

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	成育科学領域小児病態学教育研究分野 花田勇
<p>(論文題目)</p> <p>Gene alterations involving the CRLF2-JAK pathway and recurrent gene deletions in Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia in Japan (本邦のダウン症候群関連急性リンパ性白血病における CRLF2-JAK 経路の遺伝子異常および白血病関連遺伝子の欠失)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p><u>背景、目的</u></p> <p>Down 症候群 (DS) の小児は、健常児より高率に急性リンパ球性白血病 (acute lymphoblastic leukemia: ALL) を発症することが知られている。DS 患者では健常人に比べて抗がん剤に対する認容性が低く、治療関連死の頻度が高いことが問題となっており、分子標的治療のような毒性の低い治療の開発が待たれている。</p> <p>最近、<i>JAK2</i> の活性化変異が DS 関連 ALL (DS-ALL) の約 20%程度で認められることが報告された。またこれに引き続き、サイトカインレセプターの一つである <i>CRLF2</i> の高発現が DS-ALL の 50-60%に認められることが報告された。さらに、<i>CRLF2</i> の高発現が認められる症例の大半で性染色体の部分欠失により <i>P2RY8-CRLF2</i> 融合遺伝子が形成されていることも明らかとなった。<i>CRLF2</i> の活性化型変異も DS-ALL の数%に認められ、<i>CRLF2</i>-<i>JAK</i> シグナル伝達経路が DS-ALL の発症に深く関わっている可能性が示唆された。現在、<i>JAK</i> 阻害薬は原発性骨髄線維症において臨床応用が進められており、治療関連死の頻度が高い DS-ALL において新たな治療法となりうる可能性がある。しかし、アジア諸国でのこれら遺伝子異常についての報告は非常に少ないため、我々はその頻度を解析した。</p> <p>また一方で、DS-ALL の 20-30%で <i>IKZF1</i> の欠失が認められ、<i>IKZF1</i> 欠失例は予後不良であることが最近報告された。<i>IKZF1</i> と同様に ALL の発症に関わるとされる遺伝子群についても DS-ALL での頻度や予後について欧米での解析が進められており、今回我々はその点も含め解析を試みた。</p> <p><u>方法</u></p> <ol style="list-style-type: none"> ① 使用検体：1987年から2011年に本邦多施設にて診断治療された DS-ALL 38例の診断時骨髄を使用した。発現量測定の対照として、2002年から2010年に当院で診断治療された non-DS-ALL 25例の診断時骨髄を使用した。 ② <i>CRLF2</i>-<i>JAK</i> 経路関連遺伝子異常の解析：<i>JAK2</i> の pseudokinase domain、<i>CRLF2</i> の全コード領域についてゲノム PCR と RT-PCR を施行し、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を解析した。 ③ <i>P2RY8-CRLF2</i> 解析：特異的プライマーを用いて、ゲノム PCR、RT-PCR を施行し、ダイレクトシーケンス法により融合遺伝子の存在を確認した。 ④ <i>CRLF2</i> 発現量解析：cDNA の得られた DS-ALL 24例、non-DS-ALL 25例に対し定量的リアルタイム PCR を施行し、比較 Ct 法にて <i>CRLF2</i> 発現量を測定した。内因性コントロールとして <i>GAPDH</i> を採用した。<i>CRLF2</i> 高発現の定義は、既報にならない非 DS 関連 ALL における <i>CRLF2</i> 発現量中央値の 10 倍以上とした。 ⑤ ALL 関連遺伝子のコピー数解析：十分な DNA サンプルがある DS-ALL 32例につ 	

いて、*IKZF1*、*EBF1* など、ALL の発症や予後に関わっている遺伝子について、multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法を用いてコピー数解析を行った。

- ⑥ 統計解析：臨床データを用いたサブグループ解析、*CRLF2* 発現量についての統計解析については Fisher の正確確率検定と Mann-Whitney の U 検定のいずれかを使用した。生存分析に関しては Kaplan-Meier 法を使用し、ログランク検定により有意差を解析した。それぞれ P 値<0.05 をもって有意差ありと判定した。

結果

- ① 38 例中 6 例 (16%) で *JAK2* 変異を認め、欧米から報告されている頻度と同じかやや低頻度であった。*CRLF2* について遺伝子変異は 1 例も認められなかった。
- ② DS-ALL 38 例中 11 例 (29%) で *P2RY8-CRLF2* を認め、欧米からの報告 (約 50%) よりもやや低頻度であった。
- ③ *CRLF2* 高発現は、*P2RY8-CRLF2* 陽性例 7 例中 6 例、陰性例 20 例中 3 例、計 27 例中 9 例 (33%) で認められた。
- ④ *IKZF1* 欠失は 8 例 (25%) で認められた。*EBF1* 欠失は 32 例中 5 例 (16%) で認められ、*P2RY8-CRLF2* 陽性群で有意に高頻度であった。
- ⑤ 臨床データが得られた症例で、各遺伝子異常の有無での臨床的特徴の差異を解析した。*IKZF1* 欠失例は *IKZF1* 非欠失例と比較して有意に全生存期間が短いことが明らかとなった。そのほかの遺伝子異常の有無は性別、診断時年齢、診断時白血球数、NCI リスク分類、無イベント生存期間、全生存期間のいずれにも相関は認められなかった。

考察

本邦の DS-ALL では *CRLF2*-*JAK* シグナル伝達経路の活性化をもたらすような遺伝子異常の頻度が欧米諸国より低いことが明らかとなった。本邦 DS-ALL では *CRLF2*-*JAK* 経路以外に分子標的となる主要な経路が存在する可能性が示唆された。

IKZF1 欠失症例の頻度、予後に関しては欧米での既報とほぼ同様の結果であった。*EBF1* 欠失を認める DS-ALL 症例は欧米では約 2% とかなり稀であるが、本邦 DS-ALL 症例では 16% に認められ、特に *P2RY8-CRLF2* を有する症例で高頻度に認められた。本邦 DS-ALL 症例の一部では、*P2RY8-CRLF2* と *EBF1* 欠失が協調して白血病発症に関わっている可能性が示唆された。