

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460699

研究課題名(和文)慢性骨髄性白血病細胞を1細胞レベルまで検出可能な病態モニタリング技術開発

研究課題名(英文)A novel approach for monitoring the minimal residual disease in chronic myeloid leukemia

研究代表者

佐藤 恵理子 (Sato, Eriko)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：60398675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：慢性骨髄性白血病における治療効果の判定には、定量的PCR法を用いたBCR/ABL mRNA発現量の定量が採用されることが一般的である。しかしながら、従来法では再発を予測できないことが問題となっている。本研究では、BCR/ABLキメラ遺伝子の融合点に着目した新規検出系を構築することで、従来法よりも高感度な技術の確立を目的とした。

本技術により、3種類の細胞株それぞれのBCR/ABL融合点を同定でき、そのうち2種類においてBCR/ABLキメラ遺伝子を検出するための系を確立できた。本技術は、まだ改善の余地はあるものの、患者体内の慢性骨髄性白血病細胞を1細胞レベルで検出できる可能性を秘めた技術である。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to develop a method for monitoring the minimal residual disease in chronic myeloid leukemia (CML). Because of the low expression level of the BCR/ABL mRNAs in CML progenitor cells, conventional monitoring methods targeting BCR/ABL mRNAs cannot predict the relapse of CML. Here, we have developed the method to identify the BCR/ABL breakpoint in genomic DNAs. BCR/ABL breakpoint in genomic DNAs is expected to be a surrogate marker of minimal CML cells because the copy number of DNAs correspond to the number of cells. We demonstrated the BCR/ABL breakpoints of K562, KCL-22, and TCC-S cells can be detected using the method. Furthermore, we were able to construct the highly sensitive monitoring method targeting the identified breakpoint in two of the three cell lines (K562 and KCL-22). Although the method should be brushed up for the practical use, the method has a potential to detect a single CML cell in patients with CML.

研究分野：血液内科学

キーワード：慢性骨髄性白血病 BCR/ABLキメラ遺伝子 病態モニタリング

### 1. 研究開始当初の背景

慢性骨髄性白血病 (chronic myeloid leukemia: CML) は白血球の過剰な産生をきたす病気で、我が国における罹患者は国民 10 万人あたり 1~2 名とされ、全国に 1 万人弱の罹患者がいると見積られる。CML は 9 番染色体と 22 番染色体の相互転座により形成される BCR/ABL キメラ遺伝子が原因で発症することが明らかとなっている。

BCR/ABL キメラタンパク質は CML 治療の標的として有望であり、現在では BCR/ABL キメラタンパク質のチロシンキナーゼ活性阻害薬 (tyrosine kinase inhibitor: TKI) による治療が一般的となっている。TKI の投与により BCR/ABL キメラタンパク質の働きが抑制されるため、患者体内の CML 細胞数は減少してゆく。この経過を客観的に評価し、TKI の治療効果判定の指標とするため、BCR/ABL mRNA の発現量を定量的 PCR 法によって定量する手法が採られている。しかしながら、定量的 PCR 法により BCR/ABL mRNA の発現が 2 年間検出されなかった症例においても、TKI 投与を中止すると実に 60% 以上もの患者が CML を再発するとの報告がある。これは、定量的 PCR 法では検出できない微小な腫瘍細胞が存在しているためと考えられ、定量的 PCR 法では感度が不十分であり、現状の病態モニタリング技術では投薬中止の判断が不可能であることを意味する。

定量的 PCR 法では感度が不十分な理由として、腫瘍細胞のもととなる前駆細胞では BCR/ABL mRNA の発現量が低いことが挙げられる。そのため、定量的 PCR 法では前駆細胞の存在を認識できず、結果として CML の再発を予測できないものと推察される。そこで、BCR/ABL mRNA 発現の有無に関わらず、腫瘍細胞量を測定できる新たな指標が必要である。このような指標として、BCR/ABL キメラ遺伝子の融合点 (BCR/ABL breakpoint) が挙げられる。BCR/ABL breakpoint は CML 細胞のゲノム DNA 中のみ存在するため、遺伝子発現の影響を受けず、BCR/ABL mRNA に替わる新たな指標として利用できると考えられる。BCR/ABL breakpoint は患者ごとに特有であるが、主に BCR のエクソン 12 から 15 間の約 4.5 kbp、ABL のエクソン 1a 下流から 2 に至る約 200 kbp の間に集中することが明らかとなっている。以上のことから、患者ごとに特有の BCR/ABL breakpoint を同定し、それを検出できる技術を構築すれば、CML の再発を予測することが可能になると期待される。

### 2. 研究の目的

以上を踏まえ、本研究では、ゲノム DNA より BCR 配列を含む DNA 断片のみを特異的に濃縮し、これを次世代シーケンサーにより網羅的に解析することで、効率的に BCR/ABL breakpoint を同定できる技術を構

築することを目的とした。本研究はまた、同定された BCR/ABL breakpoint に着目した定量系を構築し、これが従来手法では不可能であった、CML の再発を予測できるレベルにまで BCR/ABL キメラ遺伝子量を定量できる技術の確立をも目的としている。

### 3. 研究の方法

#### 3. 1. 本研究の概要

本研究では、BCR 配列を含む DNA 断片を濃縮するため、BCR 配列をもつ RNA ベイトをビオチン標識し、これをゲノム DNA とハイブリダイズさせ、しかるのちにアビジンコートされたマグネティックビーズと結合・溶出させることにより BCR 配列をもつ DNA 断片をゲノム DNA から分離する。このとき、ゲノム DNA にはなるべく多くの腫瘍細胞由来の DNA が含まれている必要があるため、患者初診時の骨髄生検をホルマリン固定し、パラフィン包埋したサンプル (formalin-fixed paraffin-embedded: FFPE) を用いた。分離した DNA の配列を次世代シーケンサーにより解読し、BCR/ABL breakpoint を同定し、その周辺で検出系を構築することにより、患者ごとの BCR/ABL breakpoint 同定技術の構築を目指した。本研究の概要を図 1 に示す。

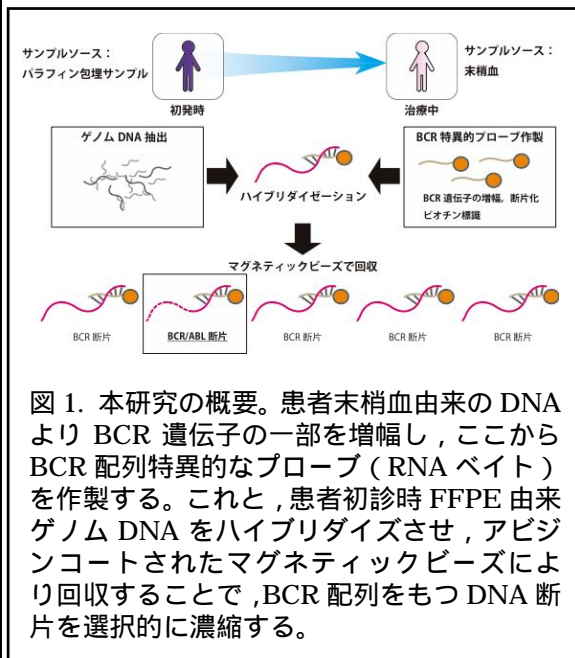


図 1. 本研究の概要。患者末梢血由来の DNA より BCR 遺伝子の一部を増幅し、ここから BCR 配列特異的なプローブ (RNA ベイト) を作製する。これと、患者初診時 FFPE 由来ゲノム DNA をハイブリダイズさせ、アビジンコートされたマグネティックビーズにより回収することで、BCR 配列をもつ DNA 断片を選択的に濃縮する。

#### 3. 2. BCR/ABL breakpoint の同定

ゲノム DNA から BCR 配列を持つ DNA 断片のみを選択的に濃縮するための技術を構築した。CML 由来の細胞株 (K562, KCL-22, TCC-S) よりゲノム DNA を抽出し、BCR エクソン 12~15 の領域を PCR により増幅した。得られた PCR 産物を鋳型とし、RNA ポリメラーゼと biotinylated dUTP の取り込みによる RNA への転写、ビオチン標識を行った。標識した RNA を 500 nt 程度に断片化し、BCR 配列に特異的なベイトを作製した。作製したベイトと、細胞株ペレットを FFPE とし

たサンプルから抽出したゲノム DNA をハイブリダイズさせた後、ゲノム DNA-RNA ベイトの複合体をアビジンコートされたマグネティックビーズで回収し、これを溶出することで BCR 配列をもつ DNA 断片を得た。回収した DNA の配列を次世代シーケンサーにより解読することで、3 種類の細胞株に特有の BCR/ABL breakpoint の同定を試みた。

### 3.3. BCR/ABL キメラ遺伝子数の定量技術の構築

3.2. において同定した BCR/ABL breakpoint を含む領域で、universal Q-probe PCR 法 (Tani H, et al., *Anal Chem* 2009) による BCR/ABL キメラ遺伝子の検出系を構築した。構築した系を用いて、細胞株由来のゲノム DNA 中の BCR/ABL キメラ遺伝子をどの程度まで検出できるか検証した。

## 4. 研究成果

### 4.1. BCR 特異的 RNA ベイトの作製

K562, KCL-22, TCC-S 株よりそれぞれゲノム DNA を抽出し、BCR エクソン 12 から 15 までの領域 (4,568 bp) を PCR により増幅させた。PCR 産物を電気泳動して目的のサイズのバンドを切り取り、精製した。精製した PCR 産物を鋳型として in vitro transcription 法により RNA への転写、および、ピオチン標識を行った。作製したピオチン標識 RNA をソニケーションにより 500 nt 程度に断片化することで、RNA ベイトを作製した。

### 4.2. FFPE サンプルからのゲノム DNA 抽出

K562, KCL-22, TCC-S 株の FFPE サンプルから、ミクロトームを用いて 10 μm のパラフィン切片を 8 枚ずつ削り出した。獲得した切片をキシレンにより脱パラフィン化し、アルカリ処理によってゲノム DNA を獲得した。獲得した DNA 量では解析に十分でないため phi29 DNA polymerase および random hexamer を用いて獲得した DNA のランダム増幅を行った。

### 4.3. BCR 配列を持つ DNA 断片の選択的濃縮

4.1. にて作製した RNA ベイトを、4.2. にて抽出・増幅させた DNA サンプルとハイブリダイズさせ、ベイトに結合した DNA 断片のみをアビジンコートされたマグネティックビーズで回収し、アルカリ処置により溶出した。溶出したサンプルを Tris-HCl で中和させた後、メンブレンカラムで精製した。

精製されたサンプルが BCR 配列をもつ DNA 断片のみであるかを確認するため、BCR, ABL いずれの遺伝子とも別の染色体上に存在する RNase P をネガティブコントロールとして、定量的 PCR 法による検証を行った。BCR/ABL, および、RNase P を特異的に増幅させるプライマーセットを用い、定量的 PCR 法を実施したところ、得られた増幅曲線から見積もられた BCR/ABL キメラ遺伝子のコピー数は RNase

P のコピー数の約 10,000 倍であり、作製した RNA ベイトにより BCR/ABL キメラ遺伝子を特異的に濃縮できた (図 2)。

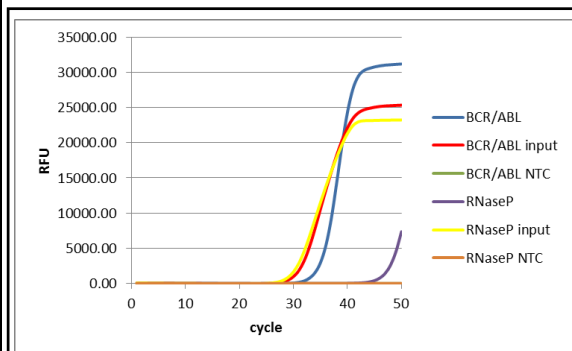


図 2. 定量的 PCR 法による BCR/ABL キメラ遺伝子の選択的濃縮の確認。インプットの BCR/ABL キメラ遺伝子数 (BCR/ABL input) と RNase P 遺伝子数 (RNase P input) がほぼ等しいのに対し、濃縮後の BCR/ABL キメラ遺伝子数 (BCR/ABL) と RNase P 遺伝子数 (RNase P) ではおよそ 15 サイクル程度の差が出ており、BCR/ABL キメラ遺伝子を選択的に濃縮できている。

### 4.4. 次世代シーケンサーによる BCR/ABL breakpoint 同定

4.3. にて濃縮したサンプルを phi29 DNA polymerase および random hexamer によりランダム増幅させ、次世代シーケンサーに供試した。得られたシーケンスデータを、CLC Bio 社の解析ソフトウェア (Genomics Workbench) を用いてリファレンス配列にマッピングしたところ、いずれの細胞株においても特定の位置にリードが集中したことから、この近傍に BCR/ABL breakpoint が存在すると考えられた (図 3)。

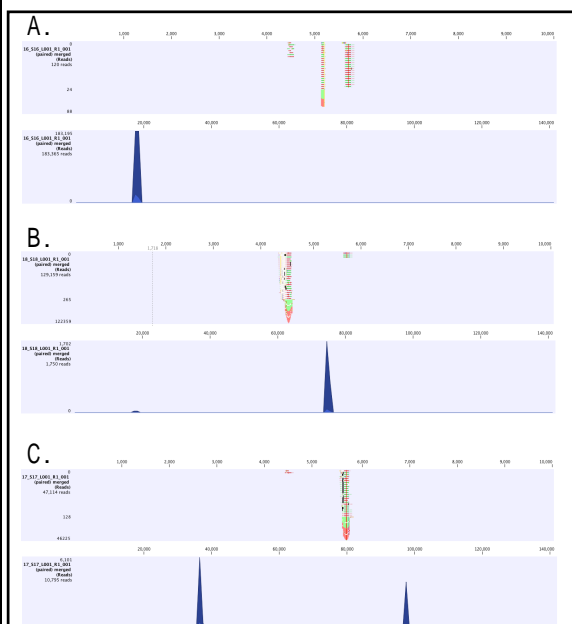


図 3. マッピングの結果。A: K562 株, B: KCL-22 株, C: TCC-S 株。上段: BCR, 下段: ABL。

そこで、BCR 配列、ABL 配列それぞれにおいて、リードが集中する位置で新たにプライマーを設計し、PCR を行った。その結果、いずれの細胞株においても目的の位置にバンドを確認でき、また、ネガティブコントロールとして設定した human genomic DNA ではバンドを確認できなかったことから、細胞株ごとに特有の BCR/ABL breakpoint 周辺を増幅できていることがわかった。さらに、ここで確認できたバンドを切り出し、サンガーシーケンスにより配列を解読した。解読された配列を NCBI にて BLAST サーチしたところ、K562 株、KCL-22 株では BCR 遺伝子と ABL 遺伝子がヒットし、またその境界を明確に確認できた(図4)。一方、TCC-S 株では BCR 遺伝子がヒットせず、3' 側が ABL 遺伝子にヒットするのみであったが、5' 側の配列を伸張させるようにプライマーを再設計し、これを同様の手順にて BLAST サーチすると BCR 遺伝子と ABL 遺伝子がヒットしたことから、プライマーの設計領域に制限はあるものの、3 種の細胞株すべての BCR/ABL breakpoint を同定できたことから、細胞株 FFPE サンプル由来のゲノム DNA から BCR/ABL breakpoint を同定するための技術を構築できたと結論付けた。

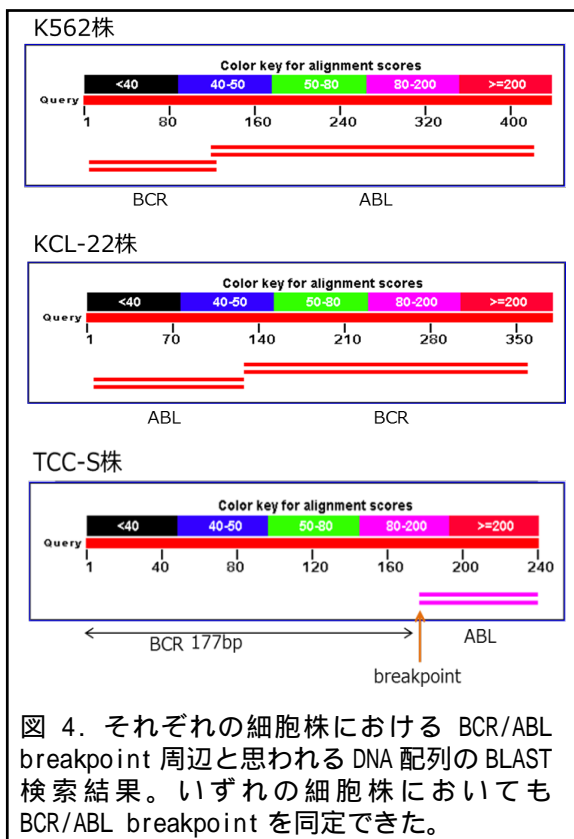


図4. それぞれの細胞株における BCR/ABL breakpoint 周辺と思われる DNA 配列の BLAST 検索結果。いずれの細胞株においても BCR/ABL breakpoint を同定できた。

#### 4.5. BCR/ABL breakpoint 検出系の構築

4.4. までにて同定した BCR/ABL breakpoint 近傍で、universal Q-probe PCR 法による検出系の構築を試みた。プライマーは増幅長が 100 bp 程度となるよう設計し、蛍光標識プローブは BCR/ABL breakpoint を

含むように設計した。設計したプライマー・プローブによる本系の検出下限を決定するため、3 種の細胞株から抽出したゲノム DNA を段階的に希釈し、これを CML 以外の細胞株である SET-2 株由来のゲノム DNA にスパイクインすることで BCR/ABL キメラ遺伝子の希釈系列を作製した。作製したサンプルを鋳型として universal Q-probe PCR 法を行った。すべてのサンプルは 3 連で実施し、得られた値の平均値を用いて解析を行った。その結果、K562 株では 0.2 コピー、KCL-22 株では 3 コピーまで BCR/ABL キメラ遺伝子を検出できることが明らかとなった(図5)。ところが、TCC-S 株では蛍光強度比の最大値が低く、検出下限値を決定できなかった。この原因として、プライマーの増幅効率や universal Q-probe の結合率が挙げられ、BCR/ABL breakpoint の配列によっては対象を満足に検出できない可能性が示唆された。

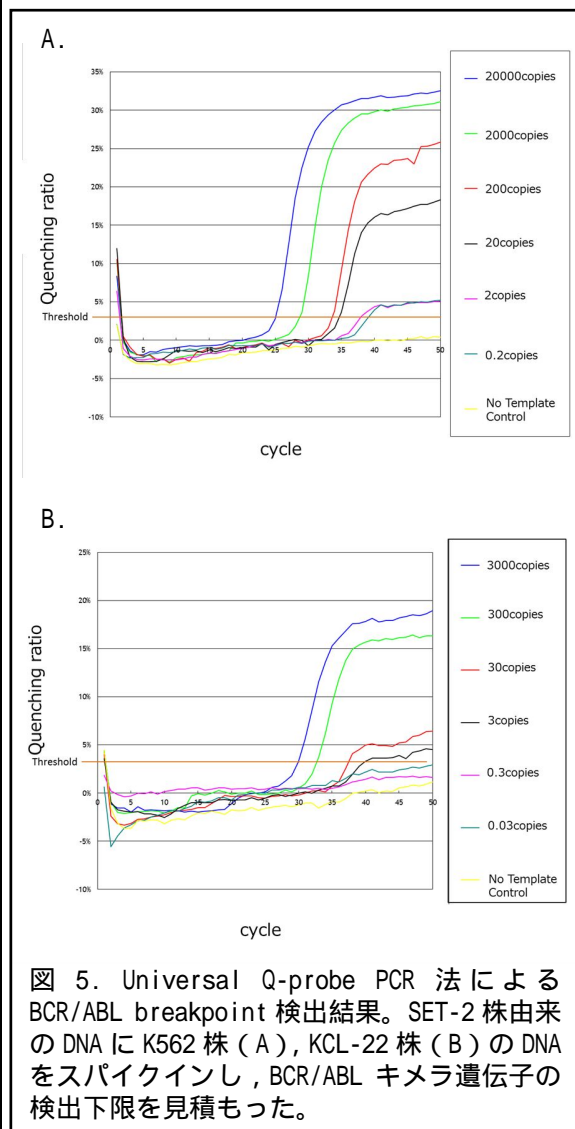


図5. Universal Q-probe PCR 法による BCR/ABL breakpoint 検出結果。SET-2 株由来の DNA に K562 株 (A)、KCL-22 株 (B) の DNA をスパイクインし、BCR/ABL キメラ遺伝子の検出下限を見積もった。

今後は、再現性の確認を進めるとともに、患者検体においても同様の検討を進めることで患者に特有の BCR/ABL breakpoint の同定、および、病態モニタリングを通じて、構



築した技術の有用性を評価する必要がある  
と考えられる。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

A interim analysis of stop trial against  
CMP-CP in CMR patients who had  
received sequential TKIs. 佐藤恵理子, 森下  
総司, 野口雅章, 小池道明, 大津洋, 小松則  
夫. 第 77 回日本血液学会学術集会, 石川,  
2015 年 10 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

佐藤 恵理子 (SATO, Eriko)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号：60398675

##### (2) 研究分担者

小松 則夫 (KOMATSU, Norio)  
順天堂大学・医学部・教授  
研究者番号：50186798

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：