

200911011B

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

多施設共同研究に登録された白血病の検体収集と

中央保存システムの確立に関する研究

平成19～21年度 総合研究報告書

研究代表者 直江 知樹

平成22(2010)年3月

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業

多施設共同研究に登録された白血病の検体収集と  
中央保存システムの確立に関する研究

平成19～21年度 総合研究報告書

研究代表者 直江 知樹  
名古屋大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学

## 《目 次》

I. 研究組織	3
II. 総合研究報告書・(研究代表者)	7
多施設共同研究に登録された白血病の検体収集と中央保存システムの確立 直江 知樹	
III. 研究分担者(総合研究報告書)	
1. 急性骨髄性白血病における遺伝子異常による予後因子の解析	15
麻生 範雄	
2. 提案研究の審査と遺伝子解析	19
清井 仁	
3. 臨床プロトコールとの調整	26
小林 幸夫	
4. 多施設共同研究での患者検体を用いた研究における問題点	31
矢ヶ崎 史治, 前田 智也	
5. 多施設共同研究に登録された白血病の検体収集と中央保存システムの確立	35
竹下 明裕	
6. 検体収集より得られた白血病細胞を用いての分子標的薬剤の併用効果の解析	39
田内 哲三	
7. 染色体のセントラルレビュー	46
滝 智彦	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	55

# I. 研 究 組 織

【多施設共同研究に登録された白血病の検体収集と中央保存システムの確立に関する研究】

名 簿

	氏 名	所 属 ・ 職 名
研究代表者	直江 知樹	名古屋大学大学院医学系研究科 教授
研究分担者	麻生 範雄	熊本大学大学院医学薬学研究部 准教授
	清井 仁	名古屋大学医学部附属病院 講師
	小林 幸夫	国立がんセンター中央病院 医長
	矢ヶ崎 史治	埼玉医科大学国際医療センター 講師
	前田 智也	埼玉医科大学国際医療センター 助教
	竹下 明裕	浜松医科大学 准教授
	田内 哲三	東京医科大学医学部 准教授
	滝 智彦	京都府立医科大学大学院医学研究科 講師

## Ⅱ. 総 合 研 究 報 告 書

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
総合研究報告書

「多施設共同研究に登録された白血病の検体収集と中央保存システムの確立」  
研究代表者 直江 知樹 名古屋大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学 教授

研究要旨

多施設共同研究に登録し、同一プロトコールで治療された白血病患者コホートにおいて、白血病検体を逐次的に収集・保存・解析しうるシステムを構築した。検体収集を効率的に行うためのインセンティブとして、遺伝子検査データを主治医に還元すること、さらに変異遺伝子での層別化治療を行うことが、重要と考えられた。研究期間中にJALSG AML201試験：249症例のDNA、APL204試験：298例のmRNA、Ph陰性ALL202試験：461例のmRNA、Ph陽性ALL208-IMA試験：71例のmRNAを中央保存した。さらに前向き遺伝子層別化治療によってFLT3/ITD変異AMLに対する同種移植介入試験を開始した。3年間で1500例を目指す大規模試験となる予定で、その残余検体が保存される予定である。このような臨床情報と連結しうる白血病検体は、より正確な亜分類や予後予測ならびに最適な治療法の選択に資する検査法の開発に必須と考えられる。

A. 研究目的

白血病において明らかにされてきた病型特異的な染色体異常や、病態に関与している遺伝子異常の多くは白血病治療上の重要な予後因子でもあり、治療法の選択など臨床的にも重要な情報を与えてきた。しかし、EBMの確立に直結する、臨床情報との関連性を加味した上での網羅的かつ系統的な大規模解析は極めて不十分である。日本成人白血病治療共同研究グループ（JALSG）では、白血病の治療成績向上を目指した多施設共同臨床治療研究を推進し、これら疾患の治療指針を提唱してきたが、白血病細胞における遺伝子解析は、付随研究として個別に行われてきた。そのため、臨床研究登録症例の部分的な症例群での解析に留まるだけでなく、検体保存の中央化システムの構築がなされていないために、臨床検体の共有化ならびに遺伝子解析結果の蓄積が不十分であった。

本研究は、白血病に対する多施設共同治療研究登録症例において、病態に関与する遺伝子異常、発現状態を臨床的データとの関連性を考慮した中で網羅的に解析し、これら疾患群における分子病態に基づく細分化から最適な治療法の選択と治療成績の向上を目指すことを目的とする。そのため、治療研究登録全症例のDNA、RNAを中央保存化するシステムと遺伝子解析を前方視的ならびに後方視的に解析を行う上での倫理性を確保する審査システムの構築を行う。

B. 研究方法

DNA/RNA 中央保存システムの基盤整備と、後方視的な検体収集を JALSG 運営委員会、検体研究・付随研究委員会と協議の上推進する。

C. 研究結果

JALSG内に検体保存・付随研究委員会を発足させ、検体採取・保存、保存同意撤回などのフォーマットを整備するとともに、JALSGホームページに“付随研究へのご協力のおねがい”を掲載し（[www.jalsg.jp](http://www.jalsg.jp)）、付随研究に関してはいつでも撤回できることと同時に、現在行っている付随研究については、その目的、対象、検体種類、採取時期などを明示し、付随研究ごとに同意の撤回を可能にすべく研究内容の概略を開示した。

既に登録が終了しているJALSG AML-201臨床試験登録症例において、遺伝子解析ならびに検体保存に関する同意が得られ、初診時白血病細胞が保存されている症例のアンケート調査を実施したのち、後ろ向きに249症例のDNAを収集した。またAPL204試験：298例のmRNA、Ph陰性ALL202試験：461例のmRNA、Ph陽性ALL208-IMA試験：71例のmRNAを中央保存した。これらの試験では、残存白血病の定量あるいはBCR/ABLキメラ遺伝子の有無によって、治療プロトコールが選択されるような仕組みになっており、収集率が100%に近い。これらの経験と各施設へのインセンティブを考慮し、検体収集を効率的に行うためのとして、白血病関連キメラ遺伝子スクリーニングを検査会社に委託し、同時にDNA/RNAの抽出を行い、匿名化の上中央保存するシステムを導入することを考えた。このシステムは匿名性を担保しつつ検体の中央保存が効率的に実施されること、施設間の検体移送がなく、Validateされた検査環境での定量測定が可能であるので測定施設への負担が少なくなるなどの利点があった。

研究期間中にJALSG AML201試験：249症例のDNA、APL204試験：298例のmRNA、Ph陰性ALL202試験：461例のmRNA、Ph陽性ALL208-IMA試験：71例のmRNAを中央保存した。

前方視的検体収集と中央保存を研究計画書に盛り込むべく、プロトコール小委員会と連携し、2008年6月より開始されたPh陽性ALL208-IMA試験では試験登録にあたり行われるキメラ遺伝子スクリーニング検査、再発時に行われる遺伝子変異解析検査の残余検体を中央保存するための同意文書を組み入れ前方視的検体収集が開始された。

またAML209試験では、キメラ遺伝子とFLT3/ITD変異において分子層別化し、治療介入を行うという遺伝子解析に関する研究提案について、JALSG検体研究・付随研究委員会と統一性をもって審議・承認を実施していく基本方針を確認し、JALSGの中での提案研究に際しては、残余検体の中央保存化を求めている。

本研究班員施設において保存された染色体および保存検体を用いた分子病態の解明を開始し、中央保存された検体において優先的に行うべき遺伝子解析を決定するための予備的検討を開始した。

#### D. 健康危険情報

該当無し。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Iwanaga E, Nanri T, Matsuno N, Kawakita T, Mitsuya H, and Asou N. A JAK2-V617F activating mutation in addition to KIT and FLT3 mutations is associated with clinical outcome in patients with t(8;21)(q22;q22) acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 94:433-435, 2009.
- Shiotsu Y\*, Kiyoi H\*, Ishikawa Y, Tanizaki R, Shimizu M, Umehara H, Ishii K, Mori Y, Ozeki K, Minami Y, Abe A, Maeda H, Akiyama T, Kanda Y, Sato Y, Akinaga S, Naoe T. KW-2449, a novel multi-kinase inhibitor, suppresses the growth of leukemia cells with FLT3 mutations or T315I-mutated BCR/ABL translocation. *Blood*. 114: 1607-1617, 2009. \*equal contribute.
- Kato M, Sanada M, Kato I, Sato Y, Takita J, Takeuchi K, Niwa A, Chen Y, Nakazaki K, Nomoto J, Asakura Y, Muto S, Tamura A, Iio M, Akatsuka Y, Hayashi Y, Mori H, Igarashi T, Kurokawa M, Chiba S, Mori S, Ishikawa Y, Okamoto K, Tobinai K, Nakagama H, Nakahata T, Yoshino T, Kobayashi Y, Ogawa S. Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature*. 459:712-6, 2009.
- Kobayashi Y, Tobinai K, Takeshita A, Naito K, Asai O, Dobashi N, Furusawa S, Saito K, Mitani K, Morishima Y, Ogura M, Yoshida F, Hotta T, Bessho M, Matsuda S, Takeuchi J, Miyawaki S, Naoe T, Usui N, Ohno R. Phase I/II study of humanized anti-CD33 antibody conjugated with calicheamicin, gemtuzumab ozogamicin, in relapsed or refractory acute myeloid leukemia: final results of Japanese multicenter cooperative study. *Int J Hematol*. 89:460-9, 2009.
- Nicolini FE, Mauro MJ, Martinelli G, Kim DW, Soverini S, Müller MC, Hochhaus A, Cortes J, Chuah C, Dufva IH, Apperley JF, Yagasaki F, Pearson JD, Peter S, Sanz Rodriguez C, Preudhomme C, Giles F, Goldman JM, Zhou W. Epidemiologic study on survival of chronic myeloid leukemia and Ph(+) acute lymphoblastic leukemia patients with BCR-ABL T315I mutation. *Blood*. 114:5271-8, 2009.
- Kitoh T, Taki T, Hayashi Y, Nakamura K, Irino T, Osaka M. Transient abnormal myelopoiesis in a newborn with Down syndrome followed by an acute myeloid leukemia: identification of the same structural chromosomal abnormality at both stage of TAM and leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 188:99-102, 2009.
- Park M, Taki T, Oda M, Watanabe T, Yumura-Yagi K, Kobayashi R, Suzuki N, Hara J, Horibe K, Hayashi Y. FBXW7 and NOTCH1 mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia and T cell non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol*. 145:198-206, 2009.
- Isoda T, Ford AM, Tomizawa D, van Delft FW, Gonzalez De Castro D, Mitsui N, Score J, Taki T, Morio T, Takagi M, Saji H, Greaves M, Mizutani S. Immunologically silent cancer clone transmission from mother to offspring. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106:17882-17885, 2009.
- Ishikawa Y, Xu J, Sakashita G, Urano T, Suzuki T, Tomita A, Kiyoi H, Nakamura S, Naoe T. Abnormal cytoplasmic dyslocalisation and/or reduction of nucleophosmin protein level rarely occurs in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma*. 49: 2359-2364, 2008.
- Narimatsu H, Yokozawa T, Iida H, Tsuzuki M, Hayakawa M, Takeo T, Iino M, Ichihashi T, Kato C, Sawamoto A, Sao H, Yanada M, Emi

- N, Kiyoi H, Yamaguchi T, Naoe T, Suzuki R, Sugiura I. Clinical characteristics and outcomes in patients with t(8;21) acute myeloid leukemia in Japan. *Leukemia*. 88: 154-8, 2008.
11. Yanada M, Takeuchi J, Sugiura I, Akiyama H, Usui N, Yagasaki E, Nishii K, Ueda Y, Takeuchi M, Miyawaki S, Maruta A, Narimatsu H, Miyazaki Y, Ohtake S, Jinnai I, Matsuo K, Naoe T, Ohno R; Japan Adult Leukemia Study Group. Karyotype at diagnosis is the major prognostic factor predicting relapse-free survival for patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia treated with imatinib-combined chemotherapy. *Haematologica*. 93:287-90, 2008.
  12. Okabe S, Tauchi T, Ohyashiki K. Characteristics of dasatinib- and imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cells. *Clin Cancer Res*. 14;6181-6186, 2008.
  13. Akahane D, Tauchi T, Okabe S, Nunoda K, Ohyashiki K. Activity of a novel Aurora kinase inhibitor against the T315I mutant form of BCR-ABL: in vitro and in vivo studies. *Cancer Sci*. 99;1251-1257, 2008.
  14. Yokoyama T, Miyazawa K, Naito M, Toyotake J, Tauchi T, Itoh M, Yuo A, Hayashi Y, Georgescu MM, Kondo Y, Kondo S, Ohyashiki K. Vitamin K2 induces autophagy and apoptosis simultaneously in leukemia cells. *Autophagy*. 4;629-640, 2008.
  15. Hidaka T, Nakahata S, Hatakeyama K, Hamasaki M, Yamashita K, Kohno T, Arai Y, Taki T, Nishida K, Okayama A, Asada Y, Yamaguchi R, Tsubouchi H, Yokota J, Taniwaki M, Higashi Y, Morishita K. Down-regulation of TCF8 is involved in the leukemogenesis of adult-T cell leukemia/lymphoma. *Blood*. 112:383-393, 2008.
  16. Hiwatari M, Ono R, Taki T, Hishiya A, Ishii E, Kitamura T, Hayashi Y, Nosaka T. Novel gain-of-function mutation in the extracellular domain of the PDGFRA gene in infant acute lymphoblastic leukemia with t(4;11)(q21;q23). *Leukemia*. 22:2279-2280, 2008.
  17. Kiyoi H, Shiotsu Y, Ozeki K, Yamaji S, Kosugi H, Umehara H, Arai H, Ishii K, Akinaga S, Naoe T. A novel FLT3 inhibitor FI-700 selectively suppress the growth of leukemia cells with FLT3 mutations. *Clin Cancer Res*. 13: 4575-4582, 2007.
  18. Kiyoi H, Yamaji S, Kojima S, Naoe T. JAK3 mutations occur in acute megakaryoblastic leukemia both in Down syndrome children and non-Down syndrome adults. *Leukemia*. 21: 574-576, 2007.
  19. Yanada M, Jinnai I, Takeuchi J, Ueda T, Miyawaki S, Tsuzuki M, Hatta Y, Usui N, Wada H, Morii T, Matsuda M, Kiyoi H, Okada M, Honda S, Miyazaki Y, Ohno R, Naoe T. Clinical features and outcome of T-lineage acute lymphoblastic leukemia in adults: A low initial white blood cell count, as well as a high count predict decreased survival rates. *Leuk Res*. 31: 907-914, 2007.
  20. Asou N, Yanagida M, Huang L, Yamamoto M, Shigesada K, Mitsuya H, Ito Y, and Osato M. Concurrent transcriptional deregulation of AML1/RUNX1 and GATA factors by the *AML1-TRPS1* chimeric gene in t(8;21)(24;q22) acute myeloid leukemia. *Blood*. 109:4023-4027, 2007.
  21. Asou N, Kishimoto Y, Kiyoi H, Okada M, Kawai Y, Tsuzuki M, Horikawa K, Matsuda M, Shinagawa K, Kobayashi T, Ohtake S, Nishimura M, Takahashi M, Yagasaki F, Takeshita A, Kimura Y, Iwanaga M, Naoe T, and Ohno R for the Japan Adult Leukemia Study Group. A randomized study with or without intensified maintenance chemotherapy in patients with acute promyelocytic leukemia who have become negative for PML-RARa transcript after consolidation therapy: The Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) APL97 study. *Blood*. 110:59-66, 2007.
  22. Fujisawa S, Ohno R, Shigeno K, Sahara N, Nakamura S, Naito K, Kobayashi M, Shinjo K, Takeshita A, Suzuki Y, Hashimoto H, Kinoshita K, Shimoya M, Kaise T, Ohnishi K. Pharmacokinetics of arsenic species in Japanese patients with relapsed or refractory acute promyelocytic leukemia treated with arsenic trioxide. *Cancer Chemother Pharmacol*. 59:485-93, 2007.
  23. Miyawaki S, Kawai Y, Takeshita A, Komatsu N, Usui N, Arai Y, Ishida F, Morii T, Kano Y, Ogura M, Doki N, Ohno R. Phase I trial of FLAGM with high doses of cytosine arabinoside for relapsed, refractory acute myeloid leukemia: study of the Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG). *Int J Hematol*. 86: 343-7, 2007.
  24. Ohyashiki K, Tauchi T, Kuroda M, Kodama A, Ohyashiki JH. Recurrent chromosomal aberration at 12q15 in chronic idiopathic myelofibrosis with or without JAK2(V617F) mutation. *Leukemia*. 21; 1578-1580, 2007.

2. 学会発表

1. Kuwatsuka Y, Kiyoi H, et al. Treatment with Bortezomib Overcomes Resistance to Imatinib in Ph-Leukemia Quiescent Cells. *The American Society of Hematology 51th Annual Meeting*. New Orleans USA. Dec, 2009
2. Goto E, Kiyoi H, et al. Double Genetic Mutations in PML-Rara Fusion Gene Confirmed in a Patient Showing Resistance to All-Trans Retinoic Acid and Arsenic-Trioxide Therapy. *The American Society of Hematology 51th Annual Meeting*. New Orleans USA. Dec, 2009
3. Mori Y, Kiyoi H, et al. FL-Dependent Wild-Type FLT3 Signals Reduce the Inhibitory Effects of FLT3 Inhibitors On Wild-Type and Mutant FLT3 Co-Expressing Cel. *The American Society of Hematology 51th Annual Meeting*. New Orleans USA. Dec, 2009
4. Katsumi A, Kiyoi H, et al. FLT3/ITD Regulates Leukemia Cell Adhesion through  $\alpha 4\beta 1$  Integrin and Pyk2 Signalin. *The American Society of Hematology 51th Annual Meeting*. New Orleans USA. Dec, 2009
5. Minami Y, Kiyoi H, et al. Treatment with mTOR Inhibitor, Everolimus (RAD001) Overcomes Resistance to Imatinib in Ph-Leukemia Quiescent or T315I-Mutated Cells. *The American Society of Hematology 51th Annual Meeting*. New Orleans USA. Dec, 2009
6. Tauchi T, Okabe S, Ashihara E, Kimura S, Maekawa T, Ohyashiki K. Combined effects of novel heat shock protein 90 inhibitor NVP-AUY922 and nilotinib in a random mutagenesis screen. *The American Society of Hematology 51th Annual Meeting*. New Orleans USA. Dec, 2009
7. Okabe S, Tauchi T, Kimura S, Maekawa T, Ohyashiki K. The efficacy of dual PI3K and mTOR inhibitor, BEZ235 against BCR-ABL positive cells include ABL kinase domain mutation in combination with nilotinib. *The American Society of Hematology 51th Annual Meeting*. New Orleans USA. Dec, 2009
8. Takeshita A, Shinjo K, Watanabe Y, Maekawa M, Ohnishi K, Sugimoto Y, Ohno R. Internalization speed may be one of the factors in the efficacy of CMC-544 (inotuzumab ozogamicin), the newly developed calicheamicin-conjugated antibody. *68<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Cancer Society* Yokohama Japan. Oct, 2009
9. Takeshita A, Yamakage N, Shinjo K, Hirano I, Ono T, Fujihara H, Watanabe H, Iino K, Hashimoto D, Maekawa M, Ohnishi K, Ohno R. CMC-544, an anti-CD22 immuno-conjugate of calicheamicin, decreases the level of compliment inhibitory factors on malignant B-cell lymphoma cells. *14<sup>th</sup> congress of European Society of Hematology* Berlin Germany. Jun 2009
10. Miyawaki S, Ohtake S, Fujisawa S, Kiyoi H, Shinagawa K, Usui N, Miyamura K, Nishimura M, Miyazaki Y, Nishii K, Nagai T, Yamane T, Taniwaki M, Takahashi M, Yagasaki F, Kimura Y, Asou N, Honda S, Ohnishi K, Naoe T, and Ohno R. Long-Term Follow-up of the Randomized JALSG AML 201 Study Comparing High Dose Ara-C Therapy with Conventional Consolidation Therapy in Adult Acute Myeloid Leukemia (AML). *The American Society of Hematology 50th Annual Meeting*. San Francisco USA. Dec, 2008
11. Ohtake S, Miyawaki S, Fujita H, Kiyoi H, Shinagawa K, Usui N, Miyamura K, Nishimura M, Miyazaki Y, Nishii K, Nagai T, Yamane T, Taniwaki M, Takahashi M, Yagasaki F, Kimura Y, Asou N, Honda S, Ohnishi K, Naoe T, and Ohno R. Updated Results of JALSG AML201 Study Comparing Intensified Daunorubicin with Idarubicin in Patients with De Novo Acute Myeloid Leukemia: Effect of Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *The American Society of Hematology 50th Annual Meeting*. San Francisco USA. Dec, 2008
12. Abe A, Kiyoi H, et al. Retention but Significant Reduction of BCR-ABL Transcript in Hematopoietic Stem Cells in Chronic Myelogenous Leukemia after Imatinib Therapy. *The American Society of Hematology 50th Annual Meeting*. San Francisco USA. Dec, 2008
13. Minami Y, Kiyoi H, et al. Treatment with Hsp90 Inhibitor, 17-AAG Overcomes Resistance to Small Molecule FLT3-Inhibitors in FLT3/ITD-Positive Leukemia Cells Harboring N676K-Mutation. *The American Society of Hematology 50th Annual Meeting*. San Francisco USA. Dec, 2008
14. Ishikawa Y, Kiyoi H, et al. The Genotype Consisting of Complex Karyotype and TP53 Gene Mutation Is Specific to Acute Myeloid Leukemia with Multilineage Dysplasia. *The American Society of Hematology 50th Annual Meeting*. San Francisco USA. Dec, 2008

15. Katsumi A, Kiyoi H, et al. Prognostic Implication and Biological Roles of RhoH in Acute Myeloid Leukemia. *The American Society of Hematology 50th Annual Meeting*. San Francisco USA. Dec, 2008
16. Shiotsu Y, Kiyoi H, et al. KW-2449, a Novel Multi-Kinase Inhibitor, Suppresses the Growth of Imatinib-Resistant Ph+ Leukemia Including BCR-ABL/T315I Both in Vitro and in Vivo. *The American Society of Hematology 50th Annual Meeting*. San Francisco USA. Dec, 2008
17. Miyawak S, Kiyoi H, et al. Long-Term Follow-up of the Randomized JALSG AML 201 Study Comparing High Dose Ara-C Therapy with Conventional Consolidation Therapy in Adult Acute Myeloid Leukemia (AML). *The American Society of Hematology 50th Annual Meeting*. San Francisco USA. Dec, 2008
18. Sugimoto T, Kiyoi H, et al. Relationship Between Post-Translational Modification of CD20 Protein and the Responsiveness to Rituximab Treatment. *The American Society of Hematology 50th Annual Meeting*. San Francisco USA. Dec, 2008
19. Wakita A, Ohtake S, Takada S, Yagasaki F, Komatsu H, Miyazaki Y, Kubo K, Kimura Y, Takeshita A, Adachi A, Kiyoi H, Yamaguchi T, Yoshida M, Ohnishi K, Miyawaki S, Naoe T, Ueda R, Ohno R. A Randomized Trial Comparing Individualized Vs. Non-Individualized Treatment for Elderly Acute Myeloid Leukemia: JALSG GML200 Study. *The American Society of Hematology 50th Annual Meeting*. San Francisco USA. Dec, 2008
20. Tauchi T, Akahane D, Okabe S, Ashihara E, Kimura S, Maekawa T, Ohyashiki K. Combined effects of novel heat shock protein 90 inhibitor NVP-AUY922 and nilotinib against mutant forms of BCR-ABL. *The American Society of Hematology 50th Annual Meeting*. San Francisco USA. Dec, 2008
21. Okabe S, Tauchi T, Kimura S, Maekawa T, Ohyashiki K. The efficacy of histone deacetylase inhibitor, vorinostat against BCR-ABL positive leukemia cells include ABL kinase domain mutation in monotherapy and in combination with dasatinib. *The American Society of Hematology 50th Annual Meeting*. San Francisco USA. Dec, 2008
22. Okabe S, Tauchi T, Kimura S, Maekawa T, Ohyashiki K. The analysis of HDAC inhibitor, vorinostat efficacy against wild type and BCR-ABL mutant positive leukemia cells in monotherapy and in combination with a pan-aurora kinase inhibitor, MK-0457. *The American Society of Hematology 50th Annual Meeting*. San Francisco USA. Dec, 2008
23. Nanri T, Iwanaga E, Matsuno N, Kawakita T, Suzushima H, Kawano F, Mitsuya H, and Asou N. A JAK2-V617F activating mutation in addition to C-KIT and FLT3 mutations is associated with clinical outcome in patients with t(8;21)(q22;q22;) acute myeloid leukemia. *The American Society of Hematology 49th Annual Meeting*. Atlanta USA. Dec, 2007
24. Jo A, Tsukimoto I, Ishii E, Asou N, Igarashi T, Hayashi Y, Ichikawa H. Age-associated difference in gene expression of pediatric myelomonocytic and *MLL*-rearranged AML. *The American Society of Hematology 49th Annual Meeting*. Atlanta USA. Dec, 2007
25. Iwasaki T, Kiyoi H, et al. Prognostic Implications and Biological Roles of RhoH in Acute Myeloid Leukemia. *The American Society of Hematology 49th Annual Meeting*. Atlanta USA. Dec, 2007
26. Narimatsu H, Kiyoi H, et al. Clinical Characteristics and Outcomes in Patients with t(8;21) Acute Myeloid Leukemia in Japan. *The American Society of Hematology 49th Annual Meeting*. Atlanta USA. Dec, 2007
27. Ishikawa Y, Kiyoi H, et al. Comprehensive Analysis of Genetic Alterations in Acute Myeloid Leukemia According to the WHO Classification. *The American Society of Hematology 49th Annual Meeting*. Atlanta USA. Dec, 2007
28. Abe A, Kiyoi H, et al. Analysis of the Role of Wnt Signaling for the Interaction between Leukemia Cells and Stroma. *The American Society of Hematology 49th Annual Meeting*. Atlanta USA. Dec, 2007
29. Sato T, Kiyoi H, et al. Activating JAK3 Mutations in Transient Myeloproliferative Disorder and Acute Megakaryoblastic Leukemia Accompanying Down Syndrome. *The American Society of Hematology 49th Annual Meeting*. Atlanta USA. Dec, 2007
30. Shiotsu Y, Kiyoi H, et al. KW-2449, a Novel Multi-Kinase Inhibitor Against FLT3, Abl, FGFR1 and Aurora, Suppresses the Growth of AML Both In Vitro and In Vivo. *The American Society of Hematology 49th Annual Meeting*. Atlanta USA. Dec, 2007
31. Takeshita A, Shinjo K, Yamakage N, Ono T,

- Hirano I, Okinaka K, Matsui H, Nakamura S, Shigeno K, Maekawa M, Ohnishi K, Ohno R. Reduced effect of inotuzumab ozogamicin (CMC544) on P-glycoprotein positive malignant B cells and its restoration by multidrug resistance modifiers. *Blood*. 2007; 110 (Suppl. 1): 702a. **The American Society of Hematology 49th Annual Meeting**. Atlanta USA. Dec, 2007
32. Yamakage N, Takeshita A, Shinjo K, Ono T, Matsui H, Nakamura S, Shigeno K, Maekawa M, Ohnishi K, Ohno R. Cell features and quantitative alternation of target molecule of malignant B cells treated with inotuzumab ozogamicin (CMC544) alone or in combination with rituximab. *Blood*. 2007; 110 (Suppl. 1): 698a. **The American Society of Hematology 49th Annual Meeting**. Atlanta USA. Dec, 2007
33. Tauchi T, et al. Combined effect of a pan-aurora kinase inhibitor MK-0457 and dasatinib against T315I BCR-ABL: in vitro and in vivo studies. **The American Society of Hematology 49th Annual Meeting**. Atlanta USA. Dec, 2007
34. Chinen Y, Taki T, Nishida K, Shimizu D, Okuda T, Yoshida N, Kobayashi C, Koike K, Tsuchida M, Hayashi Y, Taniwaki M. Cloning of AML1-LAF4 fusion gene in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia with t(2;21)(q11;q22) by bubble PCR method for cDNA. **The American Society of Hematology 49th Annual Meeting**. Atlanta USA. Dec, 2007
35. Tanaka R, Kuroda J, Ashihara E, Ishikawa T, Taki T, Hirai M, Majima S, Taniwaki M, Maekawa T, Kimura S. Detection of the V617F mutation of JAK2 using a novel fully automated SNP super-rapid detector. **The American Society of Hematology 49th Annual Meeting**. Atlanta USA. Dec, 2007

F. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む)

1. 特許取得  
該当無し。
2. 実用新案登録  
該当無し。
3. その他  
なし。

### Ⅲ. 研究分担者（総合研究報告書）

「急性骨髄性白血病における遺伝子異常による予後予測因子の解析」  
研究分担者 麻生範雄 熊本大学大学院医学薬学研究部血液内科学 准教授

研究要旨

急性骨髄性白血病は染色体転座や遺伝子変異などによる複数の遺伝子異常を基盤に発症し、病態や治療反応性が異なることが明らかにされつつある、しかし、まだ遺伝子異常が明らかでない病型も多く、その解析は重要な課題である。自施設の白血病症例146例におけるFLT3、CEBPA、NPM1、WT1およびJAK2遺伝子変異を検索し、その組み合わせが予後予測に有用であることが示した。また、これらの遺伝子変異を全く認めない症例群の予後が極めて不良なことを明らかにした。さらに、これらの既知の遺伝子変異がない症例群において新しい転写因子の遺伝子変異を同定し、その機能を解析した。さらに、CEBPA遺伝子変異による家族性白血病例を解析し、発症機構に関する重要な知見を得た。今後はこれらの知見をJALSGにおいて収集した同一治療プロトコール登録例の検体を用いて検証し、予後予測因子としての意義を確立する。

A. 研究目的

急性骨髄性白血病（AML）の治療反応性は病型により大きく異なり、年齢と染色体異常が最も大きな予後予測因子である。染色体異常による予後良好群は約30%、予後不良群は10%を占め、残る60%は予後中間群とされる。予後中間群の治療反応性には種々混在しており、その予後の幅は広い。臨床的な治療方針、例えば同種造血幹細胞移植の適応の決定に当たっては予後予測は不可欠であり、染色体異常に加えて有用な分類が求められている。最近、遺伝子変異と治療反応性の関係が徐々に明らかにされつつある。例えば受容体型チロシンキナーゼFLT3の膜近傍部の繰り返し変異（FLT3-ITD）は予後不良例に多く、NPM1の変異は予後良好例に多い。いずれも正常染色体例に多く認め、予後予測因子として期待されて、2008年の改訂WHO分類にも一部は取り入れられた。これまでひとつひとつの遺伝子変異については予後との関係が報告されてきたが、いくつもの遺伝子変異を網羅的に解析して相対的な関係を検討する解析はほとんどなく、日本人における報告も少ない。本研究では多数例のAMLの遺伝子変異を網羅的に解析し、予後予測因子としての有用性を検討することを目的とする。また、既知の異常を認めない症例については新たな遺伝子変異を見いだすことを目的とする。さらに、得られた知見を同一治療プロトコール登録例の検体を用いて検証し、予後予測因子としての意義を確立する。

B. 研究方法

AML 症例において既知の異常として FLT3、NPM1、N-RAS、K-RAS、CEBPA、MLL、AML1 および p53 等の遺伝子変異の有無を PCR 法と直接シ

ークエンス法で解析する。遺伝子変異を認めない症例において新しい遺伝子変異の同定を試みる。とくに骨髄系細胞の分化増殖を調節する転写因子を網羅的に解析する。新しく同定した遺伝子変異を細胞内へ導入して機能解析を行う。さらに、遺伝子変異と病態とくに治療反応性との関係を解析し、日本人の AML 症例における遺伝子変異の予後予測因子としての有用性を検討する。

C. 研究結果

自施設のAML症例146例においてFLT3、NPM1、CEBPA、WT1およびJAK2遺伝子変異を検索した。FLT3-ITDを27例(18%)、FLT3-TKDを10例(7%)、NPM1変異を33例(23%)、CEBPA変異を17例(12%)、WT1変異を7例(5%)およびJAK2変異を2例(1%)に認めた。FLT3-ITDとNPM1変異は重複例が多く、全体では45%にこれらの遺伝子変異を認めた。正常核型AMLの53例では75%に遺伝子変異を認めた。正常核型AMLにおいてはFLT3-ITD陽性例とともに遺伝子変異を認めない症例群の予後が不良であった。さらに、これらの既知の遺伝子変異がない症例群において新しい転写因子の欠失による遺伝子変異を同定した。Hela細胞へこの遺伝子を導入したところ、野生型では増殖抑制を来すのに対し、変異型では増殖亢進を示した。また、CEBPA遺伝子変異を認める家族性AML例を見いだした。家族内で共通のN端変異と異なるC端変異を認め、N端変異はC端変異を促進して発症に至ることが強く示唆された。今後はこれらの知見をJALSGにおいて収集する同一治療

プロトコール登録例の検体を用いて検証し、予後予測因子としての意義を確立する。また、検体収集システムの確立、整備を進めることにより質の高い臨床研究の推進をサポートする。

D. 健康危険情報  
該当無し。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzushima H, Wada N, Yamasaki H, Eto K, Shimomura T, Kugimiya MH, Horikawa K, Nishimura S, Tsuda H, Mitsuya H, Asou N. Low-dose cytarabine and aclarubicin in combination with granulocyte colony-stimulating factor for elderly patients with previously untreated acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2010 (in press).
2. Jacob B, Osato M, Yamashita N, Wang CQ, Taniuchi I, Littman DR, Asou N, and Ito Y. Stem cell exhaustion due to Runx1 deficiency is prevented by Evi5 activation in leukemogenesis. *Blood*. 115:1610-1620, 2010.
3. Nanri T, Uike N, Kawakita T, Iwanaga E, Mitsuya H, and Asou N. A family harboring a germ-line N-terminal C/EBP $\alpha$  mutation and development of acute myeloid leukemia with an additional somatic C-terminal C/EBP $\alpha$  mutation. *Genes Chromosomes Cancer*. 49:237-241, 2010.
4. Tatetsu H, Matsuno F, Takatsu N, Miyake H, Hoshino K, Nosaka K, Horikawa K, Hata H, Mitsuya H and Asou N. Treatment of therapy-related acute myeloid leukemia occurring in elderly non-Hodgkin lymphoma patients with low-dose cytarabine, aclarubicin and granulocyte colony-stimulating factor. *Leuk Res*. 33:197-200, 2009.
5. Jo A, Tsukimoto I, Ishii E, Asou N, Mitani S, Shimada A, Takashi Igarashi T, Hayashi Y and Ichikawa H. Age-associated difference in gene expression of pediatric acute myelomonocytic lineage leukemia (FAB M4 and M5 subtypes) and its correlation with prognosis. *Br J Haematol*. 144:917-929, 2009.
6. Nanri T, Iwanaga E, Fujie S, Yamada Y, Horikawa K, Mitsuya H and Asou N. Micafungin-induced immune hemolysis attacks. *Int J Hematol*. 89:139-141, 2009.
7. Iwanaga E, Nanri T, Matsuno N, Kawakita T, Mitsuya H, and Asou N. A JAK2-V617F activating mutation in addition to KIT and FLT3 mutations is associated with clinical outcome in patients with t(8;21)(q22;q22) acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 94:433-435, 2009.
8. Iwanaga E, Nakamura M, Nanri T, Kawakita T, Horikawa K, Mitsuya H, Asou N. Acute promyelocytic leukemia harboring a *STAT5B-RARA* fusion gene and a G596V missense mutation in the *STAT5B* SH2 domain of the *STAT5B-RARA*. *Euro J Haematol*. 83:499-501, 2009.
9. Powell JA, Thomas D, Barry EF, Kok CH, McClure BJ, Tsykin A, To LB, Brown A, Lewis ID, Herbert K, Goodall GJ, Speed TP, Asou N, Jacob B, Osato M, Haylock DN, Nilsson SK, D'Andrea RJ, Lopez AF, and Guthridge MA. Expression profiling of a hemopoietic cell survival transcriptome implicates osteopontin as a functional prognostic factor in AML. *Blood*. 114:4859-4870, 2009.
10. Fujiwara S, Miyake H, Nosaka K, Yoshida M, Ishihara S, Horikawa K, Yonemura Y, Iyama K, Mitsuya H, and Asou N. Hairy cell leukemia responsive to anti-thymocyte globulin used as immunosuppressive therapy for aplastic anemia. *Int J Hematol*. 90:471-475, 2009.
11. Yamada Y, Ito K, Watanabe Y, Nosaka K, Horikawa K, Hidaka M, Kawano F, Sasaki Y, Mitsuya H, Asou N. Allogeneic bone marrow transplantation after l-asparaginase-induced pancreatitis in a patient with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 32:1944-1946, 2008.
12. Asou N, Yanagida M, Huang L, Yamamoto M, Shigesada K, Mitsuya H, Ito Y, and Osato M. Concurrent transcriptional deregulation of *AML1/RUNX1* and *GATA* factors by the *AML1-TRPS1* chimeric gene in t(8;21)(24;q22) acute myeloid leukemia. *Blood*. 109:4023-4027, 2007.
13. Asou N, Kishimoto Y, Kiyoi H, Okada M, Kawai Y, Tsuzuki M, Horikawa K, Matsuda M, Shinagawa K, Kobayashi T, Ohtake S, Nishimura M, Takahashi M, Yagasak F, Takeshita A, Kimura Y, Iwanaga M, Naoe T, and Ohno R for the Japan Adult Leukemia Study Group. A randomized study with or without intensified maintenance chemotherapy in patients with acute promyelocytic leukemia who have become negative for PML-RAR $\alpha$  transcript after consolidation therapy: The Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) APL97 study. *Blood*. 110:59-66, 2007.

14. Asou N, Izuno Y, Okubo T, Ide K, Ueno H, Kawakita M, Mitsuya H, Hata H. Oral melphalan, dexamethasone and thalidomide for the treatment of refractory multiple myeloma. *Int J Hematol*. 86:69-71, 2007.
2. 学会発表
- 堀川健太郎、石原園子、河北敏郎、麻生範雄、満屋裕明、川口辰哉 顆粒リンパ球白血病における好中球減少発生機序:NKG2D-NKG2Dリガンド系を介した造血障害の関与 第71回日本血液学会総会 2009年10月23-25日、京都
  - 南里知子、麻生範雄、日高道弘、山田恭裕、宮家宏定、堀川健太郎、満屋裕明: 移植後再発ALLに対するリツキシマブ療法 第71回日本血液学会総会 2009年10月23-25日、京都
  - 藤原志保、宮家宏定、野坂生郷、石原園子、吉田稔、堀川健太郎、米村雄士、猪山賢一、満屋裕明、麻生範雄 再生不良性貧血と診断され、ATGが奏効したhairy cell leukemia 第71回日本血液学会総会 2009年10月23-25日、京都
  - 久間粧子、川口辰哉、南里知子、田原由紀子、濱田哲暢、堀川健太郎、麻生範雄、満屋裕明 ニロチニブが有効であったイマチニブ耐性および不耐容の慢性骨髄性白血病の2症例 第71回日本血液学会総会 2009年10月23-25日、京都
  - 河野和、中村美紀、星乃光有、堀川健太郎、満屋裕明、麻生範雄 赤芽球癆とサイトメガロウイルス感染症を併発したB - CLL 第71回日本血液学会総会 2009年10月23-25日、京都
  - 麻生範雄、南里知子、岩永栄作、満屋裕明 APL治療後に併発したt(5;12)陽性慢性骨髄単球性白血病に対する少量イマチニブ療法 第71回日本血液学会総会 2009年10月23-25日、京都
  - 宮下要、本多絵美、崔日承、油布祐二、阿南建一、麻生範雄、鵜池直邦 カップ様 (cup-like) の核形態を呈するHLA-DR陰性急性骨髄性白血病の臨床病理学的解析 第71回日本血液学会総会 2009年10月23-25日、京都
  - Miyawaki S, Ohtake S, Fujisawa S, Kiyoi H, Shinagawa K, Usui N, Miyamura K, Nishimura M, Miyazaki Y, Nishii K, Nagai T, Yamane T, Taniwaki M, Takahashi M, Yagasaki F, Kimura Y, Asou N, Honda S, Ohnishi K, Naoe T, and Ohno R. Long-Term Follow-up of the Randomized JALSG AML 201 Study Comparing High Dose Ara-C Therapy with Conventional Consolidation Therapy in Adult Acute Myeloid Leukemia (AML). *The American Society of Hematology 50th Annual Meeting*. San Francisco USA. Dec, 2008
  - Ohtake S, Miyawaki S, Fujita H, Kiyoi H, Shinagawa K, Usui N, Miyamura K, Nishimura M, Miyazaki Y, Nishii K, Nagai T, Yamane T, Taniwaki M, Takahashi M, Yagasaki F, Kimura Y, Asou N, Honda S, Ohnishi K, Naoe T, and Ohno R. Updated Results of JALSG AML201 Study Comparing Intensified Daunorubicin with Idarubicin in Patients with De Novo Acute Myeloid Leukemia: Effect of Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *The American Society of Hematology 50th Annual Meeting*. San Francisco USA. Dec, 2008
  - 和田奈緒子、鈴島仁、山崎浩、江藤健一郎、釘宮倫子、下村泰三、西村慎太郎、堀川健太郎、津田弘之、満屋裕明、麻生範雄 ハイリスク骨髄異形成症候群に対する少量 cytarabine, aclarubicinおよびG-CSF (CAG) 療法 第70回日本血液学会総会 2008年10月10-12日 京都
  - 山口俊一朗、南里知子、宮家宏定、堀川健太郎、麻生範雄、満屋裕明 T-ALLの寛解導入中に顕在化したCharcot-Marie-Tooth病 第70回日本血液学会総会 2008年10月10-12日 京都
  - 石原園子、本田由美、原田奈穂子、野坂生郷、松野文彦、堀川健太郎、麻生範雄、満屋裕明、猪俣裕紀洋、猪山賢一 亜型分類困難なmonomorphic post-transplant lymphoproliferative disorder 第70回日本血液学会総会 2008年10月10-12日 京都
  - 野坂生郷、南里知子、江良沢実、松野文彦、立津央、中村美紀、麻生範雄、満屋裕明 当科で経験したEBウイルス感染症によるリンパ増殖性疾患の4例 第70回日本血液学会総会 2008年10月10-12日 京都
  - 鈴島仁、和田奈緒子、山崎浩、津田弘之、江藤健一郎、西村慎太郎、下村泰三、釘宮倫子、堀川健太郎、満屋裕明、麻生範雄 高齢者急性骨髄性白血病に対する少量 cytarabine, aclarubicinおよびG-CSF (CAG) 療法 第70回日本血液学会総会 2008年10月10-12日 京都
  - 岩永栄作、南里知子、河北敏郎、松野直史、満屋裕明、麻生範雄 急性骨髄性白血病におけるFLT3、CEBPA、NPM1、WT1遺伝子変異 第70回日本血液学会総会 2008年10月10-12日 京都
  - 小野孝明、竹下明裕、岸本裕司、清井仁、岡田昌也、河合泰一、都築基弘、松田光弘、品川克至、小林透、大竹茂樹、西村美樹、高橋正知、矢ヶ崎史治、大西一功、木村之彦、岩永正子、麻生範雄、直江知樹、大野

- 竜三 急性前骨髄球性白血病における付加染色体異常の意義—JALSG APL97解析 第70回日本血液学会総会 2008年10月10-12日 京都
17. 南里知子、麻生範雄、岸本裕司、清井仁、岡田昌也、河合泰一、都築基弘、松田光弘、品川克至、小林透、大竹茂樹、西村美樹、高橋正知、矢ヶ崎史治、竹下明裕、木村之彦、岩永正子、直江知樹、大野竜三 急性前骨髄球性白血病におけるRA症候群 (JALSG APL97研究) 第70回日本血液学会総会 2008年10月10-12日 京都
  18. Tomoko Nanri, Eisaku Iwanaga, Naofumi Matsuno, Toshiro Kawakita, Hitoshi Suzushima, Fumio Kawano, Hiroaki Mitsuya, and Norio Asou. A JAK2-V617F activating mutation in addition to C-KIT and FLT3 mutations is associated with clinical outcome in patients with t(8;21)(q22;q22;) acute myeloid leukemia. *The American Society of Hematology 49th Annual Meeting*. Atlanta USA. Dec, 2007
  19. Aoi Jo, Ichiro Tsukimoto, Eiichi Ishii, Norio Asou, Takashi Igarashi, Yasuhide Hayashi, Hitoshi Ichikawa. Age-associated difference in gene expression of pediatric myelo-monocytic and MLL-rearranged AML. *The American Society of Hematology 49th Annual Meeting*. Atlanta USA. Dec, 2007
  20. Fan J, Asou N, Matsuoka M. Clustering of hypomethylated DNA regions associated with transcriptional changes in B-CLL.第66回日本癌学会学術総会 2007年10月3日-5日横浜、P. 149
  21. Sonoki T, Akasaka T, Siebert R, Dyer M, Asou N. MicroRNA125b-1 is a recurrent target gene of IgH alterations in precursor B-acute lymphoblastic leukemia. 第66回日本癌学会学術総会 2007年10月3日-5日横浜、P.159
  22. Jo A, Tsukimoto I, Ishii E, Asou N, Igarashi T, Hayashi Y, Ichikawa H. Age-associated difference in gene expression of myelo-monocytic and MLL-rearranged AML. 66回日本癌学会学術総会 2007年10月3日-5日横浜、P.196
  23. 麻生範雄、南里知子、山内慶子、河北敏郎、岩永栄作、堀川健太郎、満屋裕明 APLの治療から5年後に発症したt(5;12)陽性慢性骨髄単球性白血病 第69回日本血液学会総会、第49回日本臨床血液学会総会 2007年10月11-13日横浜 臨床血液 2007;48:1117
  24. 岩永栄作、南里知子、河北敏郎、松野直史、満屋裕明、麻生範雄 急性骨髄性白血病におけるFLT3、CEBPA、NPM1遺伝子変異 第69回日本血液学会総会、第49回日本臨床血液学会総会 2007年10月11-13日横浜 臨床血液 2007;48:861
  25. 松野文彦、立津央、高津典孝、星乃光有、宮家宏定、中村美紀、原田菜穂子、野坂生郷、堀川健太郎、畑裕之、満屋裕明、麻生範雄 Rituximab治療後のあけ性リンパ腫における治療関連AML 第69回日本血液学会総会、第49回日本臨床血液学会総会 2007年10月11-13日横浜 臨床血液 2007;48:994
  26. 河野和、中村美紀、岩永栄作、門野裕加里、南里知子、河北敏郎、星乃光有、堀川健太郎、畑裕之、満屋裕明、麻生範雄 Stat5b-RAR $\alpha$ 融合遺伝子を認めたAPL 第69回日本血液学会総会、第49回日本臨床血液学会総会 2007年10月11-13日横浜 臨床血液 2007;48:1032
  27. 山田恭裕、渡邊祐子、野坂生郷、立津央、堀川健太郎、麻生範雄、満屋裕明、伊藤清治、佐々木裕、日高道広 L-アスパラギナーゼによる重症急性膵炎より回復し、同種骨髄移植を施行したALL 第69回日本血液学会総会、第49回日本臨床血液学会総会 2007年10月11-13日横浜 臨床血液 2007;48:1111
  28. 河北敏郎、堀川健太郎、西本英史、米村雄士、畑裕之、麻生範雄、川口辰哉、満屋裕明 間接リュウマチ経過中に好中球減少を呈した $\gamma\delta$ T細胞増多症 第69回日本血液学会総会、第49回日本臨床血液学会総会 2007年10月11-13日横浜 臨床血液 2007;48:1200
  29. 南里知子、藤江里美、山田恭裕、岩永栄作、堀川健太郎、満屋裕明、麻生範雄 ミカファンギンによる血管内溶血発作 第69回日本血液学会総会、第49回日本臨床血液学会総会 2007年10月11-13日横浜 臨床血液 2007;48:1205
- F. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む)
1. 特許取得  
該当無し。
  2. 実用新案登録  
該当無し。
  3. その他  
なし。

「提案研究の審査と遺伝子解析」

研究分担者 清井 仁 名古屋大学 医学部附属病院 難治感染症部 講師

研究要旨

白血病の病態に関与する分子群の遺伝子変異、発現変化を臨床的データとの関連性を考慮しつつ網羅的に解析し、白血病の分子病態に基づく細分化から最適な治療法の選択と治療成績の向上を目的として、成人急性骨髄性白血病(AML)における遺伝子変異の解析を網羅的に行い、現在、AMLの病型分類に用いられているWHO分類の分子基盤に基づく詳細な層別化を行った。イマチニブ治療を1年以上受けている慢性期慢性骨髄性白血病(CML)患者における血中イマチニブ濃度を測定し、治療効果との相関性及び、治療中の患者血漿が有するBCR-ABLキナーゼ阻害活性(Plasma inhibitory activity, PIA)を検討し、血中イマチニブ濃度の生物学的意義を明らかにした。日本成人白血病治療共同研究グループ(JALSG)と共同して、新たに1500例の未治療成人AML患者を対象に染色体異常および網羅的遺伝子変異解析を行い、分子病態に基づく層別化因子の探索とDNA、RNAの遺伝子解析を目的とした中央保存を行うJALSG AML209 GS研究を開始した。

A. 研究目的

急性骨髄性白血病(AML)のWHO分類では、一部の染色体転座を含む発症基盤に基づく層別化が行われているが、AMLの病態発症には、細胞の増殖、生存に関与する遺伝子の異常(class I 遺伝子異常)と分化、自己複製に関与する遺伝子の異常(class II 遺伝子異常)が共に獲得されることが必要とされている。AMLの治療法層別化を行う上では、AMLを分子基盤に基づいて詳細に層別化を行うことが重要であると考えられる。本研究では、AMLにおける遺伝子変異の解析を網羅的に行い、WHO分類別にみた分子病態の特徴を明らかにすることを目的とした。また、イマチニブ(グリベック<sup>®</sup>)投与中の慢性期慢性骨髄性白血病(CML-CP)患者における血中イマチニブ濃度と治療効果との相関性を検証するために、イマチニブによる治療開始後1年以上を経過した慢性期CML患者におけるトラフ時の血中イマチニブ濃度と治療開始12ヶ月の時点でのmajor molecular response(MMR)達成率との相関性を後方視的に明らかにする。また、トラフ時患者血漿によるBCR/ABLキナーゼ抑制効果(Plasma inhibitory activity, PIA)の治療効果を予測するサロゲートマーカーとしての有用性と血中濃度測定の生物学的意義の検討を行った。

B. 研究方法

AMLにおける網羅的遺伝子変異解析

WHO分類に基づき診断および分類され、日本成人白血病研究グループ(JALSG)のAML治療プロトコールに準じて行われた成人AML150例を対象にFLT3, NPM1, CEBPA, cKIT, N-RAS, TP53, AML1,

MLL-partial tandem duplication(PTD) 遺伝子変異の解析を行い、後方視的にWHO分類別にそれら遺伝子変異と臨床病態の関係について検討し解析を行った。

イマチニブ投与中のCML患者における血中イマチニブ濃度と治療効果との相関性の検証

イマチニブによる治療を1年以上受けているCML-CP患者65例においてトラフ時イマチニブ血中濃度(Cmin)を測定した。

治療開始12ヶ月の時点でのMMR達成例と非達成例間のCmin値の相違を検討した。また、ROC解析によりMMR達成に関する閾値設定を試みた。トラフ時患者血漿によるBCR-ABLキナーゼならびにSTAT5に対するPIAを検討し、治療効果ならびにCminとの相関性を検討した。

本研究は名古屋大学医学部倫理委員会の承認を受け、文書による患者同意を得た上で実施した。

C. 研究結果

AMLにおける網羅的遺伝子変異解析

AML全体での遺伝子変異はFLT3遺伝子変異が約24%、次いでNPM1遺伝子変異が約20%、CEBPA遺伝子変異が約11%と高頻度に認められた。WHO分類別にみると、Recurrent Genetic Abnormalities(RGA)群ではFLT3, cKIT遺伝子変異が見られる一方で、NPM1, CEBPA遺伝子変異は認められず、またNot Otherwise categorized(NOC)群及びMultilineage

Dysplasia(MLD) 群では様々な遺伝子変異の存在が認められ、中でもTP53遺伝子変異はMLD群において有意に高頻度に認められた。このようにWHO分類別に存在する遺伝子異常に特徴が認められることが明らかになった。これらの遺伝子異常に基づきWHO分類の更なる細分化を試みた。

まず、recurrent genetic abnormalities群での遺伝子変異について検討したところ、t(8;21)、inv(16)を有するcore binding factor (CBF)白血病では、FLT3遺伝子変異に加え、cKIT遺伝子変異が認められ、FLT3、もしくはcKITいずれかの遺伝子変異有する症例は予後良好とされるCBF白血病の中でも明らかに不良な無病生存率を示し、予後不良であることが示された。(図1)

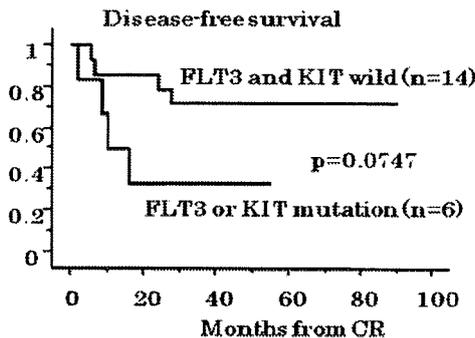


図1.CBF-AML患者における、FLT3遺伝子もしくはcKIT遺伝子変異を有する群と有しない群での無病生存率 (DFS) 曲線

次にnot otherwise categorized群について検討を行った。この疾患群では種々の遺伝子変異が認められ、染色体異常の有無で比較をすると、染色体正常核型群では、既報の通り、FLT3,NPM1,CEBPA遺伝子変異が高頻度に認められた。また、染色体異常を有する群では様々な遺伝子変異が認められたが、染色体正常症例で多くみられたCEBPA遺伝子変異は少数しか認められなかった。not otherwise categorized群全体で予後について検討を行ったところ、CEBPA遺伝子変異が予後良好因子として、FLT3-interna tandem duplication(ITD)変異が予後不良因子として抽出された(図2)。また、いずれの遺伝子変異も有しない症例群の予後の細分化が可能な遺伝子変異は認められなかった。

Multilineage dysplasia群について、染色体異常別に見た、遺伝子変異の有無について検討を行った。まず、染色体複雑核型の症例群では10例中8例でTP53遺伝子変異がみとめられた。今回、検討した150例全体で見てもTP53遺伝子変異を有する12例中9例はAML-MLDに分類され、その内8例が染色体複雑核型であった。一方、染色体複雑核型を有する17例中10例はAML-MLDに分類されるとともに、9例にTP53遺伝子変異を認めた。このようにTP53遺伝子

変異と染色体複雑核型を有する症例はAML-MLD群に特徴的に存在した。また、このような症例群は、予後不良であるAML-MLD群においても有意に低い寛解導入率 (25%, p=0.03) と生存率 (p=0.0016) を示した。

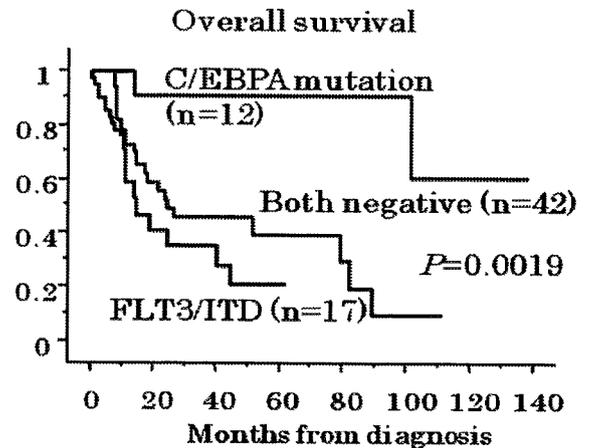


図2. AML-NOC患者における、CEBPA遺伝子変異を有する症例群、FLT3/ITD変異を有する症例群、いずれの遺伝子変異も有しない症例群での全生存率 (OS) 曲線

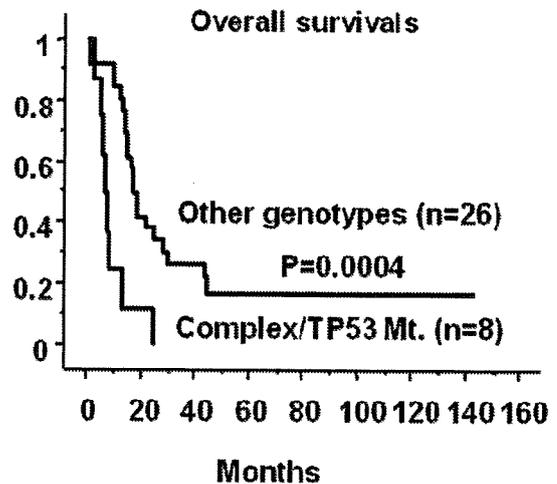
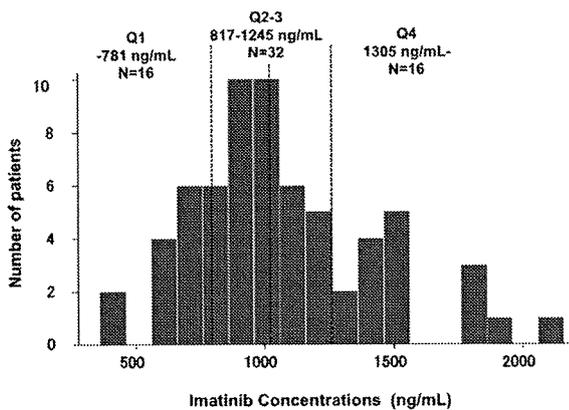


図3.AML-MLD患者における、染色体複雑核型かつTP53遺伝子変異を有する群とそれ以外の症例群での全生存率 (OS) 曲線

また、AMLで予後中間群とされている染色体正常核型AMLにおいてもMLD群とNOC群では存在する遺伝子異常に相違が認められ、NPM1遺伝子変異はMLD群に有意に高頻度に認められた (56%, 25%, p=0.027)。予後について検討を行ったところ、MLD群は有意に低い生存率 (p=0.02) を示した。

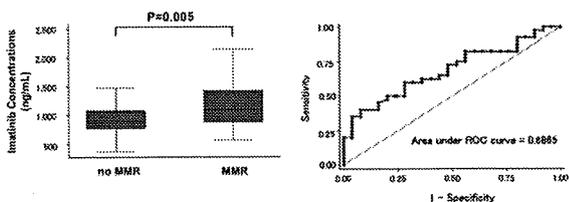
イマチニブ投与中のCML患者における血中イマチニブ濃度と治療効果との相関性の検証  
イマチニブ血中濃度中央値は1006 ng/mLで

361~2150 ng/mLの広範囲に渡っていた。血中トラフ値に基づいて症例を4分位に層別化したところ、各群の血中トラフ値は第1分位群 (Q1) の16例では781ng/mL未満、第2分位群 (Q2) および第3分位群 (Q3) の33例では817~1245ng/mL、第4分位群 (Q4) の16例では1306ng/mLを超える値が得られた (図1)。



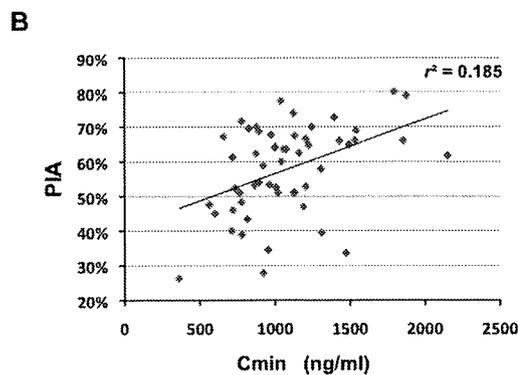
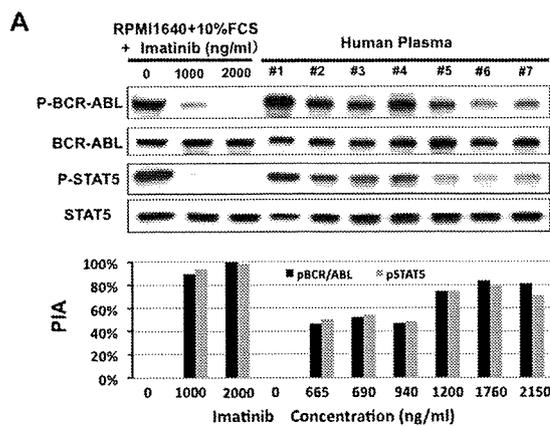
Q1~Q4ごとにMMR達成状況を比較した結果、12ヶ月後のMMR達成率はQ1が43.7%、Q2およびQ3が57.6%、Q4が87.5%と3群間で有意差を認めた (P=0.032)。

ROC解析の結果、12ヶ月時点でのMMR達成に関し感度62.5%、得意度64.0%で1002 ng/mLの閾値が算出された (図2)。



患者血漿を用いたPIA試験では、リン酸化 (P-) BCR-ABLに対し26~80% (中央値61.5%) の阻害活性を示した。CminとPIAとは弱い相関関係 ( $r^2=0.186$ ) を示したが、12ヶ月時点でのMMR達成閾値である1002 ng/mL以上のイマチニブ濃度を示した血漿では有意に高いPIAを示した (図3)。

以上の結果によりイマチニブ血中濃度は治療効果と有意に相関し、MMR達成閾値以上の濃度を示す血漿は有意にP-BCR-ABLの阻害活性が強く、生物学的傍証が示された。今後、血中濃度に基づく薬剤投与量の変更が、更なる治療成績の向上と副作用軽減に有用であるかについて、前方視的に検証を行う必要がある。



D. 健康危険情報  
該当無し。

E. 研究発表  
1. 論文発表

- Ohtake S, Miyawaki S, Kiyoi H, Miyazaki Y, Okumura H, Matsuda S, Nagai T, Kishimoto Y, Okada M, Takahashi M, Handa H, Takeuchi J, Kageyama S, Asou N, Yagasaki F, Maeda Y, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R. Randomized trial of response-oriented individualized versus fixed-schedule induction chemotherapy with idarubicin and cytarabine in adult acute myeloid leukemia: the JALSG AML95 study. *Int J Hematol*. 2010. [Epub ahead of print]
- Tanizaki R, Nomura Y, Miyata Y, Minami Y, Abe A, Hanamura A, Sawa M, Murata M, Kiyoi H, Matsushita T, Naoe T. Irrespective of CD34 expression, lineage-committed cell fraction reconstitutes and re-establishes transformed Philadelphia chromosome-positive leukemia in NOD / SCID / IL-2R $\gamma$  mice. *Cancer Sci*. 2009. [Epub ahead of print]
- Suzuki M, Abe A, Imagama S, Nomura Y, Tanizaki R, Minami Y, Hayakawa F, Ito Y, Katsumi A, Yamamoto K, Emi N, Kiyoi H, Naoe T. BCR-ABL-independent and RAS /