

審査の結果の要旨

氏名 昆 彩奈

本研究は骨髄異形成症候群および類縁疾患の新規の遺伝子変異を明らかにするために、次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析および高速ターゲットシーケンスによる解析を行い、さらに同定された遺伝子変異についての機能を研究したもので、以下の結果を得ている。

1. 骨髄異形成症候群(MDS: myelodysplastic syndromes)の原因遺伝子変異の全貌を解明することを目的として、29 症例の MDS および関連疾患を対象として、次世代シーケンサーを用いて全エクソン解析を行った。本解析を通じて、RNA スプライシング分子変異が MDS に高頻度かつ特徴的に生じていることが明らかになっているが、(Yoshida et al, Nature 2011)、その他にも、これまでに報告されていない多数の遺伝子変異が見出された。複数の症例において変異を認める新たな遺伝子として、コヒーシ複合体の主要な構成タンパク質の一つをコードする *STAG2* 遺伝子が同定された。
2. 骨髄系腫瘍におけるコヒーシ複合体遺伝子変異の詳細を調べるために、MDS, AML, CMML (慢性骨髄単球性白血病)、CML (慢性骨髄性白血病)、MPN (骨髄増殖性腫瘍)を含む多数症例 (581 症例) の骨髄系腫瘍を対象として、コヒーシ複合体を構成する遺伝子およびその関連遺伝子 9 遺伝子に関して、高速シーケンス解析を行った。また、このうちの 453 症例に関しては、SNP アレイを用いたコピー数解析も併せて行った。この結果、コヒーシ複合体の主要な 4 つの構成要素である *STAG2*, *RAD21*, *SMC1A*, *SMC3* の遺伝子変異および欠失が、AML の 12.1% (19/157), MDS の 8.0% (18/224), CMML の 10.2% (9/88), MPN の 6.3% に生じていることが明らかとなった。*STAG2* 変異のほとんど(32/33 例)および全ての *RAD21* 変異(9/9 個)は遺伝子領域全体に認められ、ナンセンス変異、フレームシフト変異、スプライスサイト変異であることから、機能喪失型の変異であると考えられた。一方で、*SMC1A* および *SMC3* に認められた変異は、コヒーシがリング状の複合体を形成するために重要と考えられているドメインに生じたミスセンス変異であり、変異によりハプロ不全やドミナントネガティブの機序を介して機能喪失を招くと考えられた。
3. コヒーシ変異は、骨髄系腫瘍で共通に変異していることが知られている他の遺伝子変異と高頻度に共存していた。コヒーシ遺伝子変異と、共存する遺伝子変異についてのディープシーケンシングの結果、ほとんどのコヒーシ遺伝子変異は腫瘍の主要な集団に生じていることが明らかになり、白血病発症において初期に生じる変異であることが示唆された。
4. コヒーシ遺伝子変異が白血病発症において果たす役割を調べるために、4 個のコヒーシ複合体の変異細胞株を含む 17 個の骨髄性白血病に由来する細胞株において、*STAG1*, *STAG2*, *RAD21*, *SMC3*, *SMC1A*, *NIPBL* の発現をウェスタンブロットにより検討したところ、*RAD21* 遺伝子のフレームシフト変異をもつ細胞株 (Kasumi-1) では *RAD21* の発現低下が認められたが、

コヒーシン複合体の遺伝子に変異をもつ他の細胞株では、変異遺伝子の発現の有意な低下は認められなかった。一方、コヒーシン複合体の遺伝子に変異は認められないにもかかわらず、STAG2 (KG-1)、およびSTAG1, STAG2, RAD21, NIPBLの発現の有意な低下の認められる細胞株 (MOLM-13)が存在した。これらの例を除くと、全可溶化画分におけるコヒーシン複合体の構成タンパク質の発現とコヒーシン複合体の変異に有意な相関は認められなかったが、クロマチン結合画分においては、1つ以上のコヒーシン複合体の構成タンパク質の変異あるいは発現の低下を認める細胞株において、SMC1A, SMC3, RAD21, STAG2を含む1つ以上のコヒーシン複合体の構成タンパク質の発現の有意な低下が認められた。すなわち、コヒーシン複合体の構成タンパク質ひとつの機能低下により、クロマチンに結合するコヒーシン複合体が減少する可能性が示唆された。

5. *RAD21* 遺伝子の変異をもつ白血病細胞株(Kasumi-1)、および *RAD21* および *STAG2* の発現の低下を認める細胞株(MOLM-13)に、野生型の *RAD21*、および、野生型の *RAD21* または *STAG2* を強制発現させることにより、コヒーシン複合体における変異および発現低下の細胞増殖に及ぼす効果について検討した。野生型の遺伝子の強制発現により、これらの細胞株の増殖は有意に抑制されたが、コヒーシン遺伝子の変異あるいは発現低下を認めない細胞株においては、増殖の有意な抑制は観察されなかったことから、これらのコヒーシン複合体の構成タンパク質の変異あるいは発現低下は、白血病細胞の増殖に関与している可能性が示された。発現アレイ法により、*RAD21* 遺伝子の変異をもつ白血病細胞株(Kasumi-1)において、野生型の *RAD21* 遺伝子の強制発現による遺伝子発現プロファイルの変化について検討した。計 63 個の遺伝子については再現性のある遺伝子発現の変化が確認され、コヒーシン複合体に変異をもつ白血病細胞では、コヒーシン複合体の機能的な異常により遺伝子発現の変化が誘導される可能性が示唆された。

6. 骨髄系腫瘍においてはコヒーシン変異を有する症例の半数は正常核型であり、コヒーシン変異の有無により核型の差は見られなかったことから、コヒーシン変異は異数性以外の機序を通じて白血病発症を招くことが示唆された。

以上、本論文は、骨髄異形成症候群および類縁疾患の全エクソン解析、網羅的ターゲットシーケンスおよび SNP アレイ解析を通じて、従来報告されてきた DNA 修飾やクロマチン修飾以外の新しいクラスの遺伝子異常であるコヒーシンのパスウェイ変異が骨髄系腫瘍の発症に重要な役割を担っていることを明らかにした研究成果である。骨髄系腫瘍の分子病態を理解するうえで重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。