

The patient in this study was exposed to pirarubicin for treatment of non-Hodgkin's lymphoma, which is associated with inactivation of topoisomerase II (TOPOII) and induction of DNA repair (Aplan et al., 1996). Analysis of the sequence around the genomic junction of *KAT6A-LEUTX* shows suggestive association with the TOPOII

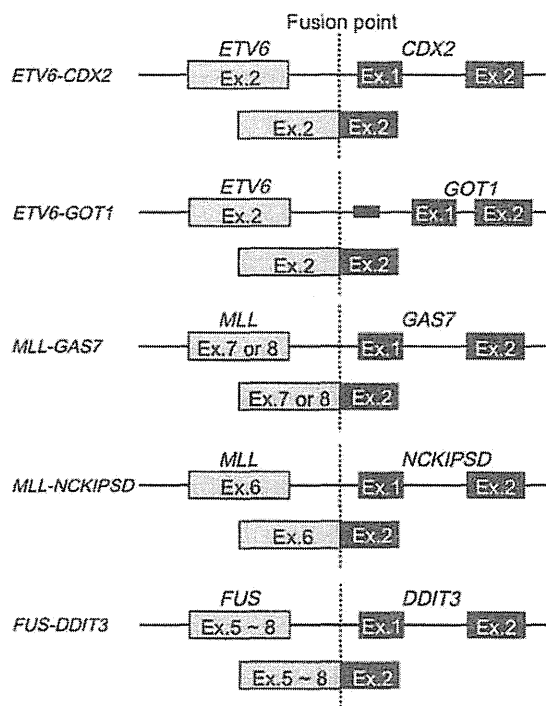


Figure 8. Schematic representation of several fusion transcripts with similar structures of the genomic junctions as in *KAT6A-LEUTX*. All five fusion genes have the genomic breakpoint 5' upstream of first exons of 3' side of fusion partners. Solid small box in *ETV6-GOT1*, a genomic region which created a fusion transcript with *ETV6* concurrently with *ETV6-GOT1* (Janssen et al., 2006).

cleavage site (Fig. 7) (Spitzner and Muller, 1988). Furthermore, the breakpoint was located upstream of exon 1, though RT-PCR showed that exon 16 of *KAT6A* fused to exon 2 of *LEUTX* instead of exon 1. *KAT6A-LEUTX* fusion transcript containing the first exon of *LEUTX* could not be amplified in this case. Similar findings have been described, for example, the *ETV6-CDX2* fusion [t(12;13)(p13;q12)] in AML (Chase et al., 1999), *ETV6-GOT1* [t(10;12)(q24;p13)] in myelodysplastic syndrome (MDS) (Janssen et al., 2006), *MLL-GAS7* [t(11;17)(q23;p13)] in acute leukemia (Mcgonigal et al., 2000), *MLL-NCKIPSD* [t(3;11)(p21;q23)] in therapy-related AML (Sano et al., 2000), and *FUS-DDIT3* [t(12;16)(q13;p11)] in myxoid and round-cell liposarcoma (Kanoc et al., 1999) (Fig. 8). The 5' side of the first exons are not flanked by splice recognition site; thus, the first exons in the 3' side of genes would not be recognized as an exon in the mature fusion mRNA. Interestingly, in a case of MDS with t(10;12)(q24;p13)/*ETV6-GOT1*, a genomic region, which was located between the breakpoint at 10q24 and *GOT1*, created a fusion transcript with *ETV6* concurrently (Janssen et al., 2006).

Based on FAB classification, the subtype was defined as myelomonocytic in the present patient. *KAT6A*-related leukemias, except for those having *ASXL2* as a partner, are associated with the M4/M5, often therapy-related and with hemophagocytosis. In other AML cases with 8p11 translocations, including t(6;8)(q27;p11) (Brizard et al., 1988), t(3;8;17)(q27;p11;q12) (Bertheas et al., 1989), and t(8;14)(p11;q11.1) (Slovak et al., 1991), where the genes involved in these translocations have not been identified, the morphological phenotypes are highly similar to leukemias with *KAT6A* translocations (Table 2). Our case displayed an M4

TABLE 2. Summary of *KAT6A*-Related Hematologic Malignancies

Chromosome abnormality	Fusion partner	Phenotype	Clinical characteristics	Reference
t(8;16)(p11;p13)	<i>CREBBP</i>	AML-M4, M5	Therapy-related Hemophagocytosis	Borrow et al. (1996)
inv(8)(p11;q13)	<i>NCOA2</i>	AML-M4, M5	Therapy-related Hemophagocytosis	Liang et al. (1998)
t(8;20)(p11;q13)	<i>NCOA3</i>	AML-M5	No hemophagocytosis	Esteyries et al. (2008)
t(8;22)(p11;q13)	<i>EP300</i>	AML-M4, M5	Therapy-related Hemophagocytosis	Chaffanet et al. (2000)
t(2;8)(p23;p11)	<i>ASXL2</i>	MDS	Therapy-related	Imamura et al. (2003)
t(8;19)(p11;q13)	<i>LEUTX</i>	AML-M4, M5	Therapy-related Hemophagocytosis	Present case Brizard et al. (1988) Stark et al. (1995); Gervais et al. (2008)
t(6;8)(q27;p11)	Unknown	AML-M5	Hemophagocytosis	Brizard et al. (1988)
t(3;8;17)(q27;p11;q12)	Unknown	AML-M5	Hemophagocytosis	Bertheas et al. (1989)
t(8;14)(p11;q11.1)	Unknown	AML-M5	Hemophagocytosis	Slovak et al. (1991)

phenotype, hemophagocytosis, and DIC, and other AML cases with t(8;19) also tend to have the M4/M5 phenotypes, hemophagocytosis, and DIC. Thus, the present case with t(8;19) is similar to other AML cases with *KAT6A* rearrangements.

In conclusion, *LEUTX* was identified as a *KAT6A* fusion partner. Molecular characterization of the *KAT6A-LEUTX* gene suggests that *LEUTX* may play a different role in leukemogenesis than other *KAT6A* partners previously identified.

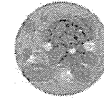
#### ACKNOWLEDGMENTS

Authors wish to express their appreciation for the outstanding technical assistance of Minako Goto and Kayoko Kurita.

#### REFERENCES

- Aguilar RC, Chase A, Coulthard S, Macdonald DH, Carapeti M, Reiter A, Sobal J, Lennard A, Goldman JM, Cross NC. 1997. Abnormalities of chromosome band 8p11 in leukemia: two clinical syndromes can be distinguished on the basis of MOZ involvement. *Blood* 90:3130–3135.
- Aplan PD, Chervinsky DS, Stanulla M, Burbans WC. 1996. Site-specific DNA cleavage within the MLL breakpoint cluster region induced by topoisomerase II inhibitors. *Blood* 87:2649–2658.
- Bertheas MF, Jaubert J, Vasselon C, Reynaud J, Pomier G, Le Petit JC, Hagemeijer A, Brizard CP. 1989. A complex t(3;8;17) involving breakpoint 8p11 in a case of M5 acute nonlymphocytic leukemia with erythrophagocytosis. *Cancer Genet Cytogenet* 42:67–73.
- Borrow J, Stanton VP, Jr, Andresen JM, Becher R, Behm FG, Chaganti RS, Civin CI, Distchech C, Dubé I, Frischauf AM, Horsman D, Mittleman F, Volinia S, Warmore AE, Housman DE. 1996. The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein. *Nat Genet* 14:53–41.
- Brizard A, Guilhot F, Hutet JL, Benz-Lemoine E, Tanzer J. 1988. The 8p11 anomaly in "monoblastic" leukaemia. *Leuk Res* 12: 693–697.
- Chaffanet M, Gressin L, Preudhomme C, Soenen-Cornu V, Birnbaum D, Pébusque MJ. 2000. MOZ is fused to p300 in an acute monocytic leukemia with t(8;22). *Genes Chromosomes Cancer* 28:138–144.
- Chase A, Reiter A, Burci L, Cazzaniga G, Biondi A, Piekard J, Roberts IA, Goldman JM, Cross NC. 1999. Fusion of ETV6 to the caudal-related homeobox gene CDX2 in acute myeloid leukemia with the t(12;13)(p13;q12). *Blood* 93:1025–1031.
- Chinen Y, Taki T, Nishida K, Shimizu D, Okuda T, Yoshida N, Kobayashi C, Koike K, Tsuchida M, Hayashi Y, Taniwaki M. 2008. Identification of the novel AML1 fusion partner gene, LAF4, a fusion partner of MLL, in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia with t(2;21)(q11;q22) by bubble PCR method for cDNA. *Oncogene* 27:2249–2256.
- Collins HM, Kindle KB, Matsuda S, Ryan G, Troke PJ, Kalkhoven E, Heery DM. 2006. MOZ-TIF2 alters cofactor recruitment and histone modification at the RARbeta2 promoter: differential effects of MOZ fusion proteins on CBP- and MOZ-dependent activators. *J Biol Chem* 281:17124–17133.
- Estevies S, Perot C, Adelaide J, Imbert M, Lagarde A, Pautas C, Olschwang S, Birnbaum D, Chaffanet M, Mozziconacci MJ. 2008. NCOA3, a new fusion partner for MOZ/MYST3 in M5 acute myeloid leukemia. *Leukemia* 22:663–665.
- Gervais C, Murati A, Helias C, Struski S, Eischen A, Lippert E, Tignaut I, Penhler D, Bastard C, Mugneret F, Poppe B, Speleman F, Falmaor P, VanDen Akker J, Baranger L, Barin C, Luquet I, Nadal N, Nguyen-Khac F, Maarek O, Herens C, Sainy D, Flandrin G, Birnbaum D, Mozziconacci MJ, Lessard M, Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique. 2008. Acute myeloid leukaemia with 8p11 (MYST3) rearrangement: an integrated cytologic, cytogenetic and molecular study by the groupe francophone de cytogénétique hématologique. *Leukemia* 22:1567–1575.
- Heathcote K, Braybrook C, Abushaban L, Guy M, Khetyar ME, Patton MA, Carter ND, Scambler PJ, Syrris P. 2005. Common arterial trunk associated with a homeodomain mutation of NKX2.6. *Hum Mol Genet* 14:585–593.
- Holland PW, Booth HA, Bruford EA. 2007. Classification and nomenclature of all human homeobox genes. *BMC Biol* 5:47.
- Huntly BJ, Shigematsu H, Deguchi K, Lee BH, Mizuno S, Duclos N, Rowan R, Amaral S, Curley D, Williams IR, Akashi K, Gilliland DG. 2004. MOZ-TIF2, but not BCR-ABL, confers properties of leukemic stem cells to committed murine hematopoietic progenitors. *Cancer Cell* 6:587–596.
- Imamura T, Kakazu N, Hibi S, Morimoto A, Fukushima Y, Tjuin I, Hada S, Kitabayashi I, Abe T, Imashuku S. 2003. Rearrangement of the MOZ gene in pediatric therapy-related myelodysplastic syndrome with a novel chromosomal translocation t(2;8)(p23;p11). *Genes Chromosomes Cancer* 36:413–419.
- Janssen H, Wlodarska J, Mecucci C, Hagemeijer A, Vandenberghe P, Marynen P, Coombs J. 2006. Fusion of ETV6 to GOT1 in a case with myelodysplastic syndrome and t(10;12)(q24;p13). *Haematologica* 91:949–951.
- Kanoe H, Nakayama T, Hosaka T, Murakami H, Yamamoto H, Nakashima Y, Tsuboyama T, Nakamura T, Ron D, Sasaki MS, Tuguchida J. 1999. Characteristics of genomic breakpoints in TLS-CHOP translocations in liposarcomas suggest the involvement of Translin and topoisomerase II in the process of translocation. *Oncogene* 18:721–729.
- Katoh M, Katoh M. 2004. Identification and characterization of ASXL3 gene in silico. *Int J Oncol* 24:1617–1622.
- Katsumoto T, Aikawa Y, Iwama A, Ueda S, Ichikawa H, Ochiya T, Kitabayashi I. 2006. MOZ is essential for maintenance of hematopoietic stem cells. *Genes Dev* 20:1321–1330.
- Kuznetsov VA, Knott GD, Bonner RF. 2002. General statistics of stochastic process of gene expression in eukaryotic cells. *Genetics* 161:1321–1332.
- Lee SW, Cho YS, Na JM, Park UH, Kang M, Kim EJ, Um SJ. 2010. ASXL1 represses retinoic acid receptor-mediated transcription through associating with HP1 and LSD1. *J Biol Chem* 285:18–29.
- Liang J, Prouty L, Williams BJ, Dayton MA, Blanchard KL. 1998. Acute mixed lineage leukemia with an inv(8)(p11q13) resulting in fusion of the genes for MOZ and TIF2. *Blood* 92:2118–2122.
- Megonigal MD, Cheung NK, Rappaport EF, Nowell PC, Wilson RB, Jones DH, Addya K, Leonard DG, Kushner BH, Williams TM, Lange BJ, Felix CA. 2000. Detection of leukemia-associated MLL-GAS7 translocation early during chemotherapy with DNA topoisomerase II inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:2814–2819.
- Paggetti J, Largeot A, Aneagne R, Jacquet A, Lagrange B, Yang XJ, Solary E, Bastie JN, Delva L. 2010. Crosstalk between leukemia-associated proteins MOZ and MLL regulates HOX gene expression in human cord blood CD34+ cells. *Oncogene* 29:5019–5031.
- Patnaik MM, Gangat N, Knudson RA, Keefe JG, Hanson CA, Pardanani A, Ketterling RP, Tefferi A. 2010. Chromosome 8p11.2 translocations: Prevalence, FISH analysis for FGFR1 and MYST3, and clinicopathologic correlates in a consecutive cohort of 13 cases from a single institution. *Am J Hematol* 85: 238–242.
- Sano K, Hayakawa A, Piao JH, Kosaka Y, Nakamura H. 2000. Novel SH3 protein encoded by the AF3p21 gene is fused to the mixed lineage leukemia protein in a therapy-related leukemia with t(3;11)(p21;q23). *Blood* 95:1066–1068.
- Slovak ML, Nemans L, Traweck ST, Stroh JA. 1991. Acute monoblastic leukemia (FAB-M5b) with t(8;14)(p11;q11). *Cancer Genet Cytogenet* 56:237–242.
- Smith DR. 1992. Ligation-mediated PCR of restriction fragments from large DNA molecules. *PCR Methods Appl* 2:21–27.
- Spitzner JR, Muller MT. 1988. A consensus sequence for cleavage by vertebrate DNA topoisomerase II. *Nucleic Acids Res* 16: 5533–5556.
- Stark B, Resnitzky P, Jeison M, Luria D, Blau O, Avigad S, Shafit D, Kodman Y, Gobuzov R, Ash S, Stein J, Yaniv I, Barak Y, Zaïvov R. 1995. A distinct subtype of M4/M5 acute myeloblastic leukemia (AML) associated with t(8;19)(p11;q13), in a patient with the variant t(8;19)(p11;q13)-case report and review of the literature. *Leuk Res* 19:367–379.

- Taniwaki M, Matsuda F, Jauch A, Nishida K, Takashima T, Tagawa S, Sugiyama H, Misawa S, Abe T, Kashima K. 1994. Detection of 14q32 translocations in B-cell malignancies by in situ hybridization with yeast artificial chromosome clones containing the human IgH gene locus. *Blood* 83:2962-2969.
- Thomas T, Corcoran LM, Gugasyan R, Dixon MP, Brodnicki T, Nutt SL, Metcalf D, Voss AK. 2006. Monocytic leukemia zinc finger protein is essential for the development of long term reconstituting hematopoietic stem cells. *Genes Dev* 20:1175-1186.
- Wang J, Hevi S, Kurash JK, Lei H, Gay F, Bajko J, Su H, Sun W, Chang H, Xu G, Gaudet F, Li E, Chen T. 2009. The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. *Nat Genet* 41:125-129.
- Yanagi Y, Masuhiro Y, Mori M, Yanagisawa J, Kato S. 2000. p300/CBP acts as a coactivator of the cone-rod homeobox transcription factor. *Biochem Biophys Res Commun* 269:410-414.
- Zhang JG, Goldman JM, Cross NC. 1995. Characterization of genomic BCR-ABL breakpoints in chronic myeloid leukaemia by PCR. *Br J Haematol* 90:138-146.
- Zhong YF, Holland PW. 2011. The dynamics of vertebrate homeobox gene evolution: gain and loss of genes in mouse and human lineages. *BMC Evol Biol* 11:169.



LETTER TO THE EDITOR

Open Access

# 8q24 amplified segments involve novel fusion genes between *NSMCE2* and long noncoding RNAs in acute myelogenous leukemia

Yoshiaki Chinen<sup>1†</sup>, Natsumi Sakamoto<sup>1†</sup>, Hisao Nagoshi<sup>1</sup>, Tomohiko Taki<sup>2</sup>, Saori Maegawa<sup>1</sup>, Shotaro Tatekawa<sup>1</sup>, Taku Tsukamoto<sup>1</sup>, Shinsuke Mizutani<sup>1</sup>, Yuji Shimura<sup>1</sup>, Mio Yamamoto-Sugitani<sup>1</sup>, Tsutomu Kobayashi<sup>1</sup>, Yosuke Matsumoto<sup>1</sup>, Shigeo Horiike<sup>1</sup>, Junya Kuroda<sup>1\*</sup> and Masafumi Taniwaki<sup>1</sup>

## Abstract

The pathogenetic roles of 8q24 amplified segments in leukemic cells with double minute chromosomes remain to be verified. Through comprehensive molecular analyses of 8q24 amplicons in leukemic cells from an acute myelogenous leukemia (AML) patient and AML-derived cell line HL60 cells, we identified two novel fusion genes between *NSMCE2* and long noncoding RNAs (lncRNAs), namely, *PVT1-NSMCE2* and *BF104016-NSMCE2*. Our study suggests that 8q24 amplicons are associated with the emergence of aberrant chimeric genes between *NSMCE2* and oncogenic lncRNAs, and also implicate that the chimeric genes involving lncRNAs potentially possess as-yet-unknown oncogenic functional roles.

**Keywords:** Acute myeloid leukemia (AML), Long noncoding RNAs (lncRNAs), *PVT1*, *NSMCE2*, *CCDC26*

## To the Editor,

To gain insight into the role(s) of double minute chromosomes (dmns) in leukemia, we cytogenetically/molecularly analyzed 8q24 amplicons in patient-derived leukemic cells and AML-derived cell line (HL60) (See Additional file 1 for supplementary materials and methods). The patient was a 71-year-old female with AML (M2). The G-banding karyotype of leukemic cells was 47, XX, +mar [2]/48, XX, idem, +mar [6]/46, XX [7], containing two marker chromosomes (mars) from chromosome 8 (Figure 1a and b). DNA copy number analysis (CNA) revealed 13 high-level amplicons on 8q22.1-q24.2 (98.43 Mb-134.16 Mb) (Additional file 2: Table S1). SKY analysis of HL60 cells containing the 8q24 amplicons revealed that the representative karyotype was 44, X, der(5)t(5;17)(q11.2;q11.2), t(7;16;9)(q34;q24;p21), t(9;14)(q22;q22), +13, -15, -17, der(21)t(15;21)(q22;q21) [1]. CNA revealed several amplicons on 8q24.13-q24.12 (126.25 Mb-130.75 Mb) in the HL60 cells (Figure 2a and b).

Consequently, three common amplicons were identified between 8q24.13-21 in the patient and the HL60 cells; i.e., the regions covering *NSMCE2* (8q24.13), *PVT1* (8q24.21) and *CCDC26* (8q24.21) (Figures 1c and 2b). Further investigation revealed three fusion transcripts between *PVT1* exon 1a and *NSMCE2* exon 3 in the patient (Figure 1d and e), and a fusion gene between exon 6 of *NSMCE2* and exon 1 of *BF104016*, a noncoding RNA sharing the sequence of *CCDC26* exon 4 (Additional file 3: Figure S1) (Additional file 4: Table S2), in the HL60 cells (Figure 2c-e). Both the *NSMCE2* and *PVT1* genes were amplified and located in a micronucleus in the patient (Figure 1f-i), and the genomic junction of 5'-*PVT1-NSMCE2*-3' was located within intron 1 of *PVT1* and at 5' upstream of exon 1 of *NSMCE2* (Figure 1j and k) (Additional file 5: Figure S3). In the HL60 cells, amplification of 3'*NSMCE2* and 5'*CCDC26* was colocalized on der(13)hsr(8), ins(2;8) and dmns (Figure 2e-h) (Additional file 5: Figure S3). Aberrant *NSMCE2* transcripts were higher than normal *NSMCE2* transcripts in the patient and the HL60 cells, while *NSMCE2* protein expression did not correlate with normal or abnormal *NSMCE2* transcripts among the leukemic patient cells or the HL60 cells, suggesting the presence of regulatory mechanisms other than transcription (Additional file 6: Figure S2).

\* Correspondence: junkuro@koto.kpu-m.ac.jp

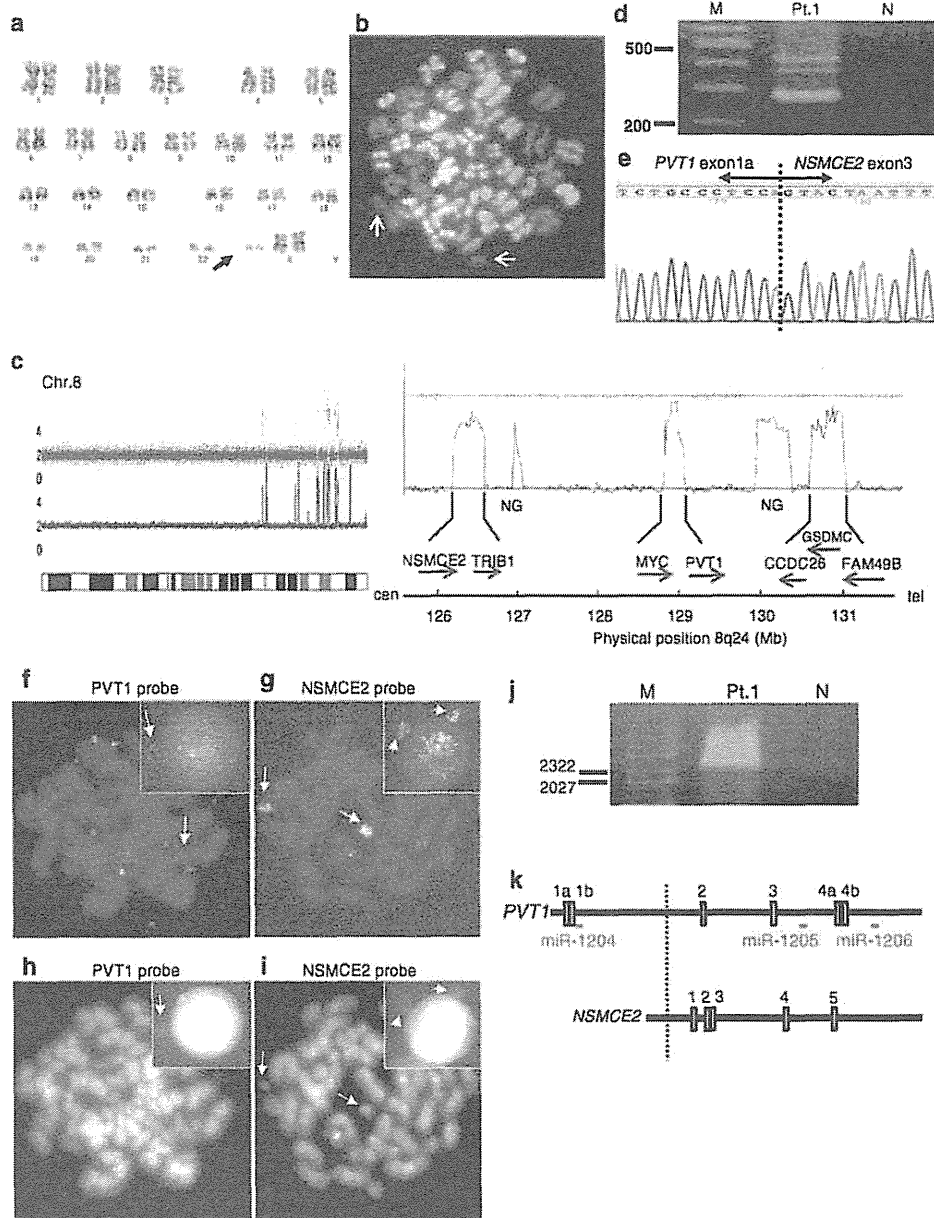
†Equal contributors

<sup>1</sup>Division of Hematology and Oncology, Department of Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine, Graduate School of Medical Science, 465 Kajji-choKamigyo-ku, Kyoto 602-8566, Japan

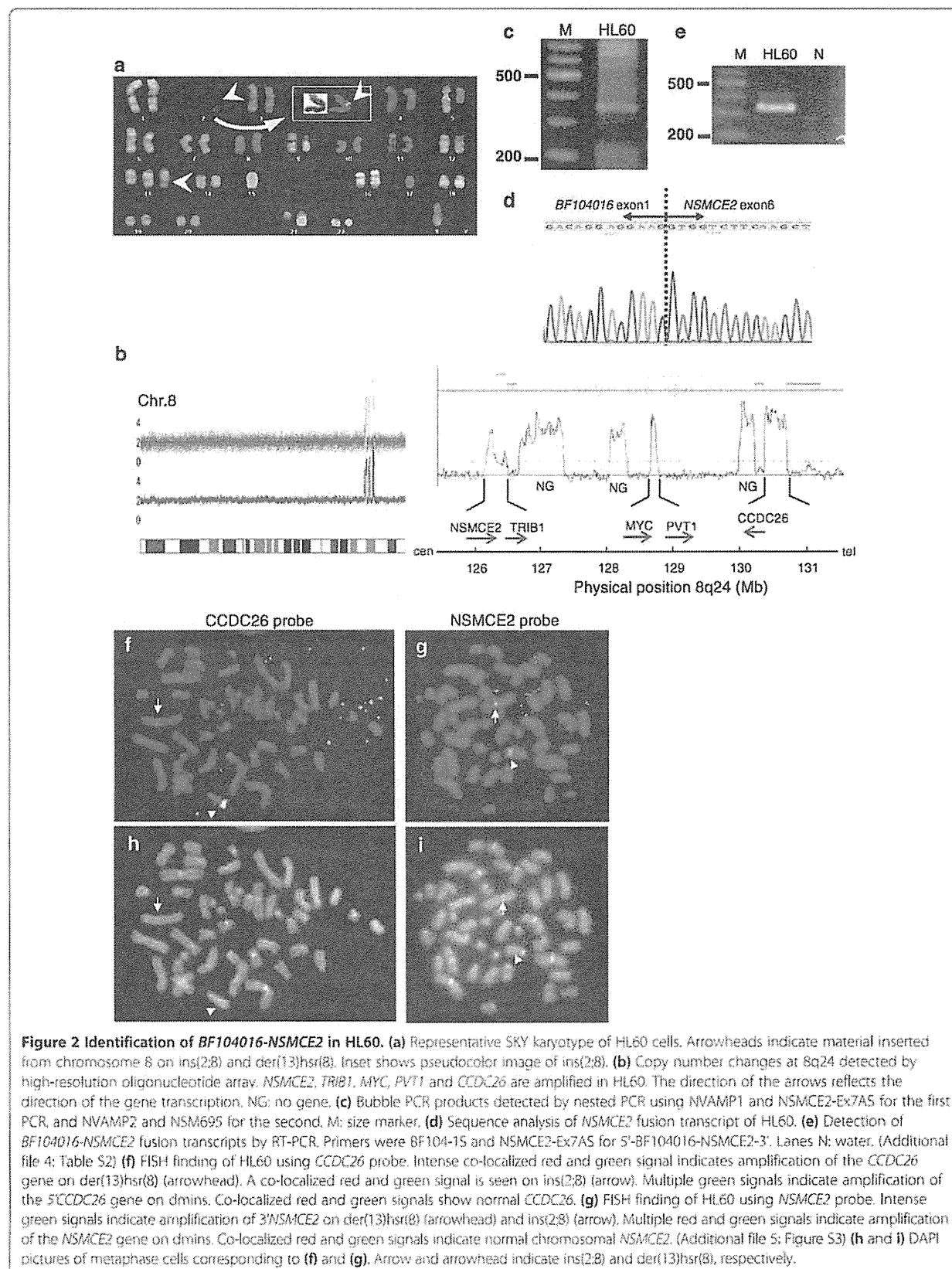
Full list of author information is available at the end of the article



© 2014 Chinen et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



**Figure 1 Identification of *PVT1-NSMCE2* in the leukemic patient cells.** (a) G-banding analysis. Arrow indicates two marker chromosomes (mars). (b) SKY analysis for the patient identified two mars derived from chromosome 8 (arrows). (c) Copy number changes at 8q24 detected by high-resolution oligonucleotide array. *NSMCE2*, *TRIB1*, *MYC*, *PVT1*, *CCDC26*, *GSDMC*, and *FAM49B* are amplified. The direction of the arrows reflects the direction of gene transcription. NG: no gene. (d) Detection of three *PVT1-NSMCE2* fusion transcripts by RT-PCR. Primers were P1S and *NSMCE2*-Ex4AS for 5'-*PVT1-NSMCE2*-3'. Lane Pt.1: leukemic cells from the patient; lane N: water; lane M: size marker. (e) Sequence analysis of *NSMCE2* fusion transcript in the patient. (f) FISH finding of the patient using *PVT1* probe. Multiple red signals indicate extrachromosomal amplification of 5'*PVT1* on dmms. Co-localized red and green signals indicate normal *PVT1*. Inset shows 5'*PVT1* amplification in a micronucleus equivalent of mar (arrow). (Additional file 5: Figure S3) (g) FISH finding from the patient using an *NSMCE2* probe. Intense yellow signals indicate amplification of *NSMCE2* on mars and co-localized red and green signals signify normal *NSMCE2* on chromosome 8. Inset shows *NSMCE2* amplification in a micronucleus equivalent of mar (arrow). (h and i) DAPI pictures of metaphase cells corresponding to (f) and (g). Arrows indicate mars. In metaphase, *NSMCE2* amplification was detectable on mars. 5'*PVT1* amplification were observed on dmms, however, *PVT1* FISH probe sets could not identify mars because of the background dmms (f and h). (j) Results of LDI-PCR. Primers were NSM38374 and NSM38666 for 5'-*PVT1-NSMCE2*-3'. Lane Pt.1: leukemic cells from the patient; lane N: water; lane M: size marker. (Additional file 4: Table S2) (k) Genomic mapping of *PVT1* and *NSMCE2* and breakpoint. White vertical boxes represent exons; dotted line represents breakpoint of *PVT1* and *NSMCE2* in the patient detected by LDI-PCR. Horizontal line indicates the location of miRNAs.



The present findings are consistent with previous studies demonstrating that segmental genome amplification of 8q24 contains recurrent *PVT1* fusion genes, which might be generated by chromothripsis [2,3]. Both lncRNAs, *PVT1* and *CCDC26*, harbor retroviral integration sites and are transcribed into multiple splice forms [4-6]. *PVT1* overexpression is induced by *MYC* or *p53*, contributing to suppression of apoptosis [7-9], whereas *PVT1* produces six annotated microRNAs that have been implicated in oncogenesis [3,10,11]. The chimeric transcripts involving *PVT1* may also regulate the expression of as-yet unspecified target genes through "enhancer-like functions" [12]. *CCDC26* amplification has been also identified as a recurrent abnormality that is associated with the response to retinoic acid-induced differentiation in AML [1,11,13-16]. This study is the first to identify *NSMCE2*-associated fusion genes in AML [17-19]. Knockdown of *NSMCE2* induces chromosomal instability and increases the frequency of chromosomal breakage and loss [20]. We speculate that *NSMCE2* gene rearrangement may potentially influence its function. Collectively, our study identified novel *PVT1-NSMCE2* and *CCDC26-NSMCE2* fusion genes that may play functional roles in leukemia.

## Additional files

### Additional file 1: Supplementary material information.

**Additional file 2: Table S1.** CNAG analysis of the region between the *MTDH* and *LRR6* genes on 8q24 in patient 1 with marker chromosomes. Results show the genomic size of the eight amplified segments that were selected based on the existence of known genes within them and their approximate positions.

**Additional file 3: Figure S1.** Association between *CCDC26* and *BF104016* at 8q24.21. The scale indicates the region 8q24.21. White boxes and grey boxes indicate exons of *CCDC26* and *BF104016* on the genetic locus at 8q24.21, respectively. Vertical black lines indicate exons on the *CCDC26* isoform. According to the NCBI database, isoform 1 (BC070152.1) consists of four (1-2-3-4) exons, and isoform 2 (BC026098.1) consists of three (1a-3-4) exons. *BF104016* consists of 2 exons. The sequence of *BF104016* exon 2 is partly consistent with that of *CCDC26* exon 4. ORF: hypothetical open reading frame.

**Additional file 4: Table S2.** Sequences of the primers used in this study.

**Additional file 5: Figure S3.** Identification of breakpoints region at 8q24 by FISH. Upper panel: location of FISH probes shown as color bars and position of *NSMCE2*, *TRIB1*, *MYC*, and *PVT1* genes at 8q24. Vertical black lines indicate exons of *NSMCE2*, *PVT1*, and *BF104016*. Lower panel: mapping of breakpoint in leukemic cells of patient 1 and HL60. Gray boxes indicate amplified regions detected.

**Additional file 6: Figure S2.** Expression of *NSMCE2* in patient 1 and AML-derived cell lines. (a) *NSMCE2* mRNA levels measured by RQ-PCR (n=3, mean  $\pm$  SD). Theoretically, the *NSMCE2* 7-8 primer/probe can amplify both normal and aberrant *NSMCE2* transcripts, while the *NSMCE2* 2-3 primer/probe set which can amplify only normal *NSMCE2* transcript. *NSMCE2* mRNA levels were normalized to  $\beta$ -actin and are relative to the control mRNA extracted from normal BM cells. *NSMCE2* mRNA levels amplified by the *NSMCE2* 7-8 primer/probe set are higher than those amplified by the *NSMCE2* 2-3 primer/probe set in patient 1, HL60 and KG1 cells. (b) Protein analysis using the anti-*NSMCE2* antibody in cells. Blot for  $\beta$ -actin was used as loading control. Lane 1: normal BM; lane 2:

KG1; lane 3: HL60. (c and d) IHC analysis of *NSMCE2* expression in BM of patient 1 (c) and normal BM (d). *NSMCE2* expression of leukemic cells was not higher than that of normal BM cells. Monocytes and megakaryocytes showed strong positive signals in their cytoplasm.

## Abbreviations

dmns: Double minute chromosomes; hsr: Homogeneously staining regions; FISH: Fluorescence *in situ* hybridization; lncRNAs: Long noncoding RNAs; AML: Acute myeloid leukemia; MDS: Myelodysplastic syndromes; *NSMCE2*: Non-SMC element 2; SKY: Spectral karyotyping; RT-PCR: Reverse transcription-polymerase chain reaction; LDI-PCR: Long-distance inverse PCR.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

YC, JK and MT reviewed the literature and wrote the paper. YC, MYS, SM, and SH treated the patient. NS, HN, TT, SM, ST, TT, YS, TK, YM and MT collected the data. YC and NS performed the molecular analyses. YC, JK and MT contributed to the design of this study, final data analysis and edited the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

The authors thank Akari Kazami and Yoko Yamane for their expert technical assistance. This study was performed as a research program of the Project for Development of Innovative Research on Cancer Therapeutics (P-Direct), Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, and supported by a Grant-in-Aid for Cancer Research from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan, by a Grant-in-aid for Scientific Research (B) and (C) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, and by the National Cancer Center Research and Development Fund.

## Author details

<sup>1</sup>Division of Hematology and Oncology, Department of Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine, Graduate School of Medical Science, 465 Kajicho-Kamigyo-ku, Kyoto 602-8566, Japan. <sup>2</sup>Department of Molecular Diagnostics and Therapeutics, Kyoto Prefectural University of Medicine, Graduate School of Medical Science, Kyoto, Japan.

Received: 2 September 2014 Accepted: 11 September 2014

Published online: 23 September 2014

## References

- Hirano T, Ike F, Mureta T, Obata Y, Utiyama H, Yokoyama KK: Genes encoded within 8q24 on the amplicon of a large extrachromosomal element are selectively repressed during the terminal differentiation of HL-60 cells. *Mutat Res* 2008, **640**:97-106.
- Campbell PJ, Stephens PJ, Pleasance ED, O'Meara S, Li H, Santarius T, Stebbings LA, Leroy C, Edkins S, Hardy C, Teague JW, Mienzes A, Goodhead I, Turner DJ, Clee CM, Quail MA, Cox A, Brown C, Durbin R, Hurles ME, Edwards PA, Bignell GR, Stratton MR, Futreal PA: Identification of somatically acquired rearrangements in cancer using genome-wide massively parallel paired-end sequencing. *Nat Genet* 2008, **40**:722-729.
- Northcott PA, Shih DJ, Peacock J, Garzia L, Morrissy AS, Zichner T, Stutz AM, Korshunov A, Reimand J, Schumacher SE, Beroukhir R, Ellison DW, Marshall CR, Lionel AC, Mack S, Dubuc A, Yao Y, Ramaswamy V, Luu B, Rolider A, Cavalli FM, Wang X, Renke M, Wu X, Chiu RY, Chu A, Chuah E, Corbett RD, Hoad GR, Jackman SD, et al: Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes. *Nature* 2012, **488**:49-56.
- Graham M, Adams JM, Cory S: Murine T lymphomas with retroviral inserts in the chromosomal 15 locus for plasmacytoma variant translocations. *Nature* 1985, **314**:740-743.
- Lemay G, Jolicoeur P: Rearrangement of a DNA sequence homologous to a cell-virus junction fragment in several Moloney murine leukemia virus-induced rat thymomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984, **81**:38-42.
- Villeneuve L, Rassart E, Jolicoeur P, Graham M, Adams JM: Proviral integration site Mis-1 in rat thymomas corresponds to the pvt-1 translocation breakpoint in murine plasmacytomas. *Mol Cell Biol* 1986, **6**:1834-1837.



7. Guan Y, Kub WL, Stilwell JL, Takano H, Lapuk AV, Fridlyand J, Mao JH, Yu M, Miller MA, Santos JL, Kalloger SE, Carlson JW, Ginzinger DG, Celniker SE, Mills GB, Huntsman DG, Grav JW: **Amplification of PVT1 contributes to the pathophysiology of ovarian and breast cancer.** *Clin Cancer Res* 2007, **13**:5745–5755.
8. Carramusa L, Contino F, Ferro A, Minafra L, Perconti G, Giallongo A, Feo S: **The PVT-1 oncogene is a Myc protein target that is overexpressed in transformed cells.** *J Cell Physiol* 2007, **213**:511–518.
9. Barsotti AM, Beckerman R, Laptenko O, Huppi K, Caplen NJ, Prives C: **p53-Dependent induction of PVT1 and miR-1204.** *J Biol Chem* 2012, **287**:2509–2519.
10. Beck-Engeser GB, Lum AM, Huppi K, Caplen NJ, Wang BB, Wabl M: **Pvt1-encoded microRNAs in oncogenesis.** *Retrovirology* 2008, **5**:4.
11. Huppi K, Volfovsky N, Runfola T, Jones TL, Mackiewicz M, Martin SE, Mushinski JF, Stephens R, Caplen NJ: **The identification of microRNAs in a genomically unstable region of human chromosome 8q24.** *Mol Cancer Res* 2008, **26**:212–221.
12. Ørom UA, Derrien T, Berlinger M, Gumireddy K, Gardini A, Bussotti G, Lai F, Zytnicki M, Notredame C, Huang Q, Guigo R, Shiekhattar R: **Long noncoding RNAs with enhancer-like function in human cells.** *Cell* 2010, **143**:46–58.
13. Radtke I, Mullighan CG, Ishii M, Su X, Cheng J, Ma J, Ganti R, Cai Z, Goorha S, Pounds SB, Cao X, Ober C, Armstrong J, Zhang J, Song G, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Raimondi SC, Shurtleff SA, Downing JR: **Genomic analysis reveals few genetic alterations in pediatric acute myeloid leukemia.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, **106**:12944–12949.
14. Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF, Feldser D, Huarte M, Zuk O, Carey BW, Cassady JP, Cabili MN, Jaenisch R, Mikkelson TS, Jacks T, Hacohen N, Bernstein BE, Kellis M, Regav A, Rinn JL, Lander ES: **Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals.** *Nature* 2009, **458**:223–227.
15. Köhn MW, Radtke I, Bullinger L, Goorha S, Cheng J, Edelmann J, Gohlke J, Su X, Paschka P, Pounds S, Krauter J, Ganser A, Quessar A, Ribeiro R, Gaidzik VI, Shurtleff S, Krönke J, Holzmann K, Ma J, Schlenk RF, Rubnitz JE, Döhner K, Döhner H, Downing JR: **High-resolution genomic profiling of adult and pediatric core-binding factor acute myeloid leukemia reveals new recurrent genomic alterations.** *Blood* 2012, **119**:e67–75.
16. Yin W, Rossin A, Clifford JL, Gronemeyer H: **Co-resistance to retinoic acid and TRAIL by insertion mutagenesis into RAM.** *Oncogene* 2006, **25**:3735–3744.
17. Brown J, Bothma H, Veale R, Willem P: **Genomic imbalances in esophageal carcinoma cell lines involve Wnt pathway genes.** *World J Gastroenterol* 2011, **17**:2909–2923.
18. Parisi F, Ariyan S, Narayan D, Bacchiocchi A, Hoyt K, Cheng E, Xu F, Li P, Halaban R, Kluger Y: **Detecting copy number status and uncovering subclonal markers in heterogeneous tumor biopsies.** *BMC Genomics* 2011, **12**:230.
19. Camps J, Nguyen QT, Padilla-Nash HM, Knutsen T, McNeil NE, Wangsa D, Hummon AB, Grade M, Ried T, DiFilippantonio MJ: **Integrative genomics reveals mechanisms of copy number alterations responsible for transcriptional deregulation in colorectal cancer.** *Genes Chromosomes Cancer* 2009, **48**:1002–1017.
20. Rai R, Varma SP, Shinde N, Ghosh S, Kumaran SP, Skariah G, Laloraya S: **Small ubiquitin-related modifier ligase activity of Mms21 is required for maintenance of chromosome integrity during the unperturbed mitotic cell division cycle in *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Biol Chem* 2011, **286**:14516–14530.

doi:10.1186/s13045-014-0068-2

Cite this article as: Chinen et al.: 8q24 amplified segments involve novel fusion genes between *NSMCE2* and long noncoding RNAs in acute myelogenous leukemia. *Journal of Hematology & Oncology* 2014 **7**:68.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit





# 急性骨髄性白血病（小児） 第2版

(2012年4月改訂)

## はじめに

白血病は、小児の悪性腫瘍の中で約3分の1を占める最も多い疾患であるが、急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia : AML) は小児期に発症する白血病の約25%を占め、わが国における新規診断 AML 症例数は年間150例前後と推定されている。小児 AML では、薬物療法の治療成績の向上と相まって、同種造血幹細胞移植に伴う晩期合併症等の問題から、第一寛解期における移植適応が縮小される傾向にある。本ガイドラインでは、急性骨髄性白血病 (*de novo* AML) と急性前骨髄球性白血病 (acute promyelocytic leukemia : APL)、ダウン症候群に伴う急性骨髄性白血病 (AML-DS) とに分けて、それぞれ記載する。

## I. 病型分類

AMLの病型分類は、2001年に導入されたWHO分類(第3版)以降、細胞形態を基本としたFAB(French-American-British)分類に代わり、AMLの予後因子として最も重要とされる染色体異常や遺伝子変異の有無が重視されるようになった。最新のWHO 2008分類(第4版)では表1のように分類されている。WHO分類では、原則として骨髄全有核細胞(ANC)中の芽球が20%以上ある場合にAMLと診断するが、t(8;21), inv(16), t(15;17)転座を伴う場合は、芽球がANCの20%未満でもAMLと診断する。

## II. 小児 *de novo* AML の移植の適応とそのエビデンスレベル

以下、小児 *de novo* AML の移植の適応とそのエビデンスレベルについて、表2に示す。

### 1. 小児 AML の予後因子と治療層別化

AMLの最も重要な予後因子は、AML細胞の染色体核型と寛解導入療法における形態学的治療反応性であり、同種造血幹細胞移植の適応を含めたAMLの寛解導入後治療は、これらの予後因子に基づいたリスク層別化により決定される<sup>1)</sup>。t(8;21)(q22;q22)/*RUNX1-*

表1 AMLのWHO分類第4版

<p>1. 特定の染色体異常・遺伝子変異を伴うAML (Acute myeloid leukaemia with recurrent genetic abnormalities)</p> <p>AML with t(8; 21)(q22; q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> (<i>AML1-ETO</i>)</p> <p>AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16; 16)(p13.1; q22); <i>CBFB-MYH11</i></p> <p>APL with t(15; 17)(q22; q12); <i>PML-RARA</i></p> <p>AML with t(9; 11)(p22; q23); <i>MLL3-MLL</i></p> <p>AML with t(6; 9)(p23; q34); <i>DEK-NUP214</i></p> <p>AML with inv(3)(q21q26.2) or t(3; 3)(q21; q26.2); <i>RPN1-EVII</i></p> <p>AML (megakaryoblastic) with t(1; 22)(p13; q13); <i>RBM15-MKLI</i></p> <p>Provisional entity: AML with mutated <i>NPM1</i></p> <p>Provisional entity: AML with mutated <i>CEBPA</i></p> <p>2. 骨髄異形成関連変化を伴うAML (Acute myeloid leukaemia with myelodysplasia-related changes)</p> <p>3. 治療関連骨髄系腫瘍 (Therapy-related myeloid neoplasms)</p> <p>4. 上記カテゴリー以外のAML (Acute myeloid leukaemia, not otherwise specified)</p> <p>AML with minimal differentiation</p> <p>AML without maturation</p> <p>AML with maturation</p> <p>Acute myelomonocytic leukemia</p> <p>Acute monoblastic/monocytic leukaemia</p> <p>Acute erythroid leukaemia</p> <p>Pure erythroid leukaemias</p> <p>Erythroleukaemia, erythroid/myeloid</p> <p>Acute megakaryoblastic leukaemia</p> <p>Acute basophilic leukaemia</p> <p>Acute panmyelosis with myelofibrosis</p> <p>5. 骨髄肉腫 (Myeloid sarcoma)</p> <p>6. ダウン症関連骨髄増殖性疾患 (Myeloid proliferations related to Down syndrome)</p> <p>Transient abnormal myelopoiesis</p> <p>Myeloid leukaemia associated with Down syndrome</p> <p>7. 芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍 (Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms)</p>
---

現在、用いられている病型分類。AMLの染色体異常や遺伝子変異の有無を重視した分類である。  
(Vardiman JW, et al: Blood 114: 937-951, 2009より)

*RUNX1T1* 陽性, inv(16)(p13.1q22) あるいは t(16; 16)(p13.1; q22) / *CBFB-MYH11* 陽性, すなわち core binding factor 関連白血病 (CBF 白血病) の場合は低リスク群として化学療法のみでの治療が行われ, モノソミー 7 や 5q-, t(16; 21)(p11; q22) / *FUS-ERG*, t(9; 22)(q34; q11.2) / *BCR-ABL1* 陽性等予後不良な染色体異常がある場合や, 初回寛解導入療法に対する形態学的治療反応性が不良であった場合などは, 高リスク群として第一寛解期における同種造血幹細胞移植の適応となる<sup>2)</sup>。低リスク群にも高リスク群にも当てはまらない

表2 小児 De novo AML の移植適応

病期	リスク	同種移植			自家移植
		HLA 適合同胞	HLA 適合非血縁	臍帯血	
第一寛解期	低リスク*	GNR	GNR	GNR	GNR
	中間リスク*	GNR	GNR	GNR	GNR
	高リスク*	S	S	S	GNR
第二以降の寛解期		S	S	S	GNR
再発進行期/寛解導入不応期		CO**	CO	CO	GNR

\*リスク分類は、使用する化学療法レジメンに依存する。わが国では、AML99 試験の解析結果から、以下のリスク分類が、現在用いられている。

低リスク群：t(8;21)(q22;q22) / *RUNX1-RUNX1T1*, inv(16)(p13.1q22) あるいは t(16;16)(p13.1;q22) / *CBFB-MYH11*。ただし、いずれの場合も1コースの化学療法で完全寛解に入ったときのみ。

中間リスク群：低リスク群、高リスク群のいずれにも属さない症例

高リスク群：以下の予後因子を有する症例。1コースの化学療法で完全寛解に入らず、2コース後に完全寛解に入った症例。モノソミー7, 5q-, t(16;21)(p11;q22) / *FUS-ERG*, t(9;22)(q34;q11.2) / *BCR-ABL1*, *FLT3-ITD* 等を有する症例。

\*\*移植を行っても治療成績は不良であるため、慎重な検討を要するという意味でCOとしたが、performance status が良好な場合積極的に行われることが多い。

S : standard of care 移植が標準治療である

(合併症、生活の質(QOL)などの不利益についても検討した上で総合的に決定すべきである)

CO : clinical option 移植を考慮してもよい場合

Dev : developmental 開発中であり、臨床試験として実施すべき場合

GNR : not generally recommended 一般的には勧められない

(筆者作成)

場合には、中間リスク群に割付けられる。

近年、国際共同研究による多数例の解析の結果、染色体 11q23/*MLL* 遺伝子異常において t(6;11)(q27;q23) / *MLL-MLLT4 (AF6)* が予後不良であることが明らかになり<sup>3)</sup>、また分子遺伝学的解析技術の進歩に伴い、従来の核型分析では同定できなかった新規の遺伝子異常が次々と見ついている。FMS-like tyrosine kinase 3(以下 *FLT3*) の internal tandem duplication (*FLT3-ITD*) は強力な予後不良因子であり、日本小児白血病リンパ腫研究グループ (JPLSG) の AML-05 試験では、*FLT3-ITD* 陽性例は高リスク群に分類された<sup>4)</sup>。その他、*NUP98-NSD1* など新規の予後不良因子も次々と明らかにされつつあるが<sup>5)</sup>、これらの新規遺伝子変異の意義は、必ずしも確立しているわけではなく、更なる検討が必要である。

初回寛解導入療法後の治療反応性は、小児 AML においても重要な予後因子であるが、従来の形態学的評価では、検出することが困難であった微小残存病変 (MRD) を、AML 細胞の持つ特異的な表面抗原パターンをフローサイトメトリー法で検出する、あるいは

AML 細胞の持つ特異的な遺伝子変異を PCR 法で検出する方法が検討されつつあり、今後のリスク層別に用いられる可能性がある<sup>6)</sup>。

## 2. 小児 AML の薬物療法

小児 AML の治療の主体は多剤併用化学療法であり、その中心を担う薬剤はシタラビン (Ara-C) とアントラサイクリン系薬剤である。これらの 2 剤を用いた寛解導入療法と大量 Ara-C 療法を含む強化療法を計 4 ～ 5 コース程度行うのが標準的である<sup>1, 2, 6-10)</sup>。維持療法については、ドイツなどの BFM (Berlin-Frankfurt-Münster) グループでは行っているものの、フランスの LAME (Leucemie Aigue Myeloblastique Enfant) 89/91 研究において維持療法の有無によるランダム化比較の結果、維持療法群において逆に全生存率 (OS) が有意に低かったとする報告があるなど、その意義については一般的に否定的である<sup>10, 11)</sup>。

小児 AML で用いられているアントラサイクリンとしては、ダウノルビシン、イダルビシン、ミトキサントロンがあるが、その優劣については結論が出ていない。その他、Ara-C とアントラサイクリン以外の第 3 の薬剤を併用することの意義も必ずしも明確ではないが、小児 AML においてはエトポシドなどが併用されることが多い。抗 CD33 モノクローナル抗体に抗腫瘍性抗生物質カリケアマイシンを結合させた製剤ゲムツズマブ・オゾガマイシン (GO) については、現時点では新規診断例に対する併用療法のエビデンスが十分ではなく、使用する場合は、対象を再発例や難治例にとどめるべきである<sup>12)</sup>。また、GO については、特に既使用例に対して造血幹細胞移植を行った場合に、veno-occlusive disease (VOD) /sinusoidal obstruction syndrome (SOS) 発症との関連が指摘されている。表 3

**表 3** 最近の主な小児 AML 臨床試験の治療成績

試験名	期間	N	CR	コース数	同種移植	EFS (年)	OS (年)
AML99 *	2000 ～ 2002	240	94%	6	19%	61% (5)	75% (5)
AML-05	2006 ～ 2010	443	86%	5	12%	54% (3)	73% (3)
CCLSG AML9805	1998 ～ 2002	101	90%	8	19%	53% (5)	74% (5)
SJCRH AML02	2002 ～ 2008	230	94%	5	27%	63% (3)	71% (3)
MRC AML12	1995 ～ 2002	455	92%	4-5	7%	56% (5)	66% (5)
AML-BFM98	1998 ～ 2003	473	88%	5 + 維持療法	—	49% (5)	62% (5)
NOPHO93	1993 ～ 2000	243	92%	6-7	23%	48% (5)	65% (5)
CCG 2961	1996 ～ 2002	901	88%	3	18%	42% (5)	52% (5)

\*小児 AML 共同治療研究会

CCLSG:小児癌白血病病研究グループ, SJCRH:St.Jude 小児がん研究病院, MRC:Medical Research Council, NOPHO : Nordic Society of Pediatric Hematology and Oncology, CCG : Children's Cancer Group, CR : 完全寛解, EFS : 無イベント生存率, OS : 全生存率

EFS で 50 ～ 60%, OS で 60 ～ 70%の長期生存率が得られている。(文献 2, 6 ～ 10 より)

に、最近の主な小児 AML 臨床試験の治療成績を示す。

### 3. 第一寛解期小児 AML における造血幹細胞移植

1980 年代以降、第一寛解期の小児 AML に対して、HLA 一致同胞ドナーからの同種造血幹細胞移植が広く行われるようになった。しかしながら、化学療法と同種あるいは自家移植とのランダム化比較試験は存在せず、「生物学的ランダム化 (Mendelian/genetic randomization)」すなわち寛解が得られた症例を、HLA 適合同胞ドナーがいる場合には同種移植群に割り付け、ドナーがない場合には化学療法(あるいは自家移植)群に割り付け、実際の移植実施の有無に関わらず、割り付けられた群 (ドナー有り群 vs ドナー無し群) に従って解析を行う方法 (intent-to-treat 解析) により、多くの臨床試験が行われた (表 4)。

米国 CCG の 5 つの臨床試験を合同解析したもの、および CCG 2891 試験では、無病生

**表 4** 第一寛解期小児 AML に対する同種移植と化学療法の比較 (intent-to-treat 解析)

	DFS *, %		OS, %	
	ドナー有り	ドナー無し	ドナー有り	ドナー無し
AML-BFM98 (HR のみ**)	47 ± 7	43 ± 4	58 ± 9	56 ± 4
CCG-251, -213, -2861, -2891, -2941	47 ± 6	37 ± 4 ***	54 ± 6	45 ± 4 ***
CCG 2891	同種移植 55 ± 9	自家移植 42 ± 8 化学療法 47 ± 8 ***	同種移植 60 ± 9	自家移植 48 ± 8 化学療法 53 ± 8 ***
CCG 2961	60 ± 8	50 ± 5 ***	67 ± 8	62 ± 5
POG 8821	同種移植 52 ± 8	自家移植 38 ± 6 *** 化学療法 36 ± 6 ***		
EORTC-CLG 58921	63 ± 8	57 ± 5	78 ± 7	65 ± 5
MRC AML10	—	—	68	59

\* POG (Pediatric Oncology Group) 8821 のみ EFS

\*\* AML-BFM98 の HR : SR (Auer 小体を有する M1/2 例, M4Eo 例, t(8;21), inv(16), かつ day15 の骨髓芽球比率 5%未滿, M3, t(15;17) 以外

\*\*\* P < 0.05

「生物学的ランダム化」により同種移植群 (ドナー有り) と化学療法群 (ドナー無し) とを比較したもの。

(文献 19 より)

存率 (DFS), 全生存率 (OS) とともにドナー有り群が優った<sup>13-15)</sup>。しかし, CCG 2961 試験ではドナー有り群が優ったのは DFS のみで, OS では差が認められなかった<sup>9)</sup>。その他, AML-BFM98 試験, EORTC (European Organization of Research and Treatment of Cancer)-CLG (Children Leukemia Group) 58921 試験, 英国の MRC AML10 試験ではドナーの有無で差は認めなかった<sup>16, 17)</sup>。

このほか, 解析を実際に行われた治療群ごとに行い, 同種移植までの待機期間内に起こり得るイベントを time-to-transplantation 補正した報告では, LAME 89/91 試験において OS で同種移植群が優ったが, 東京小児がん研究グループ (TCCSG) M91-13/M96-14 試験や, AML-BFM87/93 試験では差を認めなかった<sup>10, 11, 18)</sup>。

1990 年代後半以降, 主として AML 細胞の染色体核型によるリスク層別化治療が導入されるようになり, t(8;21) や inv(16) 陽性例などの CBF 白血病に対しては, 第一寛解期における同種移植の適応はない, とするコンセンサスが得られた。CBF 白血病以外の中間リスク群および高リスク群小児 AML に対する第一寛解期における同種移植の適応についてのコンセンサスは一致しておらず, 高リスク群のみ移植適応としているグループ, 治療抵抗例または再発例にのみ適応としているグループなど様々である。わが国では, AML99 試験の結果, 高リスク群の 5 年 OS が 57% と, 中間リスク群, 低リスク群の 72 ~ 87% と比較して明らかに不良であることから, 同種移植の適応としている<sup>2)</sup>。いずれにしても, 化学療法による治療成績の向上, 晩期合併症を含めた同種移植のリスク, 小児 AML の場合には化学療法による再発後の治療成績が比較的良好であることなどから, 第一寛解期における同種移植の適応は縮小される傾向にある<sup>1, 19, 20)</sup>。

なお, ドナーソースについては, HLA 一致または 1 座不一致血縁ドナー, HLA 一致非血縁ドナーの選択が標準的であるが, HLA 2 座不一致までの非血縁臍帯血ドナーによる移植成績も血縁あるいは非血縁ドナーによる移植成績と遜色ない結果が得られている<sup>21, 22)</sup>。

前処置についても, 全身放射線照射 (TBI) を用いた前処置法とブスルファン (BU) などを用いた非照射前処置法との間で優劣についての明確なエビデンスはない。しかしながら, TBI に伴う晩期合併症を回避する観点から, 第一寛解期での移植では非照射前処置法が選択される傾向にある。また, 前処置強度を軽減した移植法 (Reduced intensity stem cell transplantation : RIST) についても, 現時点ではエビデンスが十分ではない。

#### 4. 第一寛解期小児 AML に対する自家造血幹細胞移植

主として 1980 年代 ~ 1990 年代前半にかけての第一寛解期小児 AML に対する自家造血幹細胞移植の検討結果からは, 少なくとも OS の比較において通常の化学療法との差はなく, メタ解析にてもその優位性は証明されず, 現在その適応はない<sup>14, 15, 20)</sup>。

## 5. 第二寛解期以降の小児 AML における造血幹細胞移植

日本造血細胞移植学会による平成 23 年度全国調査報告書によれば、16 歳未満例の移植後 5 年生存率は、第二寛解期の場合 61.4% (95%信頼区間 49.6 ~ 71.2%) であり、非寛解の場合は 28.1% (95%信頼区間 20.9 ~ 35.6%) である。通常、再発後第二寛解期以降の場合や、非寛解の場合は、化学療法のみで治癒が得られる確率は非常に低く、同種造血幹細胞移植を行うことが推奨される。ただし、非寛解の場合は、治癒率の低さ、治療関連合併症を起こすリスクを考慮して、移植の適応を十分に検討する必要がある。

## Ⅲ. 小児 APL の移植の適応とそのエビデンスレベル

以下、小児 APL の移植の適応とそのエビデンスレベルについて、表 5 に示す。

### 1. APL の予後因子

初発時白血球数、血小板数による再発リスク分類が、イタリア、スペイン共同グループより報告されており<sup>23)</sup>、低リスクグループ（白血球数 $\leq 10,000/\mu\text{L}$ 、血小板数 $> 40,000/\mu\text{L}$ ）、中間リスクグループ（白血球数 $\leq 10,000/\mu\text{L}$ 、血小板数 $\leq 40,000/\mu\text{L}$ ）、高リスクグループ（白血球数 $> 10,000/\mu\text{L}$ ）と分類されている。

また強化療法終了後の RT-PCR による PML-RAR  $\alpha$  融合遺伝子を対象とした MRD 解

**表 5** 小児 APL の移植適応

	同種移植			自家移植
	HLA 適合同胞	HLA 適合非血縁	臍帯血	
第一寛解期 MRD (-)	GNR	GNR	GNR	GNR
第二寛解期 MRD (-)	CO *	CO *	CO *	S
第二寛解期 MRD (+)	CO *	CO *	CO *	CO **
再発期・寛解導入不能期	CO ***	CO ***	CO ***	GNR

MRD は PCR-MRD

\*移植関連合併症が懸念されるため、慎重な検討を要するという意味で CO とした

\*\*再発が懸念されるため、慎重な検討を要するという意味で CO とした

\*\*\*移植を行っても治療成績は不良であるため、慎重な検討を要するという意味で CO とした

S : standard of care 移植が標準治療である（合併症、QOL などの不利益についても検討した上で総合的に決定すべきである）

CO : clinical option 移植を考慮してもよい場合

Dev : developmental 開発中であり、臨床試験として実施すべき場合

GNR : not generally recommended 一般的には勧められない

(文献 24, 33 ~ 36 より)



析による分子遺伝学的再発の早期診断が、その後の予後を改善するとの報告があり、強化療法後3年間は3カ月おきに骨髄のMRD解析をすること、陽性となった場合には2週間後に再検し、それでも陽性の場合には予防的治療の開始が推奨されている<sup>24)</sup>。

## 2. APLの薬物療法

従来 APL は、APL 細胞により惹起される播種性血管内凝固症候群 (DIC) のため、寛解導入中に死亡する症例が多く、予後不良の疾患であった。しかし、1988 年に全トランスレチノイン酸 (ATRA) による分化誘導療法が報告され<sup>25)</sup>、以後 ATRA を従来の化学療法に導入することにより寛解導入療法中の死亡が減少し、寛解導入率が向上、劇的に治療成績が向上した。

ヨーロッパ APL グループによる APL93 研究によると、小児例のみを抽出した 5 年 EFS は 71% と成人例と同等であり<sup>26)</sup>、さらに ATRA および抗がん剤併用による維持療法が有効であることも示唆された<sup>27)</sup>。しかし ATRA による維持療法の有用性が否定された報告もあり、維持療法の是非についてはいまだ結論が出ていない。

ATRA 導入以降、国内では小児 AML 共同治療研究会による AML99-M3 研究<sup>28)</sup>、CCLSG-APL-ATRA 研究<sup>29)</sup> がほぼ同時期に行われ、その後 AML99-M3 研究を基本骨格とした日 JPLSG AML-P05 が全国的な臨床試験として行われた。これは ATRA と抗がん剤の同時併用による寛解導入療法、強化療法及び、ATRA 単独による維持療法からなる。

最新の AML-P05 は、まだ最終解析前であり公表されていないが、その骨格となった AML99-M3 研究は寛解導入率：96.2%、7 年 EFS 91.4% と非常に良好な結果を残している<sup>28)</sup>。

以上より現時点で国内では、① ATRA と抗がん剤併用による寛解導入療法、② アントラサイクリンを中心とした強化療法、③ ATRA 単独あるいは抗がん剤併用による維持療法、が小児 APL 治療の標準的骨格として確立されつつある。

1997 年に報告された三酸化ヒ酸 (ATO)<sup>30)</sup> は、ATRA 使用後再発例において優れた再寛解導入率を示し<sup>30)</sup>、その後成人を中心に再発例、初発例に対する治療報告が増えている。そして① ATRA 耐性例にも有効である、② アントラサイクリン総投与量を減らせる、③ 無イベント生存率を更に向上する可能性がある等の理由から、近年は成人初発 APL 例に対して ATO を導入した大規模な臨床研究が増加している。

小児 APL に関しては、米国 Children's Oncology Group (COG) が、再発 APL13 症例を ATO 単剤で治療し再寛解導入率 85% と良好な結果を報告し<sup>31)</sup>、小児初発 APL に対しても ATRA と抗がん剤の併用療法に匹敵する治療成績が示されてきている。現在、COG が強化療法の一部に ATO を追加した AAML0631 研究を 2009 年から施行中である。

しかし ATRA や ATO による治療は、いわゆる化学療法剤の合併症が少ない反面、APL 分化症候群や ATO による QT 延長などの独特な合併症対策が必要である。

その他、ゲムツズマブ・オゾガマイシン (GO) など新規化学療法剤が有効な薬剤として期待され、実際 APL に対する GO の有用性が、再発及び初発 APL いずれについても報告されている<sup>32)</sup>。

以上のように APL は最も治癒の見込める白血病のひとつとなっている。最新の推奨治療については European LeukemiaNet より報告されている<sup>33)</sup>。

予後因子の項でも触れたが、第一寛解期の強化療法終了後における PML-RAR  $\alpha$  融合遺伝子を対象とした RT-PCR による骨髄 MRD 陽性例に対しては、2 週間以内に再検査を行い、それでも陽性の場合、非常に高率で血液学的に再発するため、速やかに ATO などによる治療導入が必要であり<sup>34)</sup>、その後造血幹細胞移植の適応となる。

### 3. APL の薬物療法と造血幹細胞移植の比較

最近の国内外の治療研究では、化学療法のみで良好な成績が得られていることから、第一寛解期での造血幹細胞移植の適応はない。

造血幹細胞移植の適応となるのは、第二寛解期、難治ならびに再発症例に限られると考えられる。

APL に対する化学療法と造血幹細胞移植の比較、もしくは移植ソース別の造血幹細胞移植の比較をした報告は全て後方視的検討である。

最も症例数の多い解析は、European Acute Promyelocytic Leukemia Group による成人第二寛解期 122 症例の解析である<sup>34)</sup>。

これによると、ATRA と抗がん剤などによる救済療法後の血液学的第二寛解期に、73 例 (60%) が移植を受け、そのうち 50 例は自家移植、23 例は同種移植であった。7 年無再発生存率、7 年 EFS、7 年 OS はそれぞれ、自家移植群で 79.4%、60.6%、59.8%、同種移植群で 92.3%、52.2%、51.8%、非移植群では 38%、30.4%、39.5% であり、移植群が非移植群より成績が良かった。再発率については同種移植群が有意に低いが、治療関連合併症率が高く、EFS、OS ではむしろ自家移植群が優っていた。そして、自家移植片採取時 MRD 陰性である患者では、MRD が検討されていない患者に対して 7 年 EFS が 76.5% vs 49.2% と有意差を認め、自家移植を行う場合には分子遺伝学的に寛解であることが重要であることも示された。

小児期の再発あるいは治療抵抗性 APL 患者を対象にした自家移植、同種移植の比較検討としては Dvorak らが報告した 32 例という少数例の後方視的な検討がある<sup>35)</sup>。

再発あるいは治療抵抗性と診断され、救済療法後血液学的寛解に至った 32 例のうち、11

例に対して自家移植，21例に対して同種移植が行われた。移植関連死亡率，再発率は，自家移植群で0%，27%，同種移植群で19%，10%であり，5年EFS，5年OSはそれぞれ，自家移植群で73%，82%，同種移植群で71%，76%であり有意差はなかった。

しかし同種移植群の低い再発率から，APLに対する同種移植は強い移植片対白血病効果(GVL)が期待できること，同種移植群の治療関連死亡率が低い理由として第二寛解を得るための治療が比較的軽度であることなどが示唆されている。同様の同種移植の結果はBourquin等も報告している<sup>36)</sup>。

そこで今後，小児においてもATOを取り入れた救済療法が一般的になった場合，同種移植の重要性が，特にMRD陽性例を中心に，増してくる可能性がある。

#### IV. AML-DSの移植の適応とそのエビデンスレベル

以下AML-DSの移植の適応とそのエビデンスレベルについては表6に示す。

##### 1. AML-DSの薬物療法

ダウン症候群(以下DS)は，よく知られた染色体異常疾患の1つで，DS児は非DS児に比べ，白血病を発症しやすいことが知られている。

DSに発症した急性骨髄性白血病(以下AML-DS)は，非DSに発症したAMLに比べ，ほとんどが4歳以下と発症年齢が低く，急性巨核芽球性白血病が多いなどの特徴を持つ。AML-DSは非DSAML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行われている。

治療は非DSAMLと同様，Ara-Cとアントラサイクリンを基本とし，欧米のように非

**表6** AML-DSの移植適応

	同種移植			自家移植
	HLA 適合同胞	HLA 適合非血縁	臍帯血	
第一寛解期	GNR	GNR	GNR	GNR
第二寛解期	CO	CO	CO	GNR
再発期・寛解導入不能期	CO*	CO*	CO*	GNR

\*移植を行っても治療成績は不良であるため，慎重な検討を要するという意味でCOとした  
S : standard of care 移植が標準治療である(合併症，QOLなどの不利益についても検討した上で総合的に決定すべきである)

CO : clinical option 移植を考慮してもよい場合

Dev : developmental 開発中であり，臨床試験として実施すべき場合

GNR : not generally recommended 一般的には勧められない

(筆者作成)

DS AMLと同じ骨格を用いて投与量の減量を行っているものと、わが国のようにAML-DSに特化した治療を行っているものがあるが、いずれも70～80%のEFSが得られている<sup>37-42)</sup>。

## 2. AML-DSの薬物療法と造血幹細胞移植の比較

最近の国内外の治療研究では、化学療法のみで良好な成績が得られていることから、第一寛解期での造血幹細胞移植の適応はない。したがって、造血幹細胞移植の適応となるのは、難治ならびに再発症例に限られると考えられる。薬物療法と造血幹細胞移植を比較した試験はなく、これまでのまとまった症例の報告はすべて後方視的検討である。また、AMLだけの報告は少ない。

Rubinらは、27例のダウン症に対する移植成績(急性白血病と再生不良性貧血)を報告している<sup>43)</sup>。

全例TBI 7.5 Gy以上、シクロホスファミド(CY)120 mg/kg以上の前処置がおこなわれ、7例が肺合併症(肺炎、肺出血など)で死亡。19例(70%)が100日以上生存。前処置、GVHD予防の薬剤、量などで100日生存に有意に関係している要素はないが、CY + TBIはBU + CYまたはAra-Cに比べ、やや早期死亡が多かった、GVHD予防にメトトレキサート(MTX)を用いた群が、シクロスポリン(CyA)群に比べ早期死亡が多かったとしている。3年OSは48%、非白血病死亡率は39%で、結論としてDS児は通常の前処置に耐えうるが、生命を脅かす移植関連毒性は、非DS児より強い、移植後早期の気道ならびに肺合併症に注意が必要であると述べている。AMLは11例で、1.8歳から14歳で移植され、第一寛解期が7例、第二寛解期が3例、再発期が1例。移植ソースは全例骨髄で自家3例、同胞7例、非血縁1例、5例が生存したが、すべて第一寛解期での移植例(自家1例を含む)であったとしている。死因は原病死3例、合併症死3例であった。

Meissnerらは、11例のDS白血病の移植成績を報告している<sup>44)</sup>。

全体の移植後EFSは18%、OSは36%で、移植合併症より再発のほうが死因として多かったとしている。AMLは3例で、すべて第二寛解での移植、前処置は、BU 16 mg/kg + thiotepa 300 mg/m<sup>2</sup> + CY 200 mg/kg、BU 16 mg/kg + フルダラビン(Flu)160 mg/m<sup>2</sup>、BU 16 mg/kg + CY 120 mg/kgで、1例目がDay 80で拒絶で再移植後生存、2、3例目は移植後6、10.5カ月で再発し、死亡している。

わが国では、村松らがTRUMPデータから同種移植15例の成績を報告している<sup>45)</sup>。

第一寛解期4例、第二寛解3例、第三寛解1例、非寛解7例、3年全生存率は38.9 ± 12.9%。単変量解析ではFlu + メルファランによる前処置が予後良好。9例が死亡(再発5例、急性GVHD1例、慢性GVHD1例、二次性生着不全1例、間質性肺炎1例)とし

ている。

また多賀らは、寛解導入不能・再発の AML-DS の後方視的研究で、再寛解導入成功例 8 例に同種造血細胞移植が行われたが、生存例は 2 例のみ、非寛解期移植は全例死亡していたと報告している<sup>46)</sup>。

以上のように再発難治の AML-DS に対し、移植適応があるのか、その時期、どのような移植ソース・前処置・GVHD 予防が良いのかなどは現時点では明確ではない。今後の症例の蓄積が必要である。

(足立 壯一)

## 文 献

- 1) Creutzig U, van den Heuvel-Eibrink MM, Gibson B, et al : Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents : recommendations from an international expert panel. *Blood* 120 (16) : 3187-3205, 2012.
- 2) Tsukimoto I, Tawa A, Horibe K, et al : Risk-stratified therapy and the intensive use of cytarabine improves the outcome in childhood acute myeloid leukemia : the AML99 trial from the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *J Clin Oncol* 27 (24) : 4007-4013, 2009.
- 3) Balgobind BV, Raimondi SC, Harbott J, et al : Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia : results of an international retrospective study. *Blood* 114 (12) : 2489-2496, 2009.
- 4) Meshinchi S, Woods WG, Stirewalt DL, et al : Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood* 97 (1) : 89-94, 2001.
- 5) Hollink IH, van den Heuvel-Eibrink MM, Arentsen-Peters ST, et al : NUP98/NSD1 characterizes a novel poor prognostic group in acute myeloid leukemia with a distinct HOX gene expression pattern. *Blood* 118 (13) : 3645-3656, 2011.
- 6) Rubnitz JE, Inaba H, Dahl G, et al : Minimal residual disease-directed therapy for childhood acute myeloid leukaemia : results of the AML02 multicentre trial. *Lancet Oncol* 11 (6) : 543-552, 2010.
- 7) Gibson BE, Wheatley K, Hann IM, et al : Treatment strategy and long-term results in paediatric patients treated in consecutive UK AML trials. *Leukemia* 19 (12) : 2130-2138, 2005.
- 8) Lie SO, Abrahamsson J, Clausen N, et al : Long-term results in children with AML : NOPHO-AML Study Group--report of three consecutive trials. *Leukemia* 19 (12) : 2090-2100, 2005.
- 9) Lange BJ, Smith FO, Feusner J, et al : Outcomes in CCG-2961, a children's oncology group phase 3 trial for untreated pediatric acute myeloid leukemia : a report from the children's oncology group. *Blood* 111 (3) : 1044-1053, 2008.
- 10) Creutzig U, Zimmermann M, Ritter J, et al : Treatment strategies and long-term results in paediatric patients treated in four consecutive AML-BFM trials. *Leukemia* 19 (12) : 2030-2042, 2005.
- 11) Perel Y, Auvrignon A, Leblanc T, et al : Treatment of childhood acute myeloblastic leukemia : dose intensification improves outcome and maintenance therapy is of no benefit--multicenter studies of the French LAME (Leucemie Aigue Myeloblastique Enfant) Cooperative Group. *Leukemia* 19 (12) : 2082-2089, 2005.
- 12) Zwaan CM, Reinhardt D, Zimmerman M, et al : Salvage treatment for children with refractory first or second relapse of acute myeloid leukaemia with gemtuzumab ozogamicin : results of a phase II study. *Br J Haematol* 148 (5) : 768-776, 2010.