

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16762

研究課題名（和文）RARB転座陽性急性前骨髄球性白血病の病態解明及び新規標的薬の開発

研究課題名（英文）Elucidation of the pathophysiology of RARB translocation-positive acute promyelocytic leukemia and development of new target therapy

研究代表者

辻本 信一（TSUJIMOTO, Shinichi）

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：50838034

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：急性前骨髄急性白血病（APL）は、RARA遺伝子の転座により生じるが一部の症例ではこのRARA転座を同定できない。我々はこのRARA転座陰性APLの網羅的ゲノム解析により新たにRARB転座が関与していることを見出した。本課題ではRARB転座陽性APLの機能解析と有望な薬剤の検討を行った。RARB転座陽性APLはRARA関連APLと同様にホモ二量体を形成し、レチノイン酸受容体経路の転写活性を低下させること、レチノイン酸をはじめとした合成レチノイドは無効であることを示した。さらに、治療標的の探索のため、RNA シークエンスを行い、PPAR が標的となりうることを示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性前骨髄球性白血病（APL）は、ほとんどの症例でPML-RARAなどのRARA遺伝子関連の融合遺伝子を有し、オールトランス型レチノイン酸（ATRA）などの治療が有効である。しかし、一部のAPLの症例の中にこのRARA遺伝子関連の異常を有さない症例が存在する。我々は、これらの症例のゲノム解析を行い、新たにRARB遺伝子関連の異常を見出した。このRARB関連遺伝子を有するAPLは、RARA遺伝子異常を有するAPLと同様の病態で白血化をきたすことを示した。また、ATRAを始めとしたレチノイン酸は無効であり、PPAR に対する治療が有効であることを見出した。今後の治療応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Almost all of Acute promyelocytic acute leukemia (APL) is caused by a translocation of the RARA gene, but in some cases this RARA translocation can not be identified. We recently identified RARB translocation as the recurrent genomic alteration in APL without RARA rearrangements. However, the functional consequences of APL with RARB rearrangements are still unknown. Thus, we performed functional analyses of APL with RARB rearrangement. RARB rearrangement could make homodimerize and blocked retinoic acid pathway in dominant-negative manner. Furthermore, we showed that synthetic retinoids such as all-trans retinoic acid were ineffective for RARB rearrangement positive APL. As retinoids have insufficient therapeutic effects on APL with RARB rearrangement, we performed transcriptome analysis using RARB rearrangement induced cell line. We found TBL1XR1-RARB significantly suppressed the expression of PPAR target genes, and PPAR ligands could partially differentiate RARB rearrangements.

研究分野：小児がん

キーワード：急性前骨髄急性白血病 RARB retinoic acid pathway

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

急性前骨髄性白血病は、特徴的な形態と凝固異常による全身臓器障害をきたす白血病である。その大部分は、*PML-RARA* 融合遺伝子を始めとしたレチノイン酸受容体 遺伝子(*RARA*)が検出され、発症に関与することが知られていた。この *PML-RARA* は全トランスレチノイン酸 (*ATRA*)や三酸化ヒ素の直接の治療標的となり、その生存率についてはいまや 90%を超えるまでになった。しかし、この急性前骨髄性白血病の一部に *RARA* 遺伝子の異常を認めない症例が存在し、その分子病態は不明であった。申請者の研究グループは、*RARA* 遺伝子に異常のない急性前骨髄性白血病の症例を収集して集中的なゲノム解析を行い、レチノイン酸受容体 (*RARB*) 遺伝子が関与する新規融合遺伝子である *TBL1XR1-RARB* を同定した。さらに *TBL1XR1-RARB* についての機能解析を行い、*in vitro/ex vivo* の実験によりこの *RARB* 融合遺伝子が *RARA* 融合遺伝子と同様に急性前骨髄性白血病の発症に関与していることを証明した。また、我々は、一般的に *PML-RARA* 陽性の急性前骨髄性白血病には著効する *ATRA* やタミバロテン(合成レチノイド)、三酸化ヒ素といった薬剤が、この *RARB* 遺伝子異常が関わる急性前骨髄性白血病では効果が乏しいことも示した。このように我々は、急性前骨髄性白血病の *RARA* 転座陰性の一群において *RARB* 遺伝子の転座が関与していることを示し、*APL* の遺伝学的なサブグループを新たに特定したが、*RARA* 陰性急性前骨髄性白血病全体の病態はまだ不明な点が多く、治療法も確率されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、*RARB* 転座陽性 *APL* の病態の解明と新規治療法を開発するとともにその臨床像を明らかにするため、*RARB* 遺伝子異常が関与する急性前骨髄性白血病の症例を収集し、ゲノム解析を行うことで *RARB* 陽性 *APL* の発症頻度や臨床像を把握する。さらに、*RARB* 遺伝子異常が関与する急性前骨髄性白血病の *in vitro/in vivo* での白血病発症の機序を詳細に検討し、従来の治療法が有効でないことから新規標的薬剤を同定し、*RARB* 転座陽性急性前骨髄性白血病の病態の解明と治療法の開発を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1)ゲノムシーケンス 全ゲノムシーケンス

*RARB* 転座陽性 *APL* の潜在的なゲノム変化を調べる目的で、全ゲノムシーケンスを行った。患者由来の白血病細胞から抽出した DNA をもちいて *illumina HiSeq2500* を用いて、150bp ペアエンドモードで配列決定した。配列アライメントと構造変異の検出は *Genomon* パイプライン (ver.2.6, <https://github.com/Genomon-Project>)を用いて行った。

#### RNA シーケンスと遺伝子発現解析

患者由来の白血病細胞は白血病細胞から単離した培養した融合遺伝子導入細胞から 4 日後の分化傾向が少ない段階での GFP 陽性細胞を単離し、全 RNA を抽出した。RNA シーケンスは *NEBNext rRNA Depletion Kit* と *NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit for Illumina* (*NEW ENGLAND BioLabs, USA*)を用いて製造者のプロトコールに従い行った。得られた 150 ベースペアのペアエンドリードは、*Genomon* パイプライン (<https://github.com/Genomon-Project/>, version 2.6.3) 及び *R* を用いて解析を行った。RNA シーケンスデータのリードカウントは、*R* パッケージ *DESeq2* (バージョン 1.24.0) を用いて解析した。

#### (2)細胞培養及びアッセイ 細胞培養

全ゲノムシーケンス、RNA シーケンスで同定した新規融合遺伝子である *PML-RARA*, *TBL1XR1-RARB*, *HNRNPC-RARB*, *RARB*, *RARA* をそれぞれクローニングし、ヒト臍帯血、白血病細胞株、*HEK293* 細胞株に導入をおこない、解析をおこなった。

#### ルシフェラーゼアッセイ

転写因子応答性コンストラクトと恒常的に発現するウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を含む *RARE* シグナルレポーターを *EX-B0004-M07* 発現ベクター (*Mock*, *RARB*, *RARA*, *HNRNPC-RARB*, *HNRNPC-RARB +RARA*, *HNRNPC-RARB+RARB*) と共に 1:1 の量比で共導入し、レチノイン酸の立体構造の違いによる影響を評価するため、*ATRA* 以外に 4 種の合成レチノイド酸 (*アシトレチン*、*アリトレチノイン*、*イソトレチノイン*、*タザロテン*)

を選択した。無処理または異なる濃度の ATRA、アシトレチン、アリトレチノイン、イソトレチノイン、タザロテンをそれぞれ 24 時間後に添加し、さらに 24 時間インキュベートした。ルシフェラーゼアッセイは、ホタルルシフェラーゼを用いて転写因子の活性化を測定し、ウミシイタケルシフェラーゼとの比率でトランスフェクション効率を正規化した。

#### 共免疫沈降と免疫プロット分析

*HNRNPC-RARB* タンパク質がホモ二量体を形成するか評価する目的で共免疫沈降および免疫プロット分析を実施した。クローニングした *RARA*, *RARB*, *HNRNPC-RARB*, *PML-RARA*, *TBL1XR1-RARB* の C 末端に MYC, HAtag を導入した。共免疫沈降を行い、二量体の形成を確認するとともに、薬剤添加により二量体が解除させるかについて検討した。

#### ヒト臍帯血細胞

*TBL1XR1-RARB*, *PML-RARA* または *HNRNPC-RARB* を CD34 陽性臍帯血細胞にレトロウイルスで導入した。レトロウイルス感染の 48 時間の間、細胞はマウス Flt-3 (50ng/ml)、ヒト TPO (50ng/ml)、ヒト SCF (50ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN) を添加した StemSpan™ SFEMII (STEMCELL Technologies) で培養し、colony replating assay を実施した。

#### PPAR リガンドによる細胞分化誘導実験

PPAR リガンド (ピオグリタゾン、CDDO) の細胞分化への影響を評価する目的で、*TBL1XR1-RARB* を導入したヒト CD34 陽性細胞を 1 週間培養し、PPAR リガンド (50 μM ピオグリタゾン、0.3 μM CDDO) および 1 μM ATRA を添加し培養を行い、Flocytometer を用いた分化の評価を行った。

## 4. 研究成果

### 新規融合遺伝子 *HNRNPC-RARB* の同定

患者由来の白血病細胞をフローサイトメトリーで解析した結果 CD (cluster of differentiation)13, CD33, 細胞質ミエロペルオキシダーゼ, ヒト白血球抗原-DR (HLA-DR) が弱陽性であり, CD34 は陰性だった。骨髄検査ではアズール顆粒を有する芽球の存在が確認され、形態学的に急性前骨髄球性白血病と診断した。*PML-RARA* をはじめとした *RARA* 転座は陰性であり *RARB* FISH が陽性で検出された。したがって、何らかの *RARB* 転座を有することが考えられたため、全ゲノムシークエンスを行った。その結果、*RARB* を含むブレイクポイントの候補が検出され同ブレイクポイントでは *HNRNPC* 遺伝子の 5' 領域 (exon1 から exon3 まで) と *RARB* の 3' 領域 (exon2 から exon8 まで) がインフレームで融合していることを確認した (chr14:21701608-chr3:25491112) (図 1)。

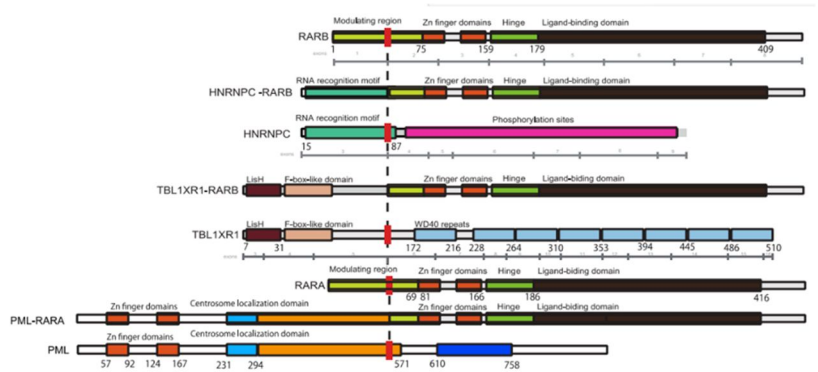


図 1. *HNRNPC-RARB* 及び *RARB* 転座の構造

### 新規 *HNRNPC-RARB* のレチノイン酸経路に対する影響

*HNRNPC-RARB* のレチノイン酸経路に対する転写活性への影響を確認するため、ルシフェラーゼアッセイを用いて、RARE(retinoic acid receptor element)への影響を確認した。その結果、*RARA*, *RARB* と比較して、有意に *HNRNPC-RARB* は RARE に対する転写活性が低いことを確認した。さらに、*RARA*, *RARB* と *HNRNPC-RARB* を共感染させ、RARE への影響をしらべたところ、*RARA*, *RARB* 単独と比較して、転写活性が低下することを確認した(図 2)。つまり、dominant-negative に *RARA*, *RARB* の転写活性を阻害することを確認することができた。これは、*PML-RARA* 及び、我々が報告した *TBL1XR1-RARB* と同様の作用を示すことがわかった。

さらに、この融合遺伝子が、*PML-RARA* や *TBL1XR1-RARB* と同様に二量体を形成して、RARE に対して dominant-negative に転写活性を阻害するかを検証するため、共免疫沈降を行った。その結果、*HNRNPC-RARB* も同様に二量体を形成することを確認した。

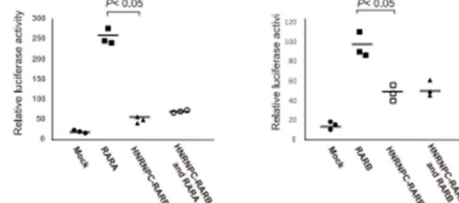


図 2. RARB 転座のルシフェラーゼアッセイ

### RARB 転座陽性の急性前骨髄球性白血病の合成レチノイドに対する影響

クローニングした *RARB*, *RARA* と *HNRNPC-RARB* を共感染させ、ATRA, Am80, アシトレチン、アリトレチノイン、イソトレチノイン、タザロテンといった合成レチノイドを投与し、二量体の解除及びルシフェラーゼ活性による RARE への影響を検証した。しかし、合成レチノイドは二量体形成の解除効果、RARE の転写活性の回復は認めなかった。これは臨床的に ATRA が有効でなかったことと合致する所見であった。また、他の合成レチノイドも同様の結果であることから、*RARB* 転座の有するレチノイン酸経路の影響については合成レチノイドにより解除されないことがわかった。したがって、新たな治療戦略を確立するため、RNA シークエンスを用いた遺伝子発現解析を行うこととした。

### RARB 関連融合遺伝子導入細胞の遺伝子発現プロファイル

*RARB* 転座陽性 APL に対する合成レチノイドの有効性が限定的であることから、新たな治療薬剤となる候補の探索を目的として RNA シークエンスを行った。RARB 関連融合遺伝子導入ヒト CD34 陽性細胞の遺伝子発現プロファイルを得て、各融合遺伝子の発現の特徴を比較した。GSEA の結果、*PML-RARA* と同様の遺伝子発現プロファイルを示すことがわかった。さらに、複数の gene set に着目し解析を行った結果、PPAR 標的 遺伝子群が、*RARB* 転座を導入した細胞ではより顕著に抑制されていた(図 3)。

一方、*HNRNPC-RARB* 導入細胞に関して RNA シークエンスのデータを用いて volcano plot 解析を行なったが、*PML-RARA* 導入細胞や *TBL1XR1-RARB* 導入細胞と比較し遺伝子発現変化が非常に乏しかったため、GSEA は実施しなかった。

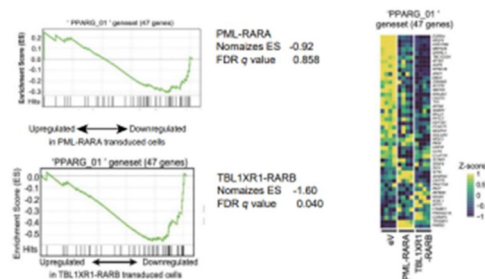


図 3. GSEA analysis

### PPAR アゴニストの RARB 関連融合遺伝子導入細胞への影響

上記結果より、PPAR の活性化に *TBL1XR1-RARB* の発がん作用を減弱させる可能性が示唆された。その結果 *TBL1XR1-RARB* を導入したヒト CD34 陽性細胞を PPAR リガンド(ピオグリタゾンまたは CDDO) 単剤の存在下で培養したが、骨髄球系細胞への分化誘導を示さなかった。一方で ATRA とピオグリタゾン、または ATRA と CDDO の併用下で細胞を培養したとき、ATRA 単独と比較し強い分化誘導効果を示した。つまり、ATRA と PPAR 阻害剤の併用が有用である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Osumi Tomoo, Watanabe Akihiro, Okamura Kohji, Nakabayashi Kazuhiko, Yoshida Masanori, Tsujimoto Shin ichi, Uchiyama Meri, Takahashi Hiroyuki, Tomizawa Daisuke, Hata Kenichiro, Kiyokawa Nobutaka, Kato Motohiro	4. 巻 58
2. 論文標題 Acute promyelocytic leukemia with a cryptic insertion of RARA into TBL1XR1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes, Chromosomes and Cancer	6. 最初と最後の頁 820 ~ 823
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/gcc.22791	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 Yoshida Masanori, Nakabayashi Kazuhiko, Yang Wentao, Sato-Otsubo Aiko, Tsujimoto Shin-ichi, Niwa Akira, Hata Kenichiro, Yang Jun J, Kato Motohiro et al	4. 巻 5
2. 論文標題 <i>NUDT15</i> variants confer high incidence of second malignancies in children with acute lymphoblastic leukemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 5420 ~ 5428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2021005507	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 Sasaki K, Tsujimoto S, Miyake M, Uchiyama Y, Ikeda J, Yoshitomi M, Shimosato Y, Tokumasu M, Matsuo H, Yoshida K, Ohki K, Kaburagi T, Yamato G, Hara Y, Takeuchi M, Kinoshita A, Tomizawa D, Taga T, Adachi S, Tawa A, Horibe K, Hayashi Y, Matsumoto N, Ito S, Shiba N	4. 巻 194
2. 論文標題 Droplet digital polymerase chain reaction assay for the detection of the minor clone of KIT D816V in paediatric acute myeloid leukaemia especially showing RUNX1-RUNX1T1 transcripts.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 414 ~ 422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Tsujimoto SI, Shirai R, Utano T, Osumi T, Matsumoto K, Shioda Y, Kiyotani C, Uchiyama T, Deguchi T, Terashima K, Tomizawa D, Matsumoto K, Kato M.	4. 巻 111
2. 論文標題 Comparison of clonazepam and levetiracetam in children for prevention of busulfan-induced seizure in hematopoietic stem cell transplantation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 463 ~ 466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kaoru Yoshida, Shinichi Tsujimoto, Motohiro Kato, et al.
2. 発表標題 RARA陰性APLにおける新規融合遺伝子HNRNPC-RARBの同定
3. 学会等名 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kaoru Yoshida, Moe Tamura, Shinichi Tsujimoto, Motohiro Kato, et al.
2. 発表標題 TBL1XR1-RARB陽性急性前骨髄球性白血病の病態基盤とPPARγリガンドの生物学的効果の検討
3. 学会等名 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masanori Yoshida, Takaya Moriyama, Rina Nishii, Shinichi Tsujimoto, Motohiro Kato, et al.
2. 発表標題 小児ALLにおけるSandwich ELISAを用いたNUDT15蛋白定量
3. 学会等名 日本小児血液がん学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masahiro Yoshitomi, Junji Ikeda, Shinichi Tsujimoto, Norio Shiba et al
2. 発表標題 小児急性骨髄性白血病においてDOCK1遺伝子高発現は予後不良因子となり得る
3. 学会等名 日本小児血液がん学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masahiro Yoshitomi, Shinichi Tsujimoto, Junji Ikeda, Norio Shiba et al
2. 発表標題 小児急性骨髄性白血病における、ChIP-seqを用いたPRDM16結合部位の同定
3. 学会等名 日本小児血液がん学会
4. 発表年 2021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