

- 11) Tomizawa D, Tawa A, Watanabe T, Moriya Saito A, Kudo K, Taga T, Iwamoto S, Shimada A, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Takahashi H, Nakayama H, Kiyokawa N, Isoyama K, Mizutani S, Hara J, Horibe K, Nakahata T, Adachi S. Appropriate dose reduction in induction therapy is essential for the treatment of infants with acute myeloid leukemia: A report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Int J Hematol* 2013; 98(5): 578-588

2. 学会発表

- 1) Shiba N, Yoshida K, Nagata Y, Kon A, Okuno Y, Shiraishi Y, Kato M, Park M-J, Ohki K, Takita J, Kanazawa T, Kudo K, Ito E, Sanada M, Tomizawa D, Tawa A, Adachi S, Miyano S, Ogawa S, Hayashi Y. Whole-exome resequencing identifies somatic mutations of BCOR and BCORL1 transcriptional corepressor genes and major cohesin complex component genes in pediatric acute myeloid leukemia. 55th Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, USA, December 7-10, 2013.
- 2) Sano H, Ohki K, Park M-J, Hara Y, Shiba N, Tomizawa D, Taga T, Saito AM, Fujimoto J, Tawa A, Horibe K, Adachi S, Hayashi Y. CSF3R gene mutations in myeloid malignancy of childhood. 55th Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, USA, December 7-10, 2013.
- 3) Ohki K, Park M-J, Sano H, Hara Y, Shiba N, Tomizawa D, Taga T, Saito AM, Fujimoto J, Tawa A, Horibe K, Adachi S, Hayashi Y. Low frequency and poor prognosis of MLL-partial tandem duplications in pediatric acute myeloid leukemia using MLPA method: The Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG) AML-05 Trial. 55th Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, USA, December 7-10, 2013.
- 4) Hara Y, Shiba N, Ohki K, Park M-J, Tomizawa D, Taga T, Saito AM, Fujimoto J, Arakawa H, Tawa A, Horibe K, Adachi S, Hayashi Y. Comprehensive fusion gene analysis of pediatric non-Down syndrome acute megakaryoblastic leukemia. 55th Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, USA, December 7-10, 2013.
- 5) Shimada A, Yamashita Y, Tomizawa D, Tawa A, Watanabe T, Yokozawa T, Kudo K, Taga T, Iwamoto S, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Takahashi H, Nakayama H, Koh K, Goto H, Kosaka Y, Saito AM, Fujimoto J, Horibe K, Oki K, Hayashi Y, Adachi S. Poor prognosis with different induction rate was observed in children with acute myeloid leukemia and FLT3-ITD according to the ITD/WT allelic ratio: a result from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. 55th Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, USA, December 7-10, 2013.
- 6) 富澤大輔, 多和昭雄, 渡辺智之, 齋藤明子, 康勝好, 気賀沢寿人, 小阪嘉之, 堀部敬三, 中畑龍俊, 足立壮一. 小児急性骨髄性白血病の治療成績: JPLSG AML-05

- 臨床試験より. 第 116 回日本小児科学会
学術集会, 2013 年 4 月 20 日, 広島
- 7) 長谷川大一郎、工藤寿子、多和昭雄、照
井君典、岩本彰太郎、木下明俊、高橋浩
之、中山秀樹、齋藤明子、足立壮一; 小
児急性骨髄性白血病寛解導入療法にお
いて支持療法が有害事象に与える影響
第 116 回日本小児科学会学術集会 広島
(2013. 4. 19~21)
- 8) 柴 徳生、朴 明子、船戸道德、小林正
夫、木下明俊、足立壮一、荒川浩一、多
和昭雄、月本一郎、林 泰秀; 小児骨髄
性白血病における GATA2 遺伝子変異の解
析 第 116 回日本小児科学会学術集会 広
島 (2013. 4. 19~21)
- 9) 原 勇介、柴 徳生、嶋田 明、工藤寿
子、富澤大輔、多賀 崇、多和昭雄、荒
川浩一、足立壮一、林 泰秀; NUP98-NSD1
融合遺伝子陽性例は小児急性骨髄背白
血病において予後不良である 第 116 回
日本小児科学会学術集会 広島
(2013. 4. 19~21)
- 10) Matsuo H, Kajihara M, Tomizawa D,
Watanabe T, Saito AM, Fujimoto J,
Horibe K, Tokumasu M, Itoh H, Nakayama
H, Kinoshita A, Taga T, Tawa A, Taki
T, Adachi S. Investigation of the
clinical significance of CEBPA
mutation in child AML; The JPLSG
AML-05 study. 第 75 回日本血液学会総
会, 2013 年 10 月 11 日, 札幌
- 11) Tokumasu M, Nagao M, Shimada A, Murata
C, Ohki K, Hayashi Y, Saito A, Fujimoto
J, Horibe K, Itoh H, Nakayama H,
Kinoshita A, Tomizawa D, Taga T,
Yamaguchi H, Tawa A, Heike T, Adachi
S. Prognostic impact of *KIT*
mutations in t(8;21) childhood AML:
the JPLSG AML-05 trial. 第 75 回日本
血液学会総会, 2013 年 10 月 11 日, 札幌
- 12) Hara Y, Shiba N, Ichikawa H, Taki T,
Shimada A, Kudo K, Tomizawa D, Taga T,
Adachi S, Arakawa H, Tawa T, Hayashi
Y. *NUP98-NSD1* gene fusion is a strong
poor prognostic factor in pediatric
AML. 第 75 回日本血液学会総会, 2013
年 10 月 11 日, 札幌
- 13) Takahashi H, Matsushita H, Kinoshita
A, Taki T, Deguchi T, Kiyokawa N,
Hashii Y, Hayashi Y, Tomizawa D, Taga
T, Tawa A, Adachi S, Yabe M, Miyachi
H. A diversity of cases in AML with
promyelocytic differentiation; A
report from JPLSG. 第 75 回日本血液
学会総会, 2013 年 10 月 11 日, 札幌
- 14) Taga T, Saito AM, Kudo K, Tomizawa D,
Terui K, Moritake H, Kinoshita A,
Iwamoto S, Nakayama H, Takahashi H,
Tawa A, Shimada A, Taki T, Kigasawa H,
Koh K, Adachi S. Clinical
characteristics and outcome of
refractory/relapsed myeloid leukemia
in children with Down syndrome. 第
55 回日本小児血液・がん学会学術集会,
2013 年 11 月 29 日 (プレナリー・セッシ
ョン), 福岡
- 15) Ohki K, Sano H, Park M-J, Hara Y, Shiba
N, Sotomatsu M, Tomizawa D, Taga T,
Saito A, Fujimoto J, Tawa A, Horibe K,
Adachi S, Hayashi Y. Low frequency
and poor prognosis of MLL-partial
tandem duplications in pediatric
acute myeloid leukemia using MLPA
method: the Japanese Pediatric
Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG)
AML-05 trial. 第 55 回日本小児血液・

- がん学会学術集会, 2013年11月29日(ワークショップ), 福岡
- 16) Yabe M, Matsushita H, Kinoshita A, Tokumasu M, Shimada A, Taki T, Hayashi Y, Tomizawa D, Taga T, Tawa A, Adachi S, Miyachi H. Detection of the KIT mutation and treatment response of acute myeloid leukemia associated with mastocytosis: A retrospective study of JPLSG-AML05. 第55回日本小児血液・がん学会学術集会, 2013年11月29日(ワークショップ), 福岡
- 17) Kurosawa H, Sato Y, Okuya M, Fukushima K, Arisaka O, Park M-J, Matsui H, Inaba T, Inukai T, Fujimoto J, Tawa A, Tomizawa D, Taga T, Adachi S, Horibe K, Hayashi Y. Inhibitor of apoptosis proteins family genes expression in childhood AML. 第55回日本小児血液・がん学会学術集会, 2013年11月29日(ワークショップ), 福岡
- 18) Hara Y, Shiba N, Ohki K, Park M-J, Sotomatsu M, Tomizawa D, Taga T, Tawa A, Arakawa H, Adachi S, Hayashi Y. Comprehensive fusion gene analysis of non-Down syndrome acute megakaryoblastic leukemia. 第55回日本小児血液・がん学会学術集会, 2013年11月29日(ワークショップ), 福岡
- 19) 佐野弘純、嶋田 明、田渕 健、滝 智彦、村田知里、朴 明子、大木健太郎、外松 学、足立壮一、多和昭雄、小林良二、堀部敬三、土田昌宏、花田良二、月本一郎、林 泰秀; 急性骨髄性白血病における WT1 遺伝子変異の解析 第55回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡市 (2013. 11. 29-12. 1)
- 20) 佐野仁志、大木健太郎、朴 明子、柴 徳生、原 勇介、外松 学、足立壮一、堀部敬三、多和昭雄、花田良二、月本一郎、林 泰秀; 小児骨髄性造血器腫瘍における *CSF3R* 遺伝子異常の解析 第55回日本小児血液・がん学会学術集会 (福岡市) (2013. 11. 29-12. 1)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案
なし
 3. その他
なし

分担研究報告書

小児がん拠点病院を活用した臨床研究基盤のあり方及び新規治療開発に関する研究
(H25-がん臨床-指定-002)

研究分担者 堀部敬三 国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター
センター長

AML 新規治療開発に関する研究

—小児急性骨髄性白血病の遺伝子診断に関する研究—

研究要旨 小児急性骨髄性白血病(AML)にみられる染色体異常で生じる8種類のキメラ遺伝子について、日本小児白血病リンパ腫研究グループ(JPLSG)疫学研究に登録されたAML患者284例において診断時スクリーニング検査を実施した。うち4例は、*PML-RAR α* のみ検査した。284例中114(40.1%)でいずれかの遺伝子が同定された。内訳は、*AML1-ETO* 67例、*CBFB-MYH11* 17例、*MLL-AF9* 16例、*MLL-ELL* 3例、*MLL-AF6* 2例、*TLS/FUS-ERG* 1例、*PML-RAR α* 8例、*NUP98-HOXA9* 0例であった。また、FLT3-ITD解析をAML-05 536例、AML-P05 32例、AML-D05 77例、JPLSG疫学研究のDown症を伴わないAML登録の286例とDown症に伴うAML 10例、そして、AML-R11登録例8例の合計949例に行った。合計85例(9.0%)が陽性であった。AML-05においてFLT3-ITD/WTのアレル比と全生存率や無イベント生存率に有意差は認めなかったが、アレル比の低い群(ratio; <0.4)では高い群に比べ有意に寛解導入率が高かった。これらの結果を基に次期研究の遺伝子診断パネルを検討した。

研究協力者

嶋田 明 岡山大学小児科 講師
山下友加 名古屋医療センター 流動研究員
山田美穂 名古屋医療センター 研究助手

AML-05、AML-P05、および臨床試験登録終了後にJPLSG疫学研究に登録予定されたAML患者である。また、FLT3-ITDは、AML-D05以降のDown症に伴うAMLやAML-R11登録例も対象とした。

A. 研究目的

小児急性骨髄性白血病(AML)におけるキメラ遺伝子スクリーニングおよび*FLT3* Internal Tandem Duplication (ITD)の有無とFLT3-ITD/WTアレル比診断の臨床的有用性を検討する。

方法は、診断時の骨髄液あるいは末梢血の有核細胞からRNAを抽出し、定量的RT-PCR法によってAMLに代表的な8種類のキメラ遺伝子、*AML1-ETO*、*CBFB-MYH11*、*MLL-AF6*、*MLL-AF9*、*MLL-ELL*、*TLS/FUS-ERG*、*PML-RAR α* 、*NUP98-HOXA9*の測定を行った。

B. 研究方法

対象は、日本小児白血病リンパ腫研究グループ(JPLSG)で実施された臨床試験

FLT3-ITD検査は、清井らの方法(Kiyoi H, et al. *Methods Mol Med*. 2006;125:189-97.)に従って実施した。初発時骨髄検体からgenomic

DNAを抽出し、PCRを行い、陽性例をダイレクトシーケンスで確認した。*FLT3-ITD/WT allelic ratio*の解析は、10ngのDNAを鋳型として、蛍光色素が修飾されたprimerを用いてPCRを行い、*FLT3-ITD*部位を含む領域を増幅する。このPCR産物をフラグメント解析することにより、*FLT3-WT*と*ITD*のフラグメントのピークの比より、アレル比を算出した。

(倫理面への配慮)

本研究は、名古屋医療センターの臨床研究審査委員会およびJPLSGの研究審査委員会の承認を得て実施した。また、本研究は、臨床試験 AML-05、AML-D05、AML-P05、AML-R11 および JPLSG 疫学研究の一部であり、これらの臨床試験、疫学研究は日本小児血液学会臨床研究審査委員会、および参加施設の倫理審査委員会の承認を得て行った。すべての検体は、文書によるインフォームドコンセントを得た後に収集された。また、検体提出、収集においてすべて匿名化を行い、検体提供者の個人情報を適切に保護して実施した。

C. 研究結果

2011年1月から2014年1月までの間にJPLSG疫学研究に登録されたAML患者284例において診断時に8種類のキメラ遺伝子スクリーニング検査を実施した。うち4例は、*PML-RAR α* のみ検査した。284例中114(40.1%)でいずれかの遺伝子が同定された。内訳は、*AML1-ETO* 67例(23.6%)、*CBFB-MYH11* 17例(6.0%)、*MLL-AF9* 16例(5.6%)、*MLL-ELL* 3例(1.1%)、*MLL-AF6* 2例(0.7%)、*TLS/FUS-ERG* 1例(0.4%)、*PML-RAR α* 8例(2.8%)であった。一方、APL疑いと施設診断された4例のうち*PML-RAR α* 陽性例は2例のみであった。

*FLT3-ITD*解析をAML-05 536例、

AML-P05 32例、AML-D05 77例、JPLSG疫学研究のDown症を伴わないAML登録の286例とDown症に伴うAML 10例、そして、AML-R11登録例8例の合計949例に行った。合計85例(9.0%)が陽性であった。内訳は、AML-05で実施した、536例中56例が陽性、478例が陰性、2例が判定不能であった。AML-P05では、32例中4例が陽性、28例が陰性であった。JPLSG疫学研究では、Down症を伴わないAML登録の286例中、陽性例は24例で、261例が陰性、1例が判定不能であった。Down症に伴うAMLでは、AML-D05登録例と疫学研究登録例を合わせた87例中、陽性例は1例のみで、86例は陰性であった。AML-R11登録例8例は、すべて陰性であった。

AML-05の*FLT3-ITD*陽性例44中38例について、*FLT3-WT*と*ITD*のアレル比の測定を行ったところ、アレル比(*ITD/WT*)の中央値(範囲)は、0.63(0.11-4.47)で、2種類以上の*ITD*のフラグメントが3例で検出された。臨床的意義については、予後不良とされている0.4以上28例とそれ未満の10例において、全生存率や無イベント生存率に有意差は認められなかったが、寛解導入率はアレル比0.4未満の群では91.7%に対し、0.4以上の群では53.1%と有意に低かった($p=0.018$)。

D. 考察

2014年1月までの1年間のキメラスクリーニング、*FLT3-ITD*スクリーニング実施例は99例であり前年とほぼ同等であった。キメラ遺伝子陽性例の比率は全体の結果とほぼ同じであった。これまでにスクリーニングを行った949例において、*NUP98-HOXA9*は一例も検出されなかったことから、次期研究からはスクリーニングに加えないこととした。また、次期治療研究に向けたキメラ遺伝子スクリーニングのパネルの検討において、新規

予後因子として、*NUP98-NSD1*を導入することとし、real-time PCRの検出系の立ち上げを行った。*NUP98-NSD1*ではNUP98のexon 12で再構成を起こす頻度が高いが、他に本邦のグループでexon 11, exon 13で再構成を起こす例も報告されており、これらに対応したmultiplex real-time PCRの系を作成し、陽性患者より作成したプラスミドを用いて、EACの基準に準じた測定系の立ち上げを行った。

FLT3-ITD陽性率も例年と同等であった。昨年FLT3-ITD/WTのアレル比を測定した44例について、アレル比の臨床的意義を検討したが、カットオフ値を0.4とした際には、寛解導入率に差が認められたが、予後に有意差は認められなかった。今後更に症例数を増やして、カットオフ値等についても検討する必要があると考える。

E. 結論

小児AMLにおいて8つのキメラ遺伝子とFLT3-ITDのスクリーニング検査を実施し、FLT3-ITDについてWTとのアレル比を検討した。今後、AML治療層別において、より有用性の高い遺伝子スクリーニング検査項目の選定と方法の改良が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

本研究による直接的な健康被害はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shiba N, Funato M, Ohki K, Park MJ, Mizushima Y, Adachi S, Kobayashi M, Kinoshita A, Sotomatsu M, Arakawa H, Tawa A, Horibe K, Tsukimoto I, Hayashi Y. Mutations of the GATA2 and CEBPA genes in paediatric acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2013 Sep 14.

doi: 10.1111/bjh.12559. [Epub ahead of print]

2. Tomizawa D, Tawa A, Watanabe T, Saito AM, Kudo K, Taga T, Iwamoto S, Shimada A, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Takahashi H, Nakayama H, Kiyokawa N, Isoyama K, Mizutani S, Hara J, Horibe K, Nakahata T, Adachi S. Appropriate dose reduction in induction therapy is essential for the treatment of infants with acute myeloid leukemia: a report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Int J Hematol*. 2013 Nov;98(5):578-88.
3. Sano H, Shimada A, Tabuchi K, Taki T, Murata C, Park MJ, Ohki K, Sotomatsu M, Adachi S, Tawa A, Kobayashi R, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Hayashi Y. WT1 mutation in pediatric patients with acute myeloid leukemia: a report from the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Int J Hematol*. 2013 Oct;98(4):437-45. _
4. Horibe K, Saito AM, Takimoto T, Tsuchida M, Manabe A, Shima M, Ohara A, Mizutani S. Incidence and survival rates of hematological malignancies in Japanese children and adolescents (2006-2010): based on registry data from the Japanese Society of Pediatric Hematology. *Int J Hematol*. 2013 Jul;98(1):74-88.
5. Tomizawa D, Tawa A, Watanabe T, Saito AM, Kudo K, Taga T, Iwamoto S, Shimada A, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Takahashi H, Nakayama H, Koh K, Kigasawa H, Kosaka Y, Miyachi H, Horibe K, Nakahata T, Adachi S.

- Excess treatment reduction including anthracyclines results in higher incidence of relapse in core binding factor acute myeloid leukemia in children. *Leukemia*. 2013 Dec;27(12):2413-6.
6. Shiba N, Ichikawa H, Taki T, Park MJ, Jo A, Mitani S, Kobayashi T, Shimada A, Sotomatsu M, Arakawa H, Adachi S, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Hayashi Y. NUP98-NSD1 gene fusion and its related gene expression signature are strongly associated with a poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013 Jul;52(7):683-93.
2. 学会発表
1. 佐野仁志、大木健太郎、朴 明子、柴 徳生、原 勇介、外松 学、足立壮一、堀部敬三、多和昭雄、花田良二、月本一郎、林 泰秀 小児骨髄性造血器腫瘍における CSF3R 遺伝子異常の解析 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会 2013.12.1 福岡
2. 佐藤弘純、嶋田 明、田渕 健、滝 智彦、村田知里、朴 明子、大木健太郎、外松 学、足立壮一、多和昭雄、小林良二、堀部敬三、土田昌宏、花田良二、月本一郎、林 泰秀 急性骨髄性白血病における WT1 遺伝子変異の解析 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会 2013.11.29 福岡
3. Hara Y, Shiba N, Funato M, Oki K, Park Mj, Mizushima Y, Adachi S, Kobayashi M, Kinoshita A, Sotomatsu M, Arakawa H, Tawa A, Horibe K, Tsukimoto I, Hayashi Y GATA2 mutations are found in pediatric AML but not in other leukemias including JMML 第 75 回日本血液学会学術集会 2013.10.12 札幌
4. Matsuo H, Kajihara M, Tomizawa D, Watanabe T, Saito AM, Fujimoto J, Horibe K, Tokumasu M, Itoh H, Nakayama H, Kinoshita A, Taga T, Tawa A, Taki T, Adachi S Investigation of the clinical significance of CEBPA mutation in child AML: The JPLSG AML-05 study 第 75 回日本血液学会学術集会 2013.10.11 札幌
5. Tokumasu M, Nagao M, Shimada A, Murata C, Ohki K, Hayashi Y, Saito A, Fujimoto J, Horibe K, Itoh H, Nakayama H, Kinoshita A, Tomizawa D, Taga T, Yamaguchi H, Tawa A, Heike T, Adachi S Prognostic impact of KIT mutations in t(8;21) childhood AML: The JPLSG AML-05 trial 第 75 回日本血液学会学術集会 2013.10.11 札幌
6. Akira Shimada, Yuka Yamashita, Daisuke Tomizawa, Akio Tawa, Tomoyuki Watanabe, Toshiya Yokozawa, Kazuko Kudo, Takashi Taga, Shotaro Iwamoto, Kiminori Terui, Hiroshi Moritake, Hiroshi Moritake, Akitoshi Kinoshita, Hiroyuki Takahashi, Hideki Nakayama, Katsuyoshi Koh, Hiroaki Goto, Yoshiyuki Kosaka, Akiko Moriya Saito, Junichiro Fujimoto, Keizo Horibe, Kentaro Oki, Yasuhide Hayashi, and Souichi Adachi. Poor Prognosis With Different Induction Rate Was Observed In Children With Acute Myeloid Leukemia and *FLT3*-ITD According To The ITD/WT Allelic Ratio: A Result From The Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. 5th ASH Annual Meeting, New Orleans 2013 Annual Meeting Abstracts Poster Sessions *Blood 2013 122:3891*.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
2. 実用新案
なし
3. その他
なし

分担研究報告書

小児がん拠点病院を活用した臨床研究基盤のあり方及び新規治療開発に関する研究
(H25-がん臨床-指定-002)

研究分担者 宮地 勇人 東海大学医学部基盤診療学系臨床検査学 教授

AML新規治療開発に関する研究

—形態中央診断システムの構築と運用に関する研究—

研究要旨

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ための多施設共同臨床試験の実施において形態中央診断システムの構築は重要である。本研究の目的は、小児 AML の多施設共同臨床試験において構築した形態中央診断システムを継続的に運用し、WHO 分類における形態診断の意義を検討することとした。多施設共同臨床試験のプロトコールは、24 年度に AML-R11「小児急性骨髄性白血病(AML)初回骨髄再発例および寛解導入不能例に対する Fludarabine を寛解導入療法の有効性と安全性を検討する多施設共同後期第 II 相臨床試験」である。形態中央診断はプロトコールに従い、骨髄再発例および寛解導入不能例の治療前 BMA-R1、寛解導入療法 1 後の BMA-R2 の骨髄および末梢血塗抹標本にて実施した。25 年度の形態中央診断件数は AML-R11 が 2 件（内、BMA-R2 の依頼が 2 件）であった。また、AML 観察研究において、診断困難（初発）例について 25 年度 9 件の形態中央診断を行った。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。以上、小児 AML の形態中央診断のシステムは、小児 AML 多施設共同臨床試験において我が国で初めて導入後、良好な運営を継続的に行うことが出来た。小児 AML の形態中央診断を通して、WHO 分類における形態診断の意義を明確化するとともに、細胞表面マーカー検査と染色体検査所見との相互関係から、形態検査の有用性ととも限界や課題が明らかとなった。

A. 研究目的

本研究では、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構築した形態中央診断システムを継続的に運用すること、AML 観察研究における診断困難例の中央診断による診断支援を継続すること、および WHO 分類における形態診断の意義を検討することを目的とした。

B. 研究方法

AML の形態中央診断は、東海大学医学部基盤診療学系臨床検査学（責任者：宮地勇人）に於いて行った。25 年度における多施設共同臨床試験は、「小児急性骨髄性白血病(AML)初回骨髄再発例および寛解導入不能例に対する Fludarabine を寛解導入療法の有効性と安全性を検討する多施設共同後期第 II 相臨床試験」(AML-R11) である。

対象患者は、再発または寛解導入不能の小児

AML で、形態中央診断の対象は、再発・寛解導入不能診断(BMA-R1)と本試験治療 (FLAG+IDA)後の寛解判定 (BMA-R2) 時の骨髓および末梢血塗抹標本にて実施した。完全寛解、骨髓再発の定義は、プロトコールにしたがった。

AML 観察研究において、個々の病院では診断が難しい症例に絞った中央診断による診断支援は、平成 23 年 1 月から開始し、平成 25 年度も継続して実施した。診断困難例の形態中央診断は、各施設からの事務局への要請と事務局での対象症例としての確認に基づき、実施した。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 (第 4 版、WHO-4) を併記した。

(倫理面への配慮)

本研究は、日本小児血液学会及び日本小児白血病リンパ腫研究グループの倫理委員会の提唱するガイドラインに沿って、施設の倫理委員会で承認された臨床試験として行った。検体使用や取扱いは、「日本小児白血病リンパ腫研究グループ保存検体の収集・保存と分譲に関する規約」にしたがった。ヘルシンキ宣言を遵守し、検体は個人情報保護のため連結不可能匿名化を図った。

C. 研究結果

形態中央診断の実施は、各施設から実施施設に送付された既染の末梢血および骨髓塗抹標本 (メイ・ギムザ/ライト・ギムザ、ペロキシダーゼ、エステラーゼ) について、臨床検査技師による細胞カウントを行った。続いて、検査専門医/血液専門医による形態診断と報告書作成を行った。

AML-R11 の臨床試験における 25 年度の形態中央診断件数は AML-R11 が 2 件 (内、BMA-R2 の依頼が 2 件) であった。

診断困難 (初発) 例について 25 年度 9 件の形態中央診断を行った。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を総合して検討、議論の上で確定した。25 年度診断困難例 9 件の内訳は、AML with inv(16)(p13q22); (CBF β /MYH11) 1 例、AML with MLL-AF9 / Mixed phenotype of Acute leukemia 1 例、AML with myelodysplasia-related changes (MRC) 3 例、Acute megakaryoblastic leukemia 1 例、Mixed phenotype of Acute leukemia 1 例、Transient abnormal myelopoiesis 1 例、Chronic myelomonocytic leukemia-2 1 例であった。POX 陰性白血病と形態診断した 4 例 (弱陽性を含む) は、形態にて AML with MRC 1 例、細胞表面マーカー所見にて、Acute megakaryoblastic leukemia 1 例、Mixed phenotype of Acute leukemia (MPAL) 1 例、Transient abnormal myelopoiesis 1 例と最終診断された。

D. 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は初めて導入した後、継続的かつ円滑に運用することに成功した。多施設共同臨床試験「小児急性骨髄性白血病 (AML) 初回骨髄再発例および寛解導入不能例に対する Fludarabine を寛解導入療法の有効性と安全性を検討する多施設共同後期第 II 相臨床試験」(AML-R11)において形態中央診断システムを継続して運用した。さらに、観察研究において、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、議論の上で確定した。

新 WHO 分類における形態診断の意義として、

24年度までの研究成果は、以下のごとく整理され、本研究でも確認が出来た。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。

一方、形態診断においては、POX 陰性急性白血病、芽球比率 20%未満 (low percentage) 白血病、細胞異形成に乏しい MRC における限界があり、染色体・遺伝子異常や細胞表面マーカーの所見が最終診断の決め手となる。

E. 考察

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。AML の新 WHO 分類は、分子病態の解明と臨床的意義の明確化を踏まえ、2008年に第4版(WHO-4)が公表された。WHO 分類は、形態、免疫形質とともに染色体・遺伝子異常に基づき体系化されている。すなわち、芽球 20%以上の症例において、病型診断は定型的な染色体異常、細胞異形成および形態所見により序列化している。形態診断に基づく FAB 分類にない病型として、以下があり、これらは白血病細胞の形態診断に優先する。①染色体・遺伝子異常、②細胞異形成、③先行 MDS (WHO-4 で追加)、先行化学療法 (WHO-4 では治療薬で細分類しない)、④ダウン症候群関連 (WHO-4 で追加)。

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。診断困難例において、AML with t(8;21)(q22;q22); (*RUNX1/RUNX1T1*) や AML with inv(16)(p13q22); (*CBFβ/MYH11*) が相当する。一方、芽球が POX 陰性の白血病の場合、および芽球比率 20%未満 (low percentage) 白血病の場合は、形態診断は難渋する場合が多い。POX 陰性白血病は、形態診断における限界で、診断困難例 9 例中 3 例 (弱陽性を含めると 4 例) と多い。POX 陰性白血病と形態診断した 4 例は、形態にて AML with MRC 1 例、細胞表面マーカー所見にて、Acute megakaryoblastic leukemia 1 例、Mixed phenotype of acute leukemia 1 例、臨床所見 (0 歳児、ダウン症候群) を踏まえて Transient abnormal myelopoiesis 1 例と最終診断された。芽球比率 20%未満 (low percentage) 白血病では、Chronic myelomonocytic leukemia-2 1 例を認めた。骨髄低形成と骨髄標本不良であったが、芽球比率によっては、AML-M4/AML-MRC が考えられた。

AML with multilineage dysplasia (WHO-3) の病型診断の基準は、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 MRC 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。診断困難例において、形態所見から AML-MRC と診断された 1 例を認めた一方、2 例は、2 系統の細胞異形成 50%未満のため、MRC 関連染色体異常 (複雑型) より、AML-MRC と最終診断された。細胞異形成 50%未満、巨核球少なく観察できない場合の形態診断での限界がある。末梢血の血小板形態の異常の診断意義について検討が必要である。

以上、小児 AML の形態中央診断のシステムは、小児 AML 多施設共同臨床試験において我が国で初めて導入後、継続的に良好な運営を行うこと

が出来た。小児 AML の形態中央診断を通して、WHO 分類における形態診断の意義を明確化するとともに、細胞表面マーカー検査と染色体検査所見との相互関係から、その診断における有用性ととともに、形態検査の限界や課題が確認された。小児 AML の形態中央診断は、その実施継続とともに、明らかとなった課題への取組みが必要となる。

G. 研究発表

1. Tomizawa D, Tawa A, Watanabe T, Saito AM, Kudo K, Taga T, Iwamoto S, Shimada A, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Takahashi H, Nakayama H, Koh K, Kigasawa H, Kosaka Y, Miyachi H, Horibe K, Nakahata T, Adachi S. Excess treatment reduction including anthracyclines results in, higher incidence of relapse in core binding factor acute myeloid, leukemia in children. *Leukemia* 27, 2013; 2413-16.
2. Tanaka Y, Matsushita H, Tanaka Y, Maruki Y, Hayashi F, Kondo T, Asai S, Miyachi H. Elimination of interference by lipids in the low WBC mode in the automated hematology analyzer XN-2000. *Intern J Lab Hematol* (2014, in press)
3. Tanaka Y, Matsushita H, Tanaka Y, Maruki Y, Kondo T, Asai S, Miyachi H. Evaluation of the body fluid mode of automated hematology analyzer XN-Series for extremely low peripheral White Blood Cell Counts. *Intern J Lab Hematol* (2014, in press).
4. Tanaka Y, Tanaka Y, Gondo K, Maruki Y, Kondo T, Asai S, Matsushita H, Miyachi H. Performance evaluation of platelet counting by novel fluorescent dye staining

in the automated hematology analyzers XN-series. *J Clin Lab Analysis* (2014, in press)

5. Asai S, Okami K, Nakamura N, Shiraishi S, Sugimoto R, Damdinsuren A, Sato S, Matsushita H, Suzuki Y, Miyachi H. Localized or diffuse lesions of the submandibular glands in IgG4-related disease in association with differential organ involvement. *J Ultrasound Med* 2013;32 : 731-736.

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
予定なし
3. その他
予定なし

分担研究報告書

小児がん拠点病院を活用した臨床研究基盤のあり方及び新規治療開発に関する研究
(H25-がん臨床-指定-002)

研究分担者 林 泰秀 群馬県立小児医療センター院長

AML新規治療開発に関する研究

-遺伝子診断-

研究要旨：小児急性骨髄性白血病(AML)の発生には癌関連遺伝子、細胞増殖関連遺伝子の異常が AML の発症や進展と関連することが報告されている。遺伝子異常と臨床情報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、新薬開発の基盤の確立と治療成績の向上および副作用の軽減につながる。我々はこれまで AML99 と AML-05 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*、*NPM1*、*DNMT3A*、*CBL*、*GATA2* 遺伝子異常および *NUP98-NSD1* 融合遺伝子と臨床像の相関について報告してきた。非 Down 症候群の急性巨核芽球性白血病(non-DS-AMKL)は既知の融合遺伝子として t(1;22)の *OTT-MAL* や 11q23 転座の *MLL fusion* があるが、近年 RNA sequence 等により *CBFA2T3-GLIS2*、*NUP98-JARID1A* 等の新規融合遺伝子が報告された。今年度は AML99 及び AML05 研究に登録された。non-DS-AMKL の 43 例で *CBFA2T3-GLIS2*、*NUP98-JARID1A*、*OTT-MAL*、*MLL-AF9*、*MLL-AF10* 融合遺伝子の検索を行い、*CBFA2T3-GLIS2* を 12 例(27.9%)、*NUP98-JARID1A* を 4 例(9.3%)、*OTT-MAL* を 10 例(23.6%)、*MLL-AF9* を 2 例(4.7%)、*MLL-AF10* を 1 例(2.3%)で認め、臨床像の検討では、*CBFA23-GLIS2*、*NUP98-JARID1A* は予後不良、*OTT-MAL* は予後良好であった。各融合遺伝子を有する症例で *FLT3-ITD*、*KIT*、*RAS*、*WT1* の各変異は比較的稀であった。

さらに AML19 例で次世代シーケンサーによる全エクソン解析を行い、*RAD21* や *STAG2* などのコヒーシオン関連遺伝子や *BCOR/BCORL1* などの新規の原因遺伝子変異を同定した。これまでの既知の知られた遺伝子についても Targetting (deep sequencing)を行っているところである。

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 プロトコルにより治療された 157 症例の遺伝子異常(*FLT3-ITD*、*KIT*、*MLL-PTD*、*NPM1*、*CEBPA*、*DNMT3A*、*CBL*、*GATA2* 遺伝子)および *NUP98-NSD1* 融合遺伝子と臨床像の相関を明らかにしてきた。

近年、成人の AML では正常核型を中心に次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子解析により、*DNMT3A*、*TET2* や *IDH1/2* といった遺伝子変異と臨床の関係が次々に明らかにされているが、小児ではこれらの頻度はまれであり、分子生物学的な背景は不明な点が多い。我々はさらに JPLSG の AML-05 登録例についても遺伝子異常

(*FLT3*、*KIT*、*MLL*、*RAS*、*NPM1*、*CEBPA*、*WT1*、*GATA2* 遺伝子)と予後との相関を検討している。

非 Down 症候群の急性巨核芽球性白血病(non-DS-AMKL)は既知の融合遺伝子として t(1;22)の *OTT-MAL* や 11q23 転座の *MLL fusion* があるが、近年 RNA sequence 等により *CBFA2T3-GLIS2*、*NUP98-JARID1A* 等の新規融合遺伝子が報告された(図1)。今年度は AML99 及び AML05 研究に登録された non-DS-AMKL の 43 例で *CBFA2T3-GLIS2*、*NUP98-JARID1A*、*OTT-MAL*、*MLL-AF9*、*MLL-AF10* の検索を行った。また AML 19 例で次世代シーケンサーによる全エクソン解析を行い、新規原因遺伝子の探索を行った。

B. 研究方法

対象は AML99 及び AML-05 研究に登録した

non-DS-AMKL の 43 例で RNA を用いて cDNA を作成し、*CBFA2T3-GLIS2*、*NUP98-JARID1A*、*OTT-MAL*、*MLL-AF9*、*MLL-AF10* の融合遺伝子それぞれに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た後、直接塩基決定法で解析した。また、次世代シーケンサーを用いて、AML19 例で全エクソン解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究事業で行われる臨床試験は、JPLSGの臨床研究審査委員会の承認と、各施設の倫理委員会の承認を得て実施している。本研究で行う遺伝子解析は、政府の定める各種倫理指針に準拠し、参加研究

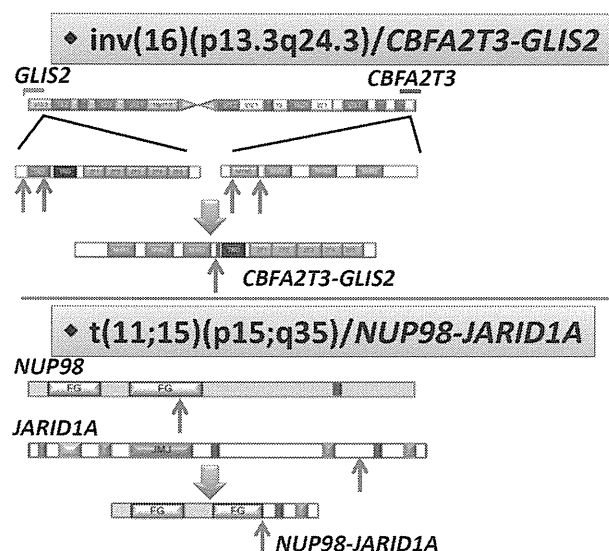


図1 新規融合蛋白模式図

施設の倫理委員会の審査・承認を得て行われた。

またJPLSGのもとで行なわれる観察研究は、文書による説明同意を行い、同意の得られた症例のみが観察研究の対象とした。また、連結可能匿名化により、症例の登録・追跡調査を行うことにより、対象症例の個人情報外部に流出する危険を限りなくゼロにする配慮をした。また、研究の安全性を担保するため、本研究は介入試験における効果安全性評価委員会の役割をもつものとしてJPLSGの倫理委員会の監視の下に行われた。

C. 研究結果

融合遺伝子の解析では、non-DS-AMKL43 例中 *CBFA2T3-GLIS2* を 12 例(27.9%)、*NUP98-JARID1A* を 4 例(9.3%)、*OTT-MAL* を 10 例(23.6%)、*MLL-AF9* を 2 例(4.7%)、*MLL-AF10* を 1 例(2.3%) 認め(図2)、*CBFA23-GLIS2*、*NUP98-JARID1A*

は予後不良、*OTT-MAL* は予後良好であった。これらの症例における *FLT3-ITD*、*KIT*、*RAS*、*WT1* の各変異は比較的稀であった。

次世代シーケンサーによる解析を AML19 例で行い、*RAD21* や *STAG2* などのコヒーシオン関連遺伝子や *BCOR/BCORL1* などの新規の原因遺伝子変異を同定した。さらに Targetting によりこれまで AML で報告されている遺伝子の詳細な解析を行っている。

D. 考察

Non-DS-AMKL は染色体転座が 43 例中 29 例(67.4%)と多く、他の遺伝子変異の合併が少ないため、oncogenic な染色体転座単独またはごく少数の遺伝子異常の付加で発症する可能性が高いと思われ、固有のグループであることが示唆された。

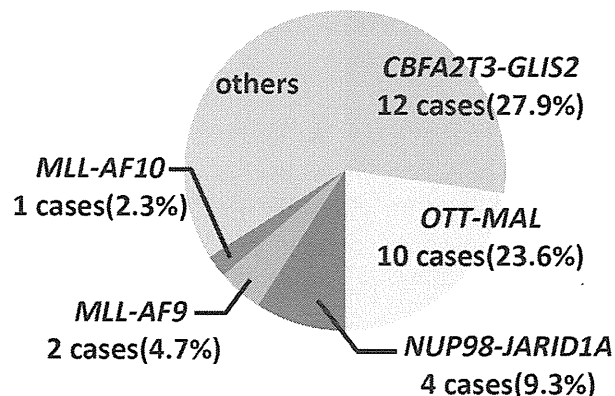


図2 non-DS-AMKL における融合遺伝子

CBFA23-GLIS2、*NUP98-JARID1A* は予後不良、*OTT-MAL* は予後良好であった。*FLT3-ITD*、*KIT*、*RAS*、*WT1* の各変異は稀にみられた。これまで正常核型が多かった小児 non-DS-AMKL の半数以上に融合遺伝子がみられ、また予後との相関がみられることは興味深く思われた。さらに多数例で各融合遺伝子陽性例の臨床像及び予後について検討を進め、分子生物学に基づいたより詳細な治療層別化を行い、小児 AML の治療成績の向上に寄与したい。

次世代シーケンサーによる解析では、新規遺伝子が同定され、今後詳細な予後との相関等の検討を行う予定である。

E. 結論

小児 non-DS-AMKL の 65%以上に融合遺伝子がみられ、*CBFA2T3-GLIS2*、*NUP98-JARID1A* 融合遺伝子を有する症例は予後不良であることが

示唆された。また次世代シーケンサーにより、新規遺伝子変異がみい出された。今後予後との関係が明らかになり、治療成績の向上に役立つことが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shiba N, Ohki K, Park MJ, Sotomatsu M, Kudo K, Ito E, Sako M, Arakawa H, Hayashi Y. SETBP1 mutations in juvenile myelomonocytic leukaemia and myelodysplastic syndrome but not in paediatric acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2013(in press).
2. Park MJ, Sotomatsu M, Ohki K, Arai K, Maruyama K, Kobayashi T, Nishi A, Sameshima K, Takagi T, Hayashi Y. Liver disease is frequently observed in Down syndrome patients with transient abnormal myelopoiesis. *Int J Hematol* (in press)
3. Yoshida K, Toki T, Okuno Y, Kanezaki R, Shiraishi Y, Sanada M, Park M, Terui K, Kon A, Nagata Y, Sato-Otsubo A, Sato Y, Wang R, Shiba N, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Muramatsu H, Hasegawa D, Nakamura K, Kanegane H, Tsukamoto K, Adachi S, Kawakami K, Kato K, Nishimura R, Izraeli S, Hayashi Y, Miyano S, Kojima S, Ito E and Seishi Ogawa S. Landscape of gene mutations in Down syndrome-related myeloid disorders. *Nature Genet* 45: 1293–1299, 2013
4. Toki T, Kanezaki R, Kobayashi E, Kaneko H, Suzuki M, Wang R, Terui K, Kanegane H, Maeda M, Endo M, Mizuochi T, Adachi S, Hayashi Y, Yamamoto M, Shimizu R, Ito E. Naturally occurring oncogenic GATA1 mutants with internal deletions in transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome. *Blood* 121 : 3181-3184, 2013
5. Sano H, Shimada A, Tabuchi K, Taki T, Murata C, Park MJ, Ohki K, Sotomatsu M, Adachi S, Tawa A, Kobayashi R, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Hayashi Y. WT1 mutation in pediatric patients with acute myeloid leukemia: a report from the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Int J Hematol* 98: 437-445, 2013
6. Shiba N, Funato M, Ohki K, Park MJ,

Mizushima Y, Adachi S, Kobayashi M, Kinoshita A, Sotomatsu M, Arakawa H, Tawa A, Horibe K, Tsukimoto I, Hayashi Y. Mutations of the GATA2 and CEBPA genes in paediatric acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 164 : 142-159, 2014

7. Nishimura R, Takita J, Sato-Otsubo A, Kato M, Koh K, Hanada R, Tanaka Y, Kato K, Maeda D, Fukayama M, Sanada M, Hayashi Y, Ogawa S. Characterization of genetic lesions in rhabdomyosarcoma using a high-density single nucleotide polymorphism array. *Cancer Sci* 104 : 856-864, 2013
8. Shiba N, Ichikawa H, Taki T, Park MJ, Jo A, Mitani S, Kobayashi T, Shimada A, Sotomatsu M, Arakawa H, Adachi S, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Hayashi Y. NUP98-NSD1 gene fusion and its related gene expression signature are strongly associated with a poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 52 : 683-693, 2013
9. Shiraishi Y, Sato Y, Chiba K, Okuno Y, Nagata Y, Yoshida K, Shiba N, Hayashi Y, Kume H, Homma Y, Sanada M, Ogawa S, Miyano S. An empirical Bayesian framework for somatic mutation detection from cancer genome sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 41 : e89, 2013
10. Wakai K, Sano H, Shimada A, Shiozawa Y, Park MJ, Sotomatsu M, Yanagisawa R, Koike K, Kozawa K, Ryo A, Tsukagoshi H, Kimura H, Hayashi Y. Cytomegalovirus retinitis during maintenance therapy for T-cell acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 35 : 162-163, 2013

2. 学会発表

1. 原 勇介, 柴 徳生, 嶋田 明, 工藤寿子, 富澤大輔, 多賀 崇, 多和昭雄, 荒川浩一, 足立壮一, 林 泰秀. NUP98-NSD1 融合遺伝子陽性例は小児急性骨髄性白血病において予後不良である. 第 116 回日本小児科学会学術集会, 広島, 2013.4.19-21
2. 柴 徳生, 朴 明子, 船戸道徳, 小林正夫, 木下明俊, 足立壮一, 荒川浩一, 多和昭雄, 月本一郎, 林 泰秀. 小児急性骨髄性白血病における GATA2 遺伝子変異の解析. 第 116 回日本小児科学会学術集会, 広島, 2013.4.19-21

3. 西村 力, 吉田健一, 白石友一, 奥野友介, 真田 昌, 林 泰秀, 宮野 悟, 小川誠司, 滝田順子. 次世代シーケンサを用いた横紋筋肉腫の標的分子の探索. 第116回日本小児科学会学術集会, 広島, 2013.4.19-21
4. 星野諭子, 西村 力, 関 正史, 奥野友介, 吉田健一, 白石友一, 林 泰秀, 宮野 悟, 小川誠司, 滝田順子. 神経芽腫におけるエピジェネティック関連遺伝子の網羅的ゲノム解析. 第116回日本小児科学会学術集会, 広島, 2013.4.19-21
5. 大木健太郎, 朴 明子, 柴 徳生, 清河信敬, 康 勝好, 花田良二, 真部 淳, 菊地 陽, 小原 明, 林 泰秀. 小児 B 型前駆細胞型 ALL における CRLF2 高発現例の特徴: TCCSG-ALL 研究. 第116回日本小児科学会学術集会, 広島, 2013.4.19-21
6. 朴 明子, 大木健太郎, 新井 心, 外松 学, 林 泰秀. 染色体異常を伴ったダウン症合併 TAM と AMKL の遺伝子解析. 第116回日本小児科学会学術集会, 広島, 2013.4.19-21
7. 関 正史, 西村 力, 星野諭子, 奥野友介, 白石友一, 吉田健一, 宮野 悟, 林 泰秀, 小川誠司, 滝田順子. 再発 T 細胞性 ALL における網羅的ゲノム解析. 第116回日本小児科学会学術集会, 広島, 2013.4.19-21
8. Hara Y, Shiba N, Shimada A, Kudo K, Tomizawa D, Taga T, Horibe K, Adachi S, Arakawa H, Tawa A, Hayashi Y. NUP98-MSD1 gene fusion is a strong poor prognostic factor in pediatric AML. 45th Congress of the International Society of Pediatric Oncology. Hong Kong, 2013.9.25-28
9. Seki M, Nishimura R, Hoshino H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraiishi Y, Sanada M, Miyano S, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J. 45th Congress of the International Society of Pediatric Oncology. Hong Kong, 2013.9.25-28
10. 三谷幸代, 坂本裕美, 柴 徳生, 林 泰秀, 吉田輝彦, 市川 仁. RNA シークエンシングによる小児 AML の融合遺伝子探索. 第72回日本癌学会学術総会. 横浜, 2013.10.3-5
11. 星野諭子, 西村 力, 関 正史, 奥野友介, 白石友一, 佐藤祐介, 吉田健一, 宮野 悟, 林 泰秀, 岩中 督, 小川誠司, 滝田順子. 次世代シーケンサーを用いた肝芽腫の全エクソーム解析. 第72回日本癌学会学術総会. 横浜, 2013.10.3-5
12. 関 正史, 西村 力, 星野諭子, 吉田健一, 佐藤悠佑, 奥野雄介, 白石悠一, 加藤元博, 康 勝好, 宮野 悟, 林 泰秀, 小川誠司, 滝田順子. 第72回日本癌学会学術総会. 横浜, 2013.10.3-5
13. 原 勇介, 柴 徳生, 大木健太郎, 朴 明子, 富澤大輔, 多賀 崇, 足立壮一, 荒川浩一, 多和昭雄, 堀部敬三, 林 泰秀. 小児 non-Down 急性巨核芽球性白血病における遺伝子解析. 第72回日本癌学会学術総会. 横浜, 2013.10.3-5
14. 大木健太郎, 柴 徳生, 朴 明子, 富澤大輔, 多賀 崇, 堀部敬三, 多和昭雄, 足立壮一, 林 泰秀. JPLSG AML05 臨床試験登録症例において MLPA 法による MLL-PTD の頻度はこれまでの報告より少なく予後不良である. 第72回日本癌学会学術総会. 横浜, 2013.10.3-5
15. Yoshida K, Toki T, Park MJ, Okuno Y, Shiraiishi Y, Sanada M, Kon A, Nagata Y, Sato-Otsubo A, Sato Y, Wang RN, Terui K, Kanezaki R, Shiba N, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Muramatsu H, Hasegawa D, Nakamura K, Kanegane H, Tsukamoto K, Adachi S, Kawakami K, Kojima S, Izraeli S, Miyano S, Hayashi Y, Ito E, Ogawa S. Genetic basis of myeloid leukemogenesis in Down syndrome. 第75回日本血液学会学術集会(2013年10月11日-13日、札幌)
16. Takahashi H, Matsushita H, Kinoshita A, Taki T, Taki T, Deguchi T, Kiyokawa N, Hashii Y, Hayashi Y, Tomizawa D, Taga T, Tawa A, Adachi S, Tabe M, Miyachi H. A diversity of cases in AML with promyelocytic differentiation; A report from JPLSG. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
17. Tokumasu M, Nagao M, Shimada A, Murata C, Ohki K, Hayashi Y, Saito A, Fujimoto J, Horibe K, Ito H, Nakayama H, Kinoshita A, Tomizawa D, Taga T, Yamaguchi H, Tawa A, Heike T, Adachi S. Prognostic impact of KIT mutaton in t(8;21) childhood AML: The JPLSG AML-05 trial. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
18. Hara Y, Shiba N, Ichikawa H, Taki T, Shimada A, Kudo K, Tomizawa D, Taga T, Adachi S, Arakawa H, Tawa A, Hayashi Y. MUP98-NSD1 gene fusion is a strong poor prognostic factor in pediatric AML. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13

19. Ohki K, Kama Y, Shiba N, Arai K, Park MJ, Sotomatsu M, Hayashi Y. Clonal architecture in a case of acute myeloid leukemia with trisomy 8 and MLL-AF9. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
20. Yoshida K, Toki T, Okuno Y, Kanezaki R, Shiraiishi Y, Sanada M, Park MJ, Terui K, Kon A, Nagata Y, Sato-Otsubo A, Sato Y, Wang R, Shiba N, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Muramatsu H, Hasegawa D, Nakamura K, Kanegane H, Tsukamoto K, Adachi S, Kawakami K, Hayashi Y, Miyano S, Kojima S, Ito E, Ogawa S. Genetic basis of myeloid leukemogenesis in Down syndrome. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
21. Iijima K, Kiyokawa N, Yoshihara H, Osumi T, Kato M, Kobayashi K, Okita H, Fujimoto J, Hanada R, Tsuchida M, Shimada H, Fukushima T, Koh K, Manabe A, Kikuchi A, Hayashi Y, Ohara A. Gene expression profile in childhood BCP-ALL without common chimeric genes. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
22. Seki M, Hoshino N, Nishimura R, Okuno Y, Shiraiishi Y, Yoshida K, Kato M, Kho K, Hanada R, Miyano S, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
23. 朴 明子, 吉田健一, 大木健太郎, 新井心, 外松 学, 伊藤悦朗, 小川誠司, 林 泰秀. 13q 欠失を伴ったダウン症合併 TAM と AMKL の遺伝子解析. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
24. Hara Y, Shiba N, Funato M, Oki K, Park MJ, Mizushima Y, Adachi S, Kobayashi M, Kinoshita A, Sotomatsu M, Arakawa H, Tawa A, Horibe K, Tsukimoto I, Hayashi Y. Gata2 mutations are found in pediatric AML but not in other leukemias including JMML. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
25. Shiba N, Yoshida K, Okuno Y, Shiraiishi Y, Nagata Y, Kon A, Chiba K, Tanaka H, Ohki K, Kato M, Terui K, Park MJ, Kanazawa T, Takita J, Kudo K, Arakawa H, Ito E, Sanada M, Miyano S, Ogawa S, Hayashi Y. Whole-exome resequencing reveals novel pathogenetic gene mutations in pediatric AML. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
26. Kiyokawa N, Iijima K, Nakabayashi K, Ichikawa H, Yoshida H, Osumi T, Kato M, Kobayashi K, Okita H, Fujimoto J, Sakamoto H, Hata K, Matsumoto K, Yoshida T, Saito H, Mori T, Fukushima T, Kinoshita A, Koh K, Manabe A, Kikuchi A, Hayashi Y, Ohara A. Identification of chimeric genes expressed in Ph-like ALL in childhood by transcriptome sequencing. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
27. Shiba N, Hara Y, Park MJ, Ohki K, Fukushima K, Sako M, Kudo K, Arakawa H, Ito E, Hayashi Y. Recurrent SETBP1 mutation in juvenile myelomonocytic leukemia and myelodysplastic syndrome. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
28. 大木健太郎, 朴 明子, 原 勇介, 柴 徳生, 大喜多 肇, 小林健一郎, 外松 学, 福島敬, 康 勝好, 花田良二, 真部 淳, 菊地陽, 土田昌宏, 小原 明, 清河信敬, 林 泰秀. 小児 B 前駆細胞型 ALL における EBF1-PDGFRB 融合遺伝子の解析: TCCSG-ALL 研究. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 2013.11.29-12.1
29. 関 正史, 吉田健一, 白石友一, 佐藤悠佑, 千葉健一, 田中陽子, 加藤元博, 花田良二, 岡 明, 宮野 悟, 林 泰秀, 小川誠司, 滝田順子. 網羅的ゲノム解析による小児 T-ALL 再発例、非再発例の検討. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 2013.11.29-12.1 29
30. 林 泰秀. 小児血液・腫瘍の染色体・分子遺伝学入門とその臨床応用. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会(meet the expert), 福岡, 2013.11.29-12.1
31. 柴 徳生, 林 泰秀. 全エクソーム解析による小児急性骨髄性白血病の新規原因遺伝子の同定. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会(シンポジウム), 福岡, 2013.11.29-12.1
32. 柴 徳生, 大木健太郎, 朴 明子, 工藤寿子, 福島啓太郎, 伊藤悦朗, 迫 正廣, 多和昭雄, 荒川浩一, 林 泰秀. 小児白血病における SETBP1 遺伝子変異の解析. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 2013.11.29-12.1
33. 佐野弘純, 嶋田 明, 田渕 健, 滝 智彦,

- 村田知里, 朴 明子, 大木健太郎, 外松 学, 足立壮一, 多和昭雄, 小林良二, 堀部敬三, 土田昌宏, 花田良二, 月本一郎, 林 泰秀. 急性骨髄性白血病における WT1 遺伝子変異の解析. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 2013.11.29-12.1
34. 瓜生久美子, 西村 力, 吉田健一, 関 正史, 佐藤悠佑, 佐藤亜以子, 吉田美沙, 加藤元博, 星野諭子, 樋渡光輝, 岡 明, 林 泰秀, 小川誠司, 滝田順子. 神経芽腫大規模検体における Genetic landscape. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 2013.11.29-12.1
35. 吉田美沙, 吉田健一, 佐藤悠佑, 佐藤亜以子, 関 正史, 西村 力, 瓜生久美子, 星野諭子, 樋渡光輝, 加藤元博, 岡 明, 小川誠司, 林 泰秀, 滝田順子. 次世代シーケンサーを用いた, 神経芽腫における 11qLOH の責任遺伝子のターゲットキャプチャー. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 2013.11.29-12.1
36. 星野諭子, 西村 力, 関 正史, 奥野友介, 吉田健一, 白石友一, 加藤元博, 宮野 悟, 岡 明, 林 泰秀, 岩中 督, 小川誠司, 滝田順子. 全エクソーム解析による肝芽腫における網羅的ゲノム解析. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 2013.11.29-12.1
37. 関 正史, 吉田健一, 白石友一, 佐藤悠佑, 西村 力, 奥野友介, 千葉健一, 田中陽子, 加藤啓輔, 加藤元博, 花田良二, 野村優子, 朴 明子, 石田敏章, 岡 明, 宮野 悟, 林 泰秀, 小川誠司, 滝田順子. 散発性胸膜肺芽腫における DICER1 の両アレル変異. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 2013.11.29-12.1
38. 佐野仁志, 大木健太郎, 朴 明子, 柴 徳生, 原 勇介, 外松 学, 足立壮一, 堀部敬三, 多和昭雄, 花田良二, 月本一郎, 林 泰秀. 小児骨髄造血器腫瘍における CSF3R 遺伝子異常の解析. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 2013.11.29-12.1
39. 朴 明子, 大木健太郎, 佐野仁志, 新井心, 土岐文彰, 西 明, 金澤 崇, 外松 学, 林 泰秀. Cushing 症候群により発見された両側副腎腫大の女兒. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 2013.11.29-12.1
40. Shiba N, Ohki K, Nagata Y, Kon A, Okuno Y, Shiraishi Y, Kato M, Park MJ, Ohki K, Takita J, Kanazawa T, Kudo K, Ito E, Sanada M, Tomizawa D, Tawa A, Adachi S, Miyano S, Ogawa S, Hayashi Y. Whole-Exome Resequencing Identifies Somatic Mutations Of *BCOR* and *BCORL1* Transcriptional Corepressor Genes and Major Cohesin Complex Component Genes In Pediatric Acute Myeloid Leukemia. 55rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, December 7-10, 2013
41. Ohki K, Park MJ, Sano H, Hara Y, Shiba N, Tomizawa D, Taga T, Moriya Saito A, Fujimoto J, Tawa A, Horibe K, Adachi S, Hayashi Y. Low Frequency and Poor Prognosis Of *MLL*-Partial Tandem Duplications In Pediatric Acute Myeloid Leukemia Using MLPA Method: The Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG) AML-05 Trial. 55rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, December 7-10, 2013
42. Yoshida K, Shiba N, Shiraishi Y, Shimada A, Terui K, Kato M, Okuno Y, Nagata Y, Kon A, Yoshizato T, Matsunawa M, Chiba K, Tanaka H, Sanada M, Miyano S, Ito E, Hayashi Y, Ogawa S. Whole Exome Sequencing Reveals Clonal Evolution Pattern and Driver Mutations Of Relapsed Pediatric AML. 55rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, December 7-10, 2013
43. Shimada A, Yamashita Y, Tomizawa D, Tawa A, Watanabe T, Yokozawa T, Kudo K, Taga T, Iwamoto S, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Takahashi H, Nakayama H, Koh K, Goto H, Kosaka Y, Moriya Saito A, Fujimoto J, Horibe K, Oki K, Hayashi Y, Adachi S. Poor Prognosis With Different Induction Rate Was Observed In Children With Acute Myeloid Leukemia and *FLT3*-ITD According To The ITD/WT Allelic Ratio: A Result From The Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. 55rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, December 7-10, 2013
44. Hara Y, Shiba n, Ohki K, Park MJ, Tomizawa D, Taga T, Saito A, Fujimoto J, Arakawa H, Tawa A, Horibe K, Adachi S, Hayashi Y. Comprehensive Fusion Gene Analysis Of Pediatric Non-Down Syndrome Acute Megakaryoblastic Leukemia. 55rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, December 7-10, 2013

45. Kiyokawa N, Iijima K, Yoshihara H, Ohki K, Kato M, Fukushima T, Kikuchi A, Fujimoto J, Hayashi Y, Koh K, Manabe A, Ohara A. An Analysis Of Ph-Like ALL In Japanese Patients. 55rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, December 7-10, 2013
46. Seki M, Yoshida K, Sato Y, Shiraishi Y, Chiba K, TanakaH, Kato M, Hiwatari M, Koh K, Hanada R, Sanada M, Miyano S, Oka A, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J. Genetic Landscapes Of Childhood T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. 55rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, December 7-10, 2013
47. Yoshimi A, Toya T, Nakagawa M, Kawazu M, Nannya Y, Ichikawa M, Arai S, Harada H, Usuki K, Hayashi Y, Ito E, Kirito K, Nakajima H, Mano H, Kurokawa M.. The Genetic Landscape Of FPD/AML Revealed CDC25C Mutation As a Driver That Promotes Malignant Transformation. 55rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, December 7-10, 2013
48. Sano H, Ohki K, Park MJ, Hara Y, Shiba N, Tomizawa D, Taga T, Moriya Saito A, Fujimoto J, Tawa A, Horibe K, Adachi S, Hayashi Y. CSF3R Gene Mutations In Myeloid Malignancy Of Childhood. 55rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, December 7-10, 2013
- 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
特になし

分担研究報告書

小児がん拠点病院を活用した臨床研究基盤のあり方及び新規治療開発に関する研究
(H25-がん臨床-指定-002)

研究分担者 滝 智彦 京都府立医科大学大学院医学研究科 講師

＜AML新規治療開発に関する研究＞
—染色体診断—

研究要旨 JPLSG の臨床試験における中央診断を通じて染色体・遺伝子異常を詳細に解析することにより、正確なリスク診断システムの確立と未知の病態解明を行う。

A. 研究目的

AML の初診時の診断の中で染色体および遺伝子異常を正確に診断することは重要である。染色体・遺伝子異常はリスク分類において重要であるだけでなく、病態解明にもつながる。中央診断を通じて染色体・遺伝子異常を詳細に解析することにより、正確な診断システムを確立する。

B. 研究方法

AML-D11 登録症例 24 例と AML の診断困難例 13 例の染色体および遺伝子検査結果を検討した。また、急性リンパ性白血病(ALL)-B12 登録症例で最終的に急性巨核芽球性白血病(AMKL)と診断された 1 例を検討した。
(倫理面への配慮)

JPLSG 登録および各臨床試験への登録の際にインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

AML-D11 登録症例の 1 歳 6 カ月女児の $der(11)t(1;11)(q21;q23)$ では *MLL-AF1q* キメラ遺伝子の可能性が考えられた。AMKL およびダウン症候群関連 AML における 11q23 異常の報告例は少ないものの、*MLL* 遺伝子の関与を常に考慮すべきであると思われた。

診断困難例として相談された 4 歳女児の $t(1;12)(q21;p13)$ からは、T細胞型 ALL で少数例の報告がある *ETV6-ARNT* の可能性が考えられ

た。また、10 歳女児での 5 番を含む複雑な染色体異常では、mFISH により $der(7)t(7;21)$ が判明し、さらに *AML1 (RUNX1)* 遺伝子再構成も判明した。このことから AML の 0.8% に報告がある *RUNX1-USP42* キメラ遺伝子の関与の可能性が示唆された。報告例とは 5 番異常も一致しており、特異的な疾患群を形成する可能性があると考えられた。

ALL-B12 に登録された 1 歳 4 カ月女児では、 $t(1;22)(p13;q13)$ が手掛かりとなって最終的に AMKL の診断に至った。

D. 考察

AML の多様な染色体・遺伝子異常を正確に診断することは難しい。中央診断を行うことにより、稀な染色体異常の中から多くの病型特異的な染色体・遺伝子異常を同定することが可能になる。そのことが適切な治療による患者の治療成績の向上につながり、未知の病態解明の手がかりとなる。

E. 結論

AML の適切な治療による予後の向上と病態解明のために、染色体・遺伝子異常の正確な診断が重要である。

F. 健康危険情報 該当せず

G. 研究発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
予定なし

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）
分担研究報告書

小児がん拠点病院を活用した臨床研究基盤のあり方及び新規治療開発に関する研究
(H25-がん臨床-指定-002)

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

＜AML新規治療開発に関する研究＞
—小児急性骨髄性白血病(AML)に対する標準的治療法の確立—

研究要旨 本研究では、小児急性骨髄性白血病(de novo AML)を対象に、これまで我が国で行われてきた全国規模の臨床試験の流れを継承し、標準的治療法の確立および更なる治療成績の向上を目指す。de novo AML に対しては本邦初の第Ⅲ相ランダム化比較試験となるAML-12が計画され、実施計画書を作成、現在試験開始に向けて最終準備中である。本試験ではシームレス第Ⅱ相-第Ⅲ相臨床試験デザインを用い、初回寛解導入療法における大量シタラビン療法およびフローサイトメトリー法による微小残存病変(MRD)の意義を検証する。

A. 研究目的

小児急性骨髄性白血病(de novo AML)に対する標準的治療法を確立し、治療成績の向上を図る。

B. 研究方法

1999年～2001年に小児AML共同治療研究会によるAML99臨床試験が実施され、治療反応性および診断時AML細胞の核型異常に基づく層別化治療が行われた。その結果、寛解導入率94%、5年無イベント生存率(EFS)61%、5年全生存率(OS)75%と世界でもトップレベルの治療成績が得られた。2003年に日本小児白血病リンパ腫研究グループ(JPLSG)が設立され、AML99試験に参加していなかった小児がん白血病研究グループ(CCLSG)も加わり、本邦初の小児AMLナショナルスタディAML-05臨床試験が行われた。AML-05では、AML99におけるリスク分類に加えて、予後不良なFLT3-ITD陽性例を高リスク群に加えて第一寛解期における同種造血幹細胞移植の適応と

した。一方、低リスク群と中間リスク群に対しては、総治療コース数を5とAML99の6コースから減らし、特に低リスク群では心毒性を有するアントラサイクリン系抗がん剤および二次性白血病のリスクを有するエトポシド(VP-16)の総投与量を減じた。中間リスク群に対しては、第一寛解期における移植適応の一切を外した。すなわち、AML99で得られた良好な治療成績を保ちつつ、治療後の晩期合併症リスクを減らすことを試みた。2006年11月～2010年12月の間に計485例(適格443例)の症例が登録され、2012年5月にデータの固定を行い、解析を実施した。その結果3年EFS54.2%、3年OS73.1%と、AML99と遜色のない治療成績が得られた。

このように、AML99、AML-05と発展させてきた小児AMLに対する治療戦略を踏襲した上で、更なる治療成績の向上を図るべく、「小児急性骨髄性白血病を対象とした初回寛解導入療法におけるシタラビン投与方法についてランダム化比較検討、および寛解導入後早期の微