

## 主論文の要旨

### **Exome sequencing identifies secondary mutations of *SETBP1* and *JAK3* in juvenile myelomonocytic leukemia**

（ エクソーム解析による若年性骨髄単球性白血病における  
2次変異としての *SETBP1* および *JAK3* 遺伝子変異の同定 ）

名古屋大学大学院医学系研究科 健康社会医学専攻

発育・加齢医学講座 小児科学分野

(指導：小島 勢二 教授)

坂口 大俊

## 【緒言】

若年性骨髄単球性白血病(以下、JMML)は幼少期に稀に発症する骨髄異形成症候群/骨髄増殖性疾患であり、骨髄単球細胞の過剰増生と顆粒球単球コロニー刺激因子に対する高感受性によって特徴付けられる。その遺伝学的な特徴としては *PTPN11*, *NF1*, *NRAS*, *KRAS*, *c-CBL* 遺伝子などの RAS シグナル伝達経路関連遺伝子の体細胞変異または生殖細胞系列変異が、JMML と診断された患者の 70%以上の症例で相互排他的に検出される。しかしながら、RAS シグナル伝達経路関連遺伝子の変異だけで JMML の発症や進展に十分であるかは未だ明らかになっていない。本研究では JMML の分子病理学的背景をより明確なものとするを目的とした。

## 【対象および方法】

### 患者

日本国内の医療施設にて JMML と診断された 92 例を対象とした。男児 61 例、女児 31 例で、診断時年齢中央値は 16 カ月、範囲は 1-160 カ月であった。7 例はヌーナン症候群に伴う骨髄増殖性疾患(NS/MPD)であった。本研究計画は名古屋大学大学院医学系研究科および共同研究機関の各倫理委員会で承認された。本研究での検体および臨床情報の利用について、各施設主治医からの十分な説明の下、親権者から書面による同意を得た。各施設から臨床情報と 1 年毎の経過レポートを回収した。

### エクソーム解析

92 例の内、検体量が十分準備できた 13 例においてエクソーム解析を行った。診断時の骨髄細胞から抽出したゲノム(腫瘍由来ゲノム)と、末梢血由来の PHA blast 細胞(1 例のみ臍帯組織)から抽出したゲノム(正常ゲノム)をペアとして、エクソーム解析に用いた。超音波破砕で断片化した全ゲノムからエクソーム領域を回収するのに Agilent Technology 社の Sure Select を使用し、解析には Illumina 社の HiSeq 2000 を使用した。同一症例のペア検体の解析結果を比較し、腫瘍特異的変異を求めた。各種公開データベースや in-house データベースにより正常遺伝多型を除外し、残った候補遺伝子変異について、元のペア検体を鋳型に Sanger 法で解析した。

### アンプリコン解析

既知の遺伝子 (*PTPN11*, *NF1*, *NRAS*, *KRAS*, *c-CBL*) とエクソーム解析により新たに同定された遺伝子(3種類)の全エクソンに対応する NotI リンカー付プライマーを作成し、これを用いて JMML92 症例それぞれの各 PCR 産物を作成し、症例毎にプールし、NotI 制限酵素処理、Ligation 反応、超音波破砕の行程を経たゲノム断片を次世代シーケンサーで解析した。検出した変異の内、変異アレル頻度が 0.15 以上のものは Sanger 法による解析で変異を確認した。

## 【結果】

### エクソーム解析

エクソーム解析の Mean depth は 140 回であり、全ての症例でエクソームの 80%

以上の領域で 20 回以上の depth で解析が行われた。その結果、表 1 で示す様に、13 例中 11 例で、既知の RAS シグナル伝達経路関連遺伝子の変異を相互排他的に同定した。さらに 3 例で新規の体細胞変異を同定した。*SETBP1* p.Asp868Asn 変異は 3 例で共通して認め、*JAK3* p.Arg657Gln 変異および *SH3BP1* p.Ser277Leu 変異は 1 例で認めた。

### アンプリコン解析

過半のエクソンで 10,000 回以上、ほぼ全てのエクソンで 1,000 回以上の depth で解析が行われた。解析の結果、表 2 および図 1 で示す様に、RAS シグナル伝達経路関連は、39 例で *PTPN11* 変異、9 例で *NF1* 変異、15 例で *NRAS* 変異、13 例で *KRAS* 変異、10 例で *c-CBL* 変異を認め、10 例ではこれら既知の遺伝子変異を認めなかった。一方で、新規に同定した 3 つの遺伝子の内、*SETBP1* は 6 例で、*JAK3* は 11 例で、それぞれ変異を認め、*SH3BP1* 遺伝子は元の 1 例以外では変異を認めなかった。*SETBP1* 変異の 6 例全ては SKI ドメイン内での変異であり、内 4 例は p.Asp868Asn 変異であった。また、*JAK3* 変異の 11 例全ては Pseudo-kinase ドメイン内での変異であり、内 8 例は Arg657Gln 変異であった。*SETBP1* または *JAK3* 変異を認めた 16 例の内、14 例は *PTPN11* または *NF1* 変異を重複して有していた。図 2 で示す様に、RAS シグナル伝達経路関連遺伝子変異と *SETBP1* または *JAK3* 変異を重複して有した症例では、後者の変異アレル頻度が前者より低い傾向を認めた。*SETBP1* または *JAK3* 変異は Secondary 変異と定義した。

### 臨床経過との相関

表 2 および図 2 に示す様に *PTPN11* または *NF1* 変異を有す症例ではそれ以外の症例に比べて、Secondary 変異を重複して有す頻度が有意に高かった。また、造血細胞移植を受けなくとも生存している症例には Secondary 変異を 1 例も認めなかった。Secondary 変異(+)群(n=16)は Secondary 変異(-)群(n=76)と比較して、5 年全生存率は低い傾向(ハザード比 1.90、95%信頼区間 0.87-4.19、P 値=0.10)を示し、5 年無移植生存率は統計学的に有意に低かった(ハザード比 2.18、95%信頼区間 1.18-4.02、P 値=0.007)。

### **【考察】**

本研究では次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析によって、JMML92 例中 82 例で RAS シグナル伝達経路関連遺伝子の変異を検出することができた。中でも *NF1* 遺伝子は非常に大きな遺伝子であり、Sanger 法による遺伝子解析を全症例で行うことは非常に困難であり通常は行われないことから、今回の解析で JMML に占める *NF1* 遺伝子の変異頻度を同定できたことは特筆に値する。一方で 92 例中 10 例では変異を検出できなかった。エクソーム解析ではカバーしきれない領域での変異や欠失は今回の解析では検出できない可能性があり、こうした症例での遺伝子解析は今後の課題である。

本研究ではまた、JMML の新規の体細胞変異として *SETBP1* と *JAK3* が同定された。*SETBP1* は 18q23.1 にコードされる 170kD の核内タンパクである。SET に結合し安定化させ、癌抑制遺伝子である *PPT2A* や *NM23-H1* の働きを抑制する。これまでに、急性骨髄性白血病や T 細胞性急性リンパ性白血病の一部では染色体転座などにより *SETBP1* の発現量が増し、予後不良と相関したとの報告がある。今回、JMML で同定された *SETBP1* 変異はいずれも、Schinzel-Giedion 症候群という先天性疾患で認められた生殖系列細胞変異(Hoischen ら、2010 年 Nature Genetic 誌)や成人の非定型慢性骨髄性白血病の多数例に認められた体細胞変異(Piazza ら、2013 年 Nature Genetic 誌)の部位と同一部位であり、SKI ドメインに集中していた。この部位は E3 ユビキチンリガーゼの結合部位であり、変異が入ることでユビキチン化が阻害され、SETBP1 は分解から免れることになる。これにより、SET の安定化が促進され、*PPT2A* や *NM23-H1* の働きを抑制し、癌の進展に寄与するものと考えられる(図 3)。また、今回同定された *JAK3* 変異は Pseudo-kinase ドメイン内での変異であり、多くの血液悪性腫瘍での変異と同様、変異により自己抑制が外れることで、STAT5 のリン酸化経路が恒常的に活性化され白血病の進展につながると考えられる(図 3)。

#### 【結語】

エクソーム解析により JMML の分子病理学的背景をより明確なものとすることができた。*SETBP1* および *JAK3* 変異は JMML の Secondary 変異として多症例で共通して認め、予後不良との相関を認めた。