

令和元年6月18日現在

機関番号：82402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10050

研究課題名(和文) 新たな発がん機構クロモソリプシスに起因する難治性造血器腫瘍の病態解明

研究課題名(英文) Genetic and cytogenetic analyses of refractory leukemia with chromothripsis, a new genomic abnormality

研究代表者

川村 眞智子 (Kawamura, Machiko)

埼玉県立がんセンター(臨床腫瘍研究所)・病院 血液内科・医長

研究者番号：80450592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：新たな発がん機構と注目されているクロモソリプシス；染色体が一度に粉碎され、融合遺伝子や遺伝子の一部の欠失、増殖が起きる現象が一部の白血病に存在することを証明した。SNPアレイでクロモソリプシスの疑い例を検出でき、PNA (Peptide nucleic acid)-FISHで、動原体の異常が確認でき、クロモソリプシスの発症機序と関連があった。白血病のクロモソリプシスは、marker 染色体、dmin (double minutes)、複雑核型、17p欠失と関連があり、特にTP53遺伝子変異と関連があった。これらの症例は予後不良で、この機序の解明により治療対策をたてる必要があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新たな発がん機構と注目されているクロモソリプシス；染色体が一度に粉碎され、融合遺伝子や遺伝子の一部の欠失、増殖が起きる現象が一部の白血病の発症に存在することを証明した。SNPアレイCGH法、クロモソリプシスの発症機序に関連のある染色体分裂の異常がわかるPNA-FISH法によりクロモソリプシス関連白血病を検出できた。これらは、染色体の特殊な異常(marker 染色体、double minutes、17p欠失)、複雑な染色体異常と関連があり、特にがん抑制遺伝子TP53変異と関連があった。これらの症例は予後不良であり、この機序の解明により、治療対策をたてる必要があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated that there is a new oncogenic mechanism and the focus on chromothripsis ;a phenomenon in which chromosomes are shattered at one time, deletion, a fusion gene, or proliferation occurs in the onset of some leukemias. SNP array CGH detected cases with chromothripsis. PNA (Peptide nucleic acid)-FISH could detect abnormalities of chromothripsis. The chromothripsis in leukemia is associated with the marker chromosome, dmin (double minutes), complex karyotype, 17p deletion, and in particular with TP53 gene mutation. The mechanisms underlying chromothripsis-associated AML are poorly understood, and treatment strategy is needed for the improvement of the patients' outcomes.

研究分野：思春期・若年成人の白血病

キーワード：白血病 クロモソリプシス 思春期・若年成人

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

1. 研究開始当初の背景

小児の白血病の予後は改善しているが、難治例の中には造血幹細胞移植等の強力な治療を行っても生存率の改善しない群がある。また治癒しても晩期合併症や二次がんの発症が問題となっている。近年、SNP CGH アレイ、次世代シーケンサー法により詳細な発がん機構が解明され、診断や新薬の開発に役立っている。

腫瘍の遺伝子異常は多段階的に蓄積するとされていたが、次世代シーケンサーNGS解析によって、クロモソリプシス(染色体粉砕:chromothripsis):一度に1~数本の染色体粉砕が生じ、数十~数千のDNA断片化と再結合によりキメラ mRNA や欠失が生じる新たな発がん機構が注目された。クロモソリプシスは、がん全体の2~3%、骨腫瘍の25%、Li Fraumeni 関連腫瘍の36%に発生する。

研究分担者の金子らは、家族性腫瘍家系の急性骨髄性白血病(AML)患者において、複雑な染色体異常を呈し、染色体外に環状DNA断片であるdouble minute (dmin)を持つ予後不良AML症例を報告した。この症例ではFISHでdmin中にMYCなど4種類の遺伝子が確認されたが、定量RT-PCRではTRIB1遺伝子のみが高発現していた(Sugawara et al., Genes Chromosomes Cancer 50, 535, 2011)。白血病細胞はTP53遺伝子変異を持っていた。dminの存在はクロモソリプシスの重要な過程の一つと報告され、本症例はクロモソリプシスが発生に関与したと考えた。

一方、小児白血病BCP-ALLの一部では、21番染色体内でRUNX1遺伝子領域が増幅したintrachromosomal amplification of chromosome 21; iAMP21を示し、予後不良であることが知られていた(Harewood et al., Leukemia 17, 547, 2003)。近年、先天性に15;21転座染色体(ロバートソン転座)を持つ人ではiAMP21関連BCP-ALLが一般の2700倍起こりやすく、クロモソリプシスによるものであることが示された。この場合、15;21転座染色体の互いに近傍にある二動原体が分裂期に反対方向に引かれるため、染色体破砕が生じる。その結果、多数のDNA断片の欠失と残った断片の再結合が生じる。これは、二動原体(dicentric)形成、切断-融合-架橋(Breakage Fusion Bridge; BFB)サイクルによるクロモソリプシスの一発生様式である(Mooman et al., Blood 109, 2327, 2007; Li et al., Nature 508, 98, 2014)。15;21転座染色体をもたない小児にも同様の機構で、iAMP21が生じていると考えられた。

一方、顕微鏡下で観察可能である小核(micronuclei)は、クロモソリプシス発生の引き金になり、その結果引き起こされるクロモソリプシス(染色体修復・再生;chromoanagenesis)は、細胞分裂時の染色体分離の過誤によって起こりやすい。最初に小核が形成され、その中に取り残された染色体だけにDNA損傷が起こり、それを修復するために大規模な組換えが起こる(Zhang et al., Nature 522, 179, 2015)。従って小核の存在はクロモソリプシスの診断に有用と考えられる。

上記のように、白血病におけるクロモソリプシスの発生機構は様々であるが、患者予後が不良であることは共通している。

2. 研究の目的

高齢者に発生するAML、MDSは複雑な核型を示し、しばしば、クロモソリプシスを伴うことが報告されている。しかしながら、思春期・若年成人(Adolescent and young adults: AYA)に発生する造血器腫瘍を対象にしたクロモソリプシスは十分解析されていない。そこで、AYA世代AML、MDSを対象にし、クロモソリプシスの発生機構、診断法の開発を目的にした研究を実施した。

3. 研究の方法

対象:染色体分析で複雑核型、17p-, dmin(double minutes), 再発白血病, 二次性白血病等を基準としAYA(12~38歳)世代のBCP-ALL 5例, T-ALL 1例, AML3例, MDS/AML 1例の10例を選択した。

方法:

- 1) 染色体分析により複雑な核型やdmin, iAMP21等を示す症例、顕微鏡所見で小核のある症例を選択した。SNPアレイ解析によりクロモソリプシスの指標である限られた染色体内に生じた複雑なゲノム再構成を解析した。
- 2) PNA-FISH法, double-color FISH法によりセントロメア異常を解析した。
- 3) TP53を含むゲノム損傷修復関連遺伝子の変異を解析した。
- 4) NGSを用いた網羅的解析によりクロモソリプシスの有無を確認した。
- 5) クロモソリプシスを示す造血器腫瘍の臨床的特徴と予後について解析した。

4. 研究成果

1) 骨髄標本でクロモソリプシスの発生に関与する小核を観察した。一部は診断が困難であり、鑑別には小核試験などが必要と考えられた。一方クロモソリプシスがあっても小核のない症例

が一部に存在した。

2) SNP アレイ解析で、限られた染色体内に遺伝子増幅や欠失を確認し、以下クロモスリプシス様パターンと呼ぶこととした。

3) RNA シークエンスと全ゲノムシークエンス解析および臨床的特徴

症例 1: 小児期 BCP-ALL の治療後に NUP98 関連白血病を発症した二次性 AML について、詳細な解析を行った。顕微鏡では、初回白血病にはなかった小核が、二次性白血病では観察された。SNP アレイを行い染色体 11 と 17 に増幅、欠失が集中しクロモスリプシス様パターンを示した。RNA シークエンスによって T-ALL で報告のある NUP98 融合遺伝子が検出され、RT-PCR によって確認した。G 分染法は複雑核型で、t(11:18)(p15;q12)は確認できず、染色体 11 番と 18 番の Painting FISH を行い融合が確認された。しかし NUP98 Break Apart FISH では break は確認できず非常に小さい DNA 断片が挿入された可能性が示唆された。PNA-FISH では、Ring 染色体や Dicentric 動原体の異常が検出された。さらに網羅的遺伝子変異解析により、NPM1 遺伝子変異および FLT3-ITD 変異は存在せず、シグナル伝達に関わる NRAS(p.Gly12Cys)、および KIT(p.Met618Ile)、がん抑制遺伝子 TP53(p.Arg248Trp)、がん遺伝子 SETBP1(p.Leu1530Pro)、骨髄系転写因子 RUNX1(p.Gln74Arg)、ヒストン修飾遺伝子の KDM6A(p.Gln1385*)、BCORL1(p.Ile389Leu)、PHF6(p.Gly275*)が証明された。

症例 2: 複雑型染色体異常をもつ難治性 T-ALL について、SNP アレイによりクロモスリプシス様パターンを検出し、詳細な解析を行った。RNA シークエンスによって T 細胞の分化に重要な BCL11B 遺伝子と新規融合遺伝子を検出した。BCL11B 遺伝子の部分欠損 (Loss of Function) が T-ALL の発症に関わると考えられた。NOTCH1 遺伝子変異が認められ、その異常による恒常的活性化は T 細胞の分化異常を引き起こし T-ALL の発症に関わっているが、高発現だけでは白血病にはならないため、この融合遺伝子が加わったと考えられる。

症例 3: 染色体正常核型で iAMP21 をもつ BCP-ALL を解析した。小核は観察できなかったが、SNP アレイでは、過去の報告通り 21 番にクロモスリプシス様パターンを検出した。TP53 遺伝子は欠失しており、網羅的に遺伝子変異解析中である。

症例 4: dmin を持つ染色体複雑核型の AML でクロモスリプシス様パターンを検出した。網羅的遺伝子変異を解析中である。

考察とまとめ: クロモスリプシス関連白血病は、marker 染色体、dmin、複雑核型、17p 欠失を示すことが多く、予後不良であると報告されている。解析した 10 例中 4 例に、SNP アレイ解析でクロモスリプシス様パターンを示し NUP98 融合遺伝子型 AML、BCL11B 融合遺伝子型 T-ALL、iAMP21 を持つ正常核型 BCP-ALL、dmin を持つ複雑核型 AML とそれぞれ診断される白血病を確認した。この 4 例中解析可能であった 2 例は PNA-FISH で動原体の異常を有していた。一方で他 6 例の RNA シークエンス解析で明らかとなった MEF2D 融合遺伝子型 BCP-ALL 1 例、ZNF386 融合遺伝子型 BCP-ALL 2 例、NPM1-MLF1 型 AML 1 例、その他の AML 2 例にはクロモスリプシス様パターンを検出できず、PNA-FISH でも、動原体の異常は検出できなかった。

症例 1 では、二次性白血病の発症にクロモスリプシスが関連していることが示唆された。AML に高頻度で検出される 54 遺伝子中 7 遺伝子変異が確認された。PHF6 変異は FLT3-ITD、MLL-PTD、ASXL1 の変異とともに、全生存率の低下に関連していることが報告されている (N Engl J Med 366:1079-89, 2012)。BCORL1 変異が確認されたが、この遺伝子は網膜芽細胞腫で変異 (Nature 481:329-33, 2012)、骨肉腫で BCOR-CCNB3 融合遺伝子形成の報告があり (Nat Genet 44:461-466, 2012)、造血器腫瘍では MDS の予後を不良にする (Blood 122:3169-77, 2013)。クロモスリプシスと関連の強い TP53 遺伝子変異解析では (p.Arg248Trp) の変異が確認された。PNA-FISH により通常の FISH では確認できなかった ring を確認し、複雑核型染色体も呈しており、PNA-FISH によるクロモスリプシスの関与を予測できると示唆された。症例 2 では、T-ALL に SNP アレイでクロモスリプシス様パターンと PNA-FISH で動原体異常が認められ、T-ALL の発症にクロモスリプシスが関わったと考えてさらなる解析を行っている。クロモスリプシスは、テロメア消失と二動原体の同時活性化 Breakage Fusion Bridge が発生機構のひとつと考え、PNA-FISH 法により動原体を解析した。症例 3 は iAMP21 をもち再発を繰り返す難治例であり、症例 4 も難治症例であった。

以上の解析で、二次性 AML に NUP98 融合遺伝子、T-ALL に新規 BCL11B 融合遺伝子にクロモスリプシスが証明され、クロモスリプシスと融合遺伝子の両方が腫瘍化に関与していると考えられ、SNP アレイと PNA-FISH でクロモスリプシスの予測が可能であった。再発・難治性白血病の治療戦略を考える上で、再発のメカニズムの相違により治療選択を考える必要があると考えられる。AYA 世代白血病にみられるクロモスリプシスの発生機構は多様であり、併存する、染色体、遺伝子異常も多様である。今後、クロモスリプシスを示す小児、AYA 世代、高齢者の白血病について染色体・遺伝子異常を解析し世代間の相違があるかどうか検討したい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Matsuo H, Yoshida K, Fukumura K, Nakatani K, Noguchi Y, Takasaki S, Noura M, Shiozawa Y, Shiraiishi Y, Chiba K, Tanaka H, Okada A, Nannya Y, Takeda J, Ueno H, Shiba

- N, Yamato G, Handa H, Ono Y, Hiramoto N, Ishikawa T, Kawamura M, Hayashi Y, Mano H, Miyano S, Kamikubo Y, Ogawa S, Adachi S et al. Recurrent CCND3 mutations in MLL-rearranged acute myeloid leukemia. *Blood Adv* 13 2879-2889, 2018 査読有
2. Koshinaga T, Takimoto T, Oue T, Okita H, Tanaka Y, Nozaki M, Tsuchiya K, Inoue E, Haruta M, Kaneko Y, Fukuzawa M. Outcome of renal tumors registered in Japan Wilms Tumor Study-2 (JWiTS-2): A report from the Japan Children's Cancer Group (JCCG)2018. *Pediatric Blood & Cancer*. Apr 6 e27056 ~ e27056. 査読有
 3. Okabe-Kado J, Hagiwara-Watanabe Y, Niitsu N, Kasukabe T, Kaneko Y. NM23 downregulation and lysophosphatidic acid receptor EDG2/ lpa1 upregulation during myeloid differentiation of human leukemia cells2018 . *Leukemia Research* 66, 39-48, 2018. 査読有
 4. Sato Y, Haruta M, Kaneko Y, Nakasato Y, Kurosawa H, Yoshihara S. Paternally inherited WT1 mutation plus uniparental disomy of 11p may be an essential mechanism for development of WT1-mutated familial Wilms tumor. *Pediatric Blood & Cancer* 66, e27442 査読有
 5. Haruta M, Arai Y, Okita H, Tanaka Y, Takimoto T, Sugino R, Yamada Y, Kamijo T, Oue T, Fukuzawa M, Koshinaga T, Kaneko Y. Combined Genetic and Chromosomal Characterization of Wilms Tumors Identifies Chromosome 12 Gain as a Potential New Marker Predicting a Favorable Outcome. *Neoplasia* 21, 117-131, 2019 査読有
 6. Izumi H, Li Y, Shibaki M, Mori D, Yasunami M, Sato S, Matsunaga H, Mae T, Kodama K, Kamijo T, Kaneko Y, Nakagawara A. Recycling endosomal CD133 functions as an inhibitor of autophagy at the pericentrosomal region. *Scientific Reports*9, 2236, 2019 査読有
 7. Yamato G, Yamaguchi H, Handa H, Shiba N, Kawamura M, Wakita S, Inokuchi K, Hara Y, Ohki K, Okubo J, Park M, Sotomatsu M, Arakawa H, Hayashi Y. Clinical features and prognostic impact of PRDM16 expression in adult acute myeloid leukemia. *Genes, Chromosomes and Cancer* 56, 800 ~ 809, 2017 査読有
 8. Kobayashi K, Isobe K, Hanada R, Kawaguchi H, Iwata T, Kawamura M. CD66c (KOR-SA3544) antigen expression of leukemic blasts in pediatric acute myeloid leukemia with TLS/FUS-ERG fusion transcript. *International Journal of Laboratory Hematology* 39, e147 ~ e150, 2017 査読有
 9. Li Y, Ohira M, Zhou Y, Xiong T, Luo W, Yang C, Li X, Gao Z, Zhou R, Nakamura Y, Kamijo T, Kaneko Y, Taketani T, Ueyama J, Tajiri T, Zhang H, Wang J, Yang H, Yin Y, Nakagawara A. Genomic analysis-integrated whole-exome sequencing of neuroblastomas identifies genetic mutations in axon guidance pathway. *Oncotarget* 8, eCollection, 2017 査読有
 - 10 . Fujiwara T, Uotani K, Yoshida A, Morita T, Nezu Y, Kobayashi E, Yoshida A, Uehara T, Omori T, Sugiu K, Komatsubara T, Takeda K, Kunisada T, Kawamura M, Kawai A, Ochiya T, Ozaki T. Clinical significance of circulating miR-25-3p as a novel diagnostic and prognostic biomarker in osteosarcoma. *Oncotarget* 8(20), 33375-33392, 2017 査読有
 11. Endo F, Tabata T, Sadato D, Kawamura M, Ando N, Oboki K, Ukaji M, Kobayashi K, Kobayashi Y, Ikeda T, Shibasaki F. Development of a simple and quick immunochromatography method for detection of anti-HPV-16/-18 antibodies. *PLoS One* 12:e0171314, 2017 査読有
 12. Takada M, Nagai S, Haruta M, Sugino RP, Tozuka K, Takei H, Ohkubo F, Inoue K, Kurosumi M, Miyazaki M, Sato-Otsubo A, Sato Y, Ogawa S, Kaneko Y. BRCA1 alterations with additional defects in DNA damage response genes may confer chemoresistance to BRCA-like breast cancers treated with neoadjuvant chemotherapy . *Genes Chromosomes Cancer* 56 405, 2017. 査読有

{ 学会発表 } (計 5 件)

1. Kawamura M, Kaneko Y, Naoto F, Tashiro S. Chromothripsis-like Single Nucleotide Polymorphism array pattern in pediatric and adolescent acute leukemia. The 50th Annual Congress of the International Society of Paediatric Oncology (SIOP, Kyoto, Nov 23, 2018)
2. 川村真智子, 久保田靖子, 小林泰文, 柵木信男, 金子安比古 Detection of chromothripsis by Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Array in acute leukemia. 79 回日本血液学会学術総会, 2017 年 10 月東京
3. 川村真智子, 金子安比古. Chromothripsis in refractory pediatric acute leukemia. 第 59 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2017 年 11 月、愛媛
4. 川村真智子 Incidence and state of high school students in adolescents and young adults with cancer in a single cancer center. 第 15 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 2017 年 7

月，神戸

5. Kawamura M, Nishimura Y, Kaneko Y. Clinical significance of serum survivin levels in hematologic malignancies. 29th World Congress of World Association of Societies of Pathology and Laboratory Medicine, 2017年11月，京都

〔図書〕(計 1件)

1. 落谷 孝広 (編集) 川村眞智子 (分担). mRNAの最新知識 起訴領域から診断・治療
応用まで総ページ数 195 出版者医薬ジャーナル社 ISBN10: 4753228444

〔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：金子 安比古
ローマ字氏名：KANEKO, Yasuhiko
所属研究機関名：埼玉県立がんセンター
部局名：臨床腫瘍研究所 病院・血液内科・
職名：非常勤医員
研究者番号(8桁)：50373387

(2)研究協力者

研究協力者氏名：田代 聡
ローマ字氏名：TASHIRO, Satoshi
広島大学原爆放射線医科学研究所，教授
研究者番号：20243610

研究協力者氏名：滝 智彦
ローマ字氏名：TAKI, Tomohiko
杏林大学，保健学部，教授
研究者番号：50322053

研究協力者氏名：林 泰秀
ローマ字氏名：HAYASHI, Yasuhide
群馬県衛生環境研究所，研究企画係，研究員
研究者番号：30238133

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。