

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：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461600

研究課題名(和文) 家族性急性リンパ性白血病の原因遺伝子の探索

研究課題名(英文) Identification of causative genes in familial acute lymphoblastic leukemia

研究代表者

盛武 浩 (Moritake, Hiroshi)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：40336300

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：家族内に小児白血病患者を複数有する5家系の遺伝子解析を行い11家系に患者共通のETV6胚細胞変異を認めた。ETV6は小児急性リンパ性白血病(ALL)で最多頻度のETV6-RUNX1融合遺伝子を形成する遺伝子の1つとして知られていたが胚細胞変異報告はなかった。しかし2015年米国より小児ALLに約1%の頻度でETV6胚細胞変異が生じているとの報告があった。ETV6胚細胞変異は他のがん種においてもがん化に関与していることが想定されるため、小児ALL患者におけるETV6胚細胞変異患者のスクリーニングの必要性、治療方針および治療終了後のフォローアップ法についても検討されるべき重要な課題と思われる。

研究成果の概要(英文)：We performed comprehensive genetic analyses on 5 families in which at least two children developed acute leukemia in their relatives. Exome sequencing identified same ETV6 germline mutations in the siblings with acute lymphoblastic leukemia (ALL) in one family. ETV6 is a transcriptional repressor and its somatic mutations are reported to be associated with certain malignancies. In childhood ALL, the ETV6-RUNX1 fusion is the most common somatic genetic aberration. On the other hand, germline ETV6 has not been previously reported; however, a recently published paper in 2015 described that the germline ETV6 mutations occur at 1% of frequency among childhood ALL. These results suggest that it may be necessary to develop the recommendations for clinical interventions and surveillance system for individuals who harbor germline ETV6 mutations.

研究分野：小児血液・腫瘍学

キーワード：白血病 家族性

1. 研究開始当初の背景

急性リンパ性白血病(ALL)は小児がんで最も高頻度に発生する疾患である。本邦での発症数は年間 600 例程度と推測される。九州山口小児がん研究グループ(KYCCSG)は 13 施設が参加しており、年間 50-60 例程度の ALL の登録がなされている。1984 年から治療研究を開始しているが、現在まで約 1,400 例の ALL が登録され、これらの治療経験の中で、兄弟間での ALL 発症は 8 例、4 家系のみであった。ALL 兄弟間発症の報告は世界的にもなく、家族内発症 ALL 責任遺伝子の同定は世界でもなされていない。

2. 研究の目的

兄弟間発症 ALL には、家族内共通ゲノム変異・多型の存在が強く疑われる。本研究では ALL 腫瘍細胞に加えて家族内体細胞のゲノム変異解析を行い、家族性 ALL の責任遺伝子ならびに発症危険因子の同定を行う。その結果小児 ALL の多段階の発がん過程に関する新知見が得られる可能性が高く、更に変異遺伝子群の種類によっては将来、分子標的療法の創薬に繋がる可能性も有する。

3. 研究の方法

(1)ゲノム解析までの準備段階

本研究への参加について同意が得られた患者、両親、兄弟から書類による同意取得を確認後、凍結保存された診断時白血病細胞や寛解時骨髄細胞に加えて家族の末梢血を採取後、宮崎大学に送付する。上記試料を用いて、以下の解析を行う。

(2)ゲノムならびに網羅的遺伝子発現解析

a)高密度一塩基多型 (SNP) アレイ解析
ゲノム DNA に対して、高密度 SNP アレイ解析を行い、ゲノム増幅、欠失、転座等のゲノムコピー数の異常を中心に白血

病細胞内で出現しているゲノム異常を中心に検討を行う。また、SNP に関して、日本人の 19 万 7000 ヶ所の SNP データベース (JSNP)を中心としたデータと比較し、特異的多型ならびに白血病感受性因子の同定を行う。

b) DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析

mRNA を用いて、DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、白血病細胞内で見られる遺伝子発現異常について情報収集を行う。また Pathway 解析を通じて、細胞内での情報伝達系異常、転写因子異常を同定し、責任遺伝子群の単離に繋げる。

c) 次世代シーケンス法による全エクソンシーケンス解析

ゲノム DNA を用いて、エクソンキャプチャー法と次世代シーケンサーを組み合わせた全エクソン塩基配列決定の解析を行なう。この検討により ALL 特異的な点突然変異、SNP 異常等の情報が得られる。

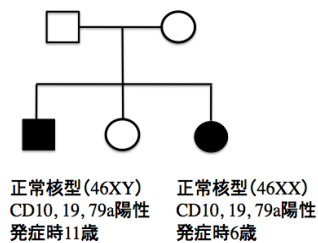
上記検査で、ゲノム DNA に有意な異常を同定した場合、その部分の特定の配列について、サンガー法による塩基配列決定により確認を行う。さらに変異や発現異常を認められた遺伝子については蛋白試料を用いて発現解析を行う。

4. 研究成果

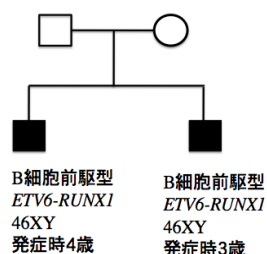
KYCCSG にて把握していた 4 家系の兄弟間発症 ALL のうち 2 家系の同意が得られた。それ以外に全国調査により小児白血病を家系内に 2 人有する 3 家系の家族性白血病の存在が明らかになり同意を取得することができた。併せて 5 家系の網羅的遺伝子解析を行った。全 5 家系にエクソーム解析を施行したが、予算の都合上、高密度 SNP アレイは 4 家系、網羅的遺伝子発現解

析は1家系のみであった。

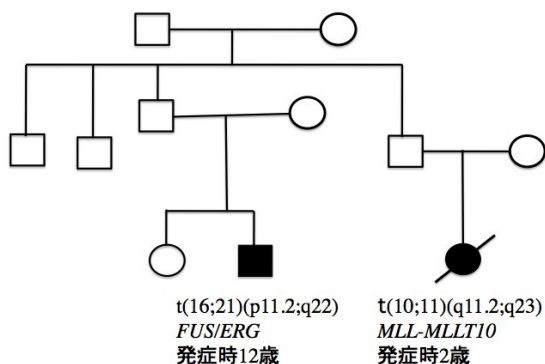
1. B細胞前駆型ALL
兄妹発症例



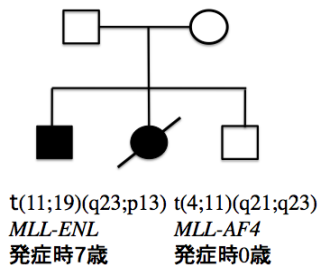
2. 一卵性双生児発症
B細胞前駆型ALL例



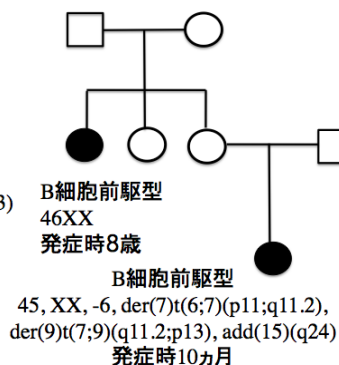
3. 従兄弟発症AML例



4. MLL遺伝子再構成ALL
兄妹発症例



5. 姪と叔母発症
B細胞前駆型ALL例



エクソーム解析にて1家系(家系2)の白血病患者兄弟(一卵性双生児)に共通のアミノ酸置換を伴う*ETV6*胚細胞変異が認められた。*ETV6*は小児急性リンパ性白血病(ALL)に最多頻度で認められる*ETV6-RUNX1*融合遺伝子を形成する遺伝子の1つとして知られていたが、胚細胞変異の報告はなかった。しかし、2015年に我々と同じ手法を用いて家族性白血病の家

系解析をとおして*ETV6*胚細胞変異を同定した報告が3報続いた(Zhang et al. Nature Genetics; Noetzli et al. Nature Genetics; Moriyama et al. Lancet Oncology)。これらの報告ではいずれの症例も血小板低下を伴っていたが、我々の症例では血小板数が正常な点が異なる。既報告では機能解析をとおして変異型*ETV6*がドミナントネガティブ効果により正常機能を喪失すること、細胞内局在に異常をきたし核内でなく細胞質に局在すること、などが証明されている。我々の症例で認められた*ETV6*変異についても同様の解析を計画中である。また、米国のMoriyamaらの報告では、4,405例の小児ALL患者で*ETV6*遺伝子のターゲットシーケンスが施行され35症例に胚細胞変異を見出しその頻度は約1%とされる。*ETV6*胚細胞変異は他のがん種においてもがん化に関与していることが想定されるため、小児ALL患者における*ETV6*胚細胞変異患者のスクリーニングの必要性、治療方針および治療終了後のフォローアップ法についても検討されるべき重要な課題と思われる。

別の家系(家系3)でもエクソーム解析にて、今までに白血病発症関与の報告がない遺伝子の患者共通胚細胞変異が認められた。他の小児白血病患者でのスクリーニングと並行して機能解析を計画している。

また、家系4はエクソーム解析では責任遺伝子の同定には至らなかった。白血病兄妹共通に認められた*MLL*遺伝子転座を誘導させ得る遺伝子異常の存在が強く疑われるため現在、全ゲノム解析を施行中である。

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 0件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

盛武 浩 (MORITAKE, Hiroshi)
宮崎大学・医学部・准教授
研究者番号：40336300

(2) 研究分担者

森下 和広 (MOROSHITA, Kazuhiro)
宮崎大学・医学部・教授
研究者番号：80260321

(3) 連携研究者

古賀 友紀 (KOGA, Yuki)
九州大学・医学部・助教
研究者番号：60398071

渡辺 浩良 (WATANABE, Hiroyoshi)
徳島大学・医学部・講師
研究者番号：50423413

辻 省次 (TSUJI, Shoji)
東京大学・医学部・教授
研究者番号：70150612

森下 真一 (MORISHITA, Shinichi)
東京大学・医学部・教授
研究者番号：90292854

高木 正稔 (TAKAGI, Masatoshi)
東京医科歯科大学・医学部・講師
研究者番号：10406267