

TAMRA-MBD2 を用いた脱メチル化剤効果予測法の開発

分担研究者 大屋敷一馬 東京医科大学 血液内科・呼吸器内科学講座 教授

研究要旨

脱メチル化剤の導入により骨髄異形成症候群(MDS)の治療が大きく変貌しつつある。従来では特定のがん抑制遺伝子過メチル化様式の解析が行われてきたが、DNA 全ゲノムにおけるメチル化状態を簡便に測定し、脱メチル化剤の効果判定に有用な情報を提供するシステム開発が望まれる。本研究では蛍光標識 MBD2 と 1 分子蛍光分析システムによる全ゲノム DNA メチル化解析が可能な SMMA 法の開発を行った。

A. 研究目的

脱メチル化剤の導入により骨髄異形成症候群 (MDS) の治療戦略が大きく変貌しつつある。それに伴い、造血器腫瘍を対象として、がん抑制遺伝子を含む制御遺伝子の CpG island におけるメチル化様式と脱メチル化剤の反応性との関係が検証されている。そこで、本研究は特定の遺伝子のメチル化状態の検討では把握しきれない細胞レベルでのメチル化状態（全ゲノムメチル化状態）を簡便にできる検出できる方法の開発を目的とした。

B. 研究方法

メチル化 DNA と結合する methylation binding domain-1 (MBD2) を蛍光色素 TAMRA で標識し、1 分子蛍光分析システム (MF20) を用いて、拡散分光を測定することにより DNA メチル化状態を半定量的に検出した (図 1)。Single molecule methylation assay (SMMA) 法として人工的にメチル化した DNA と TAMRA 標識 MBD-2 を反応させ、拡散時間より、メチル化状態を計測した。

またヒト白血病細胞株を脱メチル化剤で処理し、メチル化状態を検討した。

メチル化度の測定法

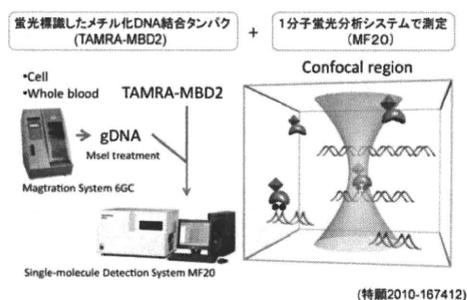
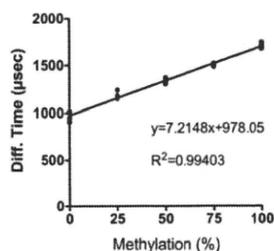


図 1 : SMMA 法による DNA メチル化測定の概略

C. 研究結果

人工的なメチル化 DNA (0%、25%、50%、75%、100% メチル化 DNA) と SMMA 法による拡散時間は正比例し、検量曲線より全 DNA のメチル化状態を半定量的に算出することが可能であった (図 2)。また MstI 処理ヒト DNA では 200–1,000 kb でも拡散時間により DNA メチル化状態の検出が可能であった。

Global DNA methylation : 定量化



100%メチル化DNAと0%メチル化DNAのリファレンスから検量曲線を作成

図2：合成メチル化DNAによる検出

さらに、SMMA法を用いた白血病細胞株（U937 および K562）におけるメチル化様式の検討では、(1) 脱メチル化剤添加前でも細胞株によりメチル化の程度が極端に異なること、(2) 脱メチル化剤の種類によっても脱メチル化の効果に差があることが明らかになった。

細胞株における検討

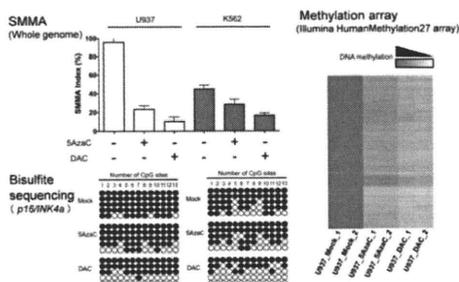


図3：細胞株における脱メチル化剤添加によるDNAメチル化様式。右にメチレーションアレイによる脱メチル化様式を示す。

また、健常人に比べ急性白血病患者DNAではゲノム全体の低メチル化状態が明らかとなった。

D. 考察

蛍光標識メチル化DNA結合タンパク（TAMRA-MBD2）と1分子蛍光分析システムを用い、ゲノムワイドなDNAメチル化の検出方法であるSMMA法を開発した。本方法により脱メチル化剤の効果予測および実際の投与前後のDNAメチル化状態の簡便な検出が可能となり、脱メチル化剤投与に際し重要な情報をもたらすものと思われる。

E. 結論

ゲノムワイドなDNAメチル化測定方法を開発した。個々の遺伝子のメチル化状態の解析とともに、本法の如くゲノムワイドなメチル化解析の臨床応用が期待される。

F. 健康危険情報：なし。

G 研究発表

1. 論文発表

1. Umezu T, Ohyashiki K, Ohyashiki JH: Single molecular methylation assay: A new technology for quantifying global DNA methylation by fluorescence correlation spectroscopy, 2011, submitted.

H. 知的財産権の出願・登録状況：

特願 2010-167412

骨髄異形成症候群の遺伝子解析を目的とした検体集積に関する研究

分担研究者 石川 隆之 京都大学医学研究科血液・腫瘍内科学 講師

分担研究者 高折 晃史 京都大学医学研究科血液・腫瘍内科学 教授

研究要旨

本研究は、2005年8月より厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「骨髄異形成症候群に対する病態解明・治療法の開発に関する研究班」によって行われてきた検体集積事業を発展的に継続するものであり、臨床情報を付帯した質の高い検体を各種遺伝子研究のために提供することを目的としている。今年度は主に、研究計画書の改訂と倫理委員会への申請手続きと、承認後の検体集積のための体制作りが進められた。検体の集積に関しても、引き継いだ前研究の計画書に基づいて継続された。今年度の集積検体の提供は、前研究から継続されている研究に限定されていたが、来年度以降には倫理委員会審査を終えたそれぞれの新規個別研究への提供を予定している。

A. 研究目的

骨髄異形成症候群（不応性貧血、MDS）は血球形態異常と無効造血による血球減少を特徴とし、骨髄不全あるいは前白血病状態と位置づけられるヘテロな疾患群であり、背景にある分子病態も多様であると考えられる。レナリドマイドやメチル化阻害剤などの新規治療薬が導入されつつあるが、これらの有効率は高くなく、現時点では造血幹細胞移植が唯一の根治的治療である。MDSの治療成績の改善には、その多様な分子病態を明らかとし、個々の病態に則した治療法の確立が求められる。このような背景のもと、2005年8月より厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「骨髄異形成症候群に対する病態解明・治療法の開発に関する研究班（班長 三谷絹子）」によって、MDSの検体集積事業ならびに遺伝子解析研究が開始され、一定の成果を上げてきた。本研究は、この研究を発展的に引き継ぎ、特発性造血障害に関する調査研究班で行われている「再生不良性貧血と骨髄異形成症候群の前方視症例登録・セントラルレ

ビュー・追跡調査研究」と連携することによって、正確で詳細な臨床情報を伴った質の高い検体を集積する。この検体と臨床情報を研究者に広く提供することで、MDSに対する遺伝子解析研究の推進をはかる。

B. 研究方法

「特発性造血障害に関する調査研究班」および「不応性貧血の治療率向上を目指した分子・免疫病態研究班」参加施設より、MDSの骨髄検体を集積する。具体的には、診療上の目的で骨髄穿刺を行った際に採取した骨髄液の一部を、検体集積施設（獨協医科大学内科学（血液）、京都大学血液・腫瘍内科）に送付していただき、検体集積施設では単核球分離後、一部の細胞からDNAを抽出し、残りの細胞は凍結保存する。DNAおよび凍結保存された細胞は「造血器腫瘍における遺伝子異常の網羅的解析」、「骨髄異形成症候群の分子病態の解析と層別化治療の確立」、「骨髄異形成症候群のSPARK発現ネットワーク解析」、「骨髄不全症候群の酸化ストレス系遺伝子発現ネットワ

ーク解析」、その他当班で行われる各種遺伝子解析研究に提供される。

(倫理面への配慮)

検体集積事業と遺伝子解析研究はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づいて行われる。すなわち、各施設の倫理審査委員会での承認の後、文書によるインフォームドコンセントを得るとともに、検体提供施設において連結可能匿名化を行う。検体集積事業ならびに遺伝子解析研究において、検体集積施設、個別遺伝子解析研究実施施設のいずれにおいても、検体と患者名の照合は不可能である。

C. 研究結果

本年度は、引き継いだ前研究を継続・発展させるために、研究計画書を大幅に改訂し、研究参加各施設における倫理委員会申請の手続きをすすめた。この間、平成22年4月から平成23年3月15日現在までに、前研究の計画書に基づく包括的な同意の得られた新たな31検体の送付があった。これを含めて、これまでに集積された検体数は合計125となっている。これらの多くでは遺伝子解析の施行に関する包括的な同意が得られており、同意の撤回がない限りは「特発性造血障害に関する調査研究班」ならびに本班で将来行う遺伝子解析研究にも使用可能である。前研究から開始されている高密度 SNP アレイ解析（東京大学小川誠司准教授）は、MDS 患者の予後を推定する上で高い有用性が示唆されており、送付された検体の一部は同解析に用いられ、結果は各検体提供施設に還元された。

D. 考察

今年度は主に、研究計画書の改訂と倫理委員会への申請・承認といった手続きと、承認後の大規模な検体集積のための体制作りが進められた。また、検体の集積実務に関しても、引き継いだ前研究の計画書に基づいて継続された。本年度の集積検体の提供は前研究から

継続されている SNP アレイ解析に限られていたが、来年度以降には倫理委員会審査を終えた各個別研究への提供を予定している。

E. 結論

MDS の発症、進展、治療などに関連した各種遺伝子解析研究の基盤となる検体集積事業を継続している。今年度に発展的な改訂が行われた研究計画に則って、今後、多様な遺伝子研究への検体供与が予定されている。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Kanda J, Mizumoto C, Kawabata H, Ichinohe T, Tsuchida H, Tomosugi N, Matsuo K, Yamashita K, Kondo T, Ishikawa T, Uchiyama T.; Clinical significance of serum hepcidin levels on early infectious complications in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009 Aug;15(8):956-962.
- Kitawaki T, Kadowaki N, Fukunaga K, Kasai Y, Maekawa T, Ohmori K, Itoh T, Shimizu A, Kuzushima K, Kondo T, Ishikawa T, Uchiyama T.; Cross-priming of CD8(+) T cells in vivo by dendritic cells pulsed with autologous apoptotic leukemic cells in immunotherapy for elderly patients with acute myeloid leukemia. *Exp Hematol.* 2011 Apr;39(4):424-433.
- 石川隆之. 骨髄異形成症候群 MDS の診断と分類 FAB 分類から WHO 分類へ. *臨床血液.* 2010;51(10):1470-9.

2. 学会発表

- Sakamoto, S., Kawabata, H., Kanda, J., Uchiyama, T., Mizumoto, C., Kondo, T., Ichinohe, T., Ishikawa T., Takaori-Kondo, A. Impact of Serum Ferritin Levels on the

Incidence of Chronic Graft-Versus-Host Disease After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Session Type: Poster Session, Board #I-228, The American Society of Hematology 52nd Annual Meeting, December 4-7, 2010, Orland, FL, USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を

含む。）

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし。

不応性貧血の治癒率向上を目指した分子・免疫病態研究

分担研究者 稲葉 俊哉 広島大学原爆放射線医科学研究所 教授

研究要旨

MDS はゲノム異常の蓄積に加え、エピゲノムの異常がその発症に寄与していると考えられ、アザシチジン(5-aza)など DNA 脱メチル化剤が有効である。われわれは、高速並列シーケンサ（次世代シーケンサ）を用いて、MDS のエピゲノム異常や 5-aza 有効性メカニズムの解明を試みた。本年はパイロットスタディとして、5-aza が K562 細胞株を赤芽球系へ分化誘導する実験系を用いて、標的因子の同定を試みた。K562 細胞は 5-aza によりヘモグロビンの蛋白量が 5 倍以上増加したが、それはヘモグロビン遺伝子やヘム合成蛋白質遺伝子の転写量の増加によるものではなく、むしろヘモグロビン mRNA の翻訳効率の増加に由来すると考えられた。われわれは翻訳効率を増加させる蛋白質として、elongation factor のうち一つが脱メチル化により転写量が著しく増加していることを見だし、本実験系での赤芽球系への分化の原因候補遺伝子と考え、解析を進めている。

A. 研究目的

MDS は高齢者に多いことや造血前駆細胞の分化異常が前景に出ること、アザシチジン(5-aza)など DNA 脱メチル化剤の有効性が報告されることなどから、ゲノム異常の蓄積に加えて、エピゲノムレベルの異常がその発症に寄与していると考えられている。しかし、これまで効率的なエピゲノム状態の解析方法がなく、研究は進んでいない。5-aza は、近年 MDS 患者の生存期間を有意に延長することが報告されているが、従来の抗白血病剤とは異なり、寛解に入ることと生存期間の延長にはあまり相関がなく、むしろ輸血依存性の離脱など、症状の改善が予後を改善すると考えられている。したがって、貧血改善は治療上重要な指標であるが、輸血依存性が改善する理由は不明である。

近年高速並列（次世代）シーケンサが登場し、ゲノムワイドなエピゲノム解析が可能となった。本研究の目的は、MDS のエピゲノム異常やエピゲノム調整薬が奏功するメカニズムを、高速並列シーケンサを用いて解析することである。

B. 研究方法

細胞から抽出したゲノム DNA を破碎後、GST-MBP(メチル化シトシン結合蛋白質)によりメチル化 DNA を単離した。同時に mRNA を分離して cDNA を合成し、いずれもイルミナ社製の高速並列シーケンサにより配列を決定した。得られた多数の配列を、コンピュータ上でゲノムシーケンス上に貼付け、網羅的 DNA メチル化解析やトランスクリプトーム解析を行った。

C. 研究結果

K562 細胞を 5-aza 存在下に培養すると、ペレットが明瞭に赤くなり、細胞内ヘモグロビタンパク量が 5 倍程度に増加した。しかし、各種ヘモグロビンやヘム合成酵素の mRNA 発現量には変化がないか、むしろ減少した。5-aza 処理により、多くのメチル化部位は顕著に脱メチル化されていた。しかし、ヘモグロビン遺伝子やヘム合成酵素のプロモータ領域は最初からメチル化されていないか、メチル化されていても 5-aza による顕著な脱メチル化は見いだせなかつた。

ヘモグロビンの mRNA 上昇なしにタンパク量が增大していることから、翻訳効率の上昇を考えた。多数のサブユニットが存在する elongation factor のなかに、5-aza によりメチル化が解除され、mRNA および蛋白質発現レベルが数倍に上昇するメンバーが存在するため、現在その分子が関与している可能性の有無を検討している。

D. 考察

MBP 法によるメチル化部位の同定は、バイサルファイト法と比較して感度や定量性に劣るものの、圧倒的に低コストであり、必要検体量が少ないという利点がある。われわれの今回の検討でも十分に議論可能なレベルが得られており、トランスクリプトーム解析と併用すれば、さらに裏付けのある良質なデータが得られた。今年度の実験の主目的は、高速並列シーケンサを用いたエピゲノム解析の可能性を見極めることであつたので、その目的は達成されたと考えられた。

ゲノムワイドに脱メチル化をもたらす 5-aza のような薬剤が、赤芽球系への分化を促進したり、MDS に寛解をもたらすなど、細胞を「特定の方向」へ分化させ

る作用を持つメカニズムは全く不明である。今回のわれわれの検討でも、ヘモグロビンやヘム合成酵素は変化しておらず、メカニズムは単純でないことが窺われた。MDS 細胞のエピゲノム異常や薬剤反応性メカニズムの解明は治療法開発や個々の患者の薬剤反応性予見法開発に直結する重要な課題であるので、来年度以降も積極的に推進していく考えである。

E. 結論

高速並列シーケンサを用いたエピゲノム解析システムを構築した。

F. 健康危険情報 該当なし

G. 研究発表

論文発表

1. Okuya M, Kurosawa H, Kikuchi J, Furukawa Y, Matsui H, Aki D, Matsunaga T, Inukai T, Goto H, Altura RA, Sugita K, Arisaka O, Look AT, Inaba T. Upregulation of survivin by the E2A-HLF chimera is indispensable for the survival of t(17;19)-positive leukemia cells. *J. Biol. Chem.* 285: 1850-1860, 2010
2. Yamasaki N, Miyazaki K, Nagamachi A, Koller R, Oda H, Miyazaki M, Sasaki T, Honda Z, Wolff L, Inaba T, Honda H. Identification of *Zfp521/ZNF521* as a cooperative gene for *E2A-HLF* to develop acute B-lineage leukemia. *Oncogene* 29: 1963-1975, 2010
3. Akahane K, Inukai T, Inaba T, Kurosawa H, Look AT, Kiyokawa N, Fujimoto J, Goto H, Endo M, Zhang X, Hirose K, Kuroda I, Honna H, Kagami J, Goi K, Nakazawa S, and Sugita K. Specific induction of CD33 expression by E2A-HLF: the first evidence for aberrant myeloid antigen expression in ALL by a fusion transcription factor. *Leukemia* 24:865-869, 2010
4. Hirose K, Inukai T, Kikuchi J, Furukawa Y, Ikawa T, Kawamoto H, Oram SH, Göttgens B, Kiyokawa N, Miyagawa Y, Okita H, Akahane K, Zhang X, Kuroda I, Honna H, Kagami K, Goi K, Kurosawa H, Look AT, Matsui H, Inaba T, Sugita K. Aberrant induction of LMO2 by the E2A-HLF chimeric transcription factor and its implication in leukemogenesis of B-precursor ALL with t(17;19). *Blood* 116: 962-970, 2010
5. Nagamachi A, Htun PW, Ma F, Miyazaki K, Yamasaki N, Kanno M, Inaba T, Honda I, Okuda T, Oda H, Tsuji K, Honda H. A 5' untranslated region containing the IRES element in the *Runx1* gene is required for angiogenesis, hematopoiesis and leukemogenesis in a knock-in mouse model. *Dev Biol.* 345: 226-236, 2010
6. Jin L, Tabe Y, Kimura S, Zhou Y, Kuroda J, Asou H, Inaba T, Konopleva M, Andreeff M, Miida T. Antiproliferative and proapoptotic activity of GUT-70 mediated through potent inhibition of Hsp90 in mantle cell lymphoma. *Br. J. Cancer* 104: 91-100, 2011

7. Ozaki Y, Matsui H, Nagamachi A, Asou H, Aki D, Inaba T. The dynactin complex maintains the integrity of metaphasic centrosomes to ensure transition to anaphase. *J. Biol. Chem* 286: 5589-5598, 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

骨髄異形成症候群における 20q 欠失領域の解析

分担研究者 泉二 登志子 東京女子医科大学血液内科 教授

研究要旨

骨髄異形成症候群で見られる染色体異常の一つ 20 番染色体長腕（20q）欠失について、約 7.2Mb の共通欠失領域を同定した。さらに共通欠失領域内の骨髄異形成症候群の疾患関連遺伝子の探索を目指し、次世代シーケンサーを用いて同部位に存在する遺伝子の変異の有無を検討した。

A. 研究目的

骨髄異形成症候群の分子病態の解明を目指して、同疾患によくみられる染色体異常の一つである 20 番染色体長腕欠失（20q-）について、共通欠失領域を決定する。また、共通欠失領域内に存在する疾患関連遺伝子候補（群）を同定し、その異常の臨床的意義を明らかにする。同時に、細胞生物学的、分子生物学的、生化学的解析を行い、骨髄異形成症候群の分子機構における意義を明らかにする。さらに、治療標的としての可能性を追求する。

B. 研究方法

1) 骨髄異形成症候群症例 9 症例の臨床検体を用いて、高分子 DNA を抽出したのち、CGH-array により、共通欠失領域の同定を試みた。
2) CGH-array で得られた結果を踏まえて、共通欠失領域に存在する遺伝子のうち、がん抑制遺伝子としての機能が推定されている遺伝子、細胞周期やアポトーシスと関連する遺伝子につき変異の有無を検討した。具体的には共通欠失領域を確定した臨床検体のうち 5 症例について、標的とする遺伝子を SureSelect により濃縮したのち、次世代シーケン

サー SOLiD を用いて、網羅的に塩基配列の決定を行った。

（倫理面への配慮）

当該研究の実施については、学内倫理委員会の承認を得たうえで、患者の臨床検体を利用する際には書面での同意を得ている。臨床検体の提供に際して、提供は個人の自由意思に基づくもので、提供の有無により診療上、治療上の不利益を受けないこと、また、いったん得られた同意については、随時撤回できることを説明している。患者の個人情報 は匿名化され性別、年齢のみが記録されている。

C. 研究結果

1) CGH-array による解析結果から 20 番染色体長腕上の共通欠失領域は約 7.2Mb であることが判明した。
2) ゲノムデータベースを用いた解析で、共通欠失領域には約 200 の遺伝子が存在することが判明した。また、これまでの研究により、がん抑制遺伝子としての機能が想定される遺伝子、細胞の増殖、分化との関連が示されている遺伝子が 32 存在することが判明した。
3) 上記の 32 の遺伝子について、次世代シーケンサーを用いた解析で、

合計 2812 か所の 1 塩基置換と 340 か所の small insertion/deletion が明らかとなった。その中で特にエクソン内に存在しアミノ酸置換を伴う 1 塩基置換 17 か所に注目して解析を継続している。

D. 考察

20 番染色体長腕欠失は骨髄異形成症候群症例の 10%に見られる染色体異常であるが、欠失部位に存在する疾患関連遺伝子は同定おらず、その生物学的な意義は明らかではない。これまで、20 番染色体長腕の共通欠失領域の同定を試みた論文はあるものの、領域内に存在する遺伝子変異は見つかっていない。今回の検討で、アミノ酸置換を伴う 1 塩基置換を複数の遺伝子で認めている。現在、20 程度の臨床検体を用いて、これらの変異がどの程度の頻度で存在するか検討を行っているが、複数の臨床検体での異常が確認できれば、その意義が示唆される。生物学的解析について検討すると同時に、MDS 症例全般についてより多数の臨床検体を用いて検討し、多施設共同研究についても視野に入れることになると思われる。

E. 結論

20 番染色体長腕上の共通欠失領域は約 7.2Mb である。共通欠失領域内に存在する複数の遺伝子にアミノ酸置換を伴う変異が検出された。今後、その臨床的、生物学的意義につ

いて検討を進める予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Mori N, Yoshinaga K, Tomita K, Ohwashi M, Kondoh T, Shimura H, Wang YH, Shiseki M, Okada M, Motoji T. Aberrant methylation of the RIZ1 gene in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* 35(4):516-21, 2011.

2. Nagai T, Takeuchi J, Dobashi N, Kanakura Y, Taniguchi S, Ezaki K, Nakaseko C, Hiraoka A, Okada M, Miyazaki Y, Motoji T, Higashihara M, Tsukamoto N, Kiyoi H, Nakao S, Shinagawa K, Ohno R, Naoe T, Ohnishi K, Usui N. Imatinib for newly diagnosed chronic ϕ -phase chronic myeloid leukemia: results of a prospective study in Japan. *Int J Hematol.* 92(1):111-7, 2010.

学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

MDSの原因候補 miR-9 の赤芽球分化に果たす役割
分担研究者 三谷 絹子 獨協医科大学 内科学（血液・腫瘍） 教授

研究要旨

RUNX1 遺伝子の機能的失活は骨髄異形成症候群(MDS)の重要な発症機構である。RUNX1 mRNA に結合配列を有する microRNA の発現レベルを MDS 検体を用いて解析した所、正常骨髄では発現していない miR-9 の発現が約 1 割の症例で亢進していることが明らかになった。miR-9 の過剰発現が MDS 病初期の病像である無効造血に果たす役割を明らかにするために、ヒト白血病細胞株 UT-7/GM 細胞の miR-9 安定発現株を樹立し、赤芽球への分化能の変化を解析した。その結果、miR-9 の安定発現株では、コントロール細胞と比較して、ヘモグロビン合成、glycopholin A の表面発現、ALAS-E 遺伝子の発現がそれぞれ低下していた。以上より、miR-9 の過剰発現は赤芽球分化に対して抑制的に作用すると考えられ、このことを介して MDS の分子病態形成に関与している可能性が示唆された。今後、miR-9 の過剰発現により発現異常を生じる標的遺伝子の同定が重要な課題である。

A. 研究目的

microRNA は約 22 塩基からなる蛋白質に翻訳されない small RNA の一種であり、mRNA 中の結合配列を介してその分解や翻訳を制御し、遺伝子発現に際して主に抑制的に作用する事が知られている。一方、microRNA の異常発現は、造血発生や細胞維持に重要な遺伝子の働きを抑制することにより、造血器腫瘍発症・病態形成の原因となると考えられる。前年度までに、骨髄異形成症候群 (MDS) で特徴的に発現が亢進する RUNX1 mRNA 3' 非翻訳領域結合 microRNA として、miR-9 を同定した。miR-9 の過剰発現は病初期の症例にも観察されることから、赤芽球系の無効造血に関与している可能性が示唆された。本年度は、miR-9 の赤芽球分化に果たす役割を解析することにより、MDS の病初期の分子病態の一旦を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

ヒト白血病細胞株 UT-7/GM 細胞はエリスロポエチン存在下で培養すると赤芽球系に分化することが知られている。Green fluorescent protein (GFP) 遺伝子の下流に miR-9 遺伝子を組み込んだ発現ベクター (pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-9) を UT-7/GM 細胞に遺伝子導入した後、GFP の発現を指標に陽性株を選択することにより、miR-9 安定発現株を樹立した。モックコントロールと miR-9 安定発現株をエリスロポエチン存在下で培養し、miR-9 過剰発現の赤芽球分化に対する影響を以下の方法で評価した。

- ① ベンチジン染色（ヘモグロビン合成能）
- ② 赤芽球系細胞に特異的な表面マーカー glycopholin A の FACS 解析
- ③ ヘモグロビン合成に必須な ALAS-E および β -グロビン遺伝子の定量 PCR 解析
- ④ サイトスピンによる形態観察

C. 研究結果

モックコントロールおよび miR-9 安定発現株のい

れにおいても、分化開始前には、ベンチジン陽性細胞はほぼ 0 %であった。エリスロポエチン存在下で 3 日間培養を継続した所、モックコントロール細胞におけるベンチジン陽性細胞の比率は 40~51 %にまで上昇が認められたのに対し、miR-9 安定発現株における陽性率は 5~11 %と有意に低い傾向にあった。また、エリスロポエチン存在下で 4 日間培養を継続した後、これらの細胞から mRNA を抽出して定量 PCR 解析を施行した所、 β -グロビン遺伝子の発現レベルに関しては両者に有意な差は認めなかったものの、ヘム合成系の遺伝子である ALAS-E の発現レベルは、モックコントロール細胞と比較して miR-9 安定発現株において有意に低い結果が得られた。さらに、エリスロポエチン存在下で 7 日間培養を継続した後 FACS 解析を施行した所、glycopholin A の発現レベルに関しても miR-9 安定発現株において低い結果が得られた。一方、エリスロポエチン存在下で 12 日間培養した後形態観察を行ったが、miR-9 安定発現株およびモックコントロール細胞のいずれにも細胞の形態変化（異形成）は観察されなかった。以上、ヒト白血病細胞株を用いた解析により、miR-9 の過剰発現の結果、赤芽球分化の際に認められるヘモグロビン合成、特異的遺伝子 (ALAS-E) の発現および特異的表面抗原 (glycopholin A) の発現にそれぞれ低下が認められた。

D. 考察

miR-9 の発現異常が MDS の発症・病態形成に関わる分子機序を明らかにすることを目的に、その赤芽球分化に対する影響に関して解析を行った。ヒト白血病細胞株 UT-7/GM 細胞を用いた解析の結果、miR-9 の過剰発現は赤芽球分化に関して抑制的に作用する事実が明らかとなった。赤芽球分化に対する抑制効果の分子基盤として ALAS-E 遺伝子の発現低下は注目されるが、同遺伝子の 3' 非翻訳領域には miR-9 の結合配列は存在せず、miR-9 の過剰発現がどのような機序で ALAS-E mRNA を抑制するのかは不明である。

今後は、miR-9 の過剰発現により発現が変化する miR-9 の標的遺伝子の同定が重要な課題である。現在、*RUNX1* 以外の miR-9 の標的候補遺伝子群の中で赤芽球分化に関与する事が示されている *ROD1*, *HES1*, *BCL11A*, *ETS1*, *FOXO3A* 遺伝子に着目し、解析を進めている。

E. 結論

miR-9 の過剰発現による赤芽球分化の異常が MDS の分子病態の一旦を担う可能性が示唆された。今後、赤芽球分化に関わる miR-9 の標的遺伝子の同定を行う予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Akiyama N, Miyazawa K, Kanda Y, Tohyama K, Omine M, Mitani K, Ohyashiki K. Multicenter phase II trial of vitamine K2 plus 1 α -hydroxyvitamine D3 combination therapy for low -risk myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 34:1151-1157, 2010.

2. Miyawaki S, Hatsumi N, Tamaki T, Naoe T, Ozawa K, Kitamura K, Karasuno T, Mitani K, Kodera Y, Yamagami T, Koga D. Prognostic potential of detection of WT1 mRNA level in peripheral blood in adult acute myeloid leukemia. *Leuk & Lymph* 51:1855-1861, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他
いずれも予定なし

骨髄異形成症候群におけるDNA修飾に関する研究

分担研究者 千葉 滋 筑波大学大学院 人間総合科学研究科 教授

研究要旨

不応性貧血をはじめとする骨髄異形成症候群（MDS）では、クローン性造血細胞において DNA シトシン残基のメチル化修飾に異常を生じていることが明らかにされてきた。これに呼応するようにシトシンメチル化阻害剤（5-azacytidine）の有効性が証明され、我が国でも MDS 治療薬として 2011 年 3 月に発売された。一方近年、メチル化シトシン（5mC）のヒドロキシメチル化酵素として *TET* 群遺伝子が同定され、このうち *TET2* 遺伝子は、MDS あるいはその他の骨髄性腫瘍において高頻度に機能欠失型変異をきたしていることが明らかにされた。すなわち、MDS では高頻度にヒドロキシメチルシトシン（5hmC）産生が障害されていると推察される。本分担研究では、MDS 患者骨髄細胞におけるヒドロキシメチルシトシン（5hmC）量を測定してこれを正常コントロールや MDS 以外の造血器腫瘍細胞などにおける 5hmC 量と比較し、さらに *TET2* 遺伝子変異、5-azacytidine への反応性などと対比することにより、MDS の病態や予後における 5hmC 制御の意義について明らかにすることとした。

5 例の MDS/急性骨髄性白血病（AML）患者骨髄単核球で 5hmC 量を測定したところ、患者間で顕著な差が認められた。いずれの患者でも 5hmC 量は正常人末梢血単核球の 5hmC 量と比べ有意に少なかった。一方、AML 細胞株における 5hmC 量は、MDS 患者骨髄単核球に比べさらに少なかった。現在、より多数の患者検体を用いて 5hmC を定量しており、また *TET2* 遺伝子変異との対比を検討中である。一方、AML 細胞株に *TET2* 変異体を発現させたところ 5hmC 量が減少し、またこの細胞ではベクターのみを導入した細胞に比較して、増殖能は亢進していることが確認された。

さらに、*TET2* 遺伝子のノックアウトマウス骨髄細胞における 5hmC は、野生型コントロールに比べ少なかった。現在、このマウスにおける造血器腫瘍発症の有無を観察している。

今後は、MDS 患者検体において、SNP アレイを用いて、ゲノムにおいて 5hmC が認められる領域を網羅的に明らかにし、*TET2* 変異の有無と比較することにより、エピゲノム異常を介した MDS 発症の病態をさらに明らかにする予定である。

A. 研究目的

MDS 患者骨髄細胞におけるヒドロキシメチルシトシン（5hmC）量を測定してこれを正常コントロールや MDS 以外の造血器腫瘍細胞などにおける 5hmC 量と比較し、さらに *TET2* 遺伝子変異、5-azacytidine への反応性などと対比することにより、MDS の病態や予後における 5hmC 制御の意義について明らかにする。

B. 研究方法

5 名の MDS 患者骨髄単核球細胞種々の白血病細胞株から、Gentra Puregene Blood Kit (QIAGEN) によりゲ

ノム DNA を抽出した。Dot blot 法により 5hmC を定量した。また、ジーントラップ法により作製された *TET2* 遺伝子のノックダウンマウスおよびコントロールマウス骨髄より Lin⁻細胞を MACS により分取後、同様に 5hmC を定量した。さらに、AML 細胞株に *TET2* 変異体を導入した安定細胞株を作製し、hmC の定量および細胞増殖を MTT 法により測定した。

（本研究における倫理面への配慮）

本研究は、臨床研究に関する倫理指針（厚生労働省平成 20 年 7 月 31 日改正）を遵守し、筑波大学におけ

る臨床研究倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

5例のMDS/AML患者骨髄単核球で5hmC量を測定したところ、患者間で顕著な差が認められた。いずれの患者でも5hmC量は正常人末梢血単核球の5hmC量と比べ有意に少なかった。一方、急性骨髄性白血病細胞株における5hmC量は、MDS患者骨髄単核球に比べさらに少なかった。現在、より多数の患者検体を用いて5hmCを定量しており、またTET2遺伝子変異との対比を検討中である。

骨髄性白血病細胞株にTET2変異体を導入した細胞株では、5hmC量が減少し、またこの細胞ではベクターのみを導入した細胞と比較して、増殖能は亢進していることが確認された。

TET2遺伝子のノックアウトマウス骨髄Lin⁻細胞における5hmCは、野生型コントロールに比べ少なかった。現在、このマウスにおける造血器腫瘍発症の有無を観察している。

D. 考察

TET2変異体を導入した白血病細胞株の解析から、TET2変異は5hmCを介して細胞の増殖を促進すると考えられる。

AML/MDS患者において5hmC定量とTET2変異あるいはその他のAML/MDSに関連する遺伝子群の変異との関連について、次世代シーケンサーを用いて比較検討が必要である。さらにはこれらの患者検体において、SNPアレイを用いて、ゲノムにおいて5hmCが認められる領域を網羅的に明らかにし、エピゲノム異常を介したMDS発症の病態をさらに明らかにする予定である。

E. 結論

AML/MDSでは5hmC量が少ないケースが多く、また症例間でのばらつきがみられた。MDSにおけるDNAメチル化異常の機序と意義について、さらに解析を進める必要がある。

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. 千葉 滋. 5q-症候群とmiRNA, p53の異常: 動物モデルでの解析. Annual Review 血液 2010-2011

(編集: 高久史麿, 溝口秀昭, 坂田洋一, 金倉譲, 小島勢二). 中外医学社, 2011, 55-59

2. Sakata-Yanagimoto M, Sakai T, Miyake Y, Saito TI, Maruyama H, Morishita Y, Nakagami-Yamaguchi E, Kumano K, Yagita H, Fukayama M, Ogawa S, Kurokawa M, Yasutomo K, Chiba S. Notch2 signaling is required for proper mast cell distribution and mucosal immunity in the intestine. *Blood* 117(1):128-134, Jan 6, 2011
3. Nakahara F, Sakata-Yanagimoto M, Komeno Y, Kato N, Uchida T, Haraguchi K, Kumano K, Harada Y, Harada H, Kitaura J, Ogawa S, Kurokawa M, Kitamura T, Chiba S. Hes1 immortalizes committed progenitors and plays a role in blast crisis transition in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 115(14):2872-2881, Apr 8, 2010

(2) 学会発表

1. Sakata-Yanagimoto M, Chiba S. Notch signaling as a mediator of myeloid differentiation and leukemic transformation. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会. 7-10 Dec, 2010 (神戸)
2. Chiba S. Distinct roles of Notch signaling and Hes-1 on hematopoietic cell differentiation fate. Notch and Stem Cells. 3-6 Oct, 2010 (Athens, Greece)
3. Nishikii H, Nakamura N, Kondou Y, Kojima M, Takizawa J, Hasegawa Y, Okoshi Y, Suzukawa K, Yokoyama Y, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Noguchi M, Aoki M, Andou K, Chiba S. Retrospective analysis of BCL2+DCBCL in the rituximab era: multi-center analysis. 第72回日本血液学会総会. 24-26 Sep, 2010 (横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
千葉 滋	5q-症候群とmiRNA, p53の異常：動物モデルでの解析	高久史磨 坂田洋一 金倉譲 小澤敬也 小島勢二	Annual Review of Hematology 2010-2011	中外医学社	東京	2011	55-59

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ogawa S, Takita J, Sanada M, Hayashi Y.	Oncogenic mutations of ALK in neuroblastoma.	Cancer Sci.	102	302-308.	2011
Thoennissen NH, Krug UO, Lee DH, Kawamata N, Iwanski GB, Lasho T, Weiss T, Nowak D, Koren-Michowitz M, Kato M, Sanada M, Shih LY, Nagler A, Raynaud SD, Muller-Tidow C, Mesa R, Haferlach T, Gilliland DG, Tefferi A, Ogawa S, Koeffler HP.	Prevalence and prognostic impact of allelic imbalances associated with leukemic transformation of Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms.	Blood.	115	2882-2890	2010
Ogawa S, Shih LY, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, Koeffler HP, Sanada M.	Deregulated Intracellular Signaling by Mutated c-CBL in Myeloid Neoplasms.	Clin Cancer Res.	16	3825-3831	2010
Ogawa S, Sanada M, Shih LY, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, Koeffler HP.	Gain-of-function c-CBL mutations associated with uniparental disomy of 11q in myeloid neoplasms.	Cell Cycle.	9		2010
Ishikawa Y, Kiyoi H, Naoe T.	Prevalence and clinical characteristics of N-terminally truncated WT1 expression in acute myeloid leukemia.	Leuk Res.	Epub ahead of print		2011
Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, Suzuki H, Ishikawa Y, Choi YL, Ueno T, Soda M, Hamada T, Haruta H, Takada S, Miyazaki Y, Kiyoi H, Ito E, Naoe T, Tomonaga M, Toyota M, Tajima S, Iwama A, Mano H.	Array-based genomic resequencing of human leukemia.	Oncogene.	29	3723-31	2010
Morita Y, Kanamaru A, Miyazaki Y, Imanishi D, Yagasaki F, Tanimoto M, Kuriyama K, Kobayashi T, Imoto S, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R.	Comparative analysis of remission induction therapy for high-risk MDS and AML progressed from MDS in the MDS200 study of Japan Adult Leukemia Study Group.	Int J Hematology.	91	97-103	2010

Qi Z, Takamatsu H, Espinoza JL, Lu X, Sugimori N, Yamazaki H, Okawa K, Nakao S	Autoantibodies specific to hnRNP K: a new diagnostic marker for immune pathophysiology in aplastic anemia	Ann Hematol	89	1255-63	2010
Katagiri T, Qi Z, Ohtake S, Nakao S	GPI-anchored protein-deficient T cells in patients with aplastic anemia and low-risk myelodysplastic syndrome: implications for the immunopathophysiology of bone marrow failure	Eur J Haematol	86	226-236	2011
Sakuta J, Ohyashiki K, et al.	Estimation of cardiac left ventricular ejection fraction in transfusional cardiac iron overload by R2* magnetic resonance.	International Journal of Hematology	92	708-712	2010
Akiyama N, Ohyashiki K, et al.	Multicenter phase II trial of vitamin K(2) monotherapy and vitamin K(2) plus lalpha-hydroxyvitamin D(3) combination therapy for low-risk myelodysplastic syndromes.	Leukemia Research	34	1151-1157	2010
Ando K, Ohyashiki K, et al.	PMHNP-phenotype cells in patients with idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS) with megakaryocytic hypoplasia and thrombocytopenia.	British Journal of Haematology	150	705-707	2010
Kanda J., Mizumoto C., Ichinohe T., Kawabata H., Saito T., Yamashita K., Kondo T., Takakura S., Ichiyama S., Uchiyama T., Ishikawa T.	Pretransplant serum ferritin and C-reactive protein as predictive factors for early bacterial infection after allogeneic hematopoietic cell transplantation.	Bone Marrow Transplant	46	208-216	2011
Kitawaki T., Kadowaki N., Fukunaga K., Kasai Y., Maekawa T., Ohmori K., Itoh T., Shimizu A., Kuzushima K., Kondo T., Ishikawa T., Uchiyama T.	Cross-priming of CD8(+) T cells in vivo by dendritic cells pulsed with autologous apoptotic leukemic cells in immunotherapy for elderly patients with acute myeloid leukemia.	Exp Hematol	39	424-433	2011
石川隆之	骨髓異形成症候群MDSの診断と分類FAB分類からWHO分類へ	臨床血液	51	1470-1479	2010
Kinuko Hirose, Takeshi Inukai, Jiro Kikuchi, Yusuke Furukawa, Tomokatsu Ikawa, Hiroshi Kawamoto, S. Helen Oram, Berthold Gottgens, Nobutaka Kiyokawa, Yoshitaka Miyagawa, Hajime Okita, Koshi Akahane, Xiaochun Zhang, Itaru Kuroda, Hiroko Honna, Keiko Kagami, Kumiko Goi, Hidemitsu Kurosawa, A. Thomas Look, Hirotaka Matsui, Toshiya Inaba, and Kanji Sugita	Aberrant induction of LMO2 by the E2A-HLF chimeric transcription factor and its implication in leukemogenesis of B-precursor ALL with t(17;19)	BLOOD	116		2010

Yuko Ozaki, Hirotake Matsui, Akiko Nagamachi, Hiroya Asou, Daisuke Aki and Toshiya Inaba	The Dynactin Complex Maintains the Integrity of Metaphasic Centrosomes to Ensure Transition to Anaphase	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY	286	5589-5598	2011
Mori N, Yoshinaga K, Tomita K, Ohwashi M, Kondoh T, Shimura H, Wang YH, Shiseki M, Okada M, Motoji T.	Aberrant methylation of the RIZ1 gene in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia	Leuk Res.	35(4)	516-21	2011
Nagai T, Takeuchi J, Dobaishi N, Kanakura Y, Taniguchi S, Ezaki K, Nakaseko C, Hiraoka A, Okada M, Miyazaki Y, Motoji T, Higashihara M, Tsukamoto N, Kiyoi H, Nakao S, Shinagawa K, Ohno R, Naoe T, Ohnishi K, Usui N.	Imatinib for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: results of a prospective study in Japan.	Int J Hematol.	92(1)	111-7	2010
Akiyama N, Miyazawa K, Kanda Y, Tohyama K, Omine M, Mitani K, Ohyashiki K.	Multicenter phase II trial of vitamin K2 plus 1-alpha-hydroxyvitamin D3 combination therapy for low-risk myelodysplastic syndrome.	Leuk Res	34	1151-1157	2010
Miyawaki S, Hatsumi N, Tamaki T, Naoe T, Ozawa K, Kitamura K, Karasuno T, Mitani K, Kodera Y, Yamagami T, Koga D.	Prognostic potential of detection of WT1 mRNA level in peripheral blood in adult acute myeloid leukemia.	Leuk & Lymph	51	1855-1861	2010
Sakata-Yanagimoto M, Sakai T, Miyake Y, Saito TI, Maruyama H, Morishita Y, Nakagami-Yamaguchi E, Kumano K, Yagita H, Fukayama M, Ogawa S, Kurokawa M, Yasutomo K,	Notch2 signaling is required for proper mast cell distribution and mucosal immunity in the intestine	Blood	117(1)	128-134	2011
Nakahara F, Sakata-Yanagimoto M, Komeno Y, Kato N, Uchida T, Haraguchi K, Kumano K, Harada Y, Harada H, Kitaura J, Ogawa S, Kurokawa M, Kitamura T, Chiba S.	Hes1 immortalizes committed progenitors and plays a role in blast crisis transition in chronic myelogenous leukemia.	Blood	115(14)	2872-2881	2010

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Review Article

Oncogenic mutations of *ALK* in neuroblastomaSeishi Ogawa,^{1,2,6} Junko Takita,^{3,4} Masashi Sanada¹ and Yasuhide Hayashi⁵

¹Cancer Genomics Project, The University of Tokyo, Tokyo; ²Core Research for Evolutional Science and Technology, Exploratory Research for Advanced Technology, Japan Science and Technology Agency, Saitama; ³Department of Pediatrics, The University of Tokyo, Tokyo; ⁴Cell Therapy and Transplantation Medicine, The University of Tokyo, Tokyo; ⁵Gunma Children's Medical Center, Gunma, Japan

(Received October 21, 2010/Revised November 26, 2010/Accepted November 28, 2010/Accepted manuscript online December 9, 2010)

Neuroblastoma is one of the most common solid cancers among children. Prognosis of advanced neuroblastoma is still poor despite the recent advances in chemo/radiotherapies. In view of improving the clinical outcome of advanced neuroblastoma, it is important to identify the key molecules responsible for the pathogenesis of neuroblastoma and to develop effective drugs that target these molecules. Anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) is a receptor tyrosine kinase, initially identified through the analysis of a specific translocation associated with a rare subtype of non-Hodgkin's lymphoma. Recently it was demonstrated that *ALK* is frequently mutated in sporadic cases with advanced neuroblastoma. Moreover, germline mutations of *ALK* were shown to be responsible for the majority of hereditary neuroblastoma. *ALK* mutants found in neuroblastoma show constitutive active kinase activity and oncogenic potentials. Inhibition of *ALK* in neuroblastoma cell lines carrying amplified or mutated *ALK* alleles results in compromised downstream signaling and cell growth, indicating potential roles of small molecule *ALK* inhibitors in the therapeutics of neuroblastoma carrying mutated *ALK* kinases. (*Cancer Sci* 2011; 102: 302–308)

Neuroblastoma is a malignant embryonal neoplasm arising from developing neural crest tissues.⁽¹⁾ It commonly affects younger children, where the median age of diagnosis is 17 months and approximately 90% of the patients are <4 years old. In the United States, the incidence of neuroblastoma is estimated to be one in 7000 births, although the incidence calculated from the mass screening program in Japan was as high as 29.80 cases per 100 000 births, which is significantly higher than the estimation in the prescreening cohort (11.56 cases per 100 000 births).⁽²⁾ It is the third most common cancer in childhood after leukemia and brain tumors, accounting for 7–11% of all pediatric cancers.⁽³⁾ The presentation and following clinical courses of neuroblastoma are highly variable, ranging from a solitary localized mass with no apparent clinical symptoms to widely disseminated diseases presenting with severe systemic illness.⁽¹⁾ While some tumors undergo spontaneous regression without therapy, approximately 60–70% of high-risk neuroblastoma patients are resistant to any therapies currently available and succumb to death,^(4–6) even though a substantial improvement in 5-year survival rates has been obtained for a subset of advanced tumors through the development of multimodal chemo/radiotherapies during the past several decades.⁽¹⁾ Thus, one of the urgent problems in the current neuroblastoma treatment would be to develop rational and effective therapeutic strategies for the high-risk neuroblastoma cases based on their molecular pathogenesis.

On the other hand, during the past three decades, little advancement has been made in the understanding of neuroblastoma pathogenesis in terms of critical gene targets, except for

the identification of frequent *MYCN* amplification.⁽⁷⁾ Amplification of the *MYCN* gene is found in approximately 20% of neuroblastoma, especially in advanced diseases, and has been consistently associated with poor prognosis.^(8,9) Although *MYCN* amplification is a critical genetic event in neuroblastoma development,⁽¹⁰⁾ it encodes a transcription factor and thus may not be a plausible pharmacological target for therapeutics. Recently, several groups independently discovered activating mutations of the *ALK* gene in the majority of familial neuroblastoma and also in a subset of sporadic neuroblastoma cases.^(11–14) Given that the mutated *ALK* kinases are well-tractable targets for small-molecule kinase inhibitors, the discovery draws attention in the field of neuroblastoma research. In this review, we provide a brief overview of the role of *ALK* mutations in neuroblastoma pathogenesis and their implication in future therapeutics.

Genetic analysis of familial neuroblastoma

One of the first clues to identifying the novel genetic target of neuroblastoma was obtained from a linkage study of neuroblastoma-prone families. It was recognized that approximately 1–2% of newly diagnosed neuroblastoma cases occur within families (familial/hereditary neuroblastoma), indicating the existence of dominantly acting neuroblastoma susceptibility gene(s),^(15–19) although previous linkage studies, in an attempt to identify the susceptibility locus, failed to provide a reproducible result due to the insufficient power of the studies.^(20–22) Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (*PHOX2B*) gene at 4p12 was reported to be responsible for neuroblastoma predisposition, but they were mostly related to a rare form of familial neuroblastoma associated with congenital central hypoventilation syndrome (CCHS) and/or Hirschsprung disease, with rare somatic mutations.^(23–26) Recently, researchers at the Pennsylvania University analyzed 20 neuroblastoma pedigrees for linkage using approximately 6000 genetic markers, and mapped a candidate neuroblastoma susceptibility locus to the 2p region between rs18621106 and rs2008535, which contains 104 genes including *MYCN* and *ALK*.⁽¹¹⁾ Through a resequencing analysis of the *ALK* exons within the pedigrees they identified germline mutations of the *ALK* gene in >90% of the pedigrees that co-segregated with neuroblastoma development within the families, clearly demonstrating that the germline *ALK* mutations are responsible for the susceptibility to the development of hereditary neuroblastoma in the majority of the cases.^(11,12) Moreover, the subsequent analysis of *ALK* mutations in sporadic neuroblastoma cases identified a subset of sporadic neuroblastoma cases carrying acquired/germline mutations of *ALK*, which was also reported independently by other groups.^(12–14,27)

⁶To whom correspondence should be addressed.
E-mail: sogawa-tky@umin.ac.jp

Genome-wide copy number scanning of neuroblastoma

These groups conducted genome-wide copy number analyses of neuroblastoma using comparative genomic hybridization (CGH) arrays⁽¹²⁾ or single nucleotide polymorphism (SNP) arrays.^(11,14,27,28) With thousands to half-a-million genetic probes, both platforms enabled high-throughput detection of subtle genetic changes occurring in tumor genomes.^(29,30) Neuroblastoma genomes show characteristic copy number changes that involve large chromosomal segments, including gains of 17q, 1q, 2p and 11p, and losses of 1p, 3p and 11q, which, like other human cancers, collectively comprise a unique genomic profile of neuroblastoma.^(11,12,14) High-level amplifications, which usually involve discrete chromosomal regions <1 Mb in length, occurred in approximately 30% of neuroblastoma cases. Approximately 90% of the high-level amplifications in neuroblastoma were centered on the *MYCN* locus at 2p24, whereas other amplicons rarely mutually overlapped, except for the amplifications at 2p23, which exclusively involved the *ALK* locus in common^(12,14,28) (Fig. 1).

High-level amplification of the *ALK* gene and aberrantly activated *ALK* signaling in neuroblastoma was first described by Osajima-Hakomori *et al.*⁽³¹⁾ in two neuroblastoma-derived cell lines and a single case of primary neuroblastoma. The genome-wide copy number studies confirmed their finding, in which the frequency of *ALK* amplifications is reported to occur in 3–5% of primary neuroblastoma cases.^(11,12,14) Subsequent resequencing studies of *ALK* coding exons disclosed non-synonymous nucleotide substitutions of *ALK* in a subset of sporadic neuroblastoma cases and also of neuroblastoma-derived cell lines with mutation rates of approximately 6–11% and approximately 30%, respectively. Amplified *ALK* alleles, as a rule, did not harbor additional mutations, although in rare cases mutated *ALK* alleles were amplified.

Genetic abnormalities of the *ALK* gene in human cancers

ALK was initially isolated as a partner of the fusion gene generated by t(2;5)(q23;q35) translocation, which is characteristic of

anaplastic large cell lymphoma (ALCL), a rare subtype of non-Hodgkin's lymphoma.^(32,33) *ALK* encodes an orphan receptor tyrosine kinase with an apparent molecular mass of 220 kDa. Jelly belly,⁽³⁴⁾ and pleiotrophin⁽³⁵⁾ and midkine⁽³⁶⁾ have been postulated as putative *ALK* ligands in *Drosophila* and mammals, respectively, but a dispute about the authentic ligands of *ALK* still remains. *ALK* has an extracellular domain that is highly similar to LTK and, together with IGF-1R and c-Ros kinases, belongs to the insulin family of proteins.⁽³⁷⁾ Expression of *ALK* is largely restricted to neural tissues and is most abundant in the neonatal brain and, to a lesser extent, in the adult brain.^(38–41) In the developing brain, the highest expression was found in the thalamus, mid-brain, olfactory bulb and selected parts of cranial and dorsal ganglia.^(38,39) It is of particular note that high frequencies of *ALK* expression were reported in primary neuroblastoma specimens (22 out of 24 samples) and in other tumor cell lines derived from neuroectodermal tumors including neuroblastoma (13 out of 29 cell lines).⁽⁴²⁾ These expression patterns of *ALK* suggest its primary role in normal neural development as well as the pathogenesis of neuroblastoma, although *ALK*-deficient mice seem to show apparently normal development.⁽³⁷⁾

In t(2;5)(q23;q35) translocation, the carboxyl terminal of *ALK* that contains a kinase domain is fused with nucleophosmin (NPM), generating NPM/*ALK* fusion protein. *ALK* was also shown to participate in the generation of different fusion genes with a variety of partner genes in ALCL,^(43–47) inflammatory fibroblastic tumor,^(43,48–52) squamous cell carcinoma of the esophagus⁽⁵³⁾ and non-small-cell lung cancers (NSCLC).^(54,55) In NSCLC, *ALK* was reported to be fused with *EML4* to generate *EML4-ALK* fusion protein as a result of inv(2)(p21p23), which is found in 6% of the NSCLC cases⁽⁵⁵⁾ (Fig. 2).

These *ALK*-containing fusion proteins invariably show constitutive kinase activity and transform NIH3T3 cells and/or confer growth factor independence to 32D and/or Ba/F3 cells.^(56–58) When bone marrow cells were retrovirally transduced with *NPM-ALK* and transplanted into mice, they developed B-cell lymphoma within 4 months.⁽⁵⁸⁾ The critical role of *ALK* fusion proteins in neoplastic evolution has been further demonstrated

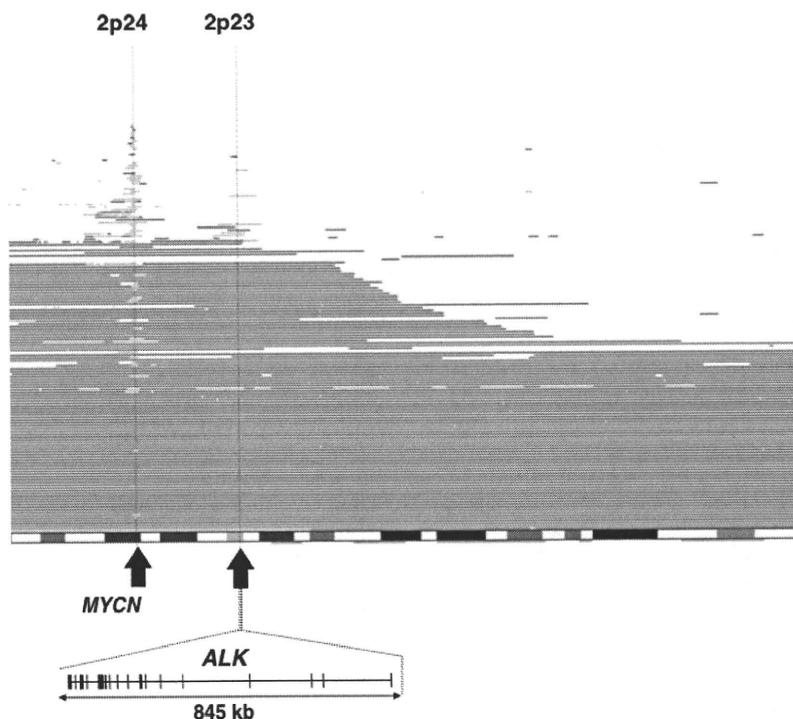


Fig. 1. Copy number gains and high-level amplifications in the short arm of chromosome 2 in neuroblastoma. Each horizontal line indicates a region showing a simple copy number (CN) gain (CN < 5; thick red) and high-level amplification (CN > 5; thin red) in each case. The majority of high-level amplifications involved the *MYCN* locus at 2p24, while the other group of amplicons is found at 2p23, which exclusively contains the *ALK* locus.