

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860794

研究課題名(和文) 若年性骨髄単球性白血病の急性転化における分子遺伝学的機構の解明

研究課題名(英文) Genetic analysis of blast crisis in juvenile myelomonocytic leukemia

研究代表者

奥野 友介 (Okuno, Yusuke)

名古屋大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：00725533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

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、稀少疾患ではあるが長期生存率が50%前後の予後不良な疾患である。同種造血幹細胞移植が唯一の根治的治療法であるが、同治療を行なったとしても予後は依然として厳しい。死因の1つに急性転化(blast crisis)が挙げられるが、この分子遺伝学的機構は明らかではない。本研究においては、全エクソーム解析を軸として3例のJMMLの急性転化例を解析した。各症例において、疾患を進展させる病的遺伝子変異(NRASヘテロ接合性消失、人白血球抗原消失、IGH-MYC遺伝子等)の獲得を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) is an intractable hematological disease of childhood. Despite the treatment with hematopoietic stem cell transplantation, the prognosis is poor. Among the cause of death is a blast crisis, of which molecular pathogenesis still remains to be elucidated. In this study, we performed a comprehensive genetic analysis including whole-exome sequencing in three patients with JMML. In a patient whose JMML progressed to a sarcoma, we identified a uniparental disomy event in NRAS, resulting in homozygous activating mutation. In another patient who developed a mature B-cell leukemia, we identified an acquisition of pathogenic IGH-MYC gene fusion. In the other patient who developed B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, however, we did not identify any acquired genetic lesions.

研究分野：小児科学

キーワード：若年性骨髄単球性白血病 次世代シーケンサー 全エクソーム解析 急性転化

1. 研究開始当初の背景

(1) 若年性骨髄単球性白血病 (Juvenile myelomonocytic leukemia; JMML) は、骨髄系細胞の異常増殖をみる、稀な小児特有の白血病である。わが国の年間発症数は 20 例に満たないが、長期生存率は 50% 前後にとどまっており、予後不良な疾患である。同種造血幹細胞移植が唯一の根治的治療として行われているが、再発等の問題があり、その予後は依然として不良である。

(2) JMML の診断には、遺伝子解析・コロニーアッセイといった、特殊な診断技術を必要とすることから、日本小児血液・がん学会では中央診断施設を指定し、会員の便宜を図っている。申請者の所属する名古屋大学小児科は 10 年以上にわたって中央診断施設の役割を果たしており、これまでに 100 例に及ぶ臨床情報や血液検体が蓄積されている。

(3) 我々は、これまで、JMML の原因遺伝子の追究を継続的に行っており、その病態解明に貢献してきた (Blood 1994; 2248, Blood 2005; 2183, Blood 2010; 1969)。これらの研究成果等により、JMML においては、RAS 経路に属する *NRAS*, *KRAS*, *PTPN11*, *CBL*, *NF1* 遺伝子の変異が関与することが明らかになったが、20% の患児においては、原因遺伝子は不明であった。

(4) 近年、我々は、次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析に基づく、網羅的な遺伝子解析を行い、*SETBP1*, *JAK3* という、新たな変異の標的遺伝子の発見を含む成果を発表した (Okuno Y (as co-first author) et al, Nature Genetics 2013; 937)。

(5) 一部の JMML 患児においては、フィラデルフィア染色体陽性慢性骨髄性白血病 (CML) と同様に、急性転化の病態がみられる。これまで、JMML の急性転化を対象にした分子生物学的検討は報告されていない。他の白血病における研究結果から推察すると、慢性期にある白血病細胞に新たな遺伝子変異 (ドライバー変異) が加わり、clonal evolution が起こったものと考えられる (Nature 2012; 506)。

(6) JMML は造血幹細胞に近い性質を持つ細胞の白血化であると考えられており、急性転化も多様である。例えば、急性転化により、急性骨髄性白血病を発症する例、急性リンパ性白血病を発症する例、あるいは軟部肉腫を形成する例などが観察される。新たな分子異常を伴って発症することが推察され、分子標的の存在も示唆されるものの、これらの急性転化例について、効果が明らかとなっている治療法は確立されていない。

(7) 急性転化の時点で、新たな病的変異の獲得があることを示せば、JMML の急性転化という病態が確実に存在することの証拠となる。病的変異が急性転化以前より存在していれば、将来的に急性転化を起こすことのバイオマーカーとなる可能性がある。臨床的な予後と相関する標的遺伝子があれば、診断的な意義がある。また、薬物反応性を変えうる変異、例えば分子標的薬のターゲットとなる変異が見つかれば、この研究が、JMML の新たな治療への直接的な架け橋となる。

(8) 学術的な特色・独創的な点は、JMML という、まれではあるが予後の悪い疾患の、まだ世界的にも研究の報告がない、急性転化という病態を解析する点にある。当研究室には、これが可能となるような、JMML の検体と臨床情報の集積がある。表に示すように、急性転化時の検体もすでに 4 症例分を有している。加えて、初診時を中心とした 100 例に及ぶ検体がある。遺伝学的な解析や、細胞生物学的な解析の環境も整っており、研究を開始するための準備は万全である。

2. 研究の目的

(1) 今回の研究の目的は、JMML における病態の進展、特に急性転化の分子遺伝学的機構を解明することである。主として初診時の遺伝学的機構を解析した、前回の研究の発展と位置付けられる。

(2) 疾患の進展における新たな遺伝子変異の獲得を解析することで、さらなる分子病態の解明や、分子標的の発見に貢献するものと期待される。JMML における病態の進展の中で、急性転化は特に予後不良の病態であり、この分子遺伝学的機構を解明することは治療成績改善のために重要である。

3. 研究の方法

(1) 研究期間内に、全エクソーム解析を軸として、急性転化時に獲得された新たな病的遺伝子変異を同定する。検出された変異を持つ白血病細胞の発生時期など、clonal evolution を決定する。変異が見つかった遺伝子について、当研究室が有する JMML 検体全体を探索する。同定された変異と臨床的な予後の相関を解析する。治療における意義が考えられる変異については、細胞株・臨床検体を用いた機能解析を行う。

(2) 全エクソーム解析
体細胞変異だけを検出するため、同一患者より得られた、急性転化時の腫瘍検体と、正常検体をペアとして全エクソーム解析を行う。正常検体としては、皮膚検体か、血液より培養した CD3⁺細胞を用いる。次世代シーケンサーはイルミナ社の HiSeq 2500 を使用し、

全エクソンキャプチャーにはアジレント社の SureSelect Human All Exon v4 キットを用いる。東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターのスーパーコンピュータ上に in-house で構築された解析パイプライン (Genomon-exome,

<http://genomon.hgc.jp/exome/>)を用いて、体細胞変異を検出する。全エクソーム解析のデータから、染色体領域のコピー数変化を解析することができる (Nat Genet 2013; 937)。これも利用して、解析の網羅性を高める。これらの解析によって、次の段階で検討すべきターゲットの遺伝子を決定する。すでに所持する4例に加えて、新たに急性転化を来した症例を収集し、10例の解析を目指す。希少な疾患であり、10例に届かない可能性は考えられるが、仮に4例のみの解析であっても、以下の検討を進められないわけではない。

(3) ディープシーケンス解析

ディープシーケンス解析は、次世代シーケンサーを用いて、目的領域だけを非常に多い回数(1,000回以上)読み取る方法である。対象領域をPCRにて増幅し、次世代シーケンサーにて読み取る。全エクソーム解析の感度では検出できない変異を検出でき、腫瘍サンプル内における、変異アレルの正確な頻度を決定できる。急性転化時点で検出された変異を、過去のタイムポイントでディープシーケンス解析することにより、腫瘍クローンの発生時点や拡大の仕方、すなわち clonal evolution を描出できる。急性転化していないサンプル約100例においても、急性転化したサンプルと同様の遺伝子変異を有したクローンがわずかに存在する可能性があり、解析の対象とする。

(4) 検出した変異の意義付け

近年、さまざまな腫瘍性疾患における、大規模な遺伝子解析がなされており、体細胞変異に関する知識は爆発的に増加している。今回の研究において検出される変異の多くは、他の腫瘍性疾患で報告されているものであると予想される。Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC)は、体細胞変異の報告を整理したデータベースであり、これを基に検討する。可能な範囲で文献検索も行い、情報の取りこぼしがないようにする。

(5) 機能解析

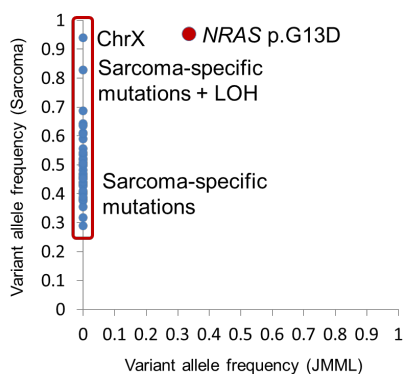
検出された体細胞変異のうち、機能解析の報告がないものを対象に機能解析を行う。もしも、抗癌剤や分子標的薬への治療反応性に影響する遺伝子に変異が見つかった場合は、それを優先して解析する。当研究室ではルーチンに、細胞株や臨床検体由来細胞の機能解析を行っている。

4. 研究成果

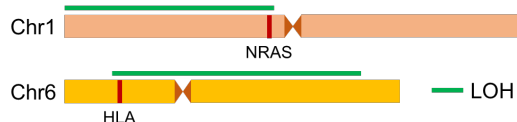
3例のJMML急性転化例について、全エクソーム解析、ヘテロ接合性消失、融合遺伝子等を対象とした、網羅的に完了することができた。JMML発症後に肉腫形成へと進展した1例では、JMMLの原因遺伝子変異であるNRAS p.G13D変異が uniparental disomy によるヘテロ接合性消失を起こし、機能獲得変異がホモ接合となっていること、さらには6番染色体短腕に存在するヒト白血球抗原 (HLA)の片アレルが失われ、免疫学的な攻撃を回避していることが確認された(図1)。

図1 NRASとHLAのヘテロ接合性消失

(A) Somatic mutations.



(B) Loss of heterozygosity.



JMML発症後に成熟B細胞性白血病を来した1例では、IGH-MYC融合遺伝子が形成されており、JMMLを素地として、de novoの成熟B細胞性白血病と同じ病的変異が獲得されていることが明らかになった(図2)。形態学的にリンパ芽球様の細胞が増生した急性転化時点における体細胞変異の解析では、初診時に認められたNRAS p.G13D変異に加えて、MLL2 p.R5021Xドライバー変異と、多数のパスセンジャー変異が獲得されていることが明らかになった。急性転化後の核型から予想される融合遺伝子として、IGH-MYC融合遺伝子をFluorescence in situ hybridization法にて同定した。興味深いことに、急性転化後には、初診時にマイナークローンとして観察されたSETBP1 p.D868N変異が消失していた。SETBP1変異は、血液悪性疾患の中でも主に骨髄性腫瘍に認められ、リンパ系腫瘍にはほとんど観察されない。リンパ系腫瘍への急性転化には、SETBP1変異は不利に働いた可能性が考えられる。

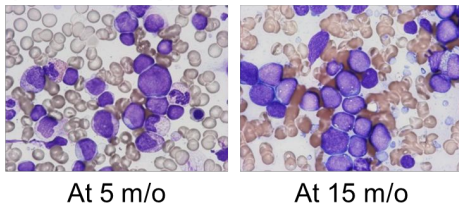
上記2例では急性転化に伴って獲得された遺伝子変異を明らかにすることができたが、JMML発症後にB前駆細胞性急性リンパ性

白血病を来した1例では、新たな遺伝子変異の獲得を検出することはできなかった(図3)。

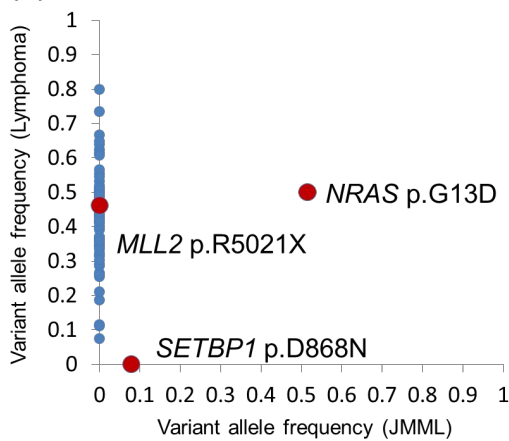
他の疾患と共通の分子機序を含めた、様々な遺伝子変異の獲得が、JMMLの急性転化を引き起こしていることが明らかとなった。急性転化を来した症例の予後は非常に不良であるが、急性転化の時点において遺伝子解析を行い、分子標的治療の対象となりうる変異を検出すること、あるいは治療に示唆を与える変異を同定することが、予後の改善に貢献する可能性がある。例えば、*IGH-MYC* 融合遺伝子を獲得した例では、通常の成熟B細胞白血病に準じた治療が奏功する可能性がある。さらに症例数を増加させ、これらの可能性の検討を進めることが必要であると考えられる。

図2 成熟B細胞白血病への進展

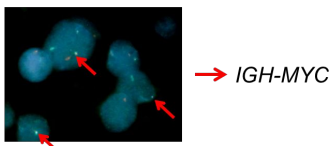
(A) Morphology.



(B) Somatic mutations.



(C) FISH analysis.



(D) Clonal evolution.

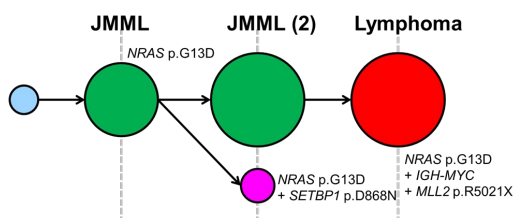
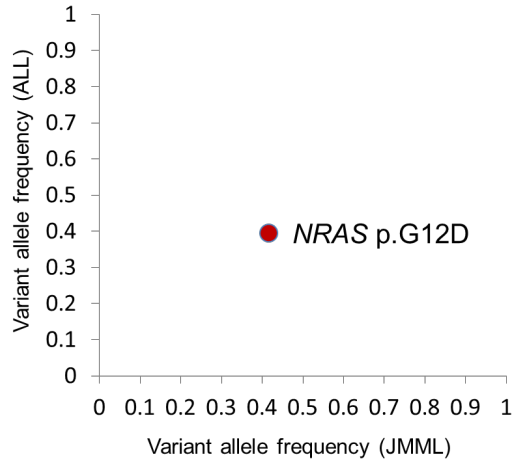


図3 急性転化前後における体細胞変異



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 1 件)

Sakaguchi H, Muramatsu H, Okuno Y, Makishima H, Xu Y, Furukawa-Hibi Y, Wang X, Narita A, Yoshida K, Shiraishi Y, Doisaki S, Yoshida N, Hama A, Takahashi Y, Yamada K, Miyano S, Ogawa S, Maciejewski JP, Kojima S. Aberrant DNA Methylation Is Associated with a Poor Outcome in Juvenile Myelomonocytic Leukemia. PLoS One. 2015 Dec 31;10(12):e0145394 (査読あり)

[学会発表](計 1 件)

Comprehensive genetic analysis of blast crisis in juvenile myelomonocytic leukemia. Nozomu Kawashima, Yusuke Okuno, Hideki Muramatsu, Xinan Wang, Atsushi Narita, Sayoko Doisaki, Masahiro Irie, Asahito Hama, Yoshiyuki Takahashi, and Seiji Kojima. Florey International Postgraduate Research Conference. 2014年9月25日 the University of Adelaide, Adelaide, Australia

6. 研究組織

(1)研究代表者

奥野 友介 (OKUNO, Yusuke)
名古屋大学・医学部附属病院・先端医療・臨床研究支援センター・特任講師
研究者番号：00725533

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

村松 秀城 (MURAMATSU, Hideki)

名古屋大学・医学部附属病院・小児科・助教

小島 勢二 (KOJIMA, Seiji)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授