

令和 元年 5 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09836

研究課題名(和文)次世代シーケンスによる再発難治性急性白血病のゲノム構造の解析

研究課題名(英文)Analysis of genome structure of relapse/refractory acute leukemia by next generation sequencing

研究代表者

小野澤 真弘 (Onozawa, Masahiro)

北海道大学・病院・講師

研究者番号：70455632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では白血病細胞の放射線、化学療法によるDNA損傷に起因するゲノム構造の変化について、次世代シーケンス技術を用いて網羅的に解析することを目指した。体細胞性変異としてのゲノム損傷修復の蓄積は、癌抑制遺伝子の発現喪失などを通して発癌や治療抵抗性の獲得に直接関わっている可能性がある。細胞株を用いたCRISPRによる部位特異的なDNA切断では、DNA二重鎖切断部位が様々な長さの欠失あるいは配列挿入で修復されることを確認した。2種類のヒト白血病細胞株とその派生細胞株で全ゲノムシーケンスを行なった。腫瘍特異的な挿入欠失を含むリードを抽出する方法を検討し解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍細胞ではゲノム損傷修復機能が活性化しており、放射線や化学療法で治療しても、DNAのダメージを乗り越えて生き残る細胞が再発をきたすと考えられる。一塩基置換による遺伝子機能の活性化とは別に、放射線や化学療法によるDNA切断部位は欠失挿入による傷をゲノム上に残して修復される。正常細胞と比べて、腫瘍細胞のゲノム構造がどれほど傷ついた状態であるかを数値化することができれば、その値は治療反応性や予後と相関する可能性がある。このコンセプトを確かめるためには、現在の次世代シーケンスよりも、より長い塩基数をより正確に安価に読み取る技術と専用の解析アルゴリズムの開発が必要であることも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：This project aim to analyze the change of genome structure of acute leukemia due to DNA damage induced by irradiation or chemotherapy using next generation sequencing. Accumulation of somatic mutations due to DNA repair might contribute leukemogenesis or acquired resistance to chemotherapy through loss of expression of tumor suppressor. We confirmed that artificially induced site specific DNA double strand break were repaired by various length of deletion or templated sequence insertion. We analyze 2 sets of human leukemic cell lines and its daughter clone by whole genome sequencing. We examined several methodology to elute meaningful sequence reads which contained tumor specific somatic indels.

研究分野：造血器腫瘍

キーワード：ゲノム損傷

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

臨床的には初発白血病クローンと再発白血病クローンは治療反応性、予後の面で明らかに異なる。しかし、その細胞生物学的な違いがどこから来るかについては明らかにされていない。近年、次世代シーケンズ技術の発展により、主に全エクソンシーケンズによって白血病における、recurrent な遺伝子変異が多数明らかにされて来た。これらは主に遺伝子エクソン領域の一塩基置換 (SNV) によって遺伝産物の機能変化を伴う変異である。これらの SNV の組み合わせによって、白血病クローン間の系統樹が作成可能であるが、SNV の組み合わせによるクローンの分類では、初発白血病クローンと再発クローン、De Novo 白血病と二次性白血病や骨髄異形成症候群から移行した白血病を見分ける事はできない。放射線や化学療法は、その直接作用および間接作用で DNA を切断することが知られている。本研究では、度重なる DNA 損傷とミス修復が蓄積し、それを生き抜いた細胞が再発難治性白血病としてクローン増殖すると仮定し、DNA 損傷部位数を定量化することで、初発白血病と再発難治性白血病のゲノム構造の違いから、両者の細胞生物学的、臨床の違いを見いだすことを目標とした。

現在の次世代シーケンズ技術は短いリード (150-300bp) を大量並列で読み、コンピューターでアセンブル、リファレンス配列へのアライメントを行うことでゲノム配列を解析する。この方法では SNP や 50bp 未満の短い欠失挿入 (Indel) については信頼性高く検出することが可能であり、腫瘍ゲノムにおいても解析が進んでいるが、50bp 以上の長い Indel や、構造変異 (SV) については信頼性、検出率が低く解析が進んでいない。特にリファレンス配列へのアライメントでは、アライメントされないリードは排除されるため、リファレンス配列にない腫瘍特異的の体細胞変異としての構造変異を検出するには新たな解析アルゴリズムが必要となる。

### 2. 研究の目的

本研究では白血病細胞の放射線、化学療法による DNA 損傷に起因するゲノム構造の変化について、次世代シーケンズ技術を用いて網羅的に解析する。体細胞性変異としてのゲノム損傷修復の蓄積は、癌抑制遺伝子の発現喪失などを通して発癌や治療抵抗性の獲得に直接関わっている可能性がある。初発クローンと再発クローンでのゲノム構造の違いを明らかにし、ゲノム上に放射線あるいは化学療法薬剤に対する感受性部位が存在するかどうかを検討する。正常細胞と比べて、腫瘍細胞のゲノム構造がどれほど傷ついた状態であるかを数値化することができれば、その値は治療反応性や予後と相関する可能性があるとともに、二次性白血病診断の客観的指標となる可能性がある。

### 3. 研究の方法

細胞内での DNA 二重鎖切断修復の網羅的解析

ゲノム編集技術である CRISPR を用い、特定部位 (RUNX1, Flt3) に導入した DNA 二重鎖切断 (DNA-DSB) がどのように修復されるかを確認する。CRISPR の発現後に bulk の細胞を回収し、ゲノム検体を精製し、切断部位を挟むプライマーにより増幅した PCR 産物をディープシーケンズすることで、1カ所の DNA-DSB がどのように修復されるかを検討した。

細胞株と派生クローンを用いた解析

ヒト白血病細胞株を Etopocide、放射線で処理した上で、限界希釈により細胞を撒き、これらの処置を生き延びた細胞を 1細胞由来のクローンとして樹立した。得られた娘細胞株の全ゲノムシーケンズデータを親細胞株と比較する事で、処置によって新たに生じた DNA 損傷修復部位を網羅的に定量的に検出する。

### 4. 研究成果

細胞内での DNA 二重鎖切断修復の網羅的解析

細胞株を用いた CRISPR による部位特異的な DNA 切断では、DNA 二重鎖切断部位が様々な長さの欠失あるいは配列挿入で修復されることを確認した。多くは短い (<50bp) Indel で修復されるが、稀に長い (>50bp) 欠失や離れた染色体部位の配列挿入が起きることが明らかとなった。興味深いことに Flt3 に導入した DNA 切断は、その一部が内部配列反復 (Internal tandem duplication, ITD) によって修復されたが、RUNX1 での切断では ITD は観察されなかった。急性骨髄性白血病における予後不良因子である Flt3-ITD が、同部位のゲノム切断をきっかけとして発生していることを示唆する所見と考えられた。

細胞株と派生クローンを用いた解析

抗がん剤や放射線照射によるゲノム損傷を網羅的に解析するため、ヒト白血病細胞株を Etopocide、放射線照射で処理した上で、限界希釈により細胞を撒き、これらの処置を生き延びた娘細胞を 1細胞由来のクローンとして樹立し、親株とともに全ゲノムシーケン

ス(WGS)を行った。当初構造変異(SV)データに着目して、娘細胞特異的な変異を解析したが、構造変異の長い配列(数 100bp)の相同性は、わずかな塩基置換でも、異なるものとして解析されるため、ほとんどの構造変異が親株と娘株で一致しなかった。テロメラーゼによるゲノム修復が(TTAGGG)<sub>n</sub>の挿入配列で起きることに注目し、WGS データから(TTAGGG)の繰り返し配列を含むリードを抽出することで、大幅に扱うデータサイズを縮小した。リファレンスゲノムにはない(TTAGGG)<sub>n</sub> 配列挿入は、腫瘍の体細胞変異である可能性があり、その定量値はゲノム損傷修復を繰り返した後の再発難治性白血病で高い可能性がある。各シーケンスリードをアライメントし、リファレンスゲノムにはない(TTAGGG)<sub>n</sub> 挿入リードを抽出するための方法論を検討している。

次世代シーケンス技術による全ゲノムシーケンスが可能となったが、1 サンプルあたりのシーケンス費用が高額であり、多くのサンプルを解析することはできなかった。経年によるコスト減を期待したが、本邦においては本研究期間のシーケンスコストが期待したほど下がらなかった。また解析費用がシーケンス以上に高額であった。このコンセプトを確かめるためには、現在の次世代シーケンスよりも、より長い塩基数をより正確に安価に読み取る技術と専用の解析アルゴリズムの開発が必要であることも明らかとなった。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Frequent structural variations involving programmed death ligands in Epstein-Barr virus-associated lymphomas.

Kataoka K, Miyoshi H, Sakata S, Dobashi A, Couronné L, Kogure Y, Sato Y, Nishida K, Gion Y, Shiraishi Y, Tanaka H, Chiba K, Watatani Y, Kakiuchi N, Shiozawa Y, Yoshizato T, Yoshida K, Makishima H, Sanada M, Onozawa M, Teshima T, Yoshiki Y, Ishida T, Suzuki K, Shimada K, Tomita A, Kato M, Ota Y, Izutsu K, Demachi-Okamura A, Akatsuka Y, Miyano S, Yoshino T, Gaulard P, Hermine O, Takeuchi K, Ohshima K, Ogawa S. *Leukemia*. 2019 Jan 25. doi: 10.1038/s41375-019-0380-5. (査読有り)

Quantitative detection of IKZF1 deletion by digital PCR in patients with acute lymphoblastic leukemia.

Hashiguchi J, Onozawa M, Okada K, Amano T, Hatanaka KC, Nishihara H, Sato N, Teshima T.

*Int J Lab Hematol*. 2019 Apr;41(2):e38-e40. doi: 10.1111/ijlh.12945. (査読有り)

Wilms Tumor 1 Expression at Diagnosis Correlates With Genetic Abnormalities and Polymorphism But Is Not Independently Prognostic in Acute Myelogenous Leukemia: A Hokkaido Leukemia Net Study.

Hidaka D, Onozawa M, Hashiguchi J, Miyashita N, Kasahara K, Fujisawa S, Hayase E, Okada K, Shiratori S, Goto H, Sugita J, Nakagawa M, Hashimoto D, Kahata K, Endo T, Yamamoto S, Tsutsumi Y, Haseyama Y, Nagashima T, Mori A, Ota S, Sakai H, Ishihara T, Imai K, Miyagishima T, Kakinoki Y, Kurosawa M, Kobayashi H, Iwasaki H, Shimizu C, Kondo T, Teshima T.

*Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2018 Nov;18(11):e469-e479. doi: 10.1016/j.clml.2018.07.291. (査読有り)

Development of a Fluorescence in Situ Hybridization Probe for Detecting IKZF1 Deletion Mutations in Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia.

Hashiguchi J, Onozawa M, Oguri S, Fujisawa S, Tsuji M, Okada K, Nakagawa M, Hashimoto D, Kahata K, Kondo T, Shimizu C, Teshima T.

*J Mol Diagn*. 2018 Jul;20(4):446-454. doi: 10.1016/j.jmoldx.2018.02.005. (査読有り)

Templated Sequence Insertion Polymorphisms in the Human Genome.

Onozawa M, Aplan PD.

*Front Chem*. 2016 Nov 16;4:43. (査読有り)

Cytogenetically Unrelated Clones in Acute Myeloid Leukemia Showing Different Responses to Chemotherapy.

Kasahara K, Onozawa M, Miyashita N, Yokohata E, Yoshida M, Kanaya M, Kosugi-Kanaya M, Takemura R, Takahashi S, Sugita J, Shigematsu A, Takahata M, Fujisawa S, Hashimoto D, Fujimoto K, Endo T, Kondo T, Teshima T.

*Case Rep Hematol*. 2016;2016:2373902. doi: 10.1155/2016/2373902. (査読有り)

〔学会発表〕(計 4 件)

Hidaka D, Onozawa M, Hashiguchi J, Miyashita N, Kasahara K, Fujisawa S, Hayase E, Okada K, Shiratori S, Goto H, Sugita J, Nakagawa M, Kahata K, Hashimoto D, Endo T, Yamamoto S, Tsutsumi Y, Haseyama Y, Nagashima T, Mori A, Ota S, Imai K, Miyagishima T, Kakinoki Y, Kurosawa M, Iwasaki H, Shimizu C, Kondo T, Teshima T

Wilms tumor 1 expression in acute myelogenous leukemia correlates with cytogenetics or collaborative mutations: Hokkaido Leukemia Net study

第 23 回欧州血液学会ストックホルム, スウェーデン 2018 年 6 月

日高 大輔, 小野澤 真弘, 橋口 淳一, 笠原 耕平, 宮下 直洋, 藤澤 真一, 森岡 正信, 太田 秀一, 山本 聡, 柿木 康孝, 宮城島 拓人, 堤 豊, 長谷山 美仁, 石原 敏道, 黒澤 光俊, 小林 一, 岩崎 博, 永嶋 貴博, 酒井 基, 清水 力, 近藤 健, 豊嶋 崇徳

同種造血幹細胞移植例における AML の予後分類の有用性 ~北海道白血病ネットの症例解析を通じて~

第 40 回日本造血細胞移植学会総会 札幌 2018 年 2 月

小野澤 真弘, 日高 大輔, 橋口 淳一, 宮下 直洋, 藤澤 真一, 早瀬 英子, 山本 聡, 堤 豊, 長谷山 美仁, 永嶋 貴博, 盛 暁生, 太田 秀一, 酒井 基, 石原 敏道, 宮城島 拓人, 柿木 康孝, 黒澤 光俊, 小林 一, 岩崎 博, 近藤 健, 豊嶋 崇徳

WT1 expression at onset of AML correlated collaborative cytogenetic abnormality and WT1 SNP status

第 80 回日本血液学会学術集会 大阪 2018 年 10 月

橋口 淳一, 小野澤 真弘, 藤澤 真一, 高橋 秀一郎, 宮下 直洋, 早瀬 英子, 白鳥 聡一, 後藤 秀樹, 杉田 純一, 中川 雅夫, 橋本 大吾, 加畑 馨, 遠藤 知之, 山本 聡, 堤 豊, 長谷山 美仁, 永嶋 貴博, 盛 暁生, 太田 秀一, 宮城島 拓人, 柿木 康孝, 黒澤 光俊, 岩崎 博, 近藤 健, 豊嶋 崇徳

成人急性リンパ性白血病における IKZF1 欠失および CRLF2 発現の解析

第 80 回日本血液学会学術集会 大阪 2018 年 10 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年:  
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。