

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

主任研究者 京都大学大学院医学研究科 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。(4) JMML 細胞の FISH 解析から、6MP 治療中の染色体異常は、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と考えられた。

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 医師

*1: 平成17年4月1日～平成18年3月31日

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

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。

MLL 遺伝子内にはトポイソメラーゼによって認識される配列が集中している箇所が存在し、それによってトポイソメラーゼ阻害剤が MLL 遺伝子異常を引き起こすのだろうと推測されている。トポイソメラーゼ阻害剤でヒトリンパ球を処理し、それをサザン法で解析すると MLL 遺伝子の切断を確認することが可能である。ところがトポイソメラーゼ阻害剤で処理後加熱したり、阻害剤フリーの条件で暫く培養すると切断片は消失し、切断片同士が再結合することが明らかになった。このことはトポイソメラーゼ阻害剤による MLL 遺伝子の切断は一過性であり、その変化は可逆的なものであることを示し、MLL 遺伝子異常がトポイソメラーゼ阻害剤でなぜ引き起こされるのかのなぞを解くことが容易でないことが明らかになった。

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。

この方法で正常細胞をトポイソメラーゼ 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ても、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。まずトポイソメラーゼ 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 期に入った細胞の解析を行った所、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。

以上をまとめるとトポイソメラーゼ阻害剤による MLL 遺伝子の切断と MLL 遺伝子における染色体の転座において

ATM 欠損が関与するメカニズムとして以下のような事が考えられた。(1) 正常細胞ではトポイソメラーゼ阻害剤による 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く、切断断片のダイナミックな位置異常を呈する事はなく、自己修復の機会が保たれた。(2) 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た。

(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。

小児の白血病という稀な疾患に対してゲノム網羅的な解析を行うにあたり、必要な試料を得るため、および、germline の解析のために、主として寛解期の患者 50 人の末梢血 5ml を採取し、EB ウィルスによる形質転換により B 細胞株を樹立した。樹立し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ており、ゲノムの安定性を規定する遺伝子に着目する、というわれわれの解析の方向性の正しさを示すものであった。しかし、化学療法による遺伝子への影響は長期間に及ぶ、との報告もあり、化学療法の有無、および、化学療法後の経過時間に関して調べたところ、それらの因子の影響による有意差は認められず、やはり、疾患の有無によるものと考えられた。年齢的には低いほど染色体不安定性を示していた。乳児白血病では MLL 遺伝子の転座を有する白血病が過半数を占めていることと矛盾しない。

解析遺伝子を絞り込む目的と転写調節領域の変異も検出できる可能性をも考慮して網羅的な発現解析を行った。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 例を用いた。得られた発現データの統計学的解析として、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常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。さらに、apoptosisとの関係が示唆されているBHLHB2やMYH10なども含まれる。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。現在までに明らかになったDNA二重鎖切断修復の主要な経路である、ATM、TP53(p53)、CHK2遺伝子の変異データと合わせて考えると、p53を中心とするgeneticな、またはepigeneticなgerm-lineレベルの変異がDNA障害修復遺伝子に変異が蓄積していることが示唆され、小児白血病の遺伝的素因の重要な素因と考えられた。

(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

1. AML99(狭義)

対象は2000.1~2002.12の3年間に登録されたDown合併例とM3を除く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、導入療法A204/214(95%)、B22/26(85%)であった。3年粗生存率(OS)は79%、EFSは64%、EFSは65%であった。予後因子別の3年生存率とDFSは、LR群88%と72%、IR群79%と63%、HR群58%と58%であった。IR群について、第一寛解期にHSCT施行群と非施行群のOSとDFSを比較した。施行群では79%と79%、非施行群では79%と53%であり、非施行群では再発してもHSCTにより約半数のものが救済された。染色体異常別のEFSはinv(16)で100%、t(8;21)は85%と高い。一方、正常核型、11q23では約40%である。11q23を有する30例の中ではt(9;14)9例は100%、それ以外の21例は35%であった。したがって、新たな予後良好因子としてt(9;11)があげられた。

2. AML99 Down

対象はDownを合併した66例で全AMLの16%を占めている。年齢の中央値は1歳10ヶ月、FAB分類は60例がM7であった。寛解導入率は64/66(97%)、うち56例(85%)が寛解を維持している。8例が再発し、3例に移植を行ったが7例が死亡した。再発は2歳以下の2/39(5%)、2歳以上の6/27(22%)にみられ、2歳以上の治療強化の必要性が示唆

された。粗生存率は2歳未満と2歳以上で91%と70%と有意差がみられた。EFSは89%と72%であり、2歳以上に寛解導入不能例が多いことが影響している。AML99/Down protocolの検証:(1)AT-Downと比べ寛解導入率はやや低下した。治療関連死が減少し、特に標準危険群では有意差がみられた。(2)予後不良因子としてmonosomy 7があげられた。

3. AML99 M3

対象は1997年から2004年までに登録された54例で、平均年齢は9歳である。寛解導入率は52/54(96%)である。死亡例は寛解導入中のICHおよびDICによる2例、強化療法時に敗血症による1例、再発後のICHによる1例である。3年生存率は90%、3年EFSは88%であった。

4. 予後因子の評価

小児AML158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%)(N822K3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。一方、欧米成人で予後良好因子とされているCEBPa mutation解析では、20例(M03例、M14例、M23例、M44例、M55例、M71例)のcDNAを用い、RT-PCRおよびDirect sequenceを施行した。20例中1例(M1

症例)に Base pair change : 1074-1075 ins. AGA (Amino acid change : K 309-310 insertion) を示す新規の mutation を認めた。mutation の頻度としては、これまでの成人報告例 (10~15%) に比べて、小児例では低い可能性が示唆された。また予後不要因子とされる BAALC expression の検索では、27 例 (M01 例, M17 例, M24 例, M31 例, M47 例, M55 例, M72 例) を対象とし、Real time RT-PCR により発現レベルを検討した。27 例中 19 例が BAALC high expression を示した。全 27 例の Over all survival (OS) は、64 ヶ月のフォロー期間で、Low expression (LE) 群 (n=8) 75% に対し、High expression (HE) 群 (n=19) では、47.3% (全体の OS は 55.6%) であった。また再発率は、LE 群で 37.5%、HE 群で 52.6% を示し、予後不良因子としての意義が示唆された。

(4) JMML 治療中の染色体異常の意義

若年性骨髄単球性白血病 (JMML) では、初発時の染色体検査において約2/3は正常核型を示し、残りが-7などの染色体異常を示すと報告されている。一方、診断時には正常核型であっても、6-MP治療中に染色体異常を認める症例にしばしば遭遇する。そこで、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。PTPN11とN-rasの変異について検索した結果、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。PTPN11変異を認めた1例について、骨髄CD34陽性細胞から得られた各系統のコロニーについてPTPN11変異の検索を行った結果、顆粒球-マクロファージ系コロニーでは染色体異常の有無に関わらず、すべてのコロニーがPTPN11変異を有していた。一方、約80%の赤血球バーストや20%の混合コロニーはPTPN11変異も染色体異常も認められなかった。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ことが明らかとなった。また、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月までの期間に、九州がんセンターで行われた新規発症小児 MDS20 例, JMML6 例に対する造血幹細胞移植の治療成績について後方視的に検討した。MDSは男児11例, 女児9例, JMMLは男児5例, 女児1例, 移植時年齢はMDSが中央値8.9才 (2.5-16.6才), JMMLが中央値2.2才 (1.5-2.6才) であった。MDS20例の移植前の病型診断は Refractory cytopenia (RC) 7例, Refractory anemia with excess blasts (RAEB) 2例, RAEB intransformation (RAEB-T) 6例, 白血病転化例5例であった。MDS/JMMLの染色体解析では、それぞれ核型正常が8例と4例, monosomy 7が6例と1例, trisomy 8が2例と0例, その他の染色体異常が4例と1例認められた。診断から移植までの期間はMDSが中央値7.1か月 (1.1-95.4か月), JMMLが中央値9.5か月 (5.9-20.1か月)、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例であった。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Bu内服不能1例を除きBu+Ara-C+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 term MTXの組み合わせを選択した。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, 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RC1例, RAEB-T1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例は移植片対白血病効果の誘導で再寛解が得られた。移植関連死亡は6例で, 内訳は肺感染症3例, 閉塞性細気管支炎1例, 敗血性ショック1例, 誤嚥性肺炎1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。MDSでは移植関連死亡が多いとされているが, 本報告でも同様の結果であった。その一方で無病生存例も多く, その観察期間も長期にわたっていて, 移植成績そのものは決して悪いものではない。本報告の結果から小児MDS治療の第1選択は造血幹細胞移植であり, その治療関連合併症を減らすことでさらなる治療成績の向上が期待できると考えられた。

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。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Sawada J., Nakahata T.: Stem cell factor has a suppressive activity to IgE-mediated chemotaxis of mast cells. *J Immunol* 174: 3626-3632, 2005
2. Kusunoki T., Nakahata T.: CpG inhibits IgE class switch recombination through suppression of NFkB activity, but not through Id2 or Bcl6. *Biochem Biophys Res Commun* 328: 499-506, 2005
3. Yoshimoto M., Nakahata T.: Two different role of purified CD45+ hematopoietic stem cells after transplantation in muscles. *Stem cells* 23: 610-618, 2005
4. Yasumi T, Nakahata T. : Limited ability of antigen-specific Th1 responses to inhibit Th2 cell development in vivo. *J. Immunol.* 177:1325-1331. 2005.
5. Kosugi N., Nakahata T.: CD34+CD7+ leukemic progenitor cells may be involved in maintenance and clonal evolution of chronic myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 11: 205-211, 2005
6. Hamahata K., Nakahata T.: Mitochondrial dysfunction is related to necrosis-like programmed cell death induced by A23187 in CEM cells. *Eur J Pharmacol* 516: 187-196, 2005
7. Kawamura T., Nakahata T.: Acetylation of GATA-4 is involved in the differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *J Biol Chem* 280: 19682-19688, 2005
8. Ohtsuka Y., Nakahata T.: RAS-blocking bisphosphonate zoledronic acid inhibits the abnormal proliferation and differentiation of juvenile myelomonocytic leukemia cells. *Blood* 106: 3134-3141, 2005
9. Saitoh M., Nakahata T.: Somatic mosaicism of CIAS1 in a CINCA syndrome patient. *Arthritis & Rheumatism in press*
10. Iguchi T., Mizutani S.: Combined treatment of leukemia cells with vitamin K2 and 1 alpha, 25-dihydroxy vitamin D3 enhances monocytic differentiation along with becoming resistant to apoptosis by induction of cytoplasmic p21CIP1. *Int J Oncol* 27: 893-900, 2005
11. Nakada S., Mizutani S.: Early G2/M checkpoint failure as a molecular mechanism underlying etoposide-induced chromosomal aberrations. *J Clin Invest* 116: 80-89, 2006
12. Ushijima T., Shimizu K.: Decreased fidelity in replicating CpG methylation patterns in cancer cells. *Cancer Res* 65: 11-17, 2005
13. Ishii E., Koike K.: Genetic subtypes of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis : correlations with clinical features and cytotoxic T lymphocyte/natural killer cell functions. *Blood* 105: 3442-3448, 2005
14. Zhao XY., Koike K.: Granulocyte-macrophage colony stimulating factor induces de novo methylation of the p15 CpG island in hematopoietic cells. *Cytokine* 31: 203-212, 2005
15. Shimada A., Tsukimoto I.: *KIT* mutations, and not *FLT3* internal tandem duplication, are strongly associated with a poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia with t(8;21): a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Blood* 106: 1906-1909, 2006
16. Taki T., Hayashi Y.: The MYO1F, unconventional myosin type 1F, gene is fused to MLL in infant acute monocytic leukemia with a complex translocation involving chromosomes 7, 11, 19 and 22. *Oncogene* 24: 5191-5197, 2005
17. Urano A., Hayashi Y.: Infertility with defective spermiogenesis in mice lacking AF5q31, the target of chromosomal translocation in human infant leukemia. *Mol Cell Biol* 25: 6834-6845, 2005
18. Igarashi S., Hayashi Y.: No advantage of dexamethasone over prednisolone for the outcome of standard- and intermediate-risk childhood acute lymphoblastic leukemia in the Tokyo Children's Cancer Study Group L95-14 protocol. *J Clin Oncol* 23: 6489-6498, 2005
19. Nagayama J., Nakahata T.: Acute lymphoblastic leukemia with a germline MLL gene can be cured in a high proportion of infants with use of intensive chemotherapy: results from the Japan Infant Leukemia Study group. *Blood in press*