

令和元年6月6日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09856

研究課題名(和文) 難治性リンパ腫におけるMYC, PVT1再構成・発現の解析と臨床応用

研究課題名(英文) Molecular cytogenetic studies of MYC and PVT1 rearrangements in refractory and relapsed lymphoma

研究代表者

谷脇 雅史 (Taniwaki, Masafumi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：80163640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：びまん性大細胞型Bリンパ腫(DLBCL)細胞株のdouble-color FISH(DC-FISH)解析で、add(8)(q24)とder(14)t(14;16)によるIGH遺伝子への8q24領域の挿入と診断した。独自に作成したPVT1プローブにより、8q24切断点をlncRNA PVT1のexons1-2に同定し、RNA-SeqによりPVT1-ELK2APキメラを見出した。別のDLBCL細胞株で、派生染色体der(8)の均一染色部位におけるMYCの高度増幅を認めた。8q24増幅単位のサイズは1.4Mbであり、MYCとPVT1の両者を含んでおり、FISHでもPVT1の高度増幅を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非ホジキンリンパ腫の難治性に関与する新規分子異常が同定できれば、診断や適切な治療法選択の指標と応用できる。そのためには、PVT1キメラをゲノムやmRNAレベルで迅速に検出する臨床検査法の確立が重要であり、PCRやFISHによって日常診療への導入が促進される。さらに、新規分子異常が同定は新規治療薬の開発にも寄与する。新規分子異常に基づいた層別化あるいはリスク分類を確立し、適切な治療戦略が立案できれば、難治性であるがゆえの過剰治療を回避することが可能である。人口構成が高齢化するなか非ホジキンリンパ腫の罹患率は上昇しているため、本研究の社会的ならびに医療経済的なインパクトは大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have detected alteration of long noncoding RNA (lncRNA) PVT1 gene in two diffuse large B-cell lymphoma cell lines; chimeric gene in one and high-magnitude amplification in the other. Fluorescence in situ hybridization (FISH) using own two original FISH probes, PVT1-adjacent (PVT1-A) and PVT1-spanning (PVT1-S), demonstrated a breakpoint of the chimeric gene around exons 1-2 of PVT1. RNAseq analysis identified this chimeric gene as PVT1-ELK2AP. High-magnitude amplification of PVT1 gene was found on homogeneously staining region at the derivative chromosome 8 as detected by FISH with PVT1-S probe. The amplicon harbored both MYC and PVT1 gene, the size of which was 1.4Mb. The current study suggests that chimeric formation and amplification of lncRNA PVT1 gene may contribute to the pathophysiology and the molecular mechanism of refractoriness to treatment in diffuse large B-cell lymphoma.

研究分野：血液腫瘍

キーワード：難治性リンパ腫 8q24染色体異常 キメラmRNA PVT1 long noncoding RNA 遺伝子増幅

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

1. 研究開始当初の背景

8q24 染色体異常は MYC 過剰発現に関連し予後不良因子である。非ホジキンリンパ腫 (NHL) と多発性骨髄腫 (MM) で高頻度であり、急性骨髄性白血病 (AML) でも認められ、血液腫瘍の発生や進展に共通した分子メカニズムが推定される。我々は、8q24 染色体異常における切断点の多くは、MYC の約 54Kb 下流に存在する long non-coding RNAs (lncRNA) である PVT1 にあることを見出した。MM では、高頻度に PVT1 に切断点を認め、8q24 染色体異常 (22.2%) のうち約 60% を占めており、PVT1-NBEA と PVT1-WWOX のキメラ mRNA を見出した (Nagoshi H et al., Cancer Res 2012)。MM におけるキメラ遺伝子として初めての知見である。

さらに、8q24 増幅を認めた AML で、8q24 に存在する遺伝子間のキメラ PVT1-NSMCE2 と CCDC26-NSMCE2 を新たに同定した (Chinen et al. J Hematol Oncol. 2014)。CCDC26 も lncRNA である。PVT1 キメラは固形がんでも報告が多く、相手遺伝子は CHD7, NDG1, MYC, APIP, PDHX, ATE1, PRAPDC1A などである。

びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) では約 20% に 8q24 転座・増幅を認め、成人 T 細胞白血病リンパ腫では、8q24 切断点が 10p13, 14q11, 14q32 と並んで高頻度である (Hidaka et al. Blood 2008)。8q24 領域の切断点は広範囲に分布しており (Bertrand P et al. Leukemia. 2007)、我々の検討でも、切断点が PVT1 にある場合が稀でなかった (Tsutumi et al. Leuk Lymphoma. 2013)。

DLBCL では、8q24 増加が MYC mRNA の高発現に関与し、再発の多い傾向が報告されている (Stasik CJ, et al. Haematologica. 2010)。乳がんや卵巣がんでは、PVT1 増幅が造腫瘍性に関与しており、siRNA によって増殖が抑制される (Guan Y et al. Clin Cancer Res 2007)。また、MYC 蛋白質が PVT1 の転写を促進し、lncRNA の PVT1 は MYC 蛋白質を安定化し腫瘍発生と増悪に関与することが示唆されている (Tseng YY et al. Nature 2014)。

2. 研究の目的

- (1) 難治性リンパ腫の 8q24 転座・増幅を解析し、腫瘍化に関与する候補遺伝子を同定する。
- (2) PVT1 再構成を検出した場合には、切断点とキメラ形成の相手遺伝子を同定する。
- (3) PVT1 キメラ mRNA と MYC 蛋白質発現の関連性を検討し、腫瘍化への関与を解析する。
- (4) 同定した遺伝子再構成と臨床所見の関連性について検討し、治療選択の指標とする。

3. 研究の方法

(1) 8q24 染色体転座・増幅の同定と DNA 切断点の解析

DLBCL と ATLL の樹立細胞株と臨床検体を対象とし、G 染色と SKY で核型を解析する。8q24 転座は、MYC Break Apart probe (Vysis) でスクリーニングし、BAC probe PVT1-A、PVT1-S による FISH で同定する。

(2) PVT1 再構成などのキメラ mRNA と相手遺伝子の同定

SKY と array CGH の結果を統合し、8q24 の DNA 増幅領域と切断点を同定する。RT-PCR でキメラ産物を検出し、増幅産物の塩基配列を決定する。コーディング領域に切断点がある場合には、cDNA bubble PCR で PVT1 キメラの相手遺伝子を同定する。

(3) PVT1 mRNA, MYC mRNA, MYC 蛋白質の発現解析

RT-PCR と real-time PCR で、PVT1 mRNA, MYC の mRNA 発現を解析する。ウエスタンブロットと免疫組織化学で MYC タンパク質の発現を解析する。

(4) 臨床像と予後あるいは治療反応性との関連性の検討

4 . 研究成果

DLBCL 樹立細胞株の double-color FISH (DC-FISH) 解析では add(8)(q24) と der(14)t(14;16)(p11.2;q11.2)に *MYC-IGH* 融合シグナルを検出し, *MYC* 遺伝子の *IGH* 遺伝子への挿入と診断した. *PVT1* をはさむ” PVT1-adjacent (PVT1-A)”と, *PVT1* のみをカバーする” PVT1-spanning (PVT1-S)”の独自に作成したプローブを用いた DC-FISH により, 8q24 異常切断点を *PVT1* exons1-2 に同定した. RNA-Seq により *PVT1-ELK2AP* キメラを見出した. 別の DLBCL 症例から樹立された細胞株の SKY 解析により, 第 8 染色体由来の派生染色体を der(8)(8pter 8q24::hsr::6p21 6pter)と同定した. DC-FISH 解析では, LSI LSI IGH/MYC プローブ (VYSIS) により *MYC-IGH* 融合と *IGH* 転座は認めなかったが, der(8)の均一染色部位 (homogeneously staining region, hsr) における *MYC* 遺伝子の高度増幅を認めた. オリゴヌクレオチドアレイ解析から 8q24 における増幅単位のサイズは 1.4Mb であり, *MYC* 遺伝子と *PVT1* 遺伝子の両者が含まれていた. PVT1-A プローブを用いた FISH では, *PVT1* 遺伝子の高度増幅が確認できた. 長鎖非コード RNA (lncRNA) である *PVT1* は, キメラ遺伝子形成と高度増幅によってタンパク質に翻訳されずに難治性リンパ腫の分子病態に關与する可能性がある.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

- 1) Takimoto-Shimomura T, Tsukamoto T, Maegawa S, Fujibayashi Y, Matsumura-Kimoto Y, Mizuno Y, Chinen Y, Shimura Y, Mizutani S, Horiike S, Taniwaki M, Kobayashi T, Kuroda J. Dual targeting of bromodomain-containing 4 by AZD5153 and BCL2 by AZD4320 against B-cell lymphomas concomitantly overexpressing c-MYC and BCL2. Invest New Drugs. 2019;37(2):210-222. 査読あり .
- 2) Mizuno Y, Chinen Y, Tsukamoto T, Takimoto-Shimomura T, Matsumura-Kimoto Y, Fujibayashi Y, Kuwahara-Ota S, Fujino T, Nishiyama D, Shimura Y, Kobayashi T, Horiike S, Taniwaki M, Kuroda J. A novel method of amplified fluorescent in situ hybridization for detection of chromosomal microdeletions in B cell lymphoma. Int J Hematol. 2019;109(5):593-602. 査読あり .
- 3) Taniwaki M, Yoshida M, Matsumoto Y, Shimura K, Kuroda J, Kaneko H. Elotuzumab for the Treatment of relapsed or refractory multiple myeloma, with special reference to its modes of action and SLAMF7 signaling. Mediterr J Hematol Infect Dis. 2018;10(1):e2018014. 査読あり .
- 4) Mizuno Y, Tsukamoto T, Kawata E, Uoshima N, Uchiyama H, Yokota I, Maegawa S, Takimoto T, Tanba K, Matsumura-Kimoto Y, Kuwahara-Ota S, Fujibayashi Y, Yamamoto-Sugitani M, Chinen Y, Shimura Y, Horiike S, Taniwaki M, Kobayashi T, Kuroda J. Chromosomal abnormality variation detected by G-banding is associated with prognosis of diffuse large B-cell lymphoma treated by R-CHOP-based therapy. Cancer Med. 2018;7(3):655-664. 査読あり .
- 5) Tanba K, Chinen Y, Uchiyama H, Uoshima N, Shimura K, Fuchida S, Kiyota M, Nakao M, Shimura Y, Kobayashi T, Horiike S, Wada K, Shimazaki C, Kaneko H, Kobayashi Y, Taniwaki M, Kuroda J. Prognostic impact of a past or synchronous second cancer in diffuse

large B cell lymphoma. *Blood Cancer J.* 2018;8(1):1. 査読あり .

6) Mizuno S, Hanamura I, Ota A, Karnan S, Kanasugi J, Nakamura A, Takasugi S, Uchino K, Horio T, Goto M, Murakami S, Gotou M, Yamamoto H, Watarai M, Shikami M, Hosokawa Y, Miwa H, Taniwaki M, Ueda R, Nitta M, Takami A. Establishment and characterization of a novel vincristine-resistant diffuse large B-cell lymphoma cell line containing the 8q24 homogeneously staining region. *FEBS Open Bio.* 2018;8(12):1977-1991. 査読あり .

7) Watanabe T, Tobinai K, Wakabayashi M, Morishima Y, Kobayashi H, Kinoshita T, Suzuki T, Yamaguchi M, Ando K, Ogura M, Taniwaki M, Uike N, Yoshino T, Nawano S, Terauchi T, Hotta T, Nagai H, Tsukasaki K; JCOG0203 Collaborators. Outcomes after R-CHOP in patients with newly diagnosed advanced follicular lymphoma: a 10-year follow-up analysis of the JCOG0203 trial. *Lancet Haematol.* 2018;5(11):e520-e531. 査読あり .

8) Takimoto-Shimomura T, Nagoshi H, Maegawa S, Fujibayashi Y, Tsukamoto T, Matsumura-Kimoto Y, Mizuno Y, Chinen Y, Mizutani S, Shimura Y, Horiike S, Taniwaki M, Kobayashi T, Kuroda J. Establishment and characteristics of a novel mantle cell lymphoma-derived cell line and a bendamustine-resistant subline. *Cancer Genomics Proteomics.* 2018;15(3):213-223. 査読あり .

9) Okuda T, Taki T, Nishida K, Chinen Y, Nagoshi H, Sakakura C, Taniwaki M. Molecular heterogeneity in the novel fusion gene APIP-FGFR2: Diversity of genomic breakpoints in gastric cancer with high-level amplifications at 11p13 and 10q26. *Oncol Lett.* 2017;13(1):215-221. 査読あり .

10) Tsukamoto T, Kiyota M, Kawata E, Uoshima N, Tatekawa S, Chinen Y, Nagoshi H, Mizutani S, Shimura Y, Yamamoto-Sugitani M, Kobayashi T, Horiike S, Yasukawa S, Yanagisawa A, Taniwaki M, Kuroda J. Detection of chromosomal abnormalities by G-banding and prognostic impact in follicular lymphoma in the rituximab era. *Int J Hematol.* 2017;105(5):658-667. 査読あり .

11) Matsumoto Y, Nagoshi H, Yoshida M, Kato S, Kuroda J, Shimura K, Kaneko H, Horiike S, Nakamura S, Taniwaki M. Expression of master regulators of T-cell, helper T-cell and follicular helper T-cell differentiation in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Intern Med.* 2017; 56(21):2851-2856. 査読あり .

12) Matsuda K, Matsumoto Y, Yoshida M, Shimura K, Kaneko H, Inaba T, Horiike S, Kuroda J, Taniwaki M. Hairy B-Cell lymphoproliferative disorder and its differential diagnosis: a case with long-term follow-up. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2017;9(1):e2017054. doi: 10.4084/MJHID.2017.054. eCollection 2017. 査読あり .

5) Suzuki Y, Kato S, Kohno K, Satou A, Eladl AE, Asano N, Kono M, Kato Y, Taniwaki M, Akiyama M, Nakamura S. Clinicopathological analysis of 46 cases with CD4+ and/or CD56+ immature haematolymphoid malignancy: reappraisal of blastic plasmacytoid dendritic cell and related neoplasms. *Histopathology.* 2017;71(6):972-984. 査読あり .

〔学会発表〕(計 11 件)

1) Comprehensive analysis of conjoined genes in DLBCL cell line, KPUM-UH1 by RNA-Seq.

- Matsumoto Y, Taki T, Chinen Y, Sato R, Adachi H, Mizutani S, Nagoshi H, Shimura Y, Yoshida M, Sugitani-Yamamoto M, Kobayashi T, Kuroda J, Shimura K, Nakano M, Horiike S, Ohkawara Y, Tashiro K, Taniwaki M. 第 78 回日本血液学会学術集会, 横浜, 2016 .
- 2) Maegawa S, Tatekawa S, Chinen Y, Tsukamoto T, Tanba K, Kimoto-Matsumura Y, Takimoto T, Mizuno Y, Sugitani-Yamamoto M, Taniwaki M, Kuroda J. PDPK1 is the potential therapeutic target in mantle cell lymphoma. 第 78 回日本血液学会学術集会, 横浜, 2016 .
- 3) Nakahata S, Ichikawa T, Saito Y, Taki T, Taniwaki M, Morishita K. Short-form of BCL11B contributes to tumorigenesis of adult T-cell leukemia/lymphoma. 第 79 回日本血液学会学術集会, 東京, 2017 .
- 4) Tsukamoto T, Kawata E, Uoshima N, Chinen Y, Shimura Y, Yamamoto-Sugitani M, Kobayashi T, Horiike S, Yasukawa S, Yanagisawa A, Taniwaki M, Kuroda J. Chromosomal abnormalities and prognostic impacts in follicular lymphoma in the era of Rituximab. 第 79 回日本血液学会学術集会, 東京, 2017 .
- 5) Matsumoto Y, Yoshida M, Shimura K, Kaneko H, Horiike S, Kuroda J, Taniwaki M. Expression of master regulators of T-cell differentiation in adult T-cell leukemia/lymphoma. 第 79 回日本血液学会学術集会, 東京, 2017 .
- 6) Taniwaki M, Maruyama D, Tobinai K, Ogura M, Hatake K, Uchida T, Ando K, Tsukasaki K, Ishida T, Kobayashi N, Ishizawa K, Tatsumi Y, Kato K, Kiguchi T, Ikezoe T, Laille E, Ro T, Tamakoshi H, Sakurai S, Ohtsu T. TCL-001: A phase I/II Japanese study of romidepsin in relapsed/refractory peripheral T-cell lymphoma. 第 79 回日本血液学会学術集会, 東京, 2017 .
- 7) Watanabe T, Tobinai K, Wakabayashi M, Morishima Y, Kobayashi H, Kinoshita T, Suzuki T, Yamaguchi M, Ando K, Ogura M, Taniwaki M, Uike N, Yoshino T, Nawano S, Terauchi T, Hotta T and Tsukasaki K. Ten-year follow-up of newly diagnosed follicular lymphoma patients treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (R-CHOP) as first-line therapy in JCOG0203 trial. 59th The American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. Atlanta, GA, December 9-12, 2017.
- 8) 松本 洋典, 滝 智彦, 知念 良顕, 佐々木 奈々, 吉田 美穂子, 堤 康彦, 名越 久朗, 志村 和穂, 兼子 裕人, 堀池 重夫, 黒田 純也, 谷脇 雅史. B 細胞リンパ腫細胞株から検出した新規キメラ遺伝子 PVT1-ELK2AP. 第 80 回日本血液学会学術集会, 大阪, 2018 .
- 9) 塚本 拓, 中畑 新吾, 佐藤 隆一, 金井 昭教, 中野 正和, 稲葉 俊哉, 谷脇 雅史, 田代 啓, 森下 和広, 黒田 純也. マントル細胞リンパ腫における BRD4 標的遺伝子の解析. 第 80 回日本血液学会学術集会, 大阪, 2018 .
- 10) 水野 芳美, 知念 良顕, 塚本 拓, 下村 とも子, 志村 勇司, 古林 勉, 堀池 重夫, 谷脇 雅史, 黒田 純也. 増幅 FISH 法による B 細胞リンパ腫の CDKN2A 微小欠損の検出. 第 80 回日本血液学会学術集会, 大阪, 2018 .
- 11) Kuroda K, Tsukamoto T, Nakahata S, Morishita K, Sato R, Kanai A, Inaba T, Nakano M, Tashiro K and Taniwaki M. Genome-wide analysis of BRD4-targets reveals the therapeutic relevance of simultaneous targeting of BCR pathway and Ikaros-Myc axis in mantle cell lymphoma. 60th Annual Meeting and Exposition. San Diego, CA, USA, December 3-12,

2018.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：名越 久朗

ローマ字氏名：Hisao Nagoshi

所属研究機関名：京都府立医科大学

部局名：医学研究科

職名：助教

研究者番号(8桁)：80713924

研究分担者氏名：知念 良顕

ローマ字氏名：Yoshiaki Chinen

所属研究機関名：京都府立医科大学

部局名：医学研究科

職名：助教

研究者番号(8桁)：10757602

(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。