

## 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25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22790974

研究課題名（和文）

CGHアレイを用いたダウン症関連急性巨核芽球性白血病の発がんメカニズムの解明

研究課題名（英文）

The research of the leukemogenesis in patients with DS-AMKL by using CGH array

研究代表者

濱 麻人 (HAMA ASAHITO)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30566964

研究成果の概要（和文）：

ダウン症児において一過性異常骨髄増殖症（TAM）から急性巨核芽球性白血病（DS-AMKL）に進展するメカニズムを明らかにするために、DS-AMKL 11例、non-DS-AMKL 12例についてSNPアレイおよび遺伝子解析を行った。DS-AMKL/non-DS-AMKLにおいて、somatic gainが7/7例、deletionが8/5例みられた。遺伝子解析ではGATA1変異がDS-AMKLの11例、non-DS-AMKLの1例で確認された。

研究成果の概要（英文）：

To reveal the mechanism of the development from transient abnormal myelopoiesis (TAM) to acute megakaryoblastic leukemia (DS-AMKL) in children with Down syndrome, we analyzed these subgroups of patients (11 children with DS-AMKL, 12 children with non-DS-AMKL) by SNP array-based karyotyping and sequencing. Somatic gains were found in 7 DS-AMKL patients, while deletions were found in 8 DS-AMKL patients. Somatic gains were found in 7 non-DS-AMKL patients, while deletions were present in 5 patients. Mutational screen found *GATA1* mutations in 10/11 DS-AMKL, but mutations were rare in non-DS-AMKL (1/12).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：小児科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：急性巨核芽球性白血病、ダウン症候群、一過性異常骨髄増殖症、染色体異常、CGHアレイ、SNPアレイ、小児、GATA1

## 1. 研究開始当初の背景

ダウン症（DS）児においては、約10%が新生児期に一過性異常骨髄増殖症（TAM）を発症し、一旦は自然軽快するものの、その約20%が4歳までに急性巨核芽球性白血病

（AMKL）を発症することが知られている。2002年、WechslerらはGATA1遺伝子の後天的変異をDS-AMKL 6例全てに認めたと報告した（Wechsler J, et al. *Nat Genet.* 2002）。その後、TAMにおいてもGATA1変異が確認さ

れた。DSに発症する白血病のほとんどがAMKLであるという事実は、GATA1が赤血球、巨核球の分化に不可欠な転写因子であることを反映している。さらに、白血病の多段階発症説から類推すると、AMKLの進展にはGATA1の変異に加えて、細胞の増殖に関連する他の遺伝子変異が関与していると考えられる。

2006年、WaltersらはDS-AMKL由来細胞株(CMK)、DS-AMKL 3例中1例、およびnon-DS-AMKL 16例中1例にJAK3変異を認めたと報告した(Walters DK, et al. *Cancer Cell*. 2006)。我々もTAMからAMKLへの進展に関与する遺伝子を探るため、TAMおよびDS-AMKLにおいて、細胞増殖に関連すると考えられる遺伝子(FLT3, NRAS, p53, KIT, JAK3, JAK2)等の遺伝子変異の有無を検討した結果、14例中2例にp53の変異を、11例中1例にJAK3の変異を認めた(Hirose Y, et al. *Leukemia*. 2003; Kiyoi H, et al. *Leukemia*. 2007)。しかし、p53およびJAK3変異はTAMにおいてもそれぞれ1例ずつみられており、TAMからAMKLへの進展に関与するとは考えにくい。最近、MalingeらはDS-AMKLの7例中2例にFLT3の変異を、小児non-DS-AMKLの20例中、FLT3-ITD、KIT変異およびMPL変異を1例ずつ認めたと報告した(Malinge S, et al. *Blood*. 2008)。このことからJAK-STATシグナル伝達経路に関する遺伝子とAMKL発症との関連が示唆され、さらに検討をすすめていく必要があると考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) TAMとDS-AMKLにおいてCGHアレイ(SNPアレイ)を施行し、比較することで染色体異常の違いを明らかにし、染色体の増減の集中する部位から候補遺伝子を絞り込み、さらに遺伝子解析を行うことによって、TAMからAMKLへの進展に関与する遺伝子変異を同定する。

(2) これまでにAMKLの一部の症例において変異が確認されているp53、JAK3、JAK2、FLT3、KIT、MPL、ASXL1、IDH1/2、DNMT3A、RUNX1およびCBLについて、遺伝子変異の有無を確認し、その頻度を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) TAMおよびDS-AMKLの芽球から抽出したDNAを用いて、CGHアレイ(SNPアレイ)を施行する。CGHアレイはアジレントのオリゴDNAマイクロアレイを用いる。まず、患者検体からDNA extraction kit (Qiagen)を用いて抽出したDNA(500ng~3μg)を Genomic DNA

Labeling キットを用いてラベル化する(DNA500ng未満の場合はまずDNAを増幅する)。コントロールサンプルをCy3-Dutpで、ターゲットサンプルをCy5-dUTPでラベル化し、Microcoron YM-30 filter units (ミリポア社)を用いてラベル化DNAの精製および濃縮を行う。その後、ハイブリダイゼーションを施行し、スライドガラスを洗浄する。次にスキャンを行い、Feature Extractionソフトウェアを用いてスポットの数値化を行う。最後にCGH analyticsを用いてデータ解析を行う。

複数の検体で重複してみられる染色体の欠失や付加的異常の部位に位置する遺伝子を候補遺伝子とし、白血病の発症に関わっている可能性の高い遺伝子から、その遺伝子のコード領域全長をPCR法により増幅後、直接塩基配列決定法により遺伝子変異の有無を解析する。

(2) これまでにAMKLにおいて変異が確認されているGATA1、p53、JAK3、JAK2、FLT3、KIT、MPL、ASXL1、IDH1/2、DNMT3A、RUNX1およびCBLについて、患者検体から抽出したDNAを用いて、それぞれの遺伝子のコード領域全長をPCR法により増幅後、シーケンス反応を経て、ABI3100オートシーケンサーにより塩基配列の決定を行い、変異の有無を解析する。

## 4. 研究成果

(1) DS-AMKL 11例(図1)、non-DS-AMKL 12例(図2)についてSNPアレイを行った。Somatic gain(図3)はDS-AMKLで7例(1q gainが4例、7q gainが2例)(64%)、non-DS-AMKLで7例(trisomy 8が2例、trisomy 21が2例)(58%)みられた(p=1.000)。特にDS-AMKLにおいてのみ、4例で1q gainがみられ、DS-AMKLの発症に関与している可能性が示唆された(p=0.037)。

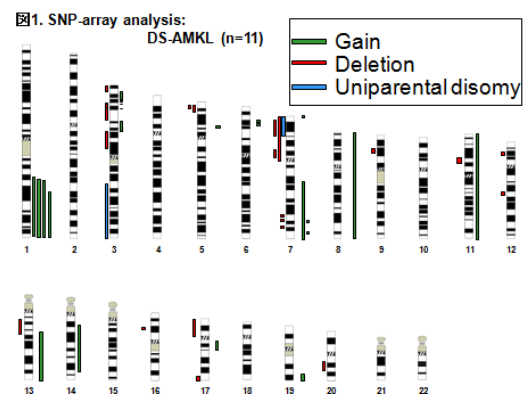


図1. DS-AMKL11例のSNPアレイ解析結果

図2. SNP-array analysis: non-DS-AMKL (n=12)

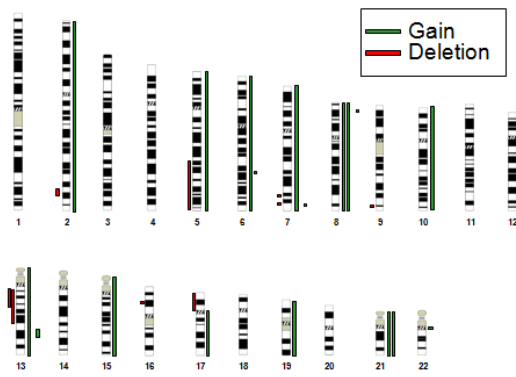


図 2. non-DS-AMKL 12 例の SNP アレイ解析結果

図3. DS-AMKLとnon-DS-AMKLにおけるgainの比較

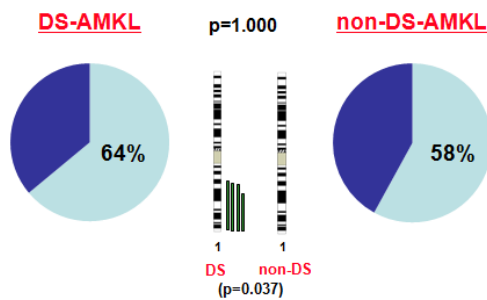


図 3. DS-AMKL と non-DS-AMKL における gain の比較

DS-AMKL の 4 例にみられた 1q gains の詳細を図 4 に示す。4 例中 2 症例で切断点が 1q25.1 で一致しており、この部位に存在する遺伝子が DS-AMKL の発症に関与している可能性が考えられる。

図4. DS-AMKL の4症例にみられた1q gains  
Break point (1q25.1)

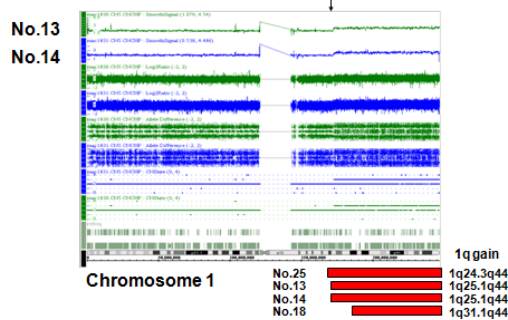


図 4. DS-AMKL の 4 症例にみられた 1q gains

Somatic deletion (図 5) は DS-AMKL の 8 例 (5p deletion が 2 例、7p deletion が 2 例) (73%)、non-DS-AMKL の 5 例 (7q deletion が 3 例、13q deletion が 2 例) (42%) でみられた ( $p=0.214$ )。FLT3 が位置する 13q の欠失が 3 例 (DS-AMKL 2 例、non-DS-AMKL 1 例)、がん抑制遺伝子の一つである p53 が位置する 17p の欠失が 2 例 (DS-AMKL 1 例、non-DS-AMKL 1 例)、WT1 が位置する 11p の欠失が DS-AMKL の 1 例および EZH2 が位置する 7q の欠失が non-DS-AMKL の 1 例にみられた。それぞれの症例において FLT3、p53、WT1、EZH2 遺伝子について直接シーケンス法を用いて解析したところ、DS-AMKL の 1 例で p53 変異が確認された。

図5. DS-AMKLとnon-DS-AMKLにおけるdeletionの比較

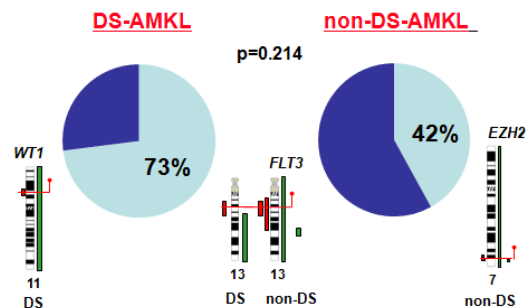


図 5. DS-AMKL と non-DS-AMKL における deletion の比較

Uniparental disomy (UPD) は DS-AMKL の 1 例で 3q と 7p の 2 箇所のみみられたのみであり、その頻度は低いと考えられた (図 1)。

(2) 直接シーケンス法による遺伝子解析では GATA1 変異が DS-AMKL 11 例中 10 例 (91%)、non-DS-AMKL 12 例中 1 例 (8%) で確認され、non-DS-AMKL においても GATA1 変異がみられることが明らかになった (表 1)。JAK3、JAK2、TP53 変異が DS-AMKL で 1 例 (9%) ずつ、同一症例にみられたが、non-DS-AMKL ではみられなかった。FLT3、KIT、MPL、ASXL1、IDH1/2、DNMT3A、RUNX1 および CBL 変異はいずれのグループにおいてもみられなかった。一方で、NRAS 変異が non-DS-AMKL の 2 例 (17%) で見つかった。

表1. 遺伝子解析結果のまとめ

	DS-AMKL (n=11)	non-DS-AMKL (n=12)
<b>GATA1</b>	<b>10</b>	<b>1</b>
<b>JAK3</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>JAK2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>p53</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>NRAS</b>	<b>0</b>	<b>2</b>

表 1. 遺伝子解析結果のまとめ

DS-AMKL と non-DS-AMKL では遺伝子変異の種類や頻度に違いがあることが明らかになり、両者の白血病発症のメカニズムが異なることを示唆していると考えられる。

## 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 1 件)

- ① Molecular lesions in childhood and adult acute megakaryoblastic leukaemia. Hama A, Muramatsu H, Makishima H, Sugimoto Y, Szpurka H, Jasek M, O'Keefe C, Takahashi Y, Sakaguchi H, Doisaki S, Shimada A, Watanabe N, Kato K, Kiyoi H, Naoe T, Kojima S, Maciejewski JP. Br J Haematol. 2012;156:316-325. (査読あり)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Hama A. Gene Alterations in Acute Megakaryoblastic Leukemia (AMKL): a Comparison of AMKL with and without Down Syndrome. 52nd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orland, USA, 2010. 12. 7
- ② 濱 麻人. Gene alterations of acute megakaryoblastic leukemia (AMKL) with and without Down syndrome. 第 72 回日本血液学会学術集会, 横浜, 2010. 9. 25

## 5. 研究組織

(1) 研究代表者  
濱 麻人 (HAMA ASAHITO)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 30566964

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者なし