

学位論文(課程博士)

内 容 要 旨

(付)

履歴書

小児医科学

石 田 悠 志

平成 30 年 12 月申請

内 容 要 旨 目 次

主 論 文

Panel-based Next-generation Sequencing Identifies Prognostic and Actionable Genes in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia and is Suitable for Clinical Sequencing

(小児の急性リンパ性白血病において、パネル型次世代シーケンサー解析により予後に関与し、介入を変えうるような遺伝子変異の同定が可能であり、本手法は臨床的遺伝子解析に適している)

石田悠志, 井口晶裕, 青江伯規, 高橋孝英, 爲房宏輔, 金光喜一郎,
藤原かおり, 鷺尾佳奈, 松原岳大, 塚原宏一, 真田 昌, 嶋田 明

Annals of Hematology (掲載予定)

平成 30 年 4 月 米国がん研究学会にて発表

Panel-based Next-generation Sequencing Identifies Prognostic and Actionable Genes in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia and is Suitable for Clinical Sequencing

(小児の急性リンパ性白血病において、パネル型次世代シーケンサー解析により予後に関与し、介入を変えうるような遺伝子変異の同定が可能であり、本手法は臨床的遺伝子解析に適している)

[緒言]

急性リンパ性白血病 (ALL) は小児期における悪性腫瘍の中で最多である。ALL の治療成績は非常に改善したが、依然として再発する患者は多く、再発した場合にはその治癒率は 40%未満である。そのため結果として ALL は小児期の悪性腫瘍による死因として最多である。

これまで、小児 ALL において様々な再発リスク因子が報告されてきた。中でも染色体・遺伝子の異常や微小残存病変などの治療反応性が重要である。一般に、再発リスクが最も高い群は造血細胞移植が適応となり、最も再発リスクが低い群はより治療強度を減弱した多剤併用化学療法を行うこととなる。どちらの群にも含まれない患者は中間リスク群となる。これら中間～高リスク群の治療成績は満足のできるレベルには至っていない。これらのことから、今後 ALL 全体の治療成績を改善するためには、治療層別化をより最適化すること、また中間～高リスク群において標的治療などの新規治療戦略を導入することが必要と考えられる。また、多くの再発 ALL 患者は造血幹細胞移植の対象となるが、依然として予後は不良である。そのため、再発 ALL 患者もまた新規治療戦略の対象となりうる。

近年、次世代シーケンサー (NGS) により多数の遺伝子異常を同定することが可能となってきた。そこで我々は、17 人の再発小児 ALL において NGS による解析を行い臨床的情報との関連について検討を行った。

[材料と方法]

患者背景

2000 年から 2017 年までに岡山大学と北海道大学で診断された 0 歳から 18 歳までの 17 人の再発 ALL 患者を対象とした。

NGS の方法

がん関連の遺伝子変異 150 個以上を対象としたカスタムパネル (Agilent Technology 社 HaloPlex) を使用した。シーケンスは Illumina 社の MiSeq を使用し、Agilent 社の SureCall で結果を解析した。

遺伝子変異の評価

非コード領域の以上や、データベース (dbSNP, 1000gp, HGVD) において 1%以上の頻度で報告されている一塩基多型は除外した。変異アリルが 5 リード以上で指定されているものを解析対象とした。全ての病期のサンプルで 20%以上の変異アリル頻度で指定されているものは胚細胞系列の変異候補と考え、最終的にサンガーシーケンスで確認した。寛解期サンプルと白血病サンプルとのリード差については Fisher 正確度検定を用い評価した。リードの質は IGV software で評価した。コピー数変化については SureCall による解析を用い評価した。これまで予後不良との関連が示されている遺伝子欠失や遺伝子再構成に関連しているものを対象とした。

診断時と再発時のクローン性の変化

診断時と再発時サンプルにおいて遺伝子変異がどの様に変化しているか評価した。

治療方針を変え得るような遺伝子異常の定義

新規治療の標的となるもの、既存治療薬の選択に影響するもの、臨床的対応を変え得る胚細胞系列の遺伝子変異を対象とした。

Fluorescence in situ hybridization (FISH)

市販されている Abbot 社のプローブ (Vysis TP53/CEP17 FISH probe kit) を用いて行った。

[結果]

患者背景

17 人の患者が対象となった。男女比は 14:3 と男児が多かった。診断時年齢は生後 3 か月から 15

歳までであり、中央値は5歳であった。B前駆細胞型（BCP-ALL）が9人、フィラデルフィア染色体陽性（PhALL）が3人、乳児が3人、T細胞型が2人であった。第一寛解期に造血幹細胞移植を行ったのは1人だけであったが、再発後は全員が造血幹細胞移植を受けた。

NGSの結果

各シーケンスの平均総リード数は1,874,078であった。83.63-97.34%の領域において最低50リードが配置された。我々は合計で16個のSNVを診断時サンプルから、28個のSNVを再発時サンプルから同定した。遺伝子欠失については診断時サンプルから19、再発時サンプルから22個が同定された。

生殖細胞系列の変異

二次的所見として生殖細胞系列における遺伝子変異が同定された。ガイドラインを参考にすると、今回病原性がある可能性が考えられたのは *TP53* R248Q 変異のみであった。本遺伝子変異はFISH法により、寛解期検体でヘテロ接合性であり、かつ腫瘍細胞において正常アレル欠失が生じていることが確認された。

診断時の遺伝子変異

一人を除き診断時に何らかの遺伝子変異が確認された。BCP-ALLにおいては、合計9人のうち6人において、診断時の検体で既に何らかの予後不良遺伝子変異を有することが確認された。1人を除き初発時には最高リスクと考えられておらず、より正確な層別化ができる可能性が示唆された。PhALLでは予後不良因子として報告されている *IKZF1* の欠失が全例で同定された。乳児ALLではチロシンキナーゼ-PI3K-RASシグナル経路における変異が全例で同定された。T細胞性ALLでも既報の変異が複数見つかったが、予後不良が示唆されるものはなかった。

再発のパターン

本解析で同定された全ての遺伝子変異が、診断時検体と再発時検体でどの様に変化するかを検討した。正確な比較ができなかった4例を除く13例を対象とした。9例において再発時に、診断時の遺伝子変異の一部が失われた上で新たな遺伝子変異が獲得されていた。残り4例では診断時の遺伝子変異が保たれた上で新たな遺伝子変異が獲得されていた。

治療方針を変え得るような遺伝子異常

17例のうち8例で、治療方針を変え得るような遺伝子異常が診断時に認められた。

[考察]

本研究では診断時、寛解期、再発時の患者検体をパネル型次世代シーケンサーにより解析した。

BCP-ALLにおいてはこれまでも様々な遺伝子変異が予後不良因子として指摘されてきた。本研究においても、9例中6例において、予後不良とされる遺伝子変異を診断時検体に同定することができた。

PhALLにおいても *IKZF1* 欠失という有名な予後不良因子が全例で認められた。これらに対しどの程度の治療強度が最適であるかは現在臨床的に検討されている。

乳児ALLの全例においてチロシンキナーゼ-PI3K-RASシグナル経路における変異が同定されたことは特筆に値する。既報においても同経路の変異は頻度が高ければ予後不良が示唆されるとするものもある。また、これらの変異は標的治療の対象とも考えられるが、時に再発時に失われることが知られており、既存の化学療法に併用することが望ましいと考えられる。

T細胞性ALLにおいては予後不良因子を同定することはできなかった。既報でも特定の遺伝子再構成が予後不良と関連することが指摘されており、今回の手法では同定できない非コード領域やRNAなどの転写産物解析が必要なかもしれない。

総じて、様々なサブタイプの再発ALLにおいて治療方針を変えうるような遺伝子異常を同定できたことはとても有意義であると考えられた。17例中8例（47.1%）というのは既報とほぼ同程度の値である。

生殖細胞系列における遺伝子変異が同定されたことも特筆すべき結果と言える。既報では小児がん患者の8.5%において、何らかの病的変異が生殖細胞系列から同定されたが、この内がんの家族歴があったのは4割に過ぎないとしている。遺伝的がん素因を臨床的に疑うのは時に難しい事が、複数の研究結果から示唆されている。

がん素因を持つ症候群の中で、Li-Fraumeni 症候群（LFS）は最もよく知られたものである。LFSは生殖細胞の *TP53* 変異に起因するが、本研究でも一人、生殖細胞系列に *TP53* R248Q 変異

が同定された。同患者は後の臨床経過から LFS であることが明らかとなったが、診断時には特徴的な ALL サブタイプを示しておらず、LFS を疑い得なかった。LFS は定期的なスクリーニング計画に従うことで生命予後が著しく改善することが示されている。他の症候群では未だ証明されていないが、将来的には他の遺伝的がん素因を持つ患者でも早期診断により生命予後を改善させることが期待される。一方で生殖細胞系列の遺伝子変異の病原性を検討し患者に報告する際には慎重に慎重を重ねる必要があり、最新のガイドラインに従った対応が必須である。

本手法は NGS としてはスループットが低く、時間とコストの面で利点がある。検体が得られてから数日以内に結果が分かるため、一定の治療期間の後に判定される微小残存病変などの検査よりも早い段階で治療内容を最適化することが可能である。

我々の研究にはいくつかの限界がある。本研究は後方視的であり、今回得られた因子による治療層別化の可能性についてはより大規模な前方視的研究が必要である。また、現時点で小児 ALL は治癒率 8 割程度を十分に期待できる疾患群である。治療標的となる変異を同定した際に、8 割の患者でその標的を使用する必要がない可能性がある。当然それらを組み込むことで現状の治療の強度を更に下げることが可能となるかもしれないが、本検討は再発 ALL という難治例のみを対象としているため、そのような患者がどの程度含まれるかについては検討できていない。

[結論]

小児の急性リンパ性白血病において、パネル型次世代シーケンサー解析により予後に関与し、介入を変えうるような遺伝子変異の同定が可能であった。本手法は臨床的遺伝子解析に適していると考えられた。