

WHO 分類において、形態所見の意義（序列順）は以下のごとくである。

1) 病型に特異的な染色体・遺伝子異常 (recurrent cytogenetic abnormalities) と特徴的な形態所見があり、その総合的な評価によって染色体・遺伝子異常を推定可能な場合が多い。第 3 版での予後良好な t(8;21)、inv(16)/t(16;16)、t(15;17)に加え、第 4 版では、APL で t(15;17)以外の非典型的な染色体異常が別に取り扱われ、また予後不良な 3 病型 t(6;9)、inv(3)/t(3;3); t(1;22)が追加された。11q23 異常 (WHO-3) の内、t(9;11)は第 4 版で独立の病型となった。

2) 細胞異形成の定量的評価は、AML with multilineage dysplasia (WHO-3) の病型診断に必要である。その基準は、芽球 20%以上（骨髄または末梢血）、2 系統以上の細胞異形成（各系統 50%以上）で、予後不良因子とされる。第 4 版では、AML with myelodysplasia-related changes と名称変更され、基準として、MDS 既往、関連する染色体異常が追加された。

3) 基本的な病型 (AML, not otherwise specified) は FAB 分類を踏襲している。

すなわち、WHO 分類において形態診断は、その基本は変わらず、新たな病型との関係で重要となる。

WHO 分類は、治療予後を反映する病型情報を提供するものの、迅速性や簡便性等の点で必ずしも実用的でない。初発未治療の形態中央診断は、免疫形質、染色体検査やキメラ遺伝子検査の結果が不明の段階であり、WHO 分類の病型は暫定的である。形態中央診断は、WHO 分類における血液形態検査の意義を認識した上で行った。最終診断は、AML 診断小委員会にて、形態中央診断を踏まえて、染色体検査、キメラ遺伝子検査、細胞表面マーカー検査などの他の検査所見、臨床所見を総合して検討、議論の上確定した。形態中央診断は、小児 AML 診断の質を高め、多

施設共同臨床試験でのリスク分類の精度向上により、層別化による治療成績の評価と各予後因子の意義の明確化において質の高い臨床研究に貢献すると期待される。また、診断困難例において小児 AML 診療の質向上に貢献することが期待される。

E. 結論

小児急性骨髄性白血病 (AML) に対する標準的治療法の確立を目指す多施設共同臨床試験において形態中央診断システムを初めて導入した後、継続的かつ円滑に運用することに成功した。さらに、AML-05 新規登録終了後、個々の病院では診断が難しい症例に絞って中央診断による診断支援を継続した。初発時の病型診断は FAB 分類に加え、形態検査所見で該当する WHO 分類を併記した。最終診断は、AML 診断小委員会にて、形態中央診断を踏まえて、染色体検査、キメラ遺伝子検査、細胞表面マーカー検査などの他の検査所見を総合して検討、議論の上確定した。

新 WHO 分類における形態診断の意義として、以下のごとく整理された。1) 病型に特異的な染色体・遺伝子異常 (recurrent cytogenetic abnormalities) と特徴的な形態所見があり、その総合的な評価によって染色体・遺伝子異常を推定可能な場合が多い。2) 細胞異形成の定量的評価が重要である。

3) 基本的な病型 (AML, not otherwise specified) は FAB 分類を踏襲している。

G. 研究発表

1. Hori T, Suzuki N, Hatakeyama N, Yamamoto M, Inazawa N, Miyachi H, Taki T, Tsutsumi H. Infantile acute promyelocytic leukemia without an RAR α rearrangement. *Pediatrics International* 53: 1070-1096, 2011.
2. Asai S, Okami K, Nakamura N, Shiraishi S, Yamashita T, Anar D, Matsushita H, Miyachi H.

The sonographic appearance of the submandibular glands in patients with IgG4-related disease. J Ultrasound Med. 31: 489-93, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許習得

予定なし

2. 実用新案登録

予定なし

3. その他

予定なし

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に関する研究
分担研究報告書

小児造血器腫瘍臨床研究の質の向上に関する研究

研究分担者 齋藤明子 独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター
臨床研究企画部 臨床疫学研究室 室長

研究要旨 小児急性骨髄性白血病(AML)の診療の質を向上させる目的で、病態解明の為の研究や、新治療法・標準的治療法開発を目的とした臨床研究は必要不可欠である。2003年に発足した日本小児白血病リンパ腫研究グループ内で行われるAML関連の臨床研究の質を確保する目的で、独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター疫学研究室は、特定非営利活動法人臨床研究支援機構と連携して、各種臨床研究のデータ管理の実務と方法論の研究を実施している。平成23年度は、3臨床試験(AML-05, AML-D05, AML-P05, H23度中に登録終了)の質管理、新規に開始した2臨床試験(AML-R11, AML-D11)の試験開始準備支援と開始後の質管理、2観察研究(AML支持療法に関する調査、再発ダウンAML調査)の質管理と解析などを担当すると共に、現在開始準備中の2試験(AML-P12, AML-12)の試験開始準備支援の実務を担当すると共に、その標準化・効率化を図るための研究活動を実施してきた。尚、試験開始準備には、プロトコールや同意説明文書作成支援を始め、中央診断部門との調整、及び調査票・データベース構築などを含む。当該稀少疾患領域におけるエビデンスの創生に必要な情報を収集する為に計画された“JPLSG疫学研究(前向きコホート研究)”と組み合わせることにより、迅速な症例登録推進も図っている。今後も継続して当該領域のデータ管理の基盤整備に努める。

A. 研究目的

小児造血器腫瘍性疾患のうち、小児急性骨髄性白血病(AML)の病態解明を目的とした各種研究、新治療法・標準的治療法開発を目的とした臨床研究、及び疫学研究は、当該領域の診療の質を向上させる上で必要不可欠である。この実現を目的として2003年に設立された日本小児白血病リンパ腫研究グループが企画・実施する各種臨床研究の質管理の担当部門として、研究協力を行う。すなわち臨床研究より得られる結果の質を確保する為、中央データセンターとして臨床研究の企画から結果公表に至る一連の作業を監視し、正確な情報発信を適時に行うことにより、科学的なエビデンスの創生に努めることが我々の使命である。臨床試験のような特殊な実験環境下で得られる研究の結果を、より広い患者集団

へ適用することの妥当性を評価する為には、必要な臨床研究への参加の有無によらず、当該領域の患者集団の臨床経過を網羅的に把握し、患者集団の違いによる効果・安全性の比較が必要不可欠であることから、当該領域のより広い患者集団を対象とした前向きコホート調査の為の基盤整備に努める必要性もあり、併せて質管理の実務を遂行しながら体制整備を行う。

B. 研究方法

1. 独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター内に、特定非営利活動法人臨床研究支援機構(NPO OSCR)データセンターを設置し、名古屋医療センター臨床研究センター臨床研究企画室 臨床疫学研究室と共同で、臨

床研究の質確保を担当する。NPO OSCRでデータマネージャーを雇用し実務を担当させると共に、臨床疫学研究室の客員研究員として、臨床研究の質向上の為の方法論の研究を行わせることで育成を図る。これら一連の活動を通して、データセンターとしての標準化・効率化を図る。

2. データ管理部門として、患者の個人情報及び診療情報の保護に関するポリシーを遵守した活動を行うため、関係者への個人情報保護に関する教育を行う。
3. JPLSGの各種委員会(AML治療研究委員会、診断委員会、効果安全性評価委員会、監査委員会、事務局、外部検査部門)などの連携が効率的かつ円滑に行われるよう、システムの有機的整備を行う。
4. 稀少疾患であるという小児造血器腫瘍領域の特殊性、急激な少子化、及び治療成績向上を目指した層別化治療の発展に伴い、少ない症例数での臨床研究を実行可能にするためのデザインの工夫が必要不可欠であることから、統計学的方法論の研究や疫学研究の開発を行う。
5. データ管理業務の実務を通して得られた問題点を質管理の基盤整備に役立てる為の各種研究活動を実施する。

(倫理面への配慮)

昨年度、臨床研究に関する倫理指針の施行に従い、データセンター業務運用に必要な患者の個人情報及び診療情報の保護方針をまとめ、ポリシーとして成文化した。本年度も継続して、倫理指針及び個人情報保護ポリシーを遵守した活動を行うための教育活動を平行しつつ、倫理面への配慮をはかる。

C. 研究結果

1. 臨床研究の質確保

データ管理担当者として、AML関連の以下の業務を担当した。

(1) 開始後の5つの臨床試験について、症例登録、進捗管理、定期的なデータクリーニング、安全性情報管理業務などを実施した。このうち、AMLの新規の2臨床試験について、研究開始に先立ち、実施計画書/同意説明文書作成支援、データ管理計画作成、オンライン登録システム確立、臨床研究開始説明会実施、及びデータベース構築によるデータ管理システム構築作業を行った。新規再発AML臨床試験は研究利用の適応外医薬品(リン酸フルダラビン、G-CSF)が含まれており、中央診断施設と参加施設側での手順書等の整備も行った。

(2) 新規開始予定のAML2試験について、研究開始支援として、実施計画書/同意説明文書作成支援、データ管理計画作成、オンライン登録システム確立、臨床研究開始説明会実施、及びデータベース構築によるデータ管理システム構築作業を行った。

2. 観察研究の質確保

AML治療研究委員会を中心として、AMLダウン再発例に関する調査研究や支持療法に関する観察研究などが計画・実施された。データ管理担当者として調査実施に関わる必要情報の提供から、計画書及び調査票などの作成支援を行った。後者については簡単な集計を、前者については公表論文作成の為の詳細な解析を担当した(現在、Bloodへ投稿中)。

3. 個人情報保護ポリシーの作成

JPLSGの各種AML関連の臨床研究のデータ管理を担当する上で、患者の個人情報及び

診療情報の漏洩、混交、紛失、盗用などを防ぐ為のセキュリティ確保の方針、患者情報の不正流出の防止策、不要となった情報の取り扱い、開示の方法、研究に関わる側の情報の取り扱いなどについて具体的の方針を定め、「個人情報保護方針」を作成しており、本年も継続して関係者への教育・周知・徹底を図った。

4. 臨床研究デザインの工夫及び疫学研究の開発

当該グループは研究開始当初より、臨床研究への症例登録手続きに先立ち、JPLSG 登録を行ってきた。これは主として、研究グループが診断技術向上と標準化を目指した中央診断施設への一貫した検体搬送システムを確立する意図に基づいていた。JPLSG 登録症例の中には、臨床研究の候補者であっても細かい対象に関する規定への抵触などの理由で臨床研究に参加しない症例が存在する。臨床研究不参加症例のその後の治療内容と臨床効果を把握することが出来れば、臨床研究に参加し、厳密な管理の下で規定の治療を受けた患者から得られた臨床研究結果の一般化の妥当性評価が可能となる。この点に着目し、当該領域の患者を網羅的に把握できる前向きコホート研究のシステムを確立するための実施計画書を作成し、日本小児血液・がん学会による審査承認を得た後、H23 年度中に JPLSG140 施設中 130 施設以上での倫理審査委員会承認を得た。前述の如く、小児 AML 領域の臨床研究を行う上での問題は、疾患の稀少性にあり、この試みが、問題解決への第一歩となる。

又、稀少疾患領域における臨床試験を迅速に実施する上でシームレス Phase II, III デザインを採用した試験計画を導入した。

5. 質管理に関する研究活動

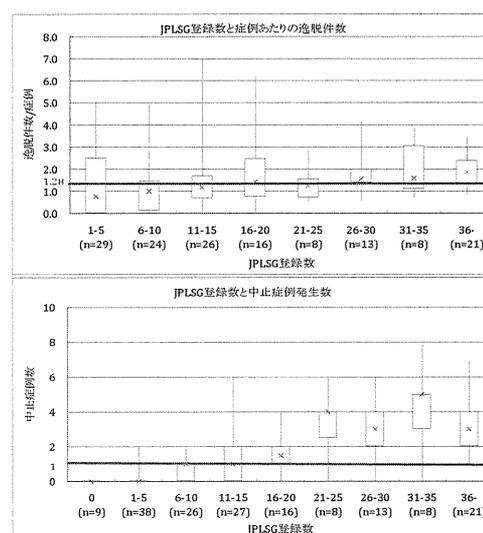
(1) 臨床研究作業工程標準化の検討

臨床研究の種別によらず作業工程に標準化をもたらすことにより、効率的な運用、症例リクルートに繋がっていることが分かった。一方、JPLSG 登録数や臨床試験症例登録数の増加が無視できない参加施設側へ負担増大に繋がっていることも確認された。これらの作業をどのように効率化、標準化していくかが今後の重要な課題となる。

(2) 臨床試験の逸脱評価に関する検討

臨床試験参加症例数が多い施設ほど、臨床試験逸脱候補や中止の発生数が多くなっている実情が明らかになった(図 1)。

図 1. 研究参加経験数と逸脱候補(上図 1a)や中止(下図 1b)発生数との関係



一方、我々が逸脱候補として抽出してきた事象は、対象とした 1351 症例に対し 2160 件となっていたが、そのうち試験継続に影響を及ぼす重大な違反と判定されたものは、僅か 34 件(1.6%)であり、その内訳には、試験薬投与量不遵守、計画書に規定されていない治療(移植/抗がん剤/放射線治療など安全性や有効性へ強い影響を及ぼすもの)、

効果判定に影響を及ぼす検査未施行などが含まれていること、及び6割以上の症例で複数の逸脱候補事象が観察されているという事実が確認された。

(3) 臨床試験の安全性評価に関する検討

臨床試験の安全性に関して、研究参加経験数が多い施設ほど有害事象発生件数が多いが、有害事象報告までの所要日数は有害事象発現件数によらず一定であることが分かった。研究協力に伴う負担増大は免れないが、安全性情報報告の重要性が認知され速やかな報告に繋がっている可能性が窺え、グループとしての成熟が確認された。

D. 考察

稀少な小児 AML 疾患領域の診療の質向上を目指した病態研究や治療開発研究は、将来ある小児の福祉向上に必要不可欠であるものの、市場が小さく毒性が強いことなどから、営利企業が扱い難い領域であり、医師主導臨床研究に頼らざるを得ない。国内の有数の臨床試験データセンターである日本臨床腫瘍研究グループ(JCOG)データセンターなどと我々のデータセンターとで大きく異なる点は、“稀少疾患領域であること”、“小児という成長過程にある患者集団を対象としていることより、投薬量は時間と共に変化し、妊よう性も含めた広い毒性評価を長期的に観察する必要があること”、“固形がんのような局所治療が主となることはなく、常に全身性疾患としての長期的な全身治療が必要になる(長いものでは2年を要する)”ことなどである。必然的に、調査は複雑化・煩雑化し、データ管理はきわめて難しい。今回行った研究活動により、登録、中央診断・検査、症例経過報告などの手順を標準化させることに有る程度の効率化が図れる

ことが分かったが、臨床研究数の増大に伴う参加施設側の負担は無視できないことが明らかになった。少ない小児科医師が多忙な臨床業務の傍ら、複雑な研究を行っている実情があり、どのように効率化を図るかが今後の課題と考える。JPLSG 疫学研究の開始により、臨床研究のリクルートの問題や長期フォローアップとの連携が整理できる方向で基盤整備を継続すると共に、各種委員会の業務を中央データセンターとしてサポートする作業も含めて、実務経験を重ね、データの質を落とさずに業務の簡略化・標準化を図るよう、今後も引き続き地道な努力が必要である。

E. 結論

臨床疫学研究室は OSCR データセンターと共同で JPLSG が企画・実施している AML 関連の臨床研究の質管理の実務・研究を担当している。臨床研究支援体制整備はまだ開発途上であり、効率化・標準化を図るための地道な努力を継続して行っていく。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Sekimizu M, Sunami S, Nakazawa A, Hayashi Y, Okimoto Y, Saito AM, HoribeK, Tsurusawa M, Mori T. Chromosome abnormalities in advanced stage T-cell lymphoblastic lymphoma of children and adolescents: a report from Japanese Paediatric Leukaemia/Lymphoma Study Group (JPLSG) and review of the literature.

British Journal of Haematology. 2011
Sep; 154(5): 612-617.

仁、堀部敬三、齋藤明子 臨床試験に
おける逸脱情報収集方法に関する検討
日本臨床試験研究会 第3回学術集会
総会 2012.2.23 (福岡)

2. 学会発表等

- (1) 齋藤明子:「小児造血器腫瘍を対象とした多施設共同臨床試験の方法と実践」
第114回日本小児科学会学術集会 分
野別シンポジウム8: 我が国における小
児造血器腫瘍治療研究体制の整備と
標準的治療法の確立に向けて. 2011.8.
品川)
- (2) 齋藤明子、永井かおり、岡部有貴子、
西岡絵美子、三和郁子、佐藤則子、古
川知佐子、上島裕子、生越由枝、西村
真希、鶴澤正仁、堀部敬三 臨床研究
作業工程の標準化がもたらす臨床試験
の質管理への影響に関する検討 日本
臨床試験研究会 第3回学術集会総会
2012.2.23 (福岡)
- (3) 岡部有貴子、永井かおり、西岡絵美子、
三和郁子、佐藤則子、古川知佐子、上
島裕子、生越由枝、西村真希、鶴澤正
仁、堀部敬三、齋藤明子 安全性情報
収集の最適化に関する検討 日本臨床
試験研究会 第3回学術集会総会
2012.2.23 (福岡)
- (4) 永井かおり、岡部有貴子、西岡絵美子、
三和郁子、佐藤則子、古川知佐子、上
島裕子、生越由枝、西村真希、堀部敬
三、齋藤明子 WEB登録システムの利
用状況に関する検討 日本臨床試験研
究会 第3回学術集会総会 2012.2.23
(福岡)
- (5) 西岡絵美子、永井かおり、岡部有貴子、
三和郁子、佐藤則子、古川知佐子、上
島裕子、生越由枝、西村真希、鶴澤正

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得、2. 実用新案、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)の標準的治療法の確立に関する研究
分担研究報告書

小児急性骨髄性白血病における遺伝子異常と臨床像の解析
研究分担者 林 泰秀 群馬県立小児医療センター 院長

研究要旨：小児急性骨髄性白血病(AML)の発生には癌遺伝子、癌抑制遺伝子、細胞増殖関連遺伝子の異常が関与し、それぞれの遺伝子が AML の発症や悪性度と関連することが報告されている。予後不良例においては同時に複数の遺伝子異常が存在することも多く、臨床情報と遺伝子異常を比較検討することにより、予後因子となる遺伝子異常を抽出することができ、これらは治療方針を決定する上で極めて重要であり、治療成績の向上と副作用の軽減につながる。我々はこれまで AML99 登録症例を対象に癌関連遺伝子の解析を行い、*FLT3-ITD*、*MLL-PTD*、*KIT*、*CEBPA* 遺伝子異常が予後因子であることを明らかにしてきた。今年度は我々は小児 AML の AML99 プロトコールにおける *DNMT3A* 遺伝子と *NUP98-NSD1* 融合遺伝子を解析し臨床像との関係を明らかにした。*DNMT3A* 遺伝子の解析では、AML149 例全例で変異はみられなかった。*DNMT3A* 遺伝子変異は小児 AML の発症・進展には関与しないものと思われた。*NUP98-NSD1* 融合遺伝子は 157 例中6例(3.8%)にみられ、この6例は正常核型が多く、有意に予後不良であった。GeneChip による発現アレイの解析では、*HOXA9*、*A10* が高発現であった。今後、AML の risk 層別化の際には、*NUP98-NSD1* 融合遺伝子陽性例を考慮する必要があると思われた。また、治療関連白血病 20 例では *MLL* 再構成のある 1 例に変異がみられ、白血病発症における *MLL* と *CBL* の共同作用が示唆された。さらに、家族性血小板減少性疾患 (FPD)-AML の家系を経験し、FPD-AML の2姉妹のうち慢性骨髄単球性白血病を発症した1例で *CBL* 遺伝子の変異がみられ、FPD-AML の AML への進展に *CBL* 遺伝子の変異が関与することが示唆された。

A. 研究目的

近年、小児急性骨髄性白血病 (AML) はチロシンキナーゼに関連する遺伝子の活性化変異と予後との関連が報告されている。我々はこれまで小児 AML 共同治療研究会で行われた AML99 プロトコールにより治療された 157 症例の遺伝子異常 (*FLT3*、*KIT*、*MLL*、*NPM1*、*CEBPA* 遺伝子) と予後との相関を明らかにしてきた。今年度は *DNMT3A* 遺伝子と *NUP98-NSD1* 融合遺伝子の解析を行ない、臨床像との関係を検討した。また治療関連白血病における *CBL* 遺伝子の異常の関与と FPD-AML の家系における *CBL* 遺伝子変異の意義を検討した。

B. 研究方法

< *DNMT3A* 遺伝子の解析 >

AML はヘテロな疾患であり、発症に関わる遺伝子異常や染色体転座が、すでに多数明らかにされているが、正常核型の中にはまだ遺伝子変異が明らかにされていない症例が数多く存在している。近年、成人AMLで、DNAメチルトランスフェラーゼをコードする *DNMT3A* 遺伝子の体細胞変異が同定された。*DNMT3A* 遺伝子変異は中リスクの細胞遺伝学的プロファイルを有する新

規 AML 患者 (特に正常核型) で高頻度に認められ、変異例では有意に予後が不良であると報告されている。今回我々は、AML99 研究 (Down 症候群は除く) で治療された AML149 例 (年齢 0 才~15 才、FAB 分類 では M0 5 例、M1 23 例、M2 44 例、M3 13 例、M4 22 例、M5 21 例、M6 1 例、M7 17 例、分類不能 3 例) において、RNA を用いて *DNMT3A* 遺伝子のエクソン 17 からエクソン 23 までを RT-PCR 法にて増幅後、直接塩基決定法で変異解析を行った。

< *NUP98-NSD* 転座の解析 >

近年、造血器腫瘍における *NUP98* 再構成を有する症例の報告が集積されつつあり、*NUP98* 再構成を有する症例は有意に予後が不良であるとの報告もみられるが、小児造血器腫瘍における臨床像は明らかでなく、多数例の検討はされていない。今回我々は、AML99 研究で治療された AML157 例の RNA を用いて、*NUP98* 遺伝子ならびに *NSD1*、*NSD2*、*NSD3* 遺伝子それぞれに複数のプライマーを設定し、RT-PCR 法にて増幅後、電気泳動でバンドを確認し、直接塩基決定法で解析を行った。

< 小児の治療関連白血病の *CBL* 遺伝子の解析 >

トポイソメラーゼ阻害薬 (VP-16 等) の登場により、小児の治療関連白血病が増えている。小児治療関連白血病 20 例 (15 例が 1 才 ~ 17 才、男 8 例、女 7 例) の AML、4 例が骨髄異形成症候群、1 例が ALL) について *CBL* 遺伝子変異の解析を行った。原病はリンパ腫 7 例、神経芽腫 5 例、ALL 5 例、AML と JMML が各 1 例であった。

<FPD-AML の家系の解析>

AML1 変異のある FPD-AML の一家系を経験した。父親が AML で死亡し、姉妹が汎血球減少症であり、その後姉が慢性骨髄単球性白血病 (CMML) を発症した。この家系の *CBL* 遺伝子の解析を行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析にあたっては、三省合同のゲノム指針に則り、患者又は両親から同意を得、当センターの倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

DNMT3A 遺伝子変異の検討では、AML149 例全例で変異は見られなかった。

米国の成人の解析では AML281 例中 62 例 (22.1%) に *DNMT3A* 遺伝子の変異が認められ、変異例の 70% 以上が正常核型で、*FLT3*、*NPM1*、*IDH* 遺伝子変異を高頻度に伴っており、FAB 分類の M4、M5 に比較的高頻度に認められたと報告されている (N Engl J Med 363: 2424-33, 2010, Nat Genet 43:309-15, 2011)。しかし、今回の我々の検討では変異例は 1 例もみられず、本邦の小児 AML では、欧米の報告と同様 *NPM1*、*IDH* 遺伝子変異と同じように *DNMT3A* 遺伝子変異はまれであり、年齢に依存することが示唆された。

NUP98-NSD1 融合遺伝子の検討では、AML 157 例のうち 6 例 (3.8%) に融合遺伝子を確認した (図 1)。*NUP98-NSD2*、*NUP98-NSD3* の融合遺伝子はみられなかった。

融合遺伝子がみられた 6 例のうちわけは、2 才 ~ 15 才、M1 1 例、M4 2 例、M5 2 例、分類不能 1 例で 6 例中 4 例は正常核型 (いずれも死亡)、2 例は 9q- の症例 (いずれも生存) であり、全例、染色体 G-banding では t(5;11) は同定できなかった。6 例中 *FLT3-ITD* が 4 例、*WT1* 変異が 2 例、*RAS* 変異が 2 例、*KIT* 変異が 1 例みられた。発現アレイの解析では *HOXA9*、*HOXA10* の高発現に加え、一部の *HOXB* の発現もみられ、*MLL* 再構成陽性例とは異なる発現パターンを示した。

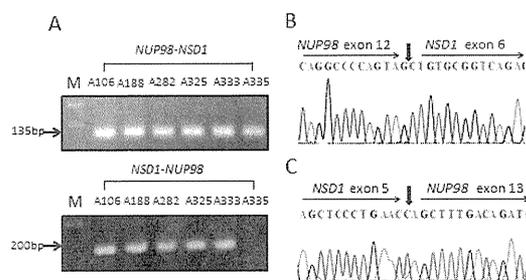


図 1 *NUP98-NSD1* 融合遺伝子
A. RT-PCR による検出バンド
B. 融合点の塩基配列

治療関連白血病 20 例では *MLL* 再構成のある 1 例に変異がみられ、この例は初診時 T-リンパ腫で単球系細胞の増加した治療関連白血病に進展し、この時 *CBL* 変異が検出された。*MLL* 再構成もみられたので、治療関連白血病の発症に *MLL* と *CBL* の共同作用が示唆された。

FPD-AML 家系の検討では、汎血球減少症の時にみられなかった *CBL* 変異が、CMML 発症時にみられた (図 2)。

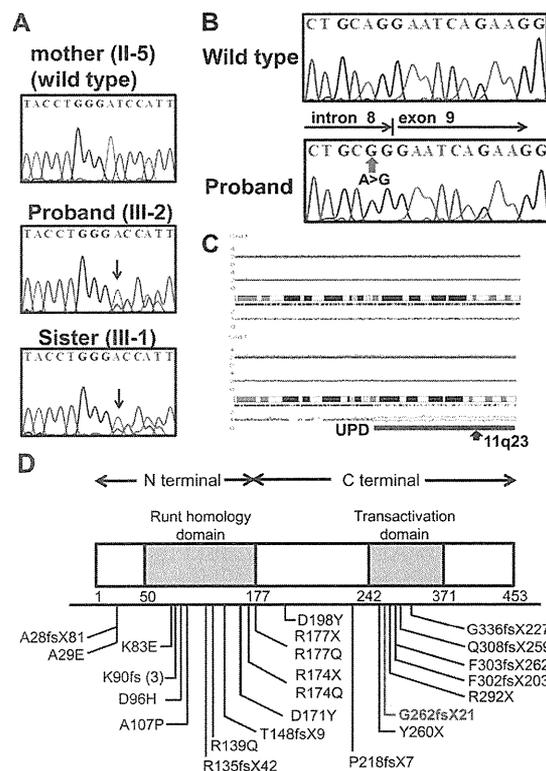


図 2. A. 患者、妹、母親の *AML1* 遺伝子変異。患者と妹に同じ変異がみられる。B. 患者の *CBL* 遺伝子変異。C. Affymetrix 社の SNP アレイ解析。患者に 11 番長腕の uniparental disomy (UPD) がみられた。D.

RUNX1 の模式図と変異部位。

D. 考察

小児 AML では、t(8;21)、t(15;17)、inv(16)が多くみられ、その予後は良好とされる一方、KIT 遺伝子変異、FLT3-ITD を有する症例は予後不良とされている。しかし、そのいずれにも属さない症例が数多く存在する。

DNMT3A 変異は成人では約20%にみられると報告されているが、今回の検討では 149 例全例で変異はみられなかった。DNMT3A 変異は年齢に依存することが示唆された。また民族差も考えられ、今後多数例での解析が待たれる。

NUP98-NSD1 融合遺伝子を有する 6 例は正常核型が多くみられ、有意に予後不良であった。また HOXA9、A10 が高発現であり、さらに一部の HOXB family も陽性で、同一の発現パターンがみられた。今後、AML の risk 層別化の際には、NUP98-NSD1 融合遺伝子を考慮する必要があると思われた。さらに小児 AML における NUP98-NSD1 融合遺伝子の臨床的意義を検討するためには、より多数例での解析が必要である。現在 AML-05 プロトコール登録 380 症例の解析を行っている。

治療関連白血病 20 例では MLL 再構成のある AML の 1 例に変異がみられたことは、これまで MLL-CBL 融合遺伝子が報告されており、白血病発症に MLL と CBL の共同作用が示唆された。

FPD-AML では、これまで AML1 遺伝子の両アレルの変異が報告されているが、他の遺伝子の関与の報告はなかった。今回の CBL 遺伝子の検討により、FPD-AML の CMML や AML への進展に CBL 遺伝子の変異が関与することが示唆された。

E. 結論

AML99 に登録された小児 AML で DNMT3A 遺伝子変異と NUP98-NSD1 を検討し、臨床像との相関を明らかにした。また、治療関連白血病と FPD-AML における CBL 遺伝子の関与を明らかにした。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shiba N, Hasegawa D, Park MJ, Murata C, Matsubara A, Ogawa C, Manabe A, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. CBL mutation in chronic myelomonocytic leukemia secondary to familial platelet disorder with propensity to develop acute myeloid leukemia. Blood 119: 2612-2614, 2012

2. Yokoyama T, Toki T, Aoki Y, Kanezaki R, Park MJ, Kanno Y, Takahara T, Yamazaki Y, Ito E, Hayashi Y, Nakamura T. Identification of TRIB1 R107L gain-of-function mutation in human acute megakaryocytic leukemia. Blood. 119: 2608-2611, 2012
3. Shiba N, Taki T, Park MJ, Shimada A, Sotomatsu M, Adachi S, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Arakawa H, Hayashi Y. DNMT3A mutations are rare in childhood acute myeloid leukaemia, myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukaemia. Br J Haematol ; 156 : 413-414, 2012
4. Okubo J, Takita J, Chen Y, Oki K, Nishimura R, Kato M, Sanada M, Hiwatari M, Hayashi Y, Igarashi T, Ogawa S. Aberrant activation of ALK kinase by a novel truncated form ALK protein in neuroblastoma. Oncogene (in press)
5. Sano H, Shimada A, Taki T, Murata C, Park MJ, Sotomatsu M, Tabuchi K, Tawa A, Kobayashi R, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Hayashi Y. RAS mutations are frequent in FAB type M4 and M5 of acute myeloid leukemia, and related to late relapse: a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. Int J Hematol (in press)
6. Inukai T, Kiyokawa N, Campana D, Coustan-Smith E, Kikuchi A, Kobayashi M, Takahashi H, Koh K, Manabe A, Kumagai M, Ikuta K, Hayashi Y, Tsuchida M, Sugita K, Ohara A. Clinical significance of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: Results of the Tokyo Children's Cancer Study Group Study L99-15. Brit J Haematol. 156 : 358-365, 2012
7. Shiba N, Park MJ, Taki T, Takita J, Hiwatari M, Kanazawa T, Sotomatsu M, Ishii E, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. CBL mutations in infant acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol 156 : 672-674, 2012
8. Takita J, Chen Y, Okubo J, Sanada M, Adachi M, Ohki K, Nishimura R, Hanada R, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Aberrations of NEGR1 on 1p31 and MYEOV on 11q13 in neuroblastoma. Cancer Sci 102 : 1645-1650, 2011
9. Shiba N, Taki T, Park MJ, Nagasawa M, Kanazawa T, Takita J, Ohnishi H, Sotomatsu M, Arakawa H, Hayashi Y. CBL mutation in childhood therapy-related leukemia. Leukemia 25 : 1356-1358, 2011
10. Sekimizu M, Sunami S, Nakazawa A, Hayashi Y, Okimoto Y, Saito AM, Horibe K, Tsurusawa M, Mori T. Chromosome abnormalities in advanced stage T-cell lymphoblastic lymphoma of children and adolescents: a report from Japanese Paediatric Leukaemia/Lymphoma Study Group (JPLSG) and review of the literature. Br J Haematol. 154 : 612-617, 2011
11. Oki K, Takita J, Hiwatari M, Nishimura R, Sanada M, Okubo J, Adachi M, Sotomatsu M, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. IDH1 and IDH2 mutations are rare in pediatric myeloid malignancies. Leukemia 25 : 382-384, 2011

12. Ogawa S, Takita J, Sanada M, Hayashi Y. Oncogenic mutations of ALK in neuroblastoma. *Cancer Science* 102 : 302-308, 2011
2. 学会発表
- 1) 小川誠司, 加藤元博, 林 泰秀. TAM における遺伝学的基盤探索. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011.8.12
 - 2) 滝田順子, 西村 力, 安達正時, 大木健太郎, 大久保 淳, 樋渡光輝, 真田 昌, 林 泰秀, 小川誠司, 五十嵐 隆. 革新的ゲノム解析技術を用いた難治性小児固形腫瘍における発症分子機構の解明. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011.8.12
 - 3) 安達正時, 滝田順子, 西村 力, 真田 昌, 樋渡光輝, 大木健太郎, 大久保 淳, 林 泰秀, 五十嵐 隆, 小川誠司. 神経芽腫における全エクソン領域のシーケンス解析. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011.8.12
 - 4) 朴 明子, 外松 学, 林 泰秀. 肝機能障害を伴う TAM の臨床像について. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011.8.12
 - 5) 福島 敬, 南木 融, 清河信敬, 康 勝好, 真部 淳, 菊地 陽, 熊谷昌明, 林 泰秀, 土田昌宏, 小原 明. TCCSG 登録例における小児 ALL 関連キメラ遺伝子発現量の推移について. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011.8.13
 - 6) 樋渡光輝, 滝田順子, 真田 昌, 西村 力, 大久保淳, 井田孔明, 外松 学, 菊地 陽, 五十嵐隆, 林 泰秀, 小川誠司. 乳児白血病における IDH 1/2 遺伝子の変異解析. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011.10.3
 - 7) 西村 力, 滝田順子, 吉田健一, 白石友一, 川幡亮一郎, 永田安伸, 大久保淳, 真田 昌, 五十嵐隆, 林 泰秀, 宮野 悟, 小川誠司. 次世代シーケンサーによる神経芽腫のエクソーム解析. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011.10.4
 - 8) 朴 明子, 清河信敬, 小田 慈, 真部 淳, 小原 明, 花田良二, 土田昌宏, 小川誠司, 堀部敬三, 林 泰秀. 小児 T 細胞性急性リンパ性白血病における LEF1 遺伝子の異常と臨床像について. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011.10.4
 - 9) Hiwatari M, Ohki K, Takita J, Nishimura R, Sanada M, Okubo J, Sotomatsu M, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Mutation analysis for IDH1 and IDH2 in infantile leukemia. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011.10.14
 - 10) Shiba N, Hasegawa D, Park MJ, Murata C, Matsubara A, Ogawa C, Manabe A, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. CBL mutation in CMML secondary to familial platelet disorder with propensity to develop AML. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011.10.15
 - 11) Inukai T, Kiyokawa N, Ohara A, Takahashi H, Koh K, Manabe A, Kumagai M, Ikuta K, Hayashi Y, Tsuchida M, Campana D, Sugita K. Clinical significance of ETP-ALL in childhood T-ALL; the TCCSG L99-15 study. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011.10.15
 - 12) Kiyokawa N, Iijima K, Inukai T, Takahashi H, Fukushima T, Koh Y, Sugita K, Manabe A, Kikuchi A, Kumagai M, Ohara A, Fujimoto J, Hayashi Y. Molecular characteristics of early T-cell precursor (ETP) ALL and T-ALL treated in TCCSG trials. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011.10.15
 - 13) Toki T, Kobayashi E, Kanazaki R, Wang R, Terui K, Kanegane H, Maeda M, Koike T, Endo M, Adachi S, Hayashi Y, Shimizu R, Yamamoto M, Ito E. Novel GATA1 mutants with internal deletions in transient abnormal myelopoiesis in down syndrome. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011.10.15
 - 14) Yoshida K, Toki T, Park MJ, Nagata Y, Wang R, Shiraishi Y, Sanada M, Nagasaki M, Miyano S, kanegane H, Kawakami K, Kato K, Hayashi Y, Ito E, Ogawa S. Whole exome analysis of transient abnormal myelopoiesis and acute megakaryocytic leukemia with Down syndrome. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011.10.15
 - 15) Motomura A, Oki K, Takita J, Nishimura R, Okubo J, Hiwatari M, Sanada M, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Aberrations of DNMT3A in pediatric myeloid malignancies. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011.10.15

- 16) Park MJ, Kiyokawa N, Oda M, Manabe A, Hara J, Ohara A, Hanada R, Tsuchida M, Ogawa S, Horibe K, Hayashi Y. The clinical significance of LEF1 mutation in childhood acute lymphoblastic leukemia. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011.10.15
- 17) 大木健太郎, 大喜多肇, 小林健一郎, 清河信敬, 朴 明子, 新井 心, 外松 学, 柴 徳生, 福島 敬, 康 勝好, 花田良二, 真部 淳, 菊地 陽, 小原 明, 土田昌宏, 林 泰秀. TCCSG 小児 B 前駆細胞型急性リンパ性白血病における *CRLF2* と *IKZF1* の解析. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.27
- 18) 花田 勇, 照井君典, 土岐 力, 工藤 耕, 佐藤知彦, 神尾卓哉, 佐々木伸也, 高橋良博, 林 泰秀, 杉田完爾, 小島勢二, 小池健一, 小阪嘉之, 小林正夫, 伊藤悦朗. ダウン症候群関連 ALL の発症における JAK2、および CRLF2 遺伝子異常の解析. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.27
- 19) 嶋田 明, 富澤大輔, 木下明俊, 浜本和子, 月本一郎, 小川 淳, 多賀 崇, 今村俊彦, 多和昭雄, 堀部敬三, 滝 智彦, 林 泰秀, 足立壮一. 乳児 AML の後方視的解析. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.25
- 20) 柴 徳生, 朴 明子, 村田知里, 嶋田 明, 滝 智彦, 外松 学, 田渕 健, 足立壮一, 多和昭雄, 堀部敬三, 土田昌宏, 花田良二, 月本一郎, 荒川浩一, 林 泰秀. 小児急性白血病における DNMT3A 遺伝子変異の解析. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.25
- 21) 木下明俊, 宮地勇人, 滝 智彦, 松下弘道, 矢部はるみ, 清河信敬, 照井君典, 太田秀明, 出口隆生, 高橋浩之, 多賀 崇, 林 泰秀, 多和昭雄, 足立壮一. JPLSG AML-05 臨床試験における WHO 分類に基づいた小児急性骨髄性白血病の中央診断. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.25
- 22) 柴 徳生, 朴 明子, 村田知里, 嶋田 明, 滝 智彦, 外松 学, 田渕 健, 足立壮一, 多和昭雄, 堀部敬三, 土田昌宏, 花田良二, 月本一郎, 荒川浩一, 林 泰秀. 小児急性骨髄性白血病における *NUP98-MSD* 転座の解析. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.25
- 23) 竹谷 健, 滝 智彦, 日向瑞貴, 安部真理子, 福田誠司, 山口清次, 林 泰秀. 染色体 11p15 異常を有する造血器腫瘍における遺伝子変異と臨床像の関連. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.25
- 24) 飯島一智, 清河信敬, 小林健一郎, 大喜多肇, 山田浩之, 三春昌嗣, 森 鉄也, 福島 敬, 南木 融, 斎藤正博, 康 勝好, 真部 淳, 菊地 陽, 熊谷昌明, 藤本純一郎, 林 泰秀, 土田昌宏, 小原 明. 東京小児がんグループ(TCCSG)ALL 治療研究登録症例の網羅的遺伝子発現解析. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.25
- 25) 朴 明子, 清河信敬, 小田 慈, 真部 淳, 原 純一, 小原 明, 花田良二, 土田昌宏, 小川誠司, 堀部敬三, 林 泰秀. T 細胞型小児急性リンパ性白血病における遺伝子異常の解析. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.25
- 26) 堤 修一, 王 凌華, 朴 明子, 照井君典, 佐々木伸也, 伊藤悦朗, 林 泰秀, 油谷浩幸. MLL 再構成陽性の小児急性リンパ性白血病のエクソーム解析. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.25
- 27) 樋渡光輝, 大木健太郎, 滝田順子, 西村力, 真田 昌, 大久保淳, 外松 学, 菊地陽, 五十嵐隆, 林 泰秀, 小川誠司. 乳児急性白血病における *IDH1* および *IDH2* 遺伝子の解析. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.25
- 28) 吉田健一, 土岐 力, 朴 明子, 永田安伸, 王 汝南, 白石友一, 真田 昌, 昆 彩菜, 佐藤亜依子, 長崎正朗, 宮野 悟, 金兼弘和, 川上 清, 加藤剛二, 小島勢二, 林 泰秀, 伊藤悦朗, 小川誠司. ダウン症候群に合併した一過性骨髄増殖症(TAM)および急性巨核芽球性白血病(AMKL)の全エクソンシーケンス. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.25
- 29) 清河信敬, 林 泰秀, 小原 明. Gene expression profiles of early T-cell precursor

- (ETP-) ALL and T-ALL treated in TCCSG trials. 第 53 回日本小児血液・がん学会 学術集会, 前橋, 2011.11.27
- 30) Shiba N, Taki T, Park M, Murata C, Oki K, Ichikawa H, Shimada A, Kanazawa T, Sotomatsu M, Tabuchi K, Adachi S, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Arakawa H, Hayashi Y. *NUP98-NSD1* fusion gene is strongly associated with a poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia: a study of the Japanese Childhood AML99 Cooperative Study Group. 53rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego, December 9-13, 2011
- 31) Taketani T, Taki T, Fukuda S, Hyuga M, Onishi C, Yamaguchi S, Hayashi Y. The Concurrent mutations in hematological malignancies with *NUP98*-fusion genes are associated with clinical prognosis. 53rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego, December 9-13, 2011
- 32) Hanada I, Terui K, Toki T, Kudo K, Sato T, Kamio T, Sasaki S, Takahashi Y, Hayashi Y, Sugita K, Kojima S, Koike K, Kosaka Y, Kobayashi M, Ito E. JAK2 mutations and CRLF2 rearrangements in down syndrome associated acute lymphoblastic leukemia in Japan. 53rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego, December 9-13, 2011
- 33) Shimada A, Tomizawa D, Kinoshita A, Hamamoto K, Tsukimoto I, Ogawa A, Taga T, Imamura T, Tawa A, Horibe K, Taki T, Hayashi Y, Adachi S. Heterogeneity in infants with acute myeloid leukemia : retrospective analysis of a Japanese nationwide survey. 53rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego, December 9-13, 2011
- 34) Toki T, Kobayashi E, Kanezaki R, Wang RN, Terui K, Kanegane H, Maeda M, Endo M, Mizuochi T, Adach S, Hayashi Y, Shimizu R, Yamamoto M, Ito E. GATA1 mutants lacking Rb-binding motif observed in transient abnormal myelopoiesis in down syndrome. 53rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego, December 9-13, 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

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)の標準的治療法の確立に関する研究
分担研究報告書

中央診断による正確かつ効率的な分子細胞遺伝学的診断法の確立

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研究で行った中央診断における染色体検査とキメラ遺伝子スクリーニングの結果のまとめを行った。追加検査を行った中には7例の *MLL-AF10*陽性例が含まれていた一方で、*NUP98-HOXA9*のようにスクリーニング項目に含まれながら1例も検出されなかったキメラ遺伝子も存在した。また、通常とは異なる部分で融合した *CBFB-MYH11*なども検出され、キメラ遺伝子スクリーニングに含めるキメラ遺伝子の内容や、使用するプライマー-プローブセットの構成などについての検討も必要と思われた。5q- やモノソミー7では、G分染法のみでの正確な診断が非常に難しいことが明らかになった。高リスク因子としている異常であり、どのような検査を追加してどのような基準で診断をするのが適当であるのかの検討が必要である。

A. 研究目的

JPLSG AML-05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い、その結果について診断小委員会において検討し、WHO分類に基づいた最終診断とリスク分類を決定した。次期臨床試験でも同様のリスク分類の採用が予定されており、正確なリスク分類を行うための効率的な検査手順と正確な診断基準の確立が必要とされる。AML-05で明らかになった染色体検査およびキメラ遺伝子検査における問題点を整理し、より正確で迅速なリスク分類の決定システムを構築する。

B. 研究方法

染色体検査結果から既知のキメラ遺伝子の形成が予想された23例、および特異的染色体転座が観察されたにもかかわらず、キメラ遺伝子スクリーニングでの該当するキメラ遺伝子が陰性だった3例について追加検査を行った。また、AML-05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、モノソミー7と5q- が疑われた症例について検討した。

(倫理面への配慮)

追加検査は、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行った。

C. 研究結果

1. キメラ遺伝子の追加検査最も多かったのは10pと11qに異常を認めた8例で、追加検査の結果は *MLL-AF10*が6例、*MLL-ABI1*が1例、*CALM-AF10*が1例であった。また、G分染法では *add(11)(q13)*のみで10番の異常は観察されなかったが、SKY法の結果から11番と10番の転座が判明した1例でも、RT-PCRにより *MLL-AF10*が検出された。その他では、*t(8;16)(p11;p13)*の3例で *MOZ-CBP*が、*t(6;9)(p23;q34)*の2例で *DEK-CAN(NUP214)*が検出された。*del(7)(q22), del(12)(p13)*を有する乳児のAMKL症例からは *MX1(HLXB9)-ETV6*が、*add(10)(q22), add(11)(q11)*を含む複雑な染色体異常を有する症例からは *MLL-LCX*が、*t(11;17)(q23;q21)*を有する症例からは *MLL-LASP1*が、*t(1;22)(p13;q13)*を要する症例からは *RBM1*

*5(OTT)-MKL1(MAL)*が、それぞれ1例ずつ検出された。また、G分染法で *inv(16)(p13.1q22)*が検出されたのにもかかわらずキメラ遺伝子スクリーニングで *CBFB-MYH11*が陰性だった1例では、通常とは異なるタイプの *CBFB-MYH11*のキメラ転写産物が検出された。AML-P05登録症例では、複雑な染色体異常を有し *PML-RARA*が陰性だった1例から、*NUMA1-RARA*が検出された。

一方、*t(6;11)(q27;q23)*を有しながら *MLL-AF6*が陰性だった1例、APLが疑われ *add(5)(q35)*から *NPM1-RARA*が予想された1例など、6例では予想されたキメラ遺伝子を検出することはできなかった。

2. モノソミー7が疑われた症例の検討

G分染法による核型記載では、9例に「-7」が含まれていた。このうち核型の中に由来不明部分が存在せず、G分染法の結果のみでモノソミー7と診断できた症例は2例のみであった。他の7例ではマーカー染色体や環状染色体などの由来不明部分が含まれていた。3例でFISH解析が追加で行われ、いずれもほとんどの細胞で2つの7番染色体のシグナルを観察した。また、1例ではSKY法が行われ、正常7番染色体以外に部分欠失を伴う7番染色体が存在した。以上から、この4例はモノソミー7ではないと診断した。

3. 5q- が疑われた症例の検討

G分染法で、*del(5)(q?)*、*add(5)(q35)*、*add(5)(q11)*、*add(5)(q31)*、*add(5)(q22)*などを認めた9例が5q-の可能性があると考えられた。しかし、いずれも複雑な核型で、多くの由来不明部分を含んでいたことから、Gバンドの核型記載だけから5q-と診断できた症例は1例もなかった。染色体の専門家（群馬県立小児医療センター林泰秀院長）による染色体の写真的確認により、2例は5q-に該当することを確認したが、残りの7例については最終確認に至っていない。

D. 考察

AML-05のキメラ遺伝子スクリーニングでは8種類のキメラ遺伝子について検索が行われたが、そのうち *NUP98-HOXA9*については1例も検出例が存在し

なかった。*NUP98-HOXA9*はt(7;11)(p15;p15)によって形成されるキメラ遺伝子であるが、染色体レベルでもこれに該当する異常を有する症例は存在しなかった。一方、追加検査によって7例の*MLL-AF10*陽性例が同定された。*MLL-AF10*陽性例の予後の検討が必要であるが、このような高頻度のキメラ遺伝子スクリーニング検査で確実に検出できるようにしていくことが今後重要であると思われる。

しかし、*MLL-AF10*をキメラ遺伝子スクリーニングに含めるうえでの問題は、このキメラ遺伝子が染色体レベルで非常に複雑になるだけでなく、形成されるキメラ転写産物の構造も融合点が離れた複数のもが存在することである。そのため、同一のプライマー-プローブセットで全てのタイプのキメラ転写産物を検出することが困難であり、このような多様なキメラ転写産物を確実に検出できる系の構築が必要である。同様のことは既にキメラ遺伝子スクリーニングに含まれている他のキメラ遺伝子についても当てはまる。今回の解析では、キメラ遺伝子スクリーニングで検出できなかった*CBFB-MYH11*を追加検査で検出しており、既知のキメラ転写産物を確実に検出するためには、現在のスクリーニングシステムの再検討が必要であると思われる。

モノソミー7と5q-のような欠失型の染色体異常の診断が非常に難しいことが明らかになった。これらの診断を難しくしている最大の要因は、いずれもその責任遺伝子が未だ明らかでないことである。したがってどの領域が欠失していることが重要であるのかが現時点で不明である。両者とも単独の異常としてみられることはまれで、通常は複雑な染色体異常の中のひとつとして観察される。同時に存在する異常染色体には、マーカー染色体や環状染色体をはじめとする由来不明の染色体部分が含まれていることが多い。FISH法を用いた解析では、そのような由来不明部分の中にG分染法での解釈では失われていると判定された部分が高頻度で含まれていることが明らかになってきた。近年用いられているゲノムアレイ法を用いれば、このような欠失が存在するかどうかをさらに正確に、簡単に診断することが可能である。しかし、リスク因子とする根拠となった解析は通常G分染法（一部FISH法を併用）で解析されており、その診断をさらに解像度が高い方法で行うことが適切かどうかについては慎重に検討する必要がある。

E. 結論

リスク因子としての評価を正確かつ迅速に行うために、現在行っているキメラ遺伝子スクリーニングの内容や使用するプライマー-プローブセットの構成などについての検討が必要である。また、ルーチンの検査だけでは最終診断に至らない場合に、どのような検査を追加して、どのような基準で診断をするのが適当であるのかの、明確な手順を作成する必要がある。

F. 健康危険情報 該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kobayashi S, Taki T, Chinen Y, Tsutsumi Y, Ohshiro M, Kobayashi T, Matsumoto Y, Kuroda J, Horiike S, Nishida K, Taniwaki M. Identification of IGHC δ

-BACH2 fusion transcripts resulting from cryptic chromosomal rearrangements of 14q32 with 6q15 in aggressive B-cell lymphoma/leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 50: 207-216, 2011

2. Shiba N, Taki T, Park M, Nagasawa M, Kanazawa T, Takita J, Ohnishi H, Sotomatsu M, Arakawa H, Hayashi Y. CBL mutation in childhood therapy-related leukemia. *Leukemia* 25: 1356-1358, 2011

3. Sasaki N, Kuroda J, Nagoshi H, Yamamoto M, Kobayashi S, Tsutsumi Y, Kobayashi T, Shimura Y, Matsumoto Y, Taki T, Nishida K, Horiike S, Akao Y, Taniwaki M. Bcl-2 is a better therapeutic target than c-Myc, but attacking both could be a more effective treatment strategy for B-cell lymphoma with concurrent Bcl-2 and c-Myc overexpression. *Exp Hematol* 39: 817-828.e1, 2011

4. Yamamoto-Sugitani M, Kuroda J, Ashihara E, Nagoshi H, Kobayashi T, Matsumoto Y, Sasaki N, Shimura Y, Kiyota M, Nakayama R, Akaji K, Taki T, Uoshima N, Kobayashi Y, Horiike S, Maekawa T, Taniwaki M. Galectin-3 (Gal-3) induced by leukemia microenvironment promotes drug resistance and bone marrow lodgment in chronic myelogenous leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 17468-17473, 2011

5. Hori T, Suzuki N, Hatakeyama N, Yamamoto M, Inazawa N, Miyachi H, Taki T, Tsutsumi H. Infantile acute promyelocytic leukemia without a RARA rearrangement. *Pediatr Int* 53: 1070-1073, 2011

6. Gotou M, Hanamura I, Nagoshi H, Wakabayashi M, Sakamoto N, Tsunekawa N, Horio T, Goto M, Mizuno S, Takahashi M, Suganuma K, Yamamoto H, Hiramatsu A, Watarai M, Shikami M, Imamura A, Mihara H, Taki T, Miwa H, Taniwaki M, Nitta M. Establishment of a novel human myeloid leukemia cell line, AMU-AML1, carrying t(12;22)(p13;q11) without chimeric MN1-TEL and with high expression of MN1. *Genes Chromosomes Cancer* 51: 42-53, 2012

7. Shiba N, Park M, Taki T, Shimada A, Tabuchi K, Adachi S, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Arakawa H, Hayashi Y. DNMT3A mutations are rare in childhood acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukemia. *Br J Haematol* 156: 413-414, 2012

8. Shiba N, Park M, Taki T, Takita J, Hiwatari M, Kanazawa T, Sotomatsu M, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. CBL Mutations in infant acute lymphoblastic leukemia. *Br J Haematol* 156: 672-674, 2012

9. Sano H, Shimada A, Taki T, Murata C, Park M, Sotomatsu M, Tabuchi K, Tawa A, Kobayashi R, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Hayashi Y. RAS mutations are frequent in FAB type M4 and M5 of acute myeloid leukemia, and related to late relapse: a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Int J Hematol* in press

2. 学会発表

1. Kobayashi S, Taki T, Tsutsumi Y, Nagoshi H, Matsumoto Y, Kuroda J, Horiike S, Nishida K, Taniwaki M. Expression analysis of BACH2-related genes in B-cell malignancies. 第70回日本癌学会学術総会,

名古屋, 2011年10月3-5日

2. Nagoshi H, Taki T, Hanamura I, Nishida K, Kuroda J, Okuda K, Kobayashi S, Yamamoto M, Tsutsumi Y, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Otsuki T, Nitta M, Taniwaki M. Recurrent involvement of PVT1 gene in multiple myeloma with 8q24 abnormality. 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011年10月3-5日

3. Taki T, Nishida K, Ohtake S, Miyazaki Y, Takeuchi J, Miura I, Jinnai I, Ohyashiki K, Sakamaki H, Miyawaki S, Honda S, Ohnishi K, Ohno R, Naoe T, Taniwaki M. Clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia: the JALSG AML201 study. 第73回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011年10月14-16日

4. Kobayashi S, Taki T, Tsutsumi T, Nagoshi H, Matsumoto Y, Kuroda J, Horiike S, Nishida K, Taniwaki M. Analysis of BACH2-Related Genes in B-cell Malignancies. 第73回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011年10月14-16日

5. Nagoshi H, Taki T, Hanamura I, Nishida K, Kuroda J, Okuda K, Kobayashi S, Yamamoto M, Tsutsumi Y, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Otsuki T, Nitta M, Taniwaki M. Analysis of PVT1 rearrangements in multiple myeloma and identification of a chimeric gene PVT1-NBEA. 第73回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011年10月14-16日

6. Nagoshi H, Taki T, Hanamura I, Nitta M, Otsuki T, Nishida K, Okuda K, Sakamoto N, Kobayashi S, Yamamoto M, Tsutsumi Y, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Kuroda J, Taniwaki M. Frequent involvement of PVT1 in multiple myeloma carrying 8q24 rearrangement and Identification of novel PVT1-NBEA chimeric gene. 53rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego, December 9-13, 2011

7. Shiba N, Taki T, Park M, Murata C, Oki K, Ichikawa H, Shimada A, Kanazawa T, Sotomatsu M, Tabuchi K, Adachi S, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Arakawa H, Hayashi Y. NUP98-NSD1 fusion gene is strongly associated with a poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia: a study of the Japanese Childhood AML99 Cooperative Study Group. 53rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego, December 9-13, 2011

8. Taketani T, Taki T, Fukuda S, Hyuga M, Onishi C, Yamaguchi S, Hayashi Y. The Concurrent mutations in hematological malignancies with NUP98-fusion genes are associated with clinical prognosis. 53rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego, December 9-13, 2011

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AML(AML-DS)に対する標準的治療法の確立
研究分担者 多賀 崇 滋賀医科大学 小児科 講師

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。本年度はすでに登録終了したAML-DSに対する治療研究 JPLSG AML-D05に続く、JPLSG AML-D11を立案し、平成24年3月から試験を開始した。さらに今後の治療研究の参考にすべく「本邦におけるダウン症候群に発症した急性骨髄性白血病の寛解導入不能および再発例の疫学調査」も行った。

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委員会の立案のもと行われた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AML-D05」(研究代表者:多賀崇、平成22年12月31日登録終了)の追跡研究を継続した。一方、今

後の治療研究の参考にすべく、AML-DSの寛解導入不能例・再発例の検討が必要と考え、「本邦におけるダウン症候群に発症した急性骨髄性白血病の寛解導入不能および再発例の疫学調査」をJPLSGAML委員会主導で、多賀崇が研究代表者となり、行った。

C. 研究結果

AML-D05登録終了に伴い、AML-DSに対する次期治療研究「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病変探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、日本小児血液学会審査での承認を経て、平成24年3月1日から全国一斉に試験開始となった。

本邦におけるダウン症候群に発症した急性骨髄性白血病の寛解導入不能および再発例の疫学調

査では、29例の該当症例があり、再寛解導入率が悪く、造血幹細胞移植での救済が難しいなど、予後不良であることが判明した。

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、一定の成果が得られた。疫学調査による再発例の救済が困難なこととあわせ、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、新たに開始されたAML-D11でその実現可能性を検討し、次期治療につなげたい。

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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takashi Taga, Yasuto Shimomura, Yasuo Horikoshi, Atsushi Ogawa, Masaki Itoh, Masahiko Okada, Junichi Ueyama, Takeshi Higa, Arata Watanabe, Hirokazu Kanegane, Asayuki Iwai, Yutaka Saiwakawa, Kazuhiro Kogawa, Junko Yamanaka, and Masahito Tsurusawa. 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*. 2011;57(1):36-40.
- 2) Eva A Coenen, Susana Raimondi, Jochen Harbott, Martin Zimmermann, Todd Alonzo,

Anne Auvrignon, Berna Beverloo, Myron Chang, Ursula Creutzig, Micheal Dworzak, Erik Forestier, Brenda Gibson, Henrik Hasle, Christine Harrison, Nyla Heerema, Gertjan Kaspers, Anna Leszl, Nathalia Litvinko, Luca Lo Nigro, Akira Morimoto, Christine Perot, Dirk Reinhardt, Jeffrey Rubnitz, Franklin Smith, Jan Stary, Irina Stasevich, Sabine Strehl, Takashi Taga, Daisuke Tomizawa, David Webb, Zuzana Zemanova, Rob Pieters, Christian Zwaan, and Marry M van den Heuvel-Eibrink. Prognostic significance of additional cytogenetic aberrations in 733 de novo pediatric 11q23/*MLL*-rearranged AML patients: results of an international study. *Blood* 2011; 117(26):7102-11.

- 3) 多賀崇、ダウン症のAMLの治療は何か、2011年小児白血病リンパ腫ガイドライン、日本小児血液学会編

2. 学会発表

- 1) Akira Shimada, Daisuke Tomizawa, Akitoshi Kinoshita, Kazuko Hamamoto, Ichiro Tsukimoto, Atsushi Ogawa, Takashi Taga, Toshihiko Imamura, Akio Tawa, Keizo Horibe, Tomohiko Taki, Yasuhide Hayashi and Souichi Adachi, Heterogeneity in Infant with Acute Myeloid Leukemia: Retrospective Analysis of a Japansene Nationwide Survey. 53th Annual meeting of American Society of Hematology, Dec 10-13,2011 (San Diego,USA)
- 2) 多賀崇、齋藤明子、工藤寿子、富澤大輔、照井君典、盛武浩、木下明俊、岩本彰太郎、中山秀樹、高橋浩之、高橋浩之、多和昭雄、嶋田明、気賀沢寿人、康勝好、滝智彦、足立壮

一、ダウン症候群に発生した急性骨髄性白血病（AML・DS）の寛解導入不能・再発例の多施設共同後方視的研究、第53回日本小児血液・がん学会学術集会、平成23年11月25—27日（前橋）

H. 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)の標準的治療法の確立に関する研究
分担研究報告書

AML-05 参加施設の支持療法の実態調査に関する研究
分担研究者 工藤寿子 静岡県立こども病院血液腫瘍科 科長

研究要旨

AML-05「小児急性骨髄性白血病(AML)に対する多施設共同後期第2相臨床試験」参加施設の支持療法の実態調査を行い、寛解導入療法に伴う合併症と参加各施設における支持療法の施設方針との間の関連について検討した。骨髄抑制の遷延するAML治療において重篤な感染症合併のリスクを回避し、有害事象を減らすために各施設でのさまざまな工夫のもとに治療が遂行されている実態が明らかになった。有害事象情報と連結した解析ではヘパフィルターの使用、好中球減少時の経静脈的抗生剤投与、監視培養実施例が感染の頻度/重症度は低い傾向があった。

A. 研究目的

日本小児白血病リンパ腫研究グループ(JPLSG)のAML委員会、AML-05「小児急性骨髄性白血病(AML)に対する多施設共同後期第2相臨床試験」参加施設の支持療法の実態調査を行い、骨髄抑制の遷延するAML治療において、できるだけ重篤な感染症合併のリスクを回避し、有害事象を減らすために推奨される支持療法を検討することを目的とした。

次にAMLに対する寛解導入療法の安全性を向上させるために、化学療法(ECM)に伴う合併症と参加各施設における支持療法の施設方針との間の関連について検討することを第2の目的とした。

B. 研究方法

AML-05 臨床試験に参加している全国163施設に調査票を送付し、ヘパフィルター使用の有無など支持療法に関する項目について調査票に記載してもらい、JPLSGデータセンターに返送する。回収・集積された調査票をもとに施設支持療法指針を検討した。次に2006年11月1日から2011年8月31日の間にAML-05に登録され、CRF回収により初回寛解導入療法(ECM)における有害

事象情報が確定した449例を対象とし、各施設から回収・集積された支持療法に関する情報をCRFにおいて確定した有害事象情報と連結し、各々の支持療法の様式が与える影響を検討した。

C. 研究結果

AML-05 臨床試験参加している全国163施設に調査票を送付し、121施設から129の調査票を回収した(回収率74.2%)。

ヘパフィルターの使用率は90%で、そのうち38.5%は全例に使用、45%は好中球数に応じて使用しており、開始基準は好中球数 $500/\mu\text{l}$ 以下が70%であった。Sulfamethoxazole・trimethoprin(ST)合剤の予防投与は全施設において行われ、96%は全例に投与すると回答し、残りの4%は好中球数 $500/\mu\text{l}$ 以下という回答であった。投与方法は3投4休が50%、隔日投与が25%、連日投与が22%であった。抗真菌剤の予防内服は84%の施設で行われ、静注用抗真菌剤の開始基準は好中球減少性発熱(FN)合併時に抗生剤不応と判断した時に使用が47%、抗生剤と同時に使用が20%、好中球減少期間中無熱であっても使用が46%という回答であった。52%の施設で好中