

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007 ~ 2008

課題番号：19591132

研究課題名 (和文)

網羅的遺伝子解析による急性骨髄性白血病の新規原因遺伝子の探索

研究課題名 (英文)

A genomic analysis of acute myeloid leukemia.

研究代表者

山下 義博 (YAMASHITA YOSHIHIRO)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：10326861

研究成果の概要：

我々は効率の良いゲノミクス解析を行うことを目的として、急性骨髄性白血病 (AML) 症例を含む様々な白血病類縁疾患の患者骨髄より造血幹細胞のみを純化保存する大規模検体収集事業「Blast Bank」を設立した。本研究において我々は Blast Bank の AML 検体の中から、核型や治療反応性などの臨床情報が整備された 99 例からなる「標準検体セット」を選び出し、これらに対して網羅的なゲノミクス解析を行い、新たながん遺伝子の同定を目指すと共に、真に治療反応性にリンクする遺伝子の同定を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：急性骨髄性白血病、DNA マイクロアレイ、Blast Bank

1. 研究開始当初の背景

造血器悪性腫瘍には急性骨髄性白血病 (AML) や骨髄異形成症候群 (MDS)、慢性骨髄性白血病 (CML) など様々な白血病類縁疾患が存在し、いずれも骨髄内の造血幹細胞あるいは血液幼若芽球の異常により引き起こされると考えられている。しかしその分子発症メカニズムは多岐に渡っており、これまでの多大な研究にもかかわらず、具体的な原因遺伝子の同定がなされたものは稀である。一方、染色体の構造異常は白血病発症メカニズムに重要な役割を果たしており、転座や欠失、

増幅といった特異的染色体・遺伝子変異の有無が治療法選択と治療予後に大きく関係している。これら分子異常を標的とした薬剤であるイマチニブ (CML) やオールトランスレチノイン酸 (急性前骨髄球性白血病: APL) などの有効性から明らかなように、白血病の診断法や新規分類法、新規治療法の開発にはその分子発症機構の解明が、緊急且つ最も重要な課題である。

2. 研究の目的

DNA マイクロアレイなどの網羅的遺伝子発

現プロファイルによって造血器悪性腫瘍の病態解析を試みた報告が発表されているが、これらはいずれも末梢血あるいは骨髄中の単核球全体を解析したものであり、真に白血病クローンの異常を反映しているかは疑問が残る。我々は造血器悪性腫瘍における効率の良いゲノミクス解析を行うことを目的として様々な白血病類縁疾患の患者骨髄より CD133 陽性造血幹細胞相当分画のみを純化保存する大規模検体収集事業「Blast Bank」を設立した。2006 年 10 月時点で 600 症例を超える検体収集に成功しており、本バンクは造血器悪性腫瘍検体としてのみならず純化ヒト疾患臨床検体のゲノミクスプロジェクトとして現在においてもなお、世界最大規模の一つとなっている。我々は Blast Bank の AML 検体の中から、核型や治療反応性などの臨床情報が整備された 99 例からなる「標準検体セット」を選び出し、これらに対して網羅的なゲノミクス解析を行い、新たながん遺伝子の同定を目指すと共に、真に治療反応性にリンクする遺伝子の同定を試みることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

Blast Bank に属する AML99 例の標準検体セットを用いて、(1) 遺伝子発現プロファイル、(2) 染色体コピー数異常、(3) DNA メチル化異常、について解析を行った。

(1) AML 標準検体 99 例より mRNA を抽出し、症例ごとにビオチン標識した相補鎖 RNA をアフィメトリクス社 HGU133 マイクロアレイにハイブリサイズし、4 万 4 千種類にも及ぶ全ヒト遺伝子を網羅した遺伝子発現データベースを構築した。

(2) AML 標準検体セットよりゲノム DNA を採取し、断片化した後 PCR で増幅し、ビオチン標識した DNA 断片をアフィメトリクス社 GeneChip100K マッピングアレイにハイブリダイズした。本アレイは SNP ジェノタイピングを目的に開発されたオリゴヌクレオチドアレイであるが、このアレイにハイブリダイズしたゲノム DNA 量を各アレルの SNP ジェノタイプの蛍光強度として測定するため、その総和でコピー数を計算可能である。このようにして AML99 例の染色体コピー数変化 (copy number alteration: CNA) 部位のデータベース構築を行った。

(3) MCA-RDA 法 (Toyota, M., et al., Cancer Res, **59**: 2307-2312, 1999) により健常者骨髄造血幹細胞 DNA と AML 症例 DNA との間で程度の異なるメチル化 DNA 断片を選択的に増幅した。増幅された DNA 断片はビオチン標識した後、染色体構造異常解析の場合と同様にア

フィメトリクス社マッピング 100K アレイにハイブリダイズすることで DNA メチル化部位のゲノム上におけるアノテーションを行い、AML 標準セットにおける DNA メチル化レベルデータベースを構築した。

4. 研究成果

(1) これまでの DNA マイクロアレイを使用した遺伝子発現プロファイルによる白血病の病態解析はいずれも末梢血あるいは骨髄中の単核球全体を解析したものであり、導き出されたデータは症例毎の白血病芽球の存在割合や分化の程度に強く左右される報告であった。我々は様々な白血病類縁疾患が、いずれも骨髄内の造血幹細胞あるいは血液幼若芽球の異常により引き起こされることに着目し、患者骨髄より CD133 陽性造血幹細胞相当分画のみを純化し比較を行った。その結果これまでの病型分類によらない白血病芽球のみの遺伝子発現解析が可能となった。我々は AML99 例の標準検体セットの遺伝子発現プロファイルから、治療反応性にリンクする遺伝子セットを選び出し、それらの遺伝子発現量を基にした生命予後予測法を開発することを試みた。我々は AML 標準検体セットのうち標準治療を受け、完全寛解を一年以上継続した予後良好群と完全寛解を得られなかった予後不良群との間で発現量が有意に異なる遺伝子を 19 種類同定することに成功した。次にこの二群における 19 遺伝子の発現プロファイルをまず k-nearest neighbor 法を用いてコンピューターのプログラムに教育させ、予後良好群、予後不良群にも属さない症例の遺伝子発現プロファイルが何れのグループに近いかわかるかあるいはどちらとも判断できないか予測させた。その結果、3つのグループに分類され、各々のグループの生存期間は統計的に有意に異なった。我々が開発した予後予測法を用いたところ、正常核型を持つ 41 症例は三グループに分類可能であった。つまり臨床的には現在単一の予後群であると定義される AML の正常核型を有する群も遺伝子発現プロファイルの観点からは複数の予後グループからなることが明確となった。

(2) 白血病を含む種々のヒト悪性腫瘍において微細な染色体構造異常も発癌メカニズムに関与する可能性が指摘されている。染色体重複部位にはがん遺伝子の存在を、また欠失部位あるいは LOH 部位には癌抑制遺伝子の存在が示唆されているが、造血器悪性腫瘍においても最近、骨髄増殖性疾患 (MPD) の一部に loss-of-heterozygosity (LOH) を伴い、その部位に存在する遺伝子に恒常活性化能を獲得する遺伝子変異を有していることが明らかとされたことから (Kralovics, R., et al., N Engl J Med, **352**: 1779-1790, 2005)、

白血病原因遺伝子の同定には染色体全体にわたる詳細な構造異常の解明が必要であると考えられた。我々はAML99例の標準検体セットのゲノムDNAにおいてアフィメトックス社 GeneChip100K マッピングアレイを用いて、平均約 25kbp という詳細な解像度を以て、CNA および LOH の極めて詳細かつ大規模な染色体構造異常部位を測定した。その結果、従来の G-banding 法にて正常核型と診断されていた AML 症例の多くに数百 kbp から染色体全体にわたる CNA/LOH を認め、また遺伝子発現量に相関する CNA 部位や、多症例に共通した LOH 部位を複数同定した。我々は、11 番染色体長腕上に存在するがん抑制遺伝子 *CBL* 遺伝子座位が白血病において LOH となっており、さらにこの *CBL* に活性型変異が生じていることを明らかにした。更に治療反応性や生命予後など臨床パラメーターにリンクした CNA 部位の同定も試みた。我々は同様のアプローチを用い、血管免疫芽球性 T リンパ腫 (AILT) において予後に関与する CNA/LOH 部位を明らかにした。

(3) MCA-RDA 法により健常者骨髓造血幹細胞 DNA と AML 症例 DNA との間で程度の異なるメチル化 DNA 断片を選択的に増幅し、マッピング 100K アレイにハイブリダイズした。ハイブリダイズした DNA 断片は、各 SNP のシグナル強度から DNA メチル化レベルの程度が類推可能であり、ゲノム上におけるアノテーションが可能であった。その結果、健常者造血幹細胞 DNA と異なる AML 特異的な DNA メチル化異常部位を複数同定した。これら異常部位に存在する遺伝子は AML 発症の原因遺伝子の候補と言える。また同一症例において CNA/LOH 解析で検出された heterozygotic call がメチル化 DNA 断片でのみ消失し homozygotic call を呈している SNP も認められた。このことは一方のアリルのみ DNA メチル化を受けている、すなわちゲノムインプリンティング異常による機能的な LOH が存在する可能性を示唆すると考えられた。

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 14 件)

- 1 Genome-wide histone methylation profile for heart failure. *Genes Cells*, Kaneda, R., et al. (全 10 名、第 3 著者), 査読有, 14: 69-77., 2009
- 2 KIF5B-ALK, a Novel Fusion Oncokinase Identified by an Immunohistochemistry-based Diagnostic System for ALK-positive Lung Cancer. *Clin Cancer Res*, Takeuchi, K., et al. (全 14

- 名、第 9 著者), 査読有, 15: 3143-3149., 2009
- 3 MicroRNA expression profiles of human leukemias. *Leukemia*, Takada, S., Yamashita, Y., et al. (全 11 名、第 2 著者), 査読有, 22: 1274-1278., 2008
- 4 A mouse model of EML4-ALK-positive lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Soda M., et al. (全 12 名、第 9 著者), 査読有, 105: 19893-19897., 2008
- 5 Multiplex reverse transcription-PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts. *Clin Cancer Res*, Takeuchi, K., et al. (全 14 名、第 9 著者), 査読有, 14: 6618-6624., 2008
- 6 Chromosome copy number analysis in screening for prognosis-related genomic regions. *Cancer Sci*, Kurashina, K., Yamashita, Y., et al. (全 16 名、第 2 著者), 査読有, 99: 1835-1840., 2008
- 7 Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, Choi, Y. L., et al. (全 18 名、第 15 著者), 査読有, 68: 4971-4976., 2008
- 8 High-resolution analysis of chromosome copy number alterations in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma, unspecified, with single nucleotide polymorphism-typing microarrays. *Leukemia*, Fujiwara, S. I., Yamashita, Y., et al. (全 14 名、第 2 著者), 査読有, 22: 1891-1898., 2008
- 9 Analysis of chromosome copy number in leukemic cells by different microarray platforms. *Leukemia*, Yamashita, Y., et al. (全 12 名、筆頭著者), 査読有, 21: 1333-1337., 2007
- 10 Transforming activity of purinergic receptor P2Y₂, G protein coupled, 8 revealed by retroviral expression screening. *Leuk Lymphoma*, Fujiwara, S., Yamashita, Y., et al. (全 11 名、第 2 著者), 査読有, 48: 978-986., 2007
- 11 Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*, Soda, M., et al. (全 18 名、第 5 著者), 査読有, 448: 561-566., 2007
- 12 Identification of a constitutively active mutant of JAK3 by retroviral expression screening. *Leuk Res*, Choi, Y. L., et al. (全 12 名、第 11 著者), 査読有, 31: 203-209., 2007
- 13 Transforming activity of purinergic receptor P2Y₂, G-protein coupled, 2 revealed by retroviral expression

screening. Biochem Biophys Res Commun, Hatanaka, H., et al. (全 11 名、第 9 著者), 査読有, 356: 723-726., 2007

14 A genomic analysis of adult T-cell leukemia. Oncogene, Choi, Y. L., et al. (全 16 名、第 8 著者), 査読有, 26: 1245-1255., 2007

〔学会発表〕(計 4 件)

1) Yamashita, Y., Soda, M., Mano, H.: A large-scale resequencing project of ~5600 human genes in the genome of acute myeloid leukemia. AACR 100th Annual Meeting 2009, Denver, U.S.A. April 18-April 22, 2009.

2) 山下義博, 崔永林, 高田修治, 間野博行 : 大型リ・シーケンスアレイによる白血病の遺伝子変異スクリーニング. 第 70 回日本血液学会総会, 京都, 2008 年 10 月 10-12 日

3) Yamashita, Y., Kurashina, K., Soda, M., Watanabe, H., Mano, H.: A large-scale resequencing project of ~5400 human genes in the genome of acute myeloid leukemia. Signaling Pathways in Cancer and Development, Steamboat Springs, U.S.A. March 24-29, 2008

4) Yamashita, Y., Kurashina, K., Watanabe, H., Soda, M., Hatanaka, H., Mano, H.: Analysis of chromosome copy number in leukemic cells by different microarray platforms. Molecular Targets for Cancer, Whistler, Canada, March 18-23 2007

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

なし。

〔その他〕

なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 義博 (YAMASHITA YOSHIHIRO)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 10326861

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし