162　若年性骨髄単球性白血病の遺伝子発現制御機構	若松　学

【目的】若年性骨髄単球性白血病（Juvenile myelomonocytic leukemia：JMML）は、主に 5 歳未満の小児に発生する予後不良な血液悪性腫瘍である。JMML は、本邦で年間約 20 例が発症する非常に稀な小児がんの一病型である。JMML 患者の約 9 割は、細胞の分化や細胞増殖のシグナル伝達に関与する RAS 関連遺伝子（*PTPN11*、*NRAS*、*KRAS*、*NF1CBL*）に遺伝子変異を認める。一部の JMML 患者では、RAS 経路の遺伝子変異に続いて、*SETBP1* や *JAK3* 遺伝子にセカンドヒット変異を認め、これらの変異を認める患者は化学療法に抵抗性で再発率も高く、特に予後不良である。また、2018 年にゲノムワイドなメチル化解析が大規模に行われた結果、高メチル化プロファイルを認める症例で有意に予後が不良であることが明らかとなった。ゲノムは、様々な構造状態を取ることで空間的に近い距離にあるゲノム同士が相互に影響し、遺伝子発現の On と Off のスイッチを切り替えて、細胞の機能・分化・恒常性の維持を制御する。最近、次世代シーケンサーによる解析技術の著しい進歩により、遺伝子発現の調節を担う基本単位である Topology associating domain（TAD）を同定し、3 次元的なクロマチン構造解析法（Hi-C 法）が技術的に可能となった。TADs は、遺伝子発現調節の基本構造単位とし、500 kb から 1 Mb 程度の領域に複数の細胞特異的、あるいは発生時期特異的に働く coding 遺伝子と、その発現調節領域を含む長い DNA 単位が大きな塊を作り、急性白血病でも特徴的な TADs が報告されている。本研究では、Hi-C 法を用いて、JMML における 3 次元的クロマチンの構造変化に対して、どの領域に、どのように影響を及ぼすかを検討し、JMML の病態に関連するゲノム領域の同定やクロマチン構造の制御機構を解明することを目的とした。

【方法】本研究で実施する Hi-C 法では、JMML 患者由来骨髄単核球細胞を死細胞の除去を行った後に、空間的に近接関係にあるゲノム領域を保存したまま抽出するため、ホルムアルデヒドを用いてクロスリンクした。クロスリンクした後に、クロマチンを制限酵素で切断し、切断された DNA 末端にビオチン化ヌクレオチドを取り込み、ライゲーション処理を実施した。脱クロスリンクの後 DNA を精製し、精製 DNA から次世代シーケンサーを用いて解析を行うために、シーケンスライブラリーを調製した。既存のツールを用いて、作成ライブラリーをペアエンドで解析しコントロールデータとして正常健常人の凍結保存細胞を用いた同様の Hi-C 解析を行い、比較した。

【結果】Hi-C 解析を JMML 患者と健常人で実施し、全体で 2,400 個の TADs を同定した。うち、両者で共通する TADs は、1,485 個で、JMML 患者に特異的な TADs 領域は 399 個であった。次に、public database から急性骨髄性白血病細胞株の Hi-C データを抽出し、本研究の TADs と比較検証した。さらに、得られた領域に含まれる遺伝子の、mRNA 発現レベルとの相関関係を評価し、JMML に認められる TADs 領域、かつ遺伝子発現が有意に亢進している領域を複数同定した。今後は、サンプル数を増やして解析を継続する予定である。

2,400 個の TADs を同定



JMMLに特徴的なTADs

162. 若年性骨髄単球性白血病の遺伝子発現制御機構

若松　学

名古屋大学 医学部附属病院 小児科

Key words：若年性骨髄単球性白血病，RAS 関連遺伝子，クロマチン構造，遺伝子発現

緒　言

若年性骨髄単球性白血病（Juvenile myelomonocytic leukemia：JMML）は、主に 5 歳未満の小児に発生する予後不良な血液悪性腫瘍である。本邦では、年間約 20 例が発症する非常に稀な小児がんの一病型である。JMML は、通常の化学療法で十分な治療効果が得られる患者は極めて少なく、同種造血細胞移植が唯一の根治療法である。一方で、移植関連合併症や再発のために患者の 5 年生存率は約 50%前後にとどまり、造血細胞移植の代わりとなる分子標的治療薬などの新規治療法の開発が望まれている。

JMML の約 9 割は、細胞の分化や細胞増殖のシグナル伝達に関与する RAS 関連遺伝子（*PTPN11*、*NRAS*、*KRAS*、*NF1*、*CBL*）に遺伝子変異を認める（図 1）。一部の JMML 患者では、RAS 経路の遺伝子変異に続いて、*SETBP1* や *JAK3* 遺伝子にセカンドヒット変異を認めることが知られ、これらの変異を認める患者は化学療法に抵抗性で、再発率も高いため、特に予後不良であることが知られている［1〜3］。また、極めて稀なアリル頻度の変異を高感度に定量することが可能な droplet digital PCR（ddPCR）法を用いて、微小なアリル頻度の *SETBP1* 変異と *JAK3* 変異をもつ患者を同定し、生存解析を行った［4］。結果、JMML128 例のうち *SETBP1* 変異 9 例と *JAK3* 変異 15 例の 24 個のホットスポット変異を同定した。1%未満の微小なアリル頻度の変異のみを有する 5 例は、変異を認めない症例と比較して、有意に無移植生存率が低下していた。

JMML におけるセカンドヒット変異以外の重要な予後因子として、ゲノムワイドな DNA メチル化解析により高メチル化群が、予後不良因子であることが報告されている［5〜7］。DNA 高メチル化群は、低メチル化群よりも有意に全生存率が低く、既報の予後因子（高月齢、血小板数低下、*PTPN11* 変異、セカンドヒット変異、HbF 高値、AML 型の発現プロファイル）と強く相関していた。

ゲノムは、様々な構造状態を取ることで空間的に近い距離にあるゲノム同士が相互に影響し、遺伝子発現の On と Off のスイッチを切り替えて、細胞の機能・分化・恒常性の維持を制御する。ゲノム上における DNA 高メチル化や抑制型ヒストン修飾の増加は、クロマチン凝集に関連し、遺伝子発現を抑制する方向に作用する。次世代シーケンサー（NGS）による解析技術の進歩により、遺伝子発現調節の基本単位である Topology associating domain（TAD）を同定し、3 次元的なクロマチン構造解析法（Hi-C 法）を用いて解析することが可能である。本研究では、Hi-C 法を用いて、JMML の病態に関連する TADs 領域の同定し、遺伝子発現データと重ね合わせ、クロマチン構造の制御機構をより詳細に理解することを目的とした。

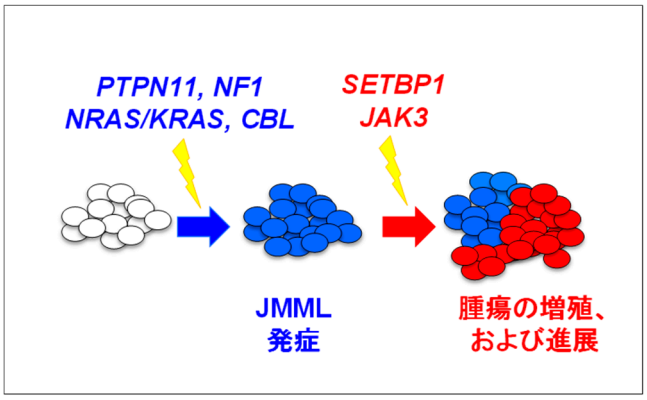


図 1. JMML におけるセカンドヒット変異と腫瘍進展

大部分の JMML で RAS 関連遺伝子変異が認められ、うち一部の症例で *SETBP1* や *JAK3* 遺伝子変異の体細胞変異の獲得を認め、特に予後不良である。

方　法

ゲノム上のどの領域同士が空間的に近接関係にあるかを網羅的に評価するために、JMML 患者の骨髄単核球細胞を用いて、Hi-C 解析を実施し、3 次元的クロマチン構造を解析する［8］。その際、Arima-Hi-C Kit のプロトコールに沿って、死細胞除去した骨髄単核球保存細胞から得られたクロマチンは、ゲノムの配列と構造を保持するため、ホルムアルデヒドを用いて架橋する（図 2）。クロスリンクされたクロマチンは、制限酵素カクテルを用いて消化され、5'-オーバーハングが埋められ、DNA 末端がビオチン化ヌクレオチドで標識される。DNA の空間的に近接した消化末端を DNA リガーゼでライゲーションし、ゲノムの配列と構造を捕捉する。ライゲーションされた DNA を精製し、純粋な近接ライゲーション DNA が得られる。近位にライゲーションした DNA を断片化し、ビオチン化断片を濃縮する。濃縮された断片は、NGS 解析用のライブラリー調製キットを用いて、カスタムライブラリーを作成する。

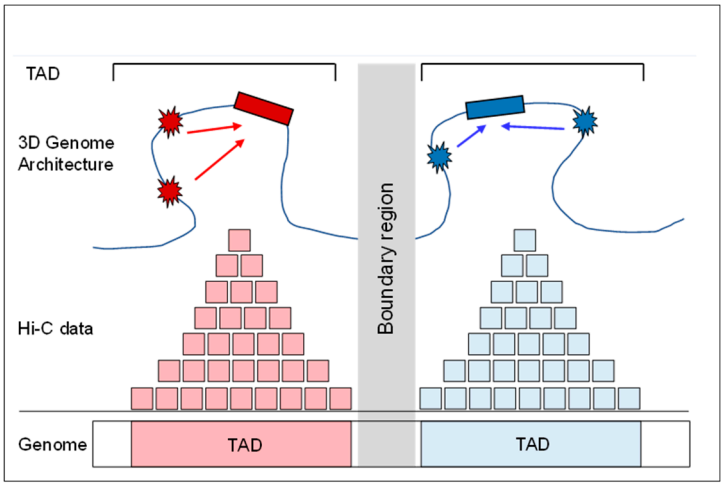


図 2. Hi-C 解析による TADs の同定

ゲノム内の物理的な距離に基づいて染色体内の相互作用をマッピングし、同定された TADs は、どのように遺伝子発現調節やクロマチン修飾パターンに及ぼす影響を評価する。

結果および考察

1. 同定された TADs 領域

Hi-C 解析データを、Juicer［9］を用いて呼び出された染色体内、短距離、長距離のコンタクトの平均総数をプロットした結果、染色体内コンタクトの数は全コンタクト数の大部分を占め、短距離接触よりも長距離接触に偏りを認めた（図 3)。

JMML 患者と健常人の全体では、2,400 個の TADs を同定した。うち両者で共通する TADs は、1,485 個で、JMML 患者のみに存在する特異的な TADs 領域は 399 個で、健常人のみに存在する TADs は 516 個で検出された。

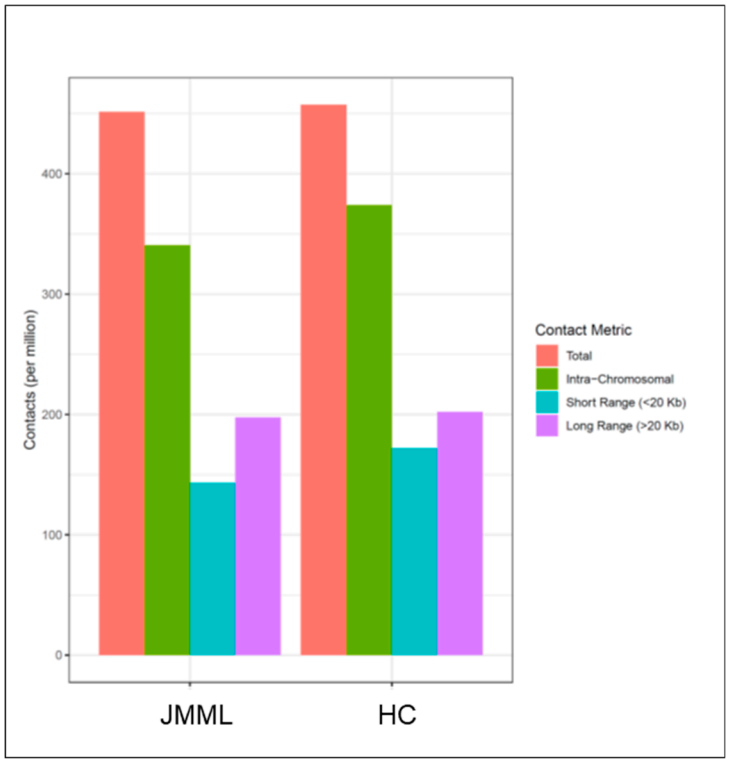


図 3. JMML と健常サンプルにおける contact の分布
JMML と健常サンプルのコンタクト分布では、特定の染色体領域やゲノム座間のコンタクトの差異を評価した。

2. JMML に特徴的な TADs 領域とその遺伝子発現との相互作用

前述した JMML で特異的に存在した 399 個の TADs 領域に含まれる遺伝子を抽出した。次に、我々が以前に本邦における多数例での JMML サンプルを用いた RNA-seq 解析から得られた JMML で、その遺伝子発現レベルが有意に亢進もしくは低下を示す遺伝子リストの一覧を作製し、TADs 領域に含まれた遺伝子群と統合解析を実行した（図 4)。Hi-C 解析では、染色体上の特定の領域が他の領域とより頻繁に相互作用するコンパートメント A と呼ばれる領域が存在し、その領域では遺伝子が活発に転写されるためにオープンクロマチン領域となり、遺伝子発現に重要な役割を果たす。現在、Hi-C 解析から得られた TADs 領域内の遺伝子発現が特に亢進した領域を検証している。

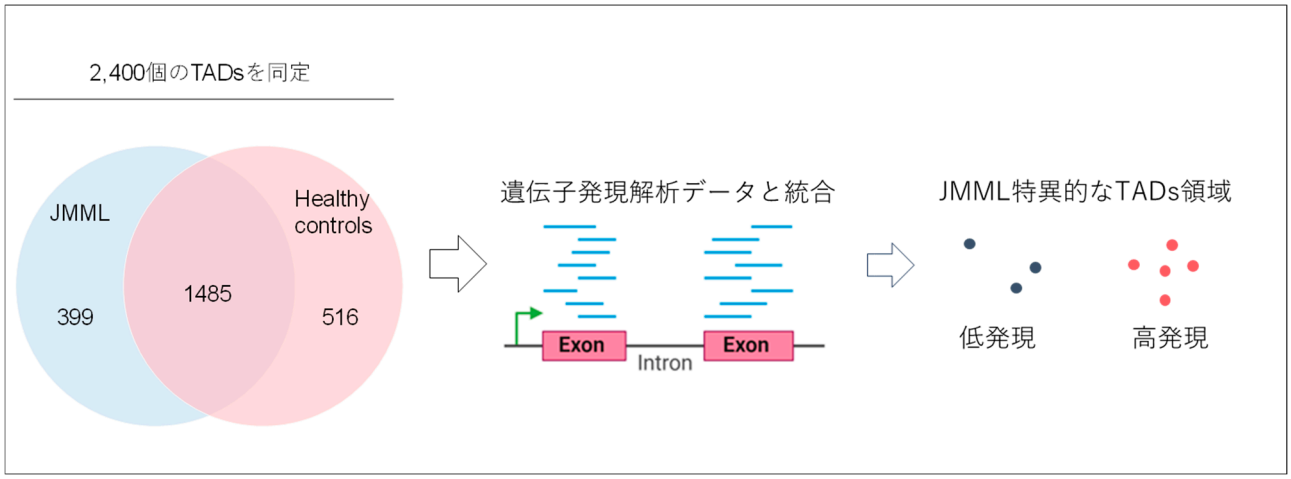


図 4. TADs 領域と遺伝子発現の相互作用

遺伝子発現の空間的な配列、TAD 内の遺伝子の相互作用として、遺伝子発現に及ぼす影響、TAD 内の遺伝子とその周辺の調節要因の相互作用の遺伝子発現の調節メカニズムに関する情報を提供する。

文　献

1) A. Caye, M. Strullu, F. Guidez, B. Cassinat, S. Gazal, O. Fenneteau, E. Lainey, K. Nouri, S. Nakhaei-Rad, R. Dvorsky, J. Lachenaud, S. Pereira, J. Vivent, E. Verger, D. Vidaud, C. Galambrun, C. Picard, A. Petit, A. Contet, M. Poiree, N. Sirvent, F. Mechinaud, D. Adjaoud, C. Paillard, B. Nelken, Y. Reguerre, Y. Bertrand, D. Haussinger, J. H. Dalle, M. R. Ahmadian, A. Baruchel, C. Chomienne, H. Cave, Juvenile myelomonocytic leukemia displays mutations in components of the RAS pathway and the PRC2 network. Nature genetics 47, 1334-1340 (2015). PMID: 26457648 DOI: 10.1038/ng.3420

2) H. Sakaguchi, Y. Okuno, H. Muramatsu, K. Yoshida, Y. Shiraishi, M. Takahashi, A. Kon, M. Sanada, K. Chiba, H. Tanaka, H. Makishima, X. Wang, Y. Xu, S. Doisaki, A. Hama, K. Nakanishi, Y. Takahashi, N. Yoshida, J. P. Maciejewski, S. Miyano, S. Ogawa, S. Kojima, Exome sequencing identifies secondary mutations of SETBP1 and JAK3 in juvenile myelomonocytic leukemia. Nature genetics 45, 937-941 (2013). PMID: 23832011 DOI: 10.1038/ng.2698

3) R. Piazza, S. Valletta, N. Winkelmann, S. Redaelli, R. Spinelli, A. Pirola, L. Antolini, L. Mologni, C. Donadoni, E. Papaemmanuil, S. Schnittger, D. W. Kim, J. Boultwood, F. Rossi, G. Gaipa, G. P. De Martini, P. F. di Celle, H. G. Jang, V. Fantin, G. R. Bignell, V. Magistroni, T. Haferlach, E. M. Pogliani, P. J. Campbell, A. J. Chase, W. J. Tapper, N. C. Cross, C. Gambacorti-Passerini, Recurrent SETBP1 mutations in atypical chronic myeloid leukemia. Nature genetics 45, 18-24 (2013). PMID: 23222956 DOI: 10.1038/ng.2495

4) M. Wakamatsu, Y. Okuno, N. Murakami, S. Miwata, H. Kitazawa, K. Narita, S. Kataoka, D. Ichikawa, M. Hamada, R. Taniguchi, K. Suzuki, N. Kawashima, E. Nishikawa, A. Narita, N. Nishio, S. Kojima, H. Muramatsu, Y. Takahashi, Detection of subclonal SETBP1 and JAK3 mutations in juvenile myelomonocytic leukemia using droplet digital PCR. Leukemia, (2020). PMID:32307441 DOI:10.1038/s41375-020-0817-x

5) N. Murakami, Y. Okuno, K. Yoshida, Y. Shiraishi, G. Nagae, K. Suzuki, A. Narita, H. Sakaguchi, N. Kawashima, X. Wang, Y. Xu, K. Chiba, H. Tanaka, A. Hama, M. Sanada, M. Ito, M. Hirayama, A. Watanabe, T. Ueno, S. Kojima, H. Aburatani, H. Mano, S. Miyano, S. Ogawa, Y. Takahashi, H. Muramatsu, Integrated molecular profiling of juvenile myelomonocytic leukemia. Blood 131, 1576-1586 (2018). PMID: 29437595 DOI: 10.1182/blood-2017-07-798157

6) E. Stieglitz, T. Mazor, A. B. Olshen, H. Geng, L. C. Gelston, J. Akutagawa, D. B. Lipka, C. Plass, C. Flotho, F. F. Chehab, B. S. Braun, J. F. Costello, M. L. Loh, Genome-wide DNA methylation is predictive of outcome in juvenile myelomonocytic leukemia. Nature communications 8, 2127 (2017). PMID: 29259179 DOI: 10.1038/s41467-017-02178-9

7) D. B. Lipka, T. Witte, R. Toth, J. Yang, M. Wiesenfarth, P. Nollke, A. Fischer, D. Brocks, Z. Gu, J. Park, B. Strahm, M. Wlodarski, A. Yoshimi, R. Claus, M. Lubbert, H. Busch, M. Boerries, M. Hartmann, M. Schonung, U. Kilik, J. Langstein, J. A. Wierzbinska, C. Pabst, S. Garg, A. Catala, B. De Moerloose, M. Dworzak, H. Hasle, F. Locatelli, R. Masetti, M. Schmugge, O. Smith, J. Stary, M. Ussowicz, M. M. van den Heuvel-Eibrink, Y. Assenov, M. Schlesner, C. Niemeyer, C. Flotho, C. Plass, RAS-pathway mutation patterns define epigenetic subclasses in juvenile myelomonocytic leukemia. Nature communications 8, 2126 (2017). PMID: 29259247 DOI: 10.1038/s41467-017-02177-w

8) M. Kadota, O. Nishimura, H. Miura, K. Tanaka, I. Hiratani, S. Kuraku, Multifaceted Hi-C benchmarking: what makes a difference in chromosome-scale genome scaffolding? Gigascience 9, (2020). PMID: 31919520 DOI: 10.1093/gigascience/giz158

9) S. S. Rao, M. H. Huntley, N. C. Durand, E. K. Stamenova, I. D. Bochkov, J. T. Robinson, A. L. Sanborn, I. Machol, A. D. Omer, E. S. Lander, E. L. Aiden, A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. Cell 159, 1665-1680 (2014). PMID: 25497547 DOI: 10.1016/j.cell.2014.11.021