

【要約】

Somatic mutations in newly-diagnosed chronic myeloid
leukemia detected by whole-exome sequencing

(初発慢性骨髄性白血病症例における全エクソン
シーケンス法を用いた体細胞突然変異の解析)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学 専攻

(主任：横手 幸太郎 教授)

東ヶ崎 絵美

チロシンキナーゼ阻害薬 (Tyrosine kinase inhibitors; TKIs) の導入により、慢性骨髄性白血病 (Chronic myeloid leukemia; CML) の予後は劇的に改善した。2003 年に発表された、第一世代の TKI であるイマチニブに関する多施設共同大規模第三相試験である IRIS study では、イマチニブ投与群と、インターフェロンアルファおよび低用量シタラビンによる従来標準治療群を比較すると、奏効率・無増悪生存率共に大きな有意差をもってイマチニブ群で良好であった。

一方骨髄増殖性疾患 (Myeloproliferative neoplasms; MPNs) では、その発症要因としてチロシンキナーゼである *JAK2* の変異によって細胞増殖が促進されるという点で CML と類似している。近年 *JAK2* に加え *CALR* の変異も MPNs と関与していることが明らかになっているが、MPNs 168 症例に全ゲノム解析を行った 2013 年の報告では、*JAK2*・*CALR* に加えて *TET2* や *DNMT3A*、*ASXL1* などの複数の体細胞突然変異が同定された。また、MPNs の患者から採取した末梢血単核球細胞にコロニーアッセイを行い、得られた erythroid burst-forming unit に対して *JAK2* と *TET2* をシーケンスして変異の入った順番を推定した 2015 年の報告では、MPNs の 3 病型いずれかに関わらず、*TET2* の変異が先に入った症例では骨髄中に骨髄系前駆細胞の比率が高く、*JAK2* の変異が先に入った症例では巨核球・巨赤芽球系前駆細胞比率が高い傾向が認められた。これらの結果から、既知のドライバー変異に加えて体細胞突然変異の存在が疾患の phenotype に影響を与える可能性が示唆された。

しかし CML では *BCR-ABL1* 融合遺伝子が強力なドライバー変異となっているため、その他の体細胞突然変異に関する報告は少なく、特に多数例における全エクソン解析についてはまだ報告がない。一方で健常人においても *BCR-ABL1* が同定されたとの報告や、*Bcr-Abl1* のみを knock-in した mouse では CML を発症しないとの報告もあり、CML 発症の背景には *BCR-ABL1* に加えその他の要因が関与している可能性があるのではと考えた。

以上より、今回日本成人白血病治療共同研究グループ (Japan adult leukemia study group; JALSG) CML212 試験に登録された 初発慢性期の CML 症例の末梢血単核球 DNA を用いて全エクソン解析を行い、体細胞突然変異 (somatic mutation) を解析することを目的として検討を行った。JALSG CML212 試験は、第 2 世代 TKI であるニロチニブおよびダサチニブの無作為割り付けを行ってその治療効果を比較する多施設共同ランダム化前向き比較試験であり、初発時の末梢血単核球細胞および口腔粘膜細胞から DNA を抽出し、また分子学的大寛解 (major molecular response; MMR) を達成した際にも末梢血単核球細胞から DNA を抽出した。今回は 2013 年 4 月から 2014 年 1 月に診断された初期の 24 例を対象に解析を行った。

得られた DNA 検体について、HiSeq2000 を用いて全エクソン解析 (Whole-exome sequencing; WES) を行い、同定された single nucleotide variant; SNV を既報データまたは in house の Single Nucleotide Polymorphism; SNP データと比較して既知の SNP を除き、末梢血検体と口腔粘膜検体の変異アレル頻度を Fisher 検定して $p < 0.001$ 未満であ

るものを有意な変異として抽出した。抽出された変異は Sanger sequencing または deep sequencing で validation を行った。得られた WES のデータから、シーケンス領域のリード数と、ヘテロ接合性 SNPs のアリル頻度を比較してコピー数解析を行い、また変異が同定された遺伝子がどのような機能を有しているかについて Gene Ontology 解析を行った。更に MMR 達成時検体が得られた症例に対して、Hiseq 1500 を用いて特定の遺伝子変異に対する deep sequencing を行い、初発時検体と比較して MMR 達成による遺伝子変異の推移を解析した。

24 例の患者背景に関して、年齢の中央値は 55 歳、男性が 75%であった。Major *BCR-ABL1* の international scale の平均値は 57%であった。初発時の白血球平均値は 96,000/ μ L で、8.3%の症例が付加的染色体異常を有していた。合計で 184 の遺伝子に 190 箇所の変異を認め、1 症例あたりの変異数の中央値は 8 個であった。同定された 184 の遺伝子から、造血器腫瘍で報告の認められたもの、または複数症例で変異の認められた 27 遺伝子を中心に検討を行ったところ、特にエピジェネティック制御因子として知られる *ASXL1*・*TET2*・*TET3*に加え、*KDM1A* および *MSH6* の 5 遺伝子の変異を 5 症例に認めた。*ASXL1* の変異は 2 症例に認め、1 症例は nonsense、もう 1 症例は frame shift 変異と、両方ともに exon12 での機能喪失型変異を認めた。GO では細胞分裂またはシグナル伝達に関連する GO term に位置づけられる遺伝子が有意に変異していることが示唆された。

またコピー数解析では 2 症例に、両アリルが片親由来となる uniparental disomy (UPD)を認めた。このうち MMR 検体の得られた症例 17 に対して、3q 上の UPD が治療によりどう変化するかについて検討を行った。3q 上にある *IQCJ*・*ABCC5*・*C3orf37* および *PRR23A* の 4 遺伝子上にある hetero SNP に対して、Sanger sequencing で解析を行ったところ、発症時の末梢血単核球 DNA ではこれらの hetero SNP が homozygous に変化しており、MMR 達成時では再び hetero SNP に戻っていたことから、症例 17 の 3q UPD に関しては MMR 達成時に消失していたと考えられた。

更に MMR 達成時検体が得られた 3 症例に対して deep sequencing を施行したところ、*ASXL1*・*RUNX1* および *PRDM9* の変異は MMR 達成時には消失していた。

DNA のメチル化と CML の病態に関しては、マウスモデルにおいて *Bcr-Abl1* の発現により DNA メチル化が亢進し、DNA メチル化阻害剤が CML の発症を遅らせるとの報告があり、また TKI 治療抵抗性の症例においては、*BCR-ABL1* 以外の遺伝子でメチル化が見られ、予後と関連するという報告もあることから、エピジェネティック制御が CML の病態において重要な役割を担っている可能性が示唆される。MPN 症例においては *ASXL1* の変異が exon12 に集中しているとの報告が散見されているが、近年 CML においても 15%の症例で *ASXL1* の exon12 に変異が認められたとの報告がなされた。*ASXL1* の C 末端には PHD finger があり、転写制御やクロマチン修飾、およびヒストンのメチル化に関与しているが、*ASXL1* の exon12 における機能喪失型変異は PHD finger を含む C 末端の離断につながる可能性が報告されており、本解析で同定された

2 症例での *ASXL1* の機能喪失型変異も exon12 に認められ、1 症例においては MMR 到達後に変異が消失していたことから、これらの変異が CML における腫瘍化や病勢に何らかの関連をもつ可能性が考えられる。

KDM1A は主に H3K4me2 の脱メチル化を介して造血幹細胞の維持や分化に関わる遺伝子であり、前立腺がんや神経芽腫では *KDM1A* の発現が高いほど腫瘍細胞が未分化で予後が悪いとの報告がなされている。また *MLL-AF9* の白血病マウスでは、*KDM1A* は白血病幹細胞の維持に必要でありその分化やアポトーシスに抑制的に働くとの報告や、近年開発された *KDM1A* 阻害剤は AML のマウスモデルにおいて予後を改善するとの報告もあり、エピジェネティック制御因子としての *KDM1A* が白血病の維持に関与している可能性が示唆される。

今回コピー数解析で 2 症例に UPD を認めたが、41 症例の CML に対する SNP array では、29 症例で 65 領域の UPD を認め、複数の症例 UPD が認められた領域のシーケンスにて 6 症例で *ASXL1* の変異が同定されたとの報告がある。今回の解析では 1p および 3q に有意な変異は認めなかったが、1p 上には *NRAS*・*JAK1* が、3q 上には *BCL6*・*GATA2*・*TP63* が存在しており、Prader-Willi 症候群など一部の先天性疾患では、インプリンティング領域に UPD が起こることで、インプリンティング遺伝子の不活化による機能不全が発症に関与すると報告されていることから、UPD の存在は遺伝子の発現に影響を与える可能性が考えられる。

今回、初発慢性期 CML の体細胞突然変異における全エクソン解析では、エピジェネティック制御に関与する遺伝子変異が 21%に認められた。治療抵抗性や TKI 中止後の再発リスクなど、今後解析症例を重ね長期フォローアップを行うことで *BCR-ABL1* 以外の体細胞突然変異と予後予測との関連が期待されると考えられる。