

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17384

研究課題名(和文)小児白血病の発症・予後に関連する免疫グロブリン領域関連融合遺伝子の検出法の開発

研究課題名(英文)Development of methodology detecting immunoglobulin related fusion genes in pediatric leukemia

研究代表者

渡部 悟(Watanabe, Satoru)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・小児血液・腫瘍研究部・研究員

研究者番号：00829418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：免疫グロブリン(IG)領域を対象としたカスタムパネルの設計・修正を行うと共に、フローサイトメトリー解析や病理解析等の結果からIGH-DUX4やIGH-MYCが疑われる小児造血器腫瘍についてRNAパネルシーケンス解析を行った。10例中8例でIGH-DUX4が、3例中2例でIGH-MYCが検出され、ダイレクトシーケンス法で切断点を確認した。今回の研究でIG領域を含む融合遺伝子を検出可能なRNAパネルシーケンス法の開発に成功した。今後はこのパネルを用いて原因となる遺伝子異常の同定ができていない小児造血器腫瘍を対象に新規融合遺伝子の検出および治療標的となる遺伝子の検索を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、小児急性リンパ芽球性白血病(ALL)に対する次世代シーケンス等の解析が進み、IGH-DUX4やIGH-EPOR等の免疫グロブリン(IG)が関連する遺伝子再構成がB前駆細胞型ALLの5-10%で同定され、新規の予後因子候補と期待されているが実臨床での検出方法は未だに確立されていないが、本研究でIG領域を含む融合遺伝子を検出可能なカスタムパネルを作製することに成功した。今後はこのパネルを用いて解析を行うことにより新規の融合遺伝子や治療標的の候補となる遺伝子異常を同定し、治療の層別化に利用することで、小児ALLの予後の向上に役立てられると考えている。

研究成果の概要(英文)：We designed and modified a custom panel for the immunoglobulin (IG) region and performed RNA panel sequencing analysis on pediatric hematopoietic tumors suspected of IGH-DUX4 or IGH-MYC based on flow cytometry and FISH analysis. IGH-DUX4 was detected in 8 of 10 cases and IGH-MYC in 2 of 3 cases, and the fusion points were confirmed by direct sequencing. In this study, we succeeded in creating a custom panel that can generally detect fusion genes containing the IG region. We plan to use this panel to detect novel fusion genes and search for therapeutic target genes in cases with Acute Lymphoblastic leukemia/lymphoma, and mature B cell leukemia/lymphoma for which fusion genes have not yet been identified.

研究分野：血液腫瘍

キーワード：小児がん 白血病 リンパ腫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性リンパ芽球性白血病 (ALL: Acute Lymphoblastic Leukemia) は、種々の複合的遺伝子異常によって生じる多様な疾患群の集合であり、発症の主要原因と考えられる遺伝子異常によって、白血病細胞の生物学的特性や臨床特性には強い相関が認められる。

2012 年末から本格的に開始された日本小児がん研究グループ血液腫瘍分科会 (JPLSG) の中央診断によって、わが国のほぼ全ての小児白血病症例が共通のプラットフォームによる詳細な分子診断を受ける体制が確立され、その診断情報が蓄積されている。この中央診断によって、わが国における白血病発症の実態の解明が進んでおり、主要な既知の遺伝子異常については、それぞれの臨床所見についての知見が集積されている。しかし BCP-ALL の約 1/3 ~ 1/4 の症例は B-others と総称され、発症に関わる遺伝子異常が明らかではない。

2. 研究の目的

近年、B-others 症例に対する次世代シーケンス解析により、新規の融合遺伝子として Ph-like ALL 関連融合遺伝子や ZNF384 関連融合遺伝子、MEF2D 関連融合遺伝子などに加えて、IGH-CRLF2 や IGH-DUX4 等の免疫グロブリン領域との融合遺伝子が同定され、新規の予後因子や治療標的となることが期待されている。一方で、次世代シーケンス解析を行っても、依然として ALL の 20% 前後の症例で白血病発症に関わる遺伝子異常が同定されておらず、既存の解析方法で見つけられない遺伝子異常を同定する方法の開発が急務となっている。

免疫グロブリン領域との融合遺伝子は、B-others の中に一定の割合で含まれていると推測されるが、免疫グロブリンの様々な部位と融合遺伝子を形成することから、既存の全 RNA シーケンス解析ではデータ解析中にエラーと認識されるため、検出が困難な場合がある。本研究では、免疫グロブリン領域を標的とした RNA target capture sequencing 解析を行うことで、これまでの全 RNA シーケンス解析に比べて、より高感度で効率的な免疫グロブリン関連融合遺伝子の同定法を開発を行う。

3. 研究の方法

本研究の対象は、BCP-ALL の中で既知の遺伝子異常 (融合遺伝子、染色体数の異常) が認められない B-others で、TCCSG および JPLSG に登録され、検体の研究利用の同意が得られ、検体が保存されている症例である。具体的には、1) フローサイトメトリー法や G-band 法で染色体数の異常を示さない 2) FISH 法、定量 PCR 法等の既存の遺伝子異常を検出できない症例で、TCCSG 登録症例 100 例、JPLSG 登録症例 20 例について、TCCSG と JPLSG の検体保存センターから分与を受ける。TCCSG 症例については臨床情報が紐付けされている。今回の研究では、B-others 症例の RNA について、イルミナ社の次世代シーケンサーを用いた RNA target capture sequencing 解析を行い、より高感度で効率的に免疫グロブリン関連融合遺伝子の検出方法の開発を目的とする。RNA target capture sequencing 解析は検体から抽出した RNA を Agilent 社の SureSelect ターゲットエンリッチメントシステムを用い、mRNA を抽出後断片化しアダプター配列をつけてフローセルに結合させる。その後 PCR 反応で増幅してクラスターを形成させ、傾向標識した A, T, G, C のヌクレオチドを添加し、1 回の伸長反応ごとに傾向を読み取ることで塩基配列を決定し、解析を行う。

今回は免疫グロブリン領域 (IGH、IGK、IGL) の遺伝子をあらかじめ選択して抽出することで解析時間の短縮およびより深度の深い解析を行うことが可能である。免疫グロブリン領域を対象とするカスタムパネルを作成後、TCCSG 登録症例と JPLSG 登録症例について RNA target capture sequencing 解析による免疫グロブリン関連融合遺伝子解析を行う。候補融合遺伝子を抽出し、direct sequencing 法で validation を行い、候補遺伝子を絞り込む。さらに臨床情報との統合解析によって予後に関わる免疫グロブリン関連融合遺伝子の発見を目指す。

4. 研究成果

令和元年度から 3 年度にかけてカスタムパネルの設計・修正を行うと共に、フローサイトメトリー解析や FISH 解析等の結果から IGH-DUX4 や IGH-MYC が疑われる小児造血器腫瘍について RNA パネルシーケンス解析を行った。10 例中 8 例で DUX4-IGH が、3 例中 2 例で IGH-MYC が検出され、direct sequencing 法で切断点を確認した。また、特定領域に絞って解析を行うためディープシーケンスも同時に可能となり、造血器腫瘍の発症に関与するマイナークローンも検出できる可能性が示唆された。条件検討の結果、RNA の品質を示す RIN 値が 5.0 未満の検体では、RNA の分解により遺伝子異常の検出が困難であった。

免疫グロブリン領域が関連する遺伝子再構成は既存の全 RNA シーケンス解析では解析が困難であり、実臨床での検出方法は未だに確立されていないが、本研究では検出可能な RNA パネルシーケンス法の開発に成功した。

今後はこのパネルを用いて多数検体の解析を行うことで新規の融合遺伝子や治療標的の候補となる遺伝子異常を同定し、治療の層別化に利用することで、小児造血器腫瘍の予後の向上に役立つ

てられると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡部悟、大木健太郎、出口隆生、清河信敬
2. 発表標題 小児急性リンパ性白血病の融合遺伝子検出のためのパネル開発
3. 学会等名 第66回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2019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
---------	---------