に強く関連していることが示された。TCF3-PBX1 陽性 ALL や ETV6-RUNX1 陽性 ALL は維持療法を短縮しても予後良好な表現型が維持される一方で、高二倍体 ALL は維持療法を短縮することで再発率が高くなることが明らかになった。

これらの成果は、小児 ALL における維持療法期間の最適化だけでなく、維持療法の分子生物学的意義の解明につながるものと考えられる(Kato M et al. Leukemia 2017)。

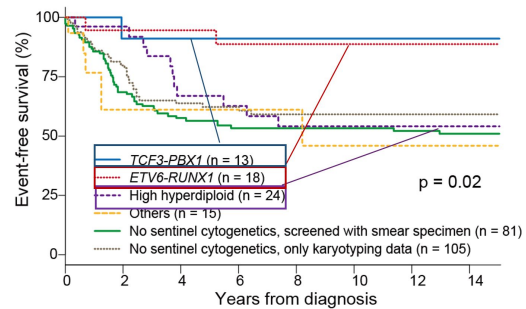


図 1. 短期維持療法における分子遺伝学的サブグループと予後の関係

(2) 治療不応白血病の背景にあるキナーゼ融合遺伝子の検出

寛解導入療法後に寛解が得られなかった小児 ALL 例のゲノム解析を行い、高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いたコピー数解析から NUP214-ABL1 融合遺伝子の存在が示唆され、PCR にて確認した。

ABL1 の融合遺伝子を持つ症例はチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)により治療効果が期待できることからその特定が重要であると認識されているが、スクリーニングには FISH 法が有用であると考えられている。しかし、NUP214 と ABL1 は染色体上の位置が近いことから重複による融合遺伝子の症例においては、FISH では偽陰性となることを示した(図 2)。TKI 治療の対象症例を漏らさずに検出するためには、FISH 法のみでは不十分であると考えられた(Tsujimoto S et al. J Pediatr Hematol Oncol 2017)。

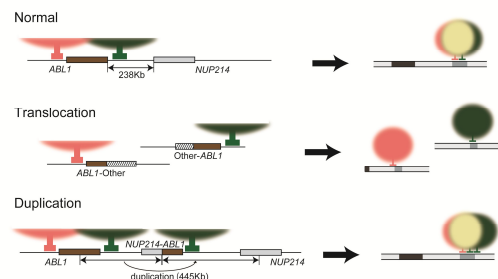


図 2. NUP214-ABL1 融合遺伝子が FISH 法では偽陰性となる機序

(3) T 細胞性 ALL にみられる新規融合遺伝子の探索

T 細胞性 ALL は小児 ALL のなかでも予後不良な病型であるが、その分子病態や予後因子の探索は不十分である。

そこで、小児 T-ALL の 123 例を対象として exome 解析に加え、RNA の包括的な構造解析を行った。その結果、STMN1-SPI1 融合遺伝子や TCF7-SPI1 融合遺伝子など、これまでに同定されていなかった SPI1 の再構成を全症例の 4% にみとめた。SPI1 の高発現が T 細胞性 ALL の発症につながる分子基盤であることを明らかにした。

さらに、陽性例の予後は陰性例に比べて有意に不良であり ($p < 0.01$)、予後因子として応用可能であると考えられた (Seki M et al. Annual meeting of the American Society of Hematology, 2016)。

(4) 若年性骨髄単球性白血病の急性転化の分子基盤

若年性骨髄単球性白血病 (JMML) は、RAS 経路の活性化を特徴とする小児に特有の骨髄増殖性疾患である。一般に緩徐に進行するが、一部の症例で急速に増悪し予後不良となる急性転化をきたすことが報告されている。しかし、その分子基盤はまた十分には明らかになっていなかった。

急性転化した JMML 症例の DNA 構造異常を急性転化前と比較した結果、12 番染色体の増加が生じており、KRAS 変異のアレルが倍加することで悪性形質の顕在化をもたらしたことを示した。JMML の病態に RAS 経路が重要であることをさらに確認し、経路の阻害が治療標的となりうることを示唆する成果と考えられる。(Osumi T et al. *Pediatr Blood Cancer* 2017)。

(5) 急性リンパ性白血病に併発したランゲルハンス細胞組織球症のクローン変化

小児白血病の予後予測因子による層別化治療の精度をより向上させるために、従来の形態的な残存病変の検出手法に比べ鋭敏な微小微量残存病変 (miRD) の測定系を確立した。まず、仮想的な腫瘍細胞で希釈系列を作成し、一塩基多型を標的とし次世代シーケンサーで検出感度の検証を行ったところ、 10^{-3} ~ 10^{-4} の感度で定量的な検出が可能であった。

この検出系を用いて、実際に急性リンパ性白血病の治療経過中にランゲルハンス細胞組織球症 (LCH) を発症した症例について、治療中の miRD を測定し、ALL と LCH の腫瘍細胞の動的な推移を把握することが可能であった。

ALL 細胞と LCH 細胞は共通のクローンを起源としつつ、それぞれに特異的な変異を獲得して ALL および LCH を発症していたことが明らかになった (図 3、Kato M et al. *Br J Haematol* 2016)。

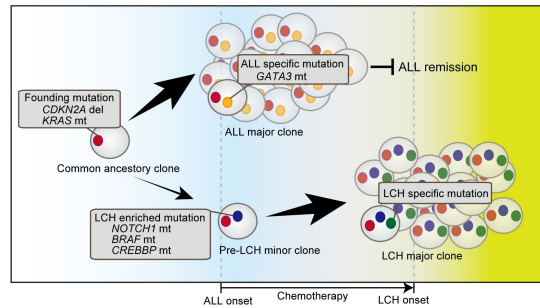


図 3. ALL に合併した LCH のクローン変化

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 7 件)

Kato M, Ishimaru S, Seki M, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, Kakiuchi N, Sato Y, Ueno H, Tanaka H, Inukai T, Tomizawa D, Hasegawa D, Osumi T, Arakawa Y, Aoki T, Okuya M, Kaizu K, Kato K, Taneyama Y, Goto H, Taki T, Takagi M, Sanada M, Koh K, Takita J, Miyano S, Ogawa S, Ohara A, Tsuchida M, Manabe A. Long-term Outcome of Six-Month Maintenance Chemotherapy for Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *Leukemia* 31:580-584, 2017

Kato M, Yamashita T, Suzuki R, Matsumoto K, Nishimori H, Takahashi S, Iwato K, Nakaseko C, Kondo T, Imada K, Kimura F, Ichinohe T, Hashii Y, Kato K, Atsuta Y, Taniguchi S, Fukuda T. Donor cell-derived hematologic malignancy: a survey by the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Leukemia* 30: 1742-5, 2016

Kato M, Seki M, Yoshida K, Sato Y, Oyama R, Arakawa Y, Kishimoto H, Taki T, Akiyama M, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Mitsuiki N, Kajiwarra M, Mizutani S, Sanada M, Miyano S, Ogawa S, Koh K, Takita J. Genomic analysis of clonal origin of Langerhans cell histiocytosis following acute lymphoblastic leukemia. *Br J Haematol* 175:169-72, 2016

Osumi T, Kato M, Ouchi-Uchiyama M, Tomizawa D, Kataoka K, Fujii Y, Seki M, Takita J, Ogawa S, Uchiyama T, Ohki K, Kiyokawa N. Blastic Transformation of Juvenile Myelomonocytic Leukaemia Caused by Duplication of Oncogenic KRAS. *Ped Blood Cancer* 2017 Feb 27 [Epub ahead of print]

Tsujimoto S, Nakano Y, Osumi T, Okada K, Ouchi-Uchiyama M, Kataoka K, Fujii Y, Ohki K, Seki M, Tamagawa N, Takita

J, Ogawa S, Kiyokawa N, Hara J, Kato M. A cryptic NUP214-ABL1 fusion in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. J Pediatr Hematol Oncol [in press]

Hirabayashi S, Seki M, Hasegawa D, Kato M, Hyakuna N, Shuo T, Kimura S, Yoshida K, Kataoka K, Fujii Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Kiyokawa N, Miyano S, Ogawa S, Takita J, Manabe A. Constitutional abnormalities of IDH1 combined with secondary mutations predispose a patient with Maffucci syndrome to acute lymphoblastic leukemia. Pediatr Blood Cancer [in press]

Oshima K, Khiabani H, da Silva-Almeida AC, Tzoneva G, Abate F, Ambesi-Impombato A, Sanchez-Martin M, Carpenter Z, Penson A, Perez-Garcia A, Eckert C, Nicolas C, Balbin M, Sulis ML, Kato M, Koh K, Paganin M, Basso G, Gastier-Foster JM, Devidas M, Loh ML, Kirschner-Schwabe R, Palomero T, Rabadan R, Ferrando AA. Mutational landscape, clonal evolution patterns and role of RAS mutations in relapsed acute lymphoblastic leukemia Proc Natl Acad Sci 113:11306-11, 2016

〔学会発表〕(計 2 件)

○ Seki M, (中略), Kato M et al. Identifications of fatal SPI1 fusions and highly aggressive phenotype with SPI1 overexpression in pediatric T cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. The 58th Annual Meeting of the American Society of Hematology. Dec 5 2016 (San Diego)

○ Kato M, et al. Long-term outcome of short maintenance therapy. The 27th meeting of the international BFM study group. April 23 2016 (Athene)

〔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〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 元博 (KATO, Motohiro)

国立成育医療研究センター・小児がんセンター・医長

研究者番号：40708690

(2)連携研究者

小川 誠司 (Ogawa, Seishi)
京都大学・腫瘍生物学・教授
研究者番号：60292900

滝田 順子 (TAKITA, Junko)
東京大学・小児科・准教授
研究者番号：00359621

(4)研究協力者

関 正史 (SEKI, Masafumi)