

# 小児 AML 症例における H3K4、H3K27 のトリメチル化と 臨床像との関連性について 研究実施計画書

研究代表者	大分大学医学部小児科学講座	後藤 洋徳
研究分担者	大分大学医学部小児科学講座 教授	井原 健二
	<small>大分大学医学部大分子ども急性救急疾患部門医療・研究事業 教授</small>	末延 聡一
	大分大学医学部附属病院小児科 助教	平野 直樹
	大分大学医学部診断病理学講座 助教	西田 陽登
	大分大学医学部診断病理講座 教授	馱阿 勉

## 共同研究施設

## 施設責任者

兵庫県立子ども病院	長谷川大一郎
兵庫県立尼崎総合医療センター小児血液・腫瘍内科	宇佐美 郁哉
名古屋大学医学部附属病院小児科	高橋 義行
宮崎大学医学部附属病院小児科	盛武 浩
福岡大学医学部附属病院小児科	熊谷 拓哉
群馬大学大学院医学系研究科病態病理学分野	信澤 純人
鳥取大学医学部附属病院小児科	奥野 啓介
静岡県立子ども病院血液腫瘍科	川口 晃司
九州大学大学院医学研究院 成長発達医学分野	大賀 正一
山形大学医学部小児科学講座	三井 哲夫
岡山大学病小児科学講座	鷲尾 佳奈
北海道大学小児科学講座	長 祐子

第1版：2018年8月17日 作成  
第2版：2019年1月31日 作成  
第3版：2019年5月14日 作成  
第4版：2019年6月24日 作成  
第5版：2020年3月26日 作成  
第6版：2021年2月19日 作成  
第7版：2021年8月2日 作成  
第8版：2022年3月15日 作成  
第9版：2022年12月13日 作成  
第10版：2023年2月3日 作成  
第11版：2023年12月5日 作成

## 目次

1. 研究の名称.....	2
2. 研究の目的と意義.....	2
3. 研究の対象および選定方法.....	3
4. 研究方法.....	3
5. 研究対象者の負担等.....	3
6. 研究対象者からの同意取得方法.....	3
7 研究対象者のプライバシーの保護.....	4
8. 試料および情報の保存.....	5
9 他機関への試料・情報の提供、および他機関からの試料・情報の授受.....	5
10. 研究機関の長への報告方法.....	6
11. 遺伝的特徴に関する重要な知見.....	6
12. 患者の個人情報取り扱いに関する方法 .....	6
13. 研究資金.....	6
14. 本研究に係る利益相反.....	6
15. 研究の実施場所.....	6
16. 研究期間.....	6
17. 研究の実施体制.....	7
18. 相談等の対応.....	8
19. 研究に関する情報公開.....	8
20. 参考文献.....	8

## 1. 研究の名称

小児 AML 症例における H3K4、H3K27 のトリメチル化と臨床像との関連性について

## 2. 研究の目的及び意義

近年、次世代シーケンスの発達に伴い、ゲノムの塩基配列が広範囲に明らかにされ、造血器腫瘍においても同様に多くの遺伝子変異が同定されてきた。

一方で、これらの遺伝子周辺のクロマチン構造やヒストンにおいて DNA の状態に変化を与え、遺伝子の転写を間接的に制御する「DNA の配列変化を伴わずに遺伝子発現を制御するメカニズム」であるエピジェネティクスの造血器腫瘍に対する作用が明らかにされ始め、また、それを標的とした薬剤（アザシチジンやボリノスタットなど）も開発され、徐々に注目され始めている。エピジェネティクスには DNA のメチル化やヒストン修飾（メチル化・アセチル化など）が含まれ、中でも造血器腫瘍における代表的なヒストン修飾は *MLL* を始めとするトライソックス群 (TrxG) による H3K4 トリメチル (以下 : me3) や *EZH2* などのポリコーム群 (PcG) 複合体による H3K27me3 化などが挙げられる<sup>-1)</sup>。

Göllner S らは、成人期発症の AML 症例において H3K27me3 化が低発現な群は高発現群に比して、治療抵抗性を示し、予後不良であることを示した (有意差をもって、5 年間無イベント生存率が低下していた)<sup>-2)</sup>。また、*MLL* 融合遺伝子関連 AML 症例においては、H3K4me3 化活性を失っていることが知られている<sup>-3)</sup>。このように他の造血器腫瘍と同様に今後、AML におけるヒストンメチル化の臨床像との関連性は徐々に明らかにされていくと考えられる。

今回、我々は免疫組織学的な手法により、AML 症例の検体 (初発時の骨髄検体) を用いて、小児期発症の AML 症例においても、成人例と同様に H3K27me3 化が低発現なグループにおいて、高発現な群に比して、予後不良となるのか (両群間において有意差をもって、5 年間無イベント生存率に有意差が生じるのか)、さらに H3K4me3 化の臨床像との関連性についても検討を行い、小児期 AML における 2 つのヒストン修飾 (H3K4me3 化、H3K27me3 化) と臨床像との関連性を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の対象および選定方法

**【適格基準】** 1985 年 4 月 1 日から 2022 年 3 月 31 日までに、診療・治療のために大分大学医学附属病院および共同研究施設 (クロット検体の提供が可能で施設倫理審査の承認が得られた施設) で検査され、AML と診断された後に AML-99、05 プロトコール等で治療を受けた患者の骨髄組織の組織検体・組織固定標本のうちで、利用可能なもの。

### 【除外基準】

- ① 同意の撤回があった場合。
- ② 研究責任者および分担研究者等が本研究の対象として不適切と認める場合。

**【対象年齢】** 18 歳までの症例に限る

**【目標症例数】** 症例数は約 100 例を見込む。

目標症例数およびその設定根拠 :

過去の大規模な成人 AML に関する H3K27 トリメチル化と予後との関連性を示した研究における症例数を参考にし、約 100 例と設定した。

研究全体の目標症例数は約 100 例 (内、本学の患者は 20 例を見込む)。

#### 4. 研究方法

【研究種別】多施設共同研究（本学が主）

【研究内容:侵襲の有無、介入の有無に関して】

侵襲： なし

介入： なし

【研究方法】

初発骨髄クロット標本から作製したパラフィン包埋切片を切り出し、脱パラフィン処理・ブロッキングを行う。その後、一次抗体反応（①Rabbit polyclonal to Histone H3 (tri methyl K4) Abcam社、②Mouse monoclonal to Histone H3 (tri methyl K27) Abcam社）を行った後に、二次抗体反応（ヒストファインシンプルステイン MAX-P0）を行い、DABで発色し、対比染色はヘマトキシリン染色で行う。

染色した検体の評価に関しては、標準的な Immunoreactive score (IRS) Remmele and Stegner の方法に準じて（陽性細胞率：400倍、10視野でカウントし平均値を算出する。染色濃度：0-3の4段階に分類する.）、スコア化する<sup>4)</sup>。

電子カルテ記録より、臨床像：年齢、性別、FAB分類、初発時の検査データ、遺伝子異常（遺伝子変異、融合遺伝子など）、治療方法、予後を把握し、IRSスコアと臨床像との比較検討を行う。

尚、今後、同一検体（同一クロット標本における未染色検体）において、他のヒストン修飾（H3K79メチル化、H3K9およびH3K14のアセチル化など）やその活性化に関わる酵素蛋白（EZHやASXL1）に関する免疫染色、再発症例に関しては再発時の検体における同様な検討など、追加検討を行う可能性がある。

【業務委託の有無】

なし

【謝礼の有無】

なし

【将来の研究利用について】

本研究終了後も、これらの試料は貴重な研究資源として、人類の健康増進を目指す様々な研究において高い利用価値を持つ。そのため、本研究終了後も提供された試料等は引き続き保存され、さらに将来、本研究と同様の目的を持つ研究がおこなわれる際には、改めて倫理審査委員会に付議し、審査・承認を経た上で利用する。しかし、染色済みの検体に関しては信頼性が乏しいため、再利用は行わない。）

#### 5. 研究対象者の負担等

本研究により被験者が直接受けることができる利益は発生しない。

本研究は通常診療で採取される検体のみを、診断の妨げにならない範囲で用いる侵襲のない研究である。また、匿名化を行うことにより個人のプライバシー保護を行うため、不利益は発生しないと考えられる。

#### 6. 研究対象者からの同意取得方法

【取得方法】

本研究は既存試料を用いた研究である。したがって、オプトアウト（情報公開+拒否機会）を、研究対象者の同意取得方法とする。

本研究は侵襲・介入のない研究であり、日常診療のために採取された保存検体の残余試料のみを用いることから、「倫理指針」において、本研究は同意を得ることを必ずしも必要としない。そこで、以下の対応により、研究実施の情報を公開し、研究参加を拒否できる機会を保証したうえで当該研究にその試料を使用する(人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 第5章 第12-1-(2)および(4))。情報を通知・公開し研究対象者等が拒否できる機会を保証する。

公開場所 (URL) : ①大分大学医学部小児科学講座のホームページ  
<http://www.med.oita-u.ac.jp/pediatrics/>

②JCCG のホームページ  
[http://jccg.jp/about/clinicalresearch\\_list/](http://jccg.jp/about/clinicalresearch_list/)

- 1) 診療のみの目的で採取された既存試料・情報については、本研究の情報を大分大学ホームページ上に公開するとともに、本研究での試料・情報の利用に対する拒否があった場合には対象から除外する。
- 2) 当該既存試料・情報については、次に掲げる (ア) ~ (オ) の要件の全てを満たしている。
  - (ア) 当該ヒトゲノム・遺伝子解析研究により提供者等に危険や不利益が及ぶおそれが極めて少ないこと。
  - (イ) 当該既存試料・情報を用いたヒトゲノム・遺伝子解析研究が公衆衛生の向上のために必要がある場合であること。
  - (ウ) 他の方法では、事実上、当該ヒトゲノム・遺伝子解析研究の実施が不可能であること。
  - (エ) 当該ヒトゲノム・遺伝子解析研究の実施状況について情報の公開を図り、併せて提供者又は代諾者等に問合せ及び試料・情報の研究への利用の拒否をする機会を保障するための措置が講じられていること。代諾者は原則として、親権者又は未成年後見人とする。
  - (オ) 提供者又は代諾者等の同意を得ることが困難であること。

(他施設から資料・情報の提供を受ける場合)

提供元での手続きが倫理指針に基づいて適切に行われていることを確認し、JCCG 関連施設に関しては、当該症例の臨床情報に関して、資料・情報の提供を受ける。また提供に関する記録を作成し、研究終了後5年間保管する。

【代諾者等】

なし

【インフォームド・アセント】

行わない (理由: 本研究は、原則オプトアウトによる同意を取得するものとする)

## 7. 研究対象者のプライバシー保護

【匿名化の方法】

大分大学医学部附属病院小児科にて検査を実施され、急性骨髄性白血病と診断された症例を、病理診断システムを用いて抽出する。適格基準を満たす症例の中から抽出された症例の組織標本は、試料採取機関の個人情報管理者により、臨床像: 年齢、性別、FAB 分類、初発時の検査データ、遺伝子異常 (遺伝子変異、

融合遺伝子など)、治療方法、予後以外のすべての情報が削除され、匿名化される。  
関連共同研究施設から提供された検体についても同様に取り扱い、  
関連共同施設からの試料・情報の提供を受ける場合には JCCG 番号等を用いて、  
資料と臨床情報の照合を行い、匿名化する。  
本学のホームページ上に研究内容の詳細を記載し、研究への組み入れに同意しない患者から  
連絡が来た場合、すみやかに研究対象から除外する。  
試料や研究によって得られた情報は研究以外の目的には使用せず、  
個人情報管理を徹底する。

**【公表の配慮】**

得られた結果は、学会や医学雑誌に発表されることとなるが、研究の結果を公表する際は、  
個人が特定できないようプライバシーに配慮する。

## 8. 試料および情報の保存

**【試料】**

保存方法：組織標本ならびにその派生物は、小児科学講座の冷凍庫などの中に、  
技術的に適切な方法で保管される。

期 間：永年保存とする。

廃棄方法：同意の撤回などで試料等の廃棄が必要となった場合、  
あるいは保存期間を終了した場合は、個人情報と連結されない方法で廃棄する。  
廃棄の際には、オートクレーブ、乾熱滅菌などの適切な不活化処理を実施後に廃棄する。

**【情報（研究に用いられる情報に係る資料を含む）】**

保存方法：情報は研究責任者（後藤洋徳）と研究分担者のみが使用し、  
外部ネットワークから遮断されたパソコンでパスワードを用いて管理する。  
また患者氏名と符合の対応表に関しては、小児科学講座の研究室の鍵のかかる棚に厳重に  
保管する。

期 間：永年保存とする。

廃棄方法：紙面の資料及び CD-R に保管した資料については、  
学内においてシュレッダー処理をして廃棄し、その他の電子媒体に保存されたものは消去する。

## 9. 他機関への試料・情報の提供、および他機関からの試料・情報の授受

他機関より試料・情報を受取る

**【試料・情報の提供機関・提供者氏名】**

②他機関より試料・情報を受け取る場合：国内  
提供先機関名・研究責任者名：現時点では未定である。

**【試料・情報の項目】**

初発時の骨髓検体のクロット標本  
臨床情報（診断名、年齢、性別、検査データ、治療経過）

**【試料・情報の取得の経緯】**

**【研究対象者等の氏名等】**

匿名化が施された上で提供を受ける。尚、対応表を受けることはない。

**②他機関より試料・情報を受取る場合**

收受記録の作成時期：他機関より試料・情報を受け取った時点

收受記録の記録媒体：紙媒体を別途作成する（以下の項目に関して、記載し作成する：  
提供元の機関の名称・提供元の機関の研究責任者又は既存試料・  
情報の提供のみを行う者の氏名）

收受記録の作成者：後藤洋徳

收受記録の代用書類の有無：なし

收受記録の保管場所：大分大学小児科医局

收受する試料・情報の管理についての責任者：後藤洋徳

**10. 研究機関の長への報告内容及び報告方法**

「倫理委員会・ヒトゲノム研究倫理審査委員会申請の手引」に基づき、医学部長に所定の報告書を提出する。

**11. 遺伝的特徴に関する重要な知見**

腫瘍部分のみにおいて遺伝情報の解析を行うことから、提供者及び血縁者の生命に、  
重大な影響を与える偶発的所見が発見される可能性はない。

**12. 健康被害に対する補償および賠償**

本研究は、通常の診療の範囲内で得られた情報（あるいは、手術又は生検によって採取した  
病理組織）を研究対象とするので、被験者に対する直接的な研究目的の侵襲性を伴う行為は  
一切行わない。そのため、本研究に起因する健康被害が発生することはない。

**13. 研究資金**

大分大学医学部小児科学講座の基盤研究経費および大分こども急性救急疾患学部門医療・研究事業の  
基盤研究経費および科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金、若手研究）【課題番号：20K1  
6895、研究課題名：「小児・AYA世代AMLにおけるヒストン修飾に着目した予後因子の確立と治療  
開発」、研究責任者：後藤洋徳】をもって充てる。

**14. 本研究に係る利益相反**

本研究に関わる全ての者が、本学利益相反マネジメントポリシーに抵触する利益相反を有しない。

**15. 研究の実施場所**

大分大学医学部小児科学講座

大分大学医学部診断病理学講座 等

## 16. 研究期間

倫理委員会承認日から 2025 年 3 月 31 日まで

(原則 5 年間以内、なお、研究期間には、症例登録期間、追跡 (観察) 期間を含みます。)

## 17. 研究の実施体制

### 【本学 (若しくは本院) における研究組織】

所属・職名	氏名	経験年数	分担課題
研究責任者 大分大学医学部小児科学講座	後藤 洋徳	8 年	臨床データの保存、解析
研究分担者 大分大学医学部小児科学講座 教授	井原 健二	20 年以上	臨床データの保存、解析
大分大学医学部大分子ども急性救急疾患学部門医療・研究事業 教授	末延 聡一	20 年以上	臨床データの保存、解析
大分大学医学部附属病院小児科 助教	平野 直樹	9 年	臨床データの保存、解析
大分大学医学部診断病理講座 教授	駄阿 勉	20 年以上	病理検体の処理、免疫染色の指導、解析
大分大学医学部診断病理学講座 助教	西田 陽登	15 年以上	病理検体の処理、免疫染色の指導解析

連絡先 本学医学部小児科学講座 後藤 洋徳 (内線 5833)

### 【研究全体の実施体制】

#### < 共同研究施設 >

兵庫県立こども病院  
兵庫県立尼崎総合医療センター小児血液・腫瘍内科  
名古屋大学医学部附属病院小児科  
宮崎大学医学部附属病院小児科  
福岡大学医学部附属病院小児科  
群馬大学大学院医学系研究科病態病理学分野  
鳥取大学医学部附属病院小児科  
静岡県立こども病院血液腫瘍科  
九州大学大学院医学研究院 成長発達医学分野  
山形大学医学部小児科学講座  
岡山大学病小児科学講座  
北海道大学小児科学講座

#### < 施設責任者 >

長谷川大一郎  
宇佐美 郁哉  
高橋 義行  
盛武 浩  
熊谷 拓哉  
信澤 純人  
奥野 啓介  
川口 晃司  
大賀 正一  
三井 哲夫  
鷺尾 佳奈  
長 祐子

研究事務局とその連絡先：

大分大学医学部小児科学講座

後藤 洋徳

〒879-5593 大分県由布市挾間町医大ヶ丘 1 丁目 1 番地 大分大学医学部小児科学講座

TEL: 097-586-5833

FAX: 097-586-5839

e-mail: syoni@oita-u.ac.jp

症例登録施設とその連絡先：

大分大学医学部小児科学講座

後藤 洋徳



〒879-5593 大分県由布市挾間町医大ヶ丘1丁目1番地 大分大学医学部小児科学講座  
TEL: 097-586-5833  
FAX: 097-586-5839  
e-mail: syoni@oita-u.ac.jp

#### 研究実施施設の役割及びその連絡先

##### 【検体収集】

大分大学医学部小児科学講座 後藤 洋徳

〒879-5593 大分県由布市挾間町医大ヶ丘1丁目1番地 大分大学医学部小児科学講座  
TEL: 097-586-5833  
FAX: 097-586-5839  
e-mail: syoni@oita-u.ac.jp

##### 【病理診断】

大分大学医学部診断病理学講座

教授 駄阿 勉

〒879-5593 大分県由布市挾間町医大ヶ丘1丁目1番地 大分大学医学部小児科学講座  
Tel : 097-586-5683  
Fax: 097-586-5686

#### 試料・情報の保管施設とその連絡先

大分大学医学部小児科学講座 後藤 洋徳

〒879-5593 大分県由布市挾間町医大ヶ丘1丁目1番地 大分大学医学部小児科学講座  
TEL: 097-586-5833  
FAX: 097-586-5839  
e-mail: syoni@oita-u.ac.jp

## 18. 相談等の対応

### 【相談窓口】

担当者氏名：後藤 洋徳

連絡先：大分大学医学部小児科学講座

電話 097-586-5833

### 【公開先】

大分大学医学部小児科学講座ホームページ

URL : <http://www.med.oita-u.ac.jp/pediatrics/about/member/index.html>

## 19. 研究に関する情報公開

得られた結果から特許などの知的財産権が生み出された場合、

その権利は研究者あるいは研究者の所属する研究機関に帰属する。

異常細胞から得られた遺伝情報を調べるだけで疾患の遺伝性を判定することはほぼ不可能である。よって遺伝子解析結果等を提供者個人には開示しない。

研究対象者の求めに応じ、他の研究対象者等の個人情報等の保護及び当該研究の独創性の確保に支障がない範囲内で研究計画書及び研究の方法に関する資料の情報公開を行う。

資料の入手又は閲覧の方法は上記の相談窓口へ問い合わせいただく。

## 20. 参考文献

- 1) 骨髓異形成症候群におけるエピジェネティック異常、臨床血液 56(2015) : 2
- 2) Loss of the histone methyltransferase EZH2 induces resistance to multiple drugs in acute myeloid leukemia. Nat Med. 2017 Jan;23(1):69-78.
- 3) MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. Nature Reviews Cancer. 2007;7(11):823-33.
- 4) Comparing of IRS and Her2 as immunohistochemical scoring schemes in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. Int J Clin Exp Pathol 2012;5(3):187-194.