

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390255

研究課題名(和文)新規システムによる骨髄増殖性疾患における未知の染色体転座および遺伝子変異の探索

研究課題名(英文)Comprehensive genetic analysis identifying novel genetic abnormalities responsible for myeloproliferative neoplasm

研究代表者

岡村 孝 (OKAMURA, TAKASHI)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：30136436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円、(間接経費) 4,350,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨髄増殖性腫瘍における新たな遺伝子異常を発見することを目的とし、融合遺伝子発見のための新規ベクターシステムの開発・応用および全エクソン配列解析法を導入し包括的ゲノム解析を行った。新規システムの応用により、融合遺伝子に関連するゲノム構造異常の候補領域を同定した。一方、エキソーム解析からは症例間に共通した高い頻度の新規遺伝子異常を見つけるには至っていない。個々の遺伝子異常に対しては、ゲノム編集法(CRISPR)を利用したiPSによる遺伝子機能解析を行うとともに、ミスセンス変異を免疫標的とした個別化免疫療法による新規治療法の開発を行っている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed a comprehensive genetic analysis by using a newly developed system for fusion-gene detection and whole exome analysis, in order to identify novel genetic abnormalities responsible for myeloproliferative neoplasm (MPN) and to develop a new therapeutic option. We could detect several candidate regions with altered genomic structures which would contribute to produce novel fusion-genes. In addition, many novel missense mutations were found in MPN cases by whole exome analysis, however, they are not shared among cases. We are applying CRISPR method to patients' derived iPSs in order to clarify genetic functions of those mutations. Furthermore, we found out that peptides derived from those mutations could be presented to patients' HLA molecules and be recognized by T cells. We are preparing a protocol to provide patients a novel therapeutic option as genetic analysis-based personalized immunotherapy.

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：血液腫瘍学 遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

骨髄増殖性疾患 (myeloproliferative disease; MPD) は、幹細胞のクローン性増殖に基づく疾患であり、従来、真性多血症 (PV)、本態性血小板血症 (ET) および原発性骨髄線維症 (MF) から成り立っていたが、これら疾患は現在の WHO 分類では骨髄増殖性腫瘍 (myeloproliferative neoplasm; MPN) の一部として分類される。近年、Jak2 遺伝子異常をはじめ Tet2 遺伝子異常など病因遺伝子が発見されてきており、われわれの教室でもこれまで Jak2・Tet2 変異について解析を行ってきた。しかし、各疾患はそれら遺伝子変異のみでは説明できず病態には未だ不明な点が多い。

造血器腫瘍の病因遺伝子異常は、(a) 染色体転座による新たな融合遺伝子によるもの、(b) 欠失・増幅・点突然変異の遺伝子変異によるものに大別されるが、MPN においても、これまでの遺伝子変異以外に新たな疾患特異的な遺伝子異常が存在することが予測されており、新規の遺伝子異常の発見による MPN の病態理解を基にした新しい臨床診断・検査法、さらに治療法の開発が求められている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新規システムの開発・導入により MPN における包括的ゲノム解析を行うことにより、新たな遺伝子異常の発見に基づく MPN 疾患群の病態の解明とともに、新しい臨床診断・検査法そして治療法の開発を行うことである。

造血器疾患の遺伝子異常としては、染色体転座による新たな融合遺伝子によるもの、点突然変異等の遺伝子変異によるものがあるが、新しい融合遺伝子の発見のために、未知の転座遺伝子の発見を可能とする新規ベクターシステムの開発・応用を行うとともに、遺伝子変異の探索のために、全エクソン遺伝子解析を導入する。これら次世代シーケンサーを用いた包括的なゲノム解析を行うことから骨髄増殖性疾患の新規病因遺伝子を探索・発見する。さらに、発見された遺伝子異常について、その病態との関連を明らかにするために遺伝子機能解析を行うとともに、治療ターゲットとしての可能性を探る。

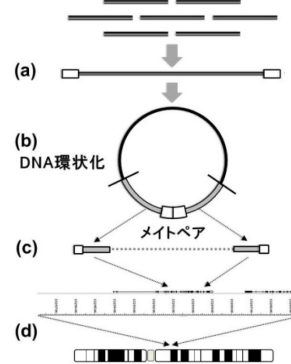
3. 研究の方法

(1) 未知の転座遺伝子の発見を可能とする新規ベクターシステムの開発および MPN への応用

染色体転座は、通常は染色体分析により発見され、その転座情報を基点としたゲノム解析や遺伝子発現解析から融合遺伝子が発見される。しかし、染色体検査には分析精度に限界があり、転座部位や転座サイズ (数 Mbp 以下) によっては染色体の異常は検出されない。そこで、新たな染色体転座および融合遺伝子を疾患から発見するために、新規ベク

ターシステムを開発した。本システムは、環状化 DNA の結合両末端 (メイトペア) の塩基配列解析を基本としており、対象疾患の cDNA ライブラリーから環状化 cDNA を作成し、そ

【図1】



のメイトペア断片の塩基解析を行う。図1のように、cDNA ライブラリーのメイトペア配列の末端配列マッピングから融合遺伝子の存在を明らかにすることができる。

本方法はシンプルであるが、実際には複数の DNA がメイトペアを形成するという致命的な問題点があり、これまで十分な応用がされていなかった。

われわれは、この問題点を根本的に解決し、融合遺伝子の検出を可能とする新規システムを開発し、システムの検証とともに MPN の解析に導入し融合遺伝子を探索する。

(2) 全エクソン遺伝子配列解析

一方、遺伝子変異の探索、特に点突然変異を見出す目的として、全エクソン塩基配列法を導入した。近年、次世代シーケンサーによる全ゲノム解析 (whole genome sequence) が現実のものとなってきている。しかし、whole genome sequence は極めて高額であることから、ゲノムからエクソン領域を濃縮し配列解析を行う、エクソン・キャプチャー法が開発されている。

われわれは、エクソン領域を SureSelect Human All Exon (Agilent) により濃縮し、HiSeq (illumina) により遺伝子解析を行った。データ解析には UCSC human genome 19 をレファレンス配列とし、Bowtie2 によりマッピングを行った。SNP/indel の抽出には SAMtools を使用し、ANNOVA により annotation を行った。SNP database および各正常対照のデータと比較解析し各症例の遺伝子変異を同定した。

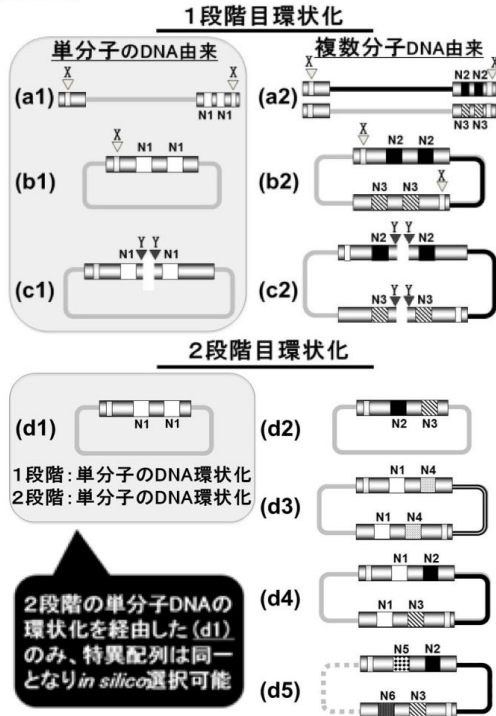
4. 研究成果

(1) 新規ベクターシステムと MPN への応用

融合遺伝子発見のための新規ベクターシステムでは、アダプター付加後にシンプルな 2 段階の DNA 環状化により、単分子 DNA 環状化と複数分子 DNA 環状化を区別することが可能となる。そのプロセスを図 2 に示す。

メイトペア作成の環状化の際に、1 段階目の DNA 環状化が単分子 DNA で形成され、さらに 2 段階目 DNA 環状化も単分子 DNA であった場合、得られるメイトペアは正しい配列情報で「正確にゲノム構造を反映」する。この時、特異的配列 (N) は必ず同一配列の組み合わせ

【図2】



となり、環状化過程が単分子 DNA により正確に進行した指標となる。一方、1段階目あるいは2段階目環状化において複数分子 DNA により環状化された場合、特異的配列は異なる組み合わせ配列で合致しない。つまり、コンピューター解析上で合致した特異配列を選択することから、正確なメイトペア配列情報のみを抽出することが可能となる (in silico selection)。

本システムをまず既知の融合遺伝子を有する K562 (慢性骨髄性白血病由来細胞株) に応用し、その検証を行った。プロトコルに従い2段階環状化反応を行い、そのメイトペア断片を解析した結果、有効配列リードの中でシステムアダプター構造を有したリードが75%であった。さらに、その91%において、タグ解析から特異配列が同一であったクローン、つまり単分子 DNA 由来の環状化分子からのメイトペアであり、最終的に543ペアの BCR-ABL 融合遺伝子を確認することができ、本システムの有効性が実証された。

検証後、本システムを MPN 症例に導入し、MPN 症例の末梢血あるいは骨髄細胞からの cDNA の解析を行っているが、これまでのところ新規融合遺伝子は検出されていない。検出感度の問題を考慮して、均一化 cDNA ライブラリー (Normalized cDNA library) へ変更を試みたが、均一化は十分でなく、そのため次項に説明するゲノム構造解析への本システムの応用を平行して行った。

(2)ゲノム構造解析による候補領域の発見

新規システムの導入から融合遺伝子同定に至らなかった原因として、症例に融合遺伝子が存在しない可能性と同時に、システムの検出限界の問題が考えられた。融合遺伝子探

索では cDNA を対象とするため目的とする遺伝子の発現量によっては検出感度を下回る可能性が否定できない。そこで、われわれは本システムをゲノム解析に応用した。cDNA の代わりに 10~20Kb に裁断したゲノム断片を出発材料とし、同アダプターシステムを導入した。cDNA からゲノムへ移行したのは本研究期間の後半であったため遺伝子の同定までには至っていないが、表1に示すようにゲノム構造異常が予想されるゲノム領域を複数

表 1

配列 1				配列 2			
Sequence	Region	Position	Feature	Sequence	Region	Position	Feature
GCTCCATGCGATCCAGAGGACAGTA	1q24.1	16660744	LXK1B	CGAGCCCCCGCTCCCGCCCAACCT	1q24.1	16661939	LXK1B
CATTTAAATGCTCAAAATACCTAGA	2p24.1	25445239	DF8B	ACATACACCCCGACCGATGCTCT	2p24.1	2545580	DF8B
ACCGGAGGATGATGACAGCTCTGTT	5p14.3	57654215	ABH8FPJ	AGACCCGACATATTCGCGACATGAA	5p14.3	5761728	ABH8FPJ
ACAGTGAAGACATACACCAACATTTATA	5p14.3	18961050	Intergenic	TGGGAGATGATATTCATTTGCTCC	5p14.3	1897243	Intergenic
CTCTAAACATCATTTGATGACCTTGG	7q21.11	80216796	ORAI1	GTTCATTAATTTTAAATGGATGATC	7q21.11	8025803	Intergenic
TTTCTGCTGCTGATGATGATGATGATG	8q23	10813382	Intergenic	AGGAAATATTTGCTGATGATGATC	8q23	1081344	Intergenic
CGACCTCTCCACTTTAGAGGGTGTG	11q22.1	89018009	Intergenic	ATATCTCTGATTTCTGATGATGATC	11q22.1	8902775	ORF55
CTCTGCTGCTGATGATGATGATGATG	13q14.3	49742233	DF8A3	CTCATCTTGTGATCCCTGATGATGATC	13q14.3	49751308	DF8A3

ゲノム構造異常候補			
Sequence	Region	Position	Feature
TCTCTTATTTATATGATTTCTGCTG	3q12.2	94939748	Intergenic
GCATCTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	11q12.3	62811432	BRX5
CTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	16q23.1	65504812	Intergenic
TAGCCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	17p13.1	7895056	LOC10724217

同定することができており、今後各ゲノム構造の解析を進めていくことで融合遺伝子が発見できると考えている。

(3)新規遺伝子変異の探索

MPN 疾患症例に対し全エクソン遺伝子解析を行った結果、各症例から多数の遺伝子異常が発見され、それらの中にはこれまで報告されている Jak2, Tet2 等の遺伝子異常も認められたが、症例間において共通した新規の遺伝子変異は見出されていない。個々の遺伝子には疾患との関連が機能的に予想されるものが存在しているが、症例間での共通性が低いため、病態への関与を明らかにするためには各遺伝子異常の機能解析を行う必要がある。さらに、個々の症例で機能的に MPN に関与する遺伝子異常が存在しても、頻度が低い場合には診断や検査そして治療における意義が明確ではないという問題点もある。

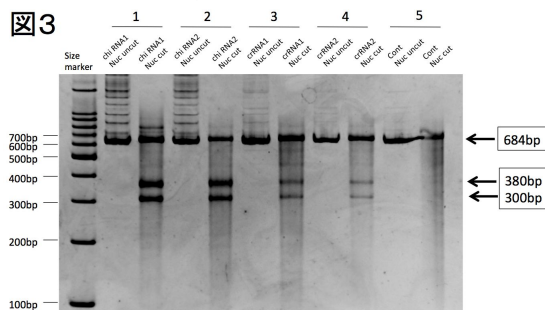
これは本研究に限らずゲノム解析一般に存在する問題であり、われわれは解決法として次の2つの方法を導入した。ひとつは、CRISPR によるゲノム編集で多数の遺伝子異常の機能解析を行えるようにすることで重要遺伝子を見落とさないようにすることで、もうひとつは個々の遺伝子変異を免疫標的とすることで、ゲノム解析が実際の治療に直結するようにすることである。

(4)遺伝子異常の機能解析

研究目的のためには、発見された遺伝子異常が、疾患の原因となる driver 変異であるのか単なる passenger 変異であるのかを解析する必要がある。研究計画では、症例間に幅広く共通して存在する遺伝子変異を想定し、遺伝子操作によるマウス実験による解析を予定していた。しかし実際には、すでに報告されている遺伝子異常以外では、少数例での共通存在にとどまっており、多数の機能解析を実施する中から重要遺伝子抽出が必要となった。そこで、機能解析の進め方を修正し、2013年に報告された新たなゲノム編集法である CRISPR Clustered Regularly

Interspaced Short Palindromic Repeat) 法を導入した。本方法では比較的容易に遺伝子破壊を誘導できるため、iPS 細胞においてそれぞれの遺伝子の機能解析を行うことが可能である。

実際に guide RNA を設定し CRISPR によるゲノム編集活性を確認したところ、図3のように SURVEYOR assay により 5~10%の遺伝子切断活性を認め、さらに機能解析のための遺



伝子変異導入を目的としてコンストラクトおよび oligonucleotide による knock-in 法を確立した。iPS 細胞においてもゲノム編集効率は高く、まず正常細胞由来の iPS において発見された遺伝子異常を導入し、その機能解析を開始している。一方、遺伝子解析を行った MPN 患者からの iPS を作成しており、個々の症例におけるそれぞれの遺伝子異常の意義付けを行うことで、疾患の個性を基にした個別化した評価が可能であると考えている。

(5) 遺伝子変異を標的とした個別化免疫療法

遺伝子異常に基づく MPN の治療法を確立することが研究の最終目的であり、そのためには、広く症例間に共通する遺伝子異常を発見し、その遺伝子異常を制御する分子を探索して薬剤を開発していく、というのが研究の方向となる。

われわれも、その方向に沿って研究を進めているが、現段階では多数の遺伝子変異が同定されるものの、少数例にのみ共通した遺伝子変異の発見にとどまっている。このような個々多数の遺伝子変異に対応してそれぞれ制御分子(薬剤)を探索することは現実的ではない。われわれは別の観点から、これら遺伝子変異を免疫の標的とした個別化免疫療法という新しい治療法を開発することとした。

まず疾患毎にエキソーム解析データから HLA を同定した(class I : A, B ローカス)。次に遺伝子のミスセンス変異によるアミノ酸変異を中心とした両側 15mer のアミノ酸ライブラリーを作成し、netMHCpan により各 HLA 結合性を検討した。その結果、wt と比較して高い HLA 結合性を有するペプチド配列を各症例において 3~8ヶ所抽出することが可能であった。このことは、遺伝子変異の発見が、その遺伝子の機能に関わらず、免疫治療のターゲットになり得ることを示している。さらに、人工抗原提示細胞に患者遺伝子変異を導入し、

auto あるいは allo リンパ球と共培養することで遺伝子変異を当該 HLA 拘束性に認識する T 細胞を得ることが可能であり、遺伝子変異を腫瘍抗原として治療に利用できることを明らかにすることができた。

従って、遺伝子異常の探索は、必ずしも疾患において高い頻度で存在する異常を同定することによる臨床応用のみならず、個々の遺伝子変異を免疫ターゲットとする個別化免疫療法、つまりダイレクトに治療へ応用することが可能である。引き続き、見出された遺伝子変異を標的に免疫療法への応用を行い、その効果を異種移植マウスモデルにおいて検証していく。

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 5 件)

1. Nagafuji K, Miyamoto T, Eto T, Kamimura T, Taniguchi S, Okamura T, Ohtsuka E, Yoshida T, Higuchi M, Yoshimoto G, Fujisaki T, Abe Y, Takamatsu Y, Yokota S, Akashi K, Harada M. (16名、6番目). Monitoring of minimal residual disease (MRD) is useful to predict prognosis of adult patients with Ph-negative ALL: results of a prospective study (ALL MRD2002 Study). J Hematol Oncol. 査読有. 6. 2013. 14.

doi: 10.1186/1756-8722-6-14.

2. Imamura R, Mouri F, Nomura K, Nakamura T, Oku E, Morishige S, Takata Y, Seki R, Osaki K, Hashiguchi M, Yoshimoto K, Ohshima K, Nagafuji K, Okamura T. (14名、ラスト). Successful treatment of small cell variant anaplastic large cell lymphoma with allogeneic peripheral blood stem cell transplantation, and review of the literature. Int J Hematol. 査読有. 2013. 97. 139-43.

doi: 10.1007/s12185-012-1242-3.

3. Takata Y, Kanaji T, Moroi M, Seki R, Sano M, Nakazato S, Sueoka E, Imamura Y, Okamura T. (9名、ラスト). Platelets with a W127X mutation in GPIX express sufficient residual amounts of GPIb to support adhesion to von Willebrand factor and collagen. Int J Hematol. 査読有. 96. 2012. 733-742.

doi: 10.1007/s12185-012-1216-5.

4. Kanaji T, Ware J, Okamura T, Newman PJ. (4名、3番目). GPIb regulates platelet size by controlling the subcellular localization of filamin. Blood. 査読有. 119. 2012. 2906-2913.

doi: 10.1182/blood-2011-08-376566.

5. Nakamura T, Oku E, Nomura K, Morishige S, Takata Y, Seki R, Imamura R, Osaki K, Hashiguchi M, Yakushiji K, Mouri F, Mizuno S, Yoshimoto K, Ohshima K, Nagafuji K, Okamura T. (16名、ラスト). Unrelated cord blood transplantation for patients with adult T-cell leukemia/lymphoma: experience at a single institute. Int J Hematol. 査読有. 2012. 96. 657-63.
doi: 10.1007/s12185-012-1177-8.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 3 件)

1. 名称: METHOD FOR EXCLUSIVE SELECTION OF CIRCULARIZED DNA FROM MONOMOLECULAR DNA WHEN CIRCULARIZING DNA MOLECULES
発明者: MIZUNO Shinichi, OZAWA Hidetoshi, NAGAFUJI Koji, OKAMURA Takashi
権利者: KURUME UNIVERSITY
種類: PATENT
番号: PCT/JP2012/071492
出願年月日: 2012/08/24
国内外の別: 国外

2. 名称: METHOD FOR PRODUCING CIRCULAR DNA FORMED FROM SINGLE-MOLECULE DNA
発明者: MIZUNO Shinichi, NAGAFUJI Koji, OKAMURA Takashi
権利者: KURUME UNIVERSITY
種類: PATENT
番号: PCT/JP2011/068856
出願年月日: 2011/08/22
国内外の別: 国外

3. 名称: DNA 分子の環状化において単分子による環状化 DNA のみを選別する方法
発明者: 水野晋一、小澤秀俊、長藤宏司、岡村孝
権利者: 久留米大学
種類: 特許
番号: 特願 2011-189280
出願年月日: 2011/08/31
国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
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

岡村 孝 (OKAMURA TAKASHI)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号: 30136436

(2) 研究分担者

奥 英二郎 (OKU EIJIRO)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号: 10569429

(3) 研究分担者

水野 晋一 (MIZUNO SHINICHI)
九州大学・先端医療イノベーションセンター・准教授
研究者番号: 40569430