

at least three unrelated chromosomal aberrations. Chimeric transcripts, *BCR/ABL*, *AML1/ETO*, *CBFB/MYH11*, *PML/RARA*, and *MLL/AF9*, were examined by real-time PCR as previously described (3).

Screening for mutations of *FLT3*, *cKIT*, *N-RAS*, *AML1*, *C/EBPA*, *TP53*, *MLL*, and *NPM1* genes

High-molecular-weight DNA and total RNA were extracted from the samples using standard methods. *FLT3* gene mutations of the internal tandem duplication in the juxtamembrane domain (*FLT3/ITD*) and deletion and point mutation in the kinase domain (*FLT3/KDM*), *NPM1* gene mutation of exon 12, *N-RAS* gene mutations of codons 12, 13, and 61 and *TP53* gene mutations of exons 5–8 were examined as reported and confirmed by the sequencing procedure (11, 16–19). The partial tandem duplication of the *MLL* gene (*MLL-PTD*) was examined by RT-PCR as described previously (17). Mutations of *AML1*, *C/EBPA* and exon 8, 10–11, and 17 of *cKIT* were screened by denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) analysis using the WAVE Maker System (Transgenomic Inc., San Jose, CA, USA) as reported (20–22). DHPLC gradients and temperatures were determined using WAVE Maker System software. When heterozygous profiles were identified by visual inspection of the chromatograms, mutations were confirmed by cloning and sequencing procedures as reported (20).

Statistical analysis

Differences in continuous variables were analyzed with the Mann–Whitney *U*-test for distribution among two groups or the Kruskal–Wallis test for distribution among more than two groups. Frequencies were analyzed using Fisher's exact test for 2 × 2 tables or Pearson's chi-squared test for larger tables. Multivariate analysis to identify risk factors for achieving CR was performed

using the logistic-regression model. Survival probabilities were estimated by the Kaplan–Meier method, and differences in survival distributions were evaluated using the log-rank test. The prognostic significance of the clinical variables was assessed using the Cox proportional hazards model. These statistical analyses were performed with StatView-J 5.0 (Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA, USA). For all analyses, the *P*-values were two-tailed, and a *P* < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Mutations of *de novo* AML

Genetic alterations of AML patients according to cytogenetics are summarized in Table 1. At least one mutation in the *FLT3*, *cKIT*, *N-RAS*, *AML1*, *C/EBPA*, *MLL*, *NPM1*, and *TP53* genes was identified in 84 of the 144 AML patients (58.3%). *FLT3* mutation was the most frequently identified in entire AML patients (35/144, 24.3%), followed by *NPM1* (29/144, 20.1%) and *C/EBPA* (17/144, 11.8%) mutations. In *FLT3* mutation, *FLT3/ITD* and *FLT3/KDM* were identified in 28 (19.4%) and seven (4.9%) patients, respectively. No overlap mutation of *FLT3/ITD* and *FLT3/KDM* was observed. In cytogenetically normal AML, *NPM1* mutation was the most frequently identified (19/54, 35.2%), followed by *FLT3/ITD* (15/54, 27.8%) and *C/EBPA* (13/54, 24.1%) mutations. *FLT3* mutation was also frequently identified in AML with *PML/RARA*, *AML1/ETO*, or *CBFB/MYH11*, although *NPM1* and *C/EBPA* mutations were not. In contrast, *cKIT* mutation was not identified in cytogenetically normal AML, while it was frequently identified in AML with *AML1/ETO* (3/19, 15.8%) or *CBFB/MYH11* (1/3, 33.3%). When comparing cytogenetically normal and abnormal patients, *NPM1* and *C/EBPA* mutations were

Table 1 Genetic alterations of 144 *de novo* AML patients according to cytogenetics

	<i>PML/RARA</i>	<i>AML1/ETO</i>	<i>CBFB/MYH11</i>	<i>MLL</i> abnormalities	Normal	Other abnormalities	Complex	Total	<i>P</i> -value
Number	14	19	3	2	54	38	14	144	
Mutation (%)									
<i>FLT3/ITD</i>	3 (21.4)	0	1 (33.3)	0	15 (27.8)	8 (21.1)	1 (7.1)	28 (19.4)	NS
<i>FLT3/KDM</i>	0	2 (10.5)	0	0	3 (5.6)	2 (5.3)	0	7 (4.9)	NS
<i>cKIT</i>	0	3 (15.8)	1 (33.3)	0	0	4 (10.5)	0	8 (5.6)	0.0208
<i>N-RAS</i>	1 (7.1)	0	0	0	4 (7.4)	6 (15.8)	0	11 (7.6)	NS
<i>TP53</i>	0	1 (5.3)	0	0	1 (1.9)	1 (2.6)	8 (57.1)	11 (7.6)	<0.0001
<i>NPM1</i>	0	0	0	0	19 (35.2)	8 (21.1)	2 (14.3)	29 (20.1)	0.0076
<i>MLL-PTD</i>	0	1 (5.3)	1 (33.3)	1 (50)	5 (9.3)	3 (7.9)	2 (14.3)	13 (9.0)	NS
<i>C/EBPA</i>	0	0	0	0	13 (24.1)	2 (5.3)	2 (14.3)	17 (11.8)	0.0242
<i>AML1</i>	0	0	0	0	1 (1.9)	2 (5.3)	0	3 (2.1)	NS

Distributions of *cKIT*, *TP53*, *NPM1*, and *C/EBPA* mutations according to cytogenetics were significantly different. AML, acute myeloid leukemia; NS, no significance.

frequently identified in cytogenetically normal patients (33.9% vs. 11.4%, $P = 0.0014$ and 23.2% vs. 4.5%, $P = 0.0011$, respectively). *TP53* mutation was identified in 11 AML patients (7.6%), and eight of them showed complex karyotype. As *AML1* mutation was identified in only three patients, further analysis is required to confirm the statistical significance of its distribution.

Overlap mutations

In the present study, we identified a total of 165 mutations in entire AML patients. Interestingly, 103 of the 165 mutations (62.4%) were overlapped with another mutations. *AML1* (3/3, 100%), *FLT3/KDM* (7/7, 100%), *FLT3/ITD* (24/28, 85.7%), *N-RAS* (9/11, 81.8%), and *NPM1* (21/29, 72.4%) mutations were frequently overlapped with another mutations. In contrast, overlap mutations of *PML/RARA* (3/14, 21.4%) and *AML1/ETO* (6/19, 31.6%) were relatively infrequent (Fig. 1A). The most frequent overlap mutation was *FLT3* and *NPM1*, which was observed in 16 of the 51 patients with overlap mutations, followed by *FLT3* and *MLL-PTD* (five patients), *FLT3* and *C/EBPA* (four patients), *FLT3* and *PML/RARA* (three patients), *cKIT* and *AML1/ETO* (three patients), *N-RAS* and *NPM1* (three patients) and *TP53* and *MLL-PTD* (three patients). Importantly, overlap pattern of mutations was not random as shown in Fig. 1(B). The overlap mutations of *FLT3* and *cKIT* were not identified. In addition, *PML/RARA*, *AML1/ETO*, *CBFB/MYH11*, and *MLL* gene abnormality and *AML1* and *C/EBPA* mutations were not overlapped each other. These results were consistent with the genetic model of class I and class II mutations. However, overlap patterns of *N-RAS*, *TP53*, *MLL-PTD*, and *NPM1* mutations seemed different from above mutations. *N-RAS* mutation was identified in nine patients, while each one of them were overlapped with *FLT3/ITD* and *cKIT* mutations, respectively. Likewise, overlap mutations of *TP53* and *FLT3/ITD*, *TP53* and *cKIT*, *MLL-PTD* and *AML1/ETO*, *MLL-PTD* and *CBFB/MYH11*, *MLL-PTD* and *MLL/ENL*, and *NPM1* and *C/EBPA* were found in each one patient. According to the general consideration that *N-RAS* and *TP53* mutations were the class I mutation, and *MLL-PTD* and *NPM1* mutations were the class II mutation, these overlap mutations seemed to irregularly occur within the same class. Taken together, overlap mutations in the same class were observed in seven patients, while five of them showed mutations in three different genes. In this study, 51 of the 144 patients (35.4%) revealed overlap mutations, and overlap mutations consisted of two or three genes were found in 46 and five patients, respectively. However, both class I

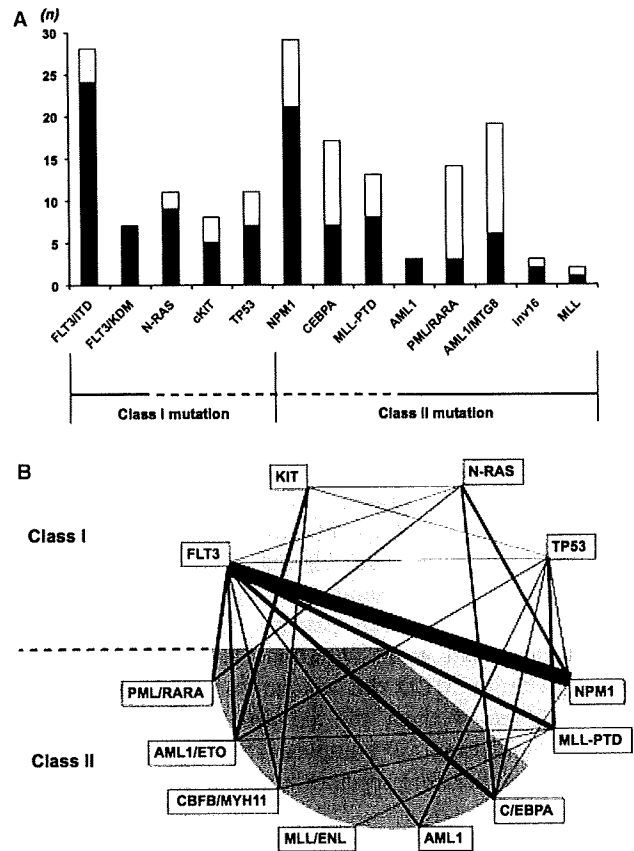


Figure 1 Prevalence and overlap pattern of class I and class II mutations in *de novo* AML. (A) We identified a total of 165 class I or class II mutations, 103 of which (62.4%) were overlapped with other mutations. Black and white bars indicate mutations with or without additional overlapped mutations, respectively. (B) Overlap pattern of each mutation. Red lines indicate mutations within the same class. Each line thickness represents the prevalence of overlap mutation. All *FLT3/KDM* overlapped with class II mutations, while two *FLT3/ITD* overlapped with class I mutations.

and class II mutations were always included in all patients with three mutations (Table 2). Therefore, only two patients showed two mutations within the same class: one consisted of *N-RAS* and *cKIT* mutations and the other consisted of *MLL-PTD* and *MLL/ENL* (Table 2).

TP53 mutation was overlapped with a variety of gene mutations. Seven of the 11 *TP53* mutated cases showed overlap mutations: two was overlapped with *MLL-PTD* and each one with *NPM1*, *C/EBPA*, *AML1*, *cKIT*, and *FLT3/ITD* mutations. Cytogenetic analysis revealed that 10 *TP53* mutated cases had abnormal karyotypes: eight were complex karyotype, five of which had a deleted chromosome 17, and each one was 46XY, del(5q) and 46XY, t(8;21), del(9). Importantly, one case with *TP53* mutation and the karyotype 46XY, del(5q) harbored

Table 2 Characteristics of AML patients with overlap mutations within the same class

Age (yr)	Sex	WHO category	FAB	WBC ($\times 10^9/L$)	Mutation
Two mutations					
64	F	Not otherwise specified	M2	18.8	<i>cKIT</i> , <i>N-RAS</i>
46	F	Recurrent genetic abnormalities	M4	1.4	<i>MLL-PTD</i> , <i>MLL/ENL</i>
Three mutations					
76	M	Not otherwise specified	M4	47.5	<i>FLT3/ITD</i> , <i>TP53</i> , <i>MLL-PTD</i>
18	M	Myelodysplasia-related changes	M4	124.9	<i>FLT3/ITD</i> , <i>NPM1</i> , <i>C/EBPA</i>
50	F	Recurrent genetic abnormalities	M3	12.0	<i>FLT3/ITD</i> , <i>N-RAS</i> , <i>PML/RARA</i>
17	M	Recurrent genetic abnormalities	M2	11.0	<i>cKIT</i> , <i>TP53</i> , <i>AML1/ETO</i>
29	F	Recurrent genetic abnormalities	M4Eo	113.3	<i>FLT3/ITD</i> , <i>MLL-PTD</i> , <i>CBFB/MYH11</i>

AML, acute myeloid leukemia; WHO, World Health Organization.

FLT3/ITD, and one case with *TP53* mutation and the karyotype 46XY, t(8;21), del(9) harbored *cKIT* mutation. Although one case showed a normal karyotype, it was overlapped with the *AML1* mutation. Taken together, all *TP53* mutated cases had another genetic alterations (Fig. 2). On the other hand, a complex karyotype was found in 14 patients. Ten patients showed MLD, and eight of them had *TP53* mutation. The remaining four patients without MLD did not harbor *TP53* mutation, although three of them showed del(17) or del(17p). A genotype consisting of complex karyotype and *TP53* mutation was therefore specifically found in AML-MLD.

Prognostic implications of the mutational status

We analyzed prognostic implications of the mutational status in 130 AML patients except for acute promyelocytic leukemia. We divided AML patients into four groups: AML-MLD with or without complex karyotype and *TP53* mutation, AML with *AML1/ETO* or *CBFB/MYH11* (CBF-AML) and other type AML. Clinical characteristics of each group are shown in Table 3. Median age of the patients in CBF-AML was significantly younger than the other groups ($P = 0.012$), while

there was no significant difference in median WBC count among 4 groups. The CR rate in AML-MLD with complex karyotype and *TP53* mutation (25%) was significantly lower than the other groups ($P = 0.0012$). Multivariate logistic-regression analysis revealed that WBC count (over $100 \times 10^9/L$) [odds ratio, 12.910 (95% CI: 3.101–53.742); $P = 0.0004$], wild-type *NPM1* [odds ratio, 10.640 (95% CI: 2.185–51.810); $P = 0.0034$], the genotype consisting of complex karyotype and *TP53* mutation [odds ratio, 8.755 (95% CI: 1.166–12.987); $P = 0.0271$], wild-type *C/EBPA* [odds ratio, 7.534 (95% CI: 1.111–51.103); $P = 0.0387$] and the presence of MLD [odds ratio, 3.891 (95% CI: 1.166–12.987); $P = 0.0271$] were independent unfavorable factors for achieving CR (Table 4). Furthermore, we analyzed prognostic implications of genetic alterations in addition to age, WBC count and existence of MLD. Multivariate Cox regression analysis with stepwise selection showed that the genotype consisting of complex karyotype and *TP53* mutation [odds ratio, 5.988 (95% CI: 2.681–13.333); $P < 0.0001$], not CBF-AML [odds ratio, 2.602 (95% CI: 1.107–6.116); $P = 0.0283$], *FLT3/ITD* [odds ratio, 1.843 (95% CI: 1.063–3.196); $P = 0.0294$] and age

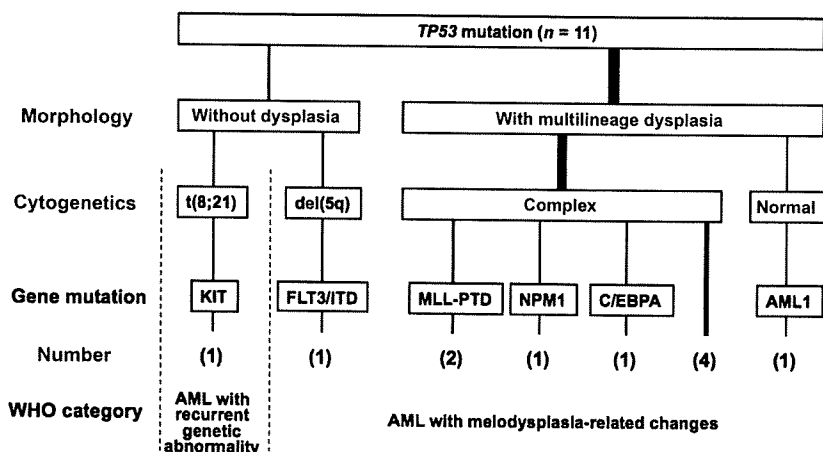


Figure 2 Association of *TP53* mutations with morphology, cytogenetics, and other mutations. *TP53* mutations were overlapped with a variety of mutations. Eight of the 11 *TP53* mutated cases showed complex karyotype, and all of them revealed morphologic MLD.

Table 3 Clinical characteristics of 130 AML patients except APL

	AML with MLD		CBF-AML	Other AML	P-value
	With complex/ TP53 Mt.	Without complex/ TP53 Mt.			
Number	8	26	22	74	
Age (yr)					
Median	60.5	55.5	33.0	53	0.012
Range	20–81	18–85	16–72	15–77	
WBC ($\times 10^9/L$)					
Median	6.6	16.9	10.3	22.9	NS
Range	1.2–22.4	0.8–139.5	3.1–113.3	0.9–351.0	
CR	2	19	20	60	0.0012
(%)	(25.0)	(73.1)	(90.9)	(81.1)	
Cytogenetics risk (%)					
High	8 (100)	3 (11.5)	–	10 (13.5)	
Complex	8 (100)	2 (7.7)	–	4 (5.4)	
Intermediate	–	23 (88.5)	–	64 (86.5)	
Normal	–	18 (69.2)	–	36 (48.6)	

Median age of the patients in CBF-AML was significantly younger than the other groups. The CR rate in AML-MLD with complex karyotype and *TP53* mutation was significantly lower than the other groups. Bold letters indicate significantly different groups.

AML, acute myeloid leukemia; APL, acute promyelocytic leukemia; MLD, multilineage dysplasia; CR, complete remission.

Table 4 Unfavorable risk factors for achieving CR in *de novo* AML except for APL

Factors	OR	95% CI	P-value
WBC count ($>100 \times 10^9/L$)	12.910	3.101–53.742	0.0004
Wild-type <i>NPM1</i>	10.640	2.185–51.810	0.0034
Complex karyotype/ <i>TP53</i> mutation	8.755	1.098–69.821	0.0405
Wild-type <i>C/EBPA</i>	7.534	1.111–51.103	0.0387
Presence of MLD	3.891	1.166–12.987	0.0271

AML, acute myeloid leukemia; CR, complete remission; MLD, multilineage dysplasia.

Table 5 Unfavorable prognostic factors for overall survival in *de novo* AML except for APL

Factors	OR	95% CI	P-value
Complex karyotype/ <i>TP53</i> mutation	5.988	2.681–13.333	<0.0001
Not CBF AML	2.602	1.107–6.116	0.0283
<i>FLT3/ITD</i>	1.843	1.063–3.196	0.0294
Age (>60 yr)	1.764	1.086–2.865	0.0218

AML, acute myeloid leukemia.

(over 60 yr) [odds ratio, 1.764 (95% CI: 1.086–2.865); $P = 0.0218$] were poor prognostic factors for overall survival (Table 5). For disease-free survival, not CBF-AML [odds ratio, 2.475 (95% CI: 1.176–5.208); $P = 0.0169$] and *AML1* mutation [odds ratio, 8.134 (95% CI: 1.039–63.642); $P = 0.0453$] were identified to be poor prognostic factors.

Discussion

In this study, we comprehensively analyzed mutations in the *FLT3*, *cKIT*, *N-RAS*, *AML1*, *C/EBPA*, *MLL*, *NPM1*, and *TP53* genes as well as cytogenetics in 144 newly diagnosed *de novo* AML patients. We identified a total of 165 class I or class II mutations, 103 of which (62.4%) were overlapped with other analyzed mutations, supporting that multiple genetic alterations have been accumulated at the diagnosis of AML. However, overlap mutations of *PML/RARA* (3/14, 21.4%) and *AML1/ETO* (6/19, 31.6%) were infrequent. Furthermore, overlap mutations of *C/EBPA* mutations, which are frequently found in cytogenetically normal AML, were relatively infrequent (7/17, 41.2%). It is well known that *PML/RARA*, *AML1/ETO*, and *C/EBPA* mutations are associated with favorable prognosis, while recent reports revealed that additional class I mutations, such as *FLT3* and *cKIT* mutations, reduced their favorable prognosis. Our results further indicate that it is necessary to clarify whether there are unknown class I mutations overlapped with them, which influence their prognostic impacts.

We demonstrate here that most overlap mutations found in AML consisted of class I and class II mutations. Although overlap mutations within the same class were found in seven patients, five of them additionally had the other class mutation. These results suggest that most overlap mutations within the same class might be the consequence of acquiring an additional mutation after the completion both of class I and class II mutations. Therefore, it is possible that an unknown

mutation of the opposite class was acquired in two patients, whose mutations consisted of two mutations within the same class. On the other hand, it has been reported that mutations in genes functioning in different pathways can occur in the same cancer, while genes functioning in the same pathway are rarely mutated in the same sample (23). However, it was also observed that certain overlap mutational patterns violate these rules and demonstrate tissue-specific variations (23). In addition, we found that mutated genes, which overlapped with the same class mutations, were limited in *N-RAS*, *TP53*, *MLL-PTD*, and *NPM1*. As these mutations are sometimes acquired at the relapse, it is necessary to analyze whether these irregular overlap mutations cooperatively participate in the development of AML, and whether these mutations are acquired during the disease progression (18, 24).

We further demonstrate the characteristic cooperative features of *TP53* mutation in *de novo* AML. Ten of the 11 patients with *TP53* mutation showed cytogenetic abnormality, and six of them showed an additional mutation. Furthermore, additional mutations involved both class I and class II mutations. Because of the evidence that p53 mediates quiescence of normal hematopoietic stem cells, Pedersen-Bjergaard *et al.* (25) proposed that *TP53* mutation functionally represent a new class III mutation. On the other hand *TP53* has been known as a tumor suppressor gene of importance for genomic stability, and it has been suggested that leukemic progenitor accumulates additional chromosomal alterations after inactivation of *TP53* in the development of AML (26). Although it is necessary to clarify how *TP53* mutation biologically involves the accumulation of genetic alterations during the development of AML and how their interactions are associated with the leukemogenesis, the previous and our results collectively suggest that *TP53* mutation might be a distinguishable class of mutation from class I and class II mutations.

Haferlach *et al.* (27) reported that *TP53* mutations were strongly associated with the complex karyotype in AML, but the association with dysplastic morphology was not evaluated; however, our results indicate that this genotype is closely associated with dysplastic morphology regardless of the history of MDS. It has been reported that *TP53* mutation is associated with loss of chromosome band 17p13, where the *TP53* gene is located (9, 28). Deletion of 17p, which occurred by unbalanced translocation between chromosome 17p and another chromosome, monosomy 17 or i(17), is reportedly observed in 3–4% of AML and MDS and 10–15% of therapy-related MDS or AML (29–33). Furthermore, it has been reported that 17p deletion is closely associated with dysgranulopoiesis, *TP53* mutation and additional complex cytogenetic findings in AML and MDS (34, 35).

In our study, deletion of 17p was identified in eight of entire 144 AML patients (5.6%), and all showed a complex karyotype. Of note is that five of eight patients with complex karyotype and *TP53* mutation showed 17p deletion, while the chromosome 17 was intact in the remaining three patients. Prognostic implication of the genotype consisting of a complex karyotype and *TP53* mutation is particularly notable as to be an independent unfavorable prognostic factor both for achieving CR and overall survival in entire *de novo* AML patients. These results collectively indicate that this genotype generates a disease entity in *de novo* AML.

Although several genetic alterations have been shown to be associated with MDS-related AML, morphologic evidence is recommended as the most available marker for the diagnosis of AML-MLD (36); however, diagnosis of dysplasia is difficult to qualify and/or quantify. Wandt *et al.* (37) demonstrated that MLD was associated with an unfavorable cytogenetic profile and that the presence of MLD was an unfavorable risk factor for achieving CR in univariate analysis but not a poor prognostic factor for either event-free or overall survival by analyzing a large number of AML patients both with and without a history of MDS. Consistently, the presence of MLD was identified to be an independent unfavorable risk factor for achieving CR by multivariate analysis, but not for long-term survival in our analysis of all AML patients. We could not identify the AML-MLD-specific genotype other than a complex karyotype and *TP53* mutation and there were some AML-MLD without any genetic alterations, indicating that AML-MLD is still genetically heterogeneous.

Acknowledgements

We would like to thank Ms. Manami Kira and Ms. Satomi Yamaji for secretarial and technical assistance. Hitoshi Kiyoi is a consultant for Kyowa-Kirin Co., Ltd. The other authors have no relevant conflicts to disclose.

References

1. Estey E, Dohner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 2006;**368**:1894–907.
2. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999;**17**:3835–49.
3. Osumi K, Fukui T, Kiyoi H, *et al.* Rapid screening of leukemia fusion transcripts in acute leukemia by real-time PCR. *Leuk Lymphoma* 2002;**43**:2291–9.

4. Frohling S, Scholl C, Gilliland DG, Levine RL. Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol* 2005;**23**:6285–95.
5. Mrozek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood* 2007;**109**:431–48.
6. Swerdlow S, Campo E, Harris N, Jaffe E, Pileri S, Stein H, Thiele J, Vardiman J. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, 4th edn. Lyon: WHO Press, 2008.
7. Speck NA, Gilliland DG. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2002;**2**:502–13.
8. Renneville A, Roumier C, Biggio V, Nibourel O, Boissel N, Fenaux P, Preudhomme C. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia* 2008;**22**:915–31.
9. Fenaux P, Jonveaux P, Quiquandon I, Lai JL, Pignon JM, Loucheux-Lefebvre MH, Bauters F, Berger R, Kerckaert JP. P53 gene mutations in acute myeloid leukemia with 17p monosomy. *Blood* 1991;**78**:1652–7.
10. Slingerland JM, Minden MD, Benchimol S. Mutation of the p53 gene in human acute myelogenous leukemia. *Blood* 1991;**77**:1500–7.
11. Nakano Y, Naoe T, Kiyoi H, *et al.* Prognostic value of p53 gene mutations and the product expression in de novo acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 2000;**65**:23–31.
12. Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Mutations with loss of heterozygosity of p53 are common in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after exposure to alkylating agents and significantly associated with deletion or loss of 5q, a complex karyotype, and a poor prognosis. *J Clin Oncol* 2001;**19**:1405–13.
13. Pedersen-Bjergaard J, Christiansen DH, Desta F, Andersen MK. Alternative genetic pathways and cooperating genetic abnormalities in the pathogenesis of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2006;**20**:1943–9.
14. Miyawaki S, Tanimoto M, Kobayashi T, *et al.* No beneficial effect from addition of etoposide to daunorubicin, cytarabine, and 6-mercaptopurine in individualized induction therapy of adult acute myeloid leukemia: the JALSG-AML92 study. Japan Adult Leukemia Study Group. *Int J Hematol* 1999;**70**:97–104.
15. Miyawaki S, Sakamaki H, Ohtake S, *et al.* A randomized, postremission comparison of four courses of standard-dose consolidation therapy without maintenance therapy versus three courses of standard-dose consolidation with maintenance therapy in adults with acute myeloid leukemia: the Japan Adult Leukemia Study Group AML 97 Study. *Cancer* 2005;**104**:2726–34.
16. Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, *et al.* Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 1999;**93**:3074–80.
17. Ozeki K, Kiyoi H, Hirose Y, *et al.* Biologic and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia. *Blood* 2004;**103**:1901–8.
18. Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K, *et al.* Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 2005;**106**:2854–61.
19. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, *et al.* Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 2001;**97**:2434–9.
20. 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* 2007;**21**:574–6.
21. Frohling S, Schlenk RF, Stolze I, Bihlmayr J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Dohner H, Dohner K. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol* 2004;**22**:624–33.
22. Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, *et al.* Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol* 2006;**24**:3904–11.
23. Yeang CH, McCormick F, Levine A. Combinatorial patterns of somatic gene mutations in cancer. *FASEB J* 2008;**22**:2605–22.
24. Nakano Y, Kiyoi H, Miyawaki S, Asou N, Ohno R, Saito H, Naoe T. Molecular evolution of acute myeloid leukemia in relapse: unstable N-ras and FLT3 genes compared with p53 gene. *Br J Haematol* 1999;**104**:659–64.
25. Pedersen-Bjergaard J, Andersen MK, Andersen MT, Christiansen DH. Genetics of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2008;**22**:240–8.
26. Castro PD, Liang JC, Nagarajan L. Deletions of chromosome 5q13.3 and 17p loci cooperate in myeloid neoplasms. *Blood* 2000;**95**:2138–43.
27. Haferlach C, Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Mutations of the TP53 gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia* 2008;**22**:1539–41.
28. Jonveaux P, Fenaux P, Quiquandon I, Pignon JM, Lai JL, Loucheux-Lefebvre MH, Goossens M, Bauters F, Berger R. Mutations in the p53 gene in myelodysplastic syndromes. *Oncogene* 1991;**6**:2243–7.
29. Fenaux P, Morel P, Lai JL. Cytogenetics of myelodysplastic syndromes. *Semin Hematol* 1996;**33**:127–38.
30. Le Beau MM, Albain KS, Larson RA, Vardiman JW, Davis EM, Blough RR, Golomb HM, Rowley JD. Clinical and cytogenetic correlations in 63 patients with therapy-related myelodysplastic syndromes and acute nonlymphocytic leukemia: further evidence for characteristic abnormalities of chromosomes no. 5 and 7. *J Clin Oncol* 1986;**4**:325–45.
31. Pedersen-Bjergaard J, Philip P. Balanced translocations involving chromosome bands 11q23 and 21q22 are highly characteristic of myelodysplasia and leukemia following

- therapy with cytostatic agents targeting at DNA-topoisomerase II. *Blood* 1991;**78**:1147–8.
32. Soenen V, Preudhomme C, Roumier C, Daudignon A, Lai JL, Fenaux P. 17p Deletion in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. Analysis of breakpoints and deleted segments by fluorescence in situ. *Blood* 1998;**91**:1008–15.
 33. Merlat A, Lai JL, Sterkers Y, Demory JL, Bauters F, Preudhomme C, Fenaux P. Therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with 17p deletion. A report on 25 cases. *Leukemia* 1999;**13**:250–7.
 34. Sessarego M, Ajmar F. Correlation between acquired pseudo-Pelger-Huet anomaly and involvement of chromosome 17 in chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1987;**25**:265–70.
 35. Ahuja H, Bar-Eli M, Arlin Z, Advani S, Allen SL, Goldman J, Snyder D, Foti A, Cline M. The spectrum of molecular alterations in the evolution of chronic myelocytic leukemia. *J Clin Invest* 1991;**87**:2042–7.
 36. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002;**100**:2292–302.
 37. Wandt H, Schakel U, Kroschinsky F, Prange-Krex G, Mohr B, Thiede C, Pascheberg U, Soucek S, Schaich M, Ehninger G. MLD according to the WHO classification in AML has no correlation with age and no independent prognostic relevance as analyzed in 1766 patients. *Blood* 2008;**111**:1855–61.

WHO 分類に基づく急性骨髄性白血病における 網羅的遺伝子変異の解析

石川 裕一¹, 清井 仁², 辻村 朱音¹, 宮崎 泰司³,
朝長 万左男³, 栗山 一孝⁴, 宮脇 修一⁵, 直江 知樹¹

Key words : AML, WHO-classification, Gene alteration, Prognosis

要 約

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 の進展・発症には, 様々な遺伝子異常が関与する事が明らかになっており, AML の発症・病態を理解する上では, 分子基盤に基づく詳細な層別化が必要である。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。148 例の AML を対象に, *FLT3*, *cKIT*, *NPM1*, *N-RAS*, *TP53*, *C/EBPA*, *AML1*, *MLL*/PTD 変異の解析を行い, WHO 分類別に検討を行った。全体では *FLT3* 変異 (20.9%), *NPM1* 変異 (14.8%), *C/EBPA* 変異 (13.0%) が高頻度に認められたが, WHO 分類別に存在する遺伝子異常には特徴が認められた。また Recurrent genetic abnormality 群の CBF 白血病は *FLT3*, *cKIT* 変異で, Not otherwise categorized 群は *C/EBPA*, *FLT3*/ITD 変異で, Multilineage dysplasia 群は *TP53* 変異にて予後を層別化する事が可能であった。このように網羅的な遺伝子変異の解析を行うことにより AML の WHO 分類の分子基盤に基づく細分化が可能であった。

緒 言

急性骨髄性白血病 (AML) は造血前駆細胞における増

殖・分化に係る様々な遺伝子に異常が生じ, それらが蓄積することにより発症, 進展すると考えられている。これら AML の発症に関与する遺伝子変異は大きく二つに分類することができるとされ, 主に造血細胞の増殖促進や生存に関与する遺伝子異常 (Class I 遺伝子異常) と細胞の分化障害や自己複製に関与する遺伝子異常 (Class II 遺伝子異常) である。これら一つの遺伝子異常のみでは AML は発症せず, Class I と Class II の遺伝子異常が協調することにより AML が発症するとされている¹⁾。現在, AML で認められる遺伝子異常の生物学的意義の解明は進み, どちらの遺伝子異常に属するか明らかになっているものが大半であるが, 依然としてその生物学的意義が不明な遺伝子異常も存在する。

成人 AML に高頻度に認められる代表的な遺伝子異常として, nucleophosmin 遺伝子 (*NPM1*), fms related tyrosine kinase3 遺伝子 (*FLT3*), CCAAT/enhancer binding protein α 遺伝子 (*C/EBPA*), c-KIT 遺伝子 (*cKIT*), mixed-lineage leukemia 遺伝子 (*MLL*), N-RAS 遺伝子 (*N-RAS*), TP53 遺伝子 (*TP53*), *AML1* 遺伝子 (*AML1*) などがあげられる²⁻⁷⁾。これらの遺伝子異常を Class I 遺伝子異常, Class II 遺伝子異常で分類すると, 前者には *FLT3*, *cKIT*, *N-RAS*, *TP53* 変異, 後者には *AML1*, *C/EBPA* 変異が含まれる。また *NPM1* 変異については現在のところ, その生物学的意義は不明ながら, おそらく Class II 遺伝子異常に含まれるのではないかと考えられている。

また, これらの遺伝子異常には *FLT3* internal tandem duplication (*FLT3*/ITD) 変異に代表されるように予後との関連が認められている遺伝子異常も存在し^{8,9)}, これらの遺伝子異常により AML の発症, 進展から予後も含めた臨床像までが特徴づけられている可能性も考えられ

¹名古屋大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学

²名古屋大学医学部附属病院 難治感染症部

³長崎大学大学院医歯薬総合研究科 原研内科

⁴琉球大学医学部保健学科 血液免疫検査学

⁵済生会前橋病院 白血病治療センター

る。

現在、AMLの病型分類として1999年に提唱されたWHO分類が用いられている⁹⁾。これは従来のFAB分類が形態学のみに基づいた分類であるのに対し、WHO分類では、AMLで一定の頻度で認められるような染色体異常、t(8;21)(q22;q22) (*AML1/ETO*), inv(16)(p13.1q22) もしくは t(16;16)(p13.1;q22) (*CBFB/MYH11*), t(15;17)(q22;q12) (*PML/RARA*), 染色体11q23 (*MLL*) を含む染色体相互転座を有するような症例はAML with recurrent genetic abnormalitie に分類されるように、形態学のみならず、患者背景や発症基盤を考慮した分類が含まれている。しかしながら、AMLの発症・進展には染色体異常のみならず、複数の遺伝子異常が関与していることが示されており、AMLの病態を理解する上では、これら遺伝子異常を網羅的に解析して評価する必要があると考えられる。本研究ではAMLにおける遺伝子変異の解析を網羅的に行うことにより、WHO分類の分子病態に基づく更なる細分化を試みた。

対象と方法

WHO分類に基づき診断および分類されたAML148例。WHO分類ではAML with recurrent genetic abnormalitie (AML-RGA) が38例(25.7%)、AML Not otherwise categorized (AML-NOC) が71例(48.0%)、AML with multilineage dysplasia (AML with MLD) が33例(22.3%)、AML therapy related (AML-TR) が6例(4.0%)であった。尚、AML-MLD群に属する33例はいずれにおいてもAMLに先行するMDSの存在は認められなかった。これら全ての患者において、名古屋大学医学部倫理委員会にて承認された検体の保存と遺伝子変異の解析に関する研究についてのインフォームド・コンセントが得られている。

治療は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、また65歳以上の患者については同様のプロトコールに準拠して減量投与が行われた。また、完全寛解(CR)に至った症例は3~4コースの地固め療法が行われた¹⁰⁾。

染色体解析はG-Banding法で行われ、3つ以上の染色体異常が認められた場合を染色体複雑核型と定義した。また既報のように、*BCR/ABL*, *AML1/ETO*, *CBFB/MYH11*, *PML/RARA*, *MLL/AF9*のキメラ遺伝子について定量PCRが行われた¹¹⁾。

FLT3, *NPM1*, *C/EBPA*, *cKIT*, *N-RAS*, *TP53*, *AML1*, *MLL*-partial tandem duplication (PTD) 遺伝子変異の解析を行い、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解析を行った。*FLT3*については、*FLT3*-Internal Tandem Duplication 変異 (*FLT3/ITD*)

はPCR法、*FLT3*-Kinase Domain 変異 (*FLT3/KDM*) 変異はRFLP法にて遺伝子変異を検討した¹²⁾。*N-RAS* 変異についてはcodon12, 13, 61について、*TP53* 変異についてはExon5, 6, 7, 8についてダイレクト・シーケンス法にてスクリーニングを行った後、cloningしたのち遺伝子変異を確認した。*NPM1*についてはExon12部位の変異についてCapillary gel electrophoresis法およびシーケンス法で検討した¹³⁾。*MLL*-PTD変異の有無についてはRT-PCR法で確認した¹⁴⁾。また*C/EBPA*はcoding sequence全てを、*cKIT*はExon8, 10, 11, 17を、*AML1*についてExon3, 4, 5をDenaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC)法にてスクリーニングを行い、遺伝子変異の存在が疑われた検体はcloning後、シーケンス解析を行い遺伝子変異について検討を行った¹⁵⁾。

結果

WHO分類別に見た臨床像について比較検討を行ったところ、発症年齢は、RGA群では他群と比べ若く($p=0.003$)、初診時白血球数ではNOC群で多い($p=0.009$)、また寛解到達率ではMLD群、TR群で有意に低い($p=0.001$)というWHO分類別に特徴的な臨床像が認められた(表1)。

予後については無病生存率(DFS)、全生存率(OS)ともに、RGA群が予後良好で、MLD群、TR群が予後不良であるという、既知の結果が確認された¹⁶⁾(いずれも $p<0.001$) (図1)。次に、これらの症例における今回解析した遺伝子変異についてWHO分類別にまとめた(表1)。AML全体での遺伝子変異は*FLT3*変異が23.6%(うち*FLT3/ITD* 18.9%、*FLT3/KDM* 4.7%)、次いで*NPM1*変異が20.3%、*C/EBPA*変異が11.5%と高頻度に認められた。またWHO分類別にみると、*NPM1*, *C/EBPA*, *TP53*変異の存在には有意差が認められた(それぞれ $p=0.01$, 0.42 , <0.001)。各分類別の特徴としては、RGA群では*FLT3*, *cKIT*変異が認められる一方で、*NPM1*, *C/EBPA*変異は認められず、またNOC群、MLD群では様々な遺伝子の変異が認められた。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。

また今回の全症例における染色体異常および遺伝子変異についてまとめてみると、単独の遺伝子変異のみ有する症例が約30%、複数の遺伝子変異を有する症例が約30%、遺伝子変異は有しないものの、染色体異常が認められる症例が約30%認められ、このように今回解析した遺伝子群と染色体異常によって、約90%の症例における分子異常が網羅することができた(図2)。しかしながら、染色体正常核型かつ遺伝子変異を認めない症例も約

表 1 AML 148 例, WHO 分類別に見た臨床像と遺伝子異常

	Recurrent genetic abnormalities	Not otherwise categorized	Multilineage dysplasia	Therapy related	Total	p value
number	38	71	33	6	148	
Age (range)	41.5 (16-72)	53 (15-75)	56 (18-85)	52 (28-71)	52 (15-85)	.003
WBC (range)	5,400 (600-113,300)	23,400 (900-351,000)	9,300 (800-139,500)	8,900 (2,000-49,300)	10,300 (600-351,000)	.009
CR (%)	35 (92.1)	59 (83.0)	21 (63.6)	2 (33.3)	117 (79.0)	.001
Mutations						
<i>FLT3</i> /ITD (%)	4 (10.5)	17 (23.9)	6 (18.2)	1 (16.7)	28 (18.9)	NS
<i>FLT3</i> /KDM (%)	2 (5.3)	4 (5.6)	1 (3.0)	—	7 (4.7)	NS
<i>cKIT</i> (%)	4 (10.5)	4 (5.6)	—	—	8 (5.4)	NS
<i>N-RAS</i> (%)	1 (2.6)	7 (9.9)	3 (9.1)	2 (33.3)	13 (8.8)	NS
<i>TP53</i> (%)	1 (2.6)	1 (1.4)	8 (24.2)	1 (16.7)	11 (7.4)	.001
<i>NPM1</i> (%)	—	16 (22.5)	13 (40.1)	1 (16.7)	30 (20.3)	.001
<i>C/EBPA</i> (%)	—	12 (16.9)	5 (15.2)	—	17 (11.5)	.042
<i>AML1</i> (%)	—	2 (2.8)	1 (3.0)	1 (16.7)	4 (2.7)	NS
<i>MLL</i> /PTD (%)	3 (7.9)	5 (7.0)	4 (12.2)	2 (33.3)	14 (9.5)	NS

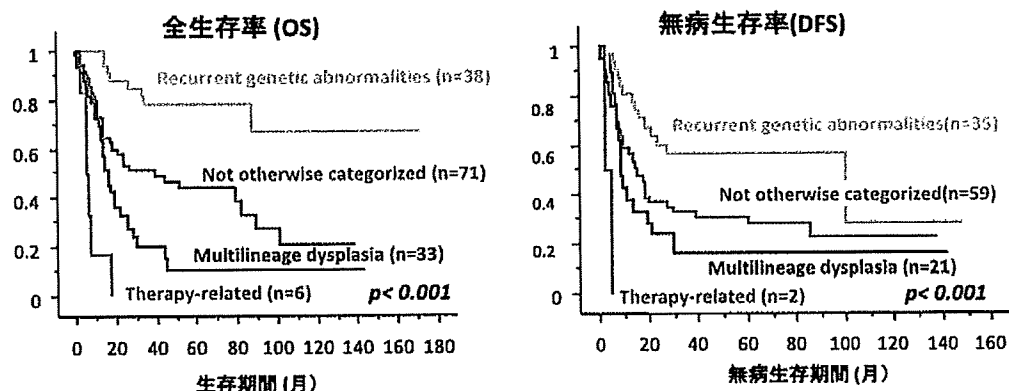


図 1 AML 148 例, WHO 分類別に見た全生存率 (OS) および無病生存率 (DFS)

9%認められ, 今後このような症例の分子病態の解明が必要と考えられる。

次いで, 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, RGA 群での遺伝子変異について検討したところ, *t*(8;21)(q22;q22), *inv*(16)(p13.1q22) もしくは *t*(16;16)(p13.1;q22) を有する core binding factor (CBF) 白血病では, *FLT3* 変異に加え, *cKIT* 変異が認められた。

また, *t*(15;17) が認められる急性前骨髄球性白血病 (APL) では *FLT3*, *N-RAS* 以外では遺伝子変異は認められず, 今回の解析では予後を層別化できるような遺伝子変異は認められなかった。染色体 11q23 を含む染色体相互点座を有する症例群においても同様であった。

CBF 白血病における遺伝子異常と臨床像および予後について検討したところ, *FLT3*, *cKIT* 遺伝子変異を有する症例と有しない症例では年齢, 初診時白血球数, 完全

表2 AML recurrent genetic abnormalities 群における染色体異常別の遺伝子異常頻度

	N	<i>FLT3</i>	<i>NPM1</i>	<i>C/EBPA</i>	<i>cKIT</i>	<i>TP53</i>	<i>N-RAS</i>	<i>AML1</i>	<i>MLL/PTD</i>
t(8;21)	19	2 (11%)	-	-	3 (16%)	-	-	-	1 (5%)
t(16;16) or inv(16)	3	1 (33%)	-	-	1 (33%)	-	-	-	1 (33%)
t(15;17)	14	3 (21%)	-	-	-	-	1 (7%)	-	-
11q23	2	-	-	-	-	-	-	-	1 (50%)
Total	38	6 (16%)	-	-	4 (11%)	1 (3%)	1 (3%)	-	3 (8%)

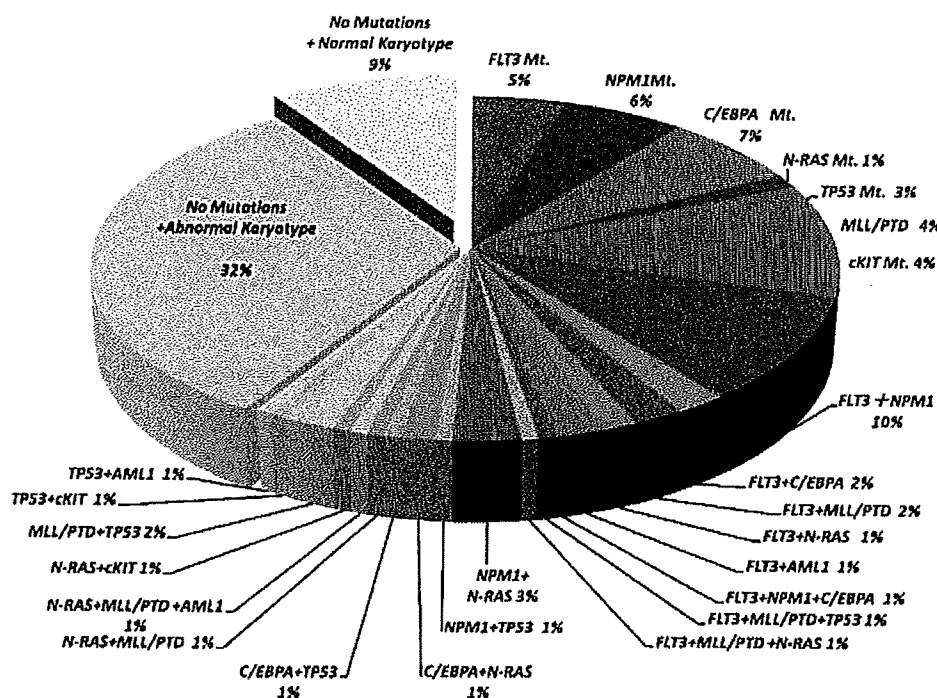


図2 AML 148例における遺伝子異常と染色体異常

寛解率では有意な差は認められなかったものの、*FLT3* もしくは *cKIT* いずれかの遺伝子変異有する症例は明らかに予後不良であることが示された (OS: $p=0.038$, DFS: $p=0.075$) (図3)。今回の対象では AraC 大量療法が行われた症例数が少なく、治療と予後の関係については今後の検討が必要と考えられる。

次に NOC 群について検討を行った。遺伝子変異については表1のように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、NOC 群の約半数を占めた

染色体正常核型群では、既報の通り⁴⁻⁶⁾、*FLT3*、*NPM1*、*C/EBPA* 変異が高頻度に認められた (表3)。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 *C/EBPA* 変異は少数しか認められなかった。NOC 群全体で予後について検討を行ったところ、OS、DFS いずれにおいても *C/EBPA* 変異を有する症例は予後良好であり、*FLT3/ITD* を有する症例は予後不良であった (OS: $p=0.002$, DFS: $p=0.032$) (図4)。いずれの遺伝子変異も有しない症例の予後をさ

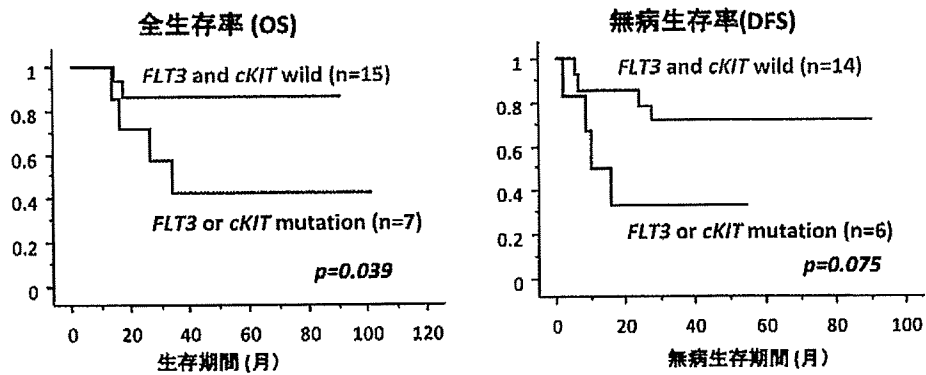


図3 CBF-AML患者におけるFLT3もしくはcKIT変異の有無でみた全生存率(OS)および無病生存率(DFS)

表3 AML Not Otherwise Categorized 群における染色体異常の有無による遺伝子異常の頻度

Karyotype	N	FLT3	NPM1	C/EBPA	cKIT	TP53	N-RAS	AML1	MLL/PTD
normal	35	11 (31%)	9 (26%)	10 (29%)	—	—	2 (6%)	—	3 (9%)
abnormal	36	10 (28%)	7 (19%)	2 (6%)	4 (11%)	1 (3%)	5 (14%)	2 (6%)	2 (6%)
Total	71	21 (30%)	16 (23%)	12 (17%)	4 (6%)	1 (1%)	7 (10%)	2 (3%)	5 (7%)

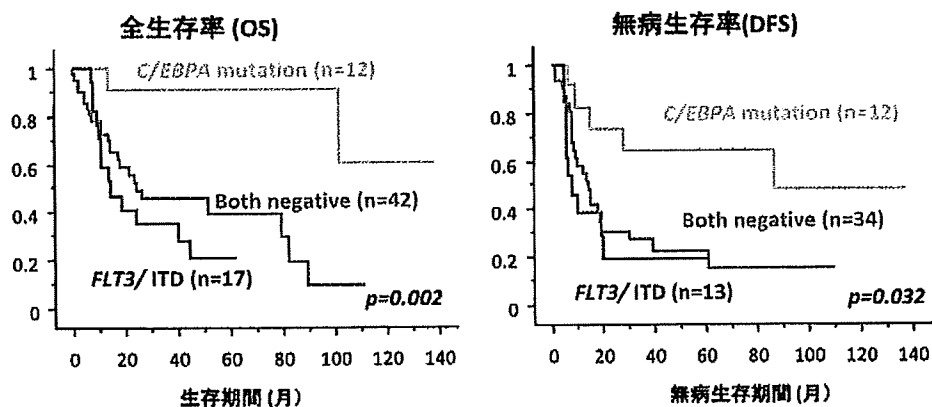


図4 AML Not Otherwise Categorized 群におけるC/EBPA変異を有する症例群, FLT3/ITD変異を有する症例群, いずれの遺伝子変異も有しない症例群での全生存率(OS)および無病生存率(DFS)

らに細分化することが可能な遺伝子変異は認められなかった。

MLD群について、この群に属する33例、すべての症例の染色体異常別に見た、遺伝子変異の有無について検討した。

まず、染色体複雑核型の症例群では9例中7例でTP53変異がみとめられ、今回、検討した148例のAML

のうち、このように染色体複雑核型でTP53変異を有する症例は、MLD群においてのみ特徴的に認められた。一方、染色体正常核型の症例ではNOC群同様にFLT3, NPM1, C/EBPA変異が高頻度に認められ、このように染色体異常の有無により合併する遺伝子変異に特徴が認められた。

AMLにおいてTP53変異は予後不良因子として知られ

ているが¹⁷⁾、今回、MLD 群における *TP53* 変異の予後への影響を解析したところ、予後不良な疾患群である MLD 群においても *TP53* 変異を有しない症例群では寛解到達率が 76.0%であったのに対し、*TP53* 変異を有する症例群は 25.0%と有意に低く ($p=0.018$)、OS においても有意に予後不良であった ($p=0.001$)。また、このように予後不良である MLD 群の中でも染色体正常核型かつ今回検討した遺伝子変異を有しない症例は、AML の平均的予後と同等であり、症例数が少ないながらも予後良好群として抽出された ($p=0.025$)。

考 察

AML は遺伝子学的にみると多様な疾患群であり、様々な遺伝子変異の存在と、その白血病発症への関与および予後への影響が検討されてきている^{6,18)}。

本研究では成人 AML において、網羅的遺伝子解析を行う事により WHO 分類の更なる細分化を試みた。AML において予後良好とされる CBF 白血病では、*FLT3*、*cKIT* 変異を有しない症例は現在の治療でも治癒が期待できる。しかし、これらの遺伝子変異を有する症例は明らかに予後不良であり、今後、第一寛解期での同種移植や将来的には *FLT3*、*cKIT* 阻害剤の併用などの新たな治療戦略を検討する必要があると考えられる。

NOC 群では *C/EBPA* 変異、*FLT3/ITD* 変異の有無により予後を 3 群に層別化すること可能であったが、*C/EBPA* 変異、*FLT3/ITD* ともに有しない疾患群の予後を層別化するような分子病態の解明が必要と考えられる。染色体正常核型 AML において *NPM1* 変異を有し *FLT3/ITD* を有しない症例群は、*C/EBPA* 変異のみを有する症例同様に予後良好であるとの報告も見られるが^{5,19)}、今回の検討では予後良好群として抽出されなかった。

MLD 群は形態異常に基づき分類された疾患群であるが、染色体異常・遺伝子変異により分子病態に基づく更なる細分化が可能であった。

今後、多系統にわたる形態異常の原因となるような遺伝子学的背景についての解明が望まれる。

今回の報告は 1999 年に提唱された WHO 分類に基づいた検討であったが、2008 年には改訂が行われ²⁰⁾、AML with recurrent genetic abnormalities 群には、従来含まれていた染色体相互転座を有する症例に加え、 $t(6;9)(p23;q34)$ (*DEK-NUP214*)、 $inv(3)(q21q26.2)$ もしくは $t(3;3)(q21;q26.2)$ (*RPNI-EV11*)、 $t(1;22)(p13;q13)$ (*RBM15-MKLI*) を有するような症例群も新たに含まれることとなった。また、AML with multilineage dysplasia は AML with myelodysplasia-related changes となり、多血球系統に及ぶ形態異常を有する症例のみならず、先行する骨髄異形成症候群 (MDS) の病歴を有する症例、

さらに染色体複雑核型、5, 7, 13 番染色体の monosomy など MDS 関連の染色体異常を有するような症例もこの疾患群に定義されることとなった。

このように AML の分類は、より分子基盤に基づいた分類へと移行している。さらに今回の分類では染色体異常のみならず、*NPM1*、*C/EBPA* 変異については AML with recurrent genetic abnormalities の中に provisional entities として記されている。

このように近年、AML の分子基盤に基づき病態、予後を解析する上では、染色体異常については勿論、遺伝子異常についても網羅的に検討することが重要であると考えられる。今後さらなる AML 発症に関与する分子異常の解明、それらを標的とした分子標的治療の開発などによる AML の予後の改善が望まれる。

文 献

- 1) Speck NA, Gilliland DG. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2: 502-513.
- 2) Baldus CD, Mrózek K, Marcucci G, Bloomfield CD. Clinical outcome of *de novo* acute myeloid leukaemia patients with normal cytogenetics is affected by molecular genetic alterations: a concise review. *Br J Haematol*. 2007; 137: 387-400.
- 3) Fröhling S, Schlenk RF, Stolze J, et al. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol*. 2004; 22: 624-633.
- 4) Mrózek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood*. 2007; 109: 431-448.
- 5) Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2008; 358: 1909-1918.
- 6) Renneville A, Roumier C, Biggio V, et al. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia*. 2008; 22: 915-931.
- 7) Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, et al. Adverse prognostic significance of *KIT* mutations in adult acute myeloid leukemia with $inv(16)$ and $t(8;21)$: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol*. 2006; 24: 3904-3911.
- 8) Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, et al. Prognostic implication of *FLT3* and *N-RAS* gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 1999; 93: 3074-3080.
- 9) Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002; 100: 2292-2302.
- 10) Miyawaki S, Sakamaki H, Ohtake S, et al. A randomized, postremission comparison of four courses of standard-dose consolidation therapy without maintenance therapy versus three courses of standard-dose consolidation with mainte-

- nance therapy in adults with acute myeloid leukemia: the Japan Adult Leukemia Study Group AML 97 Study. *Cancer*. 2005; **104**: 2726-2734.
- 11) Osumi K, Fukui T, Kiyoi H, et al. Rapid screening of leukemia fusion transcripts in acute leukemia by real-time PCR. *Leuk Lymphoma*. 2002; **43**: 2291-2299.
 - 12) Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*. 2001; **97**: 2434-2439.
 - 13) Ishikawa Y, Xu J, Sakashita G, et al. Abnormal cytoplasmic dyslocalisation and/or reduction of nucleophosmin protein level rarely occurs in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma*. 2008; **49**: 2359-2364.
 - 14) Ozeki K, Kiyoi H, Hirose Y, et al. Biologic and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2004; **103**: 1901-1908.
 - 15) 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*. 2007; **21**: 574-576.
 - 16) Yanada M, Suzuki M, Kawashima K, et al. Long-term outcomes for unselected patients with acute myeloid leukemia categorized according to the World Health Organization classification: a single-center experience. *Eur J Haematol*. 2005; **74**: 418-423.
 - 17) Nakano Y, Naoe T, Kiyoi H, et al. Prognostic value of p53 gene mutations and the product expression in *de novo* acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol*. 2000; **65**: 23-31.
 - 18) Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*. 2006; **368**: 1894-1907.
 - 19) Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood*. 2005; **106**: 3740-3746.
 - 20) Wandt H, Schäkel U, Kroschinsky F, et al. MLD according to the WHO classification in AML has no correlation with age and no independent prognostic relevance as analyzed in 1766 patients. *Blood*. 2008; **111**: 1855-1861.

第70回日本血液学会総会

シンポジウム9

Joint Symposium with Korean
Society for Hematology Clinical
Leukemia and Lymphoma

JALSG における急性骨髄性白血病治療研究

宮崎 泰司

Key words : JALSG, AML, Clinical trial, Stratification

はじめに

Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) では成人白血病を対象として様々な治療研究を実施してきた。本稿では急性骨髄性白血病 (Acute Myeloid Leukemia, AML) に対する治療研究, なかでも最近の AML 治療研究の結果を中心にその内容について論ずる。

JALSG の成り立ち

JALSG は 1987 年に大野竜三先生, 大島年照先生, 朝長万左男先生の三名の呼びかけで結成された, 成人白血病に対する多施設共同治療研究グループである。当初 14 施設で活動を開始したが, 次第に参加施設数は増加し, 2008 年 10 月には親施設 92, 関連施設 101 の合わせて 193 施設が参加する国内最大の成人白血病治療研究グループとなった。国内の白血病治療の専門施設が多数参加しており, 白血病治療研究, 中でも多施設共同第 3 相臨床研究を中心に実施することが JALSG の大きな目的である。成人の AML, 急性リンパ性白血病, 慢性骨髄性白血病, 高リスク骨髄異形成症候群 (MDS)/MDS 由来 AML, 急性前骨髄球性白血病等に対してこれまでに 18 のプロトコルを終了している。

JALSG における AML 治療プロトコル

JALSG における AML プロトコルは, AML87 として開始され, その後は AML89, AML92, AML95, AML97, AML201 と引き続いて実施されてきた。AML87, 89 プロトコルは急性前骨髄球性白血病 (Acute promyelocytic leukemia, APL) に対しても他の病型と同じ化学療法が実施されていたが, 全トランス型レチノイン酸 (All-trans retinoic acid, ATRA) の導入以来, APL が別立てのプロ

トコルとなり, APL92/95, APL97, APL204 としてトライアルが実施されてきている。JALSG の AML トライアルでは, 当初は高齢者も一部含む形でプロトコルが立案されてきたが, 増加する高齢者白血病への対応のために 2000 年より GML プロトコルとして高齢者白血病を別プロトコルで治療するようになった。

JALSG では AML201 プロトコルまでは AML を French-American-British 分類 (FAB 分類) に基づいて診断する方針がとられており, 対象とするのは初発 AML (*de novo* AML) であった。抗癌剤・放射線治療後に発症する二次性白血病については, 治療研究対象とされたことはない。また, 高リスク MDS と MDS 由来 AML については MDS95 プロトコル以降, 別プロトコルで取り扱われている。以下ではこの中で AML97, AML201 の結果について概説する。

AML97 プロトコル

AML97 プロトコルには大きく三つの目的があった。プロトコルが実施されていたときには国内でシトシンアラビノシド (AraC) 大量療法が実施できなかった。そのなかで, AML97 の第一の目的として JALSG スタイルと呼ばれる「アントラサイクリン系薬剤 + AraC 通常量の地固め療法」を薬剤量と種類を増やすことで強化し, 維持療法を実施しない寛解後療法と, それまで行われていた地固め療法 3 コース + 維持療法 6 コースを比較すること, 二つめは, JALSG がそれまでのトライアルで出してきた予後予測システム (JALSG スコア) を前向きに検証すること, 三つ目は JALSG スコアで予後中間群または不良群に割り当てられる患者に対して HLA 一致同胞の有無によって生物学的割り付けを実施し, 化学療法と同種造血幹細胞移植の成績を比較することである。

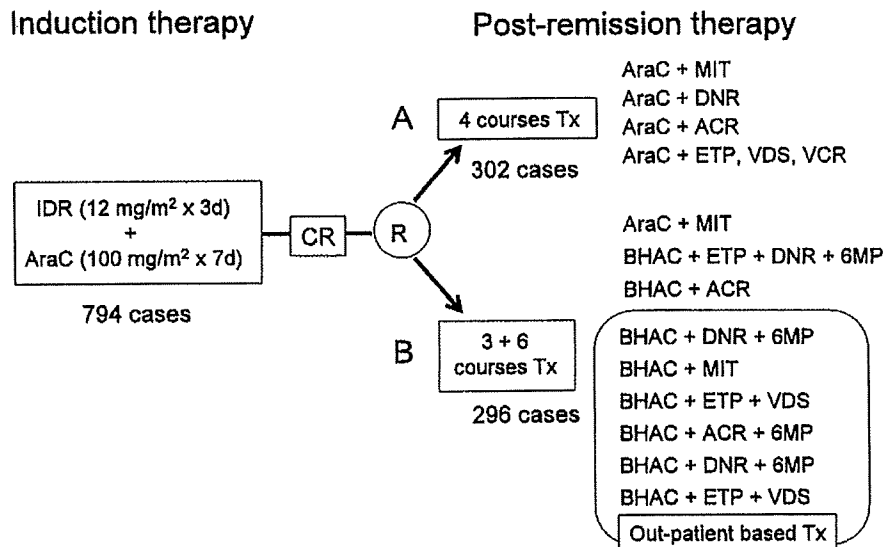


図1 AML97 プロトコルの概要
寛解導入療法として IDR+AraC が実施され、その後寛解後療法を A, B 群に無作為割り付けし、比較した。

AML97 プロトコル寛解後療法の比較¹⁾

図1に AML97 プロトコルの概要を示す。794 名が登録され、イダルビシンと AraC によって寛解導入療法が実施された。寛解に到達した例のうち 302 例が 4 コースの寛解後療法を実施する A 群に、296 例が 3 コースの地固め療法と 6 コースの維持療法を実施する B 群に割り付けられそれぞれの治療成績が比較された。表1に A, B 両群の比較を示す。年齢中央値は A 群で 46 才、B 群では 45 才で変わらず、寛解に到るまでの治療回数、初診時白血球数にも有意差を認めなかった。後述する JALSG スコアによる予後リスク別患者割合にも差は見られなかった。また、同種造血幹細胞移植が実施された患者割合も統計学的な差はなかった。A, B 群の Disease-free survival (DFS), Overall survival (OS) を図2に示す。観察期間中央値 54.7 ヶ月 (33.7~82.2 ヶ月) の時点で A, B 群の DFS はそれぞれ 35.8%, 30.4% で有意差はなく ($p=0.543$), OS はそれぞれ 52.4% と 58.4% でこちらも差はなかった ($p=0.559$)。JALSG スコアによる層別群毎の DFS, OS を表2に示す。どのグループにおいても DFS, OS ともに A, B 群間で差はなかった。しかし、地固め療法 (A 群で 4 コース, B 群で 3 コース) の実施率は 70.5% と 83.1% で有意な差を認めた。さらに有害事象では発熱性好中球減少症は A 群に明らかに多く、間質性肺炎、肛門周囲膿瘍は A 群に多い傾向が見られた。これは化学療法の強化によって白血球減少が A 群においてより高度であったためと考えられる。これらの有害事象

表1 AML97 試験 A, B 群の患者背景

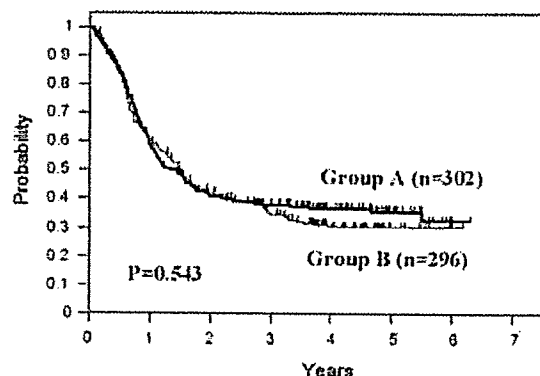
	A 群	B 群	p 値
年齢中央値 (レンジ)	46 (15-64)	45 (15-64)	0.749
初診時白血球数 ($\times 10^9/l$) (レンジ)	11.1 (0.6-368)	14.5 (0.5-450)	0.274
寛解まで 1 コース治療 (%)	83.4	82.8	0.826
同種造血幹細胞	30.80%	34.10%	0.385
JALSG スコア群別人数			0.507
Good	84	86	
Intermediate	126	141	
Poor	39	32	

は十分に耐えうると判断され、以上の結果より、JALSG が AML87 より実施してきた 3 コース地固め療法 + 外来維持療法という寛解後療法は、強化した 4 コースの地固め療法で代替可能であると考えられた。

AML97 プロトコル JALSG スコアの検証²⁾

JALSG では AML87, 89, 92 プロトコルの結果を基にして治療反応性を予測する JALSG スコアを作成した (表3)。初診時の臨床データを中心に、患者背景に関わる因子 (年齢, Performance status [PS]), 白血病細胞の特

Disease-free survival



Overall survival

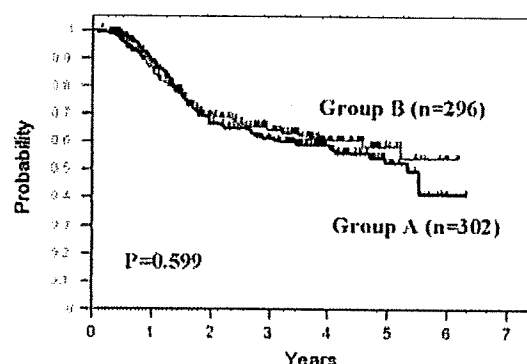


図2 AML97 化学療法の比較

Group A (A 群), Group B (B 群) の DFS と OS。いずれにも両群間に差を認めない。

表2 AML97 試験の JALSG スコア群別化学療法成績 (%)

JALSG スコア群	A 群		B 群	
	DFS	OS	DFS	OS
Good	53.4	72.9	43.9	74.2
Intermediate	26	39.8	26.1	49.1
Poor	20.4	31.8	13.5	40.8

表3 JALSG スコアによる予後層別化

因子	適応	ポイント
年齢	50 歳以下	2
初診時白血球数	2 万/ μ l 以下	2
MPO 陽性芽球率	50% <	2
PS	2 以下	1
FAB 病型	M0, M6, M7 以外	1
染色体	t(8;21)/inv(16)	1
寛解までの治療回数	1 回	1

点数	リスク群
8~10 点	Good
5~7 点	Intermediate
5 点未満	Poor

性 (ミエロペルオキシダーゼ [MPO] 陽性率, 染色体, FAB 分類), 腫瘍量 (初診時白血球数), 治療反応性 (寛解までの治療回数) より 7 つの因子を組み合わせるとスコ

ア化するもので, それぞれの重みによって因子に 1 点または 2 点を与えその合計で予後別に Good, Intermediate, Poor の三群に分類するものである。このスコアリングは寛解到達までの治療回数が因子として含まれるために, 原則として寛解に到達した例を層別化するのに用いられる。AML97 では後述するようにこのスコアリングにて寛解後の患者を層別化し, 予後が Intermediate, Poor とされる症例に対しての同種造血幹細胞移植の有効性を化学療法と比較している。

AML97 研究ではこのスコアリングによる患者層別化を前方向的に実施したが, スコアが適応可能であった (寛解した例の中で) 520 例は, Good 群 173 例, Intermediate 群 271 例, Poor 群 76 例に分けられ, それぞれの 5 年 OS は $66.4 \pm 3.9\%$, $41.0 \pm 3.6\%$, $29.8 \pm 5.7\%$ ($p < 0.0001$), DFS は $49.9 \pm 4.0\%$, $30.3 \pm 3.0\%$, $20.0 \pm 4.9\%$ ($p < 0.0001$) といずれも有意に予後の異なるグループに分けることができた。すなわち, JALSG スコアの有用性が前方向的に示されたことになる。

AML 層別化には染色体が広く用いられている。上記の患者を英国 MRC による染色体群によって層別化すると良好染色体群 137 例, 中間染色体群 359 例, 不良染色体群 24 例となる。それぞれの OS は $64.5 \pm 4.2\%$, $44.1 \pm 3.1\%$, $9.6 \pm 8.5\%$ ($p < 0.0001$) となり, DFS は $47.9 \pm 4.2\%$, $32.0 \pm 2.6\%$, $13.3 \pm 7.8\%$ ($p = 0.0001$) と同様に予後の異なる 3 群にグループ分けすることができる。JALSG スコアによるグループ分けと染色体によるグループ分けを比較すると, JALSG スコアの方が良好な予後を持つ症例を 26% 多く選別することができる (173 例対 137 例)。AML97 試験が同種造血幹細胞移植を予後中間や不良の例に実施することを目的の一つとしていることを考えると, より多くの症例を予

後良好群に引き出して移植対象例を絞ることが大切で、JALSG スコアはその目的により適していたと考えられる。確かに、染色体良好群であっても例えば白血球数の多い例では JALSG スコアで Intermediate となる場合もあり、それは予後に影響することが WBC index 等によって知られている⁹⁾。複數因子を組み合わせた予後予測システムは染色体単一の予後群よりも優れた点を持ちうると言える。染色体中間群の例でも若年、初診時白血球が少なく MPO 陽性芽球が高率であれば JALSG スコアでは Good 群となり、確かにそういった例の予後は染色体予後良好群に匹敵する。これからは、白血病の生物学的特性をより反映すると考えられる遺伝子異常を組み込んだ予後予測システムが臨床応用されていくであろうが、理解しやすく且つ判別性に優れたグルーピング法を確立する必要がある。

AML97 における同種造血幹細胞移植の成績⁴⁾

AML 治療における同種造血幹細胞移植の有効性を検証する研究はこれまでに幾つか報告があるが、その中でも第一寛解期における同種造血幹細胞移植の評価は十分明らかになったとは言えない。こうした点を明らかにする目的で実施された多くの臨床試験は AML 患者全体を一つの対象として取り扱い、化学療法と移植療法を比較するものであった。そのほとんどは、同種移植療法の持つ高い再発抑制効果、つまり無再発生存率において移植療法の優位性を示しながら、一方で移植に伴う高い移植関連有害事象や化学療法群で再発後に実施される移植効果によって両者の OS では差が出ていなかった。そこで、AML97 では化学療法では十分に対応できず予後が悪いと考えられる患者群を対象として、HLA 一致同胞の有無によって移植群と化学療法群を分け、前者においては第一寛解期での同種造血幹細胞移植を実施すること、後者では割り付けられた化学療法を続けるという形での「移植 vs 化学療法」比較をおこなった。化学療法での予後不良と考えられる患者の層別に前述の JALSG スコアを用いている。

寛解に到達した患者の中で 50 歳以下、JALSG スコアにて Intermediate/Poor という条件に適合したのは 186 名であった。そのうち 16 名は HLA 検査を受けなかったためそれらを除いた 170 例が検討の対象となった。HLA 検査の結果一致同胞が存在した 75 名はドナー群に、同胞と HLA が一致しなかった例または同胞がいなかった例は非ドナー群に割り付けられた。いずれの群も患者年齢中央値は 37 才で、両群間に FAB 病型や JALSG リスク群に差はなかった。

抗腫瘍効果として 8 年の再発率を見ると、ドナー群 54%、非ドナー群 78%と有意差が見られ ($p=0.009$) ド

ナー群で明らかに再発は減少していた。第一寛解期での同種造血幹細胞移植の効果と思われる。一方で、治療関連死亡についてはドナー群、非ドナー群それぞれ 16%と 17%で有意差は見られなかった。ドナー群の低い再発率は DFS に反映され、8 年時点において DFS 38%であり、非ドナー群の 18%より有意に良好であった ($p=0.017$)。しかしながら OS は、ドナー群にて 45%、非ドナー群では 28%と差があったものの統計学的な有意差には到らなかった ($p=0.089$)。これは非ドナー群でも非血縁ドナーを用いた同種造血幹細胞移植が実施されていたこと (特に再発後)、ドナー群においても全例が第一寛解期で同種造血幹細胞移植を受けたわけではなかったこと、有意差に到るための症例数が少なかったことなど複數の要因が考えられた。しかし、統計学的な有意差はなかったものの、OS においてもドナー群と非ドナー群の差は臨床的には意味があると考えられ、JALSG スコア Intermediate/Poor に対して第一寛解期の同種造血幹細胞移植を選択する根拠の一つとなりうると考えられた。

AML201 プロトコールの概要

JALSG では AML95 プロトコール以来、寛解導入療法時のアントラサイクリン系薬剤としてイダルビシン (IDR) を採用してきた。一方で、古くから用いられているダウノルビシン (DNR) も投与量を増やすと十分な効果があるとの報告もあり⁹⁾、どちらが優れているかについては結論が出ていないと考えられた。また、AML201 プロトコール実施時には、国内においても AraC 大量療法 (High dose AraC, HDAC) が保険診療として承認され、実施可能となっていたが、JALSG が採用してきた地固め療法は、全体の成績としては諸外国から報告される HDAC の成績と大きな差はみられなかった。こうした背景を受けて AML201 プロトコールでは (1) 寛解導入療法における IDR と DNR の比較、(2) 地固め療法における HDAC と JALSG スタイル (アントラサイクリン系薬剤 + 通常量 AraC × 4 コース) の比較という二つの目的を持って企画実施された。

AML201 プロトコール寛解導入療法の比較^{6,7)}

寛解導入療法に用いるアントラサイクリン系薬剤として IDR 12 mg/m² × 3 日 (IDR 総量 36 mg/m², A 群) と増量 DNR 50 mg/m² × 5 日 (DNR 総量 250 mg/m², B 群) を無作為に割り付け、通常量 AraC (100 mg/m² × 7 日持続投与, AraC 総量 700 mg/m²) との併用療法を行った。一コースの治療で寛解に入らないときにはもう一度同じ治療を繰り返し、二コースまでの結果を持って寛解率を比較した。

図 3 に AML201 の概要を示す。2001 年 12 月から 2005

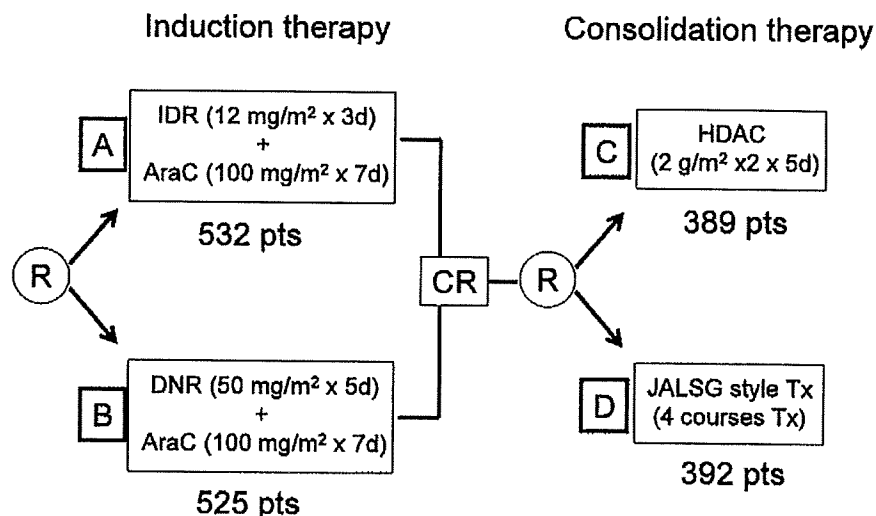


図3 AML201 プロトコルの概要

寛解導入療法を A, B の二群に無作為化し、寛解到達例を寛解後療法 C, D 群にさらに無作為割り付けした。

年 12 月までに APL を除く AML 症例が総計 1,064 例登録され、1,057 例が評価可能例であった。患者の年齢中央値は 47 才 (15 才から 64 才) で、A 群に 532 例、B 群に 525 例が割り付けられた。両群間で患者年齢、白血球数、FAB 病型、など背景因子に差は認めなかった。寛解率は A 群において 78.2% (95% CI, 74.7~81.7%), B 群において 77.5% (95% CI, 73.9~81.1%) であり、両群間に有意差は認められなかった ($p=0.79$)。第一コースでの寛解導入率に関しても A, B 群それぞれで 64.1% と 61.1% であり、差は認められなかった ($p=0.68$)。しかし、A 群では B 群より強い好中球減少と血小板減少が認められ、敗血症の発生は A 群において 8.7%, B 群において 4.9% と有意に A 群に多かった ($p=0.02$)。治療開始後の 60 日以内の早期死亡も A 群で 25 例 (4.7%), B 群で 11 例 (2.1%) と有意に A 群に多かった ($p=0.03$)。観察期間中央値 48 ヶ月での長期成績への影響では、A 群の 5 年 OS は 47.6% (95% CI, 42.8~52.4%), B 群では 48% (95% CI, 43.3~52.8%) と有意差はなく ($p=0.54$)、寛解例の 5 年無再発生存においても A 群 40.6% (95% CI, 35.6~45.6%), B 群 40.7% (95% CI, 35.4~45.4%) に差はみられず ($p=0.97$) 全体として A, B 群間で長期予後に差はないと考えられた。

AML201 プロトコルにおける寛解後療法の比較^{8,9)}

寛解後療法は、HDAC (C 群) と JALSG スタイル (D 群) を、寛解症例を無作為割り付けして比較した。C 群の HDAC の投与量は $2 \text{ g/m}^2 \times 2$ (12 時間おき) / 日 $\times 5$ 日、アントラサイクリン薬剤の併用は行わなかった。

D 群の JALSG スタイルの地固め療法は AML97 プロトコルで実施された A 群 (アントラサイクリン系薬剤 + 通常量 AraC, 4 コースで終了) を採用した。寛解到達 825 例のうち 781 例が無作為割り付けを受け、C 群 389 例、D 群 392 例がそれぞれの治療を受けた。それぞれの 5 年 OS は、C 群 57.8%, D 群 55.9% で有意差は認められなかった ($p=0.96$)。5 年の無再発生存は C 群、D 群それぞれ 42.7%, 38.9% でありここにも差は認められなかった ($p=0.73$)。サブグループ解析として JALSG スコアによる予後グループ毎の成績を比較しても、C 群、D 群に明らかな差は認められなかった。諸外国より HDAC が最も有効と報告されている CBF (core binding factor) leukemia, すなわち $t(8;21)/\text{inv}(16)$ を持つ例 (218 例)¹⁰⁾ に限って比較すると 5 年 OS は、C 群 75.0%, D 群 65.8% で有意差は認められなかった ($p=0.17$)。一方、このグループでは 5 年の無再発生存は C 群 56.5%, D 群は 38.7% でありこれは有意な差を認めた ($p=0.05$)。

寛解後療法全体として C 群は D 群より白血球数減少期間、好中球数減少期間が長く、これを反映して Documented infection は C 群で 20.9%, D 群で 14.5% と明らかに C 群で高頻度であった ($p<0.001$)。

JALSG における AML 治療

以上、AML97, AML201 研究の結果より、JALSG における AML 治療は図 4 に示すような形でまとめられる。すなわち、全生存率において、寛解導入療法では IDR (総量 36 mg/m^2) と DNR (総量 250 mg/m^2) は同等であり、地固め療法において全体としては HDAC と JALSG

AML treatment from JALSG trials

Induction therapy

DNR (50 mg/m² x 5d) ⇔ IDR (12 mg/m² x 3d)
+
AraC (100 mg/m² x 7d)

Post-remission therapy

HDAC = JALSG style Tx

Allo-HSCT for non-Favorable risk pts

図4 JALSGにおけるAML化学療法

寛解導入療法ではDNRとIDR、地固め療法HDACとJALSGスタイル治療が共に生存に関しては同等である。寛解後に予後因子によって非良好グループに割り当てられる例では、第一寛解期での血縁者間同種造血幹細胞移植が勧められる。

スタイルは同等の効果であった。一方有害事象は、それぞれIDR, HDACの方が多かった。今後は、サブグループ解析などにより、それぞれの治療法がより適したグループを検討するなどのさらなる研究が必要とされる。

JALSGにおけるAML研究の今後

AMLは多様性に富む疾患であり、これまでJALSGがAMLプロトコルで取り扱ってきた*de novo* AMLはその一部に過ぎない。また、臨床試験で得られたエビデンスを一般診療として実施する際に、患者選択基準などによって臨床試験に必ずしも組み込めない例まで含んで治療が行われているのが、実地診療の姿であると思われる。JALSGはAMLに対して今後も臨床試験を続けていくが、同時にJALSGで確立したエビデンスによって国内のAML治療成績がどのようになっているのか、急速に進む高齢化社会とそれに伴うAMLの変化、など国内白血病の全体像も把握しつつ試験を進める必要があると考えられる。

謝 辞

今回発表したデータはJALSG臨床研究に参加している全ての方々のご協力によって得られたものです。JALSG代表直江知樹先生、前代表大野竜三先生はじめ皆様に深謝申し上げます。

文 献

- 1) Miyawaki S, Sakamaki H, Ohtake S, et al. A randomized, postremission comparison of four courses of standard-dose consolidation therapy without maintenance therapy versus three courses of standard-dose consolidation with maintenance therapy in adults with acute myeloid leukemia: the Japan Adult Leukemia Study Group AML 97 Study. *Cancer* 2005; 104: 2726-2734.
- 2) *Miyazaki Y, Kiyoi H, Kuriyama K, et al. A new stratification system for adult AML that includes FTL3-ITD as a prognostic factor—A JALSG study [abstract]. *Blood*. 2006; 108: 653a. Abstract 2304.
- 3) Nguyen S, Leblanc T, Fenaux P, et al. A white blood cell index as the main prognostic factor in t(8;21) acute myeloid leukemia (AML): a survey of 161 cases from the French AML Intergroup. *Blood*. 2002; 99: 3517-3523.
- 4) *Sakamaki H, Miyawaki S, Ohtake S, et al. Allogeneic stem cell transplantation (Allo-SCT) in adults with acute myelogenous leukemia (AML). Final analysis of JALSG AML97 study [abstract]. *Blood*. 2008; 112: 135a-136a. Abstract 347.
- 5) Usui N, Dobashi N, Kobayashi T, et al. Role of Daunorubicin in the induction therapy for adult acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 1997; 16: 2086-2092.
- 6) *Ohtake S, Miyawaki S, Fujita H, et al. Randomized clinical trial induction therapy comparing intensified daunorubicin with idarubicin in patients with previously untreated *de novo* acute myeloid leukemia (JALSG AML201 study) [abstract]. *Blood*. 2006; 108: 567a. Abstract 2000.
- 7) *Ohtake S, Miyawaki S, Fujita H, et al. 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 [abstract]. *Blood*. 2008; 112: 757a. Abstract 2171.
- 8) *Miyawaki S, Ohtake S, Fujita H, et al. Postremission therapy in adults acute myeloid leukemia (AML): a randomized comparison between high dose Ara-C therapy and conventional consolidation therapy (JALSG AML201 study) [abstract]. *Blood*. 2006; 108: 566a. Abstract 2005.
- 9) *Miyawaki S, Ohtake S, Fujita H, et al. Long-term follow-up of the randomized JALSG AML201 study comparing high dose Ara-C therapy with conventional consolidation therapy in adults acute myeloid leukemia (AML) [abstract]. *Blood*. 2008; 112: 56a. Abstract 135.
- 10) Bloomfield CD, Lawrence D, Byrd JC, et al. Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. *Cancer Res*. 1998; 58: 4173-4179.