

令和2年4月20日

droplet digital PCR を用いた 若年性骨髄単球性白血病の予後予測法を開発

名古屋大学大学院医学系研究科小児科学の高橋 義行（責任著者）教授、村松 秀城講師、若松 学（筆頭著者）大学院生、名古屋大学医学部附属病院ゲノム医療センターの奥野 友介病院講師らの研究グループは、まれで治療が難しい小児白血病である若年性骨髄単球性白血病（juvenile myelomonocytic leukemia; JMML）に対して、droplet digital PCR(ddPCR)^{*1}を用いて、この病気の進展や増悪に関わる *SETBP1* と *JAK3* 遺伝子変異を高感度に測定し、微小なアリル頻度^{*2}の変異が予後不良と関連することを明らかにしました。

およそ90%のJMML症例は、細胞の分化や増殖などのシグナル伝達にかかわるRAS経路の5つの遺伝子（*PTPN11*, *NF1*, *NRAS*, *KRAS*, *CBL*）のうち1つの変異を持っていますが、最近の研究により、一部のJMML症例では、*SETBP1* や *JAK3* など、ほかの遺伝子にも変異が認められ（セカンドヒット）、白血病細胞の増殖や進展を促すことがわかってきました。

特殊なPCR法であるddPCR法は、従来法と異なり、非常にわずかなアリル頻度（～0.05%）の遺伝子変異であっても高感度に測定・定量することが可能です。本研究グループは、このddPCR法を用いて、JMML患者の初発時検体における*SETBP1* や *JAK3* 遺伝子を解析しました。

JMML患者128例のうち、ddPCR法を用いて19例で24個の*SETBP1*・*JAK3* 遺伝子変異を同定しました。うち9個の変異で認められたアリル頻度は1%未満であり、従来の次世代シーケンサーを用いた高感度な方法でも検出することができない遺伝子変異でした。また、アリル頻度1%未満の変異であっても、これらの変異を有する症例の治療成績は良くないことがわかりました。

SETBP1・*JAK3* 遺伝子変異が見つかった19例のうち5例は、*SETBP1* と *JAK3* 遺伝子変異の両方が検出されました。特殊な細胞培養法であるコロニーアッセイ^{*3}を用いた解析により、興味深いことに、2つの遺伝子変異を同時に有する白血病細胞が存在することがわかりました。

ddPCR法を用いた今回の研究成果により、特に治すことが難しいJMML患者を診断直後に見つけだし、適切な治療へつなげることができることが期待されます。

本研究成果は、英国科学誌より発行されている科学誌『Leukemia』（英国時間2020年4月20日午前1時の電子版）に掲載されました。

ポイント

- 若年性骨髄単球性白血病（JMML）は、治療がとても難しい、珍しいタイプの小児白血病の一つです。
- 特殊な PCR 法である droplet digital PCR（ddPCR）を用いて、JMML 患者が持っている、ごくわずかな *SETBP1*・*JAK3* 遺伝子変異を同定することに成功しました。
- ごくわずかであったとしても、これらの変異を認める JMML 患者の治療成績はとりわけ不良であり、今回の研究成果は、特に治療を強化すべき JMML 患者を見つけることに役立つと考えられます。


1. 背景


若年性骨髄単球性白血病（juvenile myelomonocytic leukemia; JMML）は主に 5 歳未満の小児に発生する予後の悪い白血病です。日本において年間 20~30 例程度が発症し、通常の抗がん剤による化学療法では十分な効果が得られないため、造血幹細胞移植が必要な白血病です。

JMML は、患者の約 90%で細胞の分化や増殖などのシグナル伝達に関わる RAS 経路の遺伝子（例えば、*PTPN11*, *NRAS*, *KRAS*, *NF1*, *CBL*）に変異を認めます。JMML の一部で RAS 経路の異常に加えて *SETBP1* や *JAK3* 遺伝子の変異を認め、これらは RAS 経路の遺伝子変異に続いて起こる、セカンドヒットとして腫瘍の増殖や進展に関わります。また、セカンドヒットを認める JMML 患者では、認めない患者よりも予後が悪いことが示されています。JMML 患者のセカンドヒットのうち、最も頻度の高い遺伝子変異（ホットスポット）として、*SETBP1* p.D868N 変異と *JAK3* p.R657Q 変異^{*4}があります。

最近、特殊な PCR 法である droplet digital PCR (ddPCR)法を用いて、微小なアレル頻度の変異を高感度に測定し、定量できるようになりました。これまでに JMML において、*SETBP1* および *JAK3* 遺伝子変異を同時に ddPCR 法により高感度に評価した研究はなく、治療成績との関連も明らかではありませんでした。

2. 研究成果

本研究グループは、JMML 患者のホットスポット変異である *SETBP1* p.D868N 変異、および *JAK3* p.R657Q 変異を、ddPCR 法を用いて高感度に測定しました。*SETBP1* と *JAK3* の ddPCR システムでは、0.05%（ 破線）以上のアレル頻度で変異を認める場合に、「変異あり」と判断しました。

JMML 患者 128 例の解析を行い、*SETBP1* 遺伝子変異を 9 例（7.0%）と *JAK3* 遺伝子変異を 15 例（11.7%）で検出しました（ 図 1）。同定したこれらの *SETBP1* と *JAK3* 遺伝子変異のうち、それぞれ 3 例と 6 例が 1%未満の微小なアレル頻度の遺伝子変異で、これらは遺伝子配列を高速に解読する次世代シーケンサーによる遺伝子解析をもってしても検出することのできない変異でした。

次に、ddPCR により検出した遺伝子変異が、予後におよぼす影響を調べました。*SETBP1* と

JAK3 遺伝子変異のアリル頻度に応じて、1%以上の変異をもつ Major 群 (n = 14)、1%未満の変異のみをもつ Minor 群 (n = 5)、変異が検出されなかった症例を Wildtype 群 (n = 85) の 3 群にわけて解析を行いました。Major 群、Minor 群ともに、Wildtype 群よりも有意に無移植生存率が不良でした (P = 0.017; 図 2)。

SETBP1・*JAK3* 遺伝子変異が見つかった 19 例のうち 5 例は、*SETBP1* と *JAK3* 遺伝子変異の両方が検出されました。これらの遺伝子変異を同一の白血病細胞集団が獲得したのか、もしくは、それぞれの変異を異なる集団が獲得したのかを検証するために、*SETBP1* と *JAK3* 遺伝子変異の両方をもつ症例の白血病細胞を用いて、特殊な細胞培養法であるコロニーアッセイを用いた解析を行いました。白血病細胞を、細胞の増殖を促す因子とともに 2 週間培養したのちに、各々のコロニーを一つずつ回収し、サンガーシーケンスで *SETBP1* と *JAK3* 遺伝子変異を検討しました。93 コロニーを回収し、そのうち 2 つのコロニーで *SETBP1*, *JAK3* 遺伝子変異をともに検出しました。このことから、同一の白血病クローンが *SETBP1* と *JAK3* 遺伝子変異を有していることが示唆されました。

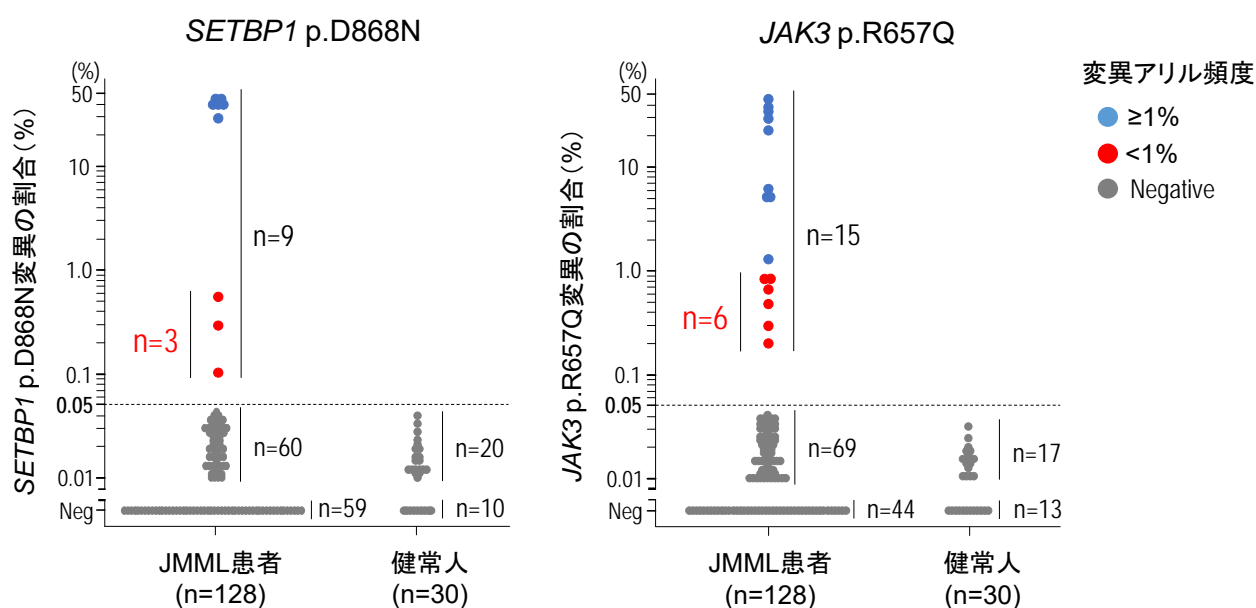


図 1. ddPCR により検出した *SETBP1* と *JAK3* 遺伝子変異

JMML 患者 128 例のうち、*SETBP1* 変異を 9 例、*JAK3* 変異を 15 例に認めました。検出した 24 個の変異のうち、9 個(赤丸)が 1%未満の微小なアリル頻度の変異でした。

無移植生存率(TFS)

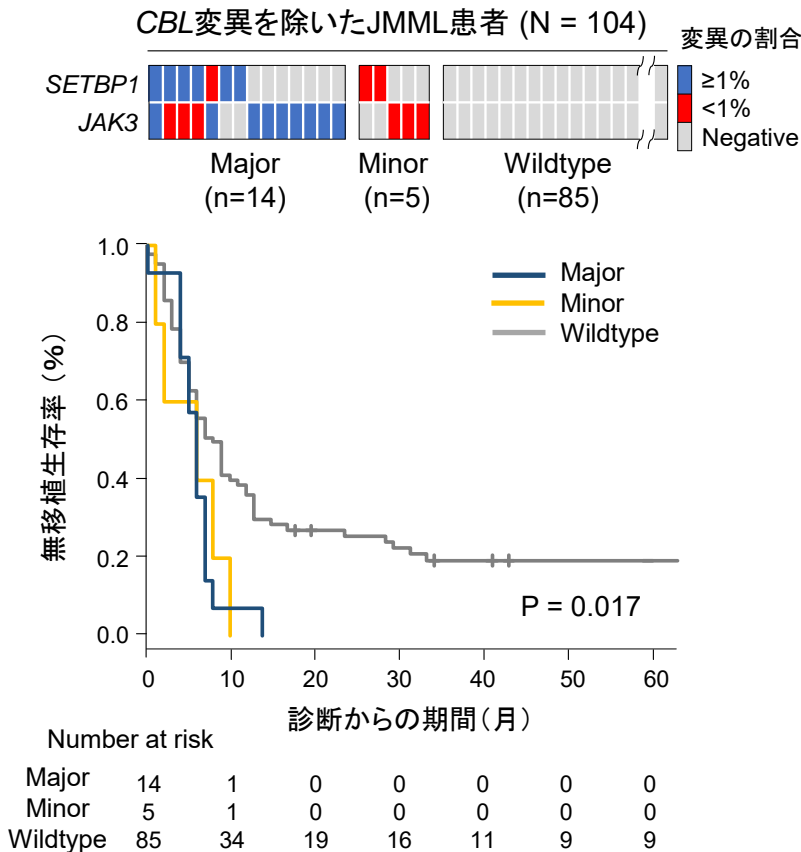


図 2. *SETBP1* と *JAK3* 遺伝子変異による生存率の比較

CBL 変異の症例を除いた JMML 患者 104 例で生存解析を行った場合、Minor 群では Wildtype 群よりも治療成績が悪かった。

3. 今後の展開

本研究では初めて、JMMLにおいてセカンドヒットとして認める *JAK3* 遺伝子変異を、ddPCR法を用いて高感度に評価しました。微小なアレル頻度の *SETBP1*、もしくは *JAK3* 遺伝子変異を認める患者は、認めない患者と比べて、予後不良であることを示しました。本研究の成果は、初発の JMML 患者のうち、治療強化が必要な患者を見つけ、適切な治療へと導くことができるものと考えます。例えば、微小なアレル頻度も含めて、*SETBP1* や *JAK3* 遺伝子変異を初発時に認める症例では診断後から、造血幹細胞移植に備えて、準備を進めることができます。

また、本研究では、同じ白血病細胞集団が *SETBP1* と *JAK3* 遺伝子変異を獲得することを示しました。このように2つの変異を同じ集団がもつことで、より高い増殖能を獲得していることが推察されます。ほかの類似した白血病では、セカンドヒットの遺伝子変異を獲得する順序が、表現型と強く関係することが示されており、JMML においても両方の変異を獲得する順序と表現型の関連性について、より大きな患者集団で検証する必要があるものと考えられます。

4. 用語説明

※1) droplet digital PCR

遺伝子変異を高感度に定量することのできる検査技術

※2) アリル頻度

個々の対立遺伝子の相対的な頻度 (%)

※3) コロニーアッセイ

増殖特性 (自己複製能) を示す細胞を検出する分析方法

※4) *SETBP1* p.D868N 変異と *JAK3* p.R657Q 変異

JMML の進展に関わる *SETBP1* と *JAK3* 遺伝子変異のうち、最も頻度の高いアミノ酸置換

5. 発表雑誌

掲雑誌名 : Leukemia (英国時間 2020 年 4 月 20 日午前 1 時の電子版)

論文タイトル : Detection of Subclonal *SETBP1* and *JAK3* Mutations in Juvenile Myelomonocytic Leukemia Using Droplet Digital PCR

著者 : Manabu Wakamatsu¹, Yusuke Okuno², Norihiro Murakami¹, Shunsuke Miwata¹, Hironobu Kitazawa¹, Kotaro Narita¹, Shinsuke Kataoka¹, Daisuke Ichikawa¹, Motoharu Hamada¹, Rieko Taniguchi¹, Kyogo Suzuki¹, Nozomu Kawashima¹, Eri Nishikawa¹, Atsushi Narita¹, Nobuhiro Nishio^{1,3}, Seiji Kojima¹, Hideki Muramatsu^{1†}, and Yoshiyuki Takahashi^{1†}

所属 :

¹Department of Pediatrics, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan, ²Medical Genomics Center, Nagoya University Hospital, Nagoya, Japan, ³Center for Advanced Medicine and Clinical Research, Nagoya University Hospital, Nagoya, Japan.

[†]Co-corresponding authors

DOI : 10.1038/s41375-020-0817-x

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Leu_200416en.pdf