

(別紙1)

総括研究報告書

課題番号：30 - 14B

課題名：小児白血病/リンパ腫の発症や予後に関係する融合遺伝子のパートナー遺伝子検出・診断法の開発

主任研究者 (所属施設) 国立成育医療研究センター研究所
(所属・職名 氏名) 小児血液・腫瘍研究部分子病理研究室 室長 大木健太郎

(研究成果の要約) 治療標的やリスクの層別化に関わる融合遺伝子や遺伝子変異、および近年新たに見出されてきた融合遺伝子や遺伝子変異を検出するために2018年度に設計した42遺伝子のカスタムプローブパネルについて、*JAK2*と*MLL*遺伝子領域を再設計後、既存の*JAK2*と*MLL*関連融合遺伝子異常を有する5症例のRNA保存検体を対象として、RNA target capture sequencing解析を行った。同定された異常について、サンガー法による確認を行い、*JAK2*と*MLL*関連の既知融合遺伝子を迅速に検出する解析法が開発できた。さらに、既知遺伝子異常が同定されていない40症例のRNAの保存検体対象として、RNA target capture sequencing解析を行い、これまでに同定されなかった*CRLF2*, *ZNF384*, *MEF2D*, *PAX5*, *JAK2*関連の既知融合遺伝子を迅速に検出することができた。次年度以降、多数検体で解析を行い、急性白血病/リンパ腫の診断アルゴリズムを確立するための準備に着手した。

1. 研究目的

急性白血病/リンパ腫は、種々の複合的遺伝子異常によって生ずる、多様な疾患群である。急性リンパ芽球性白血病/リンパ腫(ALL/LBL)と成熟Bリンパ腫のそれぞれの病型の中に、発症の主要原因と考えられる遺伝子異常(主に融合遺伝子や染色体数の異常等)によって、白血病細胞の生物学的特性や臨床特性が規定される様々な疾患entityを含む。例えば、B前駆細胞性ALL(BCP-ALL)は、B細胞系に特異的な抗原発現を示す細胞マーカー所見上の共通の特徴によって診断、分類されている。その中で、*BCR-ABL1*陽性のPh1-ALLや*ABL1*, *ABL2*, *PDGFRB*関連融合遺伝子が陽性のPh-like ALLの場合は、初発時末梢血白血球数が高く通常の化学療法に抵抗性を示す症例が多いが、チロシンキナーゼ阻害剤が有効であるという特徴を有する。*ETV6-RUNX1*陽性症例の場合は化学療法に対する治療反応性が良く予後良好である症例が多い。また近年の網羅的遺伝子解析により、見出されてきた*DUX4*関連融合遺伝子や*EP300-ZNF384*融合遺伝子陽性症例は年長児に多く、予後良好である症例が多い。以上のように、白血病/リンパ腫の発症に関わる遺伝子異常について、それぞれの臨床特性についての知見が集積されており、現在、治療標的となる遺

伝子異常やリスクの層別化に利用可能な遺伝子を検出する方法とアルゴリズムの整備が急務となっている。

本研究の目的は、小児急性白血病/リンパ腫において、治療標的やリスクの層別化に関わる融合遺伝子や遺伝子変異や近年新たに見出されてきた融合遺伝子や遺伝子変異、等について、カスタムプローブパネルを設計後、次世代シーケンサーを用いて、既存のRT-PCRやFISHに比べて、迅速かつ高感度に遺伝子異常を検出するための解析法を開発し、今後の臨床試験に利用するための診断アルゴリズムを確立することである。研究1年目の2018年度は解析対象の遺伝子異常を検出するためのカスタムプローブパネルを設計し、既存の遺伝子異常が明らかになっている症例に対して、RNA target capture sequencing解析を行い、既存の遺伝子異常を検出するための条件検討を行った。その結果、*ABL1*, *CRLF2*, *ZNF384*, *MEF2D*, *DUX4*, *ETV6*, *TCF3*, *PAX5*関連の既知融合遺伝子を迅速に検出する解析法が開発できた。一方で、*JAK2*, *MLL*関連の既知融合遺伝子は繰り返し条件検討を行ったが検出できなかった。研究2年目の2019年度は、*JAK2*, *MLL*関連遺伝子を検出可能にするために、カスタムプローブパネルを改良するとともに、既存の診断時解析で遺伝子異常を検出

できなかった臨床検体を対象とした解析を行い、今後の臨床試験に利用できるように、急性白血病/リンパ腫の診断アルゴリズムを確立することを目指す。

将来的には JPLSG の疾患委員会と協力して、臨床情報と統合的に解析し、治療層別化への応用を目指す。

2. 研究組織

研究者	所属施設
大木 健太郎	小児血液・腫瘍研究部
研究協力者	
清河 信敬	小児血液・腫瘍研究部
出口 隆生	小児がんセンター
渡部 悟	小児血液・腫瘍研究部
戸田 由香里	小児血液・腫瘍研究部

3. 研究成果

本年度の研究は、申請者ら急性白血病/リンパ腫において、2018 年度に設計したカスタムプローブパネルを再設計・作成後、昨年度検出できなかった *JAK2* と *MLL* 関連融合遺伝子を検出するための条件検討を行うとともに、既知の遺伝子異常が同定されていない症例を対象とした RNA target capture sequencing 解析を行い、診断アルゴリズムの開発を行った。

1) カスタムプローブパネルの再設計

2018 年度に設計したカスタムプローブパネルについて、*JAK2*、*MLL* 遺伝子領域を再設計し、既存の *JAK2* と *MLL* 関連融合遺伝子異常を有する 5 症例の RNA 保存検体を対象として、RNA target capture sequencing 解析を行った。同定された異常について、サンガー法による確認を行い、*JAK2* と *MLL* 関連の既知融合遺伝子を迅速に検出する解析法が開発できた。

2) 既知遺伝子異常を有さない症例を対象として、RNA target capture sequencing 解析法を用いた診断アルゴリズムの開発

「JPLSG における小児血液腫瘍性疾患を対象とした前方視的研究」において、検体の研究利用についてインフォームドコンセントが得られ、検体が保存されている症例で、既知遺伝子異常が同定されていない 40 症例の RNA の保存検体を JPLSG 検体保存センターから分与を受けた後、次世代シーケンサーを用いた RNA target capture sequencing 解析を行い、これまでに同定されなかった

CRLF2、*ZNF384*、*MEF2D*、*PAX5*、*JAK2* 関連の既知融合遺伝子を迅速に検出することができた。次年度以降に多数検体で解析を行い、急性白血病/リンパ腫の診断アルゴリズムを確立するための準備に着手した。

4. 研究内容の倫理面への配慮

本研究では、中央診断後の余剰検体を利用した検体研究であり、生年月日を含め、個人の特定に結びつく情報は取り扱わなかった。また、TCCSG 番号や JPLSG 番号と患者個人情報との照合表は該当する症例の診療施設で管理されており、研究者あるいは、研究実施施設で保持することはないため、試料の提供者が社会的不利益を受ける可能性は極めて低いと考えられるが、個人情報の保護に最新の注意を払い、検体を提供することによる不利益・危険性を排除するための最大限の努力を行った。本研究では、東京小児がん研究会 (TCCSG) 臨床研究、および日本小児がん研究グループ血液腫瘍分科会 (JPLSG) 疫学研究において、すでに研究利用の同意が得られた保存試料を対象とするため、あらためて同意を取得し直すことは無いが、本研究の実施、およびその内容について、以下の方法で情報を公開し、対象者に本研究における自身の試料の使用を拒否する機会を提供した。1) TCCSG、および JCCG ホームページおよび研究責任者の所属する施設のホームページ上で情報を公開した。2) 研究責任者や分担研究者の所属施設の病院外来に 1) と同内容のポスターを掲示した。

本研究の遂行においては、ヘルシンキ宣言を遵守し、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (平成 26 年 12 月 22 日制定)」を順守して行った。全ての研究は、成育で外部委員を含めた倫理審査委員会において、その科学性ならびに倫理性についての審査を受け、同委員会の承認ならびに実施機関の長の許可を得て実施した。成育においては、受付番号 1403「特徴的な細胞マーカー所見を示す白血病症例に対する網羅的遺伝子解析研究」、他、本件に関わる申請として 15 件について、倫理承認済みである。