

主論文の要約

**Comprehensive genetic analysis of donor cell derived
leukemia with *KMT2A* rearrangement**

〔 *KMT2A*再構成を有するドナー細胞由来白血病の
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)

谷口 理恵子

【緒言】

ドナー細胞由来白血病(Donor cell derived leukemia; DCL)は同種造血幹細胞移植後にドナー細胞を起源として発生する疾患である。DCLの発症率は造血幹細胞移植あたり0.1%と稀であり、予後は不良である。DCLの分子学的病因に関して、ドナー細胞中の潜在性白血病や白血病前駆細胞の存在、または白血病素因等のドナーに関連した発症機序がこれまでに提唱されている。しかし、DCLに関する遺伝子解析の報告はわずかであり、これまでに発見されていない分子病因が存在することが推測される。

今回我々は、DCLの発症機序を解明することを目的として、小児不応性貧血に対する同種骨髄移植後に*KMT2A*再構成を有するDCLを発症した患者において網羅的遺伝子解析を行った。

【対象と方法】

患者は5歳女児。2歳時に重度の汎血球減少をきたし、小児不応性貧血と診断された。既往歴や家族歴に特記事項はなかった。免疫抑制療法を行ったが反応不良であり、HLA(human leukocyte antigen)1座不適合の1歳の弟から骨髄移植を施行した。移植後20日で好中球生着し、性染色体FISH(fluorescence in situ hybridization)で99.6%がドナーキメリズムであった。急性GVHD(graft versus host disease)や重症感染症は認めなかった。移植から6か月後から血小板数が徐々に減少し、移植から12か月後に骨髄検査を行ったところ、白血病細胞を51%で認めた。形態および免疫学的に急性骨髄性白血病 FAB M0と診断した(Fig.1A)。G分染法にて、46,XY,der(10)ins(10;11)(p12;q13q23)del(11)(q13q21),del(11)(q?)の核型異常を20細胞中11細胞で認めた(Fig.1B)。FISH検査にて*KMT2A*再構成が確認された(Fig.1C)。性染色体FISHにて、白血病クローンはドナー由来であることが確認された(Fig.1D)。化学療法後の寛解期に、HLA1座不適合の非血縁ドナーから2回目の骨髄移植を施行した。移植後30日で好中球生着が得られたが、Grade 4の急性GVHDをきたし、肺感染症のために2回目の移植から286日後に死亡した。1回目の移植のドナーは骨髄提供から34か月後の現在、白血病をきたしていない。

患者の移植前の末梢血、ドナーの末梢血およびDCL発症時の患者の骨髄血を用いて全エクソーム解析を行い、患者及びドナーの胚細胞変異とDCL細胞の体細胞変異を網羅的に検出した。さらに、患者とドナーの胚細胞系サンプルを用いて全ゲノム解析を行い、白血病素因となり得る変異の検索を行った。次に、DCL細胞を用いてRNAシーケンス解析(RNA-seq)を行い、融合遺伝子の検出を行った。ドナーの移植時の骨髄血を用いてPCR及びdeep sequenceを行い、検出された融合遺伝子の検出を試みた。

【結果】

患者の移植前の末梢血とドナーの末梢血を用いて全エクソーム解析を行ったが、患者とドナーのいずれにおいても、白血病素因となり得る胚細胞変異は検出されなかった。さらに患者とドナーの胚細胞系サンプルを用いて全ゲノム解析を行ったが、診断

的な変異は検出されなかった。次に、DCL 細胞の全エクソーム解析を行い、体細胞変異の検索を行ったが、候補となる体細胞変異は検出されなかった。

DCL 細胞を用いて RNA-seq を行い、融合遺伝子の検出を行った。サンガー解析にて 4 つの候補融合遺伝子 (*KMT2A-MLLT10*, *MLLT10-FAM168A*, *GDI2-ARCNI*, *FAM208B-PLEKHB1*) の存在が確認された。全ての融合遺伝子が 10 番染色体と 11 番染色体に関連しており、複雑な染色体構造異常の存在が示唆された。*KMT2A-MLLT10* と *GDI2-ARCNI* はインフレーム融合であったが、他 2 つはアウトオブフレーム融合であった。*KMT2A-MLLT10* は白血病発症につながるということが明らかとなっており、今回生じたキメラタンパクには *KMT2A* 及び *MLLT10* の主要ドメインが保持されていた。一方、他の関連する遺伝子に関しては造血に関わる機能の報告は認めなかった。そのため、これら 4 つの融合遺伝子のうち、*KMT2A-MLLT10* のみ病的意義があると考えられた。*KMT2A-MLLT10* について、ゲノム DNA を用いた PCR 法で、染色体切断点を同定した。

移植時に凍結されたドナーの骨髄血から抽出したゲノム DNA を用いて、*KMT2A-MLLT10* の融合遺伝子の検出を試みた。*KMT2A-MLLT10* の融合点を含んだ遺伝子領域を特異的に増幅するプライマーを設計し、これらのプライマーを用いて、9.6 μ g の DNA において 96 回 PCR 反応を行った。これは、 $1-2 \times 10^6$ 細胞に相当するが、陽性反応は得られなかった。この結果は、PCR 産物を用いた deep sequence でも確認された。

【考察】

以前の研究では、DCL に関するいくつかの発症機序が提唱されている(Fig.2)。一つ目は、ドナー中の潜在性白血病細胞がレシピエントに移植される機序。二つ目は、ドナー中の前白血病細胞がレシピエントに移植され、レシピエント中で第二の変異を生じ白血病を発症する機序。三つ目は、ドナーが遺伝的素因を有しており、移植細胞がレシピエント中で第二の変異を獲得し白血病を発症する機序である。本症例では、ドナー及び患者で白血病素因となる胚細胞変異は検出されなかった。白血病細胞においては、*KMT2A* 遺伝子再構成以外の体細胞変異を認めず、また、遺伝子再構成はドナー骨髄において検出されなかった。すなわち、移植されたドナー細胞がレシピエントの骨髄中で *KMT2A* 遺伝子再構成を新たに生じ、白血病を発症したと考えられた。本症例は、患者とドナーに遺伝的素因が同定されないという点でこれまでの報告とは異なっており、DCL の新しい発症機序として提唱され得るものである。

KMT2A 再構成を伴う乳児急性リンパ性白血病は、他の recurrent なドライバー変異を伴うことは稀である。本症例は急性骨髄性白血病であるが、*KMT2A-MLLT10* と関連する融合遺伝子以外に体細胞変異は検出されず、*KMT2A-MLLT10* 融合遺伝子がそのみで白血病を引き起こしたと考えられる。これは、ドナー中に前白血病クローンが検出された過去の報告と対照的である。近年の研究で、加齢に関連した体細胞変異の蓄積がクローナルな造血を引き起こすと考えられている。しかしながら、我々の症例では、ドナーが非常に若年であり、過去の報告のようにドナーの造血細胞が体細胞変異

を蓄積していた可能性は低いと考えられる。

移植されたドナー細胞がレシピエント中で白血病誘発性変異を獲得する背景としては、骨髄微小環境の障害や反復性ストレスが要因となることが考えられる。

【結語】

今回検討した DCL では、移植後に獲得した遺伝子変異のみを原因として発症したと考えられた。これまでの報告における DCL とは異なる機序であり、DCL の新たな分子学的病因として提唱されるものであることが示唆された。DCL の遺伝学的背景の解明には、さらなる症例の蓄積が必要である。