

次世代シーケンサーで明らかにされた 白血病のゲノム異常は？

Answer

- 白血病は、増殖や分化に関与する遺伝子変異に加えて、DNA・ヒストンメチル化、クロマチン修飾などエピジェネティクス関連遺伝子変異、細胞分裂やRNAスプライシング関連遺伝子変異など多種類の遺伝子変異が蓄積し、協調して発症する。
- 白血病発症は、造血幹細胞が initiating 遺伝子変異を獲得して pre-leukemia クローンとなり、driver 遺伝子変異獲得後に founding クローンへ進展し、さらに passenger 遺伝子変異が加わり複数のサブクローンから構成される。
- 白血病再発には、化学療法後に残存した founding クローンが新たな遺伝子変異を獲得して再発する場合と、残存したサブクローンに遺伝子変異が加わり再発する場合とがある。

1 次世代シーケンサーによる全ゲノム解析

急性骨髄性白血病 (acute myelogenous leukemia: AML) に代表される造血器腫瘍の発症機構として、他の多くのがん腫と同様に、多種類の遺伝子変異が蓄積して発症する多段階発がんが提唱されてきた。白血病の発症において、これら蓄積される複数の遺伝子変異群のなかで、どの遺伝子変異がどのタイミングで、どのような順番で発現し、経過中その発現量がどのように変化して、その他の遺伝子変異群といかに協調・競合して、白血病発症に至るのか、そのダイナミックな過程を定性的・定量的に詳細に検討することは不可能であった。従来までは AML 発症に必要な遺伝子変異は、細胞増殖・生存を強化するクラス I 遺伝子変異と、細胞の分化を障害するクラス II 遺伝子変異の 2 種類に大別され、双方の遺伝子変異が AML 発症に必須であると考えられてきた。近年、次世代型高速・大量並行シーケンサーの登場により、1 塩基対レベルの分解能で大量迅速なゲノム解析が可能となった。さらに単なる塩基配列の決定のみならず、種々のオミックス解析とも密接に関連して、遺伝子発現量、RNA・microRNA シークエンス、スプライスバリエント、DNA メチル化、および蛋白と核酸の相互作用も測定することが可能である。次世代シーケンサーの導入により、白血病発症にはクラス I・II 遺伝子変異のみでなく、多種多様な遺伝子変異のプレイヤーが複雑に関与しており、その遺伝子変異の全体像が明らかにされつつある。

2 AML の遺伝子変異

大規模がんゲノムアトラス研究ネットワーク (The Cancer Genome Atlas: TCGA) により AML200 例の全ゲノムまたは全エクソンシーケンシスによる網羅的遺伝子解析が行われた^{1,2)}。

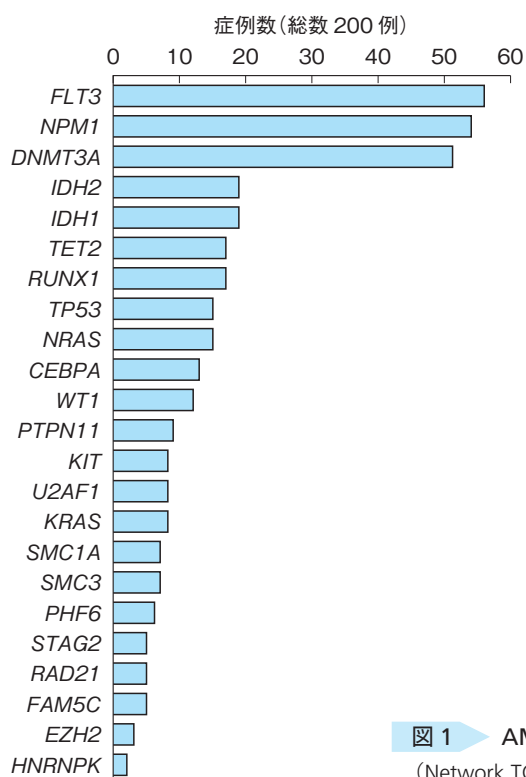


図1 AMLにおいて高頻度に検出される遺伝子変異
(Network TCGAR. N Engl J Med. 2013; 368: 2059-74)¹⁾

100種類以上の遺伝子変異が認められる肺がんや乳がんなどと比較して、AMLは最も遺伝子変異が少ないがん腫の1つであり、AMLゲノムの遺伝子変異数の平均は13種類と報告された。すなわち、de novo AML症例では他のがん腫と比較してゲノム不安定性の影響が少ないことが想定される。AML 200検体のいずれかで認められた遺伝子変異の総数は約1,600種類におよび、反復性変異のなかでの高頻度変異として23種の遺伝子変異が同定された(図1)。遺伝子変異はその機能などに基づいて、①転写因子融合18% (*PML-RARA*, *MYH11-CBFB*, *RUNX1-RUNX1T1* など)、②*NPM1* 遺伝子27%、③がん抑制遺伝子16% (*TP53*, *WT1* など)、④DNAメチル化関連44% (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1/2* など)、⑤シグナル伝達59% (*FLT3*, *KIT* など)、⑥骨髄球系転写因子22% (*RUNX1*, *CEBPA* など)、⑦クロマチン修飾30% (*MLL-PTD*, *ASXL1*, *EZH2* など)、⑧コヒーシン13%、⑨スプライソゾーム14%、の9種類に分類された。AML発症にはクラスIやIIに代表される増殖や分化に関与する遺伝子変異が主要と考えられていたが、エピジェネティクスや細胞分裂に関与する遺伝子変異も多く見出された(表1)。これらの遺伝子変異群は協調的または排他的に作用することでAML発症に関与することが明らかにされた。そのなかでも、*FLT3*, *NPM1*, *DNMT3A*は20%以上の頻度で遺伝子変異が認められ、高頻度に他の遺伝子変異と重複して存在しており、複数の遺伝子変異と協調してAML発症に深く関与している(図1)。

3 AMLのクローン変化

AML発症時のクローン進化について、Welchらが正常染色体のAML(M1)12例とAPL(M3)

12例において、全ゲノムシーケンス解析から以下の仮説が報告された³⁾。AMLの発症は、まず造血幹細胞レベルにおいてクラスII遺伝子変異 (*PML-RARA*, *RUNX1-RUNX1T1* など) や *NPM1* またはエピゲノムに關与する遺伝子変異 (*DNMT3A*, *IDH2*, *TET2* など) が initiating 変異として生じて initiating クローン、すなわち pre-leukemia クローンとなる。さらに *FLT3* や *RAS* など細胞増殖に關与する driver 変異を獲得して、クローンサイズを拡大させ、founding クローンとなり、さらに複数の passenger 変異が加わり、AML は初診時から複数のサブクローンで構成されることが明らかにされた (図2)。また Shlush らは、AML において *DNMT3A* と *IDH2* 変異について詳細な検討を行った。*DNMT3A* 変異は白血病芽球のみならず、低頻度ながら正常造血前駆細胞および T 細胞にも検出され、さらに寛解期にも *DNMT3A* 変異陽性の幹細胞が存在し、再発に寄与するク

表1 AMLにおける遺伝子変異の頻度

(Network TCGAR. N Engl J Med. 2013; 368: 2059-74)¹⁾

| 遺伝子 | 変異した遺伝子の機能分類 | 頻度 |
|----------------------|--------------|-----|
| <i>FLT3</i> | シグナル伝達 | 28% |
| <i>NPM1</i> | 細胞増殖の制御 | 27% |
| <i>DNMT3A</i> | DNA メチル化 | 26% |
| <i>IDH1/IDH2</i> | DNA メチル化 | 20% |
| <i>NRAS/KRAS</i> | シグナル伝達 | 12% |
| <i>RUNX1</i> | 転写因子 | 10% |
| <i>TET2</i> | DNA メチル化 | 8% |
| <i>TP53</i> | がん抑制遺伝子 | 8% |
| <i>CEBPA</i> | 転写因子 | 6% |
| <i>WT1</i> | がん抑制遺伝子 | 6% |
| <i>PTPN11</i> | シグナル伝達 | 4% |
| <i>KIT</i> | シグナル伝達 | 4% |
| Loss of 5 / del (5q) | 染色体欠失 | 8% |
| Loss of 7 / del (7q) | 染色体欠失 | 10% |
| 11q23 | クロマチン修飾 | 4% |
| t (15:17) | 転写因子キメラ | 9% |
| t (8:21) | 転写因子キメラ | 4% |
| Inv (16) | 転写因子キメラ | 6% |

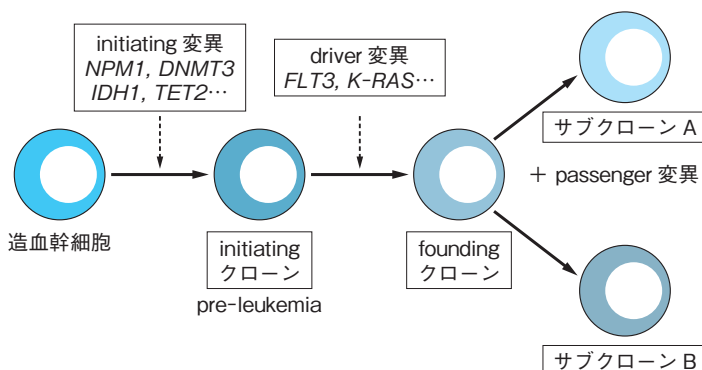


図2 AML 発症におけるクローン進展 (Welch JS, et al. Cell. 2012; 150: 264-78)³⁾

ローンサイズを拡大させることが示された。一方、*IDH2* 変異は白血病芽球と顆粒球前駆細胞のみに検出されたことから、*DNMT3A* 変異後に付加的に *IDH2* 変異が獲得されることが示唆された⁴⁾。このように pre-leukemia クローン成立にも重複する initiating 遺伝子変異のヒエラルキーが存在する可能性を示している。

4 AML 再発のクローン進展

AML 再発・抗がん剤抵抗性の原因として新たな遺伝子変異の獲得が一因であると想定されてきた。初診時と再発時の AML 検体を用いて質的かつ量的なゲノムシーケンスにより、遺伝子レベルでのクローン進展の推移が明らかにされた⁵⁾。化学療法後再発時に新たに獲得された多数の遺伝子変異のなかで反復して認める高頻度遺伝子変異として *WAC*, *SMC3*, *DIS3*, *DDX41*, *DAXX* などが同定された。また再発クローンの検討で、①初診時に大勢を占めていた founding クローンが化学療法後寛解時にも残存し、遺伝子変異を獲得して再発する、②初診時にマイナー集団であったサブクローンが化学療法後に残存して、新たな遺伝子変異を獲得して再発時の主要クローンとなる、2つの再発モデルが示された(図3)。これら全症例で founding クローンの遺伝子変異が残存しており、再発時に獲得される遺伝子変異は塩基転換の頻度が高いことが明らかにされ、抗がん剤による DNA 損傷の結果生じたクローン進展が AML 再発に関与することも併せて示された。

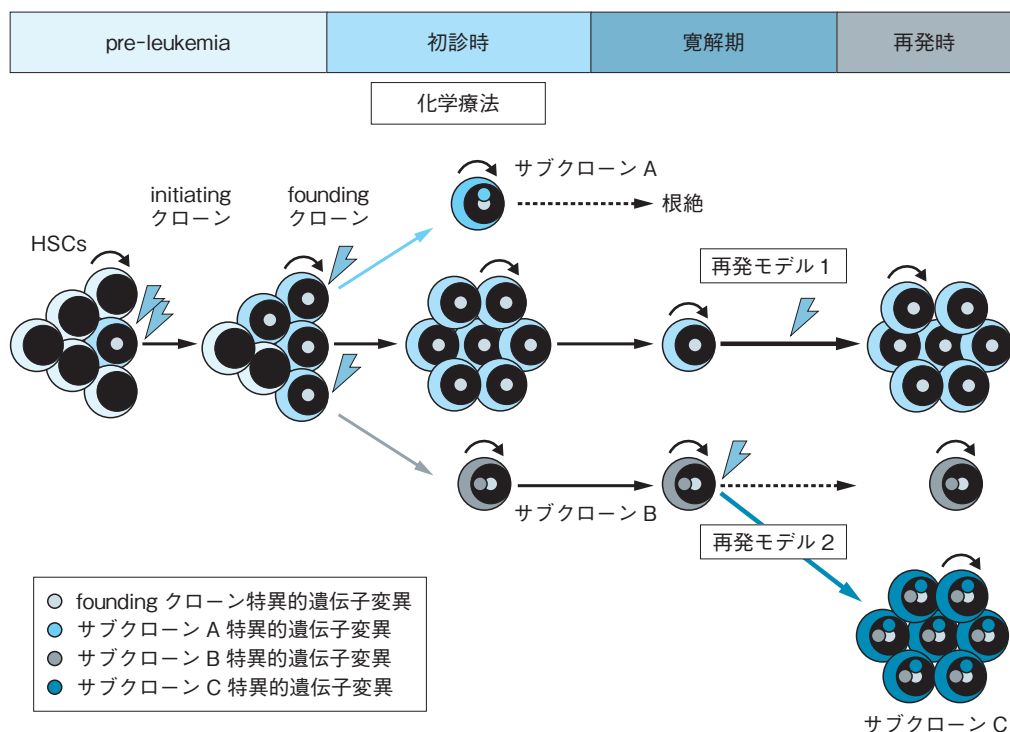


図3 AML 再発時のクローン進展 (Ding L, et al. Nature. 2012; 481: 506-10)⁵⁾

化学療法後に残存する founding クローンが主要な再発クローンとなる場合(再発モデル 1)と、少数のサブクローンが残存して新たな遺伝子変異を獲得して再発クローンになる場合(再発モデル 2)がある。

5 ゲノム情報に基づいた治療の層別化

AMLの予後予測に関して、従来は染色体異常と*FLT3*, *NPM1*, *CEBPA* 遺伝子変異の結果に基づき、寛解後の層別化治療が提唱されてきた (NCCN guidelines AML 2013 ver.2). 次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子解析の結果、新たに検出された遺伝子変異群 (*DNMT3A*, *IDH1/2*, *TET2*, *ASXL1* など) と従来の染色体・遺伝子変異とを組み合わせた解析により治療反応性や予後とが大きく異なることが明らかにされつつある⁶⁾. さらなる解析症例の蓄積と前方向視試験により、新たなリスク分類や個別化治療の可能性が検討されることが期待される。

■文献

- 1) Network TCGAR. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2013; 368: 2059-74.
- 2) Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature.* 2013; 502: 333-9.
- 3) Welch JS, Ley TJ, Link DC, et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell.* 2012; 150: 264-78.
- 4) Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature.* 2014; 506: 328-33.
- 5) Ding L, Ley TJ, Larson DE, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature.* 2012; 481: 506-10.
- 6) Patel JP, Gonen M, Figueroa ME, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2012; 366: 1079-89.

〈宮本敏浩〉