

201231006A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

不応性貧血の治癒率向上を目指した分子・免疫病態研究

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小川 誠司

平成 25(2013)年 4 月

目 次

I. 総括研究報告	1
不応性貧血の治癒率向上を目指した分子・免疫病態研究に関する研究	
東京大学医学部附属病院がんゲノミクスプロジェクト 小川誠司	3
II. 分担研究報告	13
1. 網羅的シーケンス解析によるMDSにおける新規標的遺伝子の探索	
東京大学医学部附属病院がんゲノミクスプロジェクト 小川誠司	15
2. 「MDSにおける末梢遊離DNAを用いた遺伝子変異及びエピジェネティクス異常解析」に関する研究	
名古屋大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科学 直江知樹	19
3. 自己免疫性骨髄不全における新たなクローン性造血の同定	
金沢大学医薬保健研究域医学系細胞移植学 中尾眞二	22
4. 脱メチル化薬耐性化の分子機構	
東京医科大学 内科学第1講座 大屋敷一馬	25
5. 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	
京都大学医学研究科血液・腫瘍内科学 高折 晃史	27
6. 不応性貧血の治癒率向上を目指した分子・免疫病態研究	
広島大学原爆放射線医科学研究所 稲葉 俊哉	29
7. 骨髄異形成症候群における 20q 欠失領域の解析	
東京女子医科大学血液内科 泉二登志子	31
8. 骨髄異形成症候群患者のゲノム異常、エピゲノム異常を解析するための検体収集システムの構築	
筑波大学 医学医療系 千葉 滋	33
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	35
IV. 研究成果の刊行物・別刷	41

I . 総括研究報告

不応性貧血の治癒率向上を目指した分子・免疫病態研究

研究代表者 小川誠司 東京大学 キャンサーボード がんゲノミクスプロジェクト

研究要旨

不応性貧血（骨髄異形成症候群、MDS）は高齢者に好発する難治性造血器疾患であるが、形態異常を伴う血球産生異常が共通に認められる一方、一部には免疫抑制療法が有効な自己免疫機序が主体となる病態も存在する。治療成績の向上の観点からは、この多様な病態を明らかにした上で、個々の病態に即した分子標的療法を含む治療戦略を構築することが重要である。本研究班は、MDSの多様な分子病態を明らかとすることを目的に、1) MDS研究の基盤となるMDSリソースバンクへの検体集積事業、2) 次世代シーケンス技術を活用した網羅的な変異遺伝子探索、3) MDSにおけるエピゲノム異常の解析、4) 骨髄不全における免疫病態研究を推進している。1)においては、2005年8月より「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、前班より引き継いで集積された検体数は計250例を超えている。更には日本成人白血病研究グループの臨床研究（JALSG MDS-212）と連動させて検体集積を行うことになり、現在、患者登録が進められている。2)においては、網羅的な新規変異遺伝子の探索を目的に、MDSの全エクソン・シーケンスを行い、新たにコピー数関連遺伝子群の変異ならびにSETBP1変異を見出した。後者は臨床において有用な分子マーカーになりうると考えられた。また20番長腕の共通欠失領域の標的遺伝子の探索により標的候補遺伝子としてNCOA3遺伝子を同定した。3)においては、末梢血中遊離DNAを用いたゲノム・エピゲノム解析は、末梢血に比し、骨髄細胞における遺伝子異常をより反映し、低侵襲かつ簡便な解析方法である。脱メチル化薬が、MDSの治療に積極的に使用されつつあるが、耐性化が問題となっている。そこで、脱メチル化薬耐性白血病細胞株を樹立し、ピリミジン代謝経路に関わる遺伝子発現の変化が、耐性化と関連していることを明らかとした。昨年度までに、脱メチル化薬である5-azaの貧血改善には、ヘモグロビンなどの転写レベルへの作用ではなく、eEF1aやeIF2bによるヘモグロビンの翻訳効率の上昇が寄与していることを、K562細胞を用いて明らかとしたが、今年度は正常およびMDS患者由来造血幹細胞などを用いて、より生理的な系で、普遍的に生じているかを検証した。4)においては、本研究班で昨年度までに、免疫病態の関与が示唆される骨髄不全において6q-UPDや13番部分欠失などを有するクローン性造血が観察されることを明らかとしてきたが、今年度は、次世代シーケンスを用いた全エクソン解析を通じて、新たなクローン性造血の原因遺伝子候補としてSLIT1遺伝子変異を同定した。

研究分担者

- 直江 知樹
名古屋大学大学院医学系研究科
血液・腫瘍内科学 教授
- 中尾眞二
金沢大学医薬保健研究域医学系
細胞移植学 教授
- 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
- 高折 晃史
京都大学医学研究科
血液・腫瘍内科学 教授
- 稲葉 俊哉
広島大学
原爆放射線医科学研究所 教授
- 泉二 登志子
東京女子医科大学
血液内科 教授
- 千葉 滋
筑波大学大学院
人間総合科学研究科・血液内科 教授

A. 研究目的

不応性貧血（骨髄異形成症候群 MDS）は高齢者に好発する難治性造血器疾患であるが、高齢者に適した根治的治療がなく、急速な少子高齢化による患者数の増加も危惧される。MDS では形態異常を伴う血球産生異常が共通に認められる一方、一部には免疫抑制剤が有効な自己免疫機序が主体となる病態も存在する。治療成績の向上には、この多様な病態を分子レベルで明らかにした上で、個々の分子病態に即した分子標的療法を含む治療戦略を構築することが重要であると考えられる。

そこで本研究班では、MDS 研究の基盤となるリソースバンクの一層の拡充と、これを用いた先端的なゲノム・エピゲノム解析、免疫病態解析を通じ、MDS の多様な病態とその責任となる分子病態を明らかにすることにより、新規治療薬・診断技術の開発の基盤を構築し、MDS の治療成績の向上に資することを目的として研究を遂行した。

B. 研究方法

1) 検体集積事業（高折・三谷・千葉・小川）
「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、東日本バンク（獨協医科大学血液内科）および西日本バンク（京都大学血液腫瘍内科）に骨髄異形成症候群患者の骨髄液が提供された。

これらの検体は単核球分離後、一部の細胞から DNA を抽出し、残りの細胞は凍結保存された。抽出された DNA の一部は、前研究から開始されている高密度 SNP アレイによるゲノム解析に用いられた（小川）。また、本年度は日本成人白血病研究グループが行う治療研究（JALSG MDS212）と連携した検体集積事業に向け、患

者登録が開始された（千葉）。

2) 次世代シーケンス技術を活用した網羅的な変異遺伝子探索

A. 全エクソン・シーケンスによる新規変異遺伝子の探索（小川・千葉）

新たに20例のMDS検体を用いて全エクソン・シーケンスを行った。全ゲノムよりエクソン領域をアジレント社SureSelectキットにより濃縮し、イルミナ社の次世代シーケンサーを用いて配列決定を行い、MDS細胞特異的（後天的）変異候補を同定し、サンガーシーケンスまたはdeepシーケンスにより変異の確認を行った。複数例に認められた新規標的候補遺伝子については、多数例の症例を用いて変異頻度を解析した。

B. 20番長腕欠失の標的遺伝子の探索（泉二）

20番染色体の共通欠失領域に存在する遺伝子について、次世代シーケンサー（ABI社 SOLiD）を使用したシーケンス解析と遺伝子発現解析を行った。

3) MDS におけるエピゲノム異常の解析研究

A. 脱メチル化薬耐性化の分子機構の解明（大屋敷）

脱メチル化剤は MDS 治療において広く用いられつつあるが、反復投与の過程で耐性化を示す症例がしばしば観察される。そこで、U937 白血病細胞株から 5-アザシチジン耐性細胞株を樹立し、DNA メチル化並びに発現解析を行い、親株と比較検討することで、耐性化の分子機序を検討した。

B. MDS における末梢遊離 DNA を用いた遺伝子変異及びエピジェネティクス異常解析（直江）
MDS 患者より経時的に採取された血漿または血清より遊離 DNA を抽出し、骨髄所見との関連を検討するとともに、遊離 DNA を用いた変異解析の有用性を評価した。

C. 脱メチル化薬の作用機序の解明（稲葉）

昨年度までにK562細胞株を用いて、5-アザシチジンによる赤血球分化には、eEF1aとeIF2Bが重要な役割を担っていることを示した。今年度はヒト臍帯血、ES細胞由来の細胞株およびMDS患者由来のCD34+造血細胞を用いて赤血球へ分化をさせ、DNAメチル化、遺伝子発現解析などを行い、K562細胞で得られた成果の検証を行った。

4) 自己免疫性骨髄不全における新たなクローン性造血の同定 (中尾)

自己免疫性骨髄不全において6q-UPDなどクローナルな造血が観察されることを明らかとしてきたが、新たなクローン性造血を同定する目的で、PNH型血球陽性自己免疫性骨髄不全3症例を対象とした、顆粒球DNAの全エクソン解析を行った。

5) 新規MDSモデルマウスの作成 (小川)

昨年度の研究成果として、MDSにおいて、RNAスプライシングに関わる遺伝子群に高頻度かつ特徴的に変異が生じていることを明らかとし、本異常はMDSの分子病態上、重要な役割を担っていると考えられている。そこで、代表的な変異体についてモデルマウスの作成を行った。

(倫理面への配慮)

本研究で実施される患者検体を用いた遺伝子解析研究は、原則としてMDS細胞の体細胞突然変異を扱うものであるが、平成16年文部科学省、厚生労働省および経済産業省告示第1号「ヒトゲノム・遺伝子に関する倫理指針」を遵守し、事前に各参加施設の倫理委員会の承認を得た。また、研究対象者からは文書による同意を得た。動物実験に関しては、動物愛護の観点から、平成18年文部科学省告示第71号「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指

針」及び各機関の定める動物実験倫理規定を遵守し、予め各機関に届け、機関長の承認を得た。

D. 研究結果

1) 検体集積事業 (高折・三谷・千葉・小川)

平成24年1月から平成25年1月末までに、新たに骨髄細胞76検体が提供された。収集された検体からはDNAが抽出され、その一部からはゲノムDNAの高密度SNPアレイ解析が行われた。同解析によって、染色体G-バンド法ではみつからなかったUPDなどのゲノム上の異常が多数同定されている。解析結果は随時、各検体提供施設にフィードバックされている。また、我が国で最大の造血器腫瘍研究グループである日本成人白血病研究グループ(JALSG)の治療研究(MDS211試験)と連携をして、検体集積事業を行うことが決まり、患者登録が開始された。

2) 次世代シーケンス技術を活用した網羅的な変異遺伝子探索

A. 全エクソン・シーケンスによる新規変異遺伝子の探索 (小川・千葉)

MDSの全エクソン・シーケンスにより、新たな標的遺伝子として *STAG2*, *RAD21*, *SMC3* に代表されるコヒーシン分子変異および *SETBP1* 変異が同定された。コヒーシン異常は、MDSを含む骨髄系疾患の10-20%に広く観察された。コヒーシン分子変異は、固形腫瘍においても報告があり、染色体異常を介した腫瘍化メカニズムが示唆されていたが、MDS例においては、約半数の症例は正常核型であり、異なる分子病態が示唆された。一方、*SETBP1* 変異は、MDSからAMLへの進展過程で獲得されることが多く、本変異を有する症例の生命予後は不良であった。

B.20 番染色体異常責任遺伝子の同定 (泉二)

20番染色体長腕(20q)共通欠失領域に存在する遺伝子について、次世代シーケンサにより変異の有無を解析し、複数例に観察される唯一の変異として、欠失例38例中3例においてNCOA遺伝子変異が同定された。また同共通領域に存在する32遺伝子の発現解析において、5つの遺伝子の発現レベルの低下が、20q欠失のみならず、20q異常を有さないMDS例においても観察された。

3) MDSにおけるエピゲノム異常の解析研究

A. 脱メチル化薬耐性化の分子機構の解明(大屋敷)

5Aza耐性を獲得した白血病細胞株の遺伝子発現解析から、ピリミジン代謝に関わる遺伝子の発現変化が、耐性の分子機構において重要な役割を担っていることが示唆された。

B. MDSにおける末梢遊離DNAを用いた遺伝子変異及びエピジェネティクス異常解析(直江)

MDSにおける遺伝子およびエピジェネティクス異常を低侵襲で簡便に、経時的に検討する方法として、末梢血遊離DNA(PC-DNA)を用いたゲノム・エピゲノム解析法の確立を目的に検討を行った。PC-DNA濃度は骨髓芽球数と相関し、遺伝子変異の存在割合は骨髓中幹細胞分画における存在比率を反映する傾向が示唆された。また、特定遺伝子プロモーターのメチル化測定も可能であることが確認された。

C. 脱メチル化薬の作用機序の解明(稲葉)

ヒト臍帯血、マウスES細胞、MDS患者由来造血幹細胞を用いた赤芽球系への分化誘導実験を行い、昨年度、K562白血病細胞株で示したeEF1aおよびeIF2Bの活性化を介した赤芽球系への分化促進機構の検証を行い、同機構の普遍性を裏付けるデータが一部得られた。

4) 骨髓不全における免疫病態研究(中尾)

全エクソン解析により、SLIT1遺伝子変異を見出した。SLIT1遺伝子は、PHA刺激したリンパ球の培養上清の存在下で、造血幹細胞やK562細胞において遺伝子発現が誘導され、そのレセプターであるRobo1が発現していた。また、K562の増殖はリコンビナントSlit1によって抑制され、この抑制は、shRNAによりRobo1発現を低下させたK562細胞では見られなかった。

5) MDSモデルマウスの作成(小川)

MDSにおいて、RNAスプライシングに関わる分子に、遺伝子変異が高頻度かつ特徴的に生じていることを、昨年度の本研究で明らかとしたが、その分子メカニズムは不明である。そこで、本異常の分子機構の解明を目的に、変異体のconditional Knock-inマウスを作成した。

D. 考察

1) 検体集積事業

本事業と日本成人白血病研究グループ(JALSG)との連携により、臨床情報の整備された高品質かつ多数検体の集積が可能となり、集積事業ならびに集積された検体を活用した研究が発展することが期待される。また、これまでに集積された検体からはDNA、RNAが抽出され、残った細胞は凍結保存されている。抽出されたDNAの一部は、高密度SNPアレイ解析に用いられ、同解析結果の、MDSと再生不良性貧血との鑑別や、予後を推定する上での有用性が示された。

2) 次世代シーケンス技術を活用した網羅的な変異遺伝子探索

次世代シーケンス技術は様々な疾患研究に応用され、原因遺伝子が急速に明らかとなりつつある。昨年度、本研究により、MDSにおいてRNAスプライシングに関わる一連の遺伝子群に後天的変異が高頻度に生じていることを明らか

としたが、本年度は、コヒーシン分子の変異ならびにSETBP1変異を新たに同定した。コヒーシン分子変異は、骨髄系疾患に広く観察される共通した異常であり、新たな分子病態が明らかになることが期待される。SETBP1変異はMDSからAMLへの移行に関わる異常の一つであることが想定され、同変異を有する症例は生命予後が不良である。造血幹細胞移植の適応など、治療方法を考えるうえで、臨床上有用な分子マーカーとなることが期待される。

3) MDSにおけるエピゲノム異常の解析研究

MDS 治療において有効性が期待できる貴重な治療法として脱メチル化薬が臨床応用されているが、作用機序は不明な点が多く、また耐性化の問題なども生じている。治療効果を正確に評価するうえでは、経時的な骨髄検査が望まれるが、検査の侵襲性や被験者の苦痛を考慮すると、容易ではない。末梢血遊離 DNA で骨髄の状態を評価が可能となれば、患者の負担も軽減でき、臨床上、非常に有用である。昨年度までに、K562 細胞における 5Aza の赤芽球への分化誘導の分子機構を明らかとしたが、本年は MDS 患者由来の造血細胞を用いた検証を行った。更なる検討が必要ではあるが、脱メチル化薬の作用機序が明らかとなりつつある。脱メチル化薬継続使用中に、治療反応性が低下し、耐性となってしまうことが、臨床上、問題となりつつある。そこで、脱メチル化薬に耐性を獲得した細胞株を樹立し、耐性化に関わる分子機序を明らかとした。本検討を通じて、耐性化克服への分子標的となることが期待される。

4) 骨髄不全における免疫病態研究

本研究班の研究を通じて、自己免疫性骨髄不全において 6q-UPD などクローナルな造血が観察されることを明らかとしてきたが、新たなクローン性造血の証拠として、SLIT1 遺伝子変異が

同定された。SLIT1 は autocrine または paracrine に造血幹細胞の増殖を抑制しており、この抑制機構から逸脱した SLIT1 変異クローンが拡大すると推測される。

5) MDS マウスモデルの作成

昨年度に明らかとした RNA スプライシング関連分子変異は、これまでに MDS で報告がされた遺伝子異常と異なり、MDS に特徴的である。本異常の分子機構の解明により、MDS の分子病態の理解が進むことが期待されているが、MDS における RNA スプライシング変異の分子メカニズムは不明な点が多く残されている。本異常の conditional Knock-in マウスの作成は、分子機構の解析を後押しし、今後、新規治療薬剤の開発も含めた本研究領域の重要な研究資源になると期待される。

5 結論

不応性貧血 MDS の治癒率向上につながる分子病態の解明を目的に、様々な解析技術を駆使した研究を推進させた。次世代シーケンサーを活用した網羅的な標的分子の探索を通じて、新たに、コヒーシン分子の変異ならび SETBP1 変異が同定された。MDS の治療薬として脱メチル化剤が臨床応用されているが、末梢血遊離 DNA を使用した評価は有用性が期待され、メチル化阻害薬の作用機序ならびに耐性化の分子メカニズムの解明は、薬剤ならびに使用法の改良に向け、重要な検討である。MDS は自己免疫病態や腫瘍性疾患の側面など様々な分子病態を含む疾患群であるとされ、分子病態の解明には、多数の臨床検体を使用した解析が重要である。本班で行っている検体集積事業は、本研究班の研究目的の達成において基盤となる重要な事業である。JALSG による治療研究との連携も開始しており、本事業が MDS 研究の発展に大きく寄与することが期待される。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

論文発表

- 1) Shiraishi Y, Sato Y, Chiba K, Okuno Y, Nagata Y, Yoshida K, Shiba N, Hayashi Y, Kume H, Homma Y, Sanada M, Ogawa S, Miyano S. An empirical Bayesian framework for somatic mutation detection from cancer genome sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2013 in press
- 2) Kon S, Minegishi N, Tanabe K, Watanabe T, Funaki T, Wong WF, Sakamoto D, Higuchi Y, Kiyonari H, Asano K, Iwakura Y, Fukumoto M, Osato M, Sanada M, Ogawa S, Nakamura T, Satake M. Smap1 deficiency perturbs receptor trafficking and predisposes mice to myelodysplasia. *J Clin Invest.* 2013;123(3):1123-37.
- 3) Kunishima S, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Muramatsu H, Chiba K, Tanaka H, Miyazaki K, Sakai M, Ohtake M, Kobayashi R, Iguchi A, Niimi G, Otsu M, Takahashi Y, Miyano S, Saito H, Kojima S, Ogawa S. ACTN1 Mutations Cause Congenital Macrothrombocytopenia. *Am J Hum Genet.* 2013 Mar;92(3):431-8.
- 4) Ogawa S. Splicing factor mutations in myelodysplasia. *Int J Hematol.* 2012 Oct;96(4):438-42.
- 5) Ohba R, Furuyama K, Yoshida K, Fujiwara T, Fukuhara N, Onishi Y, Manabe A, Ito E, Ozawa K, Kojima S, Ogawa S, Harigae H. Clinical and genetic characteristics of congenital sideroblastic anemia: comparison with myelodysplastic syndrome with ring sideroblast (MDS-RS). *Ann Hematol.* 2013 Jan;92(1):1-9.
- 6) Meggendorfer M, Roller A, Haferlach T, Eder C, Dicker F, Grossmann V, Kohlmann A, Alpermann T, Yoshida K, Ogawa S, Koeffler HP, Kern W, Haferlach C, Schnittger S. SRSF2 mutations in 275 cases with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Blood.* 2012 Oct ;120(15):3080-8.
- 7) Ueda T, Sanada M, Matsui H, Yamasaki N, Honda ZI, Shih LY, Mori H, Inaba T, Ogawa S, Honda H. EED mutants impair polycomb repressive complex 2 in myelodysplastic syndrome and related neoplasms. *Leukemia.* 2012 Dec;26(12):2557-60.
- 8) Takita J, Yoshida K, Sanada M, Nishimura R, Okubo J, Motomura A, Hiwatari M, Oki K, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Novel splicing-factor mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia.* 2012 Aug;26(8):1879-81.
- 9) Tokunaga T, Shimada K, Yamamoto K, Chihara D, Ichihashi T, Oshima R, Tanimoto M, Iwasaki T, Isoda A, Sakai A, Kobayashi H, Kitamura K, Matsue K, Taniwaki M, Tamashima S, Saburi Y, Masunari T, Naoe T, Nakamura S, Kinoshita T. Retrospective analysis of prognostic factors for angioimmunoblastic T-cell lymphoma: a multicenter cooperative study in Japan. *Blood.* 2012 Mar 22;119(12):2837-43
- 10) Sugimoto T, Tomita A, Abe A, Iriyama C, Kiyoi H, Naoe T. Chimeric antisense RNA derived from chromosomal translocation modulates target gene expression. **Haematologica.** 2012 Aug;97(8):1278-80.
- 11) Yasuda T, Hayakawa F, Kurahashi S, Sugimoto K, Minami Y, Tomita A, Naoe T. B cell receptor-ERK1/2 signal cancels PAX5-dependent repression of BLIMP1 through PAX5 phosphorylation: a mechanism of antigen-triggering plasma cell differentiation. *J Immunol.* 2012 Jun 15;188(12):6127-34.
- 12) Shimada K, Tomita A, Minami Y, Abe A, Hind CK, Kiyoi H, Cragg MS, Naoe T. CML cells expressing the TEL/MDS1/EV11 fusion are resistant to imatinib-induced apoptosis through inhibition of BAD, but are resensitized with ABT-737. **Exp Hematol.** 2012 Sep;40(9):724-737.
- 13) Naoe T, Kiyoi H. Genen mutations of acute myeloid leukemia in the genome era. **Int J Hematol.** 2013 Feb;97(2):165-74.
- 14) Hosokawa K, Katagiri T, Sugimori N, Ishiyama K, Sasaki Y, Seiki Y, Sato-Otsubo A, Sanada M, Ogawa S, Nakao S. Favorable outcome of patients who have 13q deletion: a suggestion for revision of the WHO 'MDS-U' designation. **Haematologica.** 2012;97:1845-9.
- 15) Katagiri T, Kawamoto H, Nakakuki T, Ishiyama K, Okada-Hatakeyama M, Ohtake S, Seiki Y, Hosokawa K, Nakao S. Individual hematopoietic stem cells in human bone marrow of patients with aplastic anemia or myelodysplastic syndrome stably give rise to limited cell lineages. **Stem cells.** 2013; in press.
- 16) Seiki Y, Sasaki Y, Hosokawa K, Saito C, Sugimori N, Yamazaki H, Takami A, Nakao S. Increased plasma thrombopoietin levels in patients with myelodysplastic syndrome: a reliable marker for a benign subset of bone marrow failure. **Haematologica.** 2013; in press.
- 17) Sakamoto S, Kawabata H, Kanda J, Uchiyama T, Mizumoto C, Kondo T, Yamashita K, Ichinohe T, Ishikawa T, Kadowaki N, Takaori-Kondo A. Differing impacts of pretransplant serum ferritin and C-reactive protein levels on the incidence of chronic graft-versus-host disease after allogeneic

hematopoietic stem cell transplantation. **Int J Hematol.** 2013;97:109-16.

18) Chonabayashi K, Hishizawa M, Kawamata S, Nagai Y, Ohno T, Ishikawa T, Uchiyama T, Takaori-Kondo A. Direct binding of Grb2 has an important role in the development of myeloproliferative disease induced by ETV6/FLT3. **Leukemia.** In press.

19) Shinohara M, Io K, Shindo K, Matsui M, Sakamoto T, Tada K, Kobayashi M, Kadowaki N, Takaori-Kondo A. APOBEC3B can impair genomic stability by inducing base substitutions in genomic DNA in human cells. **Sci Rep.** 2012;2:806,1-8.

20) Kawabata H, Doisaki S, Okamoto A, Uchiyama T, Sakamoto S, Hama A, Hosoda K, Fujikura J, Kanno H, Fujii H, Tomosugi N, Nakao K, Kojima S, Takaori-Kondo A. A case of congenital dyserythropoietic anemia type 1 in a Japanese adult with a CDAN1 gene mutation and an inappropriately low serum hepcidin-25 level. **Intern Med.** 2012;51:917-20.

21) Shi L, Fujioka K, Sun J, Kinomura A, Inaba T, Ikura T, Ohtaki M, Yoshida M, Kodama Y, Livingston GK, Kamiya K, Tashiro S. A modified system for analyzing ionizing radiation-induced chromosome abnormalities. **Radiat Res.** 177: 533-538, 2012

22) Zhang X, Inukai T, Hirose K, Akahane K, Kuroda I, Honna-Oshiro H, Kagami K, Goi K, Nakamura K, Kobayashi M, Endo M, Yagita H, Kurosawa H, Look AT, Honda H, Inaba T, Nakazawa S, Sugita K. Oncogenic Fusion E2A-HLF Sensitizes t(17;19)-positive Acute Lymphoblastic Leukemia to TRAIL-Mediated Apoptosis by Upregulating the Expression of Death Receptors. **Leukemia** 26: 2483-2493, 2012

23) Li Q, Guo H, Matsui H, Honda H, Inaba T, Sundberg JP, Sprecher E, Uitto J. Mouse Samd9l is not a functional paralogue of the human SAMD9, the gene mutated in normophosphataemic familial tumoral calcinosis. **Exp. Dermatol.** 21: 535-561, 2012

24) Ozaki Y, Matsui H, Asou H, Nagamachi A, Aki D, Honda H, Yasunaga S, Takihara Y, Yamamoto T, Izumi S, Ohsugi M, Inaba T. Poly-ADP ribosylation of Miki by tankyrase-1 promotes centrosome maturation. **Mol. Cell** 47: 694-706, 2012

25) Nemoto A, Inukai T, Uno K, Kiyokawa N, Miyagawa Y, Takahashi K, Sato H, Akahane K, Hirose K, Honna-Oshiro H, Goi K, Kagami K, Nakazawa S, Fujimoto J, Inaba T, Sugita K. Diverse underlying proliferation response to growth factors in imatinib-treated Philadelphia chromosome -positive leukemias. **Leukemia Res.**

37: 93-101, 2013

26) Kobayashi Y, Matsui H, Kanai A, Tsumura M, Okada S, Miki M, Nakamura K, Kunishima S, Inaba T, Kobayashi M. Identification of integrin $\beta 3$ L718P mutation in a pedigree with autosomal dominant thrombocytopenia accompanied by anisocytosis. **Br J. Haematol** 160: 521-529, 2013

27) Shimura H, Mori N, Wang YH, Okada M, Motoji T. Aberrant methylation and decreased expression of the RIZ1 gene are frequent in adult acute lymphoblastic leukemia of T-cell phenotype. **Leuk Lymphoma.** 53(8): 1599-609, 2012.

28) Tsuji K, Wang YH, Takanashi M, Odajima T, Lee GA, Sugimori H, Motoji T. Overexpression of lung resistance-related protein and P-glycoprotein and response to induction chemotherapy in acute myelogenous leukemia. **Hematol Rep.** 4(3):e18, 2012.

29) Kojima M, Nishikii H, Takizawa J, Aoki S, Noguchi M, Chiba S, Ando K, Nakamura N. MYC rearrangements are useful for predicting outcomes following rituximab and chemotherapy: multi-center analysis of Japanese patients with diffuse large B-cell lymphoma. **Leuk Lymphoma,** in press

30) Kamada Y, Sakata-Yanagimoto M, Sanada M, Sato-Otsubo A, Enami T, Suzukawa K, Kurita N, Nishikii H, Yokoyama Y, Okoshi Y, Hasegawa Y, Ogawa S, Chiba S. Identification of unbalanced genome copy number abnormalities in patients with multiple myeloma by single-nucleotide polymorphism genotyping microarray analysis. **Int J Hematol** 96(4):492-500, 2012

31) Goyama S, Takeuchi K, Kanda Y, Nannya Y, Chiba S, Fukayama M, Kurokawa M. Post-transplant endothelial disorder after hematopoietic SCT: a blinded autopsy study. **Bone Marrow Transplant** 47(9):1243-1245, 2012

32) Yokoyama Y, Suzukawa K, Okoshi Y, Nanmoku T, Obara N, Enami T, Hasegawa Y, Chiba S. Nine years interval between first and second bone marrow transplantations and subsequent long-term survival—a case of acute myeloid leukemia with MLL-AF6 fusion gene. **Ann Hematol** 91(9):1491-1493, 2012

33) Sakata-Yanagimoto M, Chiba S. Notch2 and Immune Function. **Curr Top Microbiol Immunol** 360:151-161, 2012

34) Machino T, Okoshi Y, Miyake Y, Akatsuka Y, Chiba S. HLA-C matching status does not affect rituximab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity by allogeneic natural killer cells. **Immunol Invest** 41(8):831-846, 2012

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願中
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

II. 分担研究報告

網羅的シーケンス解析による MDS における新規標的遺伝子の探索

主任研究者 小川 誠司 東京大学医学部附属病院がんゲノクスプロジェクト特任准教授

研究要旨 MDS における新規変異遺伝子の探索を目的に、次世代シーケンス技術を活用した全エクソン・シーケンス解析を昨年度に引き続き行い、解析症例数は 49 症例となった。昨年度報告をした *U2AF1*, *SRSF2*, *SF3B1*, *ZRSR2* などの RNA スプライシングに関わる遺伝子群の変異に加え、*STAG2*, *RAD21*, *SMC3* などコヒーシン遺伝子および *SETBP1* 遺伝子変異が新規原因遺伝子として同定された。コヒーシン分子異常は骨髄系の造血器疾患に広く観察される共通の基盤となる異常と考えられた。一方、*SETBP1* 変異は、MDS から急性骨髄性白血病への移行に代表される病態の増悪に関与しており、変異例は予後不良である。本変異の有無は、造血幹細胞移植など積極的な治療の選択をする上で、有用な分子マーカーになると考えられた。

A. 研究目的

難治性疾患である骨髄異形成症候群 (MDS) の治療成績の向上には、MDS の分子病態に即した分子標的療法を含む治療戦略を構築することが重要である。大量並列型シーケンス技術の開発により、様々な遺伝性疾患ならびに腫瘍性疾患の原因遺伝子の同定に結びつく研究がなされている。昨年度までに行った 29 例の MDS 例に対する全エクソン・シーケンスによる網羅的な変異解析研究により、RNA スプライシングに関わる遺伝子群に高頻度かつ特徴的に変異が生じていることを明らかとした (Yoshida et al. Nature 2012)。一方で、観察される多くの遺伝子変異は多岐に渡り、多様な病態を含む MDS の解析には必ずしも十分な症例数とは言えない。そこで、本年度は症例数を更に増やし、新たな原因遺伝子の同定を目指した。

B. 研究方法

本研究目的に新規に収集された 20 例の MDS および MDS 関連疾患患者の骨髄細胞および正常細胞 (末梢血 T 細胞または口腔粘膜) よりゲノム DNA を抽出し、解析に用いた。全ゲノムの約 1% を占めるエクソン領域をアジレント社 SureSelect キットにより選択的に濃縮し、イルミナ社の高速シーケンサーを用いて配列決定を行った。本研究目的に独自に開発した解析プログラム Genomon を用いて、MDS 細胞特異的 (後天的) な変異を抽出し、deep シーケンスおよびサンガー・シーケンスにより変異の確認を行った。

(倫理面への配慮)

検討に用いた検体は、当該患者からインフォー

ムドコンセントを得たのちに連結可能匿名化を施して検討に用いた。当院の倫理委員会の承認済みである。

C. 結果

前年度までの 29 例に加え、計 49 例の MDS の全エクソン・シーケンスにより、MDS 細胞特異的な変異候補が同定され、456 個 (9.3 個/例) のタンパクの構造変化を伴う体細胞性変異が確認された。同定される変異の多くは、1 例のみで観察される変異であったが、複数の症例に観察される変異として *STAG2*, *RAD21*, *SMC3* などコヒーシン遺伝子および *SETBP1* 遺伝子変異が新たに同定された。コヒーシン遺伝子変異は、MDS の 10~15% に観察される他に、急性骨髄性白血病 (AML) 含め、骨髄系腫瘍にも広く観察をされた。一方、*SETBP1* 変異は、MDS の 5~10%前後と変異頻度は高くないが、MDS から AML への移行過程で獲得することが多く、本変異を有する症例の生命予後は不良であった。

D. 考察

網羅的な変異解析により、多数の遺伝子に体細胞変異が生じていることが明らかとなったが、その多くは分子病態への関与が少ない、いわゆる passenger 変異であると考えられる。本年度は、解析症例数を増やすことにより、複数の症例で観察される共通な遺伝子異常として、コヒーシン関連遺伝子および *SETBP1* 遺伝子変異を新たに同定した。

コヒーシンは姉妹染色体の分配において中心的な役割を担う分子群として知られている。近年、固形腫瘍細胞株で変異が報告をされ、染色

体異常を介した腫瘍化機序が示唆されていた。一方、今回、MDS など骨髄系疾患で観察された同変異例の多くは、正常核型症例であり、染色体異常を介さない分子病態の存在が示唆される。

SETBP1 は、遺伝性奇形症候群である Schinzel-Giedion 症候群の原因遺伝子として知られ、また同遺伝子の過剰発現が観察される AML 例は予後が不良であることが示されていた。今回、同定された変異は Schinzel-Giedion 症候群と同一の変異が体細胞変異として生じており、変異が生じることにより、ユビキチン化を介した同分子の分解が生じにくくなり、過剰発現と同様の効果を示していると考えられる。本変異は、MDS から AML への移行の過程で獲得しており、本変異を有する症例の生命予後は不良であった。造血幹細胞移植など積極的な治療法の選択における、有用な分子マーカーとなることが期待される。

E. 結論

次世代シーケンス技術を活用した全エクソン・シーケンスにより、MDS における新規標的遺伝子として、コヒーシン分子変異および *SETBP1* 変異を同定した。

本発見によりコヒーシン異常を介した、造血器疾患の新たな分子病態の解明が進むことが期待される。一方、*SETBP1* 変異は、臨床上有用な分子マーカーになり得ると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shiraishi Y, Sato Y, Chiba K, Okuno Y, Nagata Y, Yoshida K, Shiba N, Hayashi Y, Kume H, Homma Y, Sanada M, Ogawa S, Miyano S. An empirical Bayesian framework for somatic mutation detection from cancer genome sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2013 in press
- 2) Kon S, Minegishi N, Tanabe K, Watanabe T, Funaki T, Wong WF, Sakamoto D, Higuchi Y, Kiyonari H, Asano K, Iwakura Y, Fukumoto M, Osato M, Sanada M, Ogawa S, Nakamura T, Satake M. Smad1 deficiency perturbs receptor trafficking and predisposes mice to myelodysplasia. *J Clin Invest.* 2013;123(3):1123-37.
- 3) Kunishima S, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Muramatsu H, Chiba K, Tanaka H, Miyazaki K, Sakai M, Ohtake M, Kobayashi R, Iguchi A, Niimi G, Otsu M, Takahashi Y, Miyano S, Saito H, Kojima S, Ogawa S. ACTN1 Mutations Cause Congenital Macrothrombocytopenia. *Am J Hum Genet.* 2013 Mar;92(3):431-8.
- 4) Ogawa S. Splicing factor mutations in myelodysplasia. *Int J Hematol.* 2012

Oct;96(4):438-42.

5) Ohba R, Furuyama K, Yoshida K, Fujiwara T, Fukuhara N, Onishi Y, Manabe A, Ito E, Ozawa K, Kojima S, Ogawa S, Harigae H. Clinical and genetic characteristics of congenital sideroblastic anemia: comparison with myelodysplastic syndrome with ring sideroblast (MDS-RS). *Ann Hematol.* 2013 Jan;92(1):1-9.

6) Meggendorfer M, Roller A, Haferlach T, Eder C, Dicker F, Grossmann V, Kohlmann A, Alpermann T, Yoshida K, Ogawa S, Koeffler HP, Kern W, Haferlach C, Schnittger S. SRSF2 mutations in 275 cases with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Blood.* 2012 Oct ;120(15):3080-8.

7) Ueda T, Sanada M, Matsui H, Yamasaki N, Honda ZI, Shih LY, Mori H, Inaba T, Ogawa S, Honda H. EED mutants impair polycomb repressive complex 2 in myelodysplastic syndrome and related neoplasms. *Leukemia.* 2012 Dec;26(12):2557-60.

8) Takita J, Yoshida K, Sanada M, Nishimura R, Okubo J, Motomura A, Hiwatari M, Oki K, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Novel splicing-factor mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia.* 2012 Aug;26(8):1879-81.

2. 学会発表

1) Ogawa S. Pathway Mutations in the Splicing Machinery in Myeloid Neoplasms. Scientific program, 54th Annual meeting of American Society of Hematology

2) Kon A, Shih LY, Minamino M, Sanada M, Shiraishi Y, Nagata Y, Yoshida K, Okuno Y, Bando M, Ishikawa S, Sato-Otsubo A, Nagae G, Haferlach C, Nowak D, Sato Y, Alpermann T, Nagasaki M, Shimamura T, Tanaka H, Chiba K, Yamamoto R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Nakamaki T, Ishiyama K, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Chiba S, Mori H, Nakauchi H, Koeffler HP, Aburatani H, Haferlach T, Shirahige K, Miyano S, Ogawa S. Recurrent Mutations of Multiple Components of Cohesin Complex in Myeloid Neoplasms. 54th Annual meeting of American Society of Hematology

3) Nagata Y, Sanada M, Kon A, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Sato A, Mori H, Ishiyama K, Sakata M, Obara N, Nagasaki M, Miyawaki S, Chiba S, Miyano S, Yung S, Koeffler HP, Ogawa S. Rare Mutations of Splicing Machinery in MDS with Complex Karyotypes. 17th Congress of European Haematology Association

4) Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Okuno Y, Nagata Y, Kon A, Matsunawa M, Sato-Otsubo A, Sato Y, Nagasaki M, Obara N, Sakata-Yanagimoto

M, Ishiyama K, Mori H, Nowak D, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Koeffler HP, Shih LY, Chiba S, Miyano S, Ogawa S. Spectrum of Gene Mutations and their Intratumoral Structure in Myelodysplasia Revealed by High-Throughput Sequencing. 17th Congress of European Haematology Association

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特になし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

「MDSにおける末梢遊離DNAを用いた遺伝子変異及びエピジェネティクス異常解析」
に関する研究

分担研究者 直江 知樹 名古屋大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科学 教授

研究要旨

骨髄異形成症候群（MDS）の病状および治療効果の把握には、末梢血検査所見の他、骨髄穿刺が繰り返し必要となる。本研究においては、MDSにおけるゲノム・エピゲノム異常を低侵襲で簡便に、経時的に検討する方法として、末梢血遊離DNAを用いた解析法の確立を目的とした。末梢血遊離DNAの濃度の患者ごとの比較では、骨髄芽球数の多い症例において高い傾向が確認され、遊離DNAはより脆弱なMDS芽球由来である可能性が示唆された。また、*TET2*及び*SRSF2*の遺伝子変異を同時に持つMDS症例について、経時的に採取された骨髄細胞と血漿よりDNAを抽出し、変異遺伝子存在割合を半定量したところ、*TET2*変異においては血漿DNAにおいてより変異存在割合が高いことが確認された。一方、*SRSF2*変異については両DNAごとの差異は有意ではなかった。このことから、MDS患者における変異解析に末梢血遊離DNAが利用可能であることが示されたが、MDSクローンの中でもどの分画由来のDNAであるのかについては、今後の検討課題と考えられた。

A. 研究目的

MDS細胞におけるゲノム・エピゲノム異常を、簡便かつ低侵襲に経時的に観察することを可能とするため、末梢血血漿・血清中に存在する遊離DNAに着目し遺伝子解析法を確立する。

B. 研究方法

MDS患者より経時的に採取された血漿及び血清より遊離DNAを抽出し、DNA量を定量する。また、骨髄穿刺を同時に施行された検体については、骨髄中の細胞密度、芽球数と末梢血遊離DNA濃度との相関を検討する。

これらの検体を用いて、目的とする遺伝子部位をPCR法にて増幅した後、ダイレクトシーケンシング法やパイロシーケンシング法を用いて変異解析を行う。遺伝子変異解析を行う際に、特発性造血障害班MDS検体集積事業において施行されたSNPアレイ解析結果を参考にして、特定染色体のUPDが認められた症例については、候補遺伝子についての遺伝子変異解析を追加して施行する。

（倫理面への配慮）

検体採取とその保存、研究目的使用に関する同意を文書により取得した後に検討を行った。遺伝子解析を含む本研究内容は、当院倫理委員会にて承認を得ている。

C. 研究結果

様々な病型とIPSSリスクに分類される複数のMDS症例より血漿・血清を採取し、DNA濃度等

検討したところ、骨髄芽球数の多い症例において、末梢血遊離DNAの濃度が高い傾向が確認された。また、血漿と血清のDNA濃度の比較においては、血漿において濃度が高い傾向にあることが確認された。一方で正常人コントロールにおいては、全体のDNA量はMDS症例に比べて少ない傾向であったが、血漿に比べ血清のDNA濃度が高い傾向が確認された。MDS患者、正常コントロール検体いずれにおいても、ラダー状のDNAが確認され、塩基数の検討からヌクレオソーム構造を呈して血液中に存在することが推測された。

SNPアレイ解析にて4q UPDを認めた2症例について*TET2*遺伝子変異解析を施行したところ、2症例に変異が確認された。これらの症例は、*SRSF2*変異も同時に保持しており、これらの症例から経時的に得られた、血漿と骨髄の検体を用いて、2つの遺伝子変異の存在割合を確認した。1症例の骨髄検体においては、*TET2*遺伝子変異割合が病勢進行と共に増加する傾向が認められた。血漿DNAにおける解析では、比較的早い段階から、変異DNA割合がほぼ100%となっており、正常血球由来のDNAは検出されなかった。一方、*SRSF2*変異については、骨髄、血漿

DNAにおいて、一貫して同程度の存在割合であることが確認された。また、もう一症例においては、*TET2*変異、*SRSF2*変異共にほぼ全ての血球が保持する結果が得られた。

D. 考察

本研究により、MDSクローンにおける遺伝子変異を検出するために、末梢血遊離DNAを用いることが十分可能であることが確認され、経時的変化の定量解析にも有用であることが確認された。昨年度までの解析から、骨髄中のCD34+/CD38-を示す幹細胞分画における異常をより反映する傾向にあることが確認されている。しかし、複数の遺伝子変異を持つ症例において、それぞれの変異存在割合が互いに異なる症例も経験されたことから、遊離DNAが腫瘍細胞の中でも、どのサブクローン由来であるのかについて、今後の検討を進める必要があると考えられた。

また、遊離DNAの経時的検討は、治療効果の判定、ことに微小残存病変の解析において、骨髄穿刺施行の頻度を減らすことができる、極めて有用な代替検査法となる可能性が示唆された。更に、病状の異なる多数の患者から遊離DNAが量的、質的に安定して採取されることが確認できれば、将来対象遺伝子数をさらに増やして、既知の遺伝子変異を検出するターゲットシーケンスに用いることも可能となる可能性がある。この方法によって、骨髄穿刺を施行しない病状初期の患者における遺伝子変異解析も可能となることが予想される。今後症例数を増やした検討を行う必要があると考えられる。

E. 結論

血漿・血清遊離DNAを用いたMDSの遺伝子解析は、骨髄細胞における遺伝子異常をある程度反映し、低侵襲で簡便な検体採取、解析法となり得る。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tokunaga T, Shimada K, Yamamoto K, Chihara D, Ichihashi T, Oshima R, Tanimoto M, Iwasaki T, Isoda A, Sakai A, Kobayash

i H, Kitamura K, Matsue K, Taniwaki M, Tamashima S, Saburi Y, Masunari T, Naoe T, Nakamura S, Kinoshita T. Retrospective analysis of prognostic factors for angioimmunoblastic T-cell lymphoma: a multicenter cooperative study in Japan. **Blood**. 2012 Mar 22;119(12):2837-43

2. Sugimoto T, Tomita A, Abe A, Iriyama C, Kiyoi H, Naoe T. Chimeric antisense RNA derived from chromosomal translocation modulates target gene expression. **Haematologica**. 2012 Aug;97(8):1278-80.

3. Yasuda T, Hayakawa F, Kurahashi S, Sugimoto K, Minami Y, Tomita A, Naoe T. B cell receptor-ERK1/2 signal cancels PAX5-dependent repression of BLIMP1 through PAX5 phosphorylation: a mechanism of antigen-triggering plasma cell differentiation. **J Immunol**. 2012 Jun 15;188(12):6127-34.

4. Shimada K, Tomita A, Minami Y, Abe A, Hind CK, Kiyoi H, Cragg MS, Naoe T. CML cells expressing the TEL/MDS1/EV11 fusion are resistant to imatinib-induced apoptosis through inhibition of BAD, but are resensitized with ABT-737. **Exp Hematol**. 2012 Sep;40(9):724-737.

5. Naoe T, Kiyoi H. Genes mutations of acute myeloid leukemia in the genome era. **Int J Hematol**. 2013 Feb;97(2):165-74.

2. 学会発表

- 1) Kihara R, Naoe T, et al. Prognosis of AML patients registered to JALSG AM L201 study according to the ELN genetic risk classification. The American So

- ciety of Hematology 54th Annual Meeting. Dec 2012, Atlanta USA.
- 2) Murata M, Naoe T, et al. Leukaemia escape from HLA-specific T-lymphocyte pressure in a recipient of HLA one locus-mismatched BMT. The American Society of Hematology 54th Annual Meeting. Dec 2012, Atlanta USA.
 - 3) Nishida T, Naoe T, et al. Correlation of IL-6 with exhausted CMV-specific T cells after allogeneic stem cell transplantation. The American Society of Hematology 54th Annual Meeting. Dec 2012, Atlanta USA.
 - 4) Sakura T, Naoe T, et al. Outcome of Pediatric-Type Therapy for Philadelphia Chromosome-Negative Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) in Adolescents and Young Adults (AYA): A Study by the Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG ALL202-U study). The American Society of Hematology 54th Annual Meeting. Dec 2012, Atlanta USA.
 - 5) Tomita A, Naoe T, et al. Rituximab Sensitivity to De Novo DLBCL Cells Showing the Specific Phenotype of CD20 Protein Immunohistochemistry-Positive / Flow Cytometry-Negative: Analyses of Its Clinical Significances and the Molecular Mechanisms. The American Society of Hematology 54th Annual Meeting. Dec 2012, Atlanta USA.
 - 6) Iriyama C, Tomita A, Naoe T, et al. Usefulness of Peripheral Blood Circulating DNAs As an Alternative to DNA From Bone Marrow Cells to Detect CpG Global Methylation Status and Genetic Mutations in Patients with Myelodysplastic Syndromes. The American Society of Hematology 54th Annual Meeting. Dec 2012, Atlanta USA.
 - 7) Chisako Iriyama, Akihiro Tomita, Yasuhiro Suzuki, Mizuho Shirahata, Yoko Hibi, Kiyofumi Yamada, Hitoshi Kiyoi, Tomoki Naoe. Peripheral blood circulating DNAs to detect CpG global methylation and genetic mutations in MDS. 第72回日本血液学会総会、2012年10月、京都
 - 8) Takashi Tokunaga, Akihiro Tomita, Tatsuya Hirose, Keiki Sugimoto, Kazuyuki Shimada, Hitoshi Kiyoi, Tomohiro Kinoshita, Tomoki Naoe. CD20 IHC +/FCM- DLBCL - the molecular mechanisms and the clinical significances. 第72回日本血液学会総会、2012年10月、京都
- F. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)
1. 特許取得
該当無し。
 2. 実用新案登録
該当無し。
 3. その他
なし。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

不応性貧血の治癒率向上を目指した分子・免疫病態研究

自己免疫性骨髄不全における新たなクローン性造血の同定
研究分担者 中尾眞二 金沢大学医薬保健研究域医学系細胞移植学 教授

研究要旨： 再生不良性貧血（aplastic anemia; AA）における*PIG-A*変異および6pUPD(+)クローン以外の新たなクローン性造血を同定するため、免疫病態が濃厚なPNH型血球陽性AA3症例を対象として、顆粒球DNAの全エクソンシーケンシングを行った。3例に共通してみられる変異のうち、別のt(1;10)変異陽性AA例における10番染色体の切断点がSLIT1遺伝子内にあったことから、この遺伝子に注目した。96例のAAについて次世代シーケンサーによりSLIT1変異の有無を調べたところ、1例において体細胞、2例において胚細胞変異が確認された。SLIT1は、PHAで刺激したリンパ球の培養上清の存在下で、健常者由来CD34陽性細胞や、骨髄性白血病細胞株K562で発現が誘導され、これらの細胞にはそのレセプターであるRobo1が発現していた。また、K562の増殖はリコンビナントSlit1によって抑制され、この抑制は、shRNAによりRobo1発現を低下させたK562細胞では見られなかった。したがって、Slit1はautocrineまたはparacrineに造血幹細胞の増殖を抑制しており、SLIT1変異幹細胞は、野生型幹細胞に比べて増殖抑制がかからないため、優先的に造血に寄与するようになる可能性が示唆された。

A. 研究目的

再生不良性貧血（aplastic anemia; AA）は多クローン性造血に基づく良性の骨髄不全と考えられてきたが、実際には*PIG-A*変異クローン、6pUPD(+)クローン、del(13q)クローンなどの異常幹細胞によるクローン性造血がしばしば検出される。このうち、6pUPD(+)クローンは、造血幹細胞に特異的な細胞傷害性T細胞の攻撃を免れて増殖したと考えられるが、その他の変異クローンの増殖は、骨髄における何らかの免疫反応の結果、正常幹細胞よりも優先的に活性化された結果である可能性が高い。変異幹細胞によるクローン性造血を検出できれば、その変異幹細胞が優先的に活性化されるメカニズムを明らかにすることによって、骨髄不全を引き

起こしているサイトカインを同定できる可能性がある。

そこで、免疫病態が濃厚なPNH型血球陽性AA3症例を対象として、顆粒球DNAの全エクソンシーケンシングを行い、変異クローンの同定を試みた。

B. 研究方法

PNH型血球が陽性で、免疫抑制療法によって造血が回復したAA患者から同意を得て末梢血および口腔粘膜拭液を採取し、DNAを抽出後、全エクソンシーケンシングにより変異を検出した。実際の解析は広島大学原爆放射線医科学研究所ゲノム疾患治療研究部門松井啓隆准教授の研究室で行われた。ポリフェン解析により、3症例に共通して認められるエクソン変異