

論文の内容の要旨

論文題目

造血器腫瘍におけるゲノム異常の網羅的解析

指導教員 黒川 峰夫 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 中崎 久美

I. 目的

急性骨髄性白血病(AML)、急性リンパ性白血病(ALL)や悪性リンパ腫(NHL)などの造血器腫瘍においては、従来、病型特異的に認められる染色体転座の解析から多数の遺伝子異常が同定され、腫瘍の分子病態の解析が進んでいる。

一方、AML では $t(8;21)(q22;q22)$ の転座は約 6% に認められるものの、AML1/ETO を発現する遺伝子組み換えマウスでは腫瘍化は起こさないなど、染色体転座だけでは腫瘍化に至らないことが報告されている。マウスモデルでも示されるように、腫瘍の発症には染色体の転座に加え付加的な異常が必要である。

造血器腫瘍では、染色体の増幅・欠失など遺伝子の量的異常を伴う異常もしばしば観察されるが、これらの異常の標的遺伝子については、いまだ明らかにされていない部分が多い。近年染色体転座を伴わない急性骨髄性白血病においても、FLT3 遺伝子の internal tandem duplication (ITD) など予後に関わる遺伝子異常も明らかにされてきたが、染色体転座を伴わない標的遺伝子や付加的異常は未だ十分に解明されてはいない。

そこで、これらの異常を明らかにすることを目的として、近年発達してきたゲノム網羅的な腫瘍細胞の遺伝子解析を行なうこととした。

Affymetrix® GeneChip® (100K/500K アレイ) は 12 万-52 万個の single nucleotide polymorphism (SNP) 特異的プローブを用いて大規模 SNP タイピングを可能とする高密度オリゴヌクレオチドアレイであるが、シグナルデータの定量的性質を利用して、平均解像度 6-24 kb、分解能 40bp で腫瘍ゲノムに生じるコピー数の変化を捉えることが可能である。当教室で開発された同アレイを用いた高精度コピー数解析システム (CNAG (Copy Number for GeneChip software)/ CNAGver2.0, AsCNAR (allele-specific copy-number analysis using anonymous references)) を用いて、正常対照を持たない腫瘍細胞や正常・腫瘍細胞が混在する実際の臨床検体についても、染色体分析では同定不能と考えられる微細な増幅・欠失、アレル不均衡を含む多数のゲノムの異常が同定することが可能となっている^{1,2}。これによりコピー数の増減を伴わない

loss of heterozygosity (LOH) 領域すなわち uniparental disomy (UPD) 領域の解析が可能になった。

このシステムを用いて、造血器腫瘍に伴う染色体転座を伴わない標的遺伝子や付加的遺伝子異常の同定を目的として、解析を行なった。

II. 方法

本研究は東京大学医学部倫理委員会において承認された研究(承認番号 948)である。NHL80 症例は、1993 年から 2005 年の間に東京大学医学部附属病院血液・腫瘍内科で診断または治療された症例のリンパ節を含む腫瘍組織検体を用いており、2000 年 4 月以降に診断、治療された症例については研究使用目的を説明の上同意書を得ている。AML 103 症例、及び ALL 47 症例については、2000 年 3 月以前に採取された骨髄または末梢血検体を用い、連結不可能匿名化を行なった。

		AML		ALL		NHL		
検体数		103		47		80		
						全体	DLBCL	FL
						80	41	39
検体採取時の 年齢の中央値 (最小-最大)		52 (16-87)		37 (16-89)		60 (24-85)	65 (24-85)	57 (39-75)
病期	初発	84		初発	31	初発	68	33
	再発	10		再発	16	IPI		
	multilineage	9				Low/L-I	21	26
						H-I/High	12	9
						再発	12	8
再発							8	4
型	初発・再発例 の FAB 分類 計(初発例/再発例)		核型分析		腫瘍の由来			
	M0	3(3/0)	t(8;21)	2	null	1		
	M1	9(9/0)	trisomy 8	0	混合	1		
	M2	36(30/6)	5q-/5	0	不明	1		
	M3	18(18/0)	monosomy 7	1				
	M4	4(3/1)	inv(16), t(16;16)	4				
	M4Eo	4(3/1)	t(9;22)	2				
	M5	15(13/2)	Complex aberrant	22				
	M6	4(4/0)	Other aberrations	12				
	M7	1(1/0)	Not Detected	24				
芽球(%)		73.5±21.4%			82.0±19.0%			
平均±標準偏差		(92 例)			(34 例)			

<表 1> 各疾患別の臨床情報

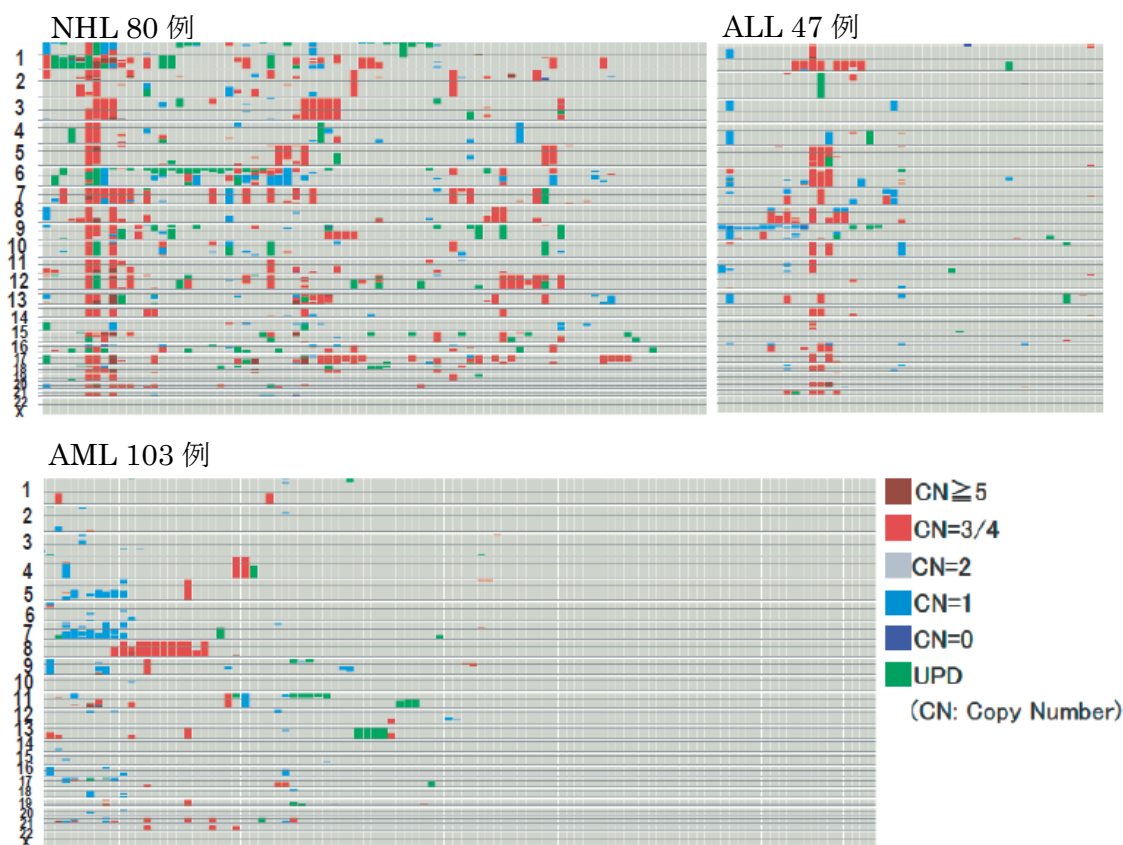
DLBCL: Diffuse Large B-cell Lymphoma, FL: Follicular Lymphoma, multilineage: Acute myeloid leukemia with multilineage dysplasia, IPI: International Prognostic Index, L-I: low-intermediate, H-I: High-Intermediate, 芽球:凍結保存された末梢血または骨髄液中の芽球の割合(芽球の割合が判明している検体数)

これら造血器腫瘍の合計 230 症例について、腫瘍組織のゲノム DNA を新鮮凍結組織から PUREGENE™ DNA Purification Kit (Gentra®) を用いて抽出した。SNP タイピングは、100K/ 500K アレイを用い Affymetrix® (Santa Clara, CA)のプロトコールに従った。タイピングの際のデータに基づいて、当研

研究室で開発された CNAG/ CNAGver2.0、AsCNAR^{1,2}を用いて、ゲノムのコピー数解析及び LOH 解析、UPD の解析を行なった。各疾患別の UPD の頻度については、2x2 分割表を用いてイェーツの補正をした χ^2 検定をし、ボンフェロニ補正を行なうことによって有意差の有無を検討した。UPD を認めた症例について、AML との関連が示されている標的遺伝子候補について、genome direct sequence を施行した。

III. 結果

AML 103 例、ALL 47 例、NHL 80 例の計 230 例の臨床検体(表 1)について、GeneChip® 100K/500K アレイ解析を行なった。図 1 に示すように、NHL において、コピー数の増減がある検体、特に 1 検体中に複数の染色体でコピー数の増減が認められる検体が、AML、ALL の検体に比べ高頻度に認められた。NHL では 80 例中、1q(33%)、6p(21%)、12 番(26%)、18 番(34%)に増幅、1p(28%)、6q(25%)に欠失が高頻度に認められた。



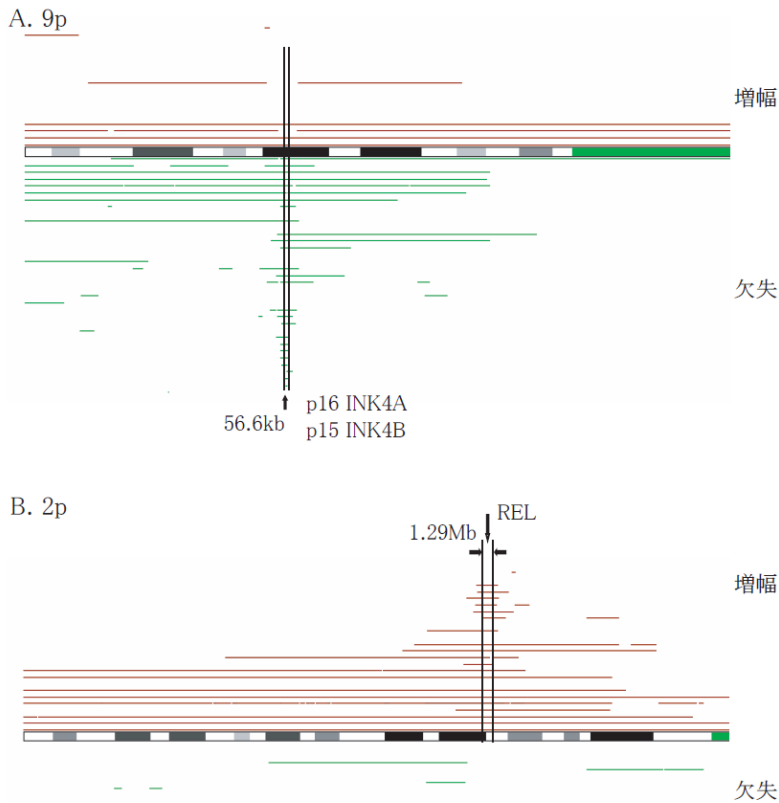
<図 1> 疾患別の染色体コピー数の増減と UPD

各疾患別に横軸に各症例、縦軸に染色体別に、コピー数の増減と UPD の分布を示す。

ALL と NHL には 127 例中 25 例(19.7%)に 9p21 の欠失があり、共通欠失領域 56.6kb に含まれる遺伝子は p16、p15 のみであった。NHL80 例中 21 例に 2p15-16.1 に共通増幅領域が認められ、REL を含むこの共通領域の大きさは 1.29Mp であった(図 2)。

本研究ではアレル別コピー数解析を行なうことによって、特に正常細胞の混在率が高い検体や微小領域の UPD を持つ検体においても、UPD の判定が可能になった。NHL は 80 例中 59 例(74%)と UPD が特に高頻度に認められ、AML、ALL における頻度と比較して有意差($p=3.3 \times 10^{-9}$ 、 $p=1.1 \times 10^{-5}$)を認めた

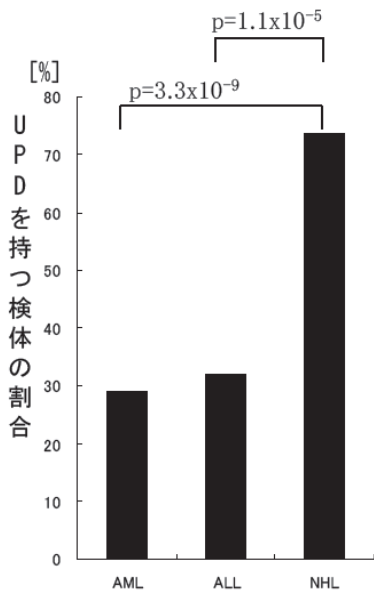
(図 3)。



<図 2> 9p21 の共通欠失領域と 2p の共通増幅領域

A. ALL、NHL 検体の 9p21 共通欠失領域: ALL47 例、NHL80 例について、25 例に 9p21 に共通欠失領域があり、共通領域は 56.6kb に限局され、含まれる遺伝子は p16 (INK4A)、p15 (INK4B) の 2 遺伝子であった。赤線で各検体に認めた増幅領域、緑線で欠失領域を示した。

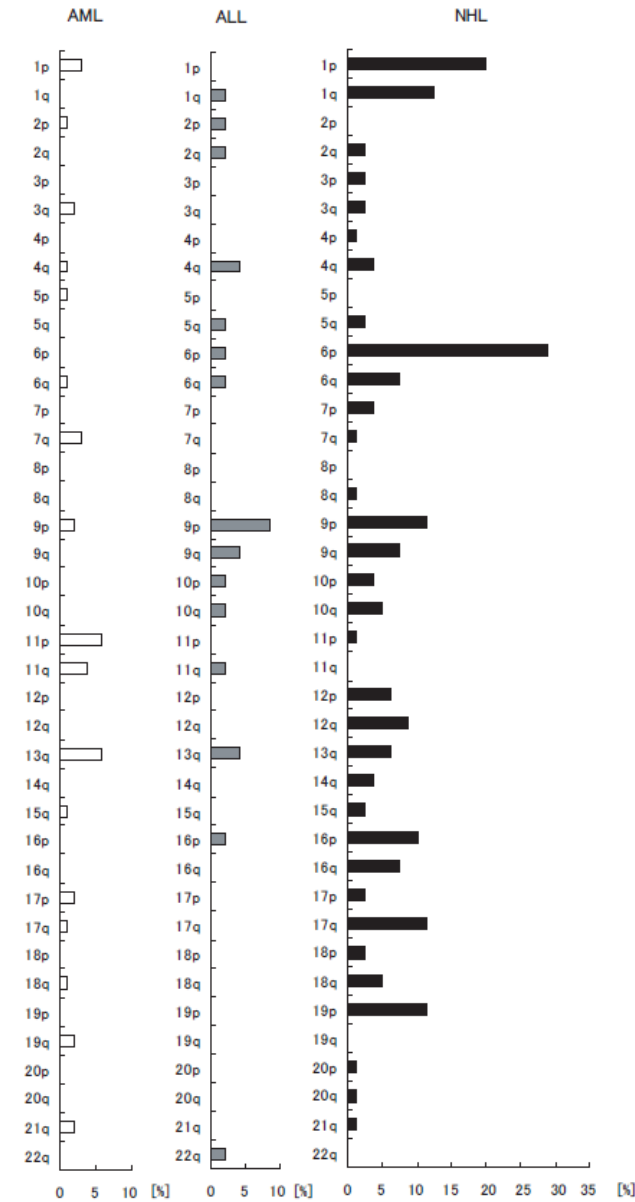
B. NHL 検体の 2p15-16.1 共通増幅領域: NHL80 例中 21 例に 2p15-16.1 に共通増幅領域が認められ、REL を含むこの共通領域の大きさは 1.29Mp であった。赤線で各検体に認めた増幅領域、緑線で欠失領域を示した。



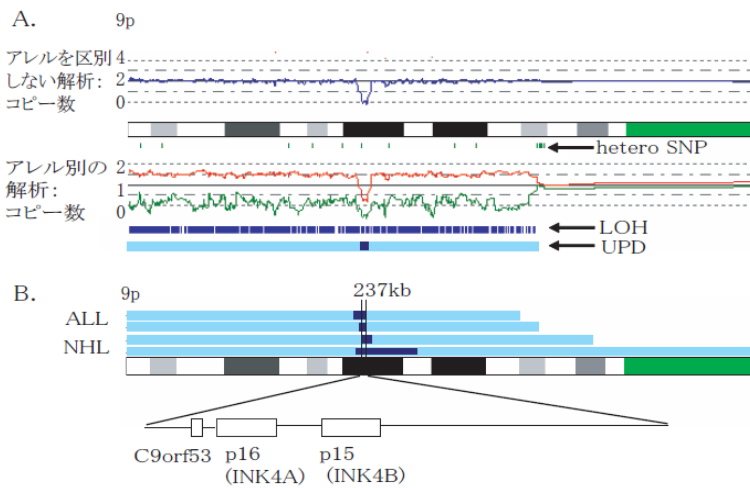
<図 3> 各疾患別の UPD の割合

個々の検体に UPD が認められる頻度について、2x2 分割表を用いてイェーツの補正をした χ^2 検定をし、ボンフェロニ補正を行なうことによって、疾患別に有意差の有無を検討したところ、AML、ALL と NHL 間では UPD の頻度に有意差が認められた。(AML と NHL 間: $p=3.3 \times 10^{-9}$ 、ALL と NHL 間: $p=1.1 \times 10^{-5}$)

NHL において UPD は 1p(20%)、1q(13%)、6p(29%)、9p(11%)、16p(10%)、17q(11%)、19p(11%) に高頻度に認められた(図 4)。ALL と NHL では 9p21 領域に UPD を認める検体の内 4 例に、UPD 領域内に 237kb の共通ホモ欠失を認め、この部位に存在する遺伝子は p16、p15、C9orf53 の 3 遺伝子のみであった(図 5)。



＜図4＞ 各疾患におけるUPD 頻度の染色体毎の分布
 AML 103 例、ALL 47 例、NHL 80 例のうち、各染色体長
 腕・短腕毎に、UPD を持つ検体の割合を示した。



＜図5＞ ALL、NHL 検体の 9p の UPD 部位に
 認めた共通ホモ欠失領域

A. ALL 検体(検体番号: W180545)で 9p に UPD
 を持つ検体のアレイ解析結果: ■は UPD 領域、■
 はホモ欠失領域を示した。

B. ALL、NHL で 9p に UPD を持つ 4 検体の UPD
 領域と共通ホモ欠失領域: ALL2 例、NHL2 例で、
 9p に UPD を認め、かつその内側にホモ欠失領域
 を認めた(■は UPD 領域、■はホモ欠失領域を示
 した。)その共通領域は 237kb で、3 遺伝子
 (C9orf53、p16 (INK4A)、p15 (INK4B))のみを含ん
 でいた。

AMLでは全103例中30例(29.1%)にUPDを認めた。AMLでUPDを認めた検体について、UPDの領域内にあり、AML発症に関わることが知られている遺伝子について、変異の有無を調べた(表2)。その結果、UPDの領域にある既知の標的遺伝子で高頻度に遺伝子変異が認められた。13q領域内にUPDをもつ6例中、UPDの領域内にFLT3領域を含有する4例にのみFLT3ITDを認め、残りの2例にはITD、tyrosine kinase domain (TKD) のcodon 835/836の変異とも認めなかった(図6A)。11qでは4例中3例にCBL遺伝子のホモ変異を認めた。2例はこれまでの報告と同様に、exon8 (Ring Finger Domain)にアミノ酸置換を伴う変異があったが、1例はexon11にホモ変異が同定された(表2、図6B)。19qでは2例にUPDが認められ、2例共にC/EBP α に両アレルに塩基の挿入を認めた(表2、図6C)。また17pにUPDがある2例では2例共にp53、21qではUPDの領域内にAML1が含まれる1例について、AML1の変異を認めた(表2)。

染色体	検体	病期	病型	核型	UPD 部位	標的遺伝子候補	(*)	変異
1p	W150234	初発	M3	add(6)(q15),t(15;17)(q22;q11~12)	1p36.12-pter	c-MPL	×	WT
	W100145	再発	M5	46, XX	1p34.1-pter	c-MPL	○	WT
	W199558	再発	M4	del(12)(q14;q21)	1p36.31-pter	c-MPL	×	WT
9p	W163369	再発	M2	46, XX	9p21.1-pter	JAK2	○	WT
	W157831	初発	M2	不明	9p13.2-pter	JAK2	○	WT
11q	W190483	multilineage		del(5)(q21q34), -9	11q22.2-11q23.3	CBL	○	Y374N
	W170134	初発	M2	不明	11q12.3-qter	CBL	○	WT
	W132710	再発	M2	46, XY	11q13.2-qter	CBL	○	G638R
	W141209	初発	M2	不明	11q13.5-qter	CBL	○	Y374S
13q	W163322	初発	M5a	46, XY	13q 全長	FLT3	○	ITD(+)
	W187978	初発	M2	del(20)(q11)	13q 全長	FLT3	○	ITD(+)
	W123820	初発	M1	46, XX	13q 全長	FLT3	○	ITD(+)
	W190277	初発	M6	不明	13q33.3-13q34	FLT3	×	ITD(-),TKD(-)
	W133811	初発	M4	不明	13q 全長	FLT3	○	ITD(+)
	W130461	初発	M1	不明	13q21.32-13q21.33	FLT3	×	ITD(-),TKD(-)
17p	W152126	multilineage		5q-, -7を含む複雑核型	17p 全長	p53	○	C273R
	W135661	multilineage		-7を含む複雑核型	17p12-pter	p53	○	C275Y
19q	W190397	初発	M5a	inv(9)(q22q11)	19q 全長	C/EBP α	○	ins197HP, ins314K
	W157831	初発	M2	不明	19q 全長	C/EBP α	○	ins318MEL
21q	W152242	初発	M5	不明	21q 全長	AML1	○	exon7 受容部位の変異
	W171228	初発	M2	5q-, -7を含む複雑核型	21q22.12-q22.13	AML1	×	WT

<表2> UPDを持つ染色体別の標的遺伝子とmutation 解析

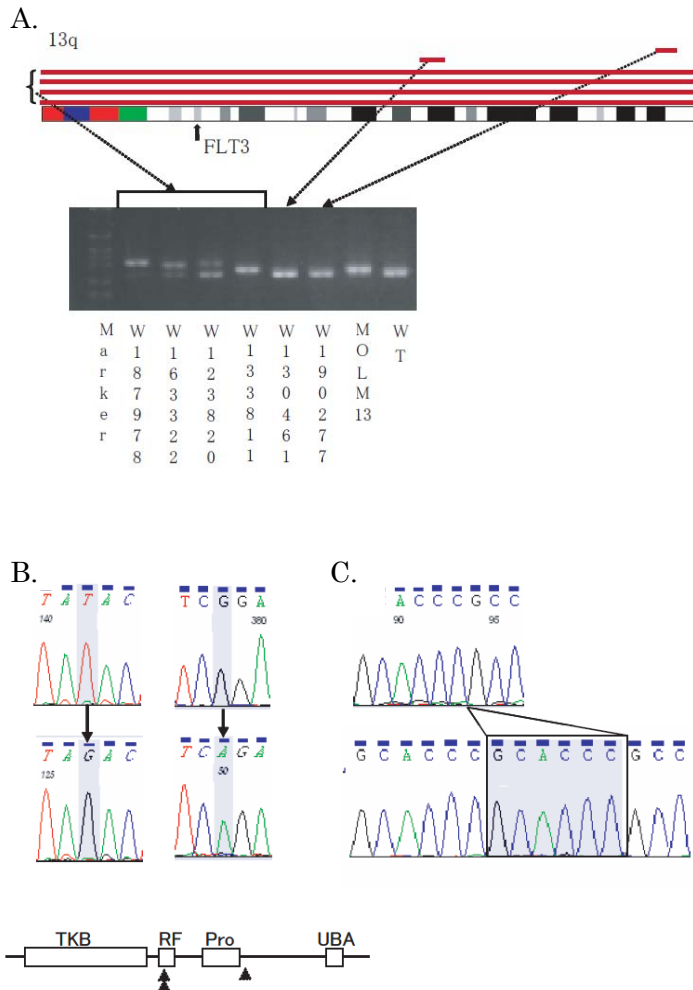
multilineage: Acute myeloid leukemia with multilineage dysplasia、(*)：標的遺伝子候補がUPD領域に含有されているか、○：含有される、×：含有されない、WT: Wild Type、ITD (+): FLT3 internal tandem repeat (ITD) が認められる、ITD(-): FLT3 ITD が認められない、TKD(-): tyrosine kinase domain codon 835/836 の変異が認められない、ins: insertion

IV. 考察

AML、ALL、NHLの造血器腫瘍に対して、SNP解析用オリゴヌクレオチドアレイとCNAG/CNAG ver2.0、AsCNAR^{1,2}を用いてゲノム網羅的な詳細なコピー数解析、またアレル別コピー数解析からLOH、UPDの解析を行なった。

NHLではUPDが74%と高頻度に認められた。AMLでは全体の29%にUPDを認めており、約20%という既存の報告と比べてやや高頻度に検出された。

AMLではUPD領域内に位置するAML発症に関わる既知の遺伝子の変異解析を行なったところ、CBL、C/EBP α 、p53、AML1に高頻度にホモ変異が蓄積していた。特にCBLではexon11にこれまで報告されていない部位のアミノ酸置換を伴うホモ変異が同定された。これらUPD領域内に認める標的遺伝子の変異は、多数例を対象としたAML正常核型の遺伝子異常の報告の頻度と比較しても明らかに高頻度であった。



<図6> AML検体でUPD部位に認められた変異

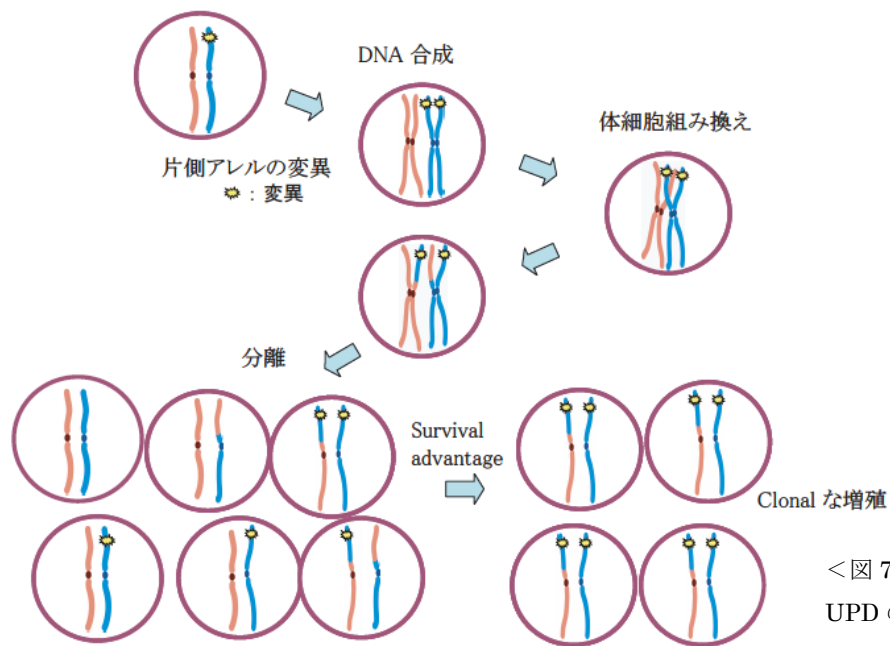
A. FLT3ITD 上段:13qにUPDを持つ6検体のUPD部位の分布(赤線)、下段(写真):各検体のPCR産物の電気泳動でみたFLT3ITD(internal tandem repeat)の有無。(MOLM13: positive control, WT: Wild Type) UPD領域内にFLT3を含む4検体にはITDがなく、FLT3を含まない領域のみにUPDを持つ2検体にはITDが認められなかった。

B. 上段:CBLexon8(左)、exon11(右)に認められたホモ変異 下段:11qにUPDを持つ検体に認められたCBL遺伝子の変異の分布(TKB: tyrosine kinase-binding domain, RF: ring finger domain, PRO: proline-rich domain, UBA: ubiquitin-associated domain, ▲:変異を認めた部位)。exon8(ring finger domain)に2箇所、exon11(Proline-rich domainより3'側)に1箇所ホモ変異を認めた。

C. 19qにUPDを持つ検体(W190397)に認めたC/EBP α 遺伝子の6塩基挿入

ALLとNHLでは9p21領域にUPDを認める検体の内4例に、UPD領域内にp16を含む237kbの共通ホモ欠失領域が認められた。また造血器腫瘍以外では、肝細胞癌や大腸癌などの固形腫瘍でもUPDを認めるという報告があった。

以上からUPDの領域に含まれる標的遺伝子の異常が腫瘍の発症進展に関与する可能性が示唆された。UPDのメカニズムとして図7に示す様に、(1)片側アレルの変異→(2)体細胞組み換えによりUPDが発生(変異アレルが両側になる)→(3)正常細胞や片側アレルのみの変異の細胞よりも増殖や生存に有利となり、細胞集団の中で選択される→(4)clonalに増殖し、両側アレルの変異が細胞集団の中で固定化、腫瘍化するという過程が想定される。この過程で変異を起こす遺伝子は、(1)本研究でホモ欠失が認められたp16の様な癌抑制遺伝子の場合、(2)骨髄増殖性疾患におけるJAK2のように、遺伝子の活性化変異が蓄積される場合などが考えられる。



<図 7>体細胞組み換えによる
UPD の発生メカニズムモデル

NHL では AML に比べ、更に多数の UPD 領域が認められるが、標的遺伝子が未同定のものが多い。また UPD による腫瘍化の機序についても今後の検討課題である。

V. 参考文献

1. Nannya Y et al. Cancer Res. 2005; 65: 6071-9.
2. Yamamoto G et al. Am J Hum Genet. 2007; 81: 114-26.