

## 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 5 月 30 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591217

研究課題名（和文）

白血病ゲノム異常の統合的解明

研究課題名（英文）

A whole 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・准教授

研究者番号：10326861

研究成果の概要（和文）：

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。

研究成果の概要（英文）：

Leukemias are clonal disorders of hematopoietic stem cells or immature progenitors. However, a simple comparison of the bone marrow (BM) mononuclear cells (MNCs) among heterogeneous acute myeloid leukemia (AML) patients is likely to reveal a large number of changes in the genome that reflect differences either in the percentage of blasts within BM, or in the differentiation ability of the blasts. To minimize such population-shift effects, we have set up a large-scale cell bank (the Blast Bank) for the storage of hematopoietic stem cell (HSC)-like fractions purified from individuals with a wide range of leukemic disorders. To identify oncogenes in leukemias, and to clarify a molecular signature that was directly linked to the prognosis of leukemic patients, we performed a large-scale genomic analysis of the Blast Bank specimens.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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、Blast Bank、ゲノムリシーケンス

## 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。2012年4月時点で700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) ゲノムリシークエンス、(4) miRNA クローニング、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) Blast Bank に属する AML 症例のうち、臨床的に正常核型と診断された 20 例について、米国 Perlegen 社と共同で開発した 900 万塩基対の配列を決定可能な世界最大の DNA シークエンスアレイを使用して、細胞増殖関連遺伝子 5600 種類の coding exon の配列解析を行った。本システムはアフィメトリクス社の SNP ジェノタイピングアレイの解析システムを応用したもので、アレイに白血病芽球より抽出したゲノム DNA をハイブリダイズし、アミノ酸の非同義変異を規定する塩基対の配列を決定した。

(4) 我々は微量の臨床検体から高感度に miRNA をクローニングする mRAP 法を開発した。具体的には白血病芽球のトータル RNA よりスモール RNA フラクションを純化し、PAGE で展開後 miRNA サイズの部分から抽出した。次に miRNA の 3' 末端にアダプターを付加し逆転写酵素で cDNA とし、5' 末端にアダプターをつけた後、両端のアダプター配列をプライマーとして PCR で miRNA を増幅した。増幅された miRNA をコンカタマーとすることで、Sanger 法による自動シークエンス装置でも一回のシークエンス反応で数十クローンの miRNA を効率よく同定可能となった。我々は標準検体のうち 12 例の miRNA クローニングを行った。

## 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どうか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 loss-of-heterozygosity (LOH) 部位には癌抑制遺伝子の存在が示唆されている。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リクス社 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。

(3) 白血病芽球に認められる異常核型の有無は AML 症例の長期予後を規定する重要な因子であり、その特徴によって予後良好群と予後不良群に分類可能である。しかし全体のおよそ半数を占める正常核型の AML 症例の予後は良好群と不良群の間程度である。このことは白血病芽球ゲノムの配列異常の結果生

じるアミノ酸置換を伴うがん遺伝子を明らかにすることで初めて AML の予後改善が実現されることを示唆する。そこで我々は米国 Perlegen 社と共同開発した超大型シーケンシングアレイを使用して、非同義変異をもたらさずゲノム配列異常を探索した。正常核型の AML 芽球 20 例のゲノム DNA について 5648 種類の遺伝子上の約 900 万塩基対の配列を決定したところ、9148 塩基対の配列異常が存在することが明らかになった。ところが同一症例の CD4 陽性正常リンパ球のゲノム DNA の配列と比較したところ、その配列異常のほとんどが正常リンパ球にも存在することが明らかとなり、白血病芽球特異的に存在する配列異常はわずか 11 塩基対のみであった。その一つは JAK3 チロシンキナーゼの活性型変異であり、Blast Bank サンプルのうち約 3% に JAK3 変異が存在した。JAK3 活性型変異を発現させたマウス造血幹細胞は骨髄再構築実験によりレシピエントマウスで白血病を発症したことから、JAK3 キナーゼ変異はヒト AML 発症の原因遺伝子候補の重要な一つと考えられる。同様に明らかとなった配列異常の一つは、ヒトゲノムのメチル化に本質的な役割を果たす DNMT3A の体細胞変異であり Blast Bank サンプルの約 4% に変異を認めた。これはゲノムメチル化酵素の世界初の体細胞変異同定であって、我々の報告の後、世界中の研究者から同様の報告がもたらされた。

(4) miRNA は 20~24 塩基長の極めて短い non-coding RNA であり、広く真核生物のタンパク翻訳制御に関わっている。発がんへの miRNA の関与もいくつかの例で報告されてきたが、微量の臨床検体から十分な量の miRNA を同定する手法が存在しなかったため、白血病における解析も進んでいなかった。我々は僅か  $1 \times 10^4$  個の細胞からも miRNA をクローニングする超高感度クローニング法 mRAP (miRNA Amplification Profiling) 法を開発した。本手法により微量の臨床検体から比較的簡単に数千クローンの miRNA を同定可能である。12 例の白血病芽球の miRNA をクローニングしたところ、一症例あたり約 3000 クローンの miRNA を得、その発現パターンは白血病芽球の核型に大きく依存し、しかもわずか 6 種類の miRNA 発現量で特徴づけられることが明らかとなった。

## 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 11 件)

1 High-throughput resequencing of target-captured cDNA in cancer cells. Ueno, T., Yamashita, Y., et al. (全 9 名、第 2 著者),

査読有, *Cancer science* 103: 131-135. 2012. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02105.x

**2** Oncogenic MAP2K1 mutations in human epithelial tumors. Choi, Y.L., Soda, M., et al. (全11名、第10著者), 査読有, *Carcinogenesis* 33: 956-961. 2012. doi: 10.1093/carcin/bgs099

**3** Ex vivo expansion of human CD8+ T cells using autologous CD4+ T cell help. Butler, M. O., Imataki, O., et al. (全13名、第3著者), 査読有, *PLoS One* 7: e30229. 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0030229

**4** Array-based genomic resequencing of human leukemia. Yamashita, Y., Yuan, J., et al. (全20名、筆頭著者), 査読有, *Oncogene* 29: 3723-3731. 2010. doi: 10.1038/onc.2010.117

**5** EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. Choi, Y.L., Soda, M., et al. (全15名、第3著者), 査読有, *N Engl J Med* 363: 1734-1739. 2010. doi: 10.1056/NEJMoa1007478

**6** Identification of transforming activity of free fatty acid receptor 2 by retroviral expression screening. Hatanaka, H., Tsukui, M., et al. (全17名、第7著者), 査読有, *Cancer science* 101: 54-59. 2010. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01348.x

**7** Identification of the transforming activity of Indian hedgehog by retroviral expression screening. Hatanaka, H., Takada, S., et al. (全16名、第7著者), 査読有, *Cancer science* 101: 60-64. 2010. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01355.x

**8** Screening for genetic abnormalities involved in ovarian carcinogenesis using retroviral expression libraries. Wada, T., Yamashita, Y., et al. (全16名、第2著者), 査読有, *Int J Oncol* 35: 973-976. 2009. doi: 10.3892/ijo\_00000410

**9** KIF5B-ALK, a novel fusion oncokinin identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. Takeuchi, K., Choi, Y.L., et al. (全14名、第9著者), 査読有, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15: 3143-3149. 2009. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-3248

**10** Potential role of miR-29b in modulation of Dnmt3a and Dnmt3b expression in primordial germ cells of female mouse embryos. Takada, S., Berezikov, E., et al. (全5名、第4著者), 査読有, *Rna* 15: 1507-1514. 2009. doi: 10.1261/rna.1418309

**11** Genome-wide histone methylation profile for heart failure. Kaneda, R., Takada, S., et al. (全10名、第3著者), 査読有, *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 14: 69-77. 2009. doi: 10.1111/j.1365-2443.2008.01252.x

[学会発表] (計5件)

1) Yamashita, Y., Ueno, T., Soda, M., Mano, H.: Array-based genomic resequencing of acute myeloid leukemia. Cold Spring Harbor Asia Conference, Translational Approaches to Cancer, Victoria, Suzhou, Jiangsu Province, China. May 24-28, 2011

2) 山下義博, 間野博行 : Array-based genomic resequencing of acute myeloid leukemia.

第16回日本遺伝子治療学会学術総会, 栃木, 2010年7月1-3日

3) 山下義博, 曾田学, 上野敏秀, 崔永林, 間野博行 : 大型リシークエ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69回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010年9月22-24日

4) Yamashita, Y., Soda, M., Ueno, T., Mano, H.: Array-based genomic resequencing of acute myeloid leukemia. Keystone Symposia, New Paradigms in Cancer Therapeutics, Victoria, British Columbia, Canada. March 23-28, 2010

5) 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, Colorado, U.S.A. April 18-April 22, 2009.

#### 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・准教授  
研究者番号 : 10326861

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし