

網羅的エクソン解析による染色体 4 倍体白血病細胞に特異的なバイオマーカー遺伝子の探索

今川 潤

広島大学病院 血液内科

【研究の背景】

がんはゲノム異常に起因するクローン性疾患であり、その進展過程において段階的にゲノム変異が蓄積される。近年、酵母菌実験において、分子生物学的に作製された染色体4倍体(4N)細胞が、環境ストレスへの曝露によって、正常2倍体(2N)細胞よりも、迅速かつ多彩なゲノム改変を起こすという知見が報告された¹⁾。申請者らは、染色体が4倍体となったがん細胞が存在するのであれば、その高いゲノム改変能は、がんの進展を強力に促進するドライバーとして機能する可能性があると考えた。そこで白血病患者の骨髄検体を用いて4倍体細胞の検出を試みた。興味深いことに4倍体細胞は、造血幹細胞と共通する未分化なCD34+CD38-分画に限局して存在しており、成熟血球への分化能を失っていた。また4倍体細胞は、化学療法後も残存し白血病再発の原因になりうると考えられた。このように、我々は4倍体白血病細胞の存在を確認し、かつこれらの細胞がいわゆる白血病幹細胞として機能している可能性を見出した。また我々は、染色体4倍体細胞は細胞増殖速度が遅く、細胞分裂像が得られにくいいため、従来の染色体解析法では検出頻度が極めて低いことを見出した。このことはこれまでのがん染色体研究において、4倍体細胞が研究対象から看過されてきたことにつながる。実際に、詳細なゲノム研究に基づく最新の血液腫瘍分類²⁾(WHO2016)においても、染色体4倍体白血病は独立した疾患単位として認識されていない。そこで本研究は、4倍体白血病細胞の網羅的エクソン解析を行うことによって、その分子病態の解明と特異的なバイオマーカー遺伝子の探索を行うことを主な目的として行った。

【目 的】

網羅的エクソン解析によって、染色体 4 倍体白血病細胞の分子遺伝学的基盤を確立し、新たな疾患単位として提唱すること、また正常組織および 2 倍体白血病細胞との比較によって、将来の分子標的治療の候補となりうる 4 倍体白血病細胞特異的なバイオマーカー遺伝子を同定することを目的とする。

【方 法】

白血病患者の骨髄検体を用いて、白血病細胞分画である CD34 陽性細胞を、DNA 染色によるゲノム染色体の定量化によって、染色体 2C細胞あるいは 4C細胞に峻別し、別々にソーティングを行った。コントロールとして同一患者の頬粘膜も採取し、これら 3 種類の検体から DNA を抽出した。続いて次世代シーケンサーによる網羅的エクソン解析を行い、それぞれの細胞集団において、Single Nucleotide Variant (SNV)、あるいは DNA 配列の欠失や挿入 (Indel) を解析した。検出された全ての遺伝学的 variant について、2C細胞集団と 4C細胞集団それぞれにおける特異性を評価するため、Fisher's exact test および多重検定の FDR (Benjamini-Hochberg 法) を適用して、それぞれの細胞集団における allele frequency に有意差があるかを検証した。

【結 果】

染色体 2C細胞あるいは 4C細胞それぞれの細胞集団について、Strand NGS v2.7 を用いて同定された SNV は全 247 種であった。そのうち、両者に共通の SNV を 115 種、2C細胞に特異的な SNV を 64 種、4C細胞に特異的な SNV を 68 種認めた。そのうち、機能的なアミノ酸置換が起こる SNV は全 15 種であったが、2C細胞と 4C細胞との比較において、有意に SNV

の出現頻度が異なる 4 遺伝子を同定した。同様に機能的なアミノ酸置換が起こる DNA 配列の欠失や挿入 (Indel) を全 93 種同定したが、そのうち 75 種は 2C細胞と 4C細胞との比較において、有意に SNV の出現頻度が異なっていた。

【考 察】

網羅的エクソン解析の結果、染色体 2C細胞および 4C細胞両者の細胞集団に共通して検出される SNV や Indel を認めたことから、両者の細胞集団は遺伝学的に同一の細胞起源であると考えられる。一方、それぞれの細胞集団に特異的な SNV や Indel も認められており、これらはゲノム染色体量に依存して発生する特異的な分子異常である可能性があり、興味深い。特に 4C細胞集団に特異的に認められた分子異常は、新たな白血病分子病態の解明や治療標的候補の発見につながる可能性がある。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

これまでの我々の検討の結果、白血病以外の血液腫瘍においても同様の染色体4倍体の腫瘍細胞が検出されており、様々ながん腫に共通して認められる染色体異常であろうと推測している。そこで固形がんを含む他臓器の腫瘍も念頭において、染色体4倍体細胞を治療標的とする臨床的意義を検証していくことを視野に入れている。

【参考・引用文献】

1. Selmecki AM, Maruvka YE, Richmond PA, et al. Polyploidy can drive rapid adaptation in yeast. *Nature*. 2015;519(7543):349-352.
2. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-2405.