

小児骨髄系腫瘍における質の高い染色体診断法の確立に関する研究

担当責任者 滝 智彦 京都府立医科大学大学院医学研究科 講師

研究要旨

JPLSGの骨髄系腫瘍の臨床試験登録症例の染色体検査結果を収集して詳細に検討することにより、リスク因子となる染色体異常を正確に診断するうえで生じうる問題点を把握する。そのことを通じて質の高い染色体診断法を確立するとともに、新規の染色体異常の詳細な解析により、未知の病態解明につなげる。

A. 研究目的

AMLに代表される小児骨髄系腫瘍の初診時の診断の中で染色体異常を正確に診断することは重要である。染色体異常はリスク分類において重要であるだけでなく、それに伴って生じる遺伝子異常を通じて病態解明にもつながる。中央診断を通じて染色体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

JPLSGの骨髄系腫瘍の臨床試験に登録された症例を中心に染色体検査結果を収集し、その内容について詳細に検討した。

（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-12登録症例33例、AML-P13登録症例1例、AML-D11登録症例28例、診断困難例4例の染色体検査結果を収集し、その内容を検討した。AML-D11登録症例と診断困難例についてはキメラ遺伝子スクリーニングの結果も収集できたため、併せて検討した。

AML-12登録症例の1例では、キメラ遺伝子スクリーニングにより高リスク因子であるFUS-ERGキメラmRNAが検出されたが、染色体検査ではt(16;21)(p11;q22)は認めなかった。add(21)(q22)を含む複雑な染色体異常であったためその中でFUS-ERGが形成されていると考えられたが、追加で行ったFISH法でもFUS遺伝子のスプリットシグナルを観察する

ことはできなかった。キメラmRNAについては、キメラ遺伝子スクリーニングに用いたものとは別の検体を、異なる施設で、異なるプライマーを用いて再検査し同様の結果を得たため、FISH法では検出できない微小な異常によりFUS-ERGキメラ遺伝子が形成されている可能性が考えられた。同じようにG分染法による染色体検査でもFUS遺伝子のFISH法でも異常を確認できなかった症例をAML-05登録症例でも経験しており、FUS-ERGの形成の際に共通する染色体再構成のパターンが存在する可能性が示唆され、現在両者を併せた詳細な検討を計画している。

同じくAML-12登録症例の-7,+21および環状染色体を有する非ダウン症AML-M7の症例では、FISH法による7番染色体の解析とSKY法を行うことにより、環状染色体が長腕部分の欠失を伴う7番染色体由来であることが確認できた。

その他に、+21のモザイクが存在する可能性が考えられた症例（寛解期に行ったFISH法では100細胞中に3コピーの21番のシグナルが観察される細胞はみつからなかった）、観察された染色体構造異常が先天的な構成的な異常の可能性が考えられた症例（寛解期の染色体検査では正常核型だった）、形態などからAPLが疑われるのにも関わらず、RARA関連の染色体異常が観察されず、RARAのスプリットの有無をFISHで確認した（スプリットはなかった）症例などについても検討した。

D. 考察

AMLの多様な染色体異常を正確に診断することは難しい。中央診断により多数の症例の染色体検査結果を詳細に検討することにより、稀な染色体異常の中から多くの病型特異的な染色体異常を同定

することが可能になる。その精度の高い染色体診断のためには臨床情報や他の検査情報も欠かせない。さらにFISH法やSKY法などの他の検査法も併せることにより正確な診断を得ることが可能になる。そのような1例1例の地道な検討が重要であり、その結果正確な染色体診断が可能になれば、適切な治療による患者の治療成績の向上につながり、未知の病態解明に役立つ情報となることができる。

## E. 結論

骨髄系腫瘍の適切な治療による予後の向上と病態解明のためのより質の高い染色体診断法の確立のために、今後も症例ごとの地道な染色体検査情報の検討が必要である。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Chinen Y, Taki T, Tsutsumi Y, Kobayashi S, Matsumoto Y, Sakamoto N, Kuroda J, Horiike S, Nishida K, Ohno H, Uike N, Taniwaki M. The leucine twenty homeobox (LEUTX) gene, which lacks a histone acetyltransferase domain, is fused to KAT6A in therapy-related AML with t(8;19)(p11;q13). *Genes Chromosomes Cancer* 53: 299-308, 2014
- 2) Kinoshita A, Miyachi H, Matsushita H, Yabe M, Taki T, Watanabe T, Saito AM, Tomizawa D, Taga T, Takahashi H, Matsuo H, Kodama M, Ohki K, Hayashi Y, Tawa A, Horibe K, Adachi S. Acute myeloid leukemia with myelodysplastic features in children. A Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Group Study. *Br J Haematol* 167: 80-86, 2014
- 3) Matsuo H, Kajihara M, Tomizawa D, Watanabe T, Saito AM, Fujimoto J, Horibe K, Kodama K, Tokumasu M, Itoh H, Nakayama H, Kinoshita A, Taga T, Tawa A, Taki T, Tanaka S, Adachi S. Prognostic implications of CEBPA mutations in pediatric acute myeloid leukemia: a report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Blood Cancer J* 4: e226, 2014
- 4) Matsuo H, Kajihara M, Tomizawa D, Watanabe T, Saito AM, Fujimoto J, Horibe K, Kodama K, Tokumasu M, Itoh H, Nakayama H, Kinoshita A, Taga T, Tawa A, Taki T, Shiba N, Ohki K, Hayashi Y, Yamashita Y, Shimada A, Tanaka S, Adachi S. EVI1 overexpression is a poor prognostic factor in pediatric patients with mixed lineage leukemia-*AF9* rearranged acute myeloid leukemia.

*Haematologica* 99: e225-227, 2014

- 5) Chinen Y, Sakamoto N, Nagoshi H, Taki T, Maegawa S, Tatekawa S, Tsukamoto T, Mizutani S, Shimura Y, Yamamoto-Sugitani M, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Kuroda J, Taniwaki M. 8q24 amplified segments involve novel fusion genes between NSMCE2 and long noncoding RNAs in acute myelogenous leukemia. *J Hematol Oncol* 7: 68, 2014

### 2. 学会発表

- 1) Yoshiaki Chinen, Natsumi Sakamoto, Hisao Nagoshi, Tomohiko Taki, Satoru Kobayashi, Kazuhiro Nishida, Saori Maegawa, Miki Kiyota, Shinsuke Mizutani, Yuji Shimura, Mio Sugitani, Tsutomu Kobayashi, Yosuke Matsumoto, Shigeo Horiike, Junya Kuroda, Masafumi Taniwaki: PVT1-NSMCE2 fusion gene enhances BCL-XL expression and drug resistance in leukemic cells. 第76回日本血液学会学術集会. 2014年10月31日
- 2) Norio Shiba, Yusuke Hara, Kentaro Ohki, Genki Yamato, Myoung-Ja Park, Toru Kobayashi, Hitoshi Ichikawa, Daisuke Tomizawa, Tomohiko Taki, Akira Shimada, Manabu Sotomatsu, Hirokazu Arakawa, Keizo Horibe, Souichi Adachi, Akio Tawa, Yasuhide Hayashi: The prognostic impact of high EVI1-related genes expression in pediatric acute myeloid leukemia. 第76回日本血液学会学術集会. 2014年11月2日
- 3) 犬飼岳史, 滝智彦, 根本篤, 赤羽弘資, 合井久美子, 黒田格, 廣瀬衣子, 阿部正子, 加賀美恵子, 杉田完爾: 卵巣胚細胞腫から発症した急性骨髄性白血病のゲノム解析. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会. 2014年11月28日
- 4) Akira Shimada, Akitoshi Kinoshita, Atsushi Manabe, Miharuru Yabe, Hayato Miyachi, Hiromichi Matsushita, Tomohiko Taki, Masami Inoue, Daisuke Hasegawa, Asahito Hama, Daiichiro Hasegawa, Keizo Horibe, Masafumi Ito, Akio Tawa, Seiji Kojima, Souichi Adachi: Chemotherapy is effective for pediatric RAEB/RAEB-T: Results from the JPLSG AML05 and JSPHO MDS studies. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会. 2014年11月30日
- 5) Takashi Taga, Tomoyuki Watanabe, Kazuko Kudo, Daisuke Tomizawa, Kiminori Terui, Hiroshi Moritake, Akitoshi Kinoshita, Shotaro Iwamoto, Hideki Nakayama, Hiroyuki Takahashi, Akira Shimada, Tomohiko Taki, Tsutomu Toki, Etsuro Ito, Hiroaki Goto, Katsuyoshi Koh, Akiko M. Saito, Keizo Horibe, Tatsutoshi Nakahata, Akio Tawa, Souichi Adachi: Risk-

oriented therapy for myeloid leukemia of Down syndrome: A nationwide prospective study by the Japanese Pediatric Leukemia / Lymphoma Study Group (JPLSG). 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Francisco, December 6-9, 2014

6) Yusuke Hara, Norio Shiba, Kentaro Ohki, Myoung-ja Park, Akira Shimada, Daisuke Tomizawa, Akiko Moriya Saito, Junichiro Fujimoto, Tomohiko Taki, Akitoshi Kinoshita, Takashi Taga, Hirokazu Arakawa, Akio Tawa, Keizo Horibe, Souichi Adachi, Yasuhide Hayashi: Poor prognosis associated with FAB subtypes M4 and M5 in Japanese pediatric acute myeloid leukemia patients with FLT3-ITD. 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Francisco, December 6-9, 2014

7) Hiroyuki Takahashi, Tomoyuki Watanabe, Akitoshi Kinoshita, Yuki Yuza, Hiroshi Moritake, Kiminori Terui, Shotaro Iwamoto, Hideki Nakayama, Akira Shimada, Kazuko Kudo, Tomohiko Taki, Miharuru Yabe, Hiromichi Matsushita, Yuka Yamashita, Kazutoshi Koike, Atsushi Ogawa, Yoshiyuki Kosaka, Daisuke Tomizawa, Takashi Taga, Akiko M. Saito, Keizo Horibe, Tatsutoshi Nakahata, Hayato Miyachi, Akio Tawa, Souichi Adachi: High Event-Free Survival rate with minimum-dose-anthracycline treatment in Childhood Acute Promyelocytic Leukemia: A nationwide prospective study by the Japanese Pediatric Leukemia / Lymphoma Study Group (JPLSG). 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Francisco, December 6-9, 2014

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 特になし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）  
委託業務成果報告（業務項目）

ダウン症候群に合併したAML（ML-DS）に対する標準的治療法の確立に関する研究

担当責任者 多賀 崇 滋賀医科大学 小児科 講師

**研究要旨：** 本研究ではこれまで我が国で行われてきたダウン症候群に発症した急性骨髄性白血病（ML-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。本年度は日本小児白血病リンパ腫研究グループ（JPLSG）のもと本疾患群に対して行われているJPLSG AML-D11研究を継続して行った。さらに、前治療研究であるJPLSG AML-D05研究が終了したことを受け、そのデータ解析ならびにその成果を国際学会で発表した。

#### A. 研究目的

ダウン症候群に発症した急性骨髄性白血病（ML-DS）は非ダウン症候群に発症した急性骨髄性白血病に比べ、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 ML-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委員会により立案、2011年3月より開始された「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AML-D11」（研究代表者：多賀崇）を継続して行った。さらに、2008年1月から2013年12月までJPLSGで初めて行われたDown症候群に発症したAMLを対象とした全国統一の治療研究「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）の研

究の成果をまとめ、解析を行った。

#### C. 研究結果

AML-D11研究は、本疾患群に対する前治療研究同様、登録は順調であり（2015年2月末現在の登録例：87例）重篤な治療関連合併症も少なく、2015年2月に新規登録終了となった。

AML-D05研究は、評価可能登録症例は72例で、3年無病生存率は86.1%であった。また、本試験のセカンダリーエンドポイントである有害事象発生率について、AML99 Down研究における成績と比較して、発生率が上回る有害事象は少数であり、本試験の安全性はAML99 Down研究と同等であった。サブグループ解析では、従来から言われている4歳以上は予後不良因子ではなかった。一方新たな予後因子として、FLT3-ITD陽性が判明した。但し、本試験でのFLT3-ITD陽性例は1例のみであり、観察期間も短いことに留意する必要がある。

現在進行中のAML-D11研究では、治療骨子はD05と同様とし、微小残存病変（MRD）が予後因子とならないかを検索している。

## D. 考察

我が国で行われてきた ML-DS に対する治療研究は、欧米の主要な研究と比べて治療強度が弱い、本研究は標準リスク群ではさらなる治療減弱をおこなったにも関わらず、これらと同等の治療成績が得られている。基礎疾患を有することの多い ML-DS の多くの症例に対してどこまで治療減弱が可能かは重要なテーマのひとつであるが、本研究はその先陣をいっているものと思われる。一方、治療反応性に基づいた層別化治療を本疾患群に対し世界で初めて行ったが、高リスク群が予想外に少なく、十分な評価ができなかった。寛解導入不能・再発例が予後不良であることから、極めて理にかなった治療法であると考えられる一方、層別因子となる予後因子のさらなる抽出が必要である。微小残存病変 (MRD) がその指標となりうるかを検証している現行試験 JPLSG AML-D11 研究に期待したい。

## E. 結論

ダウン症候群に発症した急性骨髄性白血病の病態解明とさらなる治療成績の向上のため、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. Blink M, Zimmermann M, Neuhoff CV, Reinhardt D, Haas VD, Hasle H, O'Brien MM, Stark B, Tandonnet J, Pession A, Tousovska K, Cheuk DK, Kudo K, Taga T, Rubnitz JE, Haltrich I, Balwierz W, Pieters R, Forestier E, Johansson B, van den Heuvel-Eibrink MM, Zwaan CM. Normal karyotype is a poor prognostic factor in Myeloid Leukemia of Down Syndrome: a retrospective international study. *Haematologica*. 2014; 99(2):299-307.

2. Hyakuna N, Shimomura Y, Watanabe A, Taga T, Kikuta A, Matsushita T, Kogawa K, Kawakami C, Horikoshi Y, Iwai T, Okamoto Y, Tsurusawa M, Asami K; for The Japanese Childhood Cancer and Leukemia Study Group (JCCLSG). Assessment of Corticosteroid-induced Osteonecrosis in Children Undergoing Chemotherapy for Acute Lymphoblastic Leukemia: A Report From the Japanese Childhood Cancer and Leukemia Study Group. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2014;36(1):22-9
3. Muramatsu H, Sakaguchi H, Taga T, Tabuchi K, Adachi S, Inoue M, Kitoh T, Suminoe A, Yabe H, Azuma E, Shioda Y, Ogawa A, Kinoshita A, Kigasawa H, Osugi Y, Koike K, Kawa K, Kato K, Atsuta Y, Kudo K, Reduced intensity conditioning in allogeneic stem cell transplantation for AML with Down syndrome. *Pediatr Blood Cancer*. 2014; 61(5):925-7
4. Nakayama H, Tabuchi K, Tawa A, Tsukimoto I, Tsuchida M, Morimoto A, Yabe H, Keizo Horibe, Hanada R, Imaizumi M, Hayashi Y, Hamamoto K, Kobayashi K, Kudo K, Shimada A, Miyamura T, Moritake H, Tomizawa D, Taga T, Adachi S. Outcome of children with relapsed acute myeloid leukemia following initial therapy under the AML99 protocol. *Int J Hematol* 2014; 100(2):171-9.
5. Kinoshita A, Miyachi H, Matsushita H, Yabe M, Taki T, Watanabe T, Saito AM, Tomizawa D, Taga T, Takahashi H, Matsuo H, Kodama K, Ohki K, Hayashi Y, Tawa A, Horibe K, Adachi S. Acute myeloid leukaemia with myelodysplastic features in children: a report of Japanese Paediatric Leukaemia/Lymphoma Study Group. *Br J Haematol*. 2014; 167(1):80-6.

6. Matsuo H, Kajihara M, Tomizawa D, Watanabe T, Moriya Saito A, Fujimoto J, Horibe K, Kodama K, Tokumasu M, Itoh H, Nakayama H, Kinoshita A, Taga T, Tawa A, Taki T, Shiba N, Ohki K, Hayashi Y, Yamashita Y, Shimada A, Tanaka S, Adachi S. EVI1 overexpression is a poor prognostic factor in pediatric patients with mixed lineage leukemia-AF9 rearranged acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2014 Nov;99 (11):e225-7.
7. 学会発表
1. Akira Shimada, Yuka Yamashita, Daisuke Tomizawa, Norio Shiba, Akio Tawa, Tomoyuki Watanabe, Toshiya Yokozawa, Kazuko Kudo, Takashi Taga, Shotaro Iwamoto, Kiminori Terui, Hiroshi Moritake, Akitoshi Kinoshita, Hiroyuki Takahashi, Hideki Nakayama, Katsuyoshi Koh, Hiroaki Goto, Yoshiyuki Kosaka, Akiko Saito, Junichiro Fujimoto, Keizo Horibe, Yusuke Hara, Kentaro Oki, Yasuhide Hayashi, Souichi Adachi, Pediatric AML with *FLT3-ITD/WT*, *NUP98-NSD1*, *NPM1*, and *WT1* mutations affected the clinical outcome 第76回日本血液学会学術集会、平成26年10月31日(大阪)
  2. 大和玄季、柴徳生、吉田健一、大木健太郎、朴明子、原勇介、外松学、多賀崇、富澤大輔、足立壮一、多和昭雄、堀部敬三、荒川浩一、小川誠司、林泰秀、小児骨髄性白血病におけるASXL1、ASXL2 遺伝子変異と臨床像、第56回日本小児血液・がん学会学術集会、平成26年11月29日—12月1日(岡山)
  3. 大木健太郎、朴明子、原勇介、柴徳生、富澤大輔、多賀崇、齋藤明子、藤本純一郎、多和昭雄、堀部敬三、足立壮一、林泰秀、小児AMLにおけるIKZF1欠失の頻度と予後解析：JPLSG AML-05、第56回日本小児血液・がん学会学術集会、平成26年11月29日—12月1日(岡山)
  4. 柴徳生、大木健太郎、原勇介、大和玄季、朴明子、市川仁、富澤大輔、外松学、荒川浩一、足立壮一、多賀崇、堀部敬三、多和昭雄、林泰秀、The prognostic impact of Gene X expression in pediatric acute myeloid leukemia 第56回日本小児血液・がん学会学術集会、平成26年11月29日—12月1日(岡山)
  5. 濱麻人、村松秀城、長谷川大輔、朴明子、岩本彰太郎、多賀崇、伊藤悦朗、柳沢龍、康勝好、林泰秀、足立壮一、水谷修紀、渡邊健一郎、ダウン症における一過性異常骨髄増殖症の形態的特徴：JPLSG TAM-10形態中央診断の解析、第56回日本小児血液・がん学会学術集会、平成26年11月29日—12月1日(岡山)
  6. Takashi Taga, Tomoyuki Watanabe, Kazuko Kudo, Daisuke Tomizawa, Kiminori Terui, Hiroshi Moritake, Akitoshi Kinoshita, Shotaro Iwamoto, Hideki Nakayama, Hiroyuki Takahashi, Akira Shimada, Tomohiko Taki, Akio Tawa and Souichi Adachi. Risk-oriented therapy for Myeloid leukemia of Down syndrome : A Nationwide prospective study by the Japanese Pediatric Leukemia / Lymphoma Study Group (JPLSG), 56th Annual meeting of American Society of Hematology December 6-9, 2014(San Francisco)
  7. Hiroto Inaba, Yinmei Zhou, Oussama Abla, Souichi Adachi, Anne Auvrignon, H. Berna Beverloo, Eveline de Bont, Tai-Tsung Chang, Ursula Creutzig, Michael

- Dworzak, Sarah Elitzur, Alcira Fynn, Erik Forestier, Henrik Hasle, Der-Cherng Liang, Vincent Lee, Franco Locatelli, Riccardo Masetti, Barbara De Moerloose, Dirk Reinhardt, Laura Rodriguez, Shuhong Shen, Takashi Taga, Daisuke Tomizawa, Allen E.J. Yeoh, Martin Zimmermann, and Susana C. Raimondi. Pediatric Acute Megakaryoblastic Leukemia without Down Syndrome: A Retrospective Study By the International Berlin-Frankfurt-Munster Study Group (I-BFMSG), 56th Annual meeting of American Society of Hematology December 6-9, 2014(San Francisco)
8. Daisuke Tomizawa, Akio Tawa, Takashi Taga, Yasuo Horikoshi, Hideki Nakayama, Akitoshi Kinoshita, Ryoji Hanada, Keizo Horibe, Atsushi Kikuta, Yoshifumi Kawano, Hiroki Hori, Atsushi Manabe, Souichi Adachi. Outcome of adolescent and young adults with acute myeloid leukemia treated with pediatric AML protocol: A report from the 3 Japanese cooperative studies. 56th Annual meeting of American Society of Hematology December 6-9, 2014(San Francisco)
  9. Hiroyuki Takahashi, Tomoyuki Watanabe, Akitoshi Kinoshita, Yuki Yuza, Hiroshi Moritake, Kiminori Terui, Shotaro Iwamoto, Hideki Nakayama, Akira Shimada, Kazuko Kudo, Tomohiko Taki, Miharuru Yabe, Hiromichi Matsushita, Yuka Yamashita, Kazutoshi Koike, Atsushi Ogawa, Yoshiyuki Kosaka, Daisuke Tomizawa, Takashi Taga, Akiko M. Saito, Keizo Horibe, Tatsutoshi Nakahata, Hayato Miyachi, Akio Tawa, and Souichi Adachi. High event-free survival rate with minimum-dose-anthracycline treatment in childhood acute promyelocytic leukemia: A nationwide prospective study by the Japanese Pediatric Leukemia / Lymphoma Study Group (JPLSG), 56th Annual meeting of American Society of Hematology December 6-9, 2014(San Francisco)
  10. Yusuke Hara, Norio Shiba, Kentaro Ohki, Myoung-ja Park, Akira Shimada, Daisuke Tomizawa, Takashi Taga, Akiko M. Saito, Junichiro Fujimoto, Hirokazu Arakawa, Akio Tawa, Keizo Horibe, Souichi Adachi, and Yasuhide Hayashi. Poor prognosis of FAB-M4 and M5 patients in pediatric acute myeloid leukemia with FLT3-ITD. 56th Annual meeting of American Society of Hematology December 6-9, 2014(San Francisco)
  11. Norio Shiba, Kentaro Ohki, Yusuke Hara, Genki Yamato, Myoung-ja Park,<sup>1</sup>Hitoshi Ichikawa, Tohru Kobayashi, Daisuke Tomizawa, Manabu Sotomatsu, Hirokazu Arakawa, Keizo Horibe, Takashi Taga, Souichi Adachi, Akio Tawa, and Yasuhide Hayashi. The prognostic impact of high *MEL1* gene expression in pediatric acute myeloid leukemia. 56th Annual meeting of American Society of Hematology December 6-9, 2014(San Francisco)
  12. Genki Yamato, Norio Shiba, Kenichi Yoshida, Kentaro Ohki<sup>1</sup>, Myoung-ja Park, Yusuke Hara, Daisuke Tomizawa, Manabu Sotomatu, Takashi Taga, Sohichi Adachi, Akio Tawa, Keizo Horibe, Hirokazu Arakawa, Seishi Ogawa, Yasuhide Hayashi, Clinical features of Patients with *ASXL1* and *ASXL2* mutations in pediatric acute myeloid leukemia 6th Annual meeting of American Society of Hematology December 6-9, 2014(San Francisco)

- |                             |                 |
|-----------------------------|-----------------|
| G. 知的財産権の出願・登録状況<br>(予定を含む) | なし              |
| 1. 特許取得                     | 2. 実用新案登録<br>なし |
|                             | 3. その他          |



小児 AML に対する造血細胞移植法の確立に関する研究

担当責任者 工藤 寿子 藤田保健衛生大学小児科 准教授

研究要旨：第1・第2寛解期小児急性骨髄性白血病を対象とした骨髄非破壊的前処置を用いた同種移植の治療成績を解析

#### A. 研究の目的

本研究では強力な前処置による晩期合併症の軽減のため、第1寛解(1CR)を維持している高リスク(HR)群の小児急性骨髄性白血病(AML)症例と、第2寛解(2CR)を維持しているAML症例に対する初回移植として骨髄非破壊的前処置を用いた同種移植(Reduced toxicity stem cell transplantation; RTST)と従来行われてきた骨髄破壊的前処置を用いた移植(Myeloablative stem cell transplantation; MAST)の移植成績を比較し、RTSTの安全性と有効性を検討する。

#### B. 研究方法

日本造血細胞移植学会に登録された1CR/2CR期の小児AMLに対してRTSTを施行した34例と、患者背景や病期を一致させたMAST102例(全身放射線照射(TBI)群)68例、Busulfan(BU)群)34例)を抽出し、移植成績を比較する。

#### (倫理面への配慮)

本研究は疫学研究に関する倫理指針に基づいて実施される。以下の点から、本研究ではICの取得は必要としない。①本研究を行うために新たな検体の採取はなく、研究結果は匿名化された上で厳重に管理されるため、対象者に危険を及ぼす可能性は考えられないこと、②後方視的臨床研究であるため、個別的なICの取得は現実的には困難であり、IC取得可能である患者のみを対象にすることで生じるバイアスは、

本研究の価値を著しく損ねるものであること、③本研究が医学的、社会的に重要性が高く、公共の福祉に資するものであること。従って、改めて個別のICの取得は行わないものとする。この研究は日本造血細胞移植学会の一元管理委員会の審査を受けて実施されるもので、この研究の概要を学会ホームページ上あるいは研究代表者の医療機関の掲示等において情報公開する。

#### C. 研究結果

RTSTを受けたAML34例と患者背景や病期を一致させたMAST102例の成績を比較したところ、生着、移植後早期の合併症、急性ならびに慢性GVHDの頻度は同等で、3年後の再発リスクは25% vs 26%、非再発死亡率は13% vs 11%であった。Fludarabine+Melphalanを用いたRTSTとMASTの3年粗生存率はそれぞれ72%と68%であり、後方視的解析ではあるが、RTSTの成績はMASTと遜色はなかった。

#### D. 考察

これまでの骨髄破壊的前処置を用いた移植により予後不良と言われてきた小児AMLにおいても無病生存率の向上が得られてきているが、長期生存者は晩期合併症の発症リスクが高く、今後の小児移植領域における大きな課題の一つとなっている。RTSTを施行した移植成績がMASTの成績と遜色がないことから、RTSTの適応となる小児

AML 症例が存在することが明らかになった。RTST を導入することにより、前処置軽減に伴い移植関連合併症率は減少し、長期的には成長障害・性腺障害・甲状腺機能障害などの内分泌障害、歯牙発育障害、二次がんなどの晩期合併症の軽減が期待できると考えられる。

## E. 結論

生存率の向上と晩期合併症の軽減を図ることを目的として、1CR/2CR 期の小児 AML を対象とした Fludarabine+Melphalan を用いた前処置の前方視的な臨床研究(第 II 相臨床試験)を開始する。

## F. 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*. 2014 Jan;164(1):156-9
- 2) Muramatsu H, Sakaguchi H, Taga T, Tabuchi K, Adachi S, Inoue M, Kitoh T, Suminoe A, Yabe H, Azuma E, Shioda Y, Ogawa A, Kinoshita A, Kigasawa H, Osugi Y, Koike K, Kawa K, Kato K, Atsuta Y, Kudo K. Reduced intensity conditioning in allogeneic stem cell transplantation for AML with Down syndrome. *Pediatr Blood Cancer*. *Pediatr Blood Cancer*. 2014 May;61(5):925-7
- 3) Kogawa K, Sato H, Asano T, Ohga S, Kudo K, Morimoto A, Ohta S, Wakiguchi H, Kanegane H, Oda M, Ishii E. Prognostic factors of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in children: Report of the Japan Histiocytosis Study Group. *Pediatr Blood Cancer*. 2014 Jul;61(7):1257-62
- 4) Kobayashi R, Yabe H, Kikuchi A, Kudo K, Yoshida N, Watanabe K, Muramatsu H, Takahashi Y, Inoue M, Koh K, Inagaki J, Okamoto Y, Sakamaki H, Kawa K, Kato K, Suzuki R, Kojima S. Bloodstream Infection after Stem Cell Transplantation in Children with Idiopathic Aplastic Anemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014 Aug;20(8):1145-9
- 5) Sakaguchi H, Nishio N, Hama A, Kawashima N, Wang X, Narita A, Doisaki S, Xu Y, Muramatsu H, Yoshida N, Takahashi Y, Kudo K, Moritake H, Nakamura K, Kobayashi R, Ito E, Yabe H, Ohga S, Ohara A, Kojima S. Peripheral blood lymphocyte telomere length as a predictor of the response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. *Haematologica*. 2014 Aug;99(8):1312-6
- 6) Morimoto A, Oh Y, Shioda Y, Kudo K, Imamura T. Recent advances in Langerhans Cell Histiocytosis. *Pediatr Int*. 2014 May 19
- 7) Nakayama H, Tabuchi K, Tawa A, Tsukimoto I, Tsuchida M, Morimoto A, Yabe H, Horibe K, Hanada R, Imaizumi M, Hayashi Y, Hamamoto K, Kobayashi R, Kudo K, Shimada A, Miyamura T, Moritake H, Tomizawa D, Taga T, Adachi S. Outcome of children with relapsed acute myeloid leukemia following initial therapy under the AML99 protocol. *Int J Hematol*. 2014 Aug;100(2):171-9
- 8) Kato M, Yoshida N, Inagaki J, Maeba H, Kudo K, Cho Y, Kurosawa H, Okimoto Y, Tauchi H, Yabe H, Sawada A, Kato K, Atsuta Y, Watanabe KI. Salvage allogeneic stem cell transplantation in patients with pediatric myelodysplastic syndrome and myeloproliferative neoplasms. *Pediatr Blood Cancer*. 2014 Oct;61(10):1860-6.
- 9) Oh Y, Morimoto A, Shioda Y, Imamura T,

- Kudo K, Imashuku S; for the Japan LCH Study Group. High serum osteopontin levels in pediatric patients with high risk Langerhans cell histiocytosis. *Cytokine*. 2014 Jul 30.
- 10) Yoshida N, Kobayashi R, Yabe H, Kosaka Y, Yagasaki H, Watanabe K, Kudo K, Morimoto A, Ohga S, Muramatsu H, Takahashi Y, Kato K, Suzuki R, Ohara A, Kojima S. First-line treatment for severe aplastic anemia in children: bone marrow transplantation from a matched family donor versus immunosuppressive therapy. *Haematologica*. 2014 Dec;99(12):1784-91.
- 11) Umeda K, Adachi S, Tanaka S, Ogawa A, Hatakeyama N, Kudo K, Sakata N, Igarashi S, Ohshima K, Hyakuna N, Chin M, Goto H, Takahashi Y, Azuma E, Koh K, Sawada A, Kato K, Inoue M, Atsuta Y, Takami A, Murata M; on behalf of the GVHD Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Comparison of continuous and twice-daily infusions of cyclosporine A for graft-versus-host-disease prophylaxis in pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer*. 2014 Oct 12.
- 12) Wang R, Yoshida K, Toki T, Sawada T, Uechi T, Okuno Y, Sato-Otsubo A, Kudo K, Kamimaki I, Kanazaki R, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Terui K, Sato T, Iribe Y, Ohga S, Kuramitsu M, Hamaguchi I, Ohara A, Hara J, Goi K, Matsubara K, Koike K, Ishiguro A, Okamoto Y, Watanabe K, Kanno H, Kojima S, Miyano S, Kenmochi N, Ogawa S, Ito E. Loss of function mutations in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol*. 2014 Nov 25.
- 13) Ishida H, Adachi S, Hasegawa D, Okamoto Y, Goto H, Inagaki J, Inoue M, Koh K, Yabe H, Kawa K, Kato K, Atsuta Y, Kudo K. Comparison of a fludarabine and melphalan combination-based reduced toxicity conditioning with myeloablative conditioning by radiation and/or busulfan in acute myeloid leukemia in Japanese children and adolescents. *Pediatr Blood Cancer*. 2014 Dec 24.
2. 学会発表
- 1) Kazuko Kudo, Akina Matsuoka, Hideki Muramatsu, Yusuke Okuno, Taemi Ogura, Toshihiro Tomii, Hironobu Kitazawa, Rieko Ito, Yasuo Horikoshi, Xinan Wang, Masafumi Ito, Seiji Kojima. A patient of juvenile myelomonocytic leukemia with an NRAS mutation who developed acute lymphoblastic leukemia. 9th Biennial Childhood Leukemia Symposium, April 28-29, 2014: Plague, Czech Republik
- 2) 工藤寿子、村松秀城、吉田奈央、小林良二、矢部普正、田渕 健、長 祐子、加藤啓輔、橋井佳子、井上雅美、坂巻壽、河 敬世、加藤剛二、鈴木律朗、小島勢二 小児再生不良性貧血における2回目造血幹細胞移植の成績 第36回日本造血細胞移植学会(平成26年3月7日～9日)、沖縄コンベンションセンター
- 3) Shimada A, Yamashita Y, Tomizawa D, Shiba N, 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 A, Fujimoto J, Horibe K, Hara Y, Oki K, Yahashi Y, Adachi S. Pediatric AML with FLT3-ITD/WT, NUP98-NSD1, NPM1, and WT1 mutations affected the clinical outcome. 第76回日本血液学会(平成26年10月31日-11月2日)、大阪
- 4) Muramatsu H, Yabe H, Kobayashi R, Kikuchi A, Kudo K, Kawa K, Kato K, Suzuki R,

- Takahashi Y, Inagaki J, Inoue M, Kojima S. Allogeneic SCT from HLA-mismatched related/unrelated donors in children with AA. 第76回日本血液学会(平成26年10月31日-11月2日)、大阪
- 5) Yagasaki H, Yabe H, Ohara A, Kusaka Y, Kudo K, Kobayashi R, Ohga S, Morimoto A, Watanabe K, Muramatsu H, Takahashi Y, Inagaki J, Inoue M, Kojima S. Long-term outcome of 100 children with moderate aplastic anemia. 第76回日本血液学会(平成26年10月31日-11月2日)、大阪.
- 6) Hiroki Miura, Yoshiki Kawamura, Kazuko Kudo, Masaru Ihira, Tetsushi Yoshikawa 「The virological analysis of 3 ciHHV-6 in hematopoietic stem cell transplant patient」 第56回日本小児血液・がん学会(平成26年11月28日-30日)、岡山コンベンションセンター
- 7) 石田也寸志、邱冬梅、前田美穂、藤本純一郎、気賀沢寿人、小林良二、佐藤真穂、岡村純、吉永信治、力石健、七野浩之、清谷知賀子、工藤寿子、浅見恵子、堀浩樹、川口浩史、稲田浩子、足立壮一、真部淳、黒田達夫「小児がん診断後の二次がん発症に関する疫学研究-15病院における後ろ向きコホート」第56回日本小児血液・がん学会(平成26年11月28日-30日)、岡山コンベンションセンター
- 8) 天野功二、石垣美千留、桑原和代、鈴木有美、山崎友朗、目黒茂樹、伊藤一之、伊藤理恵子、工藤寿子「小児専門病院の医療スタッフが感じる緩和ケアに関する困難感は緩和ケアチームの活動により軽減されたか」第56回日本小児血液・がん学会(平成26年11月28日-30日)、岡山コンベンションセンター

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

小児 *de novo* AML に対する標準的治療法の確立に関する研究

担当責任者 富澤 大輔 国立成育医療研究センター小児がんセンター血液腫瘍科 医長

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、2014 年 3 月 1 日に試験を開始した。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 EFS 54.2%、3 年 OS 73.1%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小残存病変の意義を検討する多施設共同シームレス第Ⅱ-Ⅲ相臨床試験: AML-12」を計画した。我々は、これまで心毒性を有するアントラサイクリン系抗がん剤の投与量は最小限に

抑えつつ、強化療法を大量シタラビン(Ara-C)療法で強化してきたが、AML-12では、初回寛解導入療法において、Ara-Cの持続静注法とミトキサントロン(MIT)、VP-16を組み合わせた標準的レジメン(ECM)に対して、大量Ara-C療法とMIT、VP-16を組み合わせた試験レジメン(HD-ECM)のランダム化比較試験を実施し、小児AMLに対する初回寛解導入療法における大量Ara-C療法の意義を検証する。ただし、HD-ECMは今回初めて実施するレジメンであることから、同レジメンの安全性を施設限定で検証する第II相試験(安全性検証相)を経てから、第III相試験(有効性検証相)に移行する、「シームレス第II-第III相試験」デザインを採用した。

また、2010年にLancet Oncology誌に報告された米国St. Jude小児研究病院のAML02試験の結果、初回寛解導入療法後のフローサイトメトリー法を用いた微小残存病変(MRD)が、小児AMLにおいて最も強力な予後因子であることが明らかになった。これを受けて、AML-12臨床試験でも、MRD検査システムを整備し、その臨床的意義についても検証することにした。その他、小児AMLにおける予後不良因子であることが明らかになった、*NUP98-NSD1*および*MLL-AF6*について診断時に全例でスクリーニングを行い、陽性例については高リスク群に割付けを行い治療成績の向上を図る。AML-12の主たるエンドポイントは、3年EFSと初回寛解導入療法後のMRD陽性率である。

### C. 研究結果

AML-12臨床試験について、2014年1月6日に日本小児血液・がん学会臨床研究審査委員会の承認を得て、2014年3月1日に試験が開始された。

2015年2月28日現在、試験参加予定119施設のうち111施設においてIRB承認が得られた。現在第II相試験(安全性検証相)が進行中であり、初回寛解導入療法のランダム化比較対象である

第II相限定施設から47症例が登録され(寛解導入療法1A(標準アーム)に24例、寛解導入療法1B(試験アーム)に23例)、その他施設からは12例が登録され、順調に症例集積が進んでいる。限定施設からの症例登録が50例に到達した時点で安全性の評価が行われ、問題がなければ第III相試験に移行する。

なお、2015年2月16日に第1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した。

### D. 考察

AML-12臨床試験は、本邦小児AMLを対象とした初めての第III相ランダム化比較試験であり、AML治療の主要薬剤であるAra-Cの寛解導入療法における使用方法について検討する重要な試験である。更に、本試験では、小児AMLにおける最も重要な予後因子となる可能性の高いフローサイトメトリー法を用いた微小残存病変(MRD)の意義についても検証が行われる。いずれも、小児AMLに対する標準的治療法の確立および更なる治療成績向上に結び付くことが期待される。

### E. 結論

AML-12臨床試験の実施により、小児de novoAMLに対する標準的治療法の確立および治療成績の向上が期待される。

### F. 健康危険情報

AML-12臨床試験にて心原性ショックによる死亡例(13歳男児)があった。本事象の原因は、試験治療薬の1つであるアントラサイクリン系抗がん剤による心筋障害を主体に、腫瘍崩壊症候群に伴う高サイトカイン血症が増悪因子になったものと考えられた。本有害事象はAMLの化学療法中に一定の確率で起こりうる予期されるものと考えるが、重篤な有害事象であり、2015年2月16日に効果安全

性評価委員会に審議を依頼した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kinoshita A, Miyachi H, Matsushita H, Yabe M, Taki T, Watanabe T, Saito AM, Tomizawa D, Taga T, Takahashi H, Matsuo H, Kodama K, Ohki K, Hayashi Y, Tawa A, Horibe K, Adachi S. Acute Myeloid Leukemia with Myelodysplastic Features in Children. A Report of Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Br J Haematol* 2014; 167(1): 80-6
- 2) Matsuo H, Kajihara M, Tomizawa D, Watanabe T, Moriya Saito A, Fujimoto J, Horibe K, Kodama K, Tokumasu M, Itoh H, Nakayama H, Kinoshita A, Taga T, Tawa A, Taki T, Shiba N, Ohki K, Hayashi Y, Yamashita Y, Shimada A, Tanaka S, Adachi S. EVI1 overexpression is a poor prognostic factor in pediatric patients with mixed lineage leukemia-AF9 rearranged acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2014; 99(11): e225-7
- 3) Matsuo H, Kajihara M, Tomizawa D, Watanabe T, Saito AM, Fujimoto J, Horibe K, Kodama K Tokumasu M, Itoh H, Nakayama H, Kinoshita A, Taga T, Tawa A, Taki T, Tanaka S, Adachi S. Prognostic implications of CEBPA mutations in pediatric acute myeloid leukemia: A report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Blood Cancer J* 2014; 4: e226
- 4) Nakayama H, Tabuchi K, Tawa A, Tsukimoto I, Tsuchida M, Morimoto A, Yabe H, Horibe K, Hanada R, Imaizumi M, Hayashi Y, Hamamoto K, Kobayashi R, Kudo K, Shimada A, Miyamura T, Moritake

H, Tomizawa D, Taga T, Adachi S. Outcome of children with relapsed acute myeloid leukemia following initial therapy under the AML99 protocol. *Int J Hematol* 2014; 100(2): 171-9

- 5) Sandahl JD, Coenen EA, Forestier E, Harbott J, Johansson B, Kerndrup G, Adachi S, Auvrignon A, Beverloo HB, Cayuela JM, Chilton L, Fornerod M, de Haas V, Harrison CJ, Inaba H, Kaspers GJ, Liang DC, Locatelli F, Masetti R, Perot C, Raimondi S, Reinhardt K, Tomizawa D, von Neuhoff N, Zecca M, Zwaan CM, van den Heuvel-Eibrink MM, Hasle H. t(6;9)(p22;q34)/DEK-NUP214 rearranged pediatric myeloid leukemia: an international study on 62 patients. *Haematologica* 2014; 99(5): 865-72

2. 学会発表

- 1) Kinoshita A, Miyachi H, Matsushita H, Yabe M, Taki T, Watanabe T, Saito AM, Tomizawa D, Taga T, Takahashi H, Matsuo H, Kodama K, Ohki K, Hayashi Y, Tawa A, Horibe K, Adachi S. The Prognostic Relevance of the 2008 WHO Classification of Myeloid Neoplasms in Childhood Acute Myeloid Leukemia. 19<sup>th</sup> Congress of European Hematology Association, June 12-15, 2014
- 2) Tomizawa D, Watanabe T, Hanada R, Horibe K, Horikoshi Y, Iwamoto S, Kinoshita A, Moritake H, Nakayama H, Shimada A, Taga T, Takahashi H, Tawa A, Terui K, Hori H, Kawano Y, Kikuta A, Manabe A, Adachi S. Outcome of adolescent and young adults with acute myeloid leukemia treated with pediatric protocols: a report from the 3 Japanese cooperative studies. 56th Annual Meeting of

- the American Society of Hematology, San Francisco, USA, December 6-9, 2014.
- 3) Takahashi H, Watanabe T, Kinoshita A, Yuza Y, Moritake H, Terui K, Iwamoto S, Nakayama H, Shimada A, Kudo K, Taki T, Yabe M, Matsushita H, Yamashita Y, Koike K, Ogawa A, Kosaka Y, **Tomizawa D**, Taga T, Saito AM, Horibe K, Nakahata T, Miyachi H, Tawa A, Adachi S. High event-free survival rate with minimum-dose-anthracycline treatment in childhood acute promyelocytic leukemia: a nationwide prospective study by the Japanese Pediatric Leukemia / Lymphoma Study Group (JPLSG). 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Francisco, USA, December 6-9, 2014.
  - 4) Hara Y, Shiba N, Ohki K, Park M-J, Shimada A, **Tomizawa D**, Saito AM, Fujimoto J, Taki T, Kinoshita A, Taga T, Arakawa H, Tawa A, Horibe K, Adachi S, Hayashi Y. Poor prognosis associated with FAB subtypes M4 and M5 in Japanese pediatric acute myeloid leukemia patients with *FLT3*-ITD. 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Francisco, USA, December 6-9, 2014.
  - 5) Yamato G, Shiba N, Yoshida K, Ohki K, Park M-J, Hara Y, **Tomizawa D**, Sotomatsu M, Taga T, Adachi S, Tawa A, Horibe K, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. Clinical features of patients with *ASXL1* and *ASXL2* mutations in pediatric acute myeloid leukemia. 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Francisco, USA, December 6-9, 2014.
  - 6) Taga T, Watanabe T, Kudo K, **Tomizawa D**, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Iwamoto S, Nakayama H, Takahashi H, Shimada A, Taki T, Toki T, Ito E, Goto H, Koh K, Saito AM, Horibe K, Nakahata T, Tawa A, Adachi S. Risk-oriented therapy for myeloid leukemia of Down syndrome: a nationwide prospective study by the Japanese Pediatric Leukemia / Lymphoma Study Group (JPLSG). 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Francisco, USA, December 6-9, 2014.
  - 7) Inaba H, Zhou Y, Ablu O, Adachi S, Auvrignon A, Beverloo HB, de Bont E, Chang T-T, Creutzig U, Dastugue N, Dworzak M, Elitzur S, Fynn A, Forestier E, Hasle H, Liang D-C, Lee V, Locatelli F, Masetti R, De Moerloose B, Reinhardt D, Rodriguez L, Shen S, Taga T, **Tomizawa D**, Yeoh AEJ, Zimmermann M, Raimondi SC. Pediatric acute megakaryoblastic leukemia without Down syndrome: a retrospective study by the International Berlin-Frankfurt-Munster Study Group (I-BFMSG). 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Francisco, USA, December 6-9, 2014.
  - 8) 宮村能子, 田淵健, 富澤大輔, 多賀崇, 長谷川大一郎, 後藤裕明, 沖本由理, 加藤剛二, 井上雅美, 浜本和子, 稲垣二郎, 河敬世, 熱田由子, 工藤寿子. 11q23 転座型小児急性骨髄性白血病に対する造血幹細胞移植治療の検討. 第 36 回日本造血細胞移植学会総会, 2014 年 3 月 8 日, 沖縄
  - 9) 長谷川大一郎, 工藤寿子, 田淵健, 熱田由子, 井上雅美, 澤田明久, 康勝好, 加藤剛二, 稲垣二郎, 石田宏之, 富澤大輔, 足立壮一. 第一寛解期の中間リスク群小児急性骨髄性白血病に対する造血幹細胞移植の意義を検証する臨床決断分析. 第



- 36 回日本造血細胞移植学会総会, 2014 年 3 月 8 日, 沖繩
- 10) Tomizawa D, Tawa A, Taga T, Horikoshi Y, Nakayama H, Kinoshita A, Hanada R, Horibe K, Kikuta A, Kawano Y, Hori H, Manabe A, Adachi S. Outcome of adolescent and young adults with AML: A report from the 3 Japanese cooperative studies. 第 76 回日本血液学会総会, 2014 年 11 月 2 日, 大阪
- 11) Sano H, Ohki K, Park M-J, Shiba N, Hara Y, Sotomatsu M, Tomizawa D, Taga T, Kiyokawa N, Tawa A, Horibe K, Adachi S, Hayashi Y. CSF3R and CALR mutations and cytogenetic findings in pediatric myeloid malignancies. 第 76 回日本血液学会総会, 2014 年 11 月 1 日, 大阪
- 12) Hara Y, Ohki K, Shiba N, Shimada A, Tomizawa D, Taga T, Adachi S, Arakawa H, Tawa A, Hayashi Y. Genetic analyses of patients who did not achieve complete remission after induction therapy. 第 76 回日本血液学会総会, 2014 年 11 月 1 日, 大阪
- 13) Shimada A, Yamashita Y, Tomizawa D, Shiba N, 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 A, Fujimoto J, Horibe K, Hara Y, Oki K, Hayashi Y, Adachi S. Pediatric AML with FLT3-ITD/WT, NUP98-NSD1, NPM1, and WT1 mutations affected the clinical outcome. 第 76 回日本血液学会総会, 2014 年 11 月 1 日, 大阪
- 14) Shiba N, Hara Y, Ohki K, Yamato G, Park M-J, Kobayashi T, Ichikawa H, Tomizawa D, Taki T, Shimada A, Sotomatsu M, Arakawa H, Horibe K, Adachi S, Tawa A, Hayashi Y. The prognostic impact of high EVI1-related genes expression in pediatric acute myeloid leukemia. 第 76 回日本血液学会総会, 2014 年 11 月 2 日, 大阪
- 15) 大和玄季, 柴徳生, 吉田健一, 大木健太郎, 朴明子, 原勇介, 外松学, 富澤大輔, 足立壮一, 多和昭雄, 堀部敬三, 荒川浩一, 小川誠司, 林泰秀. 小児急性骨髄性白血病における ASXL1, ASXL2 遺伝子変異と臨床像. 第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2014 年 11 月 29 日, 岡山
- 16) 大木健太郎, 朴明子, 原勇介, 柴徳生, 外松学, 富澤大輔, 多賀崇, 齋藤明子, 藤本純一郎, 多和昭雄, 堀部敬三, 足立壮一, 林泰秀. 小児 AML における IKZF1 欠失の頻度と予後解析: JPLSG AML-05. 第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2014 年 11 月 29 日, 岡山
- 17) 原勇介, 大木健太郎, 柴徳生, 朴明子, 富澤大輔, 多賀崇, 足立壮一, 多和昭雄, 林泰秀. 小児急性骨髄性白血病における寛解導入療法非寛解例の遺伝子解析による予後不良因子の同定. 第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2014 年 11 月 29 日, 岡山
- 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

小児 AML に対するフローサイトメトリー法を用いた微小残存病変（MRD）測定法の確立に関する研究

担当責任者 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 私どもは、小児急性骨髄性白血病(AML)患者の治療反応性を、免疫学的手法（多次元フローサイトメトリー(FCM)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）を検出する検査方法を開発した。本研究では、FCM法によるMRD検出方法を、本邦での小児AML臨床試験に応用することを目指す。具体的には、本邦で実施されている全国規模の臨床試験（AML-12及びAML-D11）に登録された小児AMLを対象に、診断時検体でMRD追跡可能な抗体の組み合わせを症例毎にセットし、臨床試験計画書に従った治療効果判定時に骨髄検体でのMRDを解析することで、予後との相関を検証する。

#### A. 研究目的

本研究では、私どもが開発してきた免疫学的手法（多次元フローサイトメトリー（FCM）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（0.1%）の微小残存白血病細胞（MRD）を同定する検査方法を、小児急性骨髄性白血病(AML)の臨床試験に応用し、予後との相関を検証する。

#### B. 研究方法

MRD測定は、ベクトン・デッキンソン会社の測定機器及び解析ソフトを用い、FCM法で行う。具体的には、8種類の標識が異なる抗体セットを駆使し、診断時検体を用いて白血病細胞を正常細胞と区別できる抗体の組み合わせを症例ごとに決定した後、治療効果判定毎に追跡検査する。本研究では、JPLSG臨床試験（AML-12、AML-D11）において、上記方法で検出されたMRD結果と予後との相関を前方視的に検討する。

（倫理面への配慮）

JPLSG倫理委員会が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った。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。

#### C. 研究結果

AML-D11は平成27年2月28日をもって登録は終了した。予定症例数(75症例)を上回る80症例以上の登録を得、現在計画通りに検体を処理・解析中である。AML-12に関しては、平成27年2月28日現在、既に59症例の登録を得、その内、同臨床試験計画書に従い本FCM法でのMRD追跡対象症例となったのは47症例であった。現在、それら診断時検体及び治療経過検体の処理・解析を実施している。

また、いずれの臨床試験においても、診断後、本FCM法で追跡可能と判断できた症例は登録例の95%以上と良好であった。但し、予後との相関を評価するには最低2年間を必要とする。

#### D. 考察

世界的にもAMLの治療効果判定として広く用いられつつある多次元FCM法によるMRD同定システムを本邦でも立ち上げ、臨床試験に組み込み、検討が開始された。多くの症例で、MRD追跡可能な抗体セットを決定できたが、

予後との相関を得る必要がある。

#### E. 結論

本検出法が、本邦小児 AML の新規予後因子と成り得るかの判定には今しばらく時間を要する。しかし、そのような結果が得られれば新たな治療介入臨床試験を組み立て、小児 AML の治療成績の向上、不必要な治療の削減・晩期障がいへの軽減につながることを期待される。そのためには、本検出法の検出感度の向上、追跡可能な症例数の増加、費用削減を図り、継続可能な検査として普及することも重要な課題である。

#### F. 健康危険情報 該当せず

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表 なし

##### 2. 学会発表

- 1) Tomizawa D, Watanabe T, Hanada R, Horibe K, Horikoshi Y, Iwamoto S, Kinoshita A, Moritake H, Nakayama H, Shimada A, Taga T, Takahashi H, Tawa A, Terui K, Hori H, Kawano Y, Kikuta A, Manabe A, Adachi S. Outcome of adolescent and young adults with acute myeloid leukemia treated with pediatric protocols: a report from the 3 Japanese cooperative studies. 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Francisco, USA, December 6-9, 2014.
- 2) Takahashi H, Watanabe T, Kinoshita A, Yuza Y, Moritake H, Terui K, Iwamoto S, Nakayama H, Shimada A, Kudo K, Taki T, Yabe M, Matsushita H, Yamashita Y, Koike K, Ogawa A, Kosaka Y, Tomizawa D, Taga T, Saito AM, Horibe K, Nakahata T, Miyachi H, Tawa A, Adachi S. High event-free survival rate with minimum-dose-anthracycline treatment in childhood acute promyelocytic leukemia: a nationwide prospective study by the Japanese Pediatric Leukemia / Lymphoma Study Group (JPLSG). 56th Annual

Meeting of the American Society of Hematology, San Francisco, USA, December 6-9, 2014.

- 3) Taga T, Watanabe T, Kudo K, Tomizawa D, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Iwamoto S, Nakayama H, Takahashi H, Shimada A, Taki T, Toki T, Ito E, Goto H, Koh K, Saito AM, Horibe K, Nakahata T, Tawa A, Adachi S. Risk-oriented therapy for myeloid leukemia of Down syndrome: a nationwide prospective study by the Japanese Pediatric Leukemia / Lymphoma Study Group (JPLSG). 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Francisco, USA, December 6-9, 2014.
  - 4) Iwamoto S, Iwasa T, Kihira K, Amano K, Toyoda H, Deguchi T, Hirayama M, Azuma E, Hori H, Hori H, Komada Y. Clinical outcome of newly diagnosed pediatric acute myeloid leukemia: Single institute experience. 第76回日本血液学会総会, 2014年11月1日, 大阪
  - 5) Shimada A, Yamashita Y, Tomizawa D, Shiba N, 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 A, Fujimoto J, Horibe K, Hara Y, Oki K, Hayashi Y, Adachi S. Pediatric AML with FLT3-ITD/WT, NUP98-NSD1, NPM1, and WT1 mutations affected the clinical outcome. 第76回日本血液学会総会, 2014年11月1日, 大阪
- #### 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

小児 AML、CML に対する中央診断法の確立に関する研究

担当責任者 平松 英文 京都大学大学院医学研究科発達小児科学 講師

研究要旨

小児急性骨髄性白血病 (AML) 患者を対象として、フローサイトメトリー (FCM) 法を用いて、微小残存白血病細胞 (MRD) を検出する検査システムを立ち上げた。ほとんどの症例で MRD が追跡可能であり、今後、FCM 法による MRD 検出を小児 AML 臨床試験に応用することが期待される。また、チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) が有効な慢性骨髄性白血病 (CML) の小児患者において、難治症例で TKI 耐性の Abl 遺伝子異常を検出する検査システムを立ち上げた。8 例の難治 CML の小児例のうち 2 例で従来の TKI に対する耐性変異を有していることを見いだした。今後 AML, CML に対するこれら中央診断法を確立し、治療成績の改善に繋がるか検討を加えていく予定である。

A. 研究目的

小児白血病の診断は従来より各施設で行われていたが、質の高い臨床研究を行うためには中央診断システムを構築し、精度の高い診断を行う必要がある。我々は *De novo* AML, ML-DS を対象にフローサイトメトリー法を用いた MRD 測定と、CML 難治症例患者を対象にチロシンキナーゼ (TKI) 変異解析を行い、小児骨髄系腫瘍臨床試験の中央診断システムの確立に貢献することを目的とする。

B. 研究方法

MRD 測定は、8 種類の標識が異なる抗体セットを使用しベクトン・デッキンソン社の測定機器及び解析ソフトを用い、フローサイトメトリー法で行う。診断時の白血病細胞の表面抗原の発現パターンから症例ごとに白血病細胞を追跡しうる抗体の組み合わせを決定した後、治療効果判定のタイミング毎に追跡検査する。本研究では、JPLSG 臨床試験 (AML-12、AML-D11) において、上記方法で検出された MRD 結果と予後との相関を前方視的に検討す

る。TKI 変異解析に関しては CML08 登録症例のうち難治症例を対象として ARKRAY 社の i-densy を用い、グアニン消光性プローブ (Quenching Probe) 法にて M244V, G250E, Q252H, Y253F, Y253H, E255K, E255V, V299L, T315A, T315I, F317L, M351T, E355G, F359V, F359C, H396R の 16 種の既知の Abl キナーゼドメインの変異につき検討した。

(倫理面への配慮)

JPLSG 倫理委員会が提唱するガイドラインに沿って、本院の倫理委員会で承認された臨床試験として行った。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。

C. 研究結果

AML-D11 に関しては平成 27 年 2 月 28 日をもって登録は終了した。三重大学と共同して、予定症例数 (75 症例) を上回る計 80 症例以上の登録を得、現在計画通りに検体を処理・解析中である。AML-12 に関しては、第 III 相試験からの参加に向