

主論文の要旨

**Integrated molecular profiling of juvenile
myelomonocytic leukemia**

〔若年性骨髄単球性白血病に対する網羅的遺伝子解析〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
発育・加齢医学講座 小児科学分野

(指導：高橋 義行 教授)

村上 典寛

【緒言】

若年性骨髄単球性白血病 (Juvenile myelomonocytic leukemia; JMML) は乳幼児期に発症する稀な骨髄異形成/骨髄増殖性疾患 (Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms; MDS/MPN) の一種である。

一般的に通常の化学療法に対して抵抗性であり、造血幹細胞移植が唯一の根治的治療法であるが、その長期生存率は 50-60% と低く非常に予後不良な疾患である。一方で、化学療法や造血幹細胞移植を行わなくても、自然に症状が改善する症例も存在することが報告されており、治療の選択に苦慮する疾患である。

約 90% の症例で RAS 経路関連遺伝子 (*PTPN11*、*NF1*、*NRAS*、*KRAS*、*CBL*) の体細胞変異 (somatic mutation) / 生殖細胞系列変異 (germline mutation) が同定され、RAS 経路の異常活性化が本疾患の原因と考えられている。しかしながら、RAS 経路関連遺伝子変異陰性例の分子生物学的病因はいまだ明らかになっていない。

これまでにいくつかのバイオマーカーが予後不良因子として報告されているが、これらの予後不良因子同士の相互関係はあきらかになっていない。

これらの問題を解決するために、我々は 150 例の JMML 検体を用いて網羅的遺伝子解析を施行した。

【対象と方法】

135 例の JMML 患者、および 15 例のヌーナン症候群関連骨髄増殖性疾患 (Noonan syndrome associated myeloproliferative disorder; NS/MPD) 患者の合計 150 例が本研究に登録された。NS/MPD は *PTPN11* の germline mutation が原因の先天性疾患であるヌーナン症候群に合併する JMML の類縁疾患で広義の JMML に含まれている。一般的に化学療法や造血幹細胞移植を行わずとも自然寛解することが知られている。

これら合計 150 例の患者検体を用いて、変異解析として全例で全エクソームシーケンス (69 例)、またはターゲットディープシーケンス (81 例) を施行した。さらに 129 例で RNA シーケンス、106 例で全ゲノムメチル化解析を施行した。その後 NS/MPD の症例を除外した 135 例の JMML 患者で予後解析を行った。

【結果】

変異解析の結果 134 例 (89%) で RAS 経路関連遺伝子変異が同定され、2 例で新規の RAS 経路遺伝子変異である *SOS1* の変異を同定した (Figure 1)。また 23 例 (15%) で secondary mutation として *SETBP1*、*JAK3*、*ASXL1* の変異を認めた。

RNA シーケンスの結果、RAS 経路遺伝子変異陰性の 16 例中 3 例で *ALK/ROS1* チロシンキナーゼ関連融合遺伝子 (*RANBP2-ALK*、*DCTN1-ALK*、*TBLIXR1-ROS1* Figure 2) が同定された。このうちの 2 例 (*DCTN1-ALK*、*TBLIXR1-ROS1*) は標準的な治療 (化学療法や造血幹細胞移植) に反応せず発症後早期に死亡しており、このチロシンキナーゼ関連融合遺伝子を有する JMML 症例は非常に予後不良であると考えられた。

RANBP2-ALK 陽性症例は本研究期間中に発症しており、診断後早期に融合遺伝子を

同定することができた。この患者の腫瘍細胞を用いて、*in vivo* でコロニーアッセイを施行したところ、ALK 阻害剤であるクリゾチニブが、腫瘍細胞の増殖を著明に抑制することが分かった (Figure 3)。この結果に基づき、適応外使用に関しての患者・保護者の同意を得た上で、この患者にクリゾチニブの投与を行った (Figure 4)。その結果、クリゾチニブ投与開始約 1 か月後に、分子生物的寛解を達成し、非常に良い状態で骨髄移植を施行することができた。現在移植後 2 年以上経過するが、再発なく経過している。

我々は 106 例で全ゲノムメチル化解析を施行し、得られたデータにインターネット上にデポジットされている 14 例の急性骨髄性白血病 (Acute myeloid leukemia; AML) 症例、および 5 例の正常造血幹細胞のデータを追加して階層的クラスタリング解析 (hierarchical clustering) を施行した。その結果「高メチル化群」、および「低メチル化群」の二群に JMML 患者が二分されることが分かった (Figure 5)。興味深いことに AML の全症例は高メチル化群に分類された一方、正常造血幹細胞および NS/MPD 症例は全例低メチル化群に分類された。Gene set enrichment analysis (GSEA) の手法を用いて両群のメチル化パターンの比較を行ったところ、高メチル化群は AML に類似したメチル化パターンを示すことがわかった。また高メチル化群は低メチル化群と比較し有意に予後不良であり (5 年全生存率: 46.0% vs 73.4% $p = 2.8 \times 10^{-3}$)、高メチル化群は新たな予後不良因子であると考えられた。

我々は 105 例の患者で RNA シーケンスで得られた遺伝子発現データを用いて階層的クラスタリングを施行した。この際発現アレイのデータを用いた骨髄異形症候群 (Myelodysplastic syndrome; MDS) および白血病の分類モデルである DC モデルに関連した 435 遺伝子を用いた。その結果クラスター1、クラスター2、クラスター3 の 3 群に JMML 症例が分類されることが分かった。このうちクラスター1 は既報の予後不良発現パターンである、AML 型発現プロファイルに発現パターンが一致することが分かり、クラスター1 を AML 型発現プロファイル群、クラスター2、3 を非 AML 型発現プロファイル群とした。AML 型発現プロファイル群は過去の報告同様に非 AML 型発現プロファイル群と比較し予後不良であった (5 年全生存率: 47.2% vs 61.4% $p = 0.2$)。さらに高メチル化群、低メチル化群の二群間で発現差異解析 (Differential expression analysis; DEA) を施行したところ、高メチル化群では既報の予後不良因子である *LIN28B*、およびその下流の *HMG2* の高発現を認めた。

最後に我々は、メチル化プロファイル、遺伝子発現プロファイル、遺伝子変異、臨床的バイオマーカー、および予後の相互関係について統合的遺伝子解析を行った。その結果、高メチル化群は診断時高年齢、ヘモグロビン F 高値、血小板低値、*PTPN11/NF1* 変異、secondary mutation、*LIN28B* 高発現、AML 型発現プロファイル等、既報の予後不良因子の多くと統計学的有意に関連し、予後不良であることが分かった (Figure 6)。

【考察】

本研究において、RAS 関連遺伝子変異陰性 JMML の 3 例で *ALK/ROSI* チロシンキナ

一ゼ関連融合遺伝子が同定された。ALK、ROS1 は受容体型チロシンキナーゼの一種であり、肺がんや悪性リンパ腫など多くの悪性腫瘍で、これらの受容体型チロシンキナーゼ関連融合遺伝子が発症の原因となることが知られている。これらの融合遺伝子はいずれも ALK/ROS1 のチロシンキナーゼドメインが fusion partner の二量体形成促進ドメインと融合し、その結果チロシンキナーゼが異常活性化されることが原因とされている。今回同定された三つの融合遺伝子はいずれも同様の構造を有しており、同様の機序で JMML の発症に関連すると考えられた。

また、*RANBP2-ALK* 陽性 JMML 患者に *in vivo* の結果をもとに ALK 阻害薬であるクリゾチニブの投与を行った結果、速やかに分子生物学的寛解を達成し、理想的な状態で骨髄移植を施行することができた。その結果 2 年以上の無病生存を達成している。JMML の再発は移植後 1 年以内に起こることが多く、クリゾチニブを用いた標的治療を併用した骨髄移植によりこの患者を完治させることができたと考えている。

全ゲノムメチル化解析の結果、AML に類似したメチル化パターンを有する高メチル化群を新たな予後不良群として同定した。統合的遺伝子解析の結果、高メチル化群は既報の予後不良因子と統計学的有意に関連することが分かった。また既報の予後不良因子同士も相互に関連することが分かり、既報の予後不良因子の多くは共通の予後不良群の別々の側面を反映していると考えられた。

【結語】

我々は 150 例の JMML 検体を用いて統合的遺伝子解析を施行した。その結果新たな予後不良因子を同定し、JMML 患者が異なる生物学的、臨床的特徴を有する二群に分類されることを示した。また少数例ではあるが、標的治療が有効な一群を同定した。我々の研究成果は JMML の治療成績の改善および、将来的な層別化治療の開発に寄与すると考えられる。