

(別紙1)

## 総括研究報告書

課題番号：2019B-10

課題名：RUNX1-RUNX1T1 陽性小児急性骨髄性白血病における細胞表面抗原とゲノム解析及び予後との関連の検討

主任研究者 (所属施設) 国立成育医療研究センター  
(所属・職名 氏名) 小児がんセンター フェロー 坂本 謙一

(研究成果の要約) 本研究の目的は、RUNX1-RUNX1T1 陽性小児急性骨髄性白血病 (Acute myeloid leukemia, AML) の臨床情報、細胞表面抗原解析結果、ゲノム解析結果を統合し予後不良な一群の探索を行うことである。本年度は、臨床情報・細胞表面抗原データの収集と予後の探索、検体保存センターからの DNA、RNA の収集、解析済みゲノムデータの収集とゲノム解析の準備及び開始を目標とした。臨床データ、細胞表面抗原解析については、データ管理センターより RUNX1-RUNX1 陽性 AML 症例のデータを収集しデータセットの作成おこなった。その結果、細胞表面抗原の一つである CD19 が陽性の群と陰性の群では、陰性の群で予後が極めて不良であることを確認した。また、すでに論文発表済みのゲノムデータを用いて、CD19 陽性、陰性群での異常を確認したところ、CD19 陰性群では、c-kit と N-RAS の異常が多い傾向にあることがわかった。その後さらに解析を進め、3 点転座を有する症例が予後不良であること、ddPCR を用いた minor clone の解析を行い、KITD816V の minor clone を有する症例も予後不良であることがわかった。現在、RNA シークエンスが完了し、CD19 陰性群陽性群の発現プロファイルの違いを解析するとともに、新たな予後不良因子の抽出についても検討している。

### 1. 研究目的

小児急性骨髄性白血病 (小児 AML) の予後は、ゲノム異常や治療反応性を用いた治療層別化により急速に向上している。RUNX1-RUNX1T1 陽性 AML は CBF $\beta$ -MYH11 陽性 AML とともに Core-binding factor (CBF)-AML という一群をなし、小児 AML の約 25% を占める。この CBF-AML は、化学療法のみでの長期生存が期待され、予後良好群に分類され治療が行われる。しかし、RUNX1-RUNX1T1 陽性 AML の一部に再発率が高く、極めて予後不良な一群が存在しその予後の改善は急務の課題である。予後因子としては、白血病細胞の細胞表面抗原やゲノム異常が報告されているが明確な予後因子は存在せず、予後因子の探索及びその臨床応用は小児 AML の予後改善につながる。そこで本研究では、日本の小児 AML 治療研究で治療された RUNX1-RUNX1T1 陽性 AML 症例の臨床情報と白血病細胞の細胞表面抗原及びゲノム解析を行い、それら

を総合的に解析し予後因子を探索する。

### 2. 研究組織

研究者	所属施設
主任研究者	
坂本謙一	国立成育医療研究センター
研究協力者	
辻本信一	国立成育医療研究センター
富澤大輔	国立成育医療研究センター
加藤元博	国立成育医療研究センター
大木健太郎	国立成育医療研究センター
清河信敬	国立成育医療研究センター
出口隆生	国立成育医療研究センター
今村俊彦	京都府立医科大学小児科
柴徳生	横浜市立大学小児科
齋藤明子	名古屋医療センター
多賀崇	滋賀医科大学医学部小児科
足立壮一	京都大学人間健康科学

### 3. 研究成果

(1) 本年度の研究は、臨床情報、細胞表面抗原データの収集及び細胞表面抗原と予後の関連について探索、検体保存センターか

ら検体及び DNA, RNA の収集、解析済みのゲノムデータの収集、ゲノム解析の開始準備。

(イ) 2019年3月に、日本小児がん研究グループ(JCCG)の研究審査委員会に本研究の倫理審査提出を行った。修正の上、2019年8月上旬に JCCG 研究審査委員会で本研究遂行の承認を得た(研究審査番号:082)。その後、JCCG データセンター及び検体保存センターである成育医療センターに臨床データの提出ならびに RNA, DNA の分譲の依頼書を提出した。

(ロ) 本研究に用いる細胞表面抗原のデータを収集し、すでに同じ対象症例に対して行われた target sequence の一部の結果を収集した。さらに、細胞表面マーカー抗原のデータ、臨床データを収集しデータセットの作成を行った。

(ハ) 検体保存センターより、依頼していた RNA 及び DNA を 2020年3月上旬に拝受した。その上で解析対象症例の選別を行った。

## (2) ゲノム解析の実行

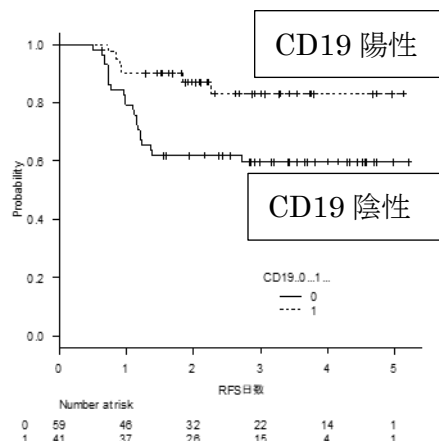
(イ) ゲノム解析に必要な、データセットの構築、及び対象遺伝子についての検討を研究協力者内で行った。主に細胞表面マーカーとゲノム異常がどのように関連するのかならびにそれがどのように予後と関連するかについての検討を行った。

(ロ) 既存データの収集  
すでに本研究と同様の対象者に対して、target sequence のプロジェクトが進んでおり、その研究代表者とデータの共有を開始した。

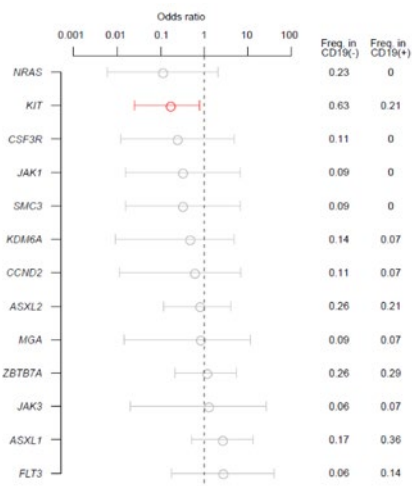
(ハ) RNA シークエンスの実行  
2020年12月に RNA シークエンス用ライブラリ作成が終了し、2021年1月にシークエンスを行い、データ解析を実施中である

## (3) 細胞表面マーカーと予後との関連

(イ) 細胞表面マーカーの一つである CD19 が予後と関連していることを報告しており、実際に我々が作成したデータセットでもそのことを示すことができた。

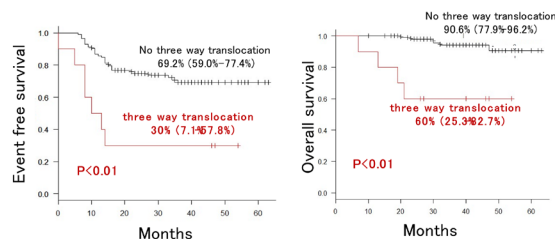


(ハ) 予後不良である CD19 陰性群では、c-kit, N-RAS の変異が多い傾向にあった。

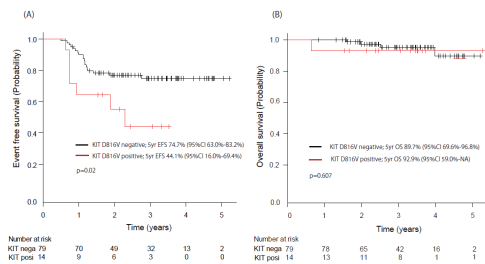


## (4) 染色体異常と予後の関連

(イ) 染色体異常と予後の関連の解析  
我々は染色体異常と予後について解析をすすめた、その結果、3点転座を有する症例は有さない症例と比較して予後不良であることを証明した。c-kit や CD19 陰性とは独立した予後不良因子であることがわかり、新たな予後不良マーカーを同定した。



(5)KIT D816V の minor clone と予後の関係  
 (イ) KITD816V は独立した予後不良因子であることは国内外で報告があるが、その minor clone の存在について検討した報告はない。我々は、ddPCR 法を用いて、KIT D816V の minor clone の存在について検討を行った。驚くべきことに、RYUNX1-RUNX1T1 を要する症例のみ、KIT D816V の minor clone を有することがわかった（他の遺伝子異常を有する AML では、minor clone の存在は検出されなかった）さらに、minor clone を有する症例を含めて KITD816V の予後解析を行ったところ、KIT D816V を有する症例は非常に予後が悪いことがわかった。この成果については現在論文投稿中である。



#### 4. 研究内容の倫理面への配慮

本研究は、日本小児がん研究グループの研究審査委員会及び成育医療研究センター

の倫理委員会での承認を得たうえで実施する。また、人を対象とする医学研究に関する倫理指針、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従って実施される。今回の研究に用いる情報や検体はすでに収集された情報及びゲノム解析についての承諾を得て保存された検体を用いるため新たな試料採取や臨床情報の取得は必要とせず、患者に対してあらたな不利益は生じない。また、患者の臨床情報の使用にあつたては、AML-05 研究で用いられた登録番号を用い、匿名化した上で厳重管理する。匿名化番号と登録番号の対応表については、成育医療研究センター研究所の個人情報管理者が厳重に保管・管理をしている。また、拒否の機会を設けるために、本研究について日本小児がん研究グループ及び成育医療研究センターにおいて HP ならびに掲示を行い、本計画の周知を行う。研究の拒否を申し出た患者情報については、登録番号をもとに解析から除外する。

なお、解析されたデータは研究代表者の下で厳重に保管される。AML05 研究における様々な臨床データは日本小児がん研究グループが定める個人情報管理責任体制のもと厳重に管理されている。