

造血器腫瘍におけるゲノム異常の網羅的解析

中崎 久美

目次

要旨	p.2
目的	p.3-5
方法	p.6-7
結果	p.8-11
考察	p.12-15
結論	p.16
謝辞	p.17
参考文献	p.18-26
図表	p.27-45

要旨

急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、悪性リンパ腫の230症例に対し、一塩基多型解析用オリゴヌクレオチドアレイを用いてゲノム網羅的な腫瘍細胞の遺伝子解析を行なった。リンパ系腫瘍における p16 欠失、REL 領域増幅等の微細なコピー数の増減が示されたのみならず、特にリンパ腫では Uniparental Disomy (UPD)を 74%と非常に高頻度に認めた。急性骨髄性白血病では UPD 領域にある CBL、p53、AML1、C/EBP α 遺伝子にホモ変異や塩基挿入、FLT3 internal tandem repeat を高頻度に認めた。この結果 UPD 領域内の標的遺伝子異常が腫瘍発症進展に関与している可能性が推測された。

目的

急性骨髄性白血病 (Acute myeloid leukemia, AML)、急性リンパ性白血病 (Acute lymphoblastic leukemia, ALL) や非ホジキン悪性リンパ腫 (non-Hodgkin lymphoma, NHL) などの造血器腫瘍においては、濾胞性リンパ腫 (Follicular Lymphoma, FL) の約 80% で認められる $t(14;18)(q32;q21)$ における Bcl2、マンテル細胞リンパ腫の約 70% で認められる $t(11;14)(q13;q32)$ における Bcl1 の様に、従来、病型特異的に認められる染色体転座の解析から多数の遺伝子異常が同定され、腫瘍の分子病態の解析が進んでいる。

一方、AML では $t(8;21)(q22;q22)$ の転座は約 6% に認められるものの、AML1/ETO を発現する遺伝子組み換えマウスでは腫瘍化は起こさない^{1, 2} など、染色体転座だけでは腫瘍化に至らないことが報告されている。マウスモデルでも示されるように、腫瘍の発症には染色体の転座に加え付加的な異常が必要である。

造血器腫瘍では、染色体の増幅・欠失など遺伝子の量的異常を伴う異常もしばしば観察されるが、これらの異常の標的遺伝子については、いまだ明らかにされていない部分が多い。近年染色体転座を伴わない正常核型の急性骨髄性白血病細胞においては、FLT3 遺伝子の internal tandem duplication (ITD)^{3, 4, 5}、C/EBP α 遺伝子変異^{3, 6, 7} など予後に関わる遺伝子異常も明らかにされてきたが、染色体転座を伴わない標的遺伝子や付加的異常は未だ十分に解明されてはいない。

これら癌を含めた疾患関連遺伝子を同定する為の手段として、近年ゲノムの網羅的な解析や遺伝子発現解析が注目されている⁸⁻¹⁷。例えば、complementary DNA microarray⁸を用いた遺伝子発現解析プロファイリングでは、びまん大細胞性リンパ腫 (Diffuse Large B-cell Lymphoma, DLBCL) を、Germinal centre B-like pattern と avctivated B-like pattern の亜分類にわけ、IPI (International Prognostic Index) と独立した予後予測因子であることが示された⁹。また、comparative genomic hybridization array (CGH array)^{10, 12}

による解析も進められてきており、予後との関係も示唆されている。44000 個のプローブを搭載した CGH array¹⁰を用いた AML100 例についての解析では、染色体分析で正常核型とされた 46 例中 27 例にゲノム異常があり、ゲノム異常の数により予後に有意差があることが報告された。

そこで、造血器腫瘍の異常を更に詳細に解明することを目的として、近年発達してきたゲノム網羅的な腫瘍細胞の遺伝子解析を行なうこととした。

Affymetrix® GeneChip® 100K/ 500K アレイ^{18, 19} は 12 万- 52 万個の single nucleotide polymorphism (SNP) 特異的プローブを用いて大規模 SNP タイピングを可能とする高密度オリゴヌクレオチドアレイであるが、シグナルデータの定量的性質を利用して、平均解像度 6-24kb、分解能 40bp で腫瘍ゲノムに生じるコピー数の変化を捉えることが可能である。当教室で開発された同アレイを用いた高精度コピー数解析システム(CNAG (Copy Number for GeneChip software)/ CNAGver2.0とAsCNAR (allele-specific copy-number analysis using anonymous references)アルゴリズム^{20, 21}を用いて、正常対照を持たない腫瘍細胞や正常・腫瘍細胞が混在する実際の臨床検体についても、染色体分析では同定不能と考えられる微細な増幅・欠失、アレル不均衡を含む多数のゲノムの異常が同定することが可能となっている^{22, 23}。これによりコピー数の増減を伴わない loss of heterozygosity (LOH) 領域すなわち染色体の片アレルが増幅、対側アレルが欠失している uniparental disomy (UPD) 領域の解析が可能になった^{24- 26}。

Prader-Willi Syndrome や Angelman syndrome など遺伝性疾患の一部では UPD を伴うものが認められる²⁷。この場合の UPD は減数分裂期の異常によるもので、正常では父方・母方の双方から相同染色体が 1 本ずつ遺伝されるところが、UPD では母方 (Prader-Willi Syndrome) もしくは父方 (Angelman syndrome) の片方のみから染色体 15 番長腕を 2 本の同じ染色体から遺伝している。しかし、このような減数分裂期の異常とは別に、近年、骨髄増殖性疾患における染色体 9 番短腕の LOH の解析から JAK2 が標的遺伝子と

して同定され、後天的な体細胞組み換えによって UPD が発生するというモデルについても提唱されている²⁸。また、AML でも、19 番長腕に UPD を持つ例で、同染色体上の遺伝子である C/EBP α 遺伝子にホモ変異が認められたことが報告⁶されており、UPD の解析は標的遺伝子候補の探索において重要であると考えられた。

これまでも当教室及び共同研究者のグループより、小児 ALL や小児神経芽腫について、GeneChip[®] アレイと CNAG、アレル別のコピー数解析について報告²⁹⁻³²した。本研究では、造血器腫瘍に伴う染色体転座を伴わない標的遺伝子や付加的遺伝子異常の同定を目的として、AML、ALL、NHL の臨床検体 230 例について、本システムを用いた解析を行なった。

方法

対象:本研究は東京大学医学部倫理委員会において承認された研究(承認番号948)である。NHL80症例は、1993年から2005年の間に東京大学医学部附属病院血液腫瘍内科で診断または治療された症例のリンパ節を含む腫瘍組織検体を用いており、2000年4月以降に診断、治療された症例については研究使用目的を説明の上同意書を得ている。AML 103症例、及び ALL 47症例については、2000年3月以前に採取された骨髄または末梢血検体を用い、連結不可能匿名化を行なった。

DNA抽出と SNP mapping assay:腫瘍組織のゲノム DNA を、新鮮凍結組織から PUREGENE™ DNA Purification Kit (Gentra®) を用いて抽出した。SNP mapping assay は、Affymetrix® GeneChip® 100K/500K アレイを用いて、Affymetrix® (Santa Clara, CA)^{18, 19} のプロトコールに従い行なった(図1)。このプロトコールでは、1検体あたり250ngのゲノムDNAを制限酵素で切断(100K: XbaIまたはHindIII、500K: NspIまたはStyI)し、アダプターを付加、これに相補的な primer を用いて PCR 増幅を行なった。PCR 産物を DNase I で断片化、terminal deoxynucleotidyl transferase を用いて ビオチン標識後、オリゴヌクレオチドアレイ上でハイブリダイゼーションを行ない、アレイをスキャンした。アレイ上には各 SNP 座について、2種類の多型 A、B をそれぞれ認識する特異的オリゴヌクレオチドプローブとこれにミスマッチ塩基を導入したプローブが合成されており、スキャンのシグナルパターンを Gene Chip Operation software (GCOS)、GeneChip® DNA Analysis software (GDAS) version3.0 (Affymetrix®) を用いて解析、これに基づいて GeneChip® Genotyping Analysis Software (GTYPE) を用いて、SNP をタイピングした。SNP タイピングが GTYPE により自動判定された割合、すなわち各 SNP の両アレルについて、多型 A、B がホモ接合性(AAまたはBB)、ヘテロ接合性(AB)を示すと判定することが可能であった割合を call rate と呼び、SNP タイピングの正確性の評価を行なった。

データ解析(ゲノムのコピー数解析):ゲノムのコピー数解析及び LOH 解析は、当研究室で開発されたソフトウェア CNAG/ CNAGver2.0、AsCNAR アルゴリズム^{20, 21}を用いた。この解析システムでは、SNP タイピングの際に検出したアレイの各 SNP のシグナル値を適切に補正し(図 1B)、シグナル比から Hidden Markov モデルに基づいてコピー数解析を行なった。さらに AsCNAR アルゴリズムでは、以下の様に自己正常対照のない腫瘍正常細胞混合検体についてもアレル別のコピー数解析を行なった。腫瘍細胞がホモ接合、正常細胞がヘテロ接合性を示す SNP では、腫瘍正常細胞混合検体はヘテロ接合性を示す場合があるが、このアルゴリズムでは、正常細胞におけるヘテロ接合性を示す SNP の多型 A、B シグナル比と、腫瘍細胞の A、B シグナル比との間に差が認められることから、自己正常対照のない腫瘍正常細胞混合検体についても多型を示す SNP について、非自己正常対照から各 SNP 別にヘテロの検体を選び、AB シグナル強度を比較することで、その SNP の部位のコピー数の増減をアレル別に判別した²¹(図 1C, D)。

統計解析:各疾患別の UPD の頻度について、2x2 分割表を用いてイエーツの補正をした χ^2 検定をし、ボンフェロニ補正を行なうことによって有意差の有無を検討した。AML の検体では、AML with multilineage dysplasia 例とそれ以外、及び初発例と再発例において同様に有意差の有無を検討した。また Diffuse Large B-cell Lymphoma (DLBCL)、Follicular Lymphoma (FL) については各染色体別に UPD の頻度に対し、同様に有意差の有無を検討した。

ゲノム DNA の Sequence:各文献で用いられた primer^{4, 6, 33} 及び primer3 により検索した primer を用いて、ゲノム DNA に対し各々の遺伝子について PCR を行ない(表 2)、3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems®) を用いて sequence を施行した。

結果

アレイ解析: AML 103 例、ALL 47 例、NHL 80 例の計 230 例の臨床検体(表 1)について、GeneChip® 100K/ 500K アレイ解析を行なった。SNP タイピングの call rate は 100K XbaI アレイ 94 例で $94.7 \pm 7.0\%$ (平均±標準偏差)、100K HindIII アレイ 34 例で $96.2 \pm 6.5\%$ 、500K NspI アレイ 81 例で $94.9 \pm 8.3\%$ 、500K StyI アレイ 21 例で $92.6 \pm 7.7\%$ であった。

アレイ解析結果例: 図 2 に AML の臨床検体 1 例(検体番号: W190483)の 500K NspI アレイによる解析結果を示した。染色体分析では、45 XX, del(5)(q21q34), -9 を示した例である。アレイによる解析では、5q14.3-33.1 の欠失、9p21.1-9q32 欠失の他、6p21.33 の 96kb の短い欠失、7p22.3-15.2、7q22.1-36.3 欠失、9q34.13-34.3 の増幅、11 番のコピー数の増減と UPD(11q13.1-11q22.2 の増幅、11q22.2-q23.3 の UPD、11q23.3-q24.1 のホモ欠失、11q24.1-q25 の増幅)、12p13.2-13.1 の欠失と 12p12.1 の 414kb の欠失、14q11.2 の 550kb の増幅、16q23.1 の 36kb の短い欠失と、染色体分析では検出されなかったコピー数変化が認められた。

コピー数解析: 全 230 例について同様の解析を行ない、各々の検体について染色体別にコピー数の増減や UPD の分布を解析し、疾患別にまとめた(図 3)。図 3 に示すように、NHL において、コピー数の増減がある検体、特に 1 検体中に複数の染色体でコピー数の増減が認められる検体が、AML、ALL の検体に比べ高頻度に認められた。

AML では、染色体分析結果が判明している 79 例中、正常核型が 27 例、t(15;17)(q22;q11~12) 転座が 9 例(複雑核型を伴うものを含めれば 11 例)、t(8; 21)(q22; q22)転座が 2 例(同 5 例)、inv(16)(p13; q22) が 4 例、複雑核型が 22 例であった。trisomy 8 は染色体分析結果が判明している 79 例中、複雑核型に含まれる 3 例のみであったが、本解析では AML103 例中 9 例(染色体分析結果が判明している 79 例中

では5例)に認められた。5-/5q-を伴う異常は染色体分析で4例であったが、アレイ解析の結果、6例に認められた。ALLでは1q増幅(8例)、7q34を含む欠失(9例)、8q増幅(8例)、9p21.3を含む欠失(14例)、17p欠失(6例)が高頻度に認められた。

NHL、特にFLではRELを含む2p15-16.1領域にNHL80症例中21例(25%)に増幅が認められ、共通増幅領域の大きさは1.29Mpであった。(図4B)。NHL及びALLのリンパ系腫瘍では127例中25例(19.7%)に9p21の欠失があり、この共通欠失領域56.6kbに含まれる遺伝子はp16(CDKN2A, INK4A)、p15(CDKN2B, INK4B)のみであった(図4A)。

NHLでは80例中、1q(26例、33%)、6p(17例、21%)、7番(21例、26%)、12番(21例、26%)、18番(27例、34%)に増幅領域、1p(22例、28%)、6q(20例、25%)に欠失が高頻度に認められた。中でもDLBCLとFLの比較では、前者で1q、3番、7番、11q、21番増幅、17q欠失、後者で18番増幅が高頻度であった(図5)。

UPDの解析:本研究ではアレル別のコピー数解析を行なった。これによってCGHアレイによるコピー数解析など従来では判定が難しかったUPDを検出することが可能となっており、特に正常細胞の混在率が高い検体や微細な領域のUPDを持つ検体において判定も可能であった。

NHLは80例中59例(74%)とUPDが特に高頻度に認められ、AML、ALLにおけるUPDの頻度と比較して有意差($p=3.3 \times 10^{-9}$ 、 $p=1.1 \times 10^{-5}$)を認めた(図6)。NHLの中では、DLBCLが41例中32例、FLは39例中27例にUPDを認め、有意差はないものの、DLBCLの方がFLよりも高頻度であった。AMLでは全103例中30例(29.1%)にUPDを認めた。UPDの頻度は、染色体分析による正常核型症例26例中で8例(31%)と頻度に差はなかった。同様にMDS由来例9例中4例、再発10例中4例であり、非MDS例、初発例と比べUPDの頻度に有意差は認めなかった。

疾患別のUPDの染色体分布:NHLにおいてUPDは1p(16例、20%)、1q(10例、13%)、6p(23例、29%)、9p(9例、11%)、16p(10例、10%)、17q(9例、11%)、19p(9例、11%)に高頻度に認められた(図7)。有意差は認めなかったものの、DLBCLとFLを比較すると、DLBCLでは1q、17q、FLでは12q、16pに高頻度であった(図8)。ALLではNHLに比べ全体の頻度は低いが、9p(4例、9%)にUPDを認めた他、4q、9q、13qで複数例にUPDを認めた。特にALLで9pにUPDを認めた4例中2例では、UPDの中に9p21領域の共通ホモ欠失を認めた(図9)。NHLにおいても同様に、9pにUPDがあり、9p21領域にホモ欠失がある例が2例で認められた。この4例の共通ホモ欠失領域は237kbであり、この部位に存在する遺伝子はp16、p15、C9orf53の3遺伝子のみであった。AMLでは、全103例中30例(29.1%)にUPDを認めた。中でも1p、7q、11p、11q、13q、17pが高頻度であった(図7、図10)。

AMLにおけるUPD中の標的遺伝子と変異解析:次にAMLでUPDが認められた検体について、UPDの領域内にあり、AML発症に関わることが知られている遺伝子について、変異の有無を調べた(表2、図10)。その結果、UPDの領域にある既知の標的遺伝子で高頻度に遺伝子変異が認められた。

13q領域内にUPDをもつ6例中、UPDの領域内にFLT3領域を含有する4例にのみFLT3ITDを認め、残りの2例にはITD、tyrosine kinase domain (TKD)のcodon 835/836の変異とも認めなかった(図11A)。11qでは4例中3例にCBLのホモ変異が認められた。2例はこれまでの報告^{34,35}と同様に、exon8(Ring Finger Domain)にアミノ酸置換を伴う変異があったが、1例はexon11にホモ変異が同定された(表3、図11B)。19qでは2例にUPDが認められ、2例共にC/EBP α に両アレルに塩基の挿入があり、1例では2つの部位に各々6塩基、3塩基の挿入、別の1例では9塩基の挿入を認めた(表3、図11C)。また17pにUPDが認められた2例では、2例(いずれもAML with multilineage dysplasiaで染色体分析では-7を含む複雑核型)ともにp53の変異を認めた。21qについても、UPDの領域内にAML1が含まれる1例に

については、AML1 の変異を認めた(表 3)。

考察

AML、ALL、NHL の造血器腫瘍 230 症例に対して、一塩基多型解析用オリゴヌクレオチドアレイと CNAG/CNAG ver2.0、AsCNAR を用いたゲノム網羅的なコピー数、LOH、UPD の解析を行なった。

500K NspI アレイを用いた AML 臨床検体の解析例(図 2)でも示されるように、本システムでは非常に詳細なコピー数の増減をゲノム全体に渡り、アレル別に解析することができた。

各疾患別にみた UPD をもつ検体の割合は、NHL は 80 例中 59 例(74%)と UPD が、AML、ALL と比べて有意に高頻度であった(図 6)。本研究の解析法では、UPD の検出は 20%以上であれば可能であるので²¹、骨髄または末梢血検体の芽球の割合は AML では $73.5 \pm 21.4\%$ (平均±標準偏差(%))、芽球の割合が判明している 92 例中)、ALL では $82.0 \pm 19.0\%$ (同 34 例中)であり(表 1)、NHL と AML、ALL の UPD の頻度の差は、検体中の腫瘍細胞の混在の為に AML、ALL の検体で本来存在する UPD を検出することができなかったのではなく、NHL の疾患特異性によるものと考えられた。

AML では 10K アレイを用いた解析²⁴により UPD の頻度は約 20%と報告、また MDS や secondary AML について 500K NspI アレイを用いた報告^{22, 25}では、94 例中の MDS 症例の 20%、33 例中の secondary AML 症例の 23%で UPD が報告されており、今回の解析結果では 29%とやや高頻度であった。UPD の染色体分布に関しても、報告されている 6p、8p の UPD は本研究では認めなかったものの、1p、4q、7q、9p、11p、11q、13q、19q、21q に認めよく一致した。CGH array による報告¹⁰との比較でも、8 番染色体の増幅、5 番、7 番、16 番、17p、18 番の欠失など共通した変化を認めた。

FL では 10K アレイを用いた解析³⁶で UPD の頻度は 83%と報告されており、本研究においても同様に NHL における UPD の頻度は 74%と高頻度であった。UPD の好発部位についても 6、9、12、17 番染色体と報告されており、本研究もこれと一致した。更に本研究では 1 番染色体にも高頻度に UPD が確認された。

またコピー数については、CGH array を用いた解析で 1q、2p、3 番、7 番、12 番、18 番染色体の増幅や 6q や 17p の欠失が報告¹²されているが、本研究でもこれと概ね一致した。REL 増幅の細胞腫瘍化における機序はまだ明らかにはされていないが、増幅が認められた頻度は、これまでの報告に比べ低かった³⁷。

ALL に関しては、本研究と同じ GeneChip® 100K/500K アレイを用いた小児 ALL^{23,32}の報告と比較し、1q や 8 番染色体増幅や p16 の欠失が高頻度に認められることは一致した。しかし、小児 ALL で報告²³された PAX5 を含む 9p13 領域を含む欠失は本研究においても認められたが、これらの欠失は 9p の広範囲を含んでおり、9p13 に限局するものではなかった。1q の増幅に関しても、1q の広範囲にわたる場合が多く、小児の報告³²の場合と異なり、増幅は PBX1(1q23)から開始されているわけではなかった。t(1;19)転座も小児 ALL では 25%と高率に認められることから、これは小児との差によるものと思われた。

また本研究で行なったアレル別コピー数解析では、微細なコピー数の増減だけではなく、コピー数の変化を伴わない LOH、UPD を詳細に検出することが可能であることが大きな利点である。AML では全体の 29%に UPD を認めており、これは約 20%というこれまでの報告^{24, 38}と比べてやや高頻度に検出された。腫瘍検体において UPD が高頻度に認められることから、UPD が疾患特異性に関わる因子となっていると考えられた。AML の同一症例について診断時と再発時の腫瘍検体 27 組を比較すると、11 例で再発時に、診断時には認めなかった新たな UPD が付加されていたという報告³⁹もある。

実際 AML では C/EBP α ^{6, 40}等 UPD に含まれる遺伝子の変異がこれまでも報告されている。本研究でも UPD 領域内に位置する AML 発症に関わる既知の遺伝子の変異解析を行なったところ、CBL、C/EBP α 、p53、AML1 に、高頻度にホモ変異が蓄積されていた。FLT3 に関しても、13q 領域内に UPD をもつ 6 例の内、UPD 領域の内部に FLT3 領域を含有する 4 例全例にのみ ITD を認め、13q でも FLT3 を含まない領域にのみ UPD のあった残りの 2 例は ITD、TKD codon835/836 の変異とも認めなかった(図

11A)。FLT3ITD が認められた 4 例中 3 例の PCR 産物では各々、Wild Type と同じ長さのバンドと ITD によるバンドの 2 本が存在するが、これは腫瘍細胞と正常細胞の混在によると推測された。

これら UPD 領域内に認める標的遺伝子の変異は、多数例を対象とした AML 正常核型の遺伝子異常の報告³の頻度と比較しても明らかに高頻度であった。特に CBL では exon11 にこれまで報告されていない部位のアミノ酸置換を伴うホモ変異が同定された^{34, 35}。また 9p21.3 領域に UPD をもつ ALL と NHL の検体 4 例に、p16 を含む 237kb の共通ホモ欠失領域が認められた。以上から UPD の領域に含まれる標的遺伝子の異常が腫瘍の発症進展に関与していることが推測された。

疾患に伴う UPD として、Prader-Willi Syndrome や Angelman Syndrome に 15q の UPD が挙げられる²⁷が、これは減数分裂の際に起きた UPD によるものと考えられる。また Beckwith-Wiedemann syndrome は heterogenous な疾患であるが、受精後に有糸分裂の際の体細胞組み換えにより UPD を起こした細胞が個体中でモザイクになる(正常細胞と、父方由来の 11p15 が UPD を起こしている細胞が混在する)場合があることが報告された。孤発例の 20%の症例に 11p15 を含む UPD が認められ、Wilms 腫瘍や肝芽腫を発症することがあると報告⁴¹⁻⁴³されている。

本研究で認めた造血器腫瘍に伴う UPD が起きる機序として、体細胞組み換えによるメカニズムが考えられる。そのメカニズムとして、(1)片側アレルの変異→(2)体細胞組み換えにより UPD が発生(変異アレルが両側になる)→(3)正常細胞や片側アレルのみの変異の細胞よりも増殖や生存に有利となり、細胞集団の中で選択される→(4) クローナルに増殖し、両側アレルの変異が細胞集団の中で固定化、腫瘍化するという過程が想定される(図 12)。

UPD の腫瘍化における病態はいくつかのメカニズムを含む³⁸と思われる。結果として、(1)骨髄増殖性疾患における JAK2 のように、遺伝子の活性化変異が蓄積される場合、(2)元々 germ line に疾患を起こしや

すい SNP を持つ minor allele 側が存在し、この minor allele がホモ接合を起こす場合、(3)遺伝子は父方・母方由来メチル化のパターンが異なり発現量が違うが、UPD を起こすことによって、どちらか一方のメチル化パターンだけになって、遺伝子の発現が増減する場合、(4) p16 のような癌抑制遺伝子がホモ欠失・ホモ変異を起こす場合などが考えられる。NHL では AML に比べ、更に多数の UPD 領域が認められるが、標的遺伝子が未同定のものである。また AML においても 1p、11p などの標的遺伝子の解明が不十分であり、今後の検討課題である。造血器腫瘍以外では、卵巣癌や肝細胞癌、大腸癌などの固形腫瘍についても腫瘍細胞に UPD が高頻度に存在することが報告⁴⁴⁻⁴⁸されている。1 検体中に複数の UPD を起こしている場合があり、染色体上に UPD を起こしやすくする変異が UPD 上の標的遺伝子とは別に存在する可能性も示唆され、UPD と腫瘍化の関連については、さらに検討が必要である。

結論

AML、ALL、NHL の造血器腫瘍 230 症例に対し、一塩基多型解析用オリゴヌクレオオリゴヌクレオチドアレイと CNAG/CNAGver2.0、AsCNAR を用いたゲノム網羅的な腫瘍細胞の遺伝子解析を行なった。リンパ系腫瘍における p16 欠失、REL 領域の増加など微小な領域のコピー数の変化を含め、ゲノム全体に渡り詳細なゲノムのコピー数の増減が示された。また本解析方法では正常対照組織を持たない腫瘍に対してもアレル別のコピー数解析、UPD の詳細な解析が可能であることが大きな特徴であり、特に悪性リンパ腫では 74% と非常に高頻度に認めた。AML では UPD の領域にある CBL、p53、AML1、C/EBP α 遺伝子にホモ変異や塩基の挿入、FLT3ITD を高頻度に認めた。UPD の領域に含まれる標的遺伝子のホモ変異が高頻度に蓄積していたことから、UPD 内の標的遺伝子の異常が腫瘍の発症進展に関与している可能性が推測された。

謝辞

本研究にあたり、御指導たまわりました、小川誠司先生をはじめ、真田昌先生、南谷泰仁先生、山本豪先生、半下石明先生、滝田順子先生、加藤元博先生、千葉滋先生、黒川峰夫先生の諸先生方に心より感謝申し上げます。また本研究で用いたコピー数解析システム(CNAG/ CNAGver2.0 と AsCNAR アルゴリズム)は、南谷泰仁先生、山本豪先生が開発なされたものです。重ねて御礼申し上げます。

参考文献

1. Rhoades KL, Hetherington CJ, Harakawa N, Yergeau DA, Zhou L, Liu LQ, Little MT, Tenen DG, Zhang DE. Analysis of the role of AML1-ETO in leukemogenesis, using an inducible transgenic mouse model. *Blood*. 2000; 96: 2108-15.
2. Yuan Y, Zhou L, Miyamoto T, Iwasaki H, Harakawa N, Hetherington CJ, Burel SA, Lagasse E, Weissman IL, Akashi K, Zhang DE. AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 10398-403.
3. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, Habdank M, Späth D, Morgan M, Benner A, Schlegelberger B, Heil G, Ganser A, Döhner H; German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2008; 358: 1909-18.
4. Stefan Fröhling, Richard F. Schlenk, Jochen Breitruck, Axel Benner, Sylvia Kreitmeier, Karen Tobis, Hartmut Döhner, and Konstanze Döhne. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood*. 2002; 100: 4372-4380.
5. Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C, Löffler H, Sauerland CM, Serve H, Büchner T, Haferlach T, Hiddemann W. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood*. 2002; 100: 59-66.

6. Snaddon J, Smith ML, Neat M, Cambal-Parrales M, Dixon-McIver A, Arch R, Amess JA, Rohatiner AZ, Lister TA, Fitzgibbon J. Mutations of CEBPA in acute myeloid leukemia FAB types M1 and M2. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003; 37: 72-8.
7. Pabst T, Mueller BU, Zhang P, Radomska HS, Narravula S, Schnittger S, Behre G, Hiddemann W, Tenen DG. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nat Genet*. 2001; 27: 263-70.
8. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 1995; 270(5235):467-70.
9. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J Jr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000; 403(6769):503-11.
10. Suela J, Alvarez S, Cifuentes F, Largo C, Ferreira BI, Blesa D, Ardanaz M, García R, Marquez JA, Odero MD, Calasanz MJ, Cigudosa JC. DNA profiling analysis of 100 consecutive de novo acute myeloid leukemia cases reveals patterns of genomic instability that affect all cytogenetic risk groups. *Leukemia*. 2007; 21(6):1224-31.
11. Silvia Bea, Andreas Zettl, George Wright, Itziar Salaverria, Philipp Jehn, Victor Moreno, Christof Burek, German Ott, Xavier Puig, Liming Yang, Armando Lopez-Guillermo, Wing C. Chan, Timothy C. Greiner, Dennis D. Weisenburger, James O. Armitage, Randy D. Gascoyne, Joseph M. Connors, Thomas M.

Grogan, Rita Braziel, Richard I. Fisher, Erlend B. Smeland, Stein Kvaloy, Harald Holte, Jan Delabie, Richard Simon, John Powell, Wyndham H. Wilson, Elaine S. Jaffe, Emili Montserrat, Hans-Konrad Muller-Hermelink, Louis M. Staudt, Elias Campo, and Andreas Rosenwald, for the Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood*. 2005; 106: 3183-90.

12. Weiyi Chen, Jane Houldsworth, Adam B. Olshen, Gouri Nanjangud, Seeta Chaganti, Ennapadem S. Venkatraman, Jeffrey Halaas, Julie Teruya-Feldstein, Andrew D. Zelenetz, and R. S. K. Chaganti. . Array comparative genomic hybridization reveals genomic copy number changes associated with outcome in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*, 2006; 107: 2477-85.

13. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, Gascoyne RD, Muller-Hermelink HK, Smeland EB, Giltane JM, Hurt EM, Zhao H, Averett L, Yang L, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Powell J, Duffey PL, Longo DL, Greiner TC, Weisenburger DD, Sanger WG, Dave BJ, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Montserrat E, López-Guillermo A, Grogan TM, Miller TP, LeBlanc M, Ott G, Kvaloy S, Delabie J, Holte H, Krajci P, Stokke T, Staudt LM; Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002; 346(25):1937-47.

14. Wright G, Tan B, Rosenwald A, Hurt EH, Wiestner A, Staudt LM. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(17):9991-6.

15. Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, Weng AP, Kutok JL, Aguiar RC, Gaasenbeek M, Angelo M, Reich M, Pinkus GS, Ray TS, Koval MA, Last KW, Norton A, Lister TA, Mesirov J, Neuberg DS, Lander ES, Aster JC, Golub TR. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med.* 2002 Jan;8(1):68-74.
16. Glas AM, Kersten MJ, Delahaye LJ, Witteveen AT, Kibbelaar RE, Velds A, Wessels LF, Joosten P, Kerkhoven RM, Bernards R, van Krieken JH, Kluin PM, van't Veer LJ, de Jong D. Gene expression profiling in follicular lymphoma to assess clinical aggressiveness and to guide the choice of treatment. *Blood.* 2005; 105(1):301-7.
17. Tagawa H, Suguro M, Tsuzuki S, Matsuo K, Karnan S, Ohshima K, Okamoto M, Morishima Y, Nakamura S, Seto M. Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2005; 106(5):1770-7.
18. Matsuzaki H, Loi H, Dong S, Tsai YY, Fang J, Law J, Di X, Liu WM, Yang G, Liu G, Huang J, Kennedy GC, Ryder TB, Marcus GA, Walsh PS, Shriver MD, Puck JM, Jones KW, Mei R. Parallel genotyping of over 10,000 SNPs using a one-primer assay on a high-density oligonucleotide array. *Genome Res.* 2004; 14(3):414-25.
19. Kennedy GC, Matsuzaki H, Dong S, Liu WM, Huang J, Liu G, Su X, Cao M, Chen W, Zhang J, Liu W, Yang G, Di X, Ryder T, He Z, Surti U, Phillips MS, Boyce-Jacino MT, Fodor SP, Jones KW. Large-scale genotyping of complex DNA. *Nat Biotechnol.* 2003; 21(10):1233-7.
20. Nannya Y, Sanada M, Nakazaki K, Hosoya N, Wang L, Hangaishi A, Kurokawa M, Chiba S, Bailey DK, Kennedy GC, Ogawa S. A robust algorithm for copy number detection using high-density

oligonucleotide single nucleotide polymorphism genotyping arrays. *Cancer Res.* 2005; 65: 6071-9.

21. Yamamoto G, Nannya Y, Kato M, Sanada M, Levine RL, Kawamata N, Hangaishi A, Kurokawa M, Chiba S, Gilliland DG, Koeffler HP, Ogawa S. Highly sensitive method for genomewide detection of allelic composition in nonpaired, primary tumor specimens by use of affymetrix single-nucleotide-polymorphism genotyping microarrays. *Am J Hum Genet.* 2007; 81: 114-26.

22. 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 ANL. *Blood.* 2008; 111: 1534-42.

23. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, Girtman K, Mathew S, Ma J, Pounds SB, Su X, Pui CH, Relling MV, Evans WE, Shurtleff SA, Downing JR. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukemia. *Nature.* 2007; 446: 758-64.

24. Raghavan M, Lillington DM, Skoulakis S, Debernardi S, Chaplin T, Foot NJ, Lister TA, Young BD. Genome-wide single nucleotide polymorphism analysis reveals frequent partial uniparental disomy due to somatic recombination in acute myeloid leukemias. *Cancer Res.* 2005; 65: 375-8.

25. Gondek LP, Dunbar AJ, Szpurka H, McDevitt MA, Maciejewski JP. SNP array karyotyping allows for the detection of uniparental disomy and cryptic chromosomal abnormalities in MDS/MPD-U and MPD. *PLoS ONE.* 2007; 2(11): e1225.

26. Dietmar Pfeifer, Milena Pantic, Ilona Skatulla, Justyna Rawluk, Clemens Kreutz, Uwe M. Martens, Paul Fisch, Jens Timmer, and Hendrik Veelken Genome-wide analysis of DNA copy number changes and LOH in CLL using high-density SNP arrays. *Blood.* 2007; 109: 1202-1210.

27. Horsthemke B, Wagstaff J. Mechanisms of imprinting of the Prader-Willi/Angelman region. *Am J Med Genet A*. 2008; 146A: 2041-52.
28. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. A Gain-of-Function Mutation of *JAK2* in Myeloproliferative Disorders. *N Engl J Med*. 2005; 352: 1779-1790.
29. Chen Y, Takita J, Choi YL, Kato M, Ohira M, Sanada M, Wang L, Soda M, Kikuchi A, Igarashi T, Nakagawara A, Hayashi Y, Mano H, Ogawa S. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature*. 2008; 455(7215): 971-4.
30. Lehmann S, Ogawa S, Raynaud SD, Sanada M, Nannya Y, Ticchioni M, Bastard C, Kawamata N, Koeffler HP. Molecular allelokaryotyping of early-stage, untreated chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2008; 112(6): 1296-305.
31. Hosoya N, Sanada M, Nannya Y, Nakazaki K, Wang L, Hangaishi A, Kurokawa M, Chiba S, Ogawa S. Genomewide screening of DNA copy number changes in chronic myelogenous leukemia with the use of high-resolution array-based comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006; 45(5): 482-94.
32. Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M, Kato M, Sanada M, Hemminki K, Yamatomo G, Nannya Y, Koehler R, Flohr T, Miller CW, Harbott J, Ludwig WD, Stanulla M, Schrappe M, Bartram CR, Koeffler HP. Molecular allelokaryotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemias by high-resolution single nucleotide polymorphism oligonucleotide genomic microarray. *Blood*. 2008; 111: 776-84.
33. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Koderu Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki

F, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Saito H, Ueda R, Ohno R, Naoe T. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*. 2001; 97: 2434-9.

34. Caligiuri MA, Briesewitz R, Yu J, Wang L, Wei M, Arnoczky KJ, Marburger TB, Wen J, Perrotti D, Bloomfield CD, Whitman SP. Novel c-CBL and CBL-b ubiquitin ligase mutations in human acute myeloid leukemia. *Blood*. 2007; 110: 1022-4.

35. Schmidt MH, Dikic I. The Cbl interactome and its functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005; 6: 907-18.

36. Fitzgibbon J, Iqbal S, Davies A, O'shea D, Carlotti E, Chaplin T, Matthews J, Raghavan M, Norton A, Lister TA, Young BD. Genome-wide detection of recurring sites of uniparental disomy in follicular and transformed follicular lymphoma. *Leukemia*. 2007; 21: 1514-20

37. Houldsworth J, Olshen AB, Cattoretti G, Donnelly GB, Teruya-Feldstein J, Qin J, Palanisamy N, Shen Y, Dyomina K, Petlakh M, Pan Q, Zelenetz AD, Dalla-Favera R, Chaganti RS. Relationship between REL amplification, REL function, and clinical and biologic features in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*. 2004; 103(5): 1862-8.

38. Maciejewski JP, Mufti GJ. Whole genome scanning as a cytogenetic tool in hematologic malignancies. *Blood*. 2008; 112: 965-74.

39. Raghavan M, Smith LL, Lillington DM, Chaplin T, Kakkas I, Molloy G, Chelala C, Cazier JB, Cavenagh JD, Fitzgibbon J, Lister TA, Young BD. Segmental uniparental disomy is a commonly acquired genetic event in relapsed acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008; 112(3): 814-21.

40. Fitzgibbon J, Smith LL, Raghavan M, Smith ML, Debernardi S, Skoulakis S, Lillington D, Lister TA, Young BD. Association between acquired uniparental disomy and homozygous gene mutation in acute myeloid leukemias. *Cancer Res.* 2005; 65: 9152-4.
41. Slatter RE, Elliott M, Welham K, Carrera M, Schofield PN, Barton DE, Maher ER. Mosaic uniparental disomy in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet.* 1994; 31: 749-53.
42. Smith AC, Shuman C, Chitayat D, Steele L, Ray PN, Bourgeois J, Weksberg R. Severe presentation of Beckwith-Wiedemann syndrome associated with high levels of constitutional paternal uniparental disomy for chromosome 11p15. *Am J Med Genet A.* 2007; 143A: 3010-5.
43. Scott RH, Douglas J, Baskcomb L, Huxter N, Barker K, Hanks S, Craft A, Gerrard M, Kohler JA, Levitt GA, Picton S, Pizer B, Ronghe MD, Williams D; Factors Associated with Childhood Tumours (FACT) Collaboration, Cook JA, Pujol P, Maher ER, Birch JM, Stiller CA, Pritchard-Jones K, Rahman. Constitutional 11p15 abnormalities, including heritable imprinting center mutations, cause nonsyndromic Wilms tumor. *N. Nat Genet.* 2008; 40: 1329-34.
44. Kurashina K, Yamashita Y, Ueno T, Koinuma K, Ohashi J, Horie H, Miyakura Y, Hamada T, Haruta H, Hatanaka H, Soda M, Choi YL, Takada S, Yasuda Y, Nagai H, Mano H. Chromosome copy number analysis in screening for prognosis-related genomic regions in colorectal carcinoma. *Cancer Sci.* 2008; 99: 1835-40.
45. Midorikawa Y, Yamamoto S, Ishikawa S, Kamimura N, Igarashi H, Sugimura H, Makuuchi M, Aburatani H. Molecular karyotyping of human hepatocellular carcinoma using single-nucleotide polymorphism arrays. *Oncogene* 2006; 25: 5581-5590

46. Mui-Teck Teh, Diana Blaydon, Tracy Chaplin, Nicola J. Foot, Spyros Skoulakis, Manoj Raghavan, Catherine A. Harwood, Charlotte M. Proby, Michael P. Philpott, Bryan D. Young and David P. Kelsell. Genomewide Single Nucleotide Polymorphism Microarray Mapping in Basal Cell Carcinomas Unveils Uniparental Disomy as a Key Somatic Event. *Cancer Research*, 2005; 65: 8597-8603
47. Andersen CL, Wiuf C, Kruhøffer M, Korsgaard M, Laurberg S, Ørntoft TF. Frequent occurrence of uniparental disomy in colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 2007; 28: 38-48.
48. Walsh CS, Ogawa S, Scoles DR, Miller CW, Kawamata N, Narod SA, Koeffler HP, Karlan BY. Genome-wide loss of heterozygosity and uniparental disomy in BRCA1/2-associated ovarian carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2008; 14:7645-51.

図表

		AML		ALL		NHL			
検体数		103		47		80	全体	DLBC	FL
						80	41	39	
検体採取時の 年齢の中央値 (最小-最大)		52 (16-87)		37 (16-8)		60 (24-85)	65 (24-85)	57 (39-75)	
病期	初発	84		初発	31	初発	68	33	35
	再発	10		再発	16	IPI			
	multilineage	9				Low/L-I		21	26
						H-I/High		12	9
						再発	12	8	4
型	初発・再発例 の FAB 分類 計(初発例/再発例)		核型分析		腫瘍の由来				
	M0	3(3/0)	t(8;21)	2	null	1			
	M1	9(9/0)	trisomy 8	0	混合	1			
	M2	36(30/6)	5q-/5	0	不明	1			
	M3	18(18/0)	monosomy 7	1					
	M4	4(3/1)	inv(16), t(16;16)	4					
	M4Eo	4(3/1)	t(9;22)	2					
	M5	15(13/2)	Complex aberrant	22					
	M6	4(4/0)	Other aberrations	12					
	M7	1(1/0)	Not Detected	24					
芽球(%)		73.5±21.4%			82.0±19.0%				
平均±標準偏差		(92 例)			(34 例)				

<表 1> 各疾患別の臨床情報

DLBCL: Diffuse Large B-cell Lymphoma, FL: Follicular Lymphoma, multilineage: Acute myeloid leukemia with multilineage dysplasia, IPI: International Prognostic Index, L-I: low-intermediate, H-I: High-Intermediate, 芽球:凍結保存された末梢血または骨髓液中の芽球の割合(芽球の割合が判明している検体数)

遺伝子		プライマー	アニーリング温度(度) 温度条件	DMSO 濃度	ベタイン 濃度
c-MPL	exon1	F GGGGCTGTATCTGACAGGAA	60		
		R CTCTTCCTGGGCATAGGTGA	#		
		2 F CCCTTCCACATAAACATGCCT	62		
		R GCAGGAAAGCTGCTGGAGT	#		
		3 F ATCCCAGGCAGTGAGAAGAA	56		
		R GTGCAGCGGAAAGAAGAGAC	#		
		4 F TCCAGAGGCTGAGCCATAGAC	62		
		R GGTCTGGAATCCCCAAAGT	#		
		5 F GGTTGGAGGCTCTCTCAGCT	62		
		R CTTTATCTCTCTCCCATCTCC	#		
		6 F CCTATACAGTAGGGGCACACG	60		
		R TGTGGCTCACTCCCATGACA	#		
		7 F GATGGGAAGCCTTGGGATTAG	60		
		R GGGAACATATGTGGAAGAAT	#		
		8 F CCTTGTGCACAGAAGGACTTA	62		
		R CCCCTGCGTAGTGAGGTCTG	#		
		9 F CGAAGCCCCGACGCCGGGCCA	62	5%	1M
		R CAGGCGCTGTGCGGCTTTGG	#		
		10 F AGGGGCGGGGCCAGAGTA	62		1M
		R AGAGGTGACGTGCAGGAA	#		
		11 F CTGCCAATCCACTGCCATG	62		1M
		R AGTACCAGGCAGGGTTGGTG	#		
		12 F TCCCACAGGATCTGCTTTAAT	62		1M
		R GAGTTTAGCTCTGTCCAGGGAAC	#		
JAK2 (V617F 変異)	exon14	F TGCTGAAAGTAGGAGAAAGTGC	62		
R CTGACACCTAGCTGTGATCCTG	#				
CBL	1	F CTTCACGCCCTGCTTCTCT	64	5%	1M
		R CCAGCACTTCTCCACCATCT	#		
		2 F TGGGGTTATGGATCTGCTTC	60		
		R TCAAATGTCAACTTTCCATTC	#		
		3 F CATCTTGTATGGTGAATTTGGTG	60		
		R AACCAAAGCCAGGAAATACATA	#		
		4 F GTGGCTCTCCTTCCTTTCCT	60		
		R CAGACAAAACCCCAAATGTT	#		
		5 F ATTGCCCTCTGAGTTGGTTG	60		
		R AACCTTGGCTATTGCGAAAC	#		
		6 F GCTGCAGTGAGCTGAGATTG	60		1M
		R TCCAGGACCTGAAGGTCAA	#		
		7 F CTACACCACGTTGCCCTTT	60		
		R TGGGTCTATTTAAGCTCCA	#		
		8 F AGGACCCAGACTAGATGCTTTC	60		
		R GGCCACCCCTGTATCAGTA	#		
		9 F CTGGCTTTTGGGGTTAGGTT	60		
		R TCGTTAAGTGTTTTACGGCTTT	#		

CBL	10	F	AACCTAGGTCTGGCCCATTT	60			
		R	GTGTGGGAGGTAAGTGGCAAT	#			
	11	F	TGCAGTTTTTGGATTCTTTGC	62	5%	1M	
		R	ACAGACATGAGCCACTGTGC	#			
	12	F	TTCATTTCCCTGGCTCTTTC	60			
		R	TGGGTTTTCTCAATTTTCTGC	#			
	13	F	AAGCTGCACCTTTGGTCAGT	60			
		R	AGCAGGTGAAGGGTGTCAAT	#			
	14	F	TGGCAAACGAGAAGATGAA	60		1M	
		R	ATGGTGGCACGTACCTGTAG	#			
	15	F	CTGCAGTGTGGTGCAGATT	60			
		R	CTTGGGACTTTCCTCCCATT	#			
	16	F	AAAACCCAGCCTTGTGACTG	60			
		R	GGAACCTCCTGCCCTTCTAGG	#			
	FLT3	exon14	F	GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC	62		
			R	CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC	#		
FLT3ITD	exon20	F	CCGCCAGGAACGTGCTTG	64			
		R	GCAGCCTCACATTGCCCC	#			
p53	5	F	TTCCTCTCCTGCAGTACTC	56			
		R	GCAAATTTCCCTCCACTCGG	#			
	6	F	ACCATGAGCGCTGCTCAGAT	56			
		R	AGTTGCAAACCAGACCTCAG	#			
	7	F	GTGTTGTCCTAGGTTGGC	62			
		R	CAAGTGGCTCCTGACCTGGA	#			
	8	F	CCTATCCTGAGTAGTGGTAA	56			
		R	CCAAGACTTAGTACCTGAAG	#			
C/EBP α	exon1	F	TCGCCATGCCGGGAGAACTCTAAC	62	5%		
		R	CCTGCTGCCGGCTGTGCTGGAAC	##			
	nt120-414*	F	CTTCAACGACGAGTTCCTGGCCGA	62	5%	1M	
		R	AGCTGCTTGGCTTCATCCTCCT	#			
	exon1	F	CCGCTGGTGATCAAGCAGGA	62	5%		
		R	CCGTAAGTTCGTTGCTGTTCT	##			
nt615-1004*	F	CAAGGCCAAGAAGTCGGTGGACA	62	5%			
	R	CACGGCTCGGGCAAGCCTCGAGAT	#				
AML1	exon3	F	AGCTGTTTGCAGGGTCTTAA	56			
		R	GTCCCTCCACCACCCTCT	#			
	4	F	CATTGCTATTCCTCTGCAACC	60			
		R	CCATGAAACGTGTTTCAAGC	#			
	5	F	CCACCAACCTCATTCTGTTT	56			
		R	AGACATGGTCCCTGAGTATA	#			
	6	F	AGCCCCAGTTTTAGGAAATCCAC	60		1M	
		R	GAGCATCAAGGGGAAACCCC	#			
	7	F	CCCACCCACTTTACATATAATTG	56			
		R	CCAGCTCAGCTGCAAAGAATGTG	#			
	exon8 5'側	F	TACTCACTCCGCTCCGTTT	62			
		R	GAGGCGCCGTAGTACAGGT	#			

exon8 3'側	F	CGCGCTACCACACCTACCT	62	5%	1M
	R	GCTTGTCGCGAACAGGAG	#		

*Y11525 に基づくヌクレオチド番号(Snaddon et al, 2003 改)

<表 2> ゲノムの direct PCR 及び Sequence の際に用いたプライマーと PCR の条件

プライマーの方向 F: 5'→3', R: 3'→5

<PCR の温度条件>

#94 度 2 分→(94 度 1 分→各々のアニーリング温度 30 秒→72 度 2 分)X35 サイクル→72 度 10 分

95 度 1 分→(95 度 1 分→62 度 30 秒→72 度 1 分)X40 サイクル→72 度 10 分

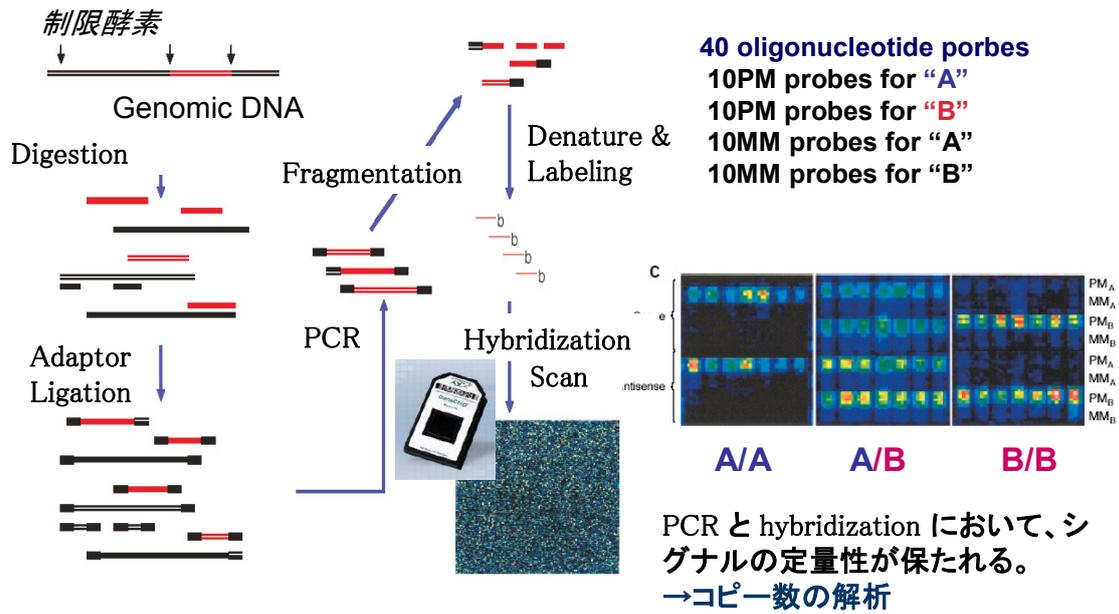
<反応液の組成> Taq、上記プライマーの他、Tris-HCL 10mM、KCL 50mM、MgCl₂ 1.5mM、各 100 μM dNTP と、各プライマーについて上記表の通り、DMSO またはベタインを加えている。

染色	検体	病期	病型	核型	UPD 部位	標的遺伝子候補	(*)	変異
1p	W150234	初発	M3	add(6)(q15),t(15;17)(q22;q11~12)	1p36.12-pter	c-MPL	×	WT
	W100145	再発	M5	46, XX	1p34.1-pter	c-MPL	○	WT
	W199558	再発	M4	del(12)(q14;q21)	1p36.31-pter	c-MPL	×	WT
9p	W163369	再発	M2	46, XX	9p21.1-pter	JAK2	○	WT
	W157831	初発	M2	不明	9p13.2-pter	JAK2	○	WT
11q	W190483	multilineage		del(5)(q21q34), -9	11q22.2-11q23.3	CBL	○	Y374N
	W170134	初発	M2	不明	11q12.3-qter	CBL	○	WT
	W132710	再発	M2	46, XY	11q13.2-qter	CBL	○	G638R
	W141209	初発	M2	不明	11q13.5-qter	CBL	○	Y374S
13q	W163322	初発	M5a	46, XY	13q 全長	FLT3	○	ITD(+)
	W187978	初発	M2	del(20)(q11)	13q 全長	FLT3	○	ITD(+)
	W123820	初発	M1	46, XX	13q 全長	FLT3	○	ITD(+)
	W190277	初発	M6	不明	13q33.3-13q34	FLT3	×	ITD(-),TKD(-)
	W133811	初発	M4	不明	13q 全長	FLT3	○	ITD(+)
	W130461	初発	M1	不明	13q21.32-13q21.33	FLT3	×	ITD(-),TKD(-)
17p	W152126	multilineage		5q-, -7 を含む複雑核型	17p 全長	p53	○	C273R
	W135661	multilineage		-7 を含む複雑核型	17p12-pter	p53	○	C275Y
19q	W190397	初発	M5a	inv(9)(q22q11)	19q 全長	C/EBP α	○	ins197HP, ins314K
	W157831	初発	M2	不明	19q 全長	C/EBP α	○	ins318MEL
21q	W152242	初発	M5	不明	21q 全長	AML1	○	exon7 受容部位の変異
	W171228	初発	M2	5q-, -7 を含む複雑核型	21q22.12-q22.13	AML1	×	WT

<表 3> UPD を持つ染色体別の標的遺伝子と mutation 解析

multilineage: Acute myeloid leukemia with multilineage dysplasia、(*)：標的遺伝子候補が UPD 領域に含有されているか、○：含有される、×：含有されない、WT: Wild Type、ITD (+): FLT3 internal tandem repeat (ITD) が認められる、ITD(-): FLT3 ITD が認められない、TKD(-): tyrosine kinase domain codon 835/836 の変異が認められない、ins: insertion

A. Affymetrix® GeneChip® 100K/ 500K mapping アレイのプロトコール



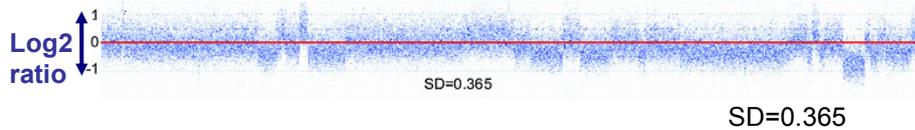
B. CNAG におけるシグナル比のバラツキの補正

各SNPに対し、シグナル比を求める

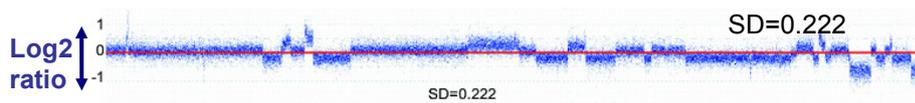
$$\log_2 \frac{\sum (PA + PB)_{tumor}}{\sum (PA + PB)_{ref}}$$

← 腫瘍検体のシグナルの和
 ← 正常対照検体のシグナルの和

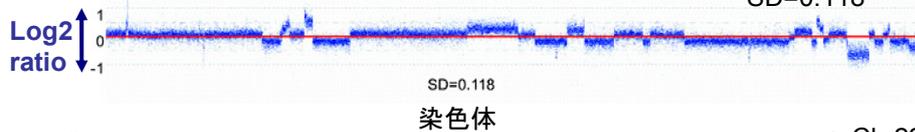
シグナル比の補正
 補正前



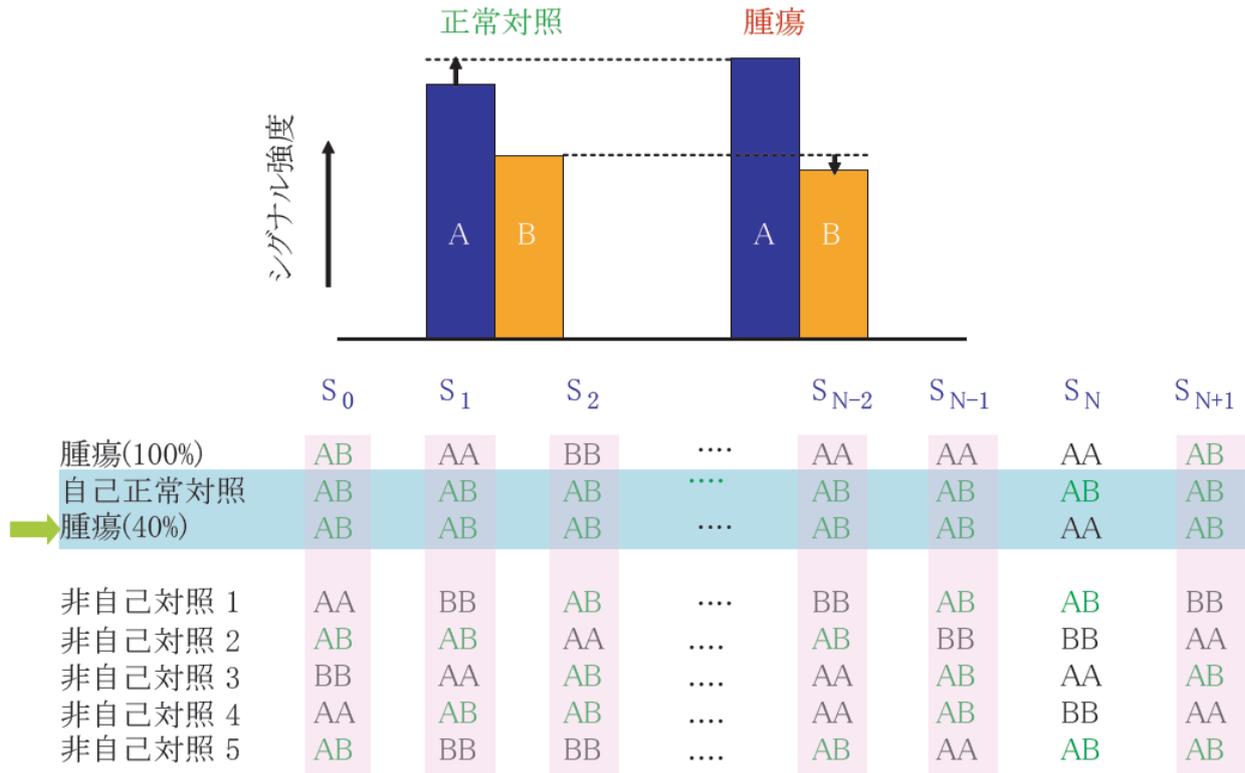
PCR条件の補正



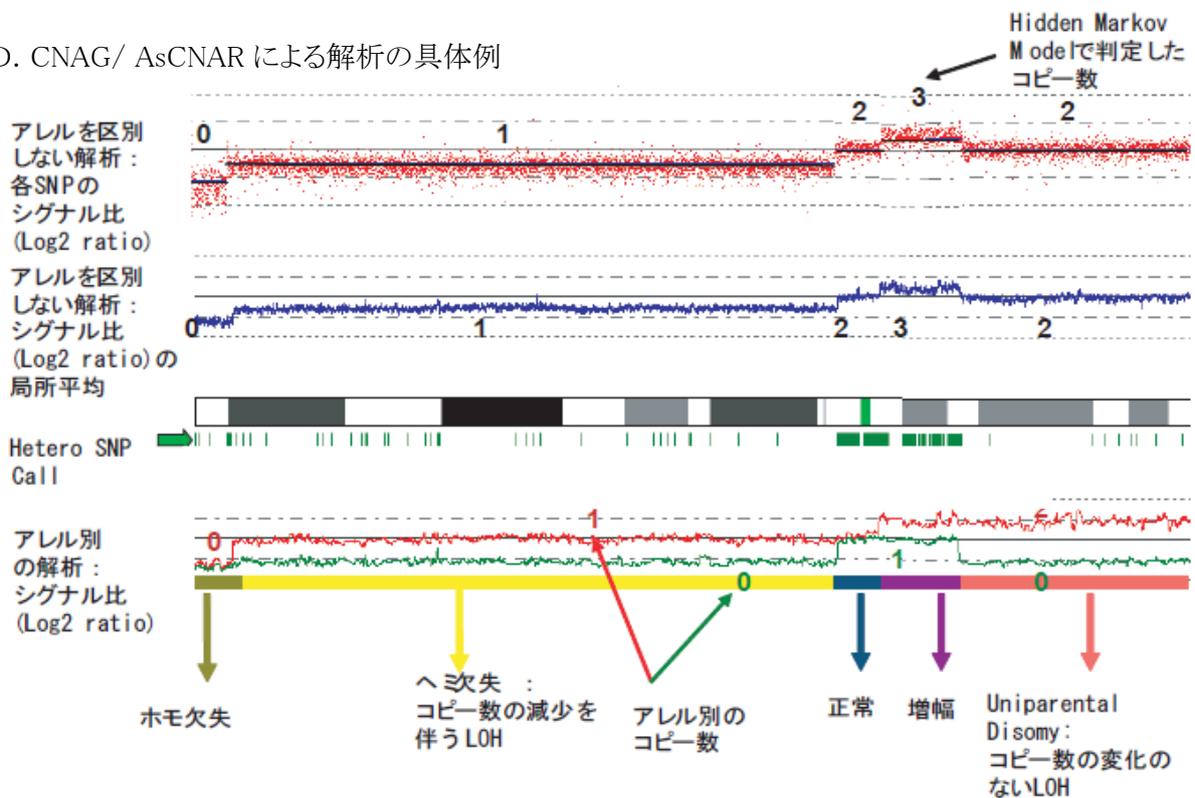
対照サンプルの選択



C. AsCNAR(非自己正常対照を用いたアレル別のコピー数の検出)のアルゴリズム



D. CNAG/ AsCNAR による解析の具体例



<図 1> SNP mapping assay と CNAG/ AsCNAR によるゲノムのコピー数解析

A. Affymetrix® GeneChip® 100K/ 500K mapping アレイのプロトコール

PM: perfect match probe (SNP を認識する特異的オリゴヌクレオチドプローブ),

MM: mismatch probe (PM に 1 塩基のミスマッチ塩基を導入したプローブ)

A, B: SNP タイピングの際に判別される SNP の多型 (A, B は各々塩基 A, G, T, C のいずれかに該当する)

1 検体あたり 250ng のゲノム DNA を制限酵素で切断(100K: XbaI または HindIII、500K: NspI または StyI)、アダプターを付加し、これに相補的な primer を用いて PCR 増幅を行なった。PCR 産物を DNase I で断片化、terminal deoxynucleotidyl transferase を用いて ビオチン標識後、オリゴヌクレオチドアレイ上でハイブリダイゼーションを行ない、アレイをスキャンした。アレイ上には各 SNP 座について、2 種類の多型 A, B をそれぞれ認識する特異的オリゴヌクレオチドプローブとこれにミスマッチ塩基を導入したプローブが合成されており、スキャンのシグナルパターンを Gene Chip Operation software (GCOS)、GeneChip® DNA Analysis software (GDAS) version3.0 (Affymetrix®) を用いて解析、これに基づいて GeneChip® Genotyping Analysis Software (GTYPE) を用いて、SNP をタイピングした。

B. CNAG におけるシグナル比のバラツキの補正: CNAG では各 SNP について、腫瘍と正常細胞のシグナル比を求め、詳細なコピー数解析の為にシグナル比を補正している。

<シグナル比の補正> 上段: 各 SNP について、腫瘍と正常細胞のシグナル比を plot しただけでは、signal noise 比が大きく、詳細なコピー数の変化がとらえにくい場合があり、詳細なコピー数解析には誤差の補正が必要である。中段: PCR 増幅率が異なることにより生じる系統的なばらつきを補正した。下段: さらに実験誤差に対応する random なバラツキを補正することで、signal noise 比が改善され、CNAG では詳細なコピー数解析が可能となった。

C. AsCNAR(非自己正常対照を用いたアレル別のコピー数の検出)のアルゴリズム

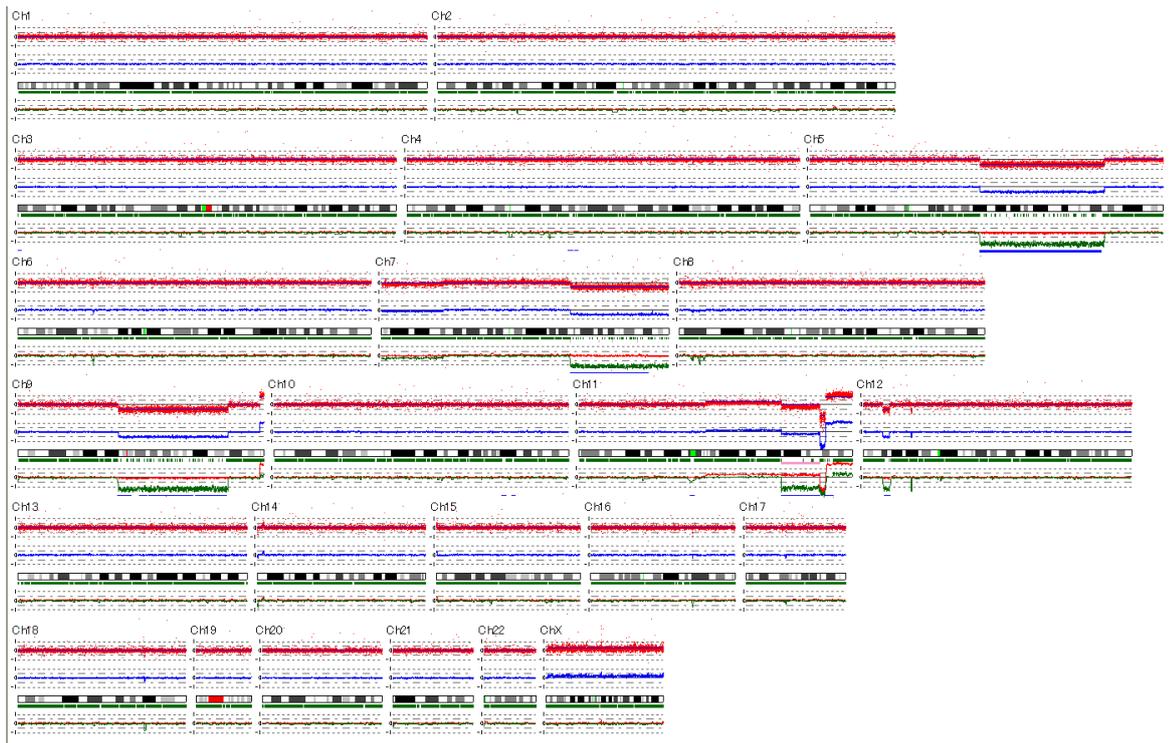
上段: 正常細胞におけるヘテロの SNP の多型 A, B シグナル比と、腫瘍細胞における A, B シグナル比との間には差が認められる。下段: 各 SNP におけるアレル別のコピー数の増減の解析方法

ヘテロ接合性(AB)をしめす SNP を選択する。このうち、腫瘍細胞がホモ接合、正常細胞がヘテロ接合性を示す SNP では、腫瘍正常細胞混合検体(黄緑矢印)はヘテロ接合性を示す場合がある(S_1 , S_2 , S_{N-2} , S_{N-1})。自己正常対照のない腫瘍正常細胞混合検体も多型を示す SNP について、非自己正常対照群から SNP 別にヘテロの正常対照検体を選び(S_{N-1} の SNP であれば、非自己正常対照 1,3,4)、A, B のシグナル強度を比較することで、その SNP の部位のコピー数の増減をアレル別に判別した。

D. CNAG/ AsCNAR による解析の具体例

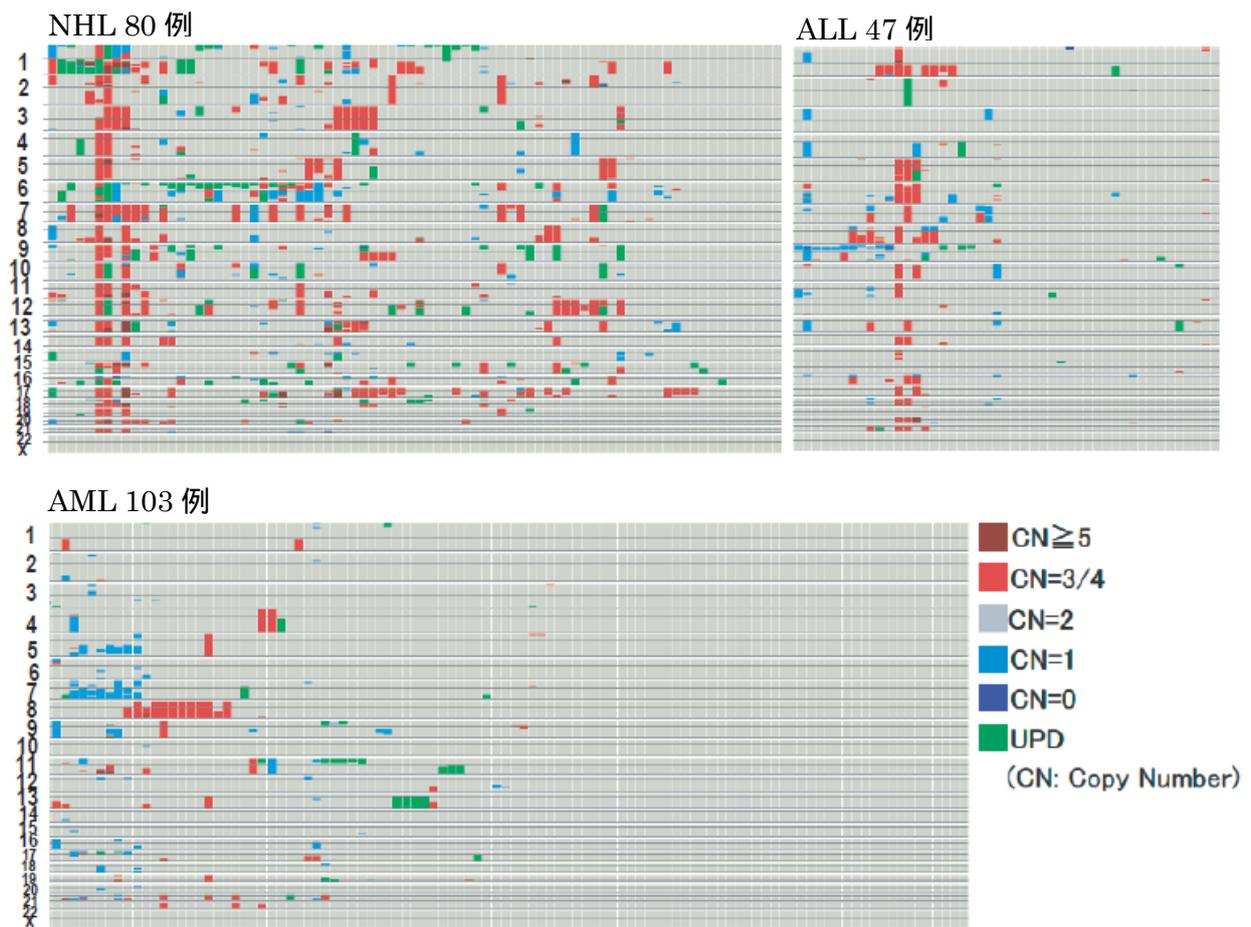
Hetero SNP call: SNP タイピングの際、ヘテロ接合性(AB)を示した SNP

最上段: 染色体上で、アレルを区別しない解析の各 SNP 順にシグナル比を赤点で示す。数値はコピー数を示す。2 段目: 染色体上で、アレルを区別しない解析の SNP5 箇所のシグナル比の局所平均を青線で示す。数値はコピー数を示す。3 段目: 染色体の G-band と、SNP タイピングの際に Hetero SNP call を示した SNP を緑線で示す。最下段: 染色体上でアレル別の解析による各 SNP のシグナル比を片側は赤線、対側は緑線で示す。数値は各々のアレルのコピー数を色別に示す。アレルを区別しない解析では、同じコピー数 2 を示す部位でも、アレル別の解析では赤線・緑線で示すコピーが 1 本ずつの正常部位と、赤で示す片アレルが 2 本、対側の緑が欠失している部位、すなわち UPD の部位を検出した。



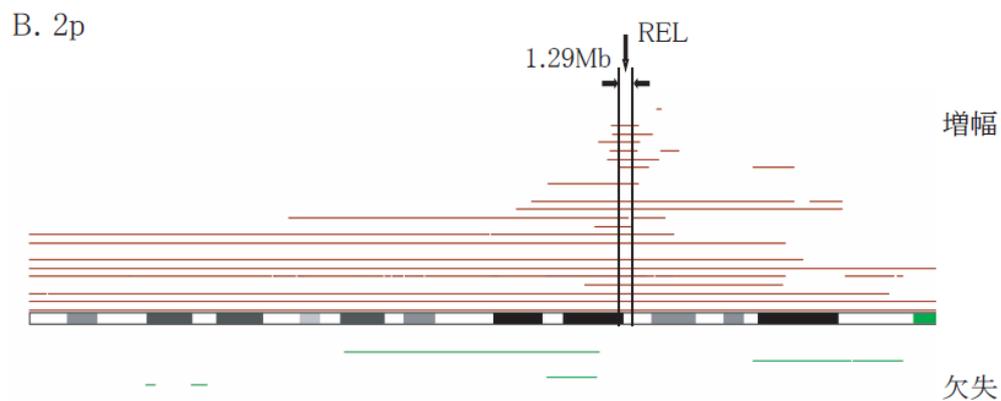
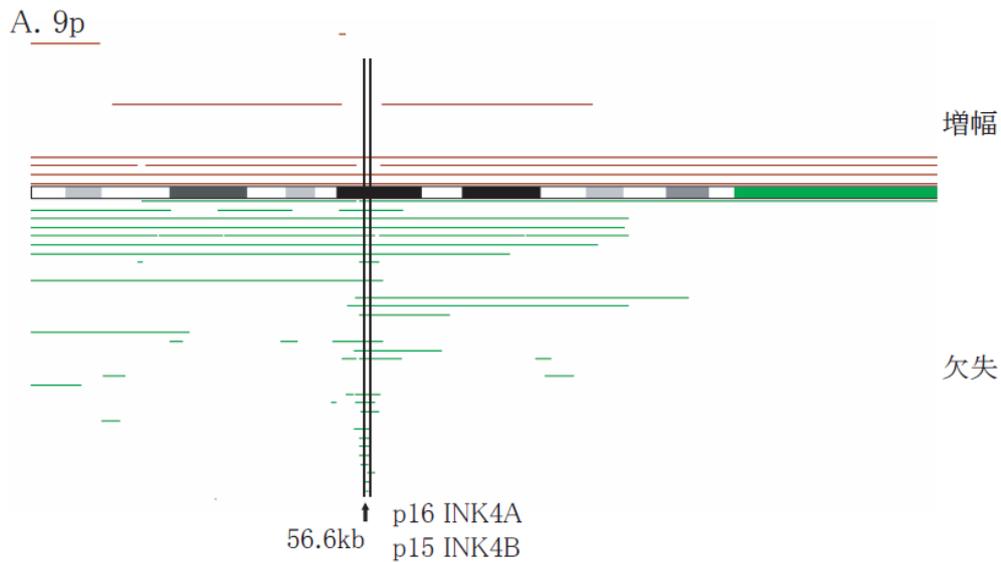
<図2> AML 臨床検体の 500K NspI アレイによる解析例 (検体: W190483)

CNAG、ASCNAR による実際の解析例を示す。染色体毎に、上段はアレルを区別しない解析でのシグナル比 (赤線)、上から 2 段目はアレルを区別しない解析のシグナル比の 5 箇所 SNPs の局所平均 (青線)、3 段目は染色体とアレイ解析において Hetero SNP call を示した部位 (緑線)、下段はアレル別の解析によるシグナル比 (赤・緑線) を示す。染色体分析では、45XX, del(5)(q21q34), -9 を示した検体であるが、本解析では、5q14.3-33.1 の欠失、9p21.1-9q32 欠失の他、6p21.33 の短い欠失、7p22.3-15.2、7q22.1-36.3 欠失、9q34.13-34.3 の増幅、11 番のコピー数の増減と UPD (11q13.1-11q22.2 の増幅、11q22.2-q23.3 の UPD、11q23.3-q24.1 のホモ欠失、11q24.1-q25 の増幅)、12p13.2-13.1 の欠失、12p12.1 の欠失、14q11.2 の増幅、16q23.1 の欠失を示した。



<図 3> 疾患別の染色体コピー数の増減と UPD

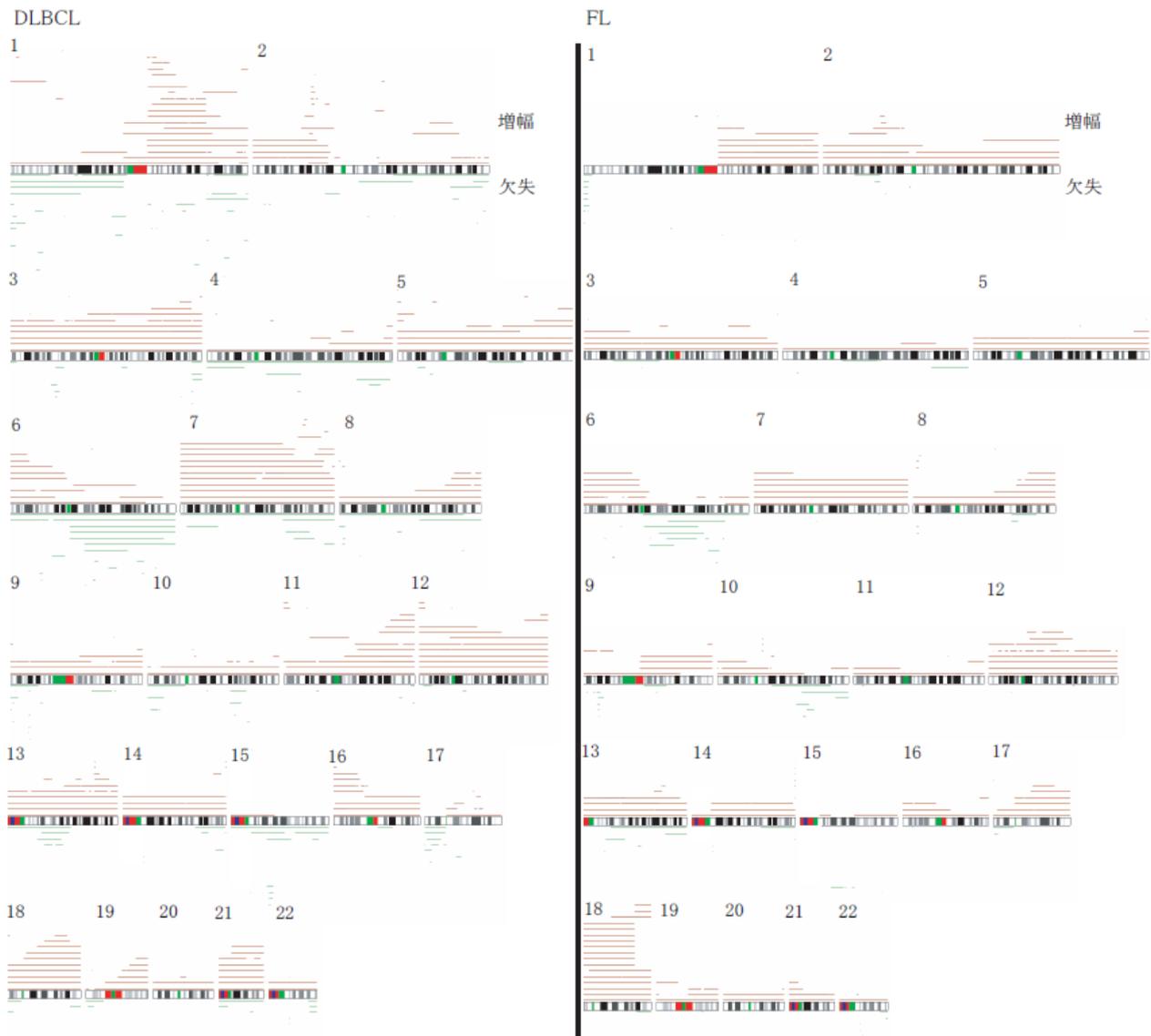
各疾患別に横軸に各症例、縦軸に染色体別に、コピー数の増減と UPD の分布を示す。



<図 4> 9p21 の共通欠失領域と 2p の共通増幅領域

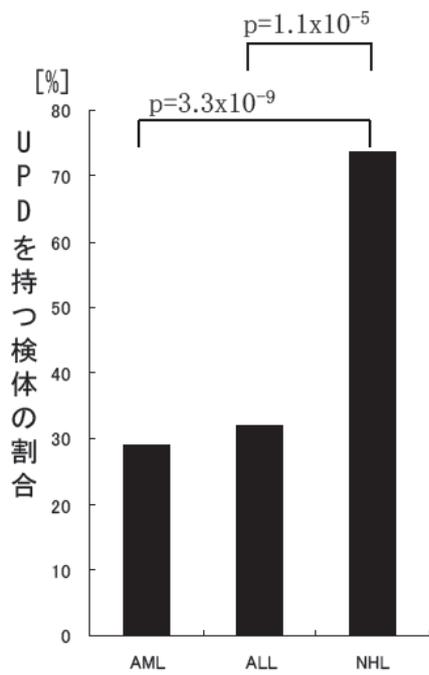
A. ALL、NHL 検体の 9p21 共通欠失領域: ALL47 例、NHL80 例について、25 例に 9p21 に共通欠失領域があり、共通領域は 56.6kb に限局され、含まれる遺伝子は p16 (INK4A)、p15 (INK4B) の 2 遺伝子であった。赤線で各検体に認めた増幅領域、緑線で欠失領域を示した。

B. NHL 検体の 2p15-16.1 共通増幅領域: NHL80 例中 21 例に 2p15-16.1 に共通増幅領域が認められ、REL を含むこの共通領域の大きさは 1.29Mp であった。赤線で各検体に認めた増幅領域、緑線で欠失領域を示した。



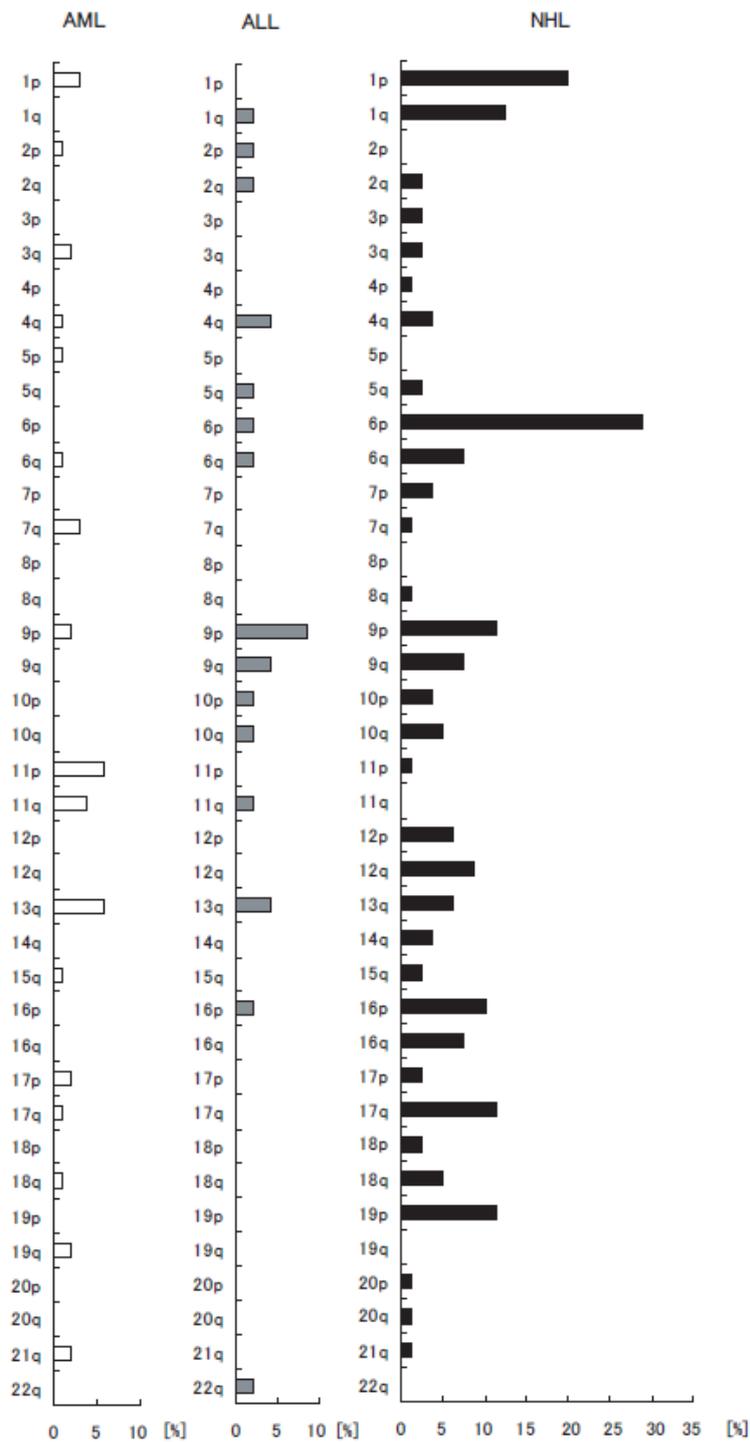
<図5> DLBCL と FL のコピー数の増減の比較

DLBCL41例、FL39例について、染色体別に（染色体1番～22番まで番号で示す）コピー数の増減を示した。赤線で各検体に認めた増幅領域、緑線で欠失領域を示した。DLBCLとFLの比較では、前者で1q、3番、7番、11q、21番増幅、17q欠失、後者で18番増幅が高頻度であった。

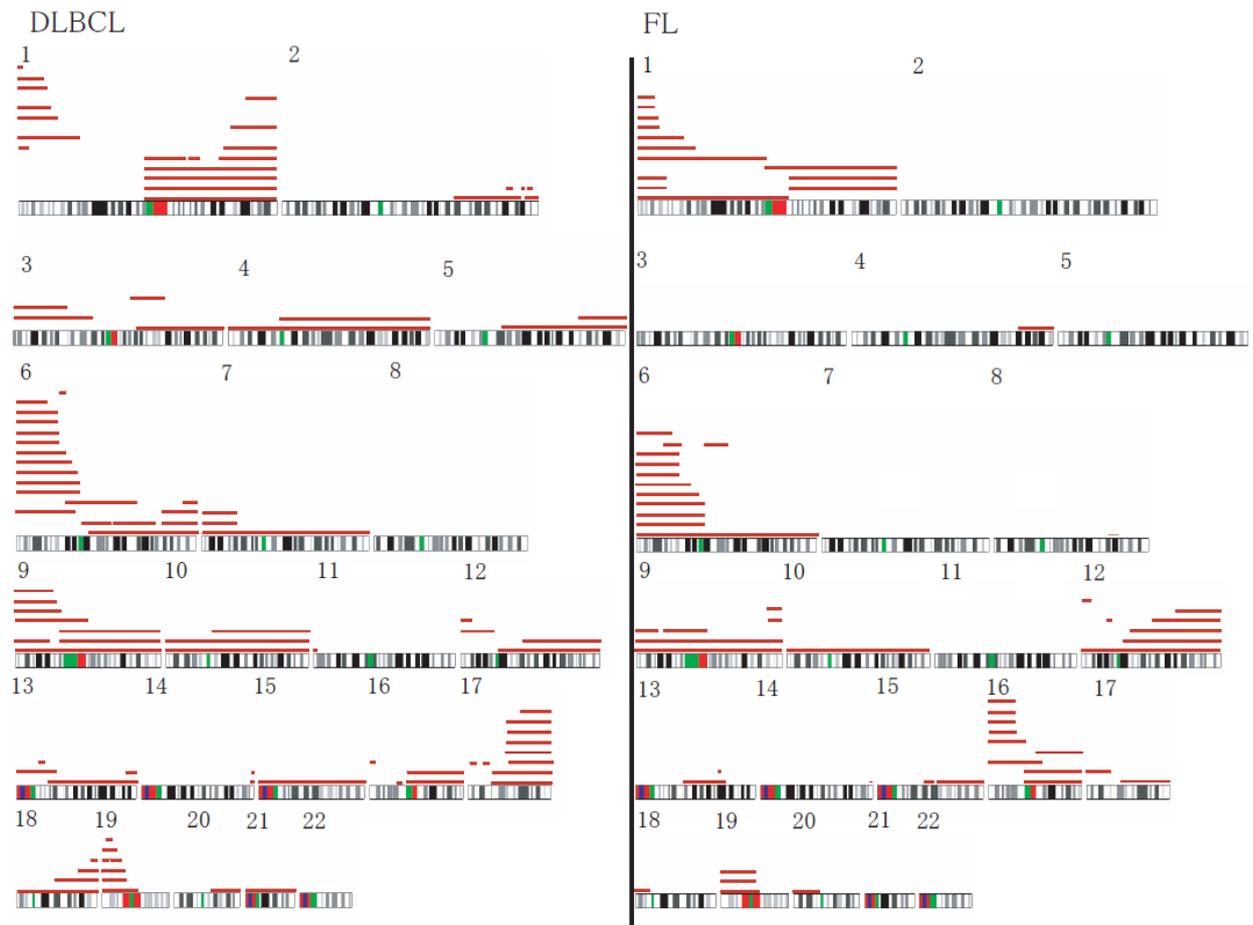


<図 6> 各疾患別の UPD の割合

個々の検体に UPD が認められる頻度について、2x2 分割表を用いてイエーツの補正をした χ^2 検定をし、ボンフェロニ補正を行なうことによって、疾患別に有意差の有無を検討したところ、AML、ALL と NHL 間では UPD の頻度に有意差が認められた。(AML と NHL 間: $p=3.3 \times 10^{-9}$ 、ALL と NHL 間: $p=1.1 \times 10^{-5}$)

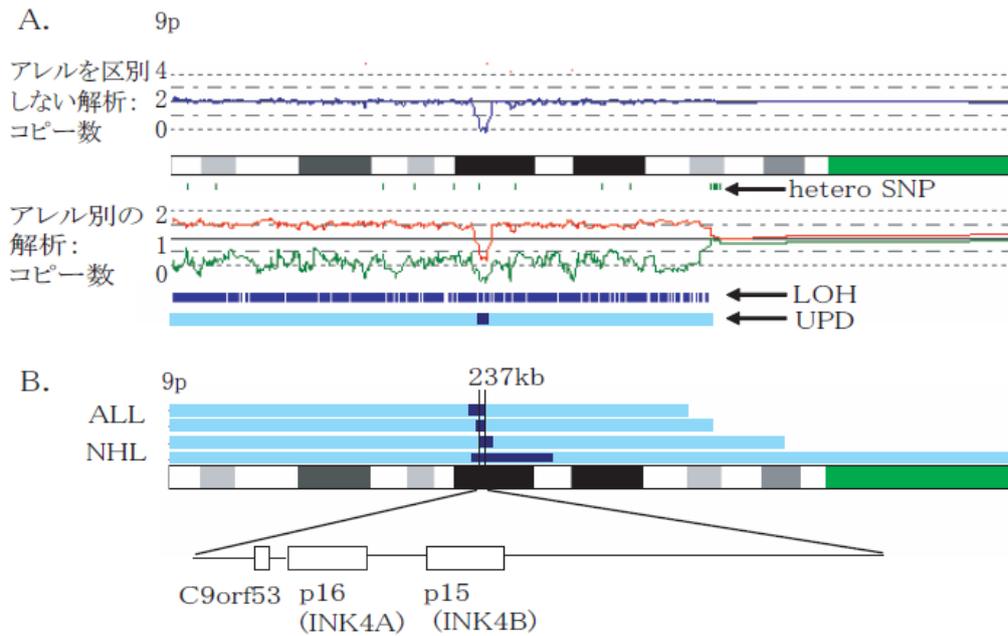


<図 7> 各疾患における UPD 頻度の染色体毎の分布
 AML 103 例、ALL 47 例、NHL 80 例のうち、各染色体長腕・短腕毎に、UPD を持つ検体の割合を示した。



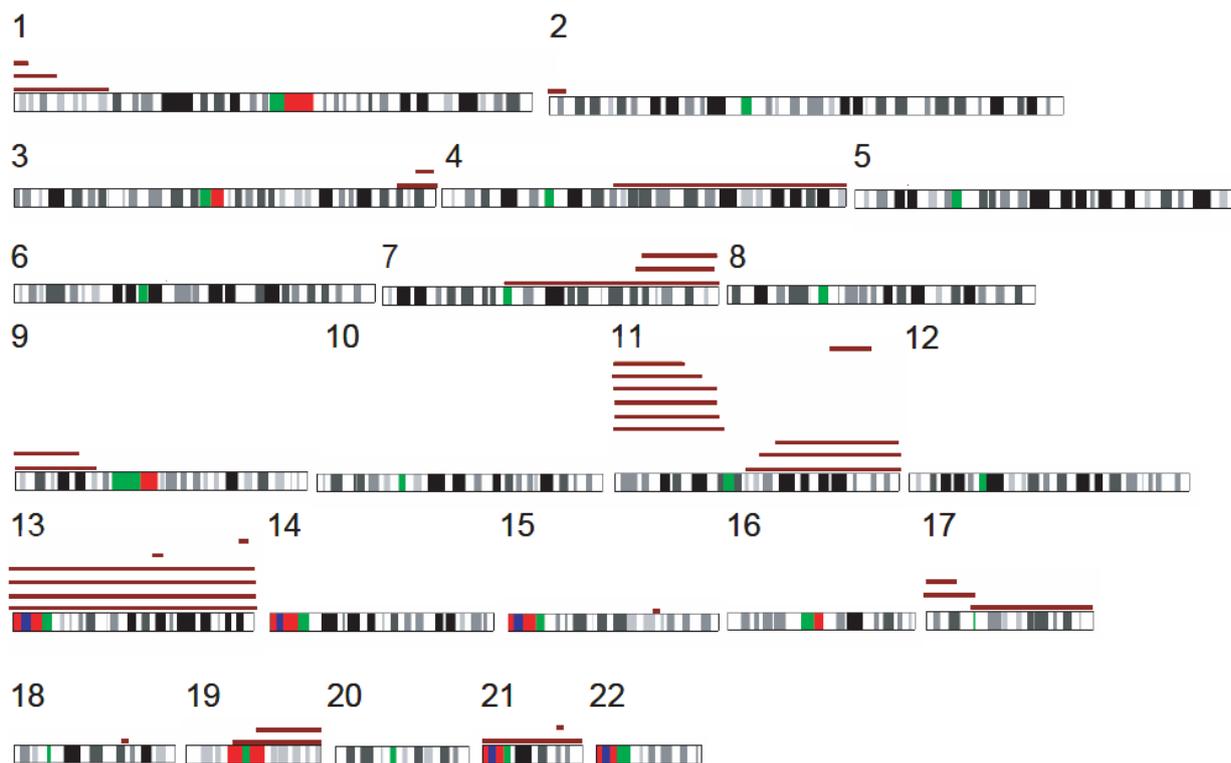
< 図 8 > DLBCL と FL の UPD の分布の比較

DLBCL41 例、FL39 例について、染色体別に（染色体 1 番～22 番まで番号で示す）コピー数の増減を示した。赤線で各検体に認めた UPD の領域を示した。染色体別の UPD の頻度に有意差は認めなかったが、DLBCL では 1q、17q、FL では 12q、16p に高頻度であった。



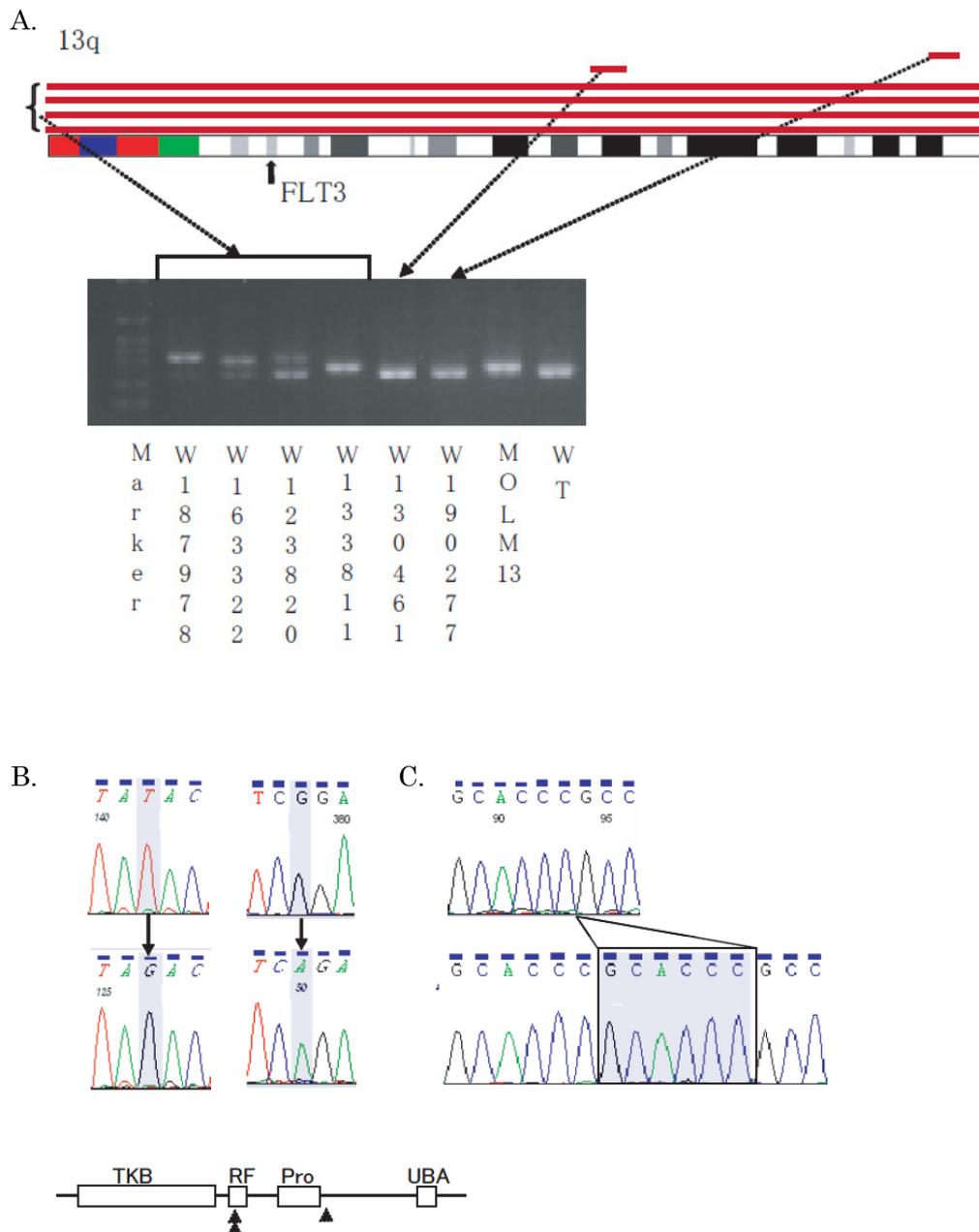
<図9> ALL、NHL 検体の 9p の UPD 部位に認めた共通ホモ欠失領域

- A. ALL 検体(検体番号: W180545)で 9p に UPD を持つ検体のアレイ解析結果: ■は UPD 領域、■はホモ欠失領域を示した。
- B. ALL、NHL で 9p に UPD を持つ 4 検体の UPD 領域と共通ホモ欠失領域: ALL2 例、NHL2 例で、9p に UPD を認め、かつその内側にホモ欠失領域を認めた(■は UPD 領域、■はホモ欠失領域を示した。)その共通領域は 237kb で、3 遺伝子(C9orf53、p16 (INK4A)、p15 (INK4B))のみを含んでいた。



<図 10>AML おける UPD の染色体別の分布

AML103 例について、染色体別に(染色体 1 番 ~ 22 番まで番号で示す)茶色の線で各検体の UPD の分布を示した。中でも 1p、1q、7q、11p、11q、13q、17p が高頻度であった。

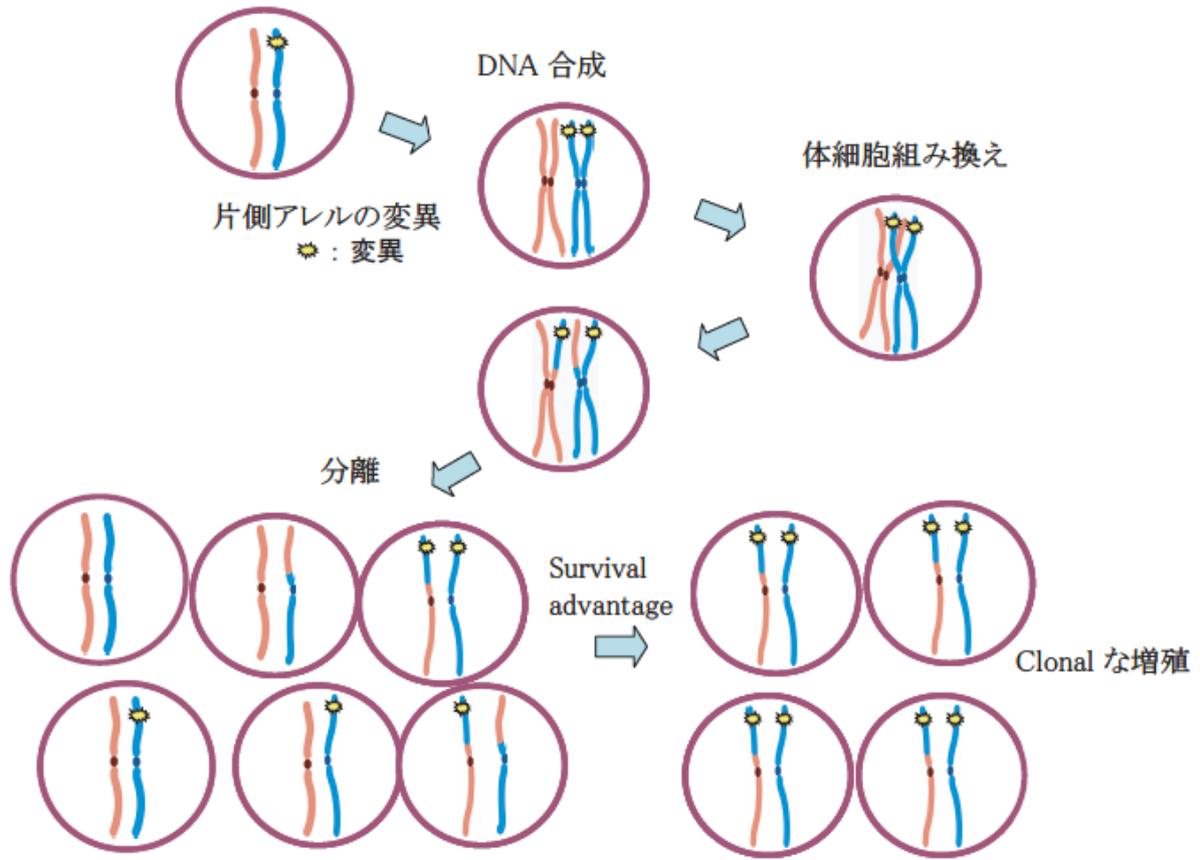


<図 11> AML 検体で UPD 部位に認められた変異

A. FLT3ITD 上段:13q に UPD を持つ 6 検体の UPD 部位の分布 (赤線)、下段 (写真): 各検体の PCR 産物の電気泳動でみた FLT3ITD (internal tandem repeat) の有無。(MOLM13: positive control, WT: Wild Type) UPD 領域内に FLT3 を含む 4 検体には ITD がなく、FLT3 を含まない領域のみに UPD を持つ 2 検体には ITD が認められなかった。

B. 上段: CBL exon 8 (左)、exon 11 (右) に認められた homo 変異 下段: 11q に UPD を持つ検体に認められた CBL 遺伝子の変異の分布 (TKB: tyrosine kinase-binding domain, RF: ring finger domain, PRO: proline-rich domain, UBA: ubiquitin-associated domain, ▲: 変異を認めた部位)。exon 8 (ring finger domain) に 2 箇所、exon 11 (Proline-rich domain より 3' 側) に 1 箇所ホモ変異を認めた。

C. 19q に UPD を持つ検体 (W190397) に認めた C/EBP α 遺伝子の 6 塩基挿入



<図 12>体細胞組み換えによる UPD の発生メカニズムモデル:(1)片側アレルの変異→(2)体細胞組み換えにより UPD が発生(変異アレルが両側になる)→(3)正常細胞や片側アレルのみの変異の細胞よりも増殖や生存に有利となり、細胞集団の中で選択される→(4)clonal に増殖し、両側アレルの変異が細胞集団の中で固定化、腫瘍化するという過程が想定される。