

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08335

研究課題名(和文) 腫瘍の多様な染色体・ゲノム構造と異常転写産物形成の分子機構の統合解析

研究課題名(英文) Integrated analysis of various chromosomal and genomic structures of tumors and the molecular mechanism of abnormal transcript formation

研究代表者

滝 智彦 (TAKI, TOMOHIKO)

杏林大学・保健学部・教授

研究者番号：50322053

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)：造血器腫瘍細胞株100株のRNAシーケンスデータから抽出された融合遺伝子産物情報を手掛かりに、その形成に関わった染色体構造異常の予測を試みた。特に注目したのは、同一細胞株内で、1つの遺伝子が複数の遺伝子と融合遺伝子を形成しているもので、そのような融合遺伝子の組み合わせを“promiscuous融合”と定義した。Promiscuous融合は38細胞株中に74種類存在していた。Promiscuous融合の形成様式は、3-way転座や欠失挿入により単純な1回の構造変化で説明が可能なものと、1回の構造変化では形成できないものに分けることができ、ゲノム構造解析の新たな手法として有用と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

次世代シーケンサーによるシーケンスのコストが下がり、膨大なゲノム情報が容易に手に入る時代になってきた。その解析のためのインフォマティクスも進歩している。しかし、現時点ではまだ、見つかったゲノム情報の一部しか利用されていない。ゲノム情報がたった4種類の塩基配列情報からなるのに対して、ゲノム構造は23対の染色体によって形成される非常に複雑なものであることも起因している。そのため、検出された異常の多くがその意味を正確に理解されていない。急速に進みつつあるゲノム医療においても、意義が明確でないゲノム異常を正確に理解することは、疾患の正確な診断やそれに基づく治療法の選択にとって重要な課題である。

研究成果の概要(英文)：We attempted to predict the chromosomal structural abnormalities involved in its formation, based on the fusion gene product information extracted from the transcriptome sequencing data of 100 hematologic tumor cell lines. Of particular interest was the fact that one gene forms a fusion gene with multiple genes in a single cell line, and the combination of such fusion genes was defined as "promiscuous fusion". There were 74 types of promiscuous fusion in 38 cell lines. The formation mode of promiscuous fusion can be divided into those that can be explained by a simple one structural change, such as 3-way translocation or deletion insertion, and those that cannot be formed by one structural change. It was considered to be useful as a new method of genomic structure analysis.

研究分野：血液・腫瘍学、分子遺伝学

キーワード：がん ゲノム 染色体 融合遺伝子 キメラ遺伝子 構造異常 エクソン イントロン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

血液腫瘍や軟部肉腫では以前からよく知られ、病型診断や予後因子として重要な意義を持つキメラ遺伝子は、肺がんでの ALK 融合遺伝子に対する阻害剤治療の成功などによって、近年は他のがんでも注目されている。そのようなキメラ遺伝子形成メカニズムとして従来からよく知られているのは染色体の転座や逆位、微小欠失などによる単純な遺伝子融合だが、より複雑なキメラ遺伝子の形成がいろいろな形で起こっていることがわかってきた。

#### (1) ゲノムの高度増幅領域におけるキメラ遺伝子の形成

最近我々は、急性骨髄性白血病と胃がんにおいて、homogeneously staining regions (HSRs) や double minute chromosomes (DMs) などのゲノムの高度増幅の形成に関わっている、その非常に複雑な形成過程の中で起こっていると思われる新しいタイプのキメラ遺伝子の形成を見出した。急性骨髄性白血病でしばしばみられる 8q24 の高度増幅では、増幅はある領域の単純な増幅ではなく、複数の領域の複雑な組み合わせによって形成されていた。

#### 2) 異常転写産物生成のゲノム構造 - イントロンのエクソン化と conjoined genes

キメラ遺伝子から転写産物が生成される際にも、単純なエクソン同士の融合だけではない、ユニークなさまざまな転写産物が生成されることがある。たとえば、本来の遺伝子の中ではイントロンの配列が、キメラ転写産物の中に含まれてくることがある。代表的なもの 1 つが、急性骨髄性白血病における MLL-ELL(MEN) での、当初 INS120 と報告された MEN イントロン 1 内の 120 塩基の配列のキメラ転写産物への挿入である (Mitani et al. Blood 85:2017-24, 1995)。このようなイントロンのエクソン化は、他のキメラ遺伝子でもさまざまな形で時々みられるが、そのメカニズムについての十分な解析はされていない。

さらに、ゲノム異常を伴わない、転写レベルでの、read-through と呼ばれる 2 つの遺伝子の連続した転写によるキメラ転写産物 (conjoined genes) が、腫瘍発生に影響する可能性が報告され (Pintarelli et al. Oncotarget 7:27889-98, 2016)、我々もびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫細胞株 KPUM-UH1 の RNA シーケンスデータをもとにした解析から、新規のものを 10 個含む、17 個の conjoined genes が発現していることを見いだした。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、腫瘍細胞にみられ、これまで十分解析されていない新しいタイプの染色体・ゲノム異常の正確な構造と、異常転写産物生成に関与するゲノム構造の変化を詳細に解析し、その生成メカニズムと病態への影響を明らかにすることである。これまで造血器腫瘍を中心に、SNP アレイによるゲノム増幅を中心とするゲノム再構成の解析や、新規キメラ転写産物の同定を目指して行った RNA シーケンスのデータから見出した結果を基に、キメラ転写産物形成に関する複数の解析を行ってきた。その研究過程で見出された、腫瘍細胞にみられ、これまで十分に解析されていない新しいタイプの染色体・ゲノム異常の正確な構造と、異常転写産物生成に関与するゲノム構造の変化の詳細を解析している。

### 3. 研究の方法

#### (1) 次世代シーケンサーによる RNA シーケンスデータの解析

ドイツの Leibniz-Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures で Illumina HiSeq2500 により解析が行われた造血器腫瘍細胞株 100 株 (Quentmeier H, et al. Sci Rep. 2019;9:8218) の公開されている次世代シーケンスデータのうち、RNA シーケンス (RNA-seq) の BAM ファイルをダウンロードして解析に用いた。

#### (2) 融合遺伝子の抽出

RNA-seq データからの融合遺伝子の抽出には STAR-Fusion (<https://github.com/STAR-Fusion/STAR-Fusion>) を用いた。

#### (3) 融合遺伝子情報に基づいた融合遺伝子形成様式の検討

抽出された融合遺伝子情報 (各々の染色体上の位置、方向) に基づいて、融合転写産物を形成したゲノム・染色体構造を検討した。

#### (4) 融合転写産物の構造の検討

コード遺伝子か非コード遺伝子か、融合部位がコード領域か非コード領域か、in-frame 融合か out-of-frame 融合かなどの情報に基づいて、融合転写産物が生成する蛋白構造を予想した。

### 4. 研究成果

#### (1) 融合転写産物の形成様式、融合蛋白構造の予測

HCL を除く 99 株に 1~50 種 (中央値 8) の融合遺伝子が検出され、スプライシングバリエーションを含めるとその数は 1~72 (中央値 9) 種であった。融合遺伝子の総数は 718 種で、関与する遺伝子の総数は 1185 個におよんだ。このうち 473 種の融合遺伝子は 1 細胞株のみにみられ、245 種の融合遺伝子は複数の細胞株にみられた。もっとも多くの細胞株で見られた融合遺伝子は 26 細胞株で検出された。

それぞれの融合遺伝子を形成するためのゲノムの変化としては、異なる染色体間での転座、腕内欠失（または相同染色体間での転座）、縦列重複（または相同染色体間での転座または環状融合）、逆位や挿入を伴う複雑な再構成などに大きく分けられた。また、融合している遺伝子のタイプの組み合わせは、タンパク質コード遺伝子同士の融合、コード遺伝子と非コード遺伝子の融合、非コード遺伝子同士の融合の3パターンに大きく分けられた。しかし、発現する可能性があるタンパク質の構造を考えたとき、その融合はより複雑であると判明した。

#### (2) Promiscuous 融合の形成様式

特に注目したのは、同一細胞株内で、1つの遺伝子が複数の遺伝子と融合遺伝子を形成しているもので、そのような融合遺伝子の組み合わせを“promiscuous 融合”と定義した。Promiscuous 融合は38細胞株中に74種類存在していた。その数は1細胞株あたり1組（22細胞株）～5組（2細胞株）であった。Promiscuous 融合の形成様式は、3-way 転座や欠失挿入により単純な1回の構造変化で説明が可能なものと（13細胞株の13組のpromiscuous 融合）、そのような1回の構造変化では形成できないと考えられるもの（28細胞株の61組のpromiscuous 融合）に分けることができた。単純な構造変化で説明可能なものの中には、2本の染色体間での部分的な相互転座のような、従来の染色体分析では同定が難しい染色体構造異常の存在が推定できるものもあった。このような構造変化の存在を1組の融合遺伝子から推定することは難しく、promiscuous 融合に着目して解析することは、非常に有効な戦略と考えられた。

#### (3) 染色体腕内欠失による融合転写産物形成と Read-through 転写産物の検討

同一染色体の同腕上の遺伝子による融合転写産物の中には腕内欠失によって形成されると考えられるものが多く含まれているが、その中には read-through により形成されているものも含まれていることが予想された。ゲノムアレイデータが手に入った細胞株について検討中であるが、2つの遺伝子間にコピー数 loss を認め、欠失によって融合遺伝子を形成していることを裏付けるものがある一方で、両遺伝子間にコピー数の変化を全く認めないものも多く存在した。このような領域での融合転写産物の形成は、read-through による可能性が考えられた。

以上のように、次世代シーケンスデータ中には既存研究では十分解析されていない重要な情報が多く含まれており、がんにおけるゲノム異常の未知のメカニズムの解明にとって、これらのデータを有効に利用していくことが重要である。シーケンスのコストが下がり、膨大なゲノム情報が容易に手に入る時代になり、その解析のためのインフォマティクスも進歩している。しかし、現時点ではまだ、見つかったゲノム情報の一部しか利用されていない。ゲノム情報がたった4種類の塩基配列情報からなるのに対して、ゲノム構造は23対の染色体によって形成される非常に複雑なものであることも起因している。そのため、検出された異常の多くがその意味を正確に理解されていない。急速に進みつつあるゲノム医療においても、意義が明確でないゲノム異常を正確に理解することは、疾患の正確な診断やそれに基づく治療法の選択にとって重要な課題である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakaguchi K, Imamura T, Ishimaru S, Imai C, Shimonodan H, Fujita N, Okada K, Taketani T, Kanai R, Tsuchi H, Kato M, Kojima Y, Watanabe A, Deguchi T, Hashii Y, Kiyokawa N, Taki T, Saito AM, Horibe K, Manabe A, Sato A, Koh K.	4. 巻 67
2. 論文標題 Nationwide study of pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with chromosome 8q24/MYC rearrangement in Japan.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatr Blood Cancer	6. 最初と最後の頁 e28341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pbc.28341	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomizawa D, Miyamura T, Imamura T, Watanabe T, Moriya Saito A, Ogawa A, Takahashi Y, Hirayama M, Taki T, Deguchi T, Hori T, Sanada M, Ohmori S, Haba M, Iguchi A, Arakawa Y, Koga Y, Manabe A, Horibe K, Ishii E, Koh K	4. 巻 136
2. 論文標題 A risk-stratified therapy for infants with acute lymphoblastic leukemia: a report from the JPLSG MLL-10 trial.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood Adv	6. 最初と最後の頁 1813-1823
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2019004741	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato H, Kawasaki N, Kawasaki M, Abiko Y, Meguro T, Takahashi N, Izumino H, Kanno M, Numakura C, Sasaki A, Imamura T, Taki T, Mitsui T	4. 巻 42
2. 論文標題 Three consecutive cases of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis, including a case due to maternal uniparental disomy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatr Hematol Oncol	6. 最初と最後の頁 e819-e821
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPH.0000000000001681	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Y, Terui K, Chinen Y, Tandai S, Kudo K, Sasaki S, Tono C, Taki T, Ito E	4. 巻 67
2. 論文標題 A pediatric case of secondary T-cell acute lymphoblastic leukemia with KMT2A-MAML2 developing after hepatoblastoma treatment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatr Blood Cancer	6. 最初と最後の頁 e28033
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pbc.28033.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto Y, Chinen Y, Shimura Y, Nagoshi H, Sasaki N, Muramatsu A, Kuriyama K, Ohshiro M, Hirakawa Y, Iwai T, Uchiyama H, Taki T, Horiike S, Kuroda J, Taniwaki M	4. 巻 111
2. 論文標題 Recurrent intragenic exon rearrangements of SOBP and AUTS2 in non-Hodgkin B-cell lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Hematol	6. 最初と最後の頁 75-83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-019-02766-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hara Y, Shiba N, Yamato G, Ohki K, Tabuchi K, Sotomatsu M, Tomizawa D, Kinoshita A, Arakawa H, Saito AM, Kiyokawa N, Tawa A, Horibe K, Taga T, Adachi S, Taki T, Hayashi Y	4. 巻 188
2. 論文標題 Patients aged less than 3 years with acute myeloid leukaemia characterize a molecularly and clinically distinct subgroup.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Br J Haematol	6. 最初と最後の頁 528-539
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.16203	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shiba N, Yoshida K, Hara Y, Yamato G, Shiraishi Y, Matsuo H, Okuno Y, Chiba K, Tanaka H, Kaburagi T, Takeuchi M, Ohki K, Sanada M, Okubo J, Tomizawa D, Taki T, Shimada A, Sotomatsu M, Horibe K, Taga T, Adachi S, Tawa A, Miyano S, Ogawa S, Hayashi Y	4. 巻 3
2. 論文標題 Transcriptome analysis offers a comprehensive illustration of the genetic background of pediatric acute myeloid leukemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood Adv	6. 最初と最後の頁 3157-3169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2019000404	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishimaru S, Okamoto Y, Imai C, Sakaguchi H, Taki T, Hasegawa D, Cho Y, Kakuda H, Sano H, Manabe A, Imamura T, Kato M, Arakawa Y, Shimonodan H, Sato A, Suenobu S, Inukai T, Watanabe A, Kawano Y, Kikuta A, Horibe K, Ohara A, Koh K	4. 巻 61
2. 論文標題 Nationwide survey of pediatric hypodiploid acute lymphoblastic leukemia in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatr Int	6. 最初と最後の頁 1103-1108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.14006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imamura T, Taga T, Takagi M, Kawasaki H, Koh K, Taki T, Adachi S, Manabe A, Ishida Y; Leukemia/Lymphoma Committee; Japanese Society of Pediatric Hematology Oncology (JSPHO)	4. 巻 108
2. 論文標題 Nationwide survey of therapy-related leukemia in childhood in Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Hematol	6. 最初と最後の頁 91-97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-018-2439-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Taga T, Imamura T, Nakashima K, Maeda N, Watanabe A, Miyajima Y, Sakaguchi S, Sano H, Hasegawa D, Kawasaki H, Adachi S, Takagi M, Koh K, Manabe A, Taki T, Ishida Y	4. 巻 108
2. 論文標題 Clinical characteristics of pediatric patients with myeloid sarcoma without bone marrow involvement in Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Hematol	6. 最初と最後の頁 438-442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-018-2492-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Tetsuko Kobayashi, Tomohiko Taki
2. 発表標題 Analysis of chromosomal and genomic structure based on the information of fusion genes revealed by RNA-sequencing
3. 学会等名 第62回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kaburagi T, Yamato G, Shiba N, Yoshida K, Hara Y, Shiraishi Y, Ohki K, Sotomatsu M, Arakawa H, Matsuo H, Shimada A, Taki T, Kiyokawa N, Tomizawa D, Horibe K, Miyano S, Adachi S, Taga T, Ogawa S, Hayashi Y
2. 発表標題 Recurrent gene mutations in pediatric AML by targeted sequencing using a 343-gene custom panel
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hara Y, Taki T, Yamato G, Yoshida K, Shiba N, Kaburagi T, Shiraishi Y, Ohki K, Kawamura M, Sotomatsu M, Arakawa H, Matsuo H, Shimada A, Toki T, Kiyokawa N, Tomizawa D, Taga T, Ito E, Horibe K, Miyano S, Ogawa S, Adach S, Hayashi Y
2. 発表標題 TP53 遺伝子異常を伴う小児急性骨髄性白血病の臨床像と分子生物学異常の解析
3. 学会等名 第61回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomizawa D, Miyamura T, Imamura T, Watanabe T, Saito A, Ogawa A, Takahashi Y, Hirayama M, Arakawa Y, Taki T, Deguchi T, Hori T, Omori S, Haba M, Iguchi A, Koga Y, Manabe A, Horibe K, Ishii E, Koh K
2. 発表標題 乳児急性リンパ性白血病に対する層別化治療: 日本小児白血病リンパ腫研究グループ MLL-10 臨床試験の報告
3. 学会等名 第61回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kaburagi T, Yamato G, Shiba N, Yoshida K, Hara Y, Shiraishi Y, Ohki K, Sotomatsu M, Arakawa H, Matsuo H, Shimada A, Taki T, Kiyokawa N, Tomizawa D, Horibe K, Miyano S, Adachi S, Taga T, Ogawa S, Hayashi Y
2. 発表標題 小児急性骨髄性白血病患者における KMT2C 変異と PHF6 変異の臨床的意義について
3. 学会等名 第61回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 Novel fusion gene PVT1-ELK2AP in a B-cell lymphoma cell line with MYC-IGH gene rearrangement
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------