主論文の要旨

IKZF1 and *CRLF2* Gene Alterations Correlate With Poor Prognosis in Japanese *BCR-ABL1*-Negative High-Risk B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia

（*IKZF1*と*CRLF2*遺伝子異常は日本人における高リスク*BCR-ABL1*陰性B細胞性急性リンパ性白血病において予後不良と相関する）

名古屋大学大学院医学系研究科　分子総合医学専攻
生物化学講座　分子細胞化学分野
（指導：岡島 徹也　教授）
山下 友加

【背景】

小児前駆 B 細胞性リンパ性白血病(BCP-ALL)は、リスク因子や治療反応性を用いた治療層別化や多剤併用療法などの治療法の進歩により、近年の 5 年全生存率は約90%と良好である。しかし未だ 20-30%が再発・難治例であり、これらの群は予後不良であることが問題となっている。また、長期生存例の増加により Quality of Life (QOL)の向上・晩期合併症の低減が急務である。そこで、副作用の少ない治療法の開発や治療の適正化を図るために新規層別化因子の探索が行われている。近年の網羅的な遺伝子解析から、予後不良群であるフィラデルフィア染色体(Ph-)陽性 ALL と類似した発現パターンを持つ BCP-ALL の 1 群(Ph-like ALL)が見出された。この群では B 細胞系の分化に必須の転写因子である *IKZF1* や、*CRLF2*・*JAK2* といったチロシンキナーゼ関連の遺伝子変異が頻発し、新規予後不良因子として報告されている。*CLRF2* 高発現群では *P2RY8-CRLF2* や *IgH-CRLF2* といったキメラ遺伝子が高頻度に観察されることが報告されている。また、約半数の症例で *JAK2* R683 に遺伝子変異が認められることが報告されている。本研究では、本邦の小児 BCP-ALL におけるこれらの新規予後因子の臨床的意義について検討を行った。

【方法】

2004 年から 2008 年に小児がん白血病研究グループ ALL-2004 臨床研究にて治療を行った 264 症例のうち検体が入手可能であった 194 例の Ph 陰性 BCP-ALL を対象に研究を行った。対象症例の初診時骨髄もしくは末梢血より抽出した DNA と RNA を用いて解析を行った。検体に含まれる芽球は中央値 95%、範囲は 53.3-100%であった。Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)法にて *IKZF1* 変異を、real-time PCR によって *CRLF2* 遺伝子発現量の定量を行った。発現量は *GAPDH* をコントロールとした相対定量で測定し、中央値(13.8)の 10 倍(138) 以上の発現量を示すものを高発現群とした。RT-PCR 法にて *P2RY8-CRLF2* キメラ遺伝子スクリーニングを行った。また *JAK2* R683 遺伝子変異を検出するため、exon 16 を PCR により増幅し、サンガーシーケンス法によりスクリーニングを行った。各遺伝子異常の臨床的意義について、カプランマイヤー法による生存解析と Cox ハザードモデルによる多変量解析により統計的な検討を行った。観察期間の中央値は 6 年であった。

【結果】

MLPA 法による解析から、12%(22/177)の症例で *IKZF1* のいずれかのエクソンに欠失が認められた。片アリル欠失が 6 例、exon 4-7 欠失(*Ik6* isoform)が 6 例、 exon 2-7 欠失(*Ik10*)が 2 例、その他が 8 例であった。Homozygous deletion は認められなかった。RNA が入手可能であった 6 例について RT-PCR を行ったところ、DNA 欠失パターンに対応した *Ik6*, *Ik10* isoform の mRNA の発現が確認された。

次に RNA が入手可能であった 141 例において、real-time PCR による *CRLF2* 発

現解析を行ったところ、*CRLF2* 高発現群は 10.6% (15/141)であった。また *P2RY8-CRLF2* キメラ遺伝子は 141 例中 5 例で検出されたが、うち 2 例が *CRLF2* 高発現の症例であった。キメラ遺伝子の結合部をシーケンスしたところ、いずれも *P2RY8* の non-coding region である exon 1 の下流と *CRLF2* の exon 1 もしくは exon 2 が結合していた。*JAK2* R683 異常は 177 例中 1 例のみで認められ、この症例では同時に *IKZF1* 欠失と *CRLF2* 高発現が認められた。また、同時に *P2RY8-CRLF2* キメラ遺伝子も認められた。

次にこれらの遺伝子異常の臨床的意義について統計解析を行った。カプランマイヤー法による生存率の解析では、*IKZF1* 欠失群と *CRLF2* 高発現群はそれぞれ、全症例を対象とした場合にも予後不良であったが、特に NCI (National Cancer Institute)-HR (High Risk)群において予後不良であり（4y- event-free survival (EFS), *IKZF1* del.：58% vs. wild type：87%, p=0.02; *CRLF2*-high：62% vs. low：88%, p=0.04）、NCI-SR (Standard Risk)群では予後に差が認められなかった（Figure 1)。次に、*IKZF1* と *CRLF2* の 2 つの異常の相乗効果について解析を行った。解析可能であった 124 例中 *IKZF1* 変異と *CRLF2* 高発現の両方を持つ症例は 5 例であり、この群は片方の異常のみを持つ群と比較して著しく予後不良であった（4y-EFS, 20%)。単変量解析では、*IKZF1* 変異と *CRLF2* 高発現は有意な予後不良因子であった (Table I)。多変量解析では、全症例を対象とした場合には *IKZF1* 変異のみが有意な予後不良因子であったが、NCI-HR のみを対象とした場合には、独立した因子は認められなかった。

【考察】

本研究では、欧米とほぼ同頻度(10%~20%)で *IKZF1* 及び *CRLF2* 遺伝子異常が認められた。また既報と同様に変異群は予後不良であった。特に NCI-HR 群においては予後不良であったが、NCI-SR においては予後と相関は認められなかった。また、*IKZF1* と *CRLF2* の両方の異常を持つ群は著しく予後不良であった。一方、*JAK2* 遺伝子変異は欧米では約 20%に認められるのに対し、本研究では 1 例のみと非常に稀であることが示された。これは人種差によるものかも知れないが、白血病において変異が認められる *JAK1, JAK3* などの他の遺伝子ファミリーの異常についても今後検討を行っていきたい。*IKZF1* には様々な欠失パターンが認められた。欠失パターンと予後との相関については、Mi らのグループが *Ik6* isoform が予後不良因子となることを報告している。しかし本研究では *Ik6* は *IKZF1* 欠失群の 1/3 にしか認められず、特に予後との相関は認められなかった。Isoform ごとの意義については今後多数例での解析が必要であると考える。*CRLF2* キメラ遺伝子については、*P2RY8-CRLF2* と *IgH-CRLF2* の 2 つが報告されているが、後者は切断点が多様であるため FISH などによる解析が必要である。しかし本研究では検体が入手不能であったため *P2RY8-CRLF2* のみ解析を行った。*CRLF2* キメラ遺伝子は *CRLF2* 高発現群の 45%に認められ、予後不良であることが Palmi らによって報告されている。本研究では

CRLF2 高発現群の 13%に認められたが、*CRLF2* 低発現群においても 2%で *P2RY8-CRLF2* が検出された。*P2RY8-CRLF2* 陽性例のうち *CRLF2* 高発現かつ *IKZF1* 欠失例の 1 例以外は全て寛解生存しており、本研究ではその臨床的意義は認められなかった。*CRLF2* 遺伝子異常の臨床的意義については、治療プロトコールに依存するとの報告もあり、今後別のコホートでも検証する必要があると考える。

【結語】

本邦の症例においても、*IKZF1* 及び *CRLF2* 遺伝子異常が NCI-HR 群において、予後不良因子であることが示された。しかし、多変量解析では有意差が認められなかったため、今後多数例での解析を行っていきたい。