

Cancer Research

The Journal of Cancer Research (1916–1930) | The American Journal of Cancer (1931–1940)

Biallelic *DICER1* Mutations in Sporadic Pleuropulmonary Blastoma

Masafumi Seki, Kenichi Yoshida, Yuichi Shiraishi, et al.

Cancer Res 2014;74:2742-2749. Published OnlineFirst March 27, 2014.

Updated version Access the most recent version of this article at:
doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2470

Supplementary Material Access the most recent supplemental material at:
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2014/03/27/0008-5472.CAN-13-2470.DC1.html>

Cited Articles This article cites by 20 articles, 3 of which you can access for free at:
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/74/10/2742.full.html#ref-list-1>

E-mail alerts Sign up to receive free email-alerts related to this article or journal.

Reprints and Subscriptions To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org.

Permissions To request permission to re-use all or part of this article, contact the AACR Publications Department at permissions@aacr.org.

【第55回日本小児血液・がん学会学術集会】シンポジウム7：次世代シーケンサーによる小児血液、
腫瘍疾患における研究の進展

急性骨髄性白血病における遺伝子異常

柴 徳生^{1*}, 林 泰秀^{2,3}

¹群馬大学小児科

²群馬県立小児医療センター

³群馬県赤十字血液センター

要 旨

近年の分子生物学の進歩はめざましく、発現アレイ, SNP アレイ, アレイ CGH, 次世代シーケンサーの登場により、急性骨髄性白血病 (AML) の診断技術は飛躍的に進歩している。特に成人 AML では、米国のコンソーシアムである TCGA により網羅的に遺伝子解析がなされ、主要なゲノム異常はほぼ明らかとなった。一方、小児 AML ではこれまでに全ゲノム、全エクソーム解析に関するまとまった報告はない。また、*DNMT3A* や *TET2*, *IDH1/2* といった成人では予後に影響を及ぼす遺伝子変異が多数同定されているが、これらの変異は小児ではまれであり、本邦においてリスク層別化の指標として確立されている遺伝子異常は *FLT3-ITD* のみというのが現状である。今回、著者らの小児 AML 19 例の解析では、小児 AML の遺伝子変異の複雑性は明らかとなったが、新たな標的となる遺伝子変異を見つけることはできず、どのような切り口で遺伝子異常を同定し、リスク層別化に役立てていくかが大きな課題である。今後、臨床研究と連動した検討がなされ、個々の遺伝子異常や遺伝子異常の組み合わせによる予後との関係が明らかとなり、よりの確かな予後層別化がなされるとともに、明らかになったゲノム異常から分子病態が解明され、新たな標的に対する有効かつ副作用の少ない分子標的薬剤が開発・臨床応用されることが期待される。

キーワード：急性骨髄性白血病, 次世代シーケンサー, 全エクソーム解析, RNA シーケンス, 遺伝子発現

Key words: acute myeloid leukemia, next generation sequencer, whole-exome analysis, RNA sequence, gene expression

I はじめに

小児急性骨髄性白血病 (AML) は、リスク分類に応じた治療の層別化および近年の治療法や支持療法の進歩により治療成績は飛躍的に向上し、5 年全生存率は 60% を超えてきているが、依然として 30% 前後は予後不良である¹⁾。近年、成人 AML 症例では、*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1/2* といった予後予測に有用な遺伝子異常が次々に同定されているが、小児 AML ではこれらの異常はほとんど同定されず、成人と小児においてその発症は大きく異なっているものと考えられる²⁻⁷⁾。

近年のマイクロアレイ、大量並列シーケンス技術 (次世代シーケンサー) の開発により、遺伝子変異の網羅的な解析が可能となり、AML や骨髄異形成症候群 (MDS) をはじめとする様々ながんにおいて、その発症に関与していると考えられる遺伝子変異が次々と同定されており、治療層別化や治療標的として実際の臨床への応用が急速に進んでいる。次世代シーケンサーでは、これまでのサンガーシー

ケンサーに比べて 1 回の解析で 100 万倍以上の塩基配列を解読することが可能である。特に、全エクソーム解析は、ヒトゲノム全体の約 1% のみを占めるタンパクをコードする領域のみに絞った解析手法であり、全ゲノム解析に比べて一度に大量のサンプルを解析することが可能となり、コストパフォーマンスの観点からも優れた手法である。これまでに成人 AML では、米国の NIH/NCI が行っている大規模コンソーシアムである The Cancer Genome Atlas (TCGA) から成人 AML 200 例で、次世代シーケンサーを利用して解析した成果が報告されているが小児 AML ではまとまった報告はなく、成人 AML に対し、大きく遅れをとっている⁸⁾。

II AML の染色体異常

染色体分染法 (G-banding 法) により、一部の症例では AML に特徴的な転座が認められ、転座点の解析から融合遺伝子の同定がなされており、マウスモデルでの検証などによる AML の分子病態の研究が数多く行われてきた⁹⁾。染色体異常の多くは予後と相関することが知られており、強力な化学療法や造血幹細胞移植の適応のための重要な指標と考えられている¹⁰⁻¹²⁾。これらの染色体異常により形成さ

2014 年 7 月 14 日受付, 2014 年 7 月 14 日受理
* 別刷請求先: 〒377-8577 前橋市昭和町 3-39-15
群馬大学小児科 柴 徳生
E-mail: nshiba@gunma-u.ac.jp

れた融合遺伝子の存在は、微少残存病変 (MRD) の追跡を分子生物学的に可能とし、一部の融合遺伝子はMRDの評価にも用いられている。小児AMLの染色体異常は成人よりも頻度が高く、成人AMLの半数弱が正常核型なのに対し、小児AMLに占める正常核型の割合は20%弱と少ない。このことは、小児AMLでは成人AMLに比し、染色体異常がAML発症に重要な役割を果たしている可能性を示唆していると考えられる。染色体異常の多くは病型に特異的であり、これらの異常の中で、 $t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1$ または $inv(16)/CBF-MYH$ を有するAMLはcore binding factor (CBF) 白血病と称され、その予後は良好であり、JPLSG AML12臨床試験では標準リスク群 (AML-05では低リスク群) に割り付けられている。一方、モノソミー7や $t(6;11)/MLL-AF6$ 、微細な転座であるために通常のG-banding法では検出されない $t(5;11)/NUP98-NSD1$ は予後不良とされている^{13,14)}。一方、これらの染色体異常を認めない正常核型の多くは中間リスク群として割り付けをされているが (*FLT3-ITD* を認める症例は高リスク群に割り付け)、治療反応性や予後は症例によって異なり、その真の病態解明には至っていないのが現状である。

米国のTCGAから報告された成人領域のAML 179例におけるトランスクリプトーム解析 (RNAシーケンス) の結果では、80例に平均1.5個/例の融合遺伝子が検出された⁸⁾。同定された融合遺伝子は、新規のin-frameでの再構成 (塩基配列がずれない融合遺伝子) も15個含まれていたが、複数例において同定される新規融合遺伝子は皆無であり、その他の融合遺伝子は $t(8;21)$ 転座など既知の遺伝子再構成ばかりであり、新たな有力な結果は得られなかった⁸⁾。この結果は、遺伝子解析技術が進歩しても、依然として染色体の構造異常が検出されないAMLが多数例存在し、染色体分析結果から診断や分子分類を行うことには限界があることを示している。また、成人AMLの主要な発症原因は染色体転座ではなく、*DNMT3A* や *TET2*、*IDH1/2*、*NPM1* をはじめとする遺伝子変異であることを示していると考えられる。

III AMLにおける遺伝子異常

これまでに、造血に関わる遺伝子などを標的とした解析研究を通じて、*FLT3-ITD*、*NPM1*、*CEBPA*、*KIT*、*MLL-PTD*、*WT1*、*NRAS* および *KRAS* などの遺伝子異常が同定されてきた^{15,16)}。特に、高頻度に検出される *FLT3-ITD*、*KIT*、*NPM1* 変異については、予後に及ぼす影響について数多くの研究がなされてきた¹⁷⁻²⁰⁾。本邦の小児AMLに対する共同治療プロトコルAML99に登録された小児AML158例 (13例のM3を含む) の著者らの結果では、158例中20例 (12.7%) に *FLT3-ITD* を認めた²¹⁾。 *FLT3-ITD* 陽性例は初診時年齢が

高く、白血球数が多い傾向がみられた。FAB分類で *FLT3-ITD* はM3 13例中3例、M5 25例中5例、M1 24例中4例に多くみられた。また、非寛解の6例中5例で *FLT3-ITD* が認められた。なおM3、Down症例を除いた寛解導入率は *FLT3-ITD* 陰性群 97.8%、*FLT3-ITD* 陽性群 75.0% で有意に *FLT3-ITD* 陽性群で低かった。3年全生存率は *FLT3-ITD* 陰性群 89.1%、*FLT3-ITD* 陽性群 34.3% ($p<0.0001$)、3年無病生存率は *FLT3-ITD* 陰性群 71.5%、*FLT3-ITD* 陽性群 38.5% ($p=0.0001$) であった。これらの結果より、本邦の臨床試験であるJPLSG AML-05およびAML12において、*FLT3-ITD* は、遺伝子異常として唯一、治療の層別化に用いられている。

一方、*NPM1* 変異は成人では予後良好であり、小児でも頻度は低いものの、予後良好との報告がある^{22,23)}。 *CEBPA* 遺伝子の変異を有する症例も予後良好と報告されており、我々が行った本邦のAML99研究に登録された症例のうち、検体が得られた157例を解析した結果、欧米同様、予後良好であった²⁴⁾。 *WT1* 遺伝子の異常はAMLで約10%にみられ、*FLT3-ITD* と重複することが多く、予後不良因子と報告されているが²⁵⁾、我々の検討では、症例全体では全生存率に有意な差は見られなかったものの、正常核型症例に限ると予後は有意に不良であった²⁶⁾。

これまでの研究で、白血病の発症には必ずしも1つの遺伝子異常のみでは十分でないことが明らかになってきており²⁷⁾、AMLにおいては細胞の増殖 (proliferation) と生存 (survival) に対して促進的に作用する遺伝子変異 (class I 遺伝子変異) と細胞の分化 (differentiation) を抑制したり、自己複製に関与する遺伝子変異 (class II 遺伝子変異) が必要十分条件とされてきた²⁷⁾。

さらに、近年の次世代シーケンサーによる網羅的全ゲノム解析技術の進歩により、AMLなどの骨髄系腫瘍において新たな遺伝子変異が次々と報告され、その発症機構から新たなclass分類の検討がなされている。従来class I、class II 遺伝子異常に加え、種々のエピジェネティックな遺伝子異常が白血病発症に関与していることが明らかにされており、成人領域では、*IDH1/2*、*TET2*、*DNMT3A* などDNAメチル化制御関連遺伝子や、*EZH2*²⁸⁾ や *ASXL1*^{29,30)} などのヒストン制御に関わる遺伝子など様々なエピゲノム修飾分子の遺伝子変異により遺伝子発現制御が破綻することで、AML発症に深く関与することが示されている。さらに *TP53* や *CDKN2A/B* など癌抑制遺伝子の異常、さらに、*U2AF1* や *SF3B1* などRNAスプライシング関連遺伝子変異も白血病発症に関連する可能性も示唆されている³¹⁾。これらのエピゲノム関連遺伝子の変異は他のclass I、class II 遺伝子変異と重複することも多く、細胞増殖や分化停止とは異なる新たな代謝異常に基づく白血球機構も関与し、それぞれ異なる多彩な遺伝子変異が複雑にからみ合って、白

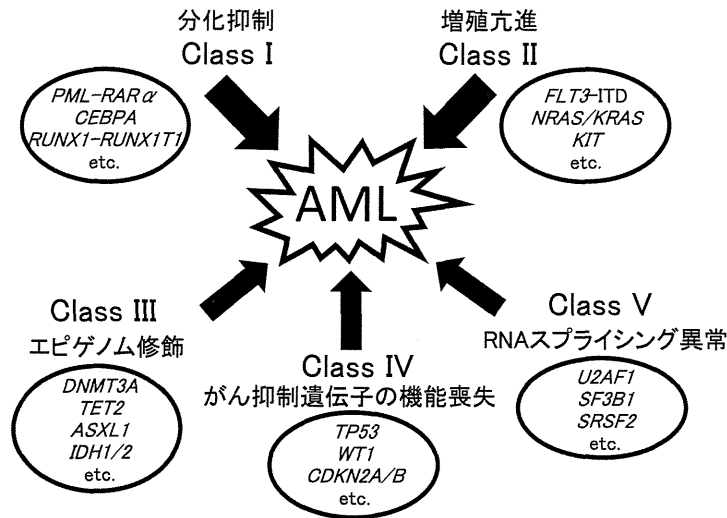


図1 AML発症に関与する様々遺伝子異常. AMLの発症には古典的には細胞増殖に関与するClass I遺伝子と細胞の分化に関与するClass II遺伝子の少なくとも2つの遺伝子異常が必要と考えられてきた. さらに近年はエピゲノム修飾やがん抑制遺伝子の機能喪失, RNA スプライシングに関与する遺伝子の異常がAMLの発症と病態形成に関与していると考えられている.

血病の発症・進展に至るものと考えられる (図1).

しかしながら, これらの成人で高頻度に認められる *DNMT3A* や *TET2*, *IDH1/2* は小児 AML ではきわめてまれであり³²⁻³⁴⁾, 成人と小児ではAMLの発症病因は大きく異なっているものと考えられ, 小児AMLでは染色体異常に加え, これらの遺伝子異常により予後が規定されていると考えられる.

IV AMLの全エクソン解析

ヒトゲノムプロジェクトによって2003年にヒトゲノム配列の解読がほぼ完了³⁵⁾したことにより, 遺伝子解析技術は, この10年間で飛躍的な進歩を遂げた. とりわけ, 標準となるゲノム配列が明らかになったことは, 次世代シーケンサーと呼ばれる大量並列型シーケンサーを用いた全ゲノムなどを対象とした網羅的なシーケンス解析を可能とし, 遺伝性疾患や腫瘍性疾患の研究に応用され, 新たな原因遺伝子が次々に同定されている³⁶⁻³⁸⁾. 成人AMLでは, 2008年に初めての腫瘍性疾患におけるヒト全ゲノムシーケンス解析研究として, 成人正常核型例の解析結果が米国ワシントン大学のグループにより報告され³⁹⁾, 2009年には同大学を中心とするTCGAにより行われた全ゲノムシーケンスにて, *IDH1* や *DNMT3A* 変異などの新規の標的遺伝子が同定された. *DNMT3A* は成人AMLの正常核型の約30%超にみられる予後不良な遺伝子変異であり, 治療層別化に重要な因子となっている⁴⁰⁾. また網羅的な遺伝子解析が可能になったことで, 従来よりもより正確な頻度で変異を同定することが可能となり, これまで, 予後不良一辺

倒と考えられてきた *FLT3-ITD* は, 合併する遺伝子変異によっては, 高リスク群には層別化せず, 中間リスク群に評価すべきとの報告も出始めており (図2), 今後, 層別化リスクの再編が進むものと考えられる⁴¹⁾.

また, 2013年には200例の成人 *de novo* AMLのシーケンス解析結果 (全ゲノム50例, 全エクソン150例) が報告され⁸⁾, AMLの主要な病型における主たるゲノム異常がほぼ明らかとなるなど, すばらしい成果が報告された. しかしながら, 新規にインパクトのある遺伝子変異は同定されておらず, 今後, AMLの遺伝子異常による治療層別化をどのように行っていくべきかが課題となった.

著者らは小児AML19例において新規の遺伝子変異を同定する目的で, 全エクソーム解析を施行した. 19例の内訳はCBF-AML5例, *MLL* 遺伝子再構成例6例, 急性巨核芽性白血病 (AMKL) 2例, その他6例であった. その結果, 小児AML19例で同定された体細胞変異数は計80個で, 1症例あたり平均4.2個であった. 成人のAMLでは平均約10個程度同定されていることから, 小児では少ない傾向にあり, 解析した症例数は少ないものの, AMKLと *MLL* 遺伝子再構成陽性AMLで特に少ない傾向がみられ, TCGAからの成人からの報告と同様の傾向がみられた⁸⁾. 19例中, 複数の症例で見つかった変異は *NRAS* と *FLT3-tyrosine kinase domain* (TKD) だけであった. *DNMT3A* や *TET2* のような成人で報告の多い遺伝子変異は今回の解析ではやはり同定されておらず, *KIT* や *CEBPA* といった過去にAMLで報告のある遺伝子が1例ずつ同定された. 以上の結果からは, AMLは非常にheterogeneityの強い腫瘍であると考えられる. また近年報告のある *ASXL2* などの

Cytogenetic Classification	Mutations		Overall Risk Profile
Favorable	Any		Favorable
Normal karyotype or intermediate-risk cytogenetic lesions	<i>FLT3</i> -ITD-negative	Mutant <i>NPM1</i> and <i>IDH1</i> or <i>IDH2</i>	Intermediate
	<i>FLT3</i> -ITD-negative	Wild-type <i>ASXL1</i> , <i>MLL</i> -PTD, <i>PHF6</i> , and <i>TET2</i>	
	<i>FLT3</i> -ITD-negative or positive	Mutant <i>CEBPA</i>	
	<i>FLT3</i> -ITD-positive	Wild-type <i>MLL</i> -PTD, <i>TET2</i> , and <i>DNMT3A</i> and trisomy 8-negative	Unfavorable
	<i>FLT3</i> -ITD-negative	Mutant <i>TET2</i> , <i>MLL</i> -PTD, <i>ASXL1</i> , or <i>PHF6</i>	
<i>FLT3</i> -ITD-positive	Mutant <i>TET2</i> , <i>MLL</i> -PTD, <i>DNMT3A</i> , or trisomy 8, without mutant <i>CEBPA</i>		
Unfavorable	Any		

図2 *FLT3*-ITDと他の遺伝子異常の組み合わせによる新たなリスク層別化。これまで、予後不良一辺倒と考えられてきた*FLT3*-ITDは、合併する遺伝子変異によっては、高リスク群には層別化せず、中間リスク群に評価すべきとの報告が出始めており、今後、リスク層別化の再編が進むものと考えられる (Ref. 41より引用)。

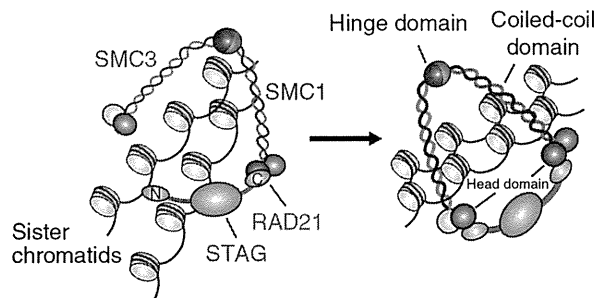


図3 コヒーシン複合体の模式図。コヒーシンは、細胞分裂の際に姉妹染色体を接着させ、染色体を均等分離する過程において、中心的な役割を果たすタンパク複合体であり、STAGおよびSMCタンパク、Rad21からなるコア・ユニットといくつかの機能制御分子から構成される (Ref. 42より引用)。

ポリコム関連遺伝子や*SMC3*、*RAD21*などのコヒーシン関連遺伝子が同定された。コヒーシンは、細胞分裂の際に姉妹染色体を接着させ、染色体を均等分離する過程において、中心的な役割を果たすタンパク複合体であり、STAGおよびSMCタンパク、Rad21からなるコア・ユニットといくつかの機能制御分子からなる (図3)⁴²⁾。興味深いことにコヒーシンの遺伝子異常は、遺伝性疾患であるCornelia de Lange症候群やRoberts症候群の原因遺伝子であることが知られている^{43,44)}。また、近年、大腸癌をはじめとする、いくつかの固形腫瘍でコヒーシン関連遺伝子の後天的変異例の報告がされ、固形腫瘍における染色体異常との関連が示唆されている⁴⁴⁾。今回の19例の解析では、少なくとも、高頻度に見つかるようなAML発症の強烈なドライバーと

なるような変異は見つからなかった。ただ、今回の解析では、病型や染色体異常は様々なヘテロなAML症例の解析であり、今後、小児AMLに関連した複数症例でみられるような共通のドライバー変異を同定するためには、正常核型症例やt(8;21)症例に限るなど、ある程度亜群 (subgroup) を絞って解析を行う必要があると考えられた。

なぜ、小児では変異数が少ないのかを解き明かすヒントになると考えられる論文が2012年7月に米国ワシントン大学のWelchらのグループから報告されている⁴⁵⁾。AML 24例 (M1; 12例, M3; 12例) の全ゲノムシーケンスを行った際のsingle nucleotide variant (SNV) 数は、エクソンのコーディング領域であろうと、その他の部位であろうと各領域の遺伝子には均等にランダムに同様の頻度で体細胞変異が起こっていることが示された (図4)⁴⁵⁾。またAML 24例の1メガベースあたりの体細胞数変異数の分布をみると、きれいに正常細胞に期待されるポアソン分布と一致し、このことは白血病細胞にも正常細胞にもほぼ同様の頻度で変異が起きていることを示した (図5)⁴⁵⁾。さらにWelchらは、各年代の健常人から採取した末梢血由来の1個の造血幹細胞を培養してコロニーを形成させ、全エクソン解析を施行したところ、30代までは40代以降に比べ体細胞変異は少ない傾向にあり、個々の造血幹細胞には後天的な遺伝子変異が観察され、加齢とともに変異数は蓄積されていくことを示した (図6)⁴⁵⁾。1例のみで観察されるような稀な遺伝子変異の多くは、白血病につながる遺伝子異常を獲得する前から有していた、または、発症過程で偶然獲得したが、白血病には直接的には寄与していない変異 (パッセンジャー変異) であると推測される。これらの結

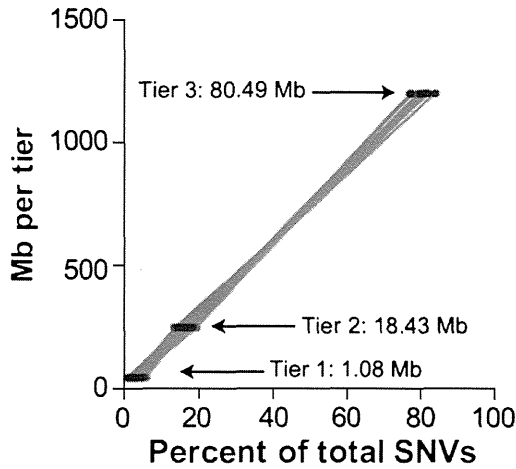


図4 遺伝子領域別における体細胞変異数の比較. 全ゲノムシーケンスを行った際の体細胞変異数は, エクソンのコーディング領域であろうと, その他の部位であろうと各領域の遺伝子には均等にランダムに同様の頻度で体細胞変異が起こっている (Ref. 45 より引用).

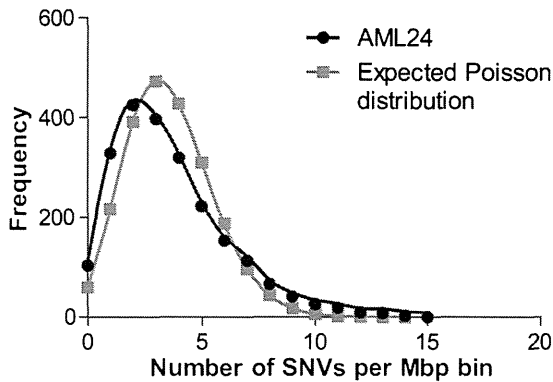


図5 白血病細胞にも正常細胞の体細胞数変異数の分布. AML 24例の1メガベースあたりの体細胞数変異数の分布をみると, 正常細胞に期待される体細胞変異数のポアソン分布と一致するため, 白血病細胞にも正常細胞にもほぼ同様の頻度で変異が起きていると考えられる (Ref. 45 より引用).

果は, 白血病細胞にも正常血液幹細胞にもほぼ同様の頻度で変異が蓄積されていき, ある特定の遺伝子だけに変異がおきてAMLが発症しているわけではなく, ランダムに発生する体細胞変異がたまたま白血病に関わる重要な遺伝子に発生し, かつその細胞の増殖アドバンテージが獲得された際にのみそれがドライバーとなって, AMLを発症するものと考えられる. 小児AMLでは成人に比し, 変異数は少ない傾向にあるため, 成人のデータに比べ, パッセンジャー変異が少ないと考えられ, よりAML発症の本質にかかわるような遺伝子変異が含まれている可能性がある.

さらに, Dingらは白血病細胞が発生する過程を詳細に検討しており, *DNMT3A* や *IDH*, *TET2* といった初期イベ

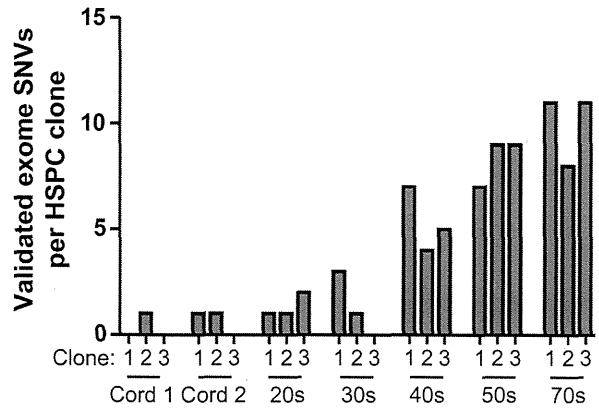


図6 年齢と後天的に獲得される体細胞変異数の関係. 各年代の健康人から採取した末梢血由来の1個の造血幹細胞を培養してコロニーを形成させ, 全エクソン解析を施行したところ, 個々の造血幹細胞には後天的な遺伝子変異が観察され, 加齢とともに変異数は蓄積されていく (Ref. 45 より引用).

トが起こったのち, *FLT3* の異常が加わって白血病細胞となり, その後, 様々なクローンに分かれている様子を示した (図7)⁴⁶⁾. このことは, 白血病細胞は単一の集団ではなく, 白血病細胞が増殖を繰り返す過程で起こる様々な一連の細胞遺伝学的なイベントが抗がん剤への耐性の獲得等に関与していることを示唆し, 再発・難治白血病といった治療抵抗性を生み出していると考えられる.

V Deep sequencingによるゲノム解析

次世代シーケンサーは, 網羅的に遺伝子変異を探索できるのみならず, 十分な深度でシーケンスすることで, アレル頻度を正確に測定することが可能となり, 特定の変異アレルを有する細胞がどの程度含まれているかを推測することができる⁴⁷⁾. 全ゲノムもしくは全エクソンシーケンスで同定された体細胞変異遺伝子についてターゲットキャプチャーもしくはPCRアンプリコンを用いたディープシーケンスを行うと, 各変異のアレル頻度が一定ではない症例が散見される. このことは, 多くの症例において均一の遺伝子異常を有した細胞から成るモノクローナルな細胞集団ではなく複数のクローンから構成されていることを示している. 腫瘍内の多様性が再発や治療抵抗性と大きく関わっていることが以前から提唱されていたが, ターゲットシーケンスを行うことで, AMLを含む様々な腫瘍において直接的に示されつつある⁴⁸⁻⁵⁰⁾. 変異アレル頻度を経時的に比較することにより, 腫瘍クローンが新たな変異を獲得して進化する過程も推測することが可能であり, 最も高頻度に観察される変異はすべてのクローンが共通して有している変異であり, 発症初期に獲得した変異であると考えられる. 著者らも全エクソーム解析で検出された体細胞変異

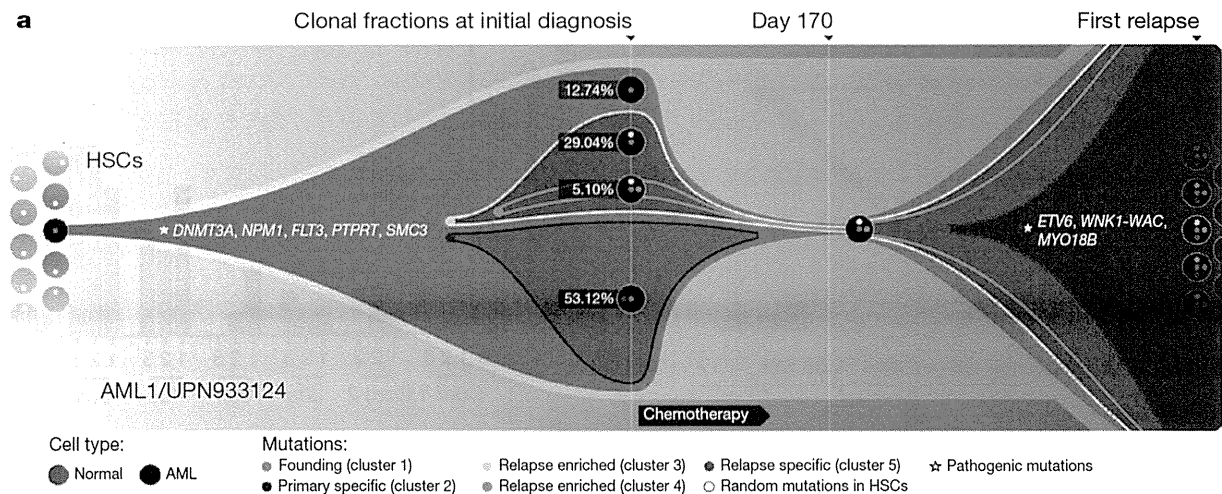


図7 白血病細胞の多様性. 白血病細胞が発生する過程では, *DNMT3A* や *IDH*, *TET2* といった初期イベントが起こったのち, *FLT3* の異常が加わって白血病細胞となり, その後, 様々なクローンに分かれていく (Ref. 46 より引用).

80 個に対し, ターゲット (ディープ) シーケンス (平均深度 48,000/変異) を行い, アレル頻度を調べたところ, 多くの症例で, 同一症例であっても遺伝子ごとのアレル頻度は大きく異なっており, *CEBPA* や *SMC3* などはアレル頻度が高く, 腫瘍の早い段階からかかわっている可能性が示唆された一方, *KIT* や *NRAS*, *FLT3*-TKD はアレル頻度が低く, *RAS* 経路やシグナル伝達に関連する遺伝子は比較的遅く変異が加わった可能性を示唆していると考えられる. このような腫瘍細胞の多様性が化学療法というふるいにかげられる中で再発や治療抵抗性の獲得に関連しているものと考えられた. また, このような遺伝子変異をマーカーに, ディープシーケンスを行うことは, MRD の高感度な検出においても有用であると考えられ⁵¹⁾, これまで適当なマーカーがなかった症例においても, モニタリングを可能にできる可能性を秘めており, 臨床現場への応用が期待される.

VI AML における遺伝子発現解析

発現アレイによる最初の白血病解析は 1999 年 Golub らにより *Science* に掲載され, 急性白血病患者において ALL と AML の鑑別が発現プロファイルによって可能と報告された⁵²⁾. 2004 年 Bullinger らにより *NEJM* に掲載された論文では, 成人 AML においてマイクロアレイによる詳細な分類が可能であることが発表され⁵³⁾, 同年 Ross らにより小児 AML に関する同様な解析結果が *Blood* に掲載され, マイクロアレイ診断の有用性が期待された⁵⁴⁾. 本邦の AML99 研究からも, 小児 AML において 54 例の発現解析結果が 2003 年に市川らから *Blood* に発表され, 発現アレイの有

用性が報告された⁵⁵⁾. さらに, 市川らは症例数を大幅に増やして, 小児 AML 130 例 (いずれも AML99 研究登録症例) で遺伝子発現解析を行い, 小児 AML が遺伝子発現により 6 つのグループ [*t(8;21)*, *t(15;17)*, *inv(16)*, *FAB-M4/M5*, *FAB-M7*, 特定の染色体転座を持たない *FAB-M0/M1/M2*] に分かれることを見出し, 遺伝子発現の観点からも病型分類が可能であることを報告した⁵⁶⁾. 近年, *MLL* 遺伝子再構成を有する症例においては, *EVII* 高発現例は予後不良であると報告されるなど, 遺伝子発現からの予後予測についての検討が続いている⁵⁷⁾. さらに我々は, 予後不良因子である *NUP98-NSD1* 遺伝子再構成を有する 6 例で特徴的な遺伝子発現パターンを示すことを報告し (図 8), さらに *NUP98-NSD1* 遺伝子再構成陰性例にも同様の遺伝子発現パターンを示す症例が多数存在することを見出し (*NUP98-NSD1* like), *NUP98-NSD1* 遺伝子再構成陽性例同様, 予後不良であることを同定した¹⁴⁾ (図 9). これらの関係は急性リンパ性白血病 (ALL) にいうフィラデルフィア染色体陽性 ALL (*Ph1+ALL*) と *Ph1-like ALL* の関係と酷似しており, 現在, これらの症例の細胞遺伝学的な背景に関して, 詳細な検討を行っている.

VII 結語

近年の分子生物学の進歩はめざましく, マイクロアレイ, 次世代シーケンサーの登場により, AML の診断技術は飛躍的に進歩している. 特に成人 AML では, TCGA により網羅的に遺伝子解析がなされ, 予後予測に重要な役割を果たすゲノム異常はほぼ明らかとなっている. 一方, 小児 AML では, これまでにエクソン解析に関するま

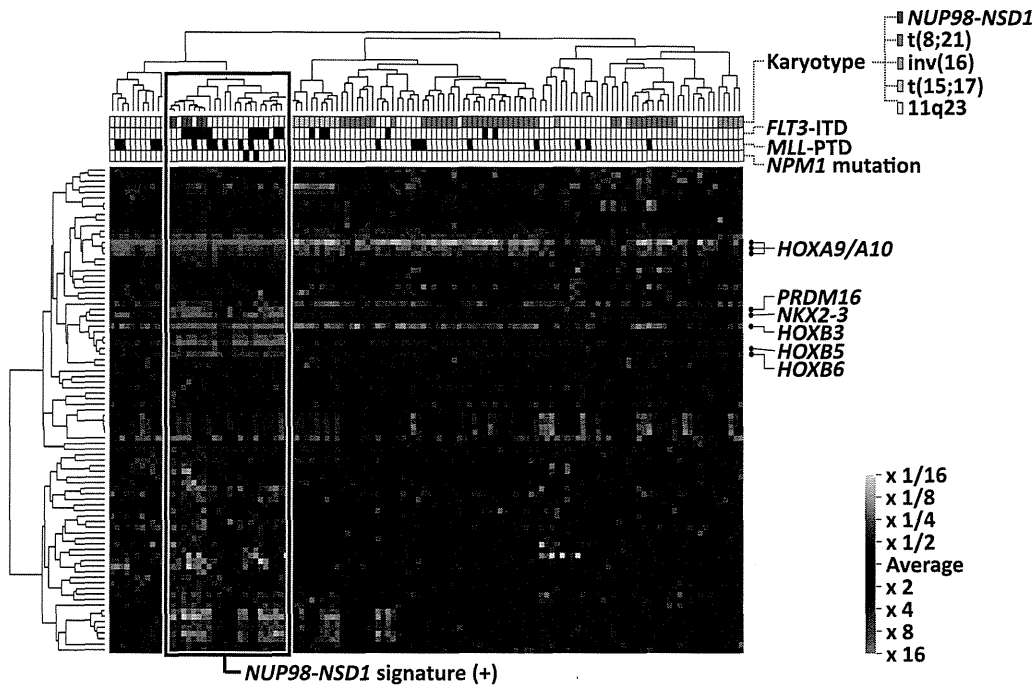


図8 *NUP98-NSD1* signature. AML 124例中6例で*NUP98-NSD1* 遺伝子再構成を同定し、この6例は特徴的な遺伝子発現パターンを示した。さらに*NUP98-NSD1* 遺伝子再構成陰性例にも同様の遺伝子発現パターンを示す症例 (*NUP98-NSD1* like) が多数存在 (118例中18例) していた (Ref. 14より引用)。

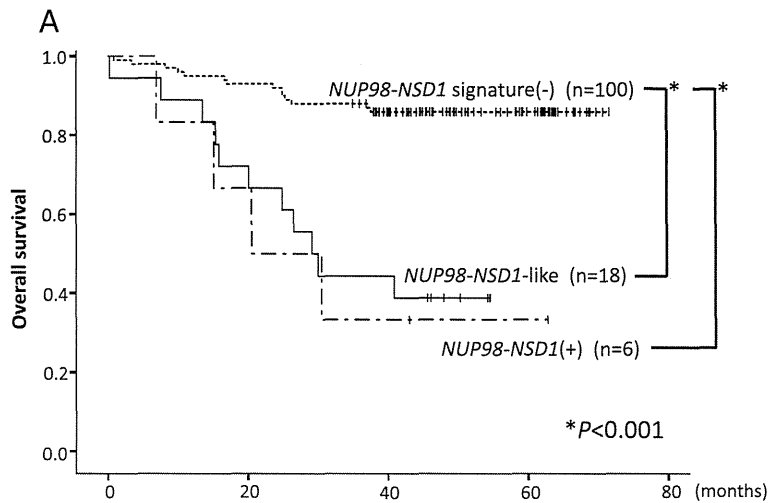


図9 *NUP98-NSD1*-like 症例の4年全生存率。 *NUP98-NSD1*-like 症例は、 *NUP98-NSD1* 遺伝子再構成陽性例同様、予後不良であった (Ref. 14より引用)。

た報告はなく、本邦において予後指標として確立されている遺伝子異常は *FLT3-ITD* のみというのが現状である。今回、著者らの小児AML 19例の解析では、小児AMLの遺伝子変異の複雑性は明らかとなったが、新たな標的となる遺伝子変異を見つけることはできず、今後、どのような切り口で遺伝子異常を同定していくかが大きな課題である。

今後、臨床研究と連動した検討がなされ、個々の遺伝子異常や遺伝子異常の組み合わせによる予後との関係が明らかとなり、よりの確な予後層別化がなされるとともに、明らかになったゲノム異常から分子病態が解明され、新たな標的に対する有効かつ副作用の少ない分子標的薬剤が開発・臨床応用されることが期待される。

文 献

- 1) Kaspers GJ, Zwaan CM: Pediatric acute myeloid leukemia: Towards high-quality cure of all patients. *Haematologica*, 92: 1519–1532, 2007.
- 2) Ley TJ, Ding L, Walter MJ, et al: DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 363: 2424–2433, 2010.
- 3) Yan XJ, Xu J, Gu ZH, et al: Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene *DNMT3A* in acute monocytic leukemia. *Nat Genet*, 43: 309–315, 2011.
- 4) Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, et al: Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood*, 114: 144–147, 2009.
- 5) Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al: Mutation in *TET2* in myeloid cancers. *N Engl J Med*, 360: 2289–2301, 2009.
- 6) Marcucci G, Maharry K, Wu YZ, et al: IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol*, 28: 2348–2355, 2010.
- 7) Abbas S, Lugthart S, Kavelaars FG, et al: Acquired mutations in the genes encoding IDH1 and IDH2 both are recurrent aberrations in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. *Blood*, 116: 2122–2126, 2010.
- 8) Ley TJ, Miller C, Ding L, et al; Cancer Genome Atlas Research Network: Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 368: 2059–2074, 2013.
- 9) Rowley JD: Chromosomal translocations: revisited yet again. *Blood*, 112: 2183–2189, 2008.
- 10) Grimwade D, Walker H, Oliver F, et al: The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood*, 92: 2322–2333, 1998.
- 11) Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, et al: Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood*, 96: 4075–4083, 2000.
- 12) Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, et al: Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with *de novo* acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood*, 100: 4325–4336, 2002.
- 13) 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: 3645–3656, 2011.
- 14) Shiba N, Ichikawa H, Taki T, et al: 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.
- 15) Frohling S, Scholl C, Gilliland DG, et al: Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol*, 23: 6285–6295, 2005.
- 16) Marcucci G, Haferlach T, Dohner H: Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol*, 29: 475–486, 2011.
- 17) Meshinchi S, Woods WG, Stirewalt DL, et al: Prevalence and prognostic significance of FIt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood*, 97: 89–94, 2001.
- 18) Mrozek K, Marcucci G, Paschka P, et al: Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood*, 109: 431–448, 2007.
- 19) Falini B, Mecucci C, Tiacci E, et al: GIMEMA Acute Leukemia Working Party. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med*, 352: 254–266, 2005.
- 20) Frohling S, Schlenk RF, Stolze I, et al: *CEBPA* mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol*, 22: 624–633, 2004.
- 21) Shimada A, Taki T, Tabuchi K, et al: Tandem duplications of MLL and FLT3 are correlated with poor prognoses in pediatric acute myeloid leukemia: A study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Pediatr Blood Cancer*, 50: 264–269, 2008.
- 22) Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K, et al: Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*, 106: 2854–2861, 2005.
- 23) Hollink IH, Zwaan CM, Zimmermann M, et al: Favorable prognostic impact of NPM1 gene mutations in childhood acute myeloid leukemia, with emphasis on cytogenetically normal AML. *Leukemia*, 23: 262–270, 2009.
- 24) Shiba N, Funato M, Ohki K, et al: Mutations of the GATA2 and CEBPA genes in paediatric acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, 164: 142–145, 2014.
- 25) Hollink IH, van den Heuvel-Eibrink MM, Zimmermann M, et al: Clinical relevance of Wilms tumor 1 gene mutations in childhood acute myeloid leukemia. *Blood*, 113: 5951–5960, 2009.
- 26) Sano H, Shimada A, Tabuchi K, et al: 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.
- 27) Speck NA, Gilliland DG: Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer*, 2: 502–513, 2002.
- 28) Neff T, Sinha AU, Kluk MJ, et al: Polycomb repressive complex 2 is required for MLL-AF9 leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109: 5028–5033, 2012.
- 29) Chou WC, Huang HH, Hou HA, et al: Distinct clinical and bio-

- logical features of *de novo* acute myeloid leukemia with additional sex comb-like 1 (*ASXL1*) mutations. *Blood*, 116: 4086–4094, 2010.
- 30) Boulton J, Perry J, Pellagatti A, et al: Frequent mutation of the polycomb-associated gene *ASXL1* in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 24: 1062–1065, 2010.
- 31) Murati A, Brecqueville M, Devillier R, et al: Myeloid malignancies: mutations, models and management. *BMC Cancer*, 12: 304, 2012.
- 32) Shiba N, Taki T, Park MJ, et al: DNMT3A mutations are rare in childhood acute myeloid leukaemia, myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 156: 413–414, 2012.
- 33) Ho PA, Kutny MA, Alonzo TA, et al: Leukemic mutations in the methylation-associated genes DNMT3A and IDH2 are rare events in pediatric AML: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer*, 57: 204–209, 2011.
- 34) Hollink IH, Feng Q, Danen-van Oorschot AA, et al: Low frequency of DNMT3A mutations in pediatric AML, and the identification of the OCI-AML3 cell line as an in vitro model. *Leukemia*, 26: 371–373, 2012.
- 35) Collins FS, Morgan M, Patrino A: The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science*, 300: 286–290, 2003.
- 36) Mardis ER: A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature*, 470: 198–203, 2011.
- 37) Stratton MR: Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. *Science*, 331: 1553–1558, 2011.
- 38) Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, et al: Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet*, 12: 745–755, 2011.
- 39) Ley TJ, Mardis ER, Ding L, et al: DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature*, 456: 66–72, 2008.
- 40) Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, et al: Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med*, 361: 1058–1066, 2009.
- 41) Patel JP, Gonen M, Figueroa ME, et al: Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 366: 1079–1089, 2012.
- 42) Kon A, Shih LY, Minamoto M, et al: Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. *Nat Genet*, 45: 1232–1237, 2013.
- 43) Krantz ID, McCallum J, DeScipio C, et al: Cornelia de Lange syndrome is caused by mutations in *NIPBL*, the human homolog of *Drosophila melanogaster Nipped-B*. *Nat Genet*, 36: 631–635, 2004.
- 44) Solomon DA, Kim T, Diaz-Martinez LA, et al: Mutational inactivation of *STAG2* causes aneuploidy in human cancer. *Science*, 333: 1039–1043, 2011.
- 45) Welch JS, Ley TJ, Link DC, et al: The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell*, 150: 264–278, 2012.
- 46) Ding L, Ley TJ, Larson DE, et al: Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*, 481: 506–510, 2012.
- 47) Yoshida K, Sanada M, Ogawa S: Deep sequencing in cancer research. *Jpn J Clin Oncol*, 43: 110–115, 2013.
- 48) Ding L, Ley TJ, Larson DE, et al: Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*, 481: 506–510, 2012.
- 49) Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al: Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*, 366: 883–892, 2012.
- 50) Shah SP, Roth A, Goya R, et al: The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature*, 486: 395–399, 2012.
- 51) Thol F, Kolking B, Damm F, et al: Next-generation sequencing for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia patients with *FLT3*-ITD or *NPM1* mutations. *Genes Chromosomes Cancer*, 51: 689–695, 2012.
- 52) Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al: Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*, 286: 531–537, 1999.
- 53) Bullinger L, Döhner K, Bair E, et al: Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 350: 1605–1616, 2004.
- 54) Ross ME, Mahfouz R, Onciu M: Gene expression profiling of pediatric acute myelogenous leukemia. *Blood*, 104: 3679–3687, 2004.
- 55) Yagi T, Morimoto A, Eguchi M, et al: Identification of a gene expression signature associated with pediatric AML prognosis. *Blood*, 102: 1849–1856, 2003.
- 56) Jo A, Tsukimoto I, Ishii E, et al: Age-associated difference in gene expression of paediatric acute myelomonocytic lineage leukaemia (FAB M4 and M5 subtypes) and its correlation with prognosis. *Br J Haematol*, 144: 917–929, 2009.
- 57) Ho PA, Alonzo TA, Gerbing RB, et al: High *EVII* expression is associated with *MLL* rearrangements and predicts decreased survival in paediatric acute myeloid leukaemia: a report from the children's oncology group. *Br J Haematol*, 162: 670–677, 2013.

