

論文の内容の要旨

論文題目 Classification, subgroup discovery, and outcome prediction in pediatric acute myelogenous leukemia by gene expression profiling

和訳 発現アレイによる小児急性骨髄性白血病の診断、分類、および予後解析

指導教員 五十嵐 隆教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 城 青衣

白血病は日本の小児悪性腫瘍の約 40%を占め、年間 700 例程度が発症している。このうち急性リンパ球性白血病 (acute lymphoblastic leukemia: ALL) が約 70% (年間推定 500 例)、急性骨髄性白血病 (acute myelogenous leukemia: AML) が約 25% (年間推定 180 例)、慢性骨髄性白血病 (CML) や骨髄異形成症候群 (MDS) などその他の白血病が 5%の割合を占めている。白血病は、その診療において過去 30 年の間に劇的な変化を遂げつつある疾患であり、不治の病から治療可能な疾患へと変わった。診断においては、形態学的診断から免疫学的マーカーによる診断を経て、分子生物学的な診断へと進展しつつある。治療においても、多剤併用および中枢神経系の予防治療だけでなく、超大量療法や造血幹細胞移植なども必須の治療手段として日常的に行われるようになった。さらに現在では、チロシンキナーゼ阻害薬 (STI571) や分化誘導剤 (ATRA) などの分子標的療法も実用化されている。今後は、新規薬剤導入による治療成績の向上だけでなく、予後良好群に対しては副作用や治療関連合併症を減らすための治療内容軽減、造血幹細胞移植に関しては移植に伴う晩期障害や移植関連死をできる限り減らすためにも適切な移植適応群の抽出、予後不良群に対しては適確な時期に造血幹細胞移植が行えるよう早期の層別化診断が重要となってくる。このように、生命予後や副作用予測なども加味した上で治療計画を選択し、患者にとって最適な治療 (custom made therapy) を行うためには、正確な診断が必要不可欠である。

小児の AML は多様な病態を有するヘテロな疾患であり、形態学的な分類や染色体異常の解析などにより治療内容の選択や予後予測が行われてきたが、その精度はいまだに不十分であり、特に特徴的な因子を有さない群においては治療内容の決定や治療反応性の予測が困難となっている。本研究では、小児 AML の診断精度の向上を図り、新規予後因子を同定するため、マイクロアレイを用いた発現解析を行った。

DNA マイクロアレイとは多数の遺伝子発現を同時に分析するため、スライドガラスなどの小基盤上に既知の DNA を高密度に整列 (アレイ) させたもので、DNA チップや遺伝子チップなどとも呼ばれる。操作手順としては、患者の臨床検体 (本研究では小児 AML 患者からの初発時骨髄血) から RNA を抽出し、cDNA の増幅・蛍光標識 (ラベリング) を行い、基盤上の DNA に結合 (ハイブリダイズ) させ、結合した cDNA の蛍光強度を読み込み (スキャン)、コンピューター上で画像を数値化することにより発現強度を測定する。最大の利点は、1 回の操作にて数千から数万種の遺伝子発現を同時に測定できることであり、網羅的な解析に

非常に有用である。各腫瘍の生物学的特徴はその遺伝子発現により規定されていると予想され、このような網羅的遺伝子発現データにより分類を行うとその生物学的特徴に基づいた腫瘍の診断が行われ、その病態の把握や治療に対する反応性の予測も可能であると考えられている。これまでに、悪性リンパ腫、肺がん、乳がん、甲状腺がん等において、マイクロアレイを用いた遺伝子発現パターンによる腫瘍分類が行われ、臨床的な予後の予測が可能であるとすでに報告されている。

発現アレイによる最初の白血病解析は 1999 年 Golub らにより Science に掲載され、急性白血病患者において ALL と AML の鑑別が発現プロファイルによって可能と報告された。その後、数多くの研究グループより各種転座症例特異的発現や予後関連のマイクロアレイデータが発表されたが、アレイプラットフォームが統一されていないことなどから比較評価が難しい状態が続いている。2004 年 Bullinger らにより NEJM に掲載された論文では、成人 AML においてマイクロアレイによる詳細な分類が可能であることが発表され、同年 Ross らにより小児 AML に関する同様な解析結果が Blood に掲載され、マイクロアレイ診断の有用性が期待された。現在 Haferlach らのヨーロッパのグループが、Roche と共同研究 (MILE Study) により成人白血病患者 3,000 例以上を集めて診断アレイを開発中である。2007 年 ASH (American Society of Hematology) Annual Meeting において 2,030 例の中間報告がなされ、95.4%の診断精度と発表されている。日本国内においては成人 MDS や成人 AML のマイクロアレイ解析結果が発表されているが、いずれも小規模であり、新たな診断法の開発までにはいたっていない。小児 AML においては、私が所属する研究グループが 54 例の発現解析結果を 2003 年 Blood に発表している。本研究は、前研究を発展させ、解析症例数を大幅に増員してより詳細に解析を行った結果であり、130 例と小児 AML においては世界的に最大規模の研究となっている。

本研究では、Affymetrix 社の HG-U133_plus_2.0 アレイを用いて遺伝子発現解析を行った。前半において、多施設共同治療研究 AML99 に由来する小児 AML130 例の解析を行い、小児 AML が遺伝子発現により 6 つのグループ [t(8;21)、t(15;17)、inv(16)、FAB-M4/M5、FAB-M7、特定の染色体転座を持たない FAB-M0/M1/M2] に分かれることを見出した。その過程において、2 例の患者 (FAB M1 および M2) において初期診断の誤りによるリスク分類ミス (過度の治療) が生じていたことが判明した。これらの患者は染色体分析にて正常核型またはその他の転座と診断され、Intermediate Risk 群として治療が行われたが、本研究のマイクロアレイ解析により Low Risk 群である inv(16)症例であることが示唆され、RT-PCR にて確認された。これらの結果は、マイクロアレイ検査が有用な診断法になり得ることを示唆している。また、現在の AML の診断および分類には相当量の検体が必要となっているが、マイクロアレイ検査はわずかな検体で可能で、一般的に検体量の少ない小児 AML 患者においては特に有用であると考えられる。このような観点から、本研究ではマイクロアレイによる 6 つのグループを診断するアルゴリズムの開発を行った。各グループに特異的な遺伝子の発現データを基に各グループの重心を算出し、これらの重心からの距離を判定することにより、症例の診断を行う方法を採用した。この診断アルゴリズムは、現在行われている全国共同治療研究 AML-05 に登録された新規小児 AML 患者に対して検証を行う予定である。現時点では、後半に用いられた小児 AML 共通プロトコール ANLL91 に由来する AML-M4/M5 症例 15 例において、100%の診断精度が得られた。また、この診断アルゴリズムを白血病患者由来の細胞株に応用したところ、5 つすべての細胞株において 100%正しい診断が得られた。さらに、391 例の成人 AML に応用したところ、t(8;21)、t(15;17)、inv(16)グループにおいては 95.0~100%の正答率が得られたが、その他のグループにおいては 75.0~79.6%であった。これらの結果より、M4/M5 や

M0/M1/M2 症例においては小児と成人で異なる生物学的背景が伺われ、小児 AML の診断においては独自のマイクロアレイ診断法の開発が必要と考えられた。

次に、後半においては、AML-M4/M5 に的を絞って解析を行った。その結果、乳児例と小児例では大きく異なる発現プロファイルを有することを見出し、ALL だけでなく AML においても乳児例と小児例では生物学的特徴が異なることが示唆された。さらに、乳児例において特徴的に高発現している遺伝子を抽出し、その発現レベルを比較することにより、40 例の AML-M4/M5 症例が年齢の異なる 3 つのサブグループ A、B、C（それぞれ平均年齢 0.3、3.1、6.6 歳）に分類されることを示した。また、サブグループ C の 3 年 EFS は 28% と非常に予後不良であり、このサブグループ分類が臨床的にも重要であることが判明した。このように本研究では、AML-M4/M5 に着目してより詳細な解析を行うことにより、今まで知られていなかった年齢依存的な遺伝子発現プロファイルを検出するとともに、これまで Intermediate Risk 群として扱われてきた集団の中に遺伝子発現により分けられる新規 High Risk 群が存在することを見いだした。マイクロアレイによる新規層別化を導入することにより、これらの予後不良の患者は、今後治療の強化や移植治療の導入などにより、より高い治療成績を得られる可能性がある。

前記のように、小児 AML の臨床においては、早期の段階で正確に診断、分類することにより、造血幹細胞移植を含めた治療方針の決定を的確に行い、予後良好な白血病に対しては不必要に強い治療を避け、患者の負担を軽減する等の個々の疾患の個性に合わせた治療法選択ができるようになることが望まれている。本研究では、遺伝子発現プロファイルにより t(8;21)、t(15;17)、inv(16)等を正確に診断するアルゴリズムを構築するとともに、新規予後不良サブグループを同定した。これらの新規診断手法や新規予後不良サブグループの発見は小児 AML の正確な診断、分類に非常に有用であると私は考えており、今後早期に臨床応用されることを期待している。