

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670466

研究課題名(和文)急性骨髄性白血病におけるクローン進化の空間的多様性の検討

研究課題名(英文)Analysis of tumor heterogeneity in acute myeloid leukemia

研究代表者

小川 誠司(ogawa, seishi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60292900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：急性骨髄性白血病(AML)において空間的な腫瘍の多様性が存在するか検証するために、AML剖検例2例より多数サンプリングを行った。具体的には、5～7ヶ所の骨髄、末梢血、血漿および頬粘膜の検体を採取し、全エクソンシーケンスを行った。その結果、各検体において28～68個の変異を認め、その中で、各々共通する変異(shared)およびその部位固有の変異(private)を認め、腫瘍内の多様性が確認された。それらの特徴として、近接する部位から採取した検体ではお互いにprivate変異は少なく、離れている部位から採取した検体ではお互いに多くのprivate変異が認められるということが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To clarify tumor heterogeneity in acute myeloid leukemia (AML), we performed multi-sampling and whole-exome sequencing in two AML autopsy cases. The specimens examined included those obtained from bone marrow (5-7 sites), peripheral blood, plasma, and buccal smear (germline control). As a result, we identified 28-68 mutations in these samples, consisting of shared and private mutations. Interestingly, we found that the more distant the compared bone marrow sites, the more the number of private mutations between them. These results suggest the presence of tumor heterogeneity and its feature in AML.

研究分野：血液内科学

キーワード：急性骨髄白血病 腫瘍内多様性 全エクソンシーケンス

## 1. 研究開始当初の背景

近年、大量並列シーケンス技術を背景としがんの体細胞性変異の解析によって、様々ながん腫において多数の繰り返し認められる体細胞変異が同定され、同じ種類のがん腫においても患者間で多様な遺伝子異常が認められることが明らかになっている。しかし、最近の研究により腫瘍間だけでなく腫瘍内にはにおいても遺伝子レベルの不均一性が存在することが明らかになっている。

特に、乳がん、腎がん、膵がんなどの固形がんにおいては、原発巣と転移巣の間だけでなく、原発巣内においても部位により遺伝子異常の有無や頻度が異なり、腫瘍全体に渡って様々な亜クローンが存在することが明らかとなっている(Gerlinger et al., N Engl J Med, 2012; Nik-Zainai et al., Cell, 2012; Campbell et al., Nature 2010)。さらに、このような腫瘍内の不均一性が従来の治療に対する抵抗性や再発に関与していると想定されている。

申請者はこれまでに骨髄性腫瘍においてスプライシング経路に参与する遺伝子やコヒーシ複合体、SETBP1などに遺伝子異常が認められることを明らかにしてきた(Yoshida et al., Nature, 2011; Kon et al., Nat Genet, 2013; Sakaguchi et al., Nat Genet, 2013; Makishima et al., Nat Genet, 2013)。これらの研究のほとんどは造血組織中の1部位からサンプリングした検体を用いて解析しており、部位による不均一性が存在する可能性を想定していなかった。そのため造血器腫瘍においても骨髄内の部位による不均一性が存在するか検証する必要があると考えた。

## 2. 研究の目的

このような学術的背景を踏まえて、本研究では、急性骨髄性白血病(acute myeloid leukemia: AML)患者において、骨髄内の部位により多様なクローンが存在するか(空間的な不均一性の有無)を検証することを目的とする。

具体的には、AML患者において、剖検例における複数個所の骨髄検体のサンプリング、初発例における骨髄と末梢血検体、血漿DNAのサンプリングにより、同一患者より同一時点において複数のDNAサンプルを採取し、次世代シーケンサーにより全エクソンシーケンスを行う。その結果、変異アレルの構成頻度によりサンプル間のクローン構成の違いを評価し、骨髄内におけるクローンの空間的な不均一性が存在するか検証する。

## 3. 研究の方法

### AML 剖検例における腫瘍の空間的不均一性の解析

AML患者骨髄における様々な部位からサンプリングを行うために、倫理面に配慮して剖検例から実施する予定とした。具体的には、2例のAML患者より剖検時に左右の大腿骨・下腿骨・上腕骨などの長管骨、椎体、腸骨、胸骨など全身の異なる部位において5~7ヶ所より骨髄検体をサンプリングした。採取したサンプルからゲノムDNAを抽出し、次世代シーケンサーにより全エクソンシーケンスを行い、体細胞変異を同定した。

その結果、各骨髄部位において認められる遺伝子異常の有無や種類、クローン構成を相互に比較することにより、AML同一患者内において骨髄内に空間的な不均一性が存在するか検証した。

### 剖検例からの複数ヶ所の骨髄サンプリング

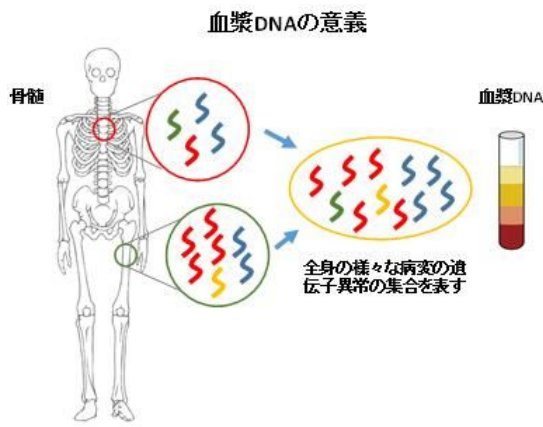


### AML 初発例における骨髄・末梢血検体、血漿DNA検体を用いた腫瘍の不均一性の解析

前述の剖検例において、さらに末梢血検体をサンプリングする。これらのDNA検体を用いてと同様に全エクソンシーケンスを行い、体細胞変異の同定およびアレル頻度の測定、クローン構成の違いなどを検証した。その結果、造血組織の違いによる腫瘍の不均一性を明らかにすることが可能である。

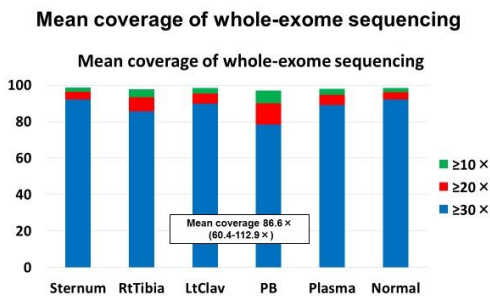
また、腫瘍患者の血漿中には腫瘍由来の循環細胞フリーDNA(circulating cell-free DNA)が存在していることが知られており、この循環細胞フリーDNAを解析することにより腫瘍に存在する変異や腫瘍量についての情報が得られることが明らかにされている(Forshever, Sci Trans Med, 2012)。特に乳がん、卵巣がん、肺がんなど固形がんにおいて

は、連続した血漿 DNA の全エクソンシーケンスにより、治療抵抗性の出現と関連する遺伝子異常を非侵襲的に同定可能であることが報告されている (Murtaza, Nature, 2013)。さらに、血漿 DNA は全身の様々な部位の骨髄中に存在している腫瘍由来の循環細胞フリー DNA が混在したものであると考えられるため、この血漿 DNA は腫瘍全体における遺伝子異常の集合を表していると考えられる。そのため、AML 同一患者内において血漿 DNA と骨髄検体由来 DNA において遺伝子変異の種類や割合、想定されるクローン構成を比較することにより、特定部位からサンプリングした骨髄検体が腫瘍全体の遺伝子異常やクローン構成を反映するか検証することが可能である。この血漿 DNA は、末梢血を EDTA 管により採取し、採取後早期に遠心により末梢血中単核球から血漿を分離し、DNA を抽出することにより得ることができた。



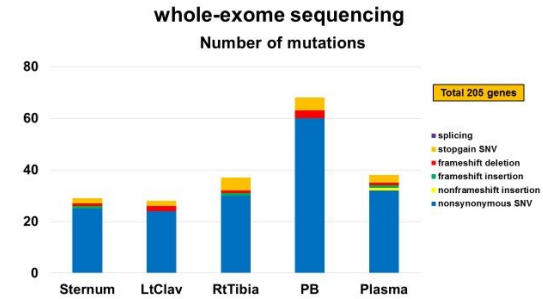
#### 4. 研究成果

剖検時に左右の脛骨・大腿骨・鎖骨・椎体・腸骨・胸骨など 5~7ヶ所の骨髄および末梢血・血漿より検体を採取し、DNA を抽出した。その後、それらの検体および頬粘膜(生殖細胞系列のコントロール)の DNA を用いて全エクソンシーケンスを行った(平均カバレッジ 86.6x)。

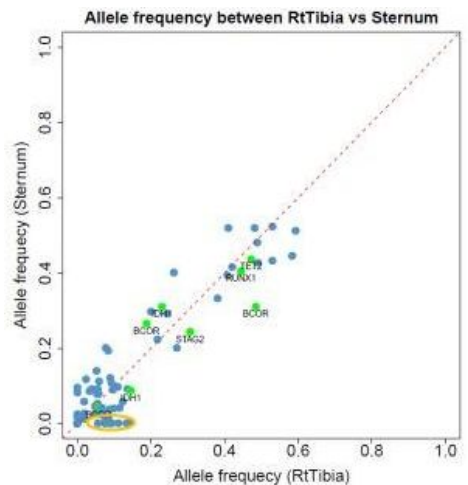
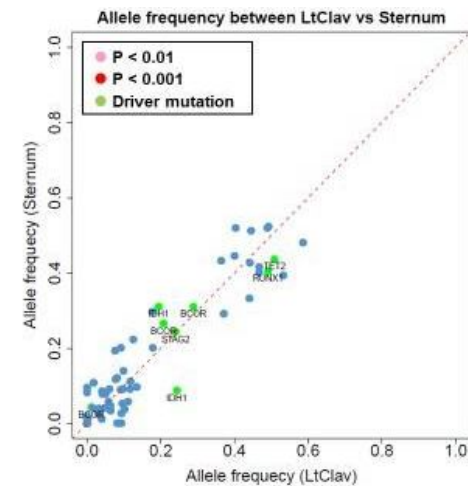


Sternum : 胸骨      RtTibia : 右腸骨  
 LtClav : 左鎖骨    PB : 末梢血  
 Plasma : 血漿      Normal : 頬粘膜

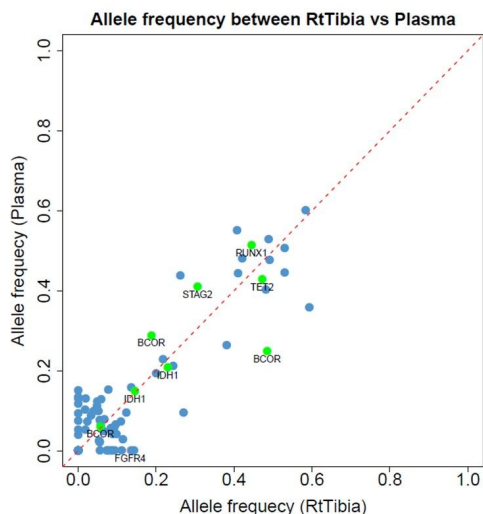
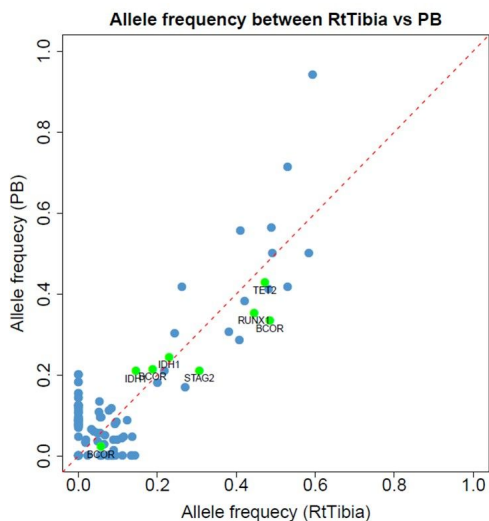
現在までに、その中で 1 例の解析が終了した。その結果、各骨髄では 28~37 個、末梢血では 68 個、血漿では 38 個の変異を認め、各々共通する変異 (shared) およびその部位固有の変異 (private) を認めた。



shared 変異としては、本症例の driver 変異の考えられる TET2, RUNX1, BCOR, STAG2, IDH1 などの変異を認めた。各骨髄で private 変異も多数認められたが、それらの特徴として胸骨と鎖骨など近接する部位から採取した検体ではお互いに private 変異は少なく、鎖骨と腸骨など空間的に離れている部位から採取した検体ではお互いに多くの private 変異が認められるということが明らかとなった。



また、末梢血や血漿 DNA においても、骨髄で認められない private 変異が多数認められていた。



これらの結果は、AML 患者においても骨髄内に空間的な多様性が存在することおよび、それらの違いが各採取部位の距離に依存する可能性が示唆された。今後、症例を重ねて、さらに AML における腫瘍内多様性が明らかにされることが望まれる。

#### 5. 主な発表論文等 なし(発表準備中)

(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 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕 なし

出願状況(計 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 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
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

小川 誠司 (Ogawa, Seishi)

研究者番号：60292900