

論文内容の要旨

論文提出者氏名 矢野 未央

論文題目

An overall characterization of pediatric acute lymphoblastic leukemia with *CRLF2* overexpression

論文内容の要旨

小児急性リンパ性白血病 (ALL) は、未だ 20%程度が予後不良であり、治療成績向上のため新たな予後因子および治療標的を見出すことが求められている。小児 BCP-ALL の予後不良因子として *BCR-ABL1* like gene expression profile (GEP)、*IKZF1* 欠失、*CRLF2* 高発現が目ざされているが、このうち *CRLF2* 高発現、及び高発現に関与するとされる *P2RY8-CRLF2*、*IgH-CRLF2* を含む *CRLF2* 遺伝子再構成の予後因子としての意義についてはこれまで様々な報告があるが、見解の一致を得ていない。今回我々は *CRLF2* 高発現が独立した予後不良因子となりうるかを評価するため、日本小児白血病研究 (Japan Association of Childhood Leukemia Study: JACLS) ALL02 試験に登録された 167 例の小児 B 前駆細胞型急性リンパ性白血病 (BCP-ALL) 患者の遺伝子解析を施行し、*CRLF2* 高発現例における分子生物学的および臨床的特徴を明らかにし、*CRLF2* 高発現が予後に与える影響を検討した。

JACLS ALL02 試験に登録された小児 BCP-ALL 患者のうち 167 例の診断時骨髄液、及び末梢血より、DNA, mRNA, cDNA を抽出および作成し以下の解析を行った。まずリアルタイム PCR 法により 167 例の *CRLF2* mRNA 発現量を解析し、これまでの報告例を参考に発現量の中央値の 10 倍以上を高発現と定義した。*P2RY8-CRLF2* 遺伝子再構成は RT-PCR 法及び multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法を用いて検索し、*CRLF2* 点変異は *CRLF2* 高発現例を対象にダイレクトシーケンス法により検索した。*IKZF1* 欠失、*CRLF2* 重複は MLPA 法により解析し、*JAK2* 変異は *IKZF1* 欠失例を対象にダイレクトシーケンス法にて解析した。また、*CRLF2* 高発現の機序にかかわる新規遺伝子再構成の検索のため *IKZF1* 欠失例を対象に mRNA シークエンスを実施し、さらに 5'RACE 法による解析を行った。

結果、*CRLF2* 高発現は 167 例中 30 例 (18%) に認められた。*CRLF2* 高発現群における遺伝子および染色体異常の解析では、高 2 倍体例が高発現群において非高発現群に比し有意に多かった (22 例中 8 例 (36%) vs 67 例中 7 例 (10%) $P=0.005$)。また *IKZF1* 欠失例も *CRLF2* 高発現群に有意に多かった (30 例中 9 例 (30%) vs 137 例中 16 例 (12%) $P=0.02$)。 *IKZF1* 欠失 25 例中 *JAK2* 変異陽性例は同定されなかった。*CRLF2* 高発現に関わる遺伝子異常として、*CRLF2* 重複は 167 例中 18 例 (11%) に認められ、*CRLF2* 高発現群に有意に多かった (30 例中 11 例 (37%) vs 137 例中 7 例 (5%) , $P=0.01$)。これま

での報告では高発現の機序であるかについては明確にされていないが、今回の解析では *P2RY8-CRLF2* 遺伝子再構成例よりも *CRLF2* 発現量はすべて高値であり、*CRLF2* 重複自体も主要な高発現の機序ではないかと考えられた。また *CRLF2* 重複例では *IKZF1* 欠失は認められなかった。*P2RY8-CRLF2* 遺伝子再構成は 167 例中 3 例 (1.8%) に認められ、全て *CRLF2* 高発現であった。*CRLF2* F232C 変異は同定されなかった。*CRLF2* 高発現 30 例中 13 例 (43%) が重複もしくは *P2RY8-CRLF2* 遺伝子再構成陽性であり高発現の機序と考えられた。残る 17 例中 *IKZF1* 欠失を伴う 7 例で施行した mRNA シークエンスの結果、*CRLF2* 高発現に関わると推測される新規の遺伝子再構成 *CSF2RA-CRLF2* を 1 例同定した。本症例は *CRLF2* 発現が 2 番目に高く、高発現の機序として *CRLF2* のプロモーター領域の欠失により *CSF2RA* のエンハンサーが *CRLF2* の発現量を制御していると推測された。*CRLF2* 高発現の頻度は欧米からの報告でも 9-17% とばらつきがあるが、*CRLF2* 発現量は遺伝子再構成を伴うクローンの陽性率によっても影響されると推測された。また *P2RY8-CRLF2* 陽性率が欧米の報告に比して (35-43%) 極めて低い頻度 (30 例中 3 例 (10%)) であったが、*CRLF2* 遺伝子再構成はヒスパニックに多いことが報告されており、人種差が影響する可能性が示唆された。次に、*CRLF2* 高発現・非高発現群での臨床的特徴を検討した結果、BCP-ALL のリスク因子とされる診断時年齢、診断時白血球数、NCI リスク分類については両群に有意差は認められなかった。生存解析においても、5 年無病生存率 (EFS)、5 年全生存率 (OS) 共に両群に有意差は認められなかった。(高発現群 vs 非高発現群 EFS : 70.7% vs 75.4%, log rank $P=0.68$, OS : 96.4% vs 82.1%, log rank $P=0.11$) 次に、*CRLF2* 高発現の予後不良因子としての意義は、その高発現の機序によるとの仮説のもと *CRLF2* 重複例、*CRLF2* 遺伝子再構成例 (*P2RY8-CRLF2*) 各々において生存解析を行ったが、EFS、OS 共に有意差を認めなかった。次に、*IKZF1* 欠失を伴うことが *CRLF2* 高発現例の予後に影響するかを検討したところ、*IKZF1* 欠失を伴う *CRLF2* 高発現群は他群に比し EFS が低値であることが明らかとなった (*CRLF2* 高発現(+)/*IKZF1* 欠失(+): 44.4%, *CRLF2* 高発現(+)/*IKZF1* 欠失(-): 83.1%, *CRLF2* 高発現(-)/*IKZF1* 欠失(+): 56.3%, *CRLF2* 高発現(-)/*IKZF1* 欠失(-): 78.0%)。単変量解析の結果、*CRLF2* 重複、*P2RY8-CRLF2* 遺伝子再構成共に EFS 及び OS に影響せず、多変量解析の結果、*IKZF1* 欠失のみが OS に影響する予後不良因子で有ることが明らかとなった (Hazard ratio= 2.427, CI= 1.037-5.679, $P=0.04$)。近年、Veerらによる小児 BCP-ALL における *BCR-ABL1* like GEP、*IKZF1* 欠失、*CRLF2* 高発現例の予後因子解析の結果、*CRLF2* 高発現は独立した予後不良因子ではないことが報告された。我々の解析の結果も彼らの見解と一致している。また *CRLF2* 重複例において *IKZF1* 欠失が認められなかったことから、両者は排他的であると考えられ、このことが *CRLF2* 重複例の予後が良好であることに関連している可能性がある。結論として、今回の研究により *CRLF2* 高発現は単独では本邦の小児 BCP-ALL の予後不良因子ではないことが明らかとなった。