

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：「希少がん・小児がん」（小児急性骨髄性白血病（AML）における新規予後因子・再発マーカーの探索）」

2. 研究開発代表者： 上久保靖彦（国立大学法人京都大学医学研究科人間健康科学系専攻准教授）

3. 研究開発の成果

（1）De novo 正常核型及び転座型 AML における新規予後因子の探索

de novo AML 臨床試験（AML-05）の寛解期検体を収集し、腫瘍検体とペアで解析を行った。また、MDS および MDS から移行した AML の骨髄液より DNA を抽出し、69 種類の既知のドライパー遺伝子を対象とした targeted sequence を行った。その結果各々、3 種類、10 種類の遺伝子変異が検出された。次に、骨髄液から FACS にて血球細胞、CD34+CD38+前駆細胞、CD34+CD38-幹細胞などをソーティングし、targeted sequence にて検出された変異の分布を調べ、それぞれの分画に含まれる変異遺伝子を血球分化モデルにマッピングした。

（2）Down 症候群急性骨髄白血病の診断時・寛解再発における新規予後因子の探索

JPLSG による ML-DS の治療研究、AML-D05 ならびに AML-D11 試験に登録された症例（全登録数 161 例）、再発症例を含む 44 症例の DS-AMKL 症例の全エクソンシーケンスを行った。複数の新規の変異遺伝子を同定し、「小児急性骨髄性白血病（AML）再発例と寛解導入不能例の前方視的研究」の臨床研究実施計画書・統計解析計画書・モックアップ図表を作成、JPLSG データセンターとの調整・プロトコールレビュー委員会の審査を受けた。

（3）De novo AML 再発例における新規予後因子の探索

小児 AML19 例の初発時、寛解時のペア検体から、エクソン解析を施行し同定された新規発症原因候補遺伝子に対し、Target Sequence および Sanger sequence により変異を確認し、確認された変異に対し、小児 AML182 例の検体を用いて、より正確な変異の頻度を調査し、臨床情報と照合することで、臨床的意義について検討を行った。これらの遺伝子異常の相互関係および臨床像との関係では、今回見出した遺伝子変異による予後の有意な差は見いだせなかった。全エクソン解析の後の Target Sequence でいくつかの新規遺伝子を見出したが、この変異の有無で予後との有意差は見られなかった。一方、再発した 4 例で初診と再発時の遺伝子の推移の検討で、再発に関与する遺伝子を見出しクローン進化の機序を明らかにすることができた。

（4）白血病パネルによる小児 AML の迅速かつ安価な予後予測システム開発

白血病発症に関係していると考えられる遺伝子の他に、先天性造血不全、免疫不全症に関与する 163 遺伝子をパネルにして、白血病細胞と寛解期細胞を比較する target deep sequence 法にて解析を行った。AML 約 20 例の解析では、KRAS、KIT、FLT3、WT1 など以外に、GATA1、IKZF1、MLH1、JAK3、SMARCB1、PU.1 などの somatic 変異の他、いくつかの germline variant も見つかった。本システムは、比較的迅速かつ安価に白血病に関与する網羅的な遺伝子解析が可能で、パネルの改良は今後も必要であるが、所期の目的は達した。今後は予想以上に多く見つかる germline variant について、真に小児 AML 発症に関与しているかどうかの検討が必要である。