

分担研究報告書

AML中央診断で明らかになった染色体検査とキメラ遺伝子検査の不一致例および診断困難例の解析

研究分担者 滝 智彦 京都府立医科大学 講師

研究要旨： JPLSG AML-05研究で行っている中央診断では、染色体検査とキメラ遺伝子解析の結果の整合性の確認を行っている。その結果、様々なパターンの両者の不一致例が見出された。また、5q-やモノソミー7の診断の基準が明確ではなく、しばしば診断困難なケースが存在した。さらに、診断に必要なさまざまな検査項目が容易に利用できない場合があることも判明した。染色体・遺伝子解析結果の正確な診断が必ずしも容易でないことが明らかになり、これまで経験した症例における染色体異常、キメラ遺伝子を、効率よく正確に診断するための検査手順およびその診断基準を明確にすることが重要である。

A. 研究目的

A. 研究目的

JPLSG AML05研究では、初診時の形態診断、マーカー診断、染色体検査、キメラ遺伝子スクリーニングおよびFLT3-ITD検査を中央診断として行っている。その結果について診断小委員会において検討を行い、最終的なリスク分類を決定している。リスク分類の決定においては、染色体検査結果が非常に重要な位置を占めているが、その正確な診断は必ずしも容易ではない。染色体検査とキメラ遺伝子スクリーニングの結果の不一致例および診断困難例を解析することにより、効率的な検査手順と正確な診断基準の確立を目指す。

B. 研究方法

AML05 研究に登録された症例の初診時の染色体検査とキメラ遺伝子スクリーニングの結果をレビューした。染色体検査とキメラ遺伝子スクリーニングの結果が一致しなかった症例については、キメラ遺伝子または FISH 法の追加検査を行った。

(倫理面への配慮)

中央検査についての同意が得られている患者について、匿名化された検体を用いて検査を行った。

C. 研究結果

1. 染色体検査と遺伝子検査の不一致

染色体検査と遺伝子検査の結果が一致しない時のパターンには、①キメラ遺伝子が検出されたのに該当する染色体異常が検出されない、②特異的な染色体異常が検出されたのに該当するキメラ遺伝子が検出されない、③複雑な核型の中に存在する特異的染色体異常が通常の染色体検査だけでは同定できない、という少なくとも3通りが存在した。

①のパターンとしては、キメラ遺伝子が検出されたにもかかわらず、染色体検査では正常核型または他の染色体異常が検出されたケースがしばしばみられた。微小な部分の挿入などによってキメラ遺伝子が形成されている可能性が高く、このようなケースでは FISH 法により遺伝子の融合の確認、または

キメラ遺伝子を形成している一方の遺伝子のスプリットの確認が行われた。

②のパターンでは、予想されるキメラ遺伝子が形成されているにもかかわらず、融合場所が一般的なキメラ遺伝子と異なるために、キメラ遺伝子スクリーニングに用いられているプライマーセットでは検出できない場合、*MLL* が関与している *t(11;19)(q23;p13)* のように、染色体レベルでは同一でありながら、複数のキメラ遺伝子の存在が知られている場合などが存在する。これらのケースでは最終的にキメラ遺伝子の同定に至らない場合も多かった。FISH 法による追加検査が行われたが、その結果、もっとも関与の可能性が高いと考えられた遺伝子のスプリットがみられなかったケースも存在した。

③のパターンにはさまざまな異常が含まれ、その診断はしばしば困難であった。注意深い核型の観察が必要であり、染色体異常についての十分な知識が必要なケースである。

2. 診断困難な染色体検査結果

5q-、モノソミー7のような染色体の構造異常や数異常の診断はしばしば困難であった。これらの染色体異常は、他の複数の染色体異常と同時にみられることが多く、その中には由来不明な部分が含まれることも多かった。その由来不明な部分の中に7番染色体の成分が含まれるかどうかで、モノソミー7なのか、7番染色体の部分欠失なのかの違いとなってしまうため、FISH 法や SKY 法による7番染色体部分の存在の確認が行われた。また、これらの染色体異常は、付加的な染色体異常として腫瘍細胞の一部のみにみられることも多い。このような場合の診断基準が明確でないことも今回明らかになった。

D. 考察

染色体異常および遺伝子異常の有無をリスク因子として治療の層別化に用いようとしている以上、その正確な診断が重要である。しかし、中央診断を通

して、それがけっして容易でないことが明らかになった。まず経験したのは、追加が必要と考えられた検査が、民間検査施設で提供されていないものがいくつも存在したことである。一部の検査施設でしか提供されていない検査も多く、どの検査項目がどの検査施設で可能なのかの情報を集めるのに非常に苦労をした。また、検査結果の判定基準が必ずしも明確でないことも明らかになった。クローン性染色体異常の基準は ISCN (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature) で規定されており、それに従って判断が行われるが、腫瘍細胞の割合が低い検体では、この基準での判断では偽陰性となる場合がある。同様のことはリアルタイム PCR 法によるキメラ遺伝子スクリーニングでもある。また、5q-やモノソミー7のような染色体の構造異常や数的異常は、付加的な異常として腫瘍細胞の一部に存在することもある。このような場合の陽性の基準が現在は明確ではなく、正確な診断のためにはこれらの診断基準を整備する必要がある。

E. 結論

これまで経験した染色体検査とキメラ遺伝子検査の不一致例、診断困難例を詳細に解析し、より客観的な診断基準および明確な診断の手順を整備する必要がある。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mizushima Y, Taki T, Shimada A, Yui M, Hiraumi Y, Matsubara H, Watanabe M, Watanabe K, Kamitsuji Y, Hayashi Y, Tsukimoto I, Kobayashi R, Horibe K, Tawa A, Nakahata T, Adachi S. Prognostic significance of the BAALC isoform pattern and CEBPA mutations in pediatric acute myeloid leukemia with normal karyotype: a study by the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Int J Hematol* 91: 831-837, 2010

2. Taketani T, Taki T, Nakamura T, Ohyashiki K, Kobayashi Y, Fukuda S, Yamaguchi S, Hayashi Y. High frequencies of simultaneous FLT3-ITD and WT1 mutations in myeloid leukemia with NUP98-HOX fusion

genes. *Leukemia* 24: 1975-1977, 2010

3. Kawamura M, Kaku H, Ito C, Funada N, Taki T, Shimada A, Hayashi Y. FLT3-internal tandem duplication in a pediatric patient with t(8;21) acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 203: 292-296, 2010

2. 学会発表

1. Kinoshita A, Miyachi H, Taki T, Kiyokawa N, Terui K, Ohta H, Deguchi T, Takahashi H, Taga T, Hayashi Y, Tawa A. A comprehensive and rapid approach for the central review of acute myeloid leukemia diagnosis in a nationwide clinical trial. 7th Bi-Annual Childhood Leukemia Symposium, Antalya, October 4-6, 2010

2. Goto M, Hanamura I, Wakabayashi M, Nagoshi H, Taki T, Imai N, Goto M, Mizuno S, Takahashi M, Suganuma K, Hiramatsu A, Yamamoto H, Watarai M, Shikami M, Imamura A, Mihara H, Taniwaki M, Miwa H, Nitta M. Establishment and characterization of a novel human myeloid leukemia cell line, AMU-AML1, carrying t(12;22)(p13;q11) with no fusion of MN1-TEL. 52nd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orlando, December 4-7, 2010

3. Shiba N, Taki T, Park M, Nagasawa M, Takita J, Kato M, Kanazawa T, Sotomatsu M, Arakawa H, Hayashi Y. CBL mutations in therapy-related leukemia and infant leukemia. 52nd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orlando, December 4-7, 2010

4. Kinoshita A, Miyachi H, Matsushita H, Taki T, Yabe M, Kiyokawa N, Terui K, Ohta H, Deguchi T, Takahashi H, Taga T, Hayashi Y, Tawa A, Adachi S, Tsurusawa M, Horibe K. A rapid approach for the integrated central review of acute myeloid leukemia diagnosis in a nationwide clinical trial for children. 52nd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orlando, December 4-7, 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし

2. 実用新案登録
該当なし

3. その他
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）
小児急性骨髄性白血病(AML)に対する標準的治療法の確立

分担研究報告書

ダウン症候群に発症した急性骨髄性白血病に対する標準的治療法の確立に関する研究

研究分担者 多賀 崇 滋賀医科大学 小児科 講師

工藤 寿子 静岡県立こども病院 血液腫瘍科 部長

研究要旨： ダウン症候群に発症した急性骨髄性白血病(AML-DS)は非ダウン症候群に発症した急性骨髄性白血病 (AML-non DS)に比べ、治療合併症が多い一方で、治療反応性がよいことが知られるようになり、現在は独立した治療がおこなわれている。本研究ではこれまで我が国で行われてきたAML-DSに対する全国規模の臨床試験の流れを継承し、より良い治療法の開発を目指す。本年度は平成20年1月から開始されていたAML-DSに対する全国規模の治療研究JPLSG AML-D05を継続しつつ、次期治療研究ダウン症候群に発症した小児急性骨髄性白血病の微小残存白血病検索の実施可能性とその有用性を探索するパイロット試験(JPLSG AML-D11)の立案をおこなった。

A. 研究目的

ダウン症候群に発症した急性骨髄性白血病(AML-DS)は非ダウン症候群に発症した急性骨髄性白血病 (AML-non DS)に比べ、治療合併症が多い一方で、治療反応性がよいことが知られるようになり、現在は独立した治療がおこなわれている。本研究ではこれまで我が国で行われてきたAML-DSに対する全国規模の臨床試験の流れを継承し、より良い治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

日本小児白血病リンパ腫研究グループ(JPLSG)AML委員会を中心にAML共同治療研究会のAML99研究、CCLSG AML研究の解析結果および諸外国の小児AMLの臨床成績に基づきDown症候群に発症したAMLを対象とした「ダウン症候群に発症した小児急性骨髄性白血病に対するリスク別多剤併用化学療法の後期第Ⅱ相臨床試験実施計画書 AML-D05」を作成した(研究代表

者：多賀崇)。平成20年1月1日から各施設のIRB/倫理委員会の承認を得た上で症例の登録が開始され、治療継続に支障となる重篤な有害事象や成績の低下がないことから、平成22年度も研究を継続した。

C. 研究結果

AML-D05は登録順調で、定期モニタリングでも効果安全性に問題がなく、平成22年12月31日に予定通り登録を終了した。平成23年2月28日までに74例の登録があった。

AML-D05終了に伴い、AML-DSに対する次期治療研究の立案を行い、「ダウン症候群に発症した小児急性骨髄性白血病の微小残存白血病検索の実施可能性とその有用性を探索するパイロット試験実施計画書AML-D11(研究代表者：多賀崇)を作成している。現在、JPLSGプロトコールレビューの審査中である。JPLSGAML委員会での検討を

経て、日本小児血液学会審査に提出、平成 23 年度中の試験開始を目指している。

D. 考察

AML-D05は、ダウン症候群に発症した急性骨髄性白血病(AML-DS)に対する本邦初の全国統一の前向き臨床研究であったが、予想通りの患者登録があり、現時点で重篤な有害事象や大幅な治療成績の低下がみられていないことから、一定の成果が得られたと考えている。AML-DSで問題となる治療毒性を増やすことなく、さらなる治療成績の向上のためには、微小残存病変を取り入れた治療戦略が必要と考えられ、計画されている次期治療研究AML-D11でその実現可能性を検討する予定である。

E. 結論

ダウン症候群に発症した急性骨髄性白血病のさらなる治療成績の改善のため、今後も全国規模の臨床試験の継続が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Taga T, Shimomura Y, Horikoshi Y, Ogawa A, Itoh M, Okada M, Ueyama J, Higa T, Watanabe A, Kanegane H, Iwai A, Saikawa Y, Kogawa K, Yamanaka J, Tsurusawa M.:

Continuous and high-dose cytarabine combined chemotherapy in children with Down syndrome and acute myeloid leukemia: Report from the Japanese Children's Cancer and Leukemia Study Group (JCCLSG) AML 9805 Down Study. *Pediatr Blood Cancer* 2010 Dec 30. [Epub ahead of print]

2) Kudo K, Hama A, Kojima S, Ishii R, Morimoto A, Bessho F, Susami S, Kobayashi N,

Kinoshita A, Okimoto Y, Tawa A, Tsukimoto I: Mosaic Down syndrome-associated acute myeloid leukemia dose not require high-dose cytarabine treatment induction and consolidation therapy. *Int J Hematol* 2010, 91: 630-635

3) Taga T, Shimomura Y, Hori T, Horikoshi Y, Ogawa A, Itoh M, Watanabe A, Saikawa Y, Ueyama J, Hyakuna N, Chin M, Iizuka S, Miyake M, Iwai A, Kamitamari A, Kanegane H, Sato N and Tsurusawa M.: A morphology-based approach for the treatment of children with acute myeloid leukaemia: A report from the Japanese Children's Cancer and Leukemia Study Group AML 9805 Study. *Japanese Journal of Pediatric Hematology* 2010: 24; 283-291

2. 学会発表

1) Taga T, Kudo K, Tomizawa D, Souichi Adachi S, the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study group (JPLSG), A Japanese strategy for the treatment of AML in Down syndrome, 5th St. Jude-Viva Forum in Pediatric Oncology 2011, Singapore, March 21-23, 2011

2) Kinoshita A, Miyachi H, Taki T, Kiyokawa N, Terui K, Ohta H, Deguchi T, Takahashi H, Taga T, Hayashi Y, Tawa A. Diagnosis division in AML committee, the Japanese Pediatric Leukemia and Lymphoma Study Group: A comprehensive and rapid approach for the central review of diagnosis in acute myeloid leukemia on the nationwide clinical trial. 7th Bi-Annual Childhood Leukemia Symposium. Oct 4-6, 2010, Antalya

3) Blink MMM. van den Eibrink VDH, de

Haas V, Hasle H, O' Brien MM, Stark B, Tandonnet J, Pession A, Tousovska K, Cheuk DKL, Kudo K, Taga T, Rubnitz JE, Haltrich I, Balwierz W, Johansson B, Zimmermann M, Reinhardt D, Pieters R, Forestier E, Zwaan CM. : Myeloid Leukemia of Down Syndrome: the results of an International Retrospective Study. Annual meeting of American Society of Hematology, Dec 4-7, 2010 (Oaland, USA)

4) 伊藤雅文、木下明俊、多賀 崇、宮地 勇人、滝 智彦、高橋浩之、照井君典、清河信敬、出口隆生、林 泰秀、多和昭雄、太田秀明、

足立壮一：ダウン症候群に発症する急性骨髄性白血病病理中央診断の解析．第52回日本小児血液学会総会 2010年12月 大阪

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）
小児急性骨髄性白血病(AML)に対する標準的治療法の確立

分担研究報告書

小児急性前骨髄性白血病(AML)に対する標準的治療法の確立に関する研究
研究分担者 富澤 大輔 東京医科歯科大学医学部附属病院 小児科 助教

研究要旨： 急性前骨髄球性白血病(AML)は、t(15;17)転座から生じるPML-RAR α 融合遺伝子の特徴とする急性骨髄性白血病(AML)の一型である。全トランスレチノイン酸(ATRA)を併用した化学療法を導入により最も高い治癒率を見込める病型となり、現在他のAMLとは独立した治療が行われている。本研究ではこれまで我が国で行われてきた小児AMLに対する全国規模の臨床試験の流れを継承し、より良い治療法の開発を目指す。本年度は平成18年4月から開始されていた臨床試験JPLSG AML-P05を継続しつつ、新規分化誘導剤三酸化ヒ素の導入によりアントラサイクリン系抗がん剤の蓄積毒性の軽減と、微小残存腫瘍(MRD)の検出による高リスク群の抽出と治療介入による予後の改善を目指した次期臨床試験(JPLSG AML-P11)の立案をおこなった。

A. 研究目的

急性前骨髄球性白血病(AML)は、t(15;17)転座から生じる PML-RAR α 融合遺伝子の特徴とする急性骨髄性白血病(AML)の一型である。全トランスレチノイン酸(ATRA)を併用した化学療法を導入により最も高い治癒率を見込める病型となり、現在他のAMLとは独立した治療が行われている。本研究ではこれまで我が国で行われてきた小児AMLに対する全国規模の臨床試験の流れを継承し、より良い治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

日本小児白血病リンパ腫研究グループ(JPLSG)AML委員会を中心に、AML共同治療研究会のAML99-M3研究の解析結果および諸外国の小児急性前骨髄球性白血病の臨床成績に基づき、「小児急性前骨髄球性白血病(AML)に対する多施設共同後期第Ⅱ相臨床試験実施計画書AML-P05」を計画した。平成17年11月29日に日

本小児血液学会臨床研究審査検討委員会の承認を得、平成18年4月1日から各施設のIRB/倫理委員会の承認を得た上で症例の登録が開始された。当初3年間の登録期間の予定であったが登録数が不足したため2年間の延長を行い、平成23年3月31日、予定数に到達し症例登録を終了した。

C. 研究結果

5年間の登録期間で累積登録症例数は46例であった。平成21年12月1日に登録症例32例の時点で中間解析を行い、結果を効果安全性評価委員会に提出、研究の継続が承認されている(平成23年2月21日)。現在、第10回定期モニタリングレポートを効果安全性評価委員会に提出中である。

AML-P05研究の登録終了にともない現在JPLSG AML委員会では次期臨床試験「AML-P11」を計画中である。AML-P11では、1)新たに分化誘導剤三酸化ヒ素(arsenic trioxide)を初期治療に導入すること

でアントラサイクリン系薬剤の総投与量を減らし、その蓄積毒性の軽減を図る、2) minimal residual disease(MRD)を用いて高リスク群を抽出し、早期に治療介入することで予後の改善を図る、などを骨子としている。

D. 考察

AML-P05は、小児APLに対する本邦初の全国統一の前向き臨床試験であった。患者登録については当初見込んだペースを下回ったものの、2年間の試験期間延長により目標症例数に達することができた。現時点では予想を上回る重篤な有害事象の発生や大幅な治療成績の低下がみられていないことから、一定の成果が得られたと考えている。今後小児APLにおける、さらなる治療成績の向上と長期生存例における晩期合併症の軽減のためには、新規薬剤の導入と微小残存病変(MRD)を取り入れた治療戦略が必要と考えられ、計画されている次期臨床試験AML-P11でその実現可能性を検討する予定である。

E. 結論

小児APLのさらなる治療成績の改善のため、今後も全国規模の臨床試験の継続が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 富澤大輔, 水谷修紀: 「治療関連骨髄異形成症候群 (MDS) / 白血病」 5. 小児科領域における治療関連骨髄異形成症候群 (MDS) / 白血病とその対策. 血液フロンティア 20(6): 865-73 医薬ジャーナル社 2010

2. 学会発表

- 1) Tomizawa D, Saito A, Taga T, Adachi S, Nakayama H, Moritake H, Azuma E, Kinoshita A, Takahashi H, Imaizumi M, Kudo K, Hama A,

Tsurusawa M, Horibe K, Tawa A.

Unexpected high mortality rate due to acute respiratory distress syndrome among infants with AML enrolled on JPLSG AML-05 trial.

7th Bi-annual Childhood Leukemia Symposium, Antalya, Turkey, October 4-6, 2010.

- 2) Coenen EA, Raimondi SC, Harbott J, Zimmermann M, Balgobind BV, Alonzo TA, Auvrignon A, Beverloo HB, Chang M, Creutzig U, Dworzak MN, Forestier E, Gibson B, Hasle H, Harrison CJ, Heerema NA, Kaspers GJL, Leszl A, Litvinko N, Lo Nigro L, Morimoto A, Perot C, Reinhardt D, Rubnitz JE, Smith FO, Stary J, Stasevich I, Strehl S, Taga T, Tomizawa D, Webb D, Zemanova Z, Pieters R, Zwaan CM, and van den Heuvel-Eibrink MM. Clinical impact of additional cytogenetic aberrations and complex karyotype in 756 pediatric 11q23/*MLL*-rearranged AML: results from an international retrospective study. 52nd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orlando, USA, December 4-7, 2010.
- 3) Tomizawa D, Moriya Saito A, Taga T, Adachi S, Nakayama H, Moritake H, Azuma E, Kinoshita A, Takahashi H, Imaizumi M, Kudo K, Hama A, Tsurusawa M, Horibe K, Tawa A. Unexpected high mortality rate due to acute respiratory distress syndrome among infants with AML enrolled on JPLSG AML-05 trial. 52nd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orlando, USA, December 4-7, 2010.
- 4) Tomizawa D. AML clinical trials in Japan - AML99 and AML-05 studies. VIVA-Asia Acute Leukemia Working Group Meeting at the 5th St. Jude-VIVA Forum in Pediatric Oncology

2011, Singapore, March 20, 2011

- 5) 大隅朋生, 嶋田博之, 木下明俊, 前田美穂, 富澤大輔, 小池和俊, 岩崎史記, 清谷知賀子, 望月慎史, 湯坐有希, 藤村純也, 山本将平, 太田節雄, 井田孔明, 黒澤秀光, 植田高弘, 高橋浩之, 土田昌宏 小児急性骨髄性白血病の長期生存者における晩期合併症の検討 第32回日本造血細胞移植学会総会, 2010年2月, 浜松
- 6) 富澤大輔, 齋藤明子, 多賀 崇, 足立壮一, 中山秀樹, 盛武 浩, 木下明俊, 高橋浩之, 工藤寿子, 堀部敬三, 多和昭雄 乳児急性骨髄性白血病における早期死亡例の検討:JPLSG AML-05臨床試験からの報告 第52回日本小

児血液学会, 2010年12月, 大阪

- 7) 富澤大輔 教育講演「小児の急性骨髄性白血病:更なる治療成績の向上に向けて」 第52回日本小児血液学会 2010年12月, 大阪

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

平成 22 年度 厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）
小児急性骨髄性白血病（AML）に対する標準的治療法の確立に関する研究
分担研究報告書

フローサイトメトリー法による微小残存病変(MRD)検出システムの確立に関する研究
研究分担者 岩本彰太郎 三重大学医学部附属病院周産母子センター助教

研究要旨： 本邦における小児急性骨髄性白血病（AML）の治療成績は世界水準にあるものの、更なる治療成績の向上のためには、臨床応用可能な予後因子の解析が急務である。なかでも、早期治療反応性は、急性白血病の予後を予測する因子として注目されている。しかし、その治療反応性の評価は、特殊な生物学的特徴を持った症例では PCR を用いて詳細に検討できるが、多くの場合、顕微鏡による形態学的判定に依存している。そこで、本研究では、従来のような方法では同定できないレベルの AML の微小残存病変（MRD）を、免疫学的手法（多次元フローサイトメトリー法）を用いて同定するシステムを確立し、臨床試験に応用することを目指している。

本研究を開始するにあたり、既に本システムを確立し、臨床応用している米国 St. Jude 小児病院の研究室との連携を図り、必要な器材、臨床で応用可能な抗体セットを準備し、現在までに、正常骨髄検体を用いて正常造血細胞の特徴を把握してきた。

今後は、AML 細胞の治療反応にともなう表現型の変化等を、本システムで追跡・解析可能であるかを検証するとともに、その検出感度を上げ、臨床試験における中央検査として組み込み事を目指す。これらの結果から、AML 患児の治療後 MRD 同定率とその予後との相関が得られれば、本システムによる MRD 陽性率による治療介入を行い、更なる治療成績の向上に繋がるよう努力していく。

A. 研究目的

日本の小児急性骨髄性白血病(AML)の予後因子の解析は遅れている。本研究では免疫学的手法（多次元フローサイトメトリー法）を用いて従来の顕微鏡による形態学的判定では同定できないレベルの微小残存白血病細胞（MRD）を同定する検査方法を開発することを目指す。

B. 研究方法

多次元フローサイトメトリー(FACS)法を用いる。健常人骨髄及び小児AML細胞を用い、6種類の抗体で標識された抗体セットを駆使して、白血病細胞を区別できる抗体の組み合

わせを症例ごとに決定する。MRD検出システム確立後は、小児AML患者検体（JPLSG AML プロトコール）を用いて、MRD検出と予後の相関関係を前方視的に検討する。

（倫理面への配慮）

患者検体使用においては、小児血液学会及び小児白血病リンパ腫研究グループ（JPLSG）の倫理委員会の提唱するガイドライに沿って、施設の倫理委員会で承認された臨床試験として行う。ヘルシンキ宣言を遵守し、個人情報保護のため、血液検体は連結不可能匿名化を図る。収集したサンプルは検査終了後、適切に廃棄し、他に使用しない。

C. 研究結果

健常人（骨髄ドナー）骨髄液を用いて、正常骨髄細胞を、16種類の抗体

（CD4, 7, 11b, 13, 15, 19, 33, 34, 38, 41, 56, 65, 117, 133, HLD-DR, anti-NG2）のうち、標識の異なる6種類の抗体を組み合わせて染め、それらの抗原発現パターンを測定機器（BD FACSCantoII）にて測定し、それら正常造血細胞の特徴を把握することができた。

分担研究者ではある私は、既に、多次元フローサイトメトリーを用いた小児急性白血病におけるMRDの定量的検出法を世界に先駆けて確立し、現在もその最先端の研究成果を発進し続けている St. Jude 小児病院（米国）の研究室あるいはシンガポールにおける

St. Jude 小児病院提携研究室に定期的に赴き、その技術を学んでいる。本年3月にもシンガポールの研修会に参加し情報交換を行ってきた。

現段階では、8種類の抗体パネルセットを決定することができ、臨床試験に対応できる同定感度を上げる取組を行っている。

D. 考察

世界的にも治療判定として広く用いられつつある多次元フローサイトメトリー法による微小残存白血病細胞（MRD）同定システムを立ち上げる基礎研究を行った。本検査システムが、更なる臨床治療成績の向上に繋がる手段となり、また国際的にも評価されるものになるためには、St. Jude 小児病院およびその提携研究室との連携を継続し、お互いのシステムの検証を行う必要がある。

E. 結論

本検出システムが、本邦の小児AMLの予後を

規定するものとなり、この結果をもとに、治療介入を行う臨床試験が組めるようになるためには、検出システムの感度の向上を図る必要がある。

G. 研究発表

論文および学会発表 未

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

予定なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

Ⅲ. 研究成果に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	(該当なし)						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Mizushima Y, Taki T, Shimada A, Yui M, Hiraumi Y, Matsubara H, Watanabe M, Watanabe K, Kamitsuji Y, Hayashi Y, Tsukimoto I, Kobayashi R, Horibe K, Tawa A, Nakahata T, Adachi S.	Prognostic significance of the BAALC isoform pattern and CEBPA mutations in pediatric acute myeloid leukemia with normal karyotype: a study by the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group.	Int J Hematol	91	831-837	2010
Fujino H, Fujita N, Hamamoto K, Oobu S, Kita M, Tanaka A, Matsubara H, Watanabe K, Adachi S.	Ring/marker chromosome derived from chromosome 7 in childhood acute megakaryoblastic leukemia with monosomy 7.	Int J Hematol	92	386-390	2010
Kanezaki R, Toki T, Terui K, Xu G, Wang R, Shimada A, Hama A, Kanegane H, Kawakami K, Endo M, Hasegawa D, Kogawa K, Adachi S, Ikeda Y, Iwamoto S, Taga T, Kosaka Y, Kojima S, Hayashi Y, Ito E.	Down syndrome and GATA1 mutations in transient abnormal myeloproliferative disorder: mutation classes correlate with progression to myeloid leukemia.	Blood	116	4631-4638	2010
Muguruma Y, Matsushita H, Yahata T, Shizu Yumino S, Tanaka Y, Miyachi H, Ogawa Y, Kawada H, Ito M, Ando K.	Establishment of xenograft model of human myelodysplastic syndromes.	Haematologica	96	543-551	2011

Matsushita H, Gondo K, Tanaka Y, <u>Miyachi H.</u>	"Triage" of lymphoid malignancies in the peripheral blood using the Extended Immunofluorescent Application of the CELL-DYN Sapphire automated hematology analyzer.	Clinical Chemistry and Laboratory Medicine	49	933-935	2011
Kawamura M, Kaku H, Ito C, Funada N, <u>Taki T,</u> Shimada A, Hayashi Y.	FLT3-internal tandem duplication in a pediatric patient with t(8;21) acute myeloid leukemia.	Cancer Genet Cytogenet	203	292-296	2010
Taketani T, <u>Taki T,</u> Nakamura T, Ohyashiki K, Kobayashi Y, Fukuda S, Yamaguchi S, Hayashi Y.	High frequencies of simultaneous FLT3-ITD and WT1 mutations in myeloidleukemia with NUP98-HOX fusion genes.	Leukemia	24	1975-1977	2010
Imaizumi M, Tawa A, Hanada R, Tsuchida M, Tabuchi K, Kigasawa H, Kobayash R, Morimoto A, Nakayama H, Hamamoto K, Kudo K, Yabe H, <u>Horibe K,</u> Tsuchiya S, Tsukimoto I.	Prospective study of a therapeutic regimen with all- <i>trans</i> retinoic acid and anthracyclines in combination of cytarabine in children with acute promyelocytic leukemia: the Japanese childhood acute myeloid leukaemia cooperative study.	Br J Haematol	152	89-98	2010
<u>Taga T,</u> Shimomura Y, Horikoshi Y, Ogawa A, Itoh M, Okada M, Ueyama J, Higa T, Watanabe A, Kanegane H, Iwai A, Saikawa Y, Kogawa K, Yamanaka J, Tsurusawa M.	Continuous and high-dose cytarabine combined chemotherapy in children with Down syndrome and acute myeloid leukemia: Report from the Japanese Children's Cancer and Leukemia Study Group (JCCLSG) AML 9805 Down Study.	Pediatr Blood Cancer	57	36-40	2011
<u>Taga T,</u> Shimomura Y, Hori T, Horikoshi Y, Ogawa A, Itoh M, Watanabe A, Saikawa Y, Ueyama J, Hyakuna N, Chin M, Iizuka S, Miyake M, Iwai A, Kamitamari A, Kanegane H, Sato N, Tsurusawa M.	A morphology-based approach for the treatment of children with acute myeloid leukaemia : A report from the Japanese Children's Cancer and Leukemia Study Group AML 9805 Study.	Jap J Pediatr Hematol	24	283-291	2010
Ohta H, Iwamoto S, Kiyokawa N, Tsurusawa M, Deguchi T, Takase K, Fujimoto J, <u>Horibe K,</u> Komada Y.	Flow cytometric analysis of de novo acute myeloid leukemia in childhood: report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group.	Int J Hematol	93	135-137	2011
Watanabe N, Takahashi Y, Matsumoto K, Hama A, Muramatsu H, Doisaki S, <u>Horibe K,</u> Kato K, Kojima S.	Prognostic factors for outcomes of pediatric patients with refractory or relapsed acute leukemia undergoing allogeneic progenitor cell transplantation.	Biol Blood Marrow Transplant	17	516-523	2011

<u>Kudo K</u> , Hama A, Kojima S, Ishii R, Morimoto A, Bessho F, Susami S, Kobayashi N, Kinoshita A, Okimoto Y, Tawa A, Tsukimoto I.	Mosaic Down syndrome-associated acute myeloid leukemia dose not require high-dose cytarabine treatment induction and consolidation therapy.	Int J Hematol	91	630-635	2010
---	--	---------------	----	---------	------

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Prognostic significance of the *BAALC* isoform pattern and *CEBPA* mutations in pediatric acute myeloid leukemia with normal karyotype: a study by the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group

Yasuhiro Mizushima · Tomohiko Taki · Akira Shimada · Yoshihiro Yui ·
Yoshimi Hiraumi · Hiroshi Matsubara · Motonobu Watanabe · Ken-ichiro Watanabe ·
Yuri Kamitsuji · Yasuhide Hayashi · Ichiro Tsukimoto · Ryoji Kobayashi ·
Keizo Horibe · Akio Tawa · Tatsutoshi Nakahata · Souichi Adachi

Received: 8 December 2009 / Revised: 20 April 2010 / Accepted: 21 April 2010
© The Japanese Society of Hematology 2010

Abstract High *BAALC* (brain and acute leukemia, cytoplasmic) gene expression may indicate an adverse prognosis for adults who have acute myeloid leukemia (AML) and a normal karyotype, but its prognostic significance for pediatric AML cases is unclear. Whether different *BAALC* isoform patterns are of prognostic significance is also unclear. Newly diagnosed AML patients with normal

karyotype who were treated by the Japanese Childhood AML Cooperative Treatment Protocol AML 99 were analyzed in terms of their *BAALC* expression levels ($n = 29$), *BAALC* isoforms ($n = 29$), and *CEBPA* mutations ($n = 49$). Eleven and 18 patients exhibited high and low *BAALC* expression, respectively, but these groups did not differ significantly in terms of overall survival (54.6 vs. 61.1%, $P = 0.55$) or event-free survival (61.4 vs. 50.0%, $P = 0.82$). Three of these 29 patients (10.3%) expressed the exon 1-5-6-8 *BAALC* isoform along with the expected 1-6-8 isoform and had adverse clinical outcomes. Novel

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12185-010-0585-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Y. Mizushima · Y. Yui · Y. Hiraumi · H. Matsubara ·
M. Watanabe · K. Watanabe · T. Nakahata · S. Adachi
Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine,
Kyoto University, 54 Kawahara-cho, Syogoin, Sakyo-ku,
Kyoto 606-8507, Japan

T. Taki
Department of Molecular Laboratory Medicine,
Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School
of Medical Science, 465 Kajii-cho, Kawaramachi-Hirokoji,
Kamigyo-ku, Kyoto 602-8566, Japan

A. Shimada · Y. Hayashi
Department of Hematology and Oncology,
Gunma Children's Medical Center, 779 Shimohakoda,
Hokkitsu, Shibukawa, Gunma 377-8577, Japan

Y. Kamitsuji
Department of Transfusion Medicine and Cell Therapy,
Kyoto University Hospital, 54 Kawahara-cho, Syogoin,
Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

I. Tsukimoto
Department of the First Pediatrics,
Toho University School of Medicine, 6-11-1 Omori-nishi,
Otaku, Tokyo 143-8541, Japan

R. Kobayashi
Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine,
Hokkaido University, North 15, West 7, Kita-ku,
Sapporo 060-8638, Japan

K. Horibe
Clinical Research Center,
National Hospital Organization Nagoya Medical Center,
4-1-1 Sannomaru, Nakaku, Nagoya, Aichi 460-0001, Japan

A. Tawa
Department of Pediatrics,
National Hospital Organization Osaka National Hospital,
2-1-14 Hoenzaka, Chuoku, Osaka 540-0006, Japan

S. Adachi (✉)
Department of Human Health Sciences,
Graduate School of Medicine, Kyoto University,
53 Kawahara-cho, Syogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan
e-mail: adachiso@kuhp.kyoto-u.ac.jp

CEBPA mutations were also identified in four of 49 patients (8.2%). All four patients have maintained complete remission for at least 5 years. Thus, 1-5-6-8 isoform expression may be associated with an adverse prognosis in pediatric AML with normal karyotype. *CEBPA* mutations may indicate a favorable prognosis.

Keywords Pediatric AML · Normal karyotype · *BAALC* · *CEBPA*

1 Introduction

Cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia (AML) that are detected at the time of diagnosis are important prognostic factors that help to determine the clinical outcome. However, 10–20% of pediatric AML cases lack known genetic abnormalities that can be used to predict clinical outcome [1]. For example, while tandem duplications of mixed lineage leukemia gene (*MLL*) and fms-like tyrosine kinase-3 (*FLT3*) correlate with a poor prognosis in pediatric AML [2], internal tandem duplications (ITD) of *FLT3* occur much more rarely in pediatric AML than in adult AML patients; indeed, there is an age-associated increase in this mutation (from 1.5% in infants to nearly 20% in teenage patients) [3]. Thus, most normal karyotype pediatric AML patients lack known markers that are of prognostic significance. To improve the prognostic stratification of this heterogeneous group of patients, novel markers should be identified.

The *BAALC* (brain and acute leukemia, cytoplasmic) gene is believed to participate in the development of AML and chronic myelogenous leukemia in blast crisis [5]. Previous studies have also reported that high *BAALC* expression levels reflect an adverse prognosis for adult AML with a normal karyotype [6–10]. However, how *BAALC* expression levels relate to the clinical outcome of pediatric AML remains unclear.

CEBPA is a transcription factor that coordinates the granulocytic differentiation of common myeloid progenitors. *CEBPA* mutations have been detected in 7–15% of adult patients with AML and are most frequently found in the AML M1 and M2 subtypes [French–American–British (FAB) classification] [10, 11]. Previous reports indicate that *CEBPA* mutations reflect a favorable prognosis in adult AML with normal karyotype [12, 13]. However, it is unclear whether the same relationship exists between *CEBPA* mutations and pediatric AML.

While previous studies have mainly examined various prognostic factors in terms of gene mutations [9–14] and changes in gene expression [15–20], some recent studies have also reported the prognostic significance of the expression of different isoforms in leukemia [21–25].

Consequently, in the present study, we investigated the prognostic relevance of high *BAALC* expression, *BAALC* isoform patterns, and *CEBPA* mutations in pediatric AML with normal karyotype. This study was performed by the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group, which employed the AML 99 protocol [2, 4, 26, 27].

2 Patients and methods

2.1 Patients

This study included 124 of the 241 pediatric patients who were newly diagnosed with de novo AML from January 2000 to December 2002. The 241 patients included 52 patients with a normal karyotype and 49 of those were recruited into the 124-patient group. None of these 49 patients had AML-M3 or Down syndrome. AML was diagnosed according to the FAB classification, and a routine G-banding method was used for cytogenetic analysis. Of the 124 cases, 104 were subjected to *BAALC* expression analysis; of these 104 subjects, 29 had a normal karyotype. These 29 normal karyotype cases were also subjected to *BAALC* isoform analysis. All 49 normal karyotype cases were subjected to *CEBPA* mutation analysis. The characteristics of the patients subjected to *BAALC* isoform analysis and *CEBPA* mutation analysis are shown in Table 1a. The 29 normal karyotype patients who were subjected to *BAALC* isoform and expression analyses did not differ significantly in age, white blood cell (WBC) counts at diagnosis, remission rates or overall survival (OS) from the remaining 20 normal karyotype patients who were not analyzed for *BAALC* isoform and expression (Table 1b). In accordance with the Declaration of Helsinki and upon approval from the Ethics Committees of Kyoto University, informed consent was obtained from each patient or the patient's parents before entering this study.

2.2 *BAALC* expression analysis

Comparative real-time RT-PCR assays were performed and *BAALC* expression levels were measured as previously reported [5, 6]. The *BAALC* expression values of the patient group were divided at the median value (0.57) and patients were said to have a low and high *BAALC* expression if they had expression values within the lower and upper 50% of values, respectively [7].

2.3 *BAALC* isoform analysis

BAALC isoform analysis was performed by RT-PCR followed by direct sequencing. For this, the PCR product was cut out of the gel, purified with a QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Chatsworth, CA), and sequenced by the

Table 1 Characteristics of AML patients subjected to BAALC expression, BAALC isoform, and CEBPA mutation analyses

	BAALC		CEBPA
	All (n = 104)	Normal karyotype (n = 29)	Normal karyotype (n = 49)
(a)			
FAB			
M0	4	2	4
M1	18	2	6
M2	36	9	12
M4	18	8	12
M5	19	7	12
M7	7	1	3
UN	2	0	0
Age	4 days to 15 years	3 months to 15 years	3 months to 15 years
Sex			
Male	60	16	27
Female	44	13	22
Risk group			
Low	45	0	0
Intermediate	51	29	49
High	8	0	0
	BAALC		P value
	Analyzed patients (n = 29)	Non-analyzed patients (n = 20)	
(b)			
Age			
Median	8 years	8 years	
Range	3 months to 15 years	7 months to 15 years	0.591
WBC at diagnosis ($\times 10^9/L$)			
Median	53.09	15.20	
Range	2.30–343.40	1.20–236.90	0.275
Remission rates	89.7%	100%	0.083
Overall survival	58.6%	65.2%	0.639

UN undifferentiated

dideoxynucleotide termination method with ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA). The primers used are shown in supplementary Table 1. The conditions for the PCR reactions were 94°C for 5 min followed by 35 cycles of 94°C for 30 s, 65°C for 30 s, and 72°C for 30 s, and one cycle of 72°C for 7 min.

2.4 CEBPA mutation analysis

The entire coding region of the gene was amplified using overlapping PCR primer pairs followed by direct sequencing as previously described [28].

2.5 Statistical analysis

Survival distributions were estimated using the Kaplan–Meier method and the differences were compared using the

log-rank test. OS and event-free survival (EFS) were defined as the time from diagnosis to death from any cause or the last follow-up and the time from diagnosis to event (relapse or death from any cause), respectively.

3 Results

3.1 BAALC expression levels

High BAALC expression was associated with M0, M1, and M2 FAB subtypes, while M4 and M5 FAB subtypes correlated with low BAALC expression (Fig. 1). Healthy volunteers (I) have remarkably small range of BAALC expression levels compared to AML patients (II, III), as the previous study was reported [15]. We did not observe significant differences between normal karyotype patients

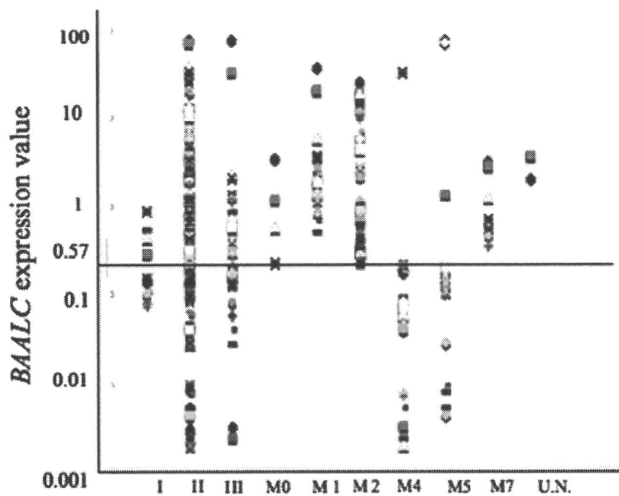


Fig. 1 *BAALC* expression levels in pediatric AML with normal karyotype and FAB subtype patients. The dot plot indicates the individual *BAALC* expression levels of healthy volunteers (I, $n = 9$), all AML patients with normal karyotype (II, $n = 104$), AML patients with normal karyotype (III, $n = 29$), and the M0 ($n = 4$), M1 ($n = 18$), M2 ($n = 36$), M4 ($n = 18$), M5 ($n = 19$), M7 ($n = 7$), and undifferentiated (U.N., $n = 2$) FAB subtype patients

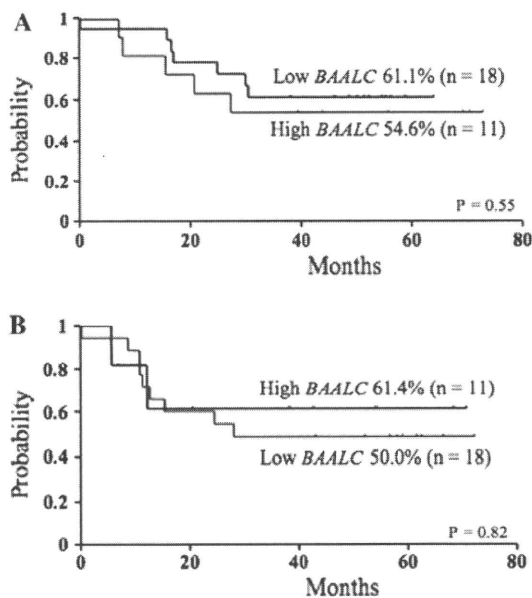


Fig. 2 Kaplan-Meier analysis of the overall survival (OS) and event-free survival (EFS) of pediatric AML patients with normal karyotype who express *BAALC* at high and low levels. The OS (a) and EFS (b) of the high and low *BAALC*-expressing pediatric AML with normal karyotype patients did not differ significantly

with high ($n = 11$) and low ($n = 18$) *BAALC* expression with regard to their OS (54.6 vs. 61.1%, $P = 0.55$, Fig. 2a) or EFS (61.4 vs. 50.0%, $P = 0.82$, Fig. 2b).

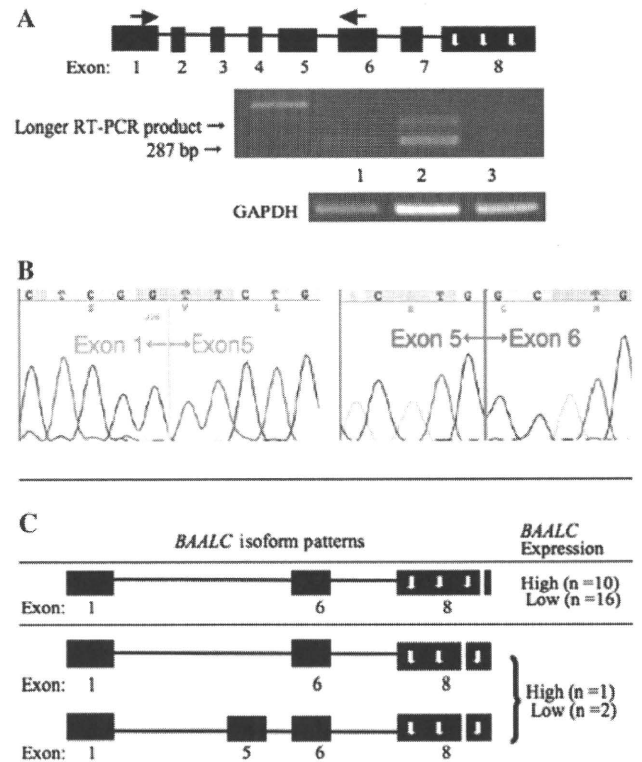


Fig. 3 a Schematic depiction of the *BAALC* gene, which consists of eight exons (indicated by black boxes). The three polyadenylation signals in the 3' untranslated region (UTR) of exon 8 that lead to three differently sized transcripts are indicated by down arrows. Comparative RT-PCR using primers in exons 1 and 6 revealed that three samples had a longer RT-PCR product in addition to the expected 287 bp product. b A partial sequence trace of exons 1, 5, and 6 in the longer RT-PCR product. c Schematic depiction of the relationship between *BAALC* isoform patterns and expression levels. Three (10.3%) of the 29 cases had the 1-5-6-8 isoform

3.2 *BAALC* isoform pattern and its relationship to *BAALC* expression levels

The *BAALC* gene consists of eight exons and its transcription followed by alternative splicing yields several different transcripts. Five stable isoforms have been detected in leukemic blasts, namely 1-8, 1-6-8, 1-5-6-8, 1-4-5-6-8, and 1-5-6-7-8 [5]. To investigate the prognostic relevance of *BAALC* isoform patterns for pediatric AML patients, we subjected 29 pediatric AML patients with normal karyotype to RT-PCR and direct sequencing. All samples had the predicted product, which consisted of exon 1, 6, and 8 sequences (1-6-8). However, three samples (10.3%) also had a longer RT-PCR product that contained in addition the exon 5 sequence (1-5-6-8) (Fig. 3a, b). How these isoform patterns relate to the *BAALC* expression levels of the 29 patients is depicted schematically in Fig. 3c. One of three patients with the

Table 2 Characteristics of patients with the 1-5-6-8 BAALC isoform

Case no.	BAALC expression value	Relapse	Clinical outcome	FAB classification	Age (years)	Sex
1	High (2.43)	+	Dead	M4	13	Female
2	Low (0.39)	-	Dead	M5a	6	Male
3	Low (0.21)	+	Dead	M4	15	Male

Table 3 CEBPA mutations

FAB subtype	All (n = 49)	CEBPA mutations
M0	4	0
M1	6	2 c. 1074_1075insAGA c. 1092_1093insCAC
M2	12	2 c. 214_224delCCCCGCACGCG c. 212_213insC and c. 720_726insCGCACC
M4	12	0
M5	12	0
M7	3	0
Total	49	4

Sequence numbering is according to GenBank accession number U34070

1-5-6-8 isoform had high BAALC expression. Of the 26 patients with the 1-6-8 isoform only, 10 and 16 showed high and low BAALC expression, respectively. The three patients with the 1-5-6-8 isoform had a poor prognosis (Table 2).

3.3 CEBPA mutation

CEBPA mutations were detected in four of the 49 AML with normal karyotype patients (8.2%). Two of these belonged to the M1 subset, and the remaining two belonged to the M2 subset. N-terminal frameshift mutations and in-frame insertions in the basic-leucine zipper (bZIP) domain were detected (Table 3). Novel mutations were identified, namely, c. 212_213insC, c. 214_224delCCCCGCACGCG, c. 720_726insCGCACC, c. 1074_1075insAGA, and c. 1092_1093insCAC. One patient had biallelic mutations in both the N-terminal part and the bZIP domain of CEBPA.

4 Discussion

High BAALC expression was associated with the M2 subset and the more immature M0/M1 FAB subtypes, while the monocytic-differentiated M4 and M5 FAB subtypes correlated with low BAALC expression (Fig. 1). This relationship between BAALC expression and FAB subtypes is

generally consistent with previously reported observations of adult AML cases [7], although the high BAALC expression in the M2 subtype cases was only observed in the pediatric AML patients. BAALC expression level was not associated with WBC counts at diagnosis [all AML patients ($n = 104$), $P = 0.91$; AML with normal karyotype ($n = 29$), $P = 0.97$]. The BAALC gene is normally expressed by neuroectoderm-derived tissues and CD34-positive hematopoietic progenitor cells and has been implicated in AML and chronic myelogenous leukemia in blast crisis [5]. Recently, quantification of BAALC gene expression made it possible to assess MRD in patients with CD34-positive acute leukemia [29]. Little is known about the functions of the BAALC gene, but it has been reported to mediate the anabolic action of PTH (parathyroid hormone) on bone cells [30]. It also serves as a marker of the mesodermal lineage (especially muscle) [31] and synaptogenesis [32], and a study on hematopoietic progenitor cells has shown that BAALC downregulation occurs upon cell differentiation [33]. Thus, while the functions of the BAALC gene remain unclear, our observations are consistent with the notion that it may be associated with monocytic cell differentiation.

We did not observe significant differences between normal karyotype patients with high ($n = 11$) and low ($n = 18$) BAALC expression with regard to their OS (54.6 vs. 61.1%, $P = 0.55$, Fig. 2a) or EFS (61.4 vs. 50.0%, $P = 0.82$, Fig. 2b). These results are not consistent with those of a previous study that examined the BAALC expression of adult normal karyotype AML patients [7]. In that study, high BAALC expression was significantly associated with a poor OS and a higher cumulative incidence of relapse. The discrepancy between this study and ours could reflect the fact that in the other study, the BAALC expression values of the patient group were divided at the median value of twelve healthy volunteers, which served as the cutoff [15]. We compared the results according to two different cutoff levels. AML samples were dichotomized at the median value (0.15) of nine healthy volunteers, but we also observed no significant differences of two expression groups (date not shown). To resolve this apparent discrepancy, a larger number of pediatric AML patients will need to be studied.

The BAALC gene consists of eight exons and its transcription followed by alternative splicing yields several