

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790900

研究課題名（和文） 急性骨髄性白血病に対する超高密度 SNP アレイを用いたゲノム網羅的
遺伝子解析研究課題名（英文） Genome-wide analysis of acute myeloid leukemia using high-density
oligonucleotide arrays.

研究代表者

中崎 久美 (NAKAZAKI KUMI)

東京大学・保健・健康推進本部・助教

研究者番号：70550432

研究成果の概要（和文）：

急性骨髄性白血病の臨床検体 103 例を対象として、超高密度 SNP アレイ (GeneChip® 100K・500K アレイ) を用いて、ゲノム網羅的遺伝子解析 (ゲノムコピー数解析) を行なった。この手法により染色体の 2 本のアレルを区別し、コピー数変化を高精度・高分解能で解析が可能であった。結果、29% に UPD (片親ダイソミー) が検出され、同領域には高頻度にホモ変異を含む多数の遺伝子異常が同定された。

研究成果の概要（英文）：

Genome-wide analysis with single nucleotide polymorphisms (SNP) arrays was conducted for samples from 103 cases with acute myeloid leukemia (AML). We applied high-resolution oligonucleotide microarrays (GeneChip® 100K or 500K arrays) which enabled us to detect allele specific copy number alterations in tumors systemically and sensitively. As a result, Lots of chromosomal aberrations including very small regions were shown in this study, and uniparental disomy was detected in 29% of AML. Homozygous mutations were highly frequently in UPD regions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：血液内科学

キーワード：急性骨髄性白血病・SNP アレイ・遺伝子解析・ゲノム

1. 研究開始当初の背景

(1) 急性骨髄性白血病 (AML) 治療の標的候補としては、病型特異的に認められる染色体転座の解析からすでに多数の遺伝子異常が同定されている。一方、腫瘍化には染色体転座に加え付加的な異常が必要であることも示されている。例えば正常核型 AML においても、FLT3 internal tandem duplication、CEBPA 遺伝子変異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 AML の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。この様な悪性腫瘍を含めた転座にあらわれない疾患関連遺伝子を同定する為の手段として、ゲノム網羅的な遺伝子解析が注目されている。

(2) ゲノム網羅的な遺伝子解析の一つである、SNP (single nucleotide polymorphism) タイピングアレイを利用したコピー数解析方法の開発も急速に発展している。超高密度 SNP アレイを利用した高精度コピー数解析システムである CNAG/ AsCNAR アルゴリズムによる解析手法は、他の解析法と比較して以下の利点がある。①検体中に腫瘍細胞が 20-30% 以上存在すれば解析が可能である、②染色体の 2 本のアレルを区別してコピー数解析が可能であり、ヘテロ接合性の消失 (LOH) と UPD の検出が可能、③平均解像度 24kb (100K アレイ)・6kb (500K アレイ) という高解像度で微小な領域のゲノムのコピー数の変化を判定可能であるという大きな利点がある。特に AML では、WHO 分類の診断基準上、ある特定の染色体転座がある場合以外は骨髄中の芽球が 20% 以上であることが診断の要件であり、他の多くの固形腫瘍と異なり、正常細胞の混在率が大きい場合が多く、本解析方法は極めて有効な解析方法である。

2. 研究の目的

AML の臨床検体 100 例を対象とし、ゲノムのコピー数異常について、染色体別に分布・集積を調べ、異常の集積する領域から腫瘍の発症・進行に関与する標的遺伝子候補を探索することを目的とする。骨髄異形成症候群やマントル細胞リンパ腫を含む様々な造血器腫瘍を対象として、この手法による解析を行ない、UPD を含むゲノムのコピー数異常が蓄積した領域中に存在する CBL や A20 遺伝子の変異が報告されている。また骨髄増殖性疾患、特に polycythaemia vera においては JAK2 遺伝子変異が UPD 領域に蓄積していることが示されている。コピー数変化が蓄積した領域、特に UPD や欠失が高頻度に存在する領域には、AML の発症・進展に関わる遺伝子がある可能性が高いと考えられる。

3. 研究の方法

100 例の AML の臨床検体について、SNP アレイを用いてゲノムコピー数の変化を網羅的に解析する。本研究の解析方法では、正常組織の混入による検出感度の低下がほとんど無く、腫瘍・正常細胞混合検体に対しても、検体中に芽球が 20-30% 以上含まれていればゲノムのコピー数解析をできること、確立された実験方法により、効率よく多数の検体のゲノム網羅的解析が可能であるが特徴である。

① DNA の抽出： AML の検査目的に採取した検体 (骨髄血・末梢血など) の残余を用いて、DNA を抽出する。

② アレイ解析： GeneChip® SNP アレイの通常の SNP タイピング用のプロトコールに従い、アレイ解析を行なう (Affymetrix®)。1 検体につき、100K アレイでは 10 万個、500K アレイでは 52 万個の SNP の情報が得られる。

③ ゲノムコピー数の解析： データ解析は、ソフトウェア CNAG/ AsCNAR アルゴリズムを

用いて行なう。この手法により染色体の2本のアレルを区別し、コピー数変化を捉えることができる。

本研究は東京大学医学部倫理委員会に承認を得た研究であり、倫理指針に則り十分な配慮を行なった。

4. 研究成果

103例のAML症例に対して、SNPアレイを用いたゲノム網羅的なコピー数解析を行なった。対象は、男/女は各65例/38例、年齢は16-87歳(中央値52歳)であった。初発例は84例、再発例は10例、AML with multilineage dysplasia 9例であった。

全103例について染色体毎に、ゲノムのコピー数の増減を図1に示す。103例中63%に、UPDを含めたゲノムのコピー数異常がある領域が検出された。

<図1> AML 103症例の染色体毎のコピー数
↓染色体



Cases→

- CN>5 or CN=5 ■ CN= 3 or 4
- CN=2 (normal) ■ CN=1 ■ CN=0
- UPD or LOH without CN loss (CN; copy number)

103例中、29%にUPDが検出された。UPDの割合はG-bandによる核型分析で正常核型であった例においても、ほぼ同じ割合であった。UPDは染色体1p、7q、11p、11q、13qに集積をした。

13qにUPDを持つ例は6例であった。その

うち、FLT3遺伝子がUPDの領域内に含まれる4例には全てFLT3-ITDが認められた。UPDを持つ例では、AMLや造血器腫瘍で遺伝子異常が知られているc-CBL、CEBPA、RUNX1遺伝子に高頻度にホモ変異が検出された。

以上の様に、AMLに対するSNPアレイとCANG/AsCNARアルゴリズムを用いた、アレルを区別した高解像度のゲノム網羅的解析により、UPDを含め、ゲノムのコピー数の異常を非常に詳細に解析することができた。UPDの領域に含まれる標的遺伝子のホモ変異が高頻度に蓄積していたことから、UPD内の標的遺伝子の異常が腫瘍の発症進展に関与している可能性が推測された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中崎 久美 (NAKAZAKI KUMI)

東京大学・保健・健康推進本部・助教

研究者番号：70550432

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：