

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21790907

研究課題名 (和文) 骨髄異形成症候群における4番染色体長腕の新規標的遺伝子の探索

研究課題名 (英文) Exploring new gene target of 4q-UPD in Myelodysplastic syndromes

研究代表者

真田 昌 (SANADA MASASHI)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：20529044

研究成果の概要 (和文)：

骨髄異形成症候群 (MDS) の高密度 SNP アレイ解析により約 30%の症例に観察されるコピー数の変化を伴わない LOH (aUPD) 領域内には、標的候補である遺伝子変異が高頻度に存在する。そこで同領域内の標的遺伝子探索を行い、4番染色体長腕 aUPD 例において TET2 遺伝子変異が高頻度に生じており、同領域の標的遺伝子であることが明らかとなった。TET2 変異は MDS および関連疾患の約 30%の症例で認められ、MDS の病態に重要な役割を担っていると予想される。一方、SNP アレイの解析によっても、コピー数異常や UPD を有さない症例は MDS の 20-30%存在し、ゲノム異常領域からのアプローチには限界がある。そこで近年、急速な技術革新が見られている次世代リシーケンサを活用した target-capture sequencing による MDS における新規変異遺伝子の網羅的な探索を試み、20 例の MDS 症例の全エクソン解析により、約 200 個の腫瘍細胞特異的な変異が同定された。既知の標的遺伝子変異の他にも、多数の新規遺伝子変異が含まれた。複数の症例において共通して観察される遺伝子変異もあり、現在、それらの変異の多数例における頻度の解析を進めている。今後、本アプローチにより、治療標的となり得る分子が同定されることが期待される。

研究成果の概要 (英文)：

Using high resolution single nucleotide polymorphism (SNP) microarrays to examine DNA copy number alterations and loss of heterozygosity (LOH), copy-number neutral LOH (aUPD) were seen in about 30% cases of MDS. We identified recurring aUPD involving 4q24 and led to the identification of *TET2* mutations by target sequencing. We also conducted whole exome analysis of 20 MDS samples, where entire exon sequences were enriched by using SureSelect Human All Exon kit and were subjected to resequencing analysis using Genome Analyzer IIx. By comparing sequences in tumors and paired T cells, nearly 200 somatic mutations and 10 insertions-deletions were detected in total. Our results suggested that target-capture resequencing technology is a powerful method to identify new gene mutations that are implicated in the pathogenesis of MDS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：ライフサイエンス

科研費の分科・細目：血液内科・ゲノム医科学

キーワード：骨髄異形成症候群・ゲノム・遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

MDS は、血球減少と急性白血病への移行を特徴とする造血器腫瘍である。従来の抗腫瘍剤を用いた化学療法は無効である症例が多く、かつ高齢者に多いことから、副作用が少なく、有効な分子標的療法が望まれている。有効な治療法の確立に当たっては、未だ不明な点が多い MDS の分子病態の解明と分子機構に基づいた分類が進むことが必要である。

ヘテロ接合性の消失 (LOH) は多くの腫瘍性疾患で普遍的に観察される異常で、癌抑制遺伝子座との緊密な関連が示唆されてきたが、MDS における LOH のゲノムワイドな分布やその病態への関与に関しては知見に乏しかった。先に我々は高密度 SNP アレイ (Affymetrix 社 GeneChip® array) を用いた、ゲノムコピー数とアレルの量的変化の高感度な解析システム CNAG/AsCNAR を開発した。このシステムを用いて、222 例の MDS について網羅的な LOH 解析を行ない、アレルの欠失に伴う多数の LOH に加え、SNP アレイによる解析により初めて網羅的な解析が可能となったコピー数の変化を伴わない LOH (Uniparental disomy, UPD) を示す領域が約 30% の症例に同定された。それらはいくつかの染色体領域に集積し、MDS はゲノム変化に基づき、いくつかのサブグループに分類された。UPD は既知の標的遺伝子座を含む領域に集積し、UPD を有する症例では当該遺伝子の変異が高頻度に観察されることから、標的遺伝子が不明の UPD 領域にも標的となる遺伝子変異が存在すると考えられた。そこで我々は先行研究において 11qUPD からユビキチンリガーゼである c-cbl 遺伝子の変異を同定した。MDS におけ

る UPD は比較的長い領域で生じており、標的遺伝子候補を絞り込むことは容易ではなく、UPD の集積が認められる 1 番染色体長腕、4 番染色体長腕、7 番染色体長腕、14 番染色体については、標的遺伝子の同定には至っていない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、MDS の新規治療標的分子の同定を目指した分子病態の解明目的に、次世代シーケンサー技術を駆使した網羅的変異解析から新規変異遺伝子の探索を行う。これまでに行った MDS の SNP アレイ解析結果をもとに、target capture sequence を行うことにより、効率良く標的遺伝子変異を同定することを目指す。

3. 研究の方法

当初の研究計画では、4 番染色体長腕の UPD の最小共通領域をカバーするタイリング BAC-アレイを自作し、アレイスライド上で断片化したゲノム DNA をハイブリダイズすることにより、UPD 領域に含まれるゲノム DNA を濃縮することを予定していた。しかし、研究計画開始後に、液相で目的とするフラグメントを濃縮するキットがアジレント社より市販され、今後の研究の発展・汎用性も考慮し、変異の意義を検証しやすい翻訳領域すなわちエクソン領域を対象とした target capture kit を用いて本研究を遂行した。MDS 患者由来の骨髄単核球および同患者より採取した末梢血 T リンパ球より抽出したゲノム DNA を超音波破碎によりフラグメント化した後に、全エクソン領域に対して相補的に設計され

た配列を用いて、濃縮を行った後に網羅的なシーケンスを行った。次世代シーケンサーにより読まれた配列情報から、ヒトゲノムの標準配列と異なり、既知の多型データベースにも登録がなく、かつ自己正常細胞（T細胞）には観察されない配列をMDS細胞特異的な体細胞変異候補として抽出し、サンガーシーケンスによる変異の確認を行った。

4. 研究成果

全ゲノムの1.5%程度であるエクソン領域のtarget captureを行ってから、シーケンスを行うことにより、読まれた配列情報の60%以上はエクソン領域に位置しており、翻訳領域を濃縮してシーケンスすることが可能であった。MDSは急性骨髄性白血病などと異なり寛解期検体を得られず、また造血幹細胞レベルでの遺伝子異常により発症すると考えられおり、血液系の細胞から完全に正常細胞を取得することは困難と考えられる。今回の解析においては、末梢血からTリンパ球を抗体ビーズにより分離し使用したが、多くの症例において、Tリンパ球では観察されない変異が骨髓検体においては認められ、正常対照として十分に活用できると考えられた。血球減少が顕著な症例などにおいては、十分な細胞数のTリンパ球を限られた末梢血中から分離することは困難であったが、サイトカイン刺激のもとで、体外で培養することにより増幅可能であり、増幅に伴う解析への影響も観察されなかった。

4番染色体長腕aUPD例の解析においてTET2遺伝子変異が確認され、他の4q-aUPDを有する症例においてもTET2遺伝子変異が高頻度（5/6例）に観察され、同領域の標的遺伝子であることが明らかとなった。TET2変異はMDSおよび関連疾患の約30%の症例で認められ、MDS病態に重要な役割を担っていると予

想された。またTET2変異が同定された症例においても、TET2変異以外にも複数の遺伝子変異が観察された。本研究期間中に4q-UPDを有さない症例も含めて20例のMDS症例の全エクソン解析を完了しており、約200個のMDS細胞特異的な変異が確認された。既知の標的遺伝子変異の他にも、多数の新規遺伝子変異が同定された（論文投稿準備中）。複数の症例において共通して観察される遺伝子変異もあり、今後、それらの変異の多数例における頻度や臨床データとの関連解析および変異遺伝子の機能解析を進めていく。本アプローチにより、MDSの病態に重要な変異遺伝子が同定され、分子病態の理解、新たな治療法の開発が進むことが期待される。

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17件）すべて査読あり

1. Oki K, Takita J, Hiwatari M, Nishimura R, Sanada M, 他7名. IDH1 and IDH2 mutations are rare in pediatric myeloid malignancies. **Leukemia**. 2011;25(2):382-4.
2. Ogawa S, Takita J, Sanada M, Hayashi Y. Oncogenic mutations of ALK in neuroblastoma. **Cancer Sci**. 2011; 102(2):302-8.
3. Yoshida K, Sanada M, Kato M, 他7名. A nonsense mutation of IDH1 in myelodysplastic syndromes and related disorders. **Leukemia**. 2011;25(1):184-6.
4. Ogawa S, Shih LY, Suzuki T, 他3名, Sanada M. Deregulated intracellular signaling by mutated c-CBL in myeloid neoplasms. **Clin Cancer Res**. 2010; 16(15):3825-31.
5. Okamoto R, Ogawa S, Nowak D, 他3名, Sanada M, 他6名. Genomic profiling of

adult acute lymphoblastic leukemia (ALL) by single nucleotide polymorphism oligonucleotide microarray and comparison to pediatric ALL. **Haematologica** 2010; 95(9): 1481-8.

6. Tada M, Kanai F, Tanaka Y, Sanada M, 他 10 名. Prognostic significance of genetic alterations detected by high-density single nucleotide polymorphism array in gastric cancer. **Cancer Sci.** 2010;101(5):1261-9.

7. Shiba N, Kato M, Park MJ, Sanada M, 他 6 名. CBL mutations in juvenile myelomonocytic leukemia, but not in pediatric myelodysplastic syndrome. **Leukemia** 2010;24(5):1090-2.

8. Ogawa S, Sanada M, Shih L, 他 4 名. Gain-of-function c-CBL mutations associated with uniparental disomy of 11q in myeloid neoplasms. **Cell Cycle** 2010; 23;9(6).

9. Thoennissen NH, Krug UO, 他 8 名, Sanada M, 他 10 名. Prevalence and prognostic impact of allelic imbalances associated with leukemic transformation of Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. **Blood.** 2010;115(14):2882-90.

10. Sanada M, Suzuki T, Shih LY, 他 26 名. Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms. **Nature.** 460:904-908, 2009.

11. Kato M, Sanada M, Kato I, 他 26 名. Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. **Nature.** 459:712-716, 2009.

12. Yin D, Ogawa S, 他 8 名, Sanada M, 他 4 名. High-resolution genomic copy number profiling of glioblastoma multiforme by

single nucleotide polymorphism DNA microarray. **Mol Cancer Res.** 7:665-677, 2009.

13. Lee SY, Kumano K, Nakazaki K, Sanada M, 他 15 名. Gain-of-function mutations and copy number increases of Notch2 in diffuse large B-cell lymphoma. **Cancer Sci.** 100:920-926, 2009.

14. Akagi T, Shih LY, 他 6 名, Sanada M, 他 8 名. Single nucleotide polymorphism genomic arrays analysis of t(8;21) acute myeloid leukemia cells. **Haematologica.** 94:1301-1306, 2009.

15. Akagi T, Shih LY, 他 3 名, Sanada M, 他 5 名. Hidden abnormalities and novel classification of t(15;17) acute promyelocytic leukemia (APL) based on genomic alterations. **Blood.** 113:1741-1748, 2009.

16. Akagi T, Ogawa S, 他 4 名, Sanada M, 他 6 名. Frequent genomic abnormalities in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome with normal karyotype. **Haematologica.** 94:213-223, 2009.

17. Fujita K, Sanada M, Harada H, 他 5 名. Molecular cloning of t(2;7)(p24.3;p14.2), a novel chromosomal translocation in myelodysplastic syndrome-derived acute myeloid leukemia. **J Hum Genet.** 54:355-359, 2009.

[学会発表] (計 10 件)

1. 真田 昌ら. 骨髄異形成症候群の全エクソンシーケンス. 第 72 回日本血液学会学術総会 2010 年 9 月 24-26 日・横浜
2. 真田 昌ら. 骨髄系腫瘍における CBL 変異の機能解析. 第 72 回日本血液学会学術総会 2010 年 9 月 24-26 日・横浜
3. 真田 昌ら. Molecular mechanism of

- mutant C-CBL in myeloid neoplasms. 第 69 回日本癌学会学術総会 2010 年 9 月 22-24 日・大阪
4. 真田 昌. Genetic Basis of Myelodysplastic syndromes. 第 69 回日本癌学会学術総会 (招待講演) 2010 年 9 月 22-24 日・大阪
 5. 真田 昌. Molecular mechanism of mutant C-CBL in myeloid neoplasms. 15th Congress of the European Hematology Association. 2010 年 6 月 10-13 日・バルセロナ、スペイン
 6. 真田 昌ら Gain-of-function mutations of C-CBL in Myeloid Neoplasms 51th Annual Meeting of the American Society of Hematology 2009 年 12 月 5-8 日・オランダ、アメリカ
 7. 真田 昌ら. 11 番染色体長腕UPDを有する骨髄異形成症候群におけるがん抑制遺伝子c-cblの機能獲得型変異 第 71 回日本血液学会学術総会 2009 年 10 月 23-25 日・京都
 8. 真田 昌ら. Gain-of-function of mutated c-Cbl tumor suppressor associated with 11q UPD in myeloid neoplasms 第 68 回日本癌学会学術総会 2009 年 10 月 1-3 日・横浜
 9. 真田 昌ら. 骨髄異形成症候群における 11 番染色体長腕UPDとがん抑制遺伝子 c-Cblの機能獲得型変異. 日本人類遺伝学会第 54 回大会 2009 年 9 月 23-26 日・東京
 10. 真田 昌ら. Gain-of-function mutations of c-Cbl tumor suppressor in MDS and MDS/MPD associated with 11q UPD. 16th Congress of the European Hematology Association. 2009 年 6 月 4-7 日・ベルリン、ドイツ

[図書] (計 3 件)

1. 真田 昌 (共著) Annual Review 血液 2011 中外医学社 2011 年 3 月刊行、229 (84-90)
2. 真田 昌 (共著) 血液診療エキスパート「貧血」 中外医学社 2010 年 3 月刊行 253 (206-208)
3. 真田 昌 (共著) 臨床に直結する血液疾患診療のエビデンス 文光堂 2009 年 5 月刊行 397 (45-48)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件) なし
- 取得状況 (計 0 件) なし

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真田 昌 (SANADA MASASHI)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：20529044

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし