

平成 31 年 4 月 24 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K19629

研究課題名(和文) T細胞性急性リンパ性白血病における新規転座遺伝子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of novel translocation gene in T-cell acute lymphoblastic leukemia

研究代表者

川原 勇太 (Kawahara, Yuta)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：10570385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、T細胞性急性リンパ性白血病(T-ALL)の患者の白血病細胞に新たに見出した新規のABL1融合遺伝子(UBAP2L-ABL1)をRNAシーケンスという遺伝子解析技術によって同定し、UBAP2L-ABL1の増幅、を行った。ABL1遺伝子は慢性骨髄性白血病においてBCR-ABL1融合遺伝子を形成し、恒常的なチロシンキナーゼ活性をもち強力に細胞増殖を促進し白血病化に関わっている。今後は、現在培養中のマウス細胞株にUBAP2L-ABL1を導入し機能解析を行い、UBAP2L-ABL1によるT-ALL発症機序を解明する。それによってチロシンキナーゼ阻害薬による治療に結びつく可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

UBAP2Lは造血幹細胞(血球の元となる細胞)の活性化に関与する遺伝子で、またいくつかの腫瘍で高発現していることがわかっている。T-ALLの新たな融合遺伝子であるUBAP2L-ABL1を同定したことによって、UBAP2LのT-ALL発症への関与の可能性が示唆された。

また、UBAP2L-ABL1によるT-ALL発症機序を解明するによって、UBAP2L-ABL1融合遺伝子を有するT-ALLにおいてチロシンキナーゼ阻害薬(ABL1はチロシンキナーゼであり、ABL1の機能を阻害する薬)による治療が可能となり、治療成績の改善が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, I identified a novel ABL1 fusion gene (UBAP2L-ABL1) newly found in patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) by RNA sequencing and performed amplification of UBAP2L-ABL1. ABL1 gene forms a BCR-ABL1 fusion gene in chronic myelocytic leukemia which has a persistent tyrosine kinase activity. It strongly promotes cell proliferation and is involved in leukemogenesis.

In the future, UBAP2L-ABL1 will be introduced into the mouse cell line, and functional analysis will be performed to clarify the role of UBAP2L-ABL1 in T-ALL. This research may lead to treatment with tyrosine kinase inhibitors for T-ALL with UBAP2L-ABL1.

研究分野：小児血液腫瘍、免疫

キーワード：T-ALL 新規ABL1融合遺伝子 ABL1 UBAP2L

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

T細胞性急性リンパ性白血病(T-ALL)における t(1;9)(q21;q34)

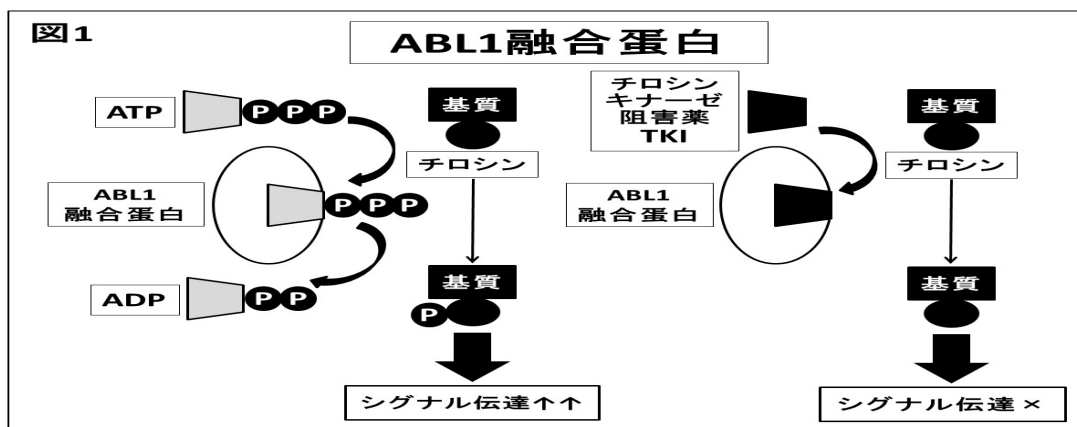
8歳の **T-ALL** 患者の初発時骨髄細胞の染色体分析で **46XY,t(1;9)(q21;q34)の核型**が得られた。この染色体異常は、検索し得る限りこれまで T-ALL において報告されていない新規染色体異常である。白血病発症に関連する既報の遺伝子として、1q21 には *AF1q* 遺伝子が、9q34 には *ABL1* 遺伝子が存在する。

FISH(Fluorescent in situ hybridization)検査による切断点の解析

ABL1 遺伝子を probe とした **FISH 解析で *ABL1* 遺伝子に設定したプローブのスプリットシグナル**を認め、**9q34 の切断点の遺伝子は *ABL1* 遺伝子**であることが明らかになった。また、*ABL1* 遺伝子のスプリットシグナルは 1 番染色体に飛んでおり、***ABL1* 遺伝子のパートナー遺伝子は 1 番染色体上の遺伝子**であることが明らかとなった。

ABL1 融合蛋白は、強力なチロシンキナーゼ活性を持ち細胞増殖を促進する (図 1)

ABL1 遺伝子は、慢性骨髄性白血病や B 前駆型 ALL に見られるフィラデルフィア(Ph)染色体(t(9;22)(q34;q11.2))において *BCR-ABL1* 融合遺伝子を形成する。その融合蛋白は恒常的なチロシンキナーゼ活性をもち、強力的に細胞増殖を促進し白血病化に関わっている。T-ALL においても *NUP214-ABL1* を代表としいくつかの *ABL1* 融合遺伝子が見つけられている(Hagemeijer A. Genes Chromosomes Cancer. 2010)。*ABL1* のパートナー遺伝子として 1q21 上の遺伝子の報告は検索し得る限りない。**ABL1 融合遺伝子を有する ALL は一般的に予後不良だが、ABL1 融合蛋白の ATP 結合部位に競合的に結合する TKI の有効性が示され、TKI による予後改善が期待される。**

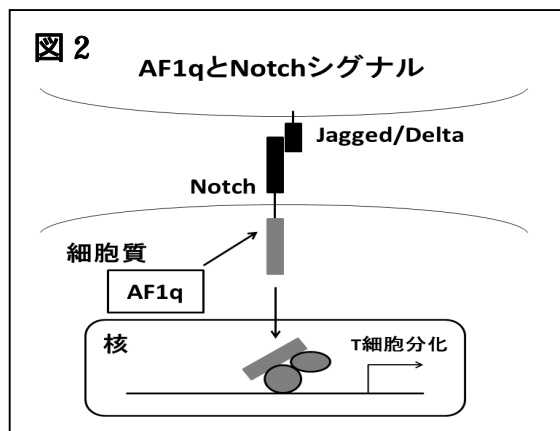


AF1q 遺伝子は Notch シグナルを介して T 細胞分化を促進している (図 2)

AF1q 遺伝子は 1q21 に存在し、乳児白血病に高頻度にみられる *MLL*(mixed lineage leukemia)遺伝子のパートナー遺伝子として発見された(Mitelman F. Nat Genet. 1997)。

AF1q は、多能性造血前駆細胞の Notch シグナルの感受性を増加し、骨髄中の前胸腺細胞を増加し胸腺への遊走を促進し、胸腺内の T 細胞分化を加速させ、T 細胞分化に関して重要な役割を担っている (Parcelier A. Blood. 2011)。

よって、本 T-ALL における *ABL1* 遺伝子のパートナー遺伝子として、*AF1q* 遺伝子の可能性がまず考えられる。



2. 研究の目的

以上から、本研究は T-ALL において *ABL1* 遺伝子の新規パートナー遺伝子を同定し、融合遺伝子の機能解析を行い、本融合遺伝子による T-ALL 発症の機序を解明することが目的である。また、融合遺伝子を導入した細胞株を用いて TKI の有効性を検証することにより、治療応用につながることが期待される。

3. 研究の方法

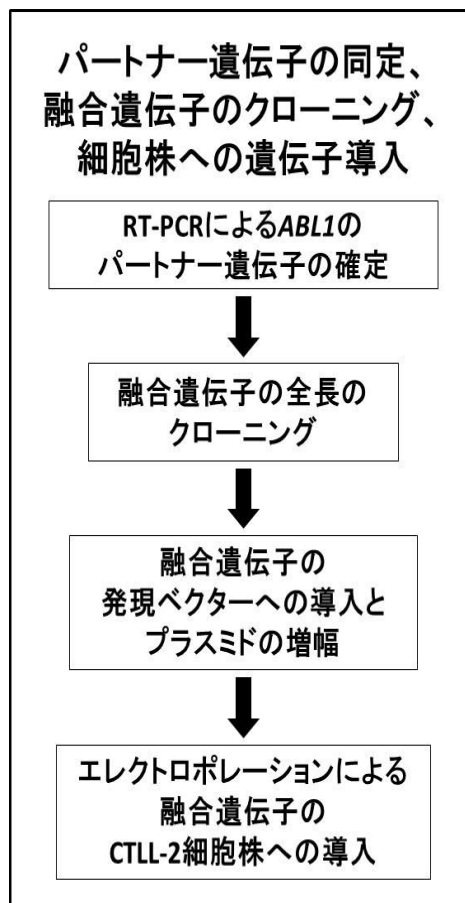
[1] *ABL1* 遺伝子のパートナー遺伝子を同定し、融合遺伝子をクローニングする。

T-ALL の新規 *ABL1* パートナー遺伝子の同定

すでに、FISH 検査により、9q34 上の遺伝子は *ABL1* 遺伝子であることが明らかになっている。1q21 上のパートナー遺伝子は、*MLL* 遺伝子のパートナー遺伝子として ALL への関与が既に報告され、T 細胞分化にも関わる *AF1q* の可能性を第一に考えていた。現在樹立中の患者白血病細胞の細胞株から、total RNA を抽出し、*AF1q* 遺伝子と *ABL1* 遺伝子に設定したプライマーを用い、RT-PCR を行う。PCR 産物のシーケンスを行い、*AF1q* と *ABL1* 遺伝子の融合遺伝子であることを確認する。

新規 *ABL1* 融合遺伝子の全長クローニングと発現ベクターへの導入

RT-PCR と制限酵素切断、ライゲーションによって、確認された *ABL1* 融合遺伝子の全長の cDNA をクローニングし、ネオマイシン耐性遺伝子を含む発現ベクターに挿入する。このプラスミドを大腸菌に導入して増やし、十分な量の全長 cDNA を含むプラスミドを得る。

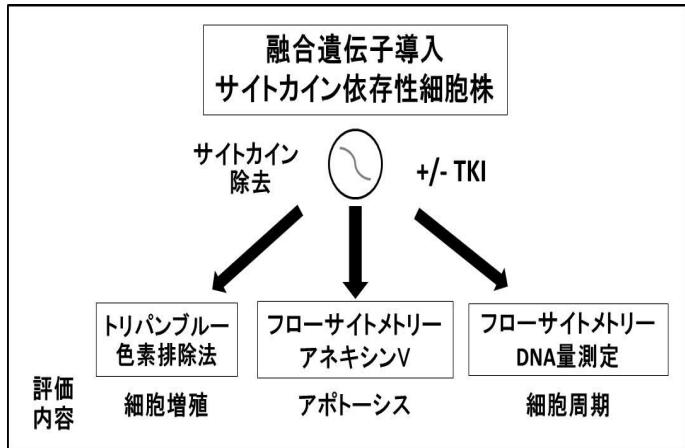


[2] マウス血球系細胞株に *ABL1* 融合遺伝子を導入する

1. で作成した *ABL1* 融合遺伝子の全長 cDNA を含む発現ベクターを、エレクトロポレーション法を用いて、マウス IL-2 依存性細胞株 CTLL-2 に導入し、ネオマイシンで全長 cDNA を発現する細胞株をセクションする。

[3] 新規 *ABL1* 融合遺伝子を導入した CTLL-2 細胞株の機能解析 増殖能の解析

CTLL-2 は増殖に IL-2 を必要とし IL-2 非存在下ではアポトーシスに至る。新規 *ABL1* 融合遺伝子を導入した CTLL-2 の細胞増殖を解析するために、トリパンブルー色素排除法を用いて、IL-2 非存在下での生細胞数をカウントし、増殖曲線を作成する。



抗アポトーシス効果の解析

IL-2 非依存性増殖能が抗アポトーシス効果によるものかどうかを調べるために、フローサイトメトリーを用い、アネキシン の発現を解析する。

細胞周期の解析

IL-2 非依存性増殖能が増殖シグナル亢進によるものかどうかを調べるために、フローサイトメトリーを用い DNA 量を調べ、細胞周期の解析を行う。

これによって新規 *ABL1* 融合遺伝子による白血病発症の機序を明らかにすることができる。

[4] 新規 *ABL1* 融合遺伝子を導入した CTLL-2 細胞株に対する TKI の増殖抑制効果の検証

新規 *ABL1* 融合遺伝子を導入した CTLL-2 細胞株に対する TKI の有効性を調べるために、培養液に TKI を添加し、TKI によって CTLL-2 細胞株の増殖が、どれくらいの濃度で抑制されるかどうかを解析する。

これによって新規 *ABL1* 融合遺伝子を導入したマウス細胞株に対する TKI の有効性が *in vitro* で検証でき、本白血病に対する治療応用につながる可能性がある。

4. 研究成果

[1] RNA シークエンスによる T-ALL の新規 *ABL1* 融合遺伝子の同定および RT-PCR による確定

白血病細胞株の樹立がうまくいかなかったため、凍結保存してあった患者の診断時の骨髓細胞から total RNA を抽出し、RNA シークエンスを行った。それにより、T-ALL の新規 *ABL1* 融合遺伝子のパートナー遺伝子として、当初パートナー遺伝子として想定していた

AF1q 遺伝子とは異なる、1q21.3 に存在する *ubiquitin associated protein 2 like (UBAP2L)* 遺伝子が同定できた。その後、RT-PCR を行い、*UBAP2L* と *ABL1* 遺伝子の融合遺伝子であることを確認した。*UBAP2L* 遺伝子の exon24 と *ABL1* 遺伝子の exon2 が融合していた。

[2] *UBAP2L-ABL1* 融合遺伝子のクローニング、発現ベクターへの挿入および増幅

RT-PCR と制限酵素切断、ライゲーションによって、*UBAP2L-ABL1* 融合遺伝子の全長をクローニングすることができた。クローニングした *UBAP2L-ABL1* 融合遺伝子をレンチウイルスベクターに挿入した。その後、大腸菌に導入して増幅した。

[3] マウス IL-2 依存性血球系細胞株 CTLL-2 の培養

マウス IL-2 依存性血球系細胞株 CTLL-2 を培養した。当初エレクトロポレーションによる細胞株への遺伝子導入を予定していたが、*UBAP2L-ABL1* 融合遺伝子をレンチウイルスベクターに挿入したため、ウイルスベクターを用いた細胞株への遺伝子導入が可能となり、遺伝子導入が容易となった。

今後は *UBAP2L-ABL1* 融合遺伝子の CTLL-2 への遺伝子導入を行い、機能解析を行う予定である。また、その解析結果を 2019 年 10 月の日本血液学会で発表する予定である。

UBAP2L は造血幹細胞（血球の元となる細胞）の活性化に関与する遺伝子で、またいくつかの腫瘍で高発現していることがわかっている。T-ALL の新たな融合遺伝子である *UBAP2L-ABL1* を同定したことによって、*UBAP2L* の T-ALL 発症への関与の可能性が示唆された。*UBAP2L* 遺伝子の白血病発症への関与の報告はこれまでになく、この融合遺伝子の機能解析を行うことは、白血病全体の治療戦略を立てる上で非常に意義がある。

また、*UBAP2L-ABL1* による T-ALL 発症機序を解明するによって、*UBAP2L-ABL1* 融合遺伝子を有する T-ALL においてチロシンキナーゼ阻害薬による治療が可能となり、治療成績の改善が期待される。

5. 主な発表論文等
なし。

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：森本 哲
ローマ字氏名：Morimoto Akira

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。