

## &lt;特集「造血制御・造血器腫瘍研究の最前線」&gt;

## 骨髓異形成のゲノム遺伝子異常

堀池重夫

京都府立医科大学大学院医学研究科血液・腫瘍内科学\*

## Genomic and Genetic Aberrations in Myelodysplasia

Shigeo Horiike

*Department of Molecular Hematology and Oncology,  
Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science*

## 抄 録

骨髓異形成は造血幹細胞レベルでの腫瘍性疾患であり、「無効造血」と「前白血病状態」の二つの病態に集約される。症例の約60%に染色体異常が見出され、5番染色体長腕(5q)と7番染色体長腕(7q)の欠失が多い。これらの欠失部分から癌抑制遺伝子の単離が試みられてきたが、最近ようやく、5q-症候群がリボソームタンパク遺伝子群 *RPS14* 遺伝子のハプロ不全で発症しうることや、5q内のもう一つの欠失集中領域にも候補遺伝子が存在することが明らかにされた。7qからはヒストンメチル化酵素をコードする *EZH2* 遺伝子の機能喪失型の異常が本年になって見出された。

従来の染色体解析に加えてアレイ技術を導入することで、分裂像を介することなく、アレルの量的変化や片親由来性 disomy (UPD) を高精度に判定することが可能になった。UPD がヘテロ接合性の消失 (LOH) の指標となることを応用して、4q から *TET2*, 11q から *c-CBL*, 20q から *ASXL1* それぞれの変異が発見された。これらは、骨髓異形成よりもむしろ骨髓増殖性疾患に多いことから、骨髓異形成の「前白血病状態」を反映している可能性がある。臨床材料においては多くの遺伝学的変異がさまざまに組み合わせられて蓄積し、各症例ごとの「無効造血」を形成しているものと考えられる。

キーワード：骨髓異形成, 前白血病状態, 染色体欠失, 片親性ディソミー, ヘテロ接合性消失。

## Abstract

Myelodysplasia is a heterogenous group of clonal hematological disorders characterized by an apoptosis-related inappropriate hematopoiesis resulting in peripheral pancytopenias and a risk of progression to acute myeloid leukemia. Although patients with myelodysplasia show frequent chromosomal losses involving long arms of chromosome #5 (5q) and/or #7 (7q), molecular mechanisms underlying these losses has not been clarified for a few decades. New developments in the understanding of myelodysplasia include haploinsufficiency of the *RPS14* gene in 5q- syndrome and mutations of *EZH2* locating within the common deleted segments on chromosome 7q. Furthermore, recent progressions in comparative genome hybridization (CGH)- or single-nucleotide polymorphisms (SNP)- array technology have revealed several causative genetic alterations involving *TET2* (4q24), *c-CBL* (11q23) and *ASXL1* (20q11), which locate within minimally deleted or uniparental disomy (UPD) segments uncovered by

these array technology concomitant with conventional chromosomal banding technique. Since SNP-array analysis on myelodysplastic cells enables genome-wide identification of allelic imbalance without copy number changes (UPD), this technique is a powerful tool for the detection of genomic regions showing loss of heterozygosity (LOH).

**Key Words:** Myelodysplasia, Preleukemia, Chromosomal losses, Uniparental disomy, Loss of heterozygosity.

## 骨髄異形成とは

骨髄異形成 (myelodysplasia) は、造血幹細胞レベルでの異常細胞がクローン性に増殖する腫瘍性疾患であり、「無効造血」と「前白血病状態」の二つの病態に集約される。前者は骨髄造血細胞の病的なアポトーシスが形態学的な異形成として認識され、その結果、骨髄が正または過形成であるにもかかわらず末梢血では汎血球減少を呈する。後者は約三分の一の症例が急性骨髄性白血病 (AML) へと移行する事実表れる。骨髄異形成の診断には、骨髄細胞や末梢血の塗抹標本にみられる造血三系統の形態学的異形成と染色体所見が専ら用いられてきた。1982年に

骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndrome; MDS) の形態的な定義が提唱され、それを改定した WHO 分類 (2008年) に基づいて、いずれの病型にあたるのかを診断する<sup>1)2)</sup> (表1)。骨髄に占める幼弱芽球の比率が20%以上あれば急性白血病であり、MDSとの境界は明確に定義されているものの、染色体所見で急性白血病に特異的な相互転座が確認される場合には、そちらが優先されて白血病と診断する。また、芽球が20%以上に増加し急性白血病の範疇であると同時に形態学的な異形成像を伴う症例も、まれならず経験される。これらはMDS関連の急性白血病としてAMLの中でも予後不良な一病型として独立している<sup>2)</sup>。このように、骨髄異

表1 骨髄異形成症候群の新 WHO 分類 (2008)

WHO病型	略称	末梢血所見	骨髄所見
Refractory cytopenia with unilineage dysplasia	RCUD*	1ないし2系統に血球減少** 芽球なしが稀 (1%未満)	単一系統のみに10%以上の異形成 芽球5%未満、環状鉄芽球15%未満
Refractory anemia with ring sideroblasts	RARS	貧血 芽球なし	赤芽球異形成のみ 芽球5%未満、環状鉄芽球15%以上
Refractory cytopenia with multilineage dysplasia	RCMD	2系統以上の血球減少 芽球なしが稀、Auer小体なし 単球1,000/ $\mu$ l未満	2系統以上に10%以上の異形成 芽球5%未満、Auer小体なし 環状鉄芽球の比率は問わず
RA with excess blasts -1	RAEB-1	血球減少、芽球5%未満 Auer小体なし、単球1,000/ $\mu$ l未満	単一系統か多系統に異形成 芽球5~9%、Auer小体なし
RA with excess blasts -2	RAEB-2	血球減少、芽球5-19% Auer小体±***、単球1,000/ $\mu$ l未満	単一系統か多系統の異形成 芽球10~19%、Auer小体±
MDS-unclassified	MDS-U	血球減少、芽球まれ (1%以下**)	単一系統か多系統に10%未満の異形成 芽球5%未満
MDS associated with Isolated del(5q)	5q- synd	貧血、芽球なしが稀 (1%未満) 血小板数正常か増加	低分葉核を有する巨核球が正常か増加 芽球5%未満、Auer小体なし del(5q) 単独の染色体異常

\* ) 減少する血球系統によってrefractory anaemia(RA), refractory neutropenia(RN), refractory thrombocytopenia(RT)に分類

\*\* ) 3系統の血球減少を伴うRCUDならびに末梢血に1%の芽球を伴うRCUDとRCMDはMDS-Uに含まれる

\*\*\* ) 末梢血の芽球が5%未満かつ骨髄の芽球が10%未満であってもAuer小体を伴っていればRAEB-2に含まれる

形成はMDSとしてひとつの症候群に束ねられてはいるものの個々の症例の血液学的所見や病勢は極めて多彩であり、このことが分子病態の解明とそれに基づく治療戦略の確立を困難にしてきた。

本稿では、この骨髄異形成にみられる染色体欠失を中心に、急性白血病と対比させながらゲノム異常、分子病態に関わる研究の最近の進展について概説する。

### MDSの染色体所見

造血器腫瘍の染色体分析は、プレパラート上に分裂中期像を展開し、これに分染法で縞模様をつけることによって各染色体とそのバンドを識別する方法がとられてきた。白血病ではこの手法によって8;21転座、15;17転座、Ph転座、inv(16)など特定の病型に特異的な均衡型相互転座が見出され、転座切断点に局在する遺伝子どうしの融合が白血病発症に関与することが明らかにされている。慢性骨髄性白血病(CML)を例にとると、特徴的な微小染色体Ph<sup>1</sup>がフィラデルフィアで発見されたのが、分染法がまだ開発されていない1960年、その転座が9番と22番の相互転座であることが同定されたのが1973年、転座が9q34上のABLと22q11上のBCRの融合遺伝子を形成し、これに起因するチロシンキナーゼの活性化が主たる分子病態であることが解明されたのが1984年、そして1996年にはBCR-ABL融合タンパクに特異的なチロシンキナーゼ阻害剤イマチニブの開発にまで実を結ぶことになる。ゆっくりとではあるものの、着実にこの領域のトップをきるかたちで研究が進められてきたのは、造血細胞特有の検体の得やすさや培養しやすさに依るところが大きい。

従来の分裂中期細胞を用いた染色体分析では、MDSと診断される症例の約60%にクローン性の骨髄細胞異常核型が見出される。急性白血病に比較すると、染色体異常症例の頻度が低いこと、異常であっても正常細胞とのモザイクが多いこと、また均衡型転座は例外的で、不均衡型転座を含む染色体の欠失が多いことがMDSの特徴といえる。欠失は5番染色体長腕(5q-

と7番染色体の全体あるいは長腕(-7/7q-)に集中しており、自験例の集計ではそれぞれ染色体異常症例の31%、22%を占めていた<sup>3)</sup>。最も多数例のMDSを集積した欧州からの報告では、染色体所見が得られたMDS症例2072例中1080例(52.3%)でクローン性の異常が検出され、5q-が異常症例の30%、-7/7q-が21%と自験例と極めて類似した異常率であった<sup>4)</sup>。アルキル化剤投与後や放射線治療後に発症する治療関連性MDSでは、これらの染色体欠失の割合はさらに高くなることが知られている。

染色体分染法は、DNA鎖のG-C対とA-T対の比率が領域によって異なることを利用して染色体上に単色の縞模様(バンド)をつける手法である。大きさと長腕・単腕の比に加えて、特有のバンドパターンから各染色体を識別するが、構造異常をもつ染色体の各部分を識別するには習熟を必要とする。それでも同定不能な染色体の構造異常がまれならず経験され、その場合、確定的でなければ核型の記載に「?」を付したり、異常染色体の一部あるいは全部が同定できなければ、それぞれ「add」か「mar」の記号を使って不明であることを表現する。このような分染法の限界を補填し、より客観的な判定をすべくspectral karyotyping(SKY)法が開発された。ヒト全染色体を24種それぞれに識別可能な色調をつけるこの方法は、由来不明の異常染色体の染色体構成を同定するのに威力を発揮する。現在では、正確な染色体診断に必要な不可欠な手法の一つとして商業ベースでも実施されている。しかしながら、労力ゆえの解析細胞数制限や微細な異常を検出できない精度の限界もある。実際、分染法によって正常核型と判定されるMDS自験例にSKY法を応用しても新たな染色体異常を見出すことはなかったし、このことは同一染色体の腕内欠失ではSKYの色調変化を生じないことから予測された。

### MDSの遺伝子異常

一般に白血病の発症と進展に関わる染色体・遺伝子変異は、細胞の増殖優位性に働くclass I変異と分化障害に働くclass II変異に大別される。

Class I 変異は *FLT3*, *cKIT*, *cFMS*, *JAK2* などの受容体型チロシンキナーゼ遺伝子群とそれらの下流に位置するシグナル伝達系遺伝子群にあり, これらの変異による活性化が細胞の「増殖優位性」獲得に関与する. 一方, class II 変異は造血転写因子をコードする遺伝子群 *AML1*, *MLL*, *RARA*, *EVII*, *CEBPA*, *NPM1* などにみられ, 当該遺伝子を切断点とした染色体相互転座もしくは遺伝子の点突然変異や構造異常に伴う不活性化が造血細胞の「分化障害」をきたす<sup>5)</sup>. 概して, 急性白血病では診断時に I II 両 class の変異を獲得している症例が多い一方で, CML や真性多血症などの骨髄増殖性疾患では慢性期である限り class I 変異だけがみられることが多い. これに対し, 前白血病状態である MDS では class II 変異に伴う造血障害が先行し, その後の急性白血病への進展に際しては class I 変異に伴う増殖優位性が付加されるものと考えられる. 自験症例を対象とした染色体・遺伝子の時系列的解析でも, *TP53* や *AML1* 変異が診断早期から検出されるのに対し, *NRAS* や *FLT3* などの class I 変異は病型の進展や白血病への移行とともに出現する late event であると判断された<sup>6)</sup> (表 2).

## 分染法による染色体解析から アレイ解析へ

上述した分染法での限界に大きな進展をもたらしたのが, 一塩基多型 (SNPs) をアレイ上でゲノムワイドに解析して, 腫瘍細胞のハプロタイプを決定する SNP アレイである. CGH (comprehensive genomic hybridization) アレイで得られる情報が増幅や欠失などコピー数の量的な変化のみに限られるのに対し, アレルの不均衡, すなわち父親由来と母親由来のアレルの偏りについての情報も同時に得られるのが SNP アレイ応用の特徴といえる. その理論と仕組みの詳細は本稿の目的とするところではないが, 簡単には以下の手順で解析する. すなわち, ①各 SNP 座が含まれる 25 mer の合成オリゴヌクレオチドを完全一致プローブと各ミスマッチプローブに分けて, それぞれ予めアレイ上にアレンジしておく (250 K アレイでは 25 万個の SNP 座についてのプローブセットが 1 枚のアレイ上に配置されている). ②検体となるゲノム DNA 数百 ng を制限酵素で切断し, その断端に相補的な配列をもつアダプターを付加したのち, 単一プライマーで PCR 増幅する. ③その産物を標識し, アレイ上のプローブと分子雑種して, そ

表 2 骨髄異形成症候群の時系列的な染色体・遺伝子解析結果  
—京都府立医科大学 解析症例—

Genetic Event	incidence	event	Relation to karyotype	outcome	Publication
abnormal karyotype at diagnosis	60%	early	—	poor OS	(CANCER,1988) (Genes Ch & C,2001)
<i>TP53</i> mutation	12%	early	del 5/7	poor OS	(BLOOD, 1995)
microsatellite instability	20%	early	del 5/7	poor OS	(BLOOD, 1995) (LEUKEMIA, 1999)
<i>AML1-runt</i> mutation	5%	early	none	?	(Br J Haemat, 2004)
karyotypic evolution	30%	late	—	AML	(CANCER,1988)
<i>NRAS</i> mutation	10%	late	none	AML	(LEUKEMIA, 1994)
<i>FLT3</i> duplication	5%	late	none	AML	(LEUKEMIA, 1997)

のシグナルの強さを定量化することによって、各 SNP 座ごとの検体ゲノムの遺伝子型とコピー数を測定する。得られた結果の解析には PCR 効率やハイブリダイゼーション効率を考慮した巧みな補正アルゴリズムが必要ではあるものの、最終的には Y 染色体と動原体付近を除いたヒトゲノム全域にわたるコピー数の変動と SNP 座の遺伝子型が判定できる (<http://www.affymetrix.com>)。光学顕微鏡によるバンドレベルで判定してきた従来の細胞遺伝学的解析では、高精度分染像ができたとしても 10 メガベース (Mb) 未満の微小部分の増減は検出できなかった。SNP アレイ解析では、分裂像を介することなくヌクレオチドレベルの高精度にアレルの量的変化とその片親由来の有無を判定できるようになった。

ゲノム領域ごとのコピー数が高密度に評価できることに加えて、SNP アレイのもう一つの大きな特徴は、上述したように、コピー数が変化しないまま両アレルともに片親由来となっている現象 (uniparental disomy: UPD) が検出可能となったことである。これは、disomy を保っているにもかかわらず「SNP 多型のホモ接合性」が統計学的に有意な偏りをもってずっと連続している部分は、父親か母親由来いづれか片方のアレルが欠失したのちに残存アレルが倍化してコピー数が正常に復したものと考えられることを根拠としている。すなわち、腫瘍細胞で UPD が生じている領域は、コピー数正常のままヘテロ接合性の消失 (LOH) が生じていると考えることができる。1 Mb 以上にわたる UPD は、健康人にも一人当たり数箇所検出され、一般に 2~3 Mb を超える UPD 領域に LOH としての意義があるものと考えられてきた<sup>7)8)9)</sup>。しかしながら、より大きな領域の UPD が健康人にも見出され、特に日本人ではその領域が大きいとする報告もある<sup>7)</sup>。一方で、大きな UPD 領域に限ってしまうと小さな LOH 領域を偽陰性として見落とす可能性もあり、理想的には正常細胞と腫瘍細胞との結果の比較によって後天的な変化のみを抽出することを原則としている。

実際の MDS 症例 94 例に対して、ゲノムを 25

万か所に断片化する 250 K の SNP アレイを応用した報告では、分染法での染色体異常症例が 59%であったのに比較して、20%の UPD 検出例を含めて、異常率は 78%と確かに上昇する<sup>10)</sup>。また、高密度アレイを用いてもその異常検出率は上昇しないため、50 K アレイでスクリーニングして 250 K アレイで再確認する手法が実際的である<sup>8)</sup>。

費用の問題は別として、SNP アレイを用いた Array-karyotyping が<sup>5)</sup>、現在造血器腫瘍の臨床検査として標準利用されている分染法の代替となるには技術的に解決すべきいくつかの問題点がある。まず、理論上から明らかなようにゲノムの量的増減を伴わない全くの均衡型相互転座と Y 染色体欠失は検出できない。次に、正常クロソムの混入によって希釈された臨床検体でコピー数異常検出の感度が問題となる。個々の細胞を解析対象とする染色体や FISH 技術にこの点は劣る。そして、上述したように必ずしも検出される全ての UPD が後天的に獲得された異常ではなく、腫瘍特異的とはいいがたい。このため予後などの臨床像との相関を述べる場合の支障となりうる。このように、一般臨床への応用には今後の課題が残るものの、研究レベルでは染色体欠失に関わる分子病態の解明、とくに疾患に共通した UPD 領域からの疾患原因遺伝子の発見として明らかな成果をあげはじめた。

## 5 番染色体長腕欠失：del (5q)

5 番染色体長腕の欠失 del (5q) は MDS でもっとも高頻度に検出される染色体異常であり、染色体分染像から判定される欠失部分は、del (5) (q13q33) と del (5) (q13q31) の腕内欠失が多い。共通欠失領域 5q31 バンドにはサイトカイン自体やその受容体をコードする遺伝子が多数局在しており、その魅力的な領域から MDS の原因となる癌抑制遺伝子の単離が長年にわたって試みられてきた。しかしながら、両アレルともに機能喪失が証明された遺伝子は存在せず、血液学における大きななぞの一つに挙げられていた。こうした状況から進展をみたのは、5 番染色体欠失には 2 種類が存在し、それぞれを区

表3 骨髓異形成の染色体欠失・LOHと局在する遺伝子異常

location	gene	frequency in MDS	references
17p13	<i>TP53</i>	11% 12%	Wattel E et al. (Blood, 1994) Kaneko H et al. (Blood, 1995)
5q32	<i>RPS14</i>	?	Ebert BL et al. (Nature, 2008)
5q31.1	<i>CTNNA1</i>	?	Liu TX et al. (Nat Med, 2007)
5q31.1	<i>EGR1</i>	?	Joslin JM et al. (Blood, 2007)
7q36.1	<i>EZH2</i>	6%	Nikoloski G et al. (Nat Genet, 2010)
4q24	<i>TET2</i>	20% 26%	Delhommeau F et al. (New Engl J Med, 2009) Langemeijer SM et al. (Nat Genet, 2009)
11q23.3	<i>c-CBL</i>	? 9%	Dunbar AJ et al. (Cancer Res, 2008) Sanada M et al. (Nature, 2009)
20q11.1	<i>ASXL1</i>	11%	Gelsi-Boyer V et al. (Br J Haematol, 2009)
20q12	<i>L3MBTL1</i>	?	Perna F et al. (Blood, 2010)

別して解析することが端緒となった。

del(5q)を単独の染色体異常として示すMDSは、van den BergheやSokalらによって“5q-症候群”としてまとめられた<sup>11)</sup>(図1)。疾患特異的な染色体異常としては、未だフィラデルフィア染色体しか知られていなかった1974年のことである。女性の高齢者に多く、血液学的には

大球性貧血、血小板増多および非分葉核をもつ巨核球の出現などが特徴的で、安定した長い臨床経過をとり急性白血病になりにくいなどの特性から、MDSのなかでも悪性度の低い独立した一病型として認識されている。治療面では、今年になって日本でも上市されたレナリドマイドが著効することで、俄然注目を集めている症

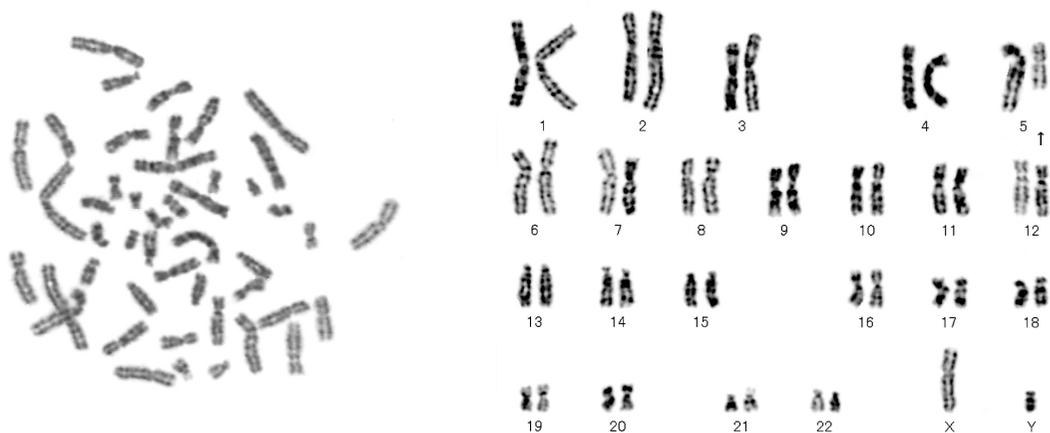


図1 5q-症候群の骨髓細胞から得た分裂像(左)と各染色体を並べた核板(右)。G分染法で5番染色体長腕の部分欠失が単独で見られる。

候群である。

この5q-症候群に限った染色体の共通欠失領域は、FISH法とphysical mapping法を用いて5q32バンド内の1.5Mbにまで狭小化されたものの、そこにはまだ40個の候補遺伝子が存在していた<sup>12)</sup>。2008年になってEbertらは、それら40遺伝子それぞれに対するRNA干渉法を用いてヒト造血前駆細胞の培養結果をスクリーニングしたところ、うち一つ*RPS14*遺伝子をノックダウンした場合のみ、5q-症候群特有の血液学的異常、すなわち巨核球分化障害を伴わない赤芽球の成熟障害が再現できることを報告した<sup>13)</sup>。さらに、患者骨髓細胞に*RPS14*を過剰発現すると赤血球分化が回復することも確認された。*RPS14*遺伝子は、80種あるヒトリボソームタンパクのひとつをコードしており、Diamond-Blackfan貧血(DBA)の家系分析から同定された先天性赤芽球形成不全の原因遺伝子*RPS*群と共通する。従来、癌抑制遺伝子の不活性化には、両アレルのホモ欠失や変異、あるいは片アレルの欠失(ヘミ欠失)に加えて残存アレルの

変異やepigeneticな修飾が必要とされてきた。これ以外に、両アレルがそろってはじめて正常な生理機能を発揮するような遺伝子では、ヘテロ変異やヘミ欠失だけで癌化に関与しうることがハプロ不全(haploinsufficiency)として知られており、リボソームタンパク遺伝子群のハプロ不全による赤芽球形成不全発症でも同様の機序と考えられる。

一方で、del(5q)単独異常ではなく、del(5q)に加えて他の異常を併せもつ症例は、5q-症候群とは対照的な臨床像を呈し、MDSのなかでもっとも予後不良な一群を構成する(図2)。複雑異常核型を示すMDS症例の半数以上に-5/del(5q)が含まれており、これらの症例に検出されるdel(5q)は、上述した*RPS14*よりセントロメア側に少し離れて共通欠失領域を有している。Liuらは、5q31.1上の共通欠失領域に局在する28遺伝子の発現スクリーニングから、 $\alpha$ カテニンをコードする遺伝子がdel(5q)造血幹細胞で特異的に発現低下していることを見出し、その本態は*CTNNA1*遺伝子のプロモーター領域のメチル化

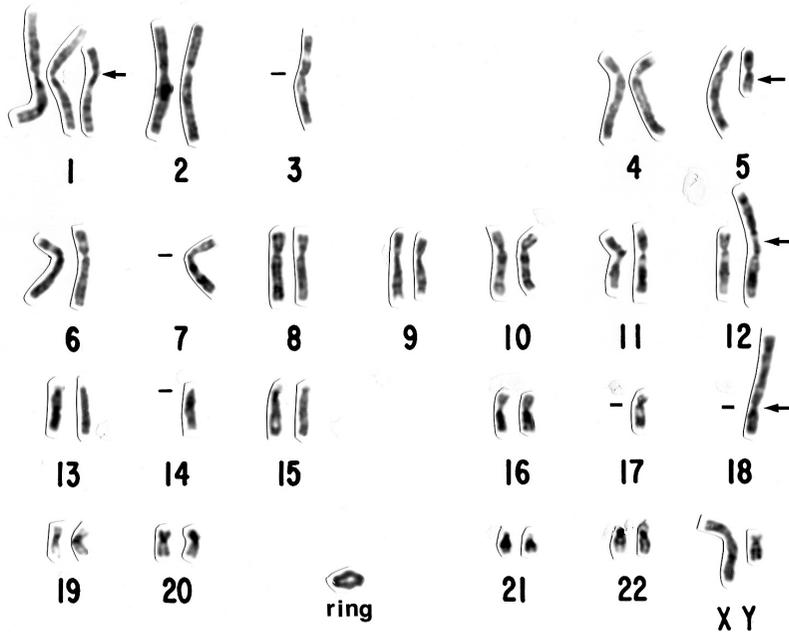


図2 芽球増多を伴う不応性貧血(RAEB)の一例でみられたモノソミー7とdel(5q)を含む複雑異常核型。ring染色体の染色体構成は、G分染法では同定できない。

とヒストンの脱アセチル化による発現抑制であることを報告した<sup>14)</sup>。これとは別に、種々の癌抑制遺伝子の転写を制御する *EGR1* 遺伝子も、この共通欠失領域に局在しており、その働きの重要性からMDS発症への関与が疑われていた。Joslinらはノックアウトマウス (*Egr1+/-*, *Egr1-/-*) へのニトロソウレア投与実験に基づいて、*EGR1* がハプロ不全によって骨髄異形成を発症する可能性を示唆した<sup>15)</sup>。

実際の5番染色体欠失症例では、そのほとんどで長腕の半分以上にわたる広範囲の腕内欠失を示し、数千もの遺伝子がヘミ欠失している状態にある。光学顕微鏡レベルでは同一バンドに局在する複数の遺伝子の欠失・不活化が複雑に組み合わさって、個々の症例の病態を多彩なものにしていると考えられる(表3)。

#### モノソミー7と7番染色体長腕欠失： -7/del(7q)

-7/del(7q)はdel(5q)に次いで多くみられる異常で、特に治療関連性MDSに限るともつとも高頻度に見られる染色体異常である。アルキル化剤投与歴や放射線治療歴と強い関連がみられることから、*de novo* 発症の症例でも-7/7qが検出される場合には、何らかの変異原への曝露が病因としてかかわっていることが想定されている。また、*p15<sup>INK4B</sup>* 遺伝子プロモーター領域のメチル化を示すMDS症例や*AML1* 変異症例に有意にdel(7q)が多いことや、モノソミー7のMDSでは*EVI* 遺伝子異常発現が高頻度に見られるなど、分子生物学的にもMDSのなかで特殊な一群を構成している。染色体バンドレベルで7q22と7q32-34が欠失することが多いが、それぞれからは病因となる遺伝子は未だ同定されてこなかった。

ごく最近、今年の7月になって、オランダのグループからdel(7q)に関する極めて興味深い所見が報告された<sup>16)</sup>。彼らは102例のMDS症例に対して、SNPアレイによる7q欠失部分とUPD領域との共通部分を染色体7q36.1内の130kbに絞り込んだ。正確には、染色体レベルで検出可能な-7/del(7q)をもつ13例のほかに、SNP

アレイでしか検出できない微細な欠失領域をもった例外的な一例が解析症例に含まれていた。幸運にもその130kbの欠失領域には2つの遺伝子しかなく、シーケンスの結果、*EZH2*の残存アリル上のフレームシフト変異を見出した。さらに解析症例を追加するとMDS126例中8例(6%)にフレームシフト以外にもミスセンス変異やプライス異常が検出され、欠失+変異、LOH+変異、あるいは両アリルの変異による*EZH2* 遺伝子の機能喪失型の異常が見出された。注目すべきは、この遺伝子がヒストンメチル化酵素をコードしていることであり、転写にかかわるepigeneticな変化がMDSの病態形成に関与する可能性が示唆され、今後の展開が期待される。

#### 4番染色体長腕欠失とTET2

染色体分析ではまれにしかみられないために、病型特異性がない非特異的異常とみなされていた染色体欠失ではあるものの、アレイ技術の併用によって新しい遺伝子異常の発見へとつながった成果が相次いでいる。その一つが4q24に局在する癌抑制遺伝子*TET2*である。

フランスINSERMのDelhommeauらは、少数例ながらAMLとMDSにおける4q24異常の重要性を指摘していた。その後、解析対象を骨髄増殖性疾患全体に拡大してCGHアレイとSNPアレイで検索した結果、4q24内にわずか325kbのみを欠失する一例が含まれていた。幸運にもその範囲には11のエクソンからなる150kbの*TET2* 遺伝子しか存在せず、塩基配列をスクリーニングしたところ、MDSでは111例中22例(20%)に変異を見出した。他の骨髄増殖性疾患と同様に、一部症例では両アリルに変異と欠失があり、彼らは癌抑制遺伝子としての意義を強調している<sup>17)</sup>。一方これとは別に、オランダのLangemeijerらは、SNPアレイを用いてMDS症例のゲノム変化をスクリーニングした結果、4q24内の共通欠失領域内に850kbの微小欠失を有する一例を見出した。その領域には*TET2* ともう一つの遺伝子しか含まないため残存アリル上の変異を検索したところ、やはり*TET2* におい

て終止コドンに変える後天的な一塩基置換が検出された<sup>18)</sup>。その症例は後に7q-と11qトリソミーの獲得とともにAMLに移行したという。変異解析の対象をMDS102例に拡大してスクリーニングすると、27例(26%)に*TET2*変異が検出され、MDSでこれまで検出された染色体欠失や遺伝子変異としては、最も高頻度な異常として注目される。一方、骨髄増殖性疾患においては急性白血病へ移行する際に付加する二次的な遺伝子変異とする報告もあるが<sup>19)</sup>、より早期から検出される症例も多く、その位置づけは未だ一定していない<sup>20)</sup>。

### 11番染色体長腕UPDと*c-CBL*変異

MDSや骨髄増殖性疾患をSNPアレイで解析すると、UPDが最も多く検出されるのが11番染色体長腕であり、11q23バンドに集中する<sup>21)22)</sup>。その頻度はMDSよりも慢性骨髄単球性白血病(CMML)に多いことから、骨髄異形成よりむしろ骨髄増殖性疾患に特異性が高いと考えられる。11q23領域にはシグナル伝達、細胞周期、アポトーシスに関わる遺伝子が集中して局在するなかで、がん抑制遺伝子*c-CBL*の異常が骨髄性腫瘍に関与することが見出された<sup>21)22)</sup>。正常*c-CBL*タンパクは、リン酸化された受容体チロシンキナーゼに結合してシグナル伝達促進的に働くと同時に、活性化されたチロシンキナーゼをユビキチン化することでその分解を促進し、結果的にシグナル伝達抑制的にも作用する。この*c-CBL*が変異することによって、癌抑制遺伝子としての機能消失をもたらすと同時に、細胞増殖を促進する機能獲得性の変異でもあることが明らか

にされた<sup>22)</sup>。こうした二面性はこれまで*TP53*遺伝子のみで報告されているが、同様の意義をもつ遺伝子変異は今後も見出されるものと思われる。

### おわりに

MDSの類縁疾患である骨髄増殖性疾患では、9p24に局在する*JAK2*遺伝子変異が極めて高頻度に見出され、*JAK-STAT*シグナル伝達系の活性化を介する細胞増殖能獲得による腫瘍発症機序が明らかにされている。それを補うかたちで上述した*TET2*と*c-CBL*、それに加えて*MPL*(1p34)、*ASXL1*(20q11)、*IDH1*(2q33)、*IDH2*(15q26)、*IKZF1*(7p12)など新規の遺伝子異常が次々と見出され、骨髄増殖性疾患の分子病態とその臨床像との関わりが明らかにされつつある<sup>20)</sup>。このうち、*ASXL1*変異はMDS症例における20qの欠失領域をCGHアレイで狭小化して見出された異常ではあるものの、その変異の頻度はMDS(11%)よりもCMML(43%)やAML(19%)に高い<sup>23)24)</sup>。おそらくは*TET2*や*c-CBL*と同様に、骨髄増殖性疾患の発症や進展に関連した遺伝子異常と考えられる。冒頭に述べた「前白血病状態」としての骨髄異形成では、これら骨髄増殖性疾患にみられる増殖能獲得性の異常が主たる分子病態であると予測される。一方で「無効造血」としての骨髄異形成の分子病態形成に、5q-症候群から見出されたリボソームタンパク遺伝子変異、あるいは7q-から検出されたヒストンメチル化酵素遺伝子の機能喪失がいかなる重要性をもつものか、今後の研究の進展が注目される。

## 文 献

- 1) Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1982; 51: 189-199.
- 2) Brunning RD, Porwit A, Orazi A, Baumann I, Germing U, Vardiman JW, Le Beau MM, Hellstrom-Lindberg E. Myelodysplastic syndromes/neoplasms, overview. In: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Eds: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, et al) IARC Press, Lyon, 2008; pp88-107.
- 3) Horiike S, Taniwaki M, Misawa S, Abe T.

- Chromosome abnormalities and karyotypic evolution in 83 patients with myelodysplastic syndrome and predictive value for prognosis. *Cancer* 1988; 62: 1129-1138.
- 4) Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Hildebrandt B, Kundgen A, Lübbert M, Kunzmann R, Giagounidis AA, Aul C, Trümper L, Krieger O, Stauder R, Müller TH, Wimazal F, Valent P, Fonatsch C, Steidl C. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* 2007; 110: 4385-4395.
  - 5) Kelly LM, Gilland DG. Genetics of myeloid leukemias. *Ann Rev Genomics Hum Genet* 2002; 3: 179-198.
  - 6) Horiike S, Misawa S, Kaneko H, et al. Distinct genetic involvement of the TP53 gene in therapy-related leukemia and myelodysplasia with chromosomal losses of Nos 5 and/or 7 and its possible relationship to replication error phenotype. *Leukemia* 1999; 13: 1235-1242.
  - 7) Gibson J, Morton NE, Collins A. Extended tracts of homozygosity in outbred human populations. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 789-795.
  - 8) Mohamedali A, Gäken J, Twine NA, Ingram W, Westwood N, Lea NC, Hayden J, Donaldson N, Aul C, Gattermann N, Giagounidis A, Germing U, List AF, Mufti GJ. Prevalence and prognostic significance of allelic imbalance by single-nucleotide polymorphism analysis in low-risk myelodysplastic syndromes. *Blood* 2007; 110: 3365-3373.
  - 9) Wang L, Fidler C, Nadig N, Giagounidis A, Della Porta MG, Malcovati L, Killick S, Gattermann N, Aul C, Boultonwood J, Wainscoat JS. Genome-wide analysis of copy number changes and loss of heterozygosity in myelodysplastic syndrome with del (5q) using high-density single nucleotide polymorphism arrays. *Haematologica* 2008; 93: 994-1000.
  - 10) Gondek LP, Tiu R, O'Keefe CL, Sekeres MA, Theil KS, Maciejewski JP. Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML. *Blood* 2008 ; 111: 1534-1542.
  - 11) Van den Berghe H, Cassiman JJ, David G, Fryns JP, Michaux JL, Sokal G. Distinct haematological disorder with deletion of long arm of no. 5 chromosome. *Nature* 1974; 251: 437-438.
  - 12) Boultonwood J, Fidler C, Strickson AJ, Watkins F, Gama S, Kearney L, Tosi S, Kasprzyk A, Cheng JF, Jaju RJ, Wainscoat JS. Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of the 5q- syndrome. *Blood* 2002; 99:4638-4641.
  - 13) Ebert BL, Pretz J, Bosco J, Chang CY, Tamayo P, Galili N, Raza A, Root DE, Attar E, Ellis SR, Golub TR. Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* 2008; 451: 335-339.
  - 14) Liu TX, Becker MW, Jelinek J, Wu WS, Deng M, Mikhalkovich N, Hsu K, Bloomfield CD, Stone RM, DeAngelo DJ, Galinsky IA, Issa JP, Clarke MF, Look AT. Chromosome 5q deletion and epigenetic suppression of the gene encoding alpha-catenin (CTNNA1) in myeloid cell transformation. *Nat Med* 2007; 13: 78-83.
  - 15) Joslin JM, Fernald AA, Tennant TR, Davis EM, Kogan SC, Anastasi J, Crispino JD, Le Beau MM. Haploinsufficiency of ERG1, a candidate gene in the del (5q), leads to the development of myeloid disorders. *Blood* 2007; 110: 719-726.
  - 16) Nikoloski G, Langemeijer SM, Kuiper RP, Knops R, Massop M, Tönnissen ER, van der Heijden A, Scheele TN, Vandenberghe P, de Witte T, van der Reijden BA, Jansen JH. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* 2010; 42: 665-667.
  - 17) Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Massé A, Kosmider O, Le Couedic JP, Robert F, Alberdi A, Lécluse Y, Plo I, Dreyfus FJ, Marzac C, Casadevall N, Lacombe C, Romana SP, Dessen P, Soulier J, Viguié F, Fontenay M, Vainchenker W, Bernard OA. Mutation in TET2 in Myeloid Cancers. *New Engl J Med* 2009; 306: 2289-2301.
  - 18) Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, Knops R, Aslanyan MG, Massop M, Stevens-Linders E, van Hoogen P, van Kessel AG, Raymakers RA, Kamping EJ, Verhoef GE, Verburgh E, Hagemeijer A, Vandenberghe P, de Witte T, van der Reijden BA, Jansen JH. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* 2009; 41: 838-843.
  - 19) Abdel-Wahab O, Manshouri T, Patel J, Harris K, Yao J, Hedvat C, Heguy A, Bueso-Ramos C, Kantarjian H, Levine RL, Verstovsek S. Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. *Cancer Res* 2010; 70:

- 447-452.
- 20) Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia* 2010; 24: 1128-1138.
- 21) Dunbar AJ, Gondek LP, O'Keefe CL, Makishima H, Rataul MS, Szpurka H, Sekeres MA, Wang XF, McDevitt MA, Maciejewski JP. 250K single nucleotide polymorphism array karyotyping identifies acquired uniparental disomy and homozygous mutations, including novel missense substitutions of c-Cbl, in myeloid malignancies. *Cancer Res* 2008; 68: 10349-10357.
- 22) Sanada M, Suzuki T, Shih LY, Otsu M, Kato M, Yamazaki S, Tamura A, Honda H, Sakata-Yanagimoto M, Kumano K, Oda H, Yamagata T, Takita J, Gotoh N, Nakazaki K, Kawamata N, Onodera M, Nobuyoshi M, Hayashi Y, Harada H, Kurokawa M, Chiba S, Mori H, Ozawa K, Omine M, Hirai H, Nakauchi H, Koeffler HP, Ogawa S. Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms. *Nature* 2009; 460: 904-908.
- 23) Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adélaïde J, Bonansea J, Cervera N, Carbuccion N, Lagarde A, Prebet T, Nezri M, Sainty D, Olschwang S, Xerri L, Chaffanet M, Mozziconacci MJ, Vey N, Birnbaum D. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2009; 145: 788-800.
- 24) Carbuccion N, Trouplin V, Gelsi-Boyer V, Murati A, Rocquain J, Adélaïde J, Olschwang S, Xerri L, Vey N, Chaffanet M, Birnbaum D, Mozziconacci MJ. Mutual exclusion of ASXL1 and NPM1 mutations in a series of acute myeloid leukemias *Leukemia* 2010; 24: 469-473.

## 著者プロフィール



## 堀池 重夫 Shigeo Horiike

所属・職：京都府立医科大学大学院医学研究科血液・腫瘍内科学・講師

略 歴：1981年3月 京都府立医科大学医学部卒業

1981年5月 京都府立医科大学第三内科

1984年4月～1988年3月 京都府立医科大学大学院医学研究科博士課程

1988年4月～1991年3月 京都府技術吏員 京都府立与謝の海病院内科

1991年4月 京都府立医科大学第三内科学助手

2001年7月～2002年1月 フランス国立ジェノタイプングセンター遺伝子  
単離部門招聘研究員

2002年1月 京都府立医科大学第三内科学助手

2003年4月～現職

専門分野：血液病学, 分子細胞遺伝学

- 主な業績：1. Aoki K, Tamai Y, Horiike S, Oshima M, Taketo MM. Colonic polyposis caused by mTOR-mediated chromosomal instability in Apc +/Delta716 Cdx2 +/- compound mutant mice. *Nat Genet* 2003; 35: 323-30.
2. Horiike S, Kita-Sasai Y, Nakao M, Taniwaki M. Configuration of the TP53 gene as an independent prognostic parameter of myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma* 2003; 44: 915-922.
3. Kita-Sasai Y, Horiike S, Misawa S, Kaneko H, Kobayashi M, Nakao M, Nakagawa H, Fujii H, Taniwaki M. International prognostic scoring system and TP53 mutations are independent prognostic indicators for patients with myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 2001; 115: 309-312.
4. Horiike S, Misawa S, Kaneko H, Sasai Y, Kobayashi M, Fujii H, Tanaka S, Yagita M, Abe T, Kashima K, Taniwaki M. Distinct genetic involvement of the TP53 gene in therapy-related leukemia and myelodysplasia with chromosomal losses of Nos 5 and/or 7 and its possible relationship to replication error phenotype. *Leukemia* 1999; 13: 1235-1242.
5. Horiike S, Yokota S, Nakao M, Iwai T, Sasai Y, Kaneko H, Taniwaki M, Kashima K, Fujii H, Abe T, Misawa S. Tandem duplications of the FLT3 receptor gene are associated with leukemic transformation of myelodysplasia. *Leukemia* 1997; 11: 1442-1446.
6. Kaneko H, Horiike S, Taniwaki M, Misawa S. Microsatellite instability is an early genetic event in myelodysplastic syndrome but is infrequent and not associated with TGF-beta receptor type II gene mutation. *Leukemia* 1996; 10: 1696-1699.
7. Kaneko H, Misawa S, Horiike S, Nakai H, Kashima K. TP53 mutations emerge at early phase of myelodysplastic syndrome and are associated with complex chromosomal abnormalities. *Blood* 1995; 85: 2189-93.
8. Horiike S, Misawa S, Nakai H, Kaneko H, Yokota S, Taniwaki M, Yamane Y, Inazawa J, Abe T, Kashima K. N-ras mutation and karyotypic evolution are closely associated with leukemic transformation in myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 1994; 8: 1331-1336.
9. Horiike S, Taniwaki M, Misawa S, Abe T. Chromosome abnormalities and karyotypic evolution in 83 patients with myelodysplastic syndrome and predictive value for prognosis. *Cancer* 1988; 62: 1129-1138.