

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591410

研究課題名(和文)急性前骨髄性白血病キメラ遺伝子BCOR-RARAによる白血病発症機序の解明

研究課題名(英文)Leukemogenic property of acute promyelocytic leukemia gene, BCOR-RARA

研究代表者

山本 幸也(YAMAMOTO, Yukiya)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号：90410703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：BCOR-RARA強制発現マウス細胞株では分化誘導が障害されていたが、ATRA投与により改善傾向が見られた。t(X;17)(p11;q12) APL症例の全エクソーム解析からBCOR-RARAと共存する他の遺伝子異常は検出されなかった。72例のAML検体を用いたBCOR遺伝子解析から4検体5種の遺伝子異常が検出された。以上よりBCORの機能異常が骨髄性白血病発症において重要な役割を持っていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：32D cell lines with BCOR-RARA exhibited differentiation block under G-CSF condition, however ATRA administration induced myeloid differentiation. Whole exome sequences with t(X;17)(p11;q12) APL samples revealed no additional gene mutations except BCOR-RARA. Deep sequence by next generation sequence of BCOR region detected 5 different BCOR mutations from 4 samples. Taken together, BCOR has important roles as a tumor suppressor.

研究分野：血液腫瘍学

キーワード：急性骨髄性白血病 急性前骨髄性白血病 BCOR RARA

1. 研究開始当初の背景

急性前骨髄性白血病 (APL) は特徴的な染色体転座、臨床像を持つ病型のひとつである。典型的な APL ではキメラ遺伝子 PML-RAR α が発症原因とされる。All-trans retinoic acid (ATRA) は RAR α に結合して PML-RAR α による転写抑制を解除することにより白血病細胞を分化誘導して細胞死を導くと考えられている。しかし臨床においては ATRA 単独では病気の治癒は得られないことから PML-RAR α のみが単一の発がんメカニズムではないと推定されている。

我々は t(X;17)(p11;q12) APL variant より BCOR-RAR α キメラ遺伝子をクローニングした。また BCOR-RAR α が内在性 RAR α の機能を阻害することを明らかにした。BCOR はクロマチン修飾分子などと結合することが知られている転写抑制因子であり、マウス胎児の発生、分化に重要な役割を持つこと、人の遺伝病 OFCD で BCOR に高率に遺伝子異常があることが報告されている。我々の報告した症例は男性であり BCOR は X 染色体上にあることから、ひとつの染色体転座により BCOR-RAR α と正常 BCOR の欠損が同時に起こる。これは t(X;17)(p11;q12) APL variant 発症に BCOR の機能欠損が関わる事を示唆する。

2. 研究の目的

本研究では、BCOR は発生だけでなく腫瘍の発生にも重要な役割があるとの仮説を検討した。

3. 研究の方法

- (1) BCOR-RAR α の造血細胞における機能解析：骨髄球系マウス細胞株 32D へ遺伝子導入するために Lentivirus ベクター (pHIVIG) へ BCOR-RAR α 遺伝子等を挿入した。このベクターと pPAX2, pMD2.G とともに HEK293T 細胞で共発現させて上清にウイルスを作製した。32D 細胞をポリブレン存在下でウイルス上清を加えて、1 時間遠心することにより細胞へ感染させた。Puromycin により遺伝子導入細胞を選択した。発現蛋白の確認は Western blot 法で行った。32D 細胞の分化誘導には IL-3 非存在下で G-CSF 投与下に 7 から 10 日間培養後、ギムザ染色で形態を観察した。
- (2) t(X;17)(p11;q12) APL 症例における全エクソーム解析：当院の症例由来 t(X;17)(p11;q12) APL genomic DNA を初診時、再発時、寛解時の保存検体から抽出した。品質評価後に DNA 破碎装置で断片化してピークサイズが 300 bps であることを確認しライブラリーとした。全エクソン領域を濃縮するために SureSelect Oligo Capture とライブラリーをハイブリダイゼーションすることに

より濃縮、回収した。Index 付き primer で PCR をすることによりシークエンスライブラリーとした。クラスター形成には cBot, シークエンス解析は HiSeq 2000 を使用した。1 検体につき 6 千万リードの出力が得られた。データ解析には CLC bio 社 Cancer Research Workbench を使用した。

- (3) 急性骨髄性白血病 (AML) 患者サンプルにおける BCOR 遺伝子異常の検討：当院における初発 AML 患者検体の genomic DNA より高正確性 PCR 酵素を用いて BCOR エクソン領域を 5 箇所 (483 – 4495 bps) に分割して増幅した。コントロールとして TP53 遺伝子を 2 箇所 (455 – 2912 bps) に分けて増幅、精製した。PCR 産物を患者ごとに混合してライブラリーとした。Illumina 社 Nextera XT キットを用いて断片化と index 付加を行った。Illumina 社 MiSeq を用いて DNA シークエンスを行った。2 4 検体につき約 1 G のデータを得た。データ解析には CLC bio 社 Cancer Research Workbench を使用した。

4. 研究成果

- (1) BCOR-RAR α の造血細胞における機能解析：骨髄球分化に与える BCOR-RAR α の影響を調べるため、BCOR-RAR α 発現 32D 細胞を作製した。G-CSF 誘導による分化誘導は BCOR, RARA 発現 32D 細胞ではコントロール細胞と比較して変化はみられなかったが、BCOR-RAR α 発現 32D 細胞は G-CSF 投与下の分化誘導に反応性が低下しており、幼弱な形態の細胞が残存した。また、ATRA 添加時には分化誘導が回復した。しかし、IL-3 および G-CSF 非存在下は不死化することなく死滅したことから、BCOR-RAR α の細胞増殖に与える影響はないと考えられた。更に同様の系を用いて正常マウス骨髄細胞へ BCOR-RAR α 遺伝子を導入して検討を進めている。
- (2) t(X;17)(p11;q12) APL 症例における全エクソーム解析：患者寛解時検体をコントロールとして初診時および再発時検体の遺伝子変異解析を行ったが、白血病特異的遺伝子変異は検出されなかった。このことから本症例においては BCOR-RAR α キメラ遺伝子が腫瘍の主原因であると考えられた。
- (3) BCOR 遺伝子解析：7 2 例の AML 検体から PCR Amplicon で標的を絞った deep sequence を行った。平均的に数百 coverage が得られており、数%程度の異常も検出できる精度が得られた。TP53 遺伝子には 1 1 検体で 1 4 種のアミノ酸

変異を起こす異常が 19.1%から 98.4%の頻度の幅で検出された。患者生存曲線でも既存の報告と同様、予後不良であることが有意差 (P=0.0291)を持って見られた。BCOR 遺伝子には 4 検体で 5 種のアミノ酸変異を起こす異常が 6.85%から 96.2%の頻度の幅で検出された。変異は Ser839fs, Gln1074*, Tyr653fs, Gln312del, Asp284Glu であった。患者生存曲線は有意差 (P=0.731)は見られないものの、予後不良傾向であった。更に 24 例分を追加で解析中である。このことから BCOR は AML 検体からも機能喪失型変異が検出され、腫瘍抑制因子として機能しているものと考えられた。

- (4) その他の共同研究として白血病に関連した RUNX1 の機能解析、RUNX1 の新たな融合遺伝子の同定について報告した。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 12 件)

The fate of patients with acute myeloid leukemia not undergoing induction chemotherapy. Masamitsu Yanada, Akinao Okamoto, Yoko Inaguma, Masutaka Tokuda, Satoko Morishima, Tadaharu Kanie, Yukiya Yamamoto, Shuichi Mizuta, Yoshiki Akatsuka, Masataka Okamoto, Nobuhiko Emi. International journal of hematology. 2015 Mar 31. DOI:10.1007/s12185-015-1786-0, 査読有

Clarifying the Impact of Polycomb Complex Component Disruption in Human Cancers. Yamamoto Y, Abe A, Emi N. *Molecular Cancer Research*: 2014 Apr;12(4):479-84, DOI:10.1158/1541-7786.MCR-13-0596, 査読有

Functionally Deregulated AML1/RUNX1 Cooperates with BCR-ABL to Induce a Blastic Phase-Like Phenotype of Chronic Myelogenous Leukemia in Mice. Kiyoko Yamamoto, Shinobu Tsuzuki, Yosuke Minami, Yukiya Yamamoto, Akihiro Abe, Koichi Ohshima, Masao Seto, Tomoki Naoe. *PLOS ONE*: 2013 Sep 30;8(9):e74864. DOI:10.1371/journal.pone.0074864, 査読有

A novel RUNX1-C11orf41 fusion gene in a case of acute myeloid leukemia with

t(11;21)(p14;q22). Abe A, Katsumi A, Kobayashi M, Okamoto A, Tokuda M, Kanie T, Yamamoto Y, Naoe T, Emi N. *Cancer Genetics*; 2012 Nov;205(11):608-11. DOI:10.1016/j.cancergen.2012.10.001, 査読有

t(X;17)(p11;q21) BCOR/RARA. Yamamoto Y. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 2012; 16(6), DOI : 10.4267/2042/47344, 査読有

Isolation of human mAbs that directly modulate FMS-related tyrosine kinase 3 signaling. Yamamoto Y, Tsuzuki S, Akahori Y, Ukai Y, Sumitomo M, Murayama Y, Yamamoto K, Inaguma Y, Tokuda M, Abe A, Akatsuka Y, Emi N, Kurosawa Y. *Cancer Science*. 2012;103(2):350-9. DOI:10.1111/j.1349-7006.2011.02141.x, 査読有

[学会発表](計 6 件)

Yamamoto Y, Abe A, Emi N, Clarifying the Impact of Polycomb Complex Component Disruption in Human Cancers. The 5th JSH International Symposium. 2014/5/25. 静岡県浜松市

Yamamoto Y, Abe A, Emi N, Clarifying the Impact of Polycomb Complex Component Disruption in Human Cancers. The 105th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, 2014/4/6, San Diego, USA

Inaguma Y, Akahori Y, Akatsuka Y, Murayama Y, Shiraishi K, Tsuzuki-Iba S, Endoh A, Tsujikawa J, Demachi-Okamura A, Hiramatsu K, Saji H, Yamamoto Y, Yamamoto N, Nishimura Y, Takahashi T, Kuzushima K, Emi N. Construction and Molecular Characterization Of a T-Cell Receptor-Like Antibody and CAR-T Cells Specific For Minor Histocompatibility Antigen HA-1H. 第 55 回米国血液学会, 2013.12.9 . New Orleans, USA.

Yukiya Yamamoto, Sachiko Tsuzuki, Motohiro Tsuzuki, Kousuke Handa, Yoko Inaguma and Nobuhiko Emi: BCOR as a novel fusion partner of retinoic acid receptor alpha in a t(X;17)(p11;q12) variant of acute promyelocytic leukemia, 第 53 回米国血液学会、2011/12/11, San Diego, USA

山本幸也、都築佐知子、都築基弘、半田幸助、稲熊容子、恵美宣彦：t(X;17)急性前骨髄性白血病よりクローニングされた新規融合遺伝子 BCOR-RARA と分子生物学的機能解析、第12回基礎血液懇話会、2011/6/24、名古屋大学医学部、愛知県名古屋市

山本幸也、都築佐知子、都築基弘、半田幸助、稲熊容子、恵美宣彦：t(X;17)(p11;q21)急性前骨髄性白血病における融合遺伝子 BCOR-RARA のクローニングと機能解析、第7回麒麟塾、東京、2011/6/4、品川カンファレンスルーム、東京都品川区

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 幸也 (YAMAMOTO Yukiya)
藤田保健衛生大学・医学部・講師
研究者番号：90410703