

# 16-3 小児の難治性白血病、骨髄異形成症候群のゲノム異常の解析と治療法に関する研究

京都大学大学院医学研究科発生発達医学 中畑 龍俊

## 研究成果の要旨

(1) Topoisomerase 阻害剤による DNA 損傷の機序を検討した。正常細胞では MLL 遺伝子の切断が起こるが、細胞周期の G2M チェックポイントによって、自己修復される。一方、ATM 欠損細胞では、チェックポイントが作動せず、自己修復が失われる。(2) 寛解期の小児白血病患者由来細胞株と健常人由来細胞株のゲノム網羅的解析を行った。患者細胞株は染色体不安定性、遺伝子発現データの偏り apoptosis 関連遺伝子 (casp8, GAS2) の発現低下がみられ、apoptosis 経路の異常が示唆された。(3) AML99 の治療成績は寛解導入率 94%, OS (LR:88%, IR:79%, HR:58%) EFS (LR:72%, IR63%, HR58%) (いずれも 3 年) で、予後因子による層別化治療に成功した。また FLT3-ITD, MLL-PTD 及び t(8;21) 症例における c-kit 変異が予後不良因子として抽出された。また、成人で予後良好因子とされる CEBPA 変異の頻度は低かった。(4) ヒト造血幹細胞や腫瘍細胞を容易に受け入れるモデルマウス (NOG マウス) を開発し、難治性白血病 (JMML 等) の生着を得て、clonality 解析を行った。

## 研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名
中畑 龍俊	京都大学 教授
水谷 修紀	東京医科歯科大学 教授
林 泰秀	群馬県立小児医療センター 院長
清水 喜美子	国立がんセンター 主任研究員
小池 健一	信州大学 教授
月本 一郎	東邦大学 教授
永山 淳	独立行政法人九州がんセンター

\*1:平成16年4月1日～平成18年3月31日

## 総合研究報告

### 1 研究目的

小児の難治性白血病及び骨髄異形成症候群の病因を明らかにするために (1) 染色体の構造異常や遺伝子異常の解明 (2) このような異常の遺伝的背景としてゲノムの安定性制御機構の障害の解明 (3) ヒト化モデルマウスを用いた in vivo での発症、進展機構の解明 (4) 新たな予後因子の同定と治療法への応用 を目指す。

## 分担研究課題

In vivo model を用いた小児難治性白血病、骨髄異形成症候群における病態解析及び治療法の開発に関する研究

小児の難治性造血器腫瘍の遺伝的・生物学的特性

小児難治性白血病および骨髄異形成症候群のゲノム異常に関する研究

小児難治性白血病のゲノム解析

小児難治性白血病の細胞周期とその異常に関する研究

小児 AML の治療法の開発に関する研究

難治性小児白血病におけるエピジェネティクス異常と予後関連性の検討

## 2 研究方法

(1) トポ II 阻害剤による MLL 遺伝子の切断が、切断された断片同士のダイナミックな局在の変化を伴っているかどうかを明らかにする目的で MLL 遺伝子上流と下流に異なった蛍光色素でラベルされた FISH プローブを作成し、two color FISH を行った。(2) 小児白血病寛解期の患者 50 人から EB ウィルス形質転換により B 細胞株を樹立した。正常人から樹立した細胞株と比較したゲノム網羅的な遺伝子解析を行い、遺伝子を絞り込まない主成分解析、unsupervised learning で遺伝子を絞り込んだ後で遺伝子発現を検討した。(3) AML99 プロトコールに登

録された240例の初発時の患者検体から、RNAを抽出し、RT-PCRとdirect sequenceを行って、FLT3-ITD, MLL-PTD, c-kit変異、CEBPA変異、BAALC発現を解析した。(4)6MP治療中のJMML患者検体の染色体異常の解析をFISH法で行い、6MP感受性試験を液体培養法、遺伝子変異解析をdirect sequence法とコロニー法で施行した。

### 3 研究成果

#### (1) 小児白血病における遺伝的背景の研究

ATMは小児白血病の遺伝的背景を形作る重要な分子である。ArtemisはDNA-PKcsの存在下においてヘアピンオープンリングにおける抗原レセプターのVDJ再結合に非常に重要な働きをする。このArtemisの欠損はATM欠損症と同様人体を放射線に対する高感受性と重症複合免疫不全に陥らせる。Artemis欠損患者もArtemis欠損マウス細胞も染色体の不安定性を呈するが、DNA損傷に対するArtemisの詳細な機能は未だ明らかにされていない。Artemisが小児白血病の遺伝的背景を形成する可能性もあるという立場からATMとArtemisの関係を検討した。健康人、A-T患者、NBS患者からそれぞれ樹立したEBV-LCL株を用いて以下の結果を得た。(1) ArtemisはDNA損傷に反応して過リン酸化される。(2) DNA-PKcsは放射線照射(IR)による過リン酸化には関与しない。(3) IRによるDSBsに対するArtemisの過リン酸化はATM依存性である。(4) ArtemisはDNA損傷に対してATM下流の基質である。(5) Ser645はIRで誘導されたDSBsにおけるArtemisの過リン酸化サイトに対応するSQ/TQである。(6) Artemisの過リン酸化にはChk2ではなくNbs1が必要である。(7) 過リン酸化したArtemisはIRで誘起したDSBsに対応してMre11/Rad50/Nbs1複合体とATMに依存した形で物理的な相互作用をする。以上よりArtemisが放射線照射(IR)に反応して、ATM及びNbs1依存性にリン酸化されることを示した。Artemisのリン酸化はATM及びNbs1が発現していない細胞では著しく減少する。ATMまたはNbs1に欠陥を持った細胞にそれぞれ正常のATMまたはNbs1を発現させると、Artemisリン酸化は回復する。また、S645はIRにおけるArtemisの泳動遅れに貢献している。リン酸化したArtemisはIRによるDNAの二本鎖切断(DSBs)においてMre11/Rad50/Nbs1複合体とATMに依存する形で物理的な相互作用をすることは、これらの分子の機能的な連関を裏付けている。DNA-PKcsまたはATMの欠損は、IRによるDSBs修復に異常を有することから、ArtemisはIRによるDSBsの修復において、DNA-PKcsとATM下流のsignaling crossroadに位置づけることができることが明らかにされた。一方、MLL遺伝子異常は難治性白

血病である乳児白血病や二次性白血病の原因となる。治療薬であるトポII阻害剤処理によるDNA損傷後の、MLL切断メカニズムを検討した。正常細胞をトポII阻害剤で処理し、解析を行ったところ、MLL遺伝子の部位で切断はされているが、断片の局在部位は変化しておらず、染色体のダイナミックな変化はおこっていないことが明らかになった。同様の実験をATM欠損細胞であるGM05849Cを用いて行った。まずトポII阻害剤による細胞周期の状態を観察した所、ATM欠損細胞ではG2Mチェックポイントに異常が認められ、細胞周期がG0/G1に進行する分画が比較的が多いことが判明した。この細胞においてM期、さらにM期を乗り越えてG1期に入った細胞の分析を行った所、MLL遺伝子切断断片の位置関係の大きな変化を観察する事ができた。以上をまとめると、正常細胞ではトポII阻害剤によるDNA損傷に対し、MLL遺伝子の切断がおこるが、細胞周期はG2MチェックポイントによってG2期を越えてM期、G1期へ進行する事はない。切断断片のダイナミックな位置異常を呈する事もなく、自己修復の機会が保たれる。一方、ATM欠損細胞では同様の処理に際し、細胞周期チェックポイントが作動せず、細胞周期はG2期を越えてM期、G1期へと進行する。この過程でMLL遺伝子断片の位置関係に大きな変化が生じ、自己修復の機会が失われる。

#### (2) 小児白血病におけるゲノム解析を通じた遺伝的背景の探索

小児白血病はMLL遺伝子の転座、再構成に代表されるような均衡型の染色体転座が多いという特異性から、ゲノムの安定性を規定する遺伝子に着目し、germline mutationやcSNP検索を行った。小児白血病患者由来細胞株は健康人由来細胞と比較して有意に染色体の不安定性を示し、年齢的には低いほど染色体不安定性を示していた。小児患者由来細胞29例、成人白血病患者由来細胞10例、健康人由来細胞19例、遺伝的素因と染色体不安定性を示す代表的な細胞としてp53遺伝子に変異のあるLi-Fraumeni患者由来細胞5例を用い、遺伝子を絞り込まずに主成分分析を行ったところ、小児患者由来細胞の発現は偏りを示すことが見出された。クラスター解析のためにはunsupervised learningで遺伝子を絞り込んだ後にt-testで小児白血病患者由来細胞株と健康人由来細胞とで有意に差のある遺伝子を抽出した。差の大きい上位50遺伝子(プローブ)のなかに、apoptosis経路で重要なCASP8( $p = 3.1 \times 10^{-5}$ )やGAS2( $p = 6.3 \times 10^{-6}$ )が含まれていた。どちらも小児患者群細胞では発現が低いものが多かった。p53の安定性にポジティブ

に働く GAS2 の発現が低い細胞における apoptosis を解析したところ、GAS2 の発現レベルと apoptosis には負の相関が観察された。したがって、小児白血病患者細胞の多くは apoptosis 経路に異常があり、白血病化の一因となっていることが示唆された。

### (3) 小児 AML99 プロトコール開始 4 年後の治療成績と予後因子の評価

対象は 2000.1~2002.12 の 3 年間に登録された AML240 例で、登録終了後 2 年 3 ヶ月の時点での中間解析を行った。寛解導入率は 226/240(94%)で、3 年粗生存率(OS)は 79%、EFS は 64%、DFS は 65%であった。OS(LR:88%, IR:79%, HR:58%) EFS(LR:72%, IR63%, HR58%) (いずれも 3 年)で、予後因子による層別化治療に成功した。小児 AML 158 例の *FLT3*、*MLL* および *KIT* 遺伝子の解析を行った。135 例中 *FLT3*-internal tandem duplication (ITD) を 17 例 (12.6%)、kinase domain mutation (D835Mt) を 8 例 (5.9%) に認めた。3 年 OS は各々 *FLT3*-ITD, D835Mt, wild type(WT) で 35.3%, 100%, 84.3% ( $p<0.0000001$ )、DFS は 40.0%, 87.5%, 66.9% ( $p<0.003$ )、再発率 (RR) は 52.4%, 11.8%, 30.3% ( $p<0.005$ )であった。*MLL*-PTD は 21 例(15.6%)にみられ、*MLL*-PTD の有無による予後の差は OS は 56.3%, 83.2% ( $p=0.018$ )、DFS は 41.7%, 69.6% ( $P=0.010$ )、RR は 54.3%, 27.6% ( $p=0.0085$ )であった。また正常核型 33 例中 15 例 (45.5%)で *FLT3*-ITD か *MLL*-PTD のどちらかの異常がみられた。小児の多数例の検討により、本邦の小児 AML でも予後不良であることを明らかにし、今年度開始される新プロトコール (AML06) では治療の層別化に用いられることになっている。*t(8;21)*-AML は予後良好とされているが、AML99 症例では約 15%が再発している。また *AML1-MTG8* 単独ノックインマウスの結果より、AML の発症には二次的遺伝子異常が必要で、*KIT* 遺伝子が候補と考えて解析を行った。AML99 登録症例中 46 例を対象とした。*KIT* 遺伝子の TK2 domain の変異が 46 例中 8 例(17.4%) (*N822K* 3 例、*N822T*、*D816H*、*D816V*、*V825A*、*A814S* 各 1 例) に認められた。*KIT* 遺伝子の有無による OS は 50.0%対 97.4% ( $p=0.001$ )、EFS は 37.5 %対 94.7% ( $p<0.0001$ )、RR は 47.0 %対 2.7% ( $p<0.00001$ ) でいずれも著明な有意差がみられた。*KIT* 遺伝子異常は *t(8;21)*-AML の新たな予後因子となりうるものと考えられた。また normal karyotype20 例に欧米成人で予後良好因子される CEBPa 変異解析を行い、1 例に新規の変異 (1074 insAGA) を見出した。

### (4) JMML 治療中の染色体異常の意義

6-MP 治療中に出現する染色体異常の意義について解析した。解析対象は 11 例で、うち 2 例は初診時に染色体異常 (+8 と -7) がみられ、残りの 9 例は正常核型であった。+8 の 1 例と、正常核型の 4 例において G 分染法で 6-MP 投与 1-14 か月後に新たな染色体異常が出現した。初診時あるいは 6-MP 治療前の骨髄細胞を FISH 法により解析したところ、全例に 3~6%の割合ですでに異常クローンが存在し、経時的に増加した。これらの患者の骨髄細胞を 6-MP 添加あるいは非添加で GM-CSF 刺激下で培養したところ、6-MP 治療中に増殖した染色体異常を有する細胞は、6-MP 治療により減少した細胞に比べ明らかに 6-MP に対して抵抗性を示した。初診時および 6-MP 治療中に染色体異常が出現した 6 例中 5 例に PTPN11 遺伝子の点変異を認めた。これらの結果から、6-MP 治療中に出現する染色体異常は初診時から存在する 6-MP 抵抗性の異常クローンの増殖によるもので、6-MP 抵抗性は遺伝子変異ではなく、染色体異常により規定されているものと考えられた。

### (5) 小児骨髄異形成症候群 (MDS) / 若年性骨髄単球性白血病 (JMML) に対する造血幹細胞移植：単一施設の経験から

1984 年 1 月から 2004 年 7 月までに九州がんセンターで行われた新規発症小児 MDS20 例、JMML6 例に対する SCT の治療成績を後方視的に検討した。移植時年齢は MDS が、中央値 8.9 才、JMML が中央値 2.2 才、MDS の病型は RC7 例、RAEB 2 例、RAEB-T 6 例、白血病転化 5 例であった。移植片は、骨髄が 22 例 (HLA 一致血縁 13 例、1 座不一致血縁 2 例、非血縁 7 例)、臍帯血が 4 例、移植前処置は MDS で TBI レジメンが 11 例、non-TBI レジメン 9 例、JMML では 1 例を除き Bu+CA+CY で行った。GVHD 予防は HLA 一致血縁ドナーで CsA あるいは MTX 単独、それ以外では CsA あるいは FK に short MTX を選択した。全例で生着が得られ、その中央値は 19 日 (11-49 日)であった。急性 GVHD は 0-I 度 8 例、II 度以上が 18 例であった。慢性 GVHD は評価可能であった 21 例中 5 例に認められた。MDS の再発は RC 1 例、RAEB-T 1 例の 2 例に留まる一方で、JMML は 6 例中 5 例が再発したが、そのうち 2 例は DLI で再寛解が得られた。移植関連死亡は 6 例であった。観察期間は中央値 6.2 年、3 年の無病生存率、全生存率、再発率、移植関連死亡率はそれぞれ 41%、61%、32%、26%であった。

### 4 倫理面への配慮

臨床検体の遺伝子及びゲノム解析については JPLSG の倫理ワーキンググループの倫理規定に従い、各施設の倫理委員会に承認された研究計画書に沿って行った。