

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09860

研究課題名(和文) RNA-seqを用いた複雑核型を呈する造血器腫瘍の遺伝子異常の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of gene aberrations in hematological malignancy with complex chromosomal abnormality using RNA-seq analysis

研究代表者

安部 明弘 (ABE, AKIHIRO)

藤田医科大学・医学部・客員准教授

研究者番号：00432261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：1.造血器腫瘍48検体においてRNA-seqを行い解析を進めた。
2.再発時に複雑核型を呈した症例から同定したRUNX1-GR1K2からは、短縮型RUNX1が発現するが、32D細胞においてG-CSFRの発現を誘導し、IL3非存在下でG-CSF刺激による増殖が増強した。初発と再発に共通する遺伝子変異が複数同定されたが、再発時には新たにTP53の変異が加わっていた。
3.t(8;12;21)からTM7SF3-VPS13BおよびVPS13B-RUNX1、12番染色体に異常を有する2症例からETV6-ABCC9およびETV6-IAPP、t(4;18)からTCF4-MAML3を新規に同定し解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、染色体核型からは推定困難な融合遺伝子を、網羅的次世代シーケンスによるRNA-seq解析を用いて同定し、複雑な染色体異常に關する遺伝子異常を明らかにするとともに、得られた遺伝子異常の機能解析を進めるものである。今回同定した短縮型RUNX1がG-CSFへの反応性を高めること、再発時にTP53の変異が加わり複雑核型を示したことは、白血病発症機構を考える上で興味深い。また、複雑核型を有する症例は、治療困難な症例が多いため、そこに關する遺伝子異常を明らかにすることは、新しい治療法を開発して行く上で役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：1. We have analyzed 48 cases of hematological malignancy using RNA-seq.
2. We have identified RUNX1-GR1K2as from relapsed/secondary acute myeloid leukemia (AML) with complex chromosomal abnormalities. This case was initially diagnosed as AML with inv(16)(p13;q22)/CBFB-MYH11 (FAB classification M4Eo). The truncated RUNX1 generated from RUNX1-GR1K2as induced the expression of the granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor on 32D myeloid leukemia cells and enhanced proliferation in response to G-CSF. We found that several SNVs with high pathogenic scores were common in both initial and relapsed leukemia. Furthermore, the alteration of TP53 G245S occurred only at relapse.
3. We have also identified TM7SF3-VPS13B and VPS13B-RUNX1 from RUNX1-RUNX1T1-positive AML with t(8;12;21)(q22;p12;q22), ETV6-IAPP and ETV6-ABCC9 from two cases of AML with 12p abnormalities, and TCF4-MAML3 from blastic NK cell leukemia with complex chromosomal abnormalities involving t(4;18)(q31;q21).

研究分野：血液学

キーワード：RNA-seq fusion gene translocation Leukemia RUNX1 G-CSF

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 融合遺伝子の研究は、慢性骨髄性白血病における *BCR-ABL*、急性前骨髄性白血病における *PML-RARA* の同定を始めとして、白血病発症機構の解明に大きな役割を果たしただけでなく、分子標的として治療薬剤の開発に発展し、治療成績を飛躍的に向上させた。我々はこれまでに、t(5;14)(q33;q32)における *CEV14(TRIP11)-PDGFR*、t(9;12)(q22;p13)における *ETV6-SYK*、t(11;12)(p12;p13)における *ETV6-LPXN*、t(12;17)(p13;q11)における *ETV6-TA01*、t(11;21)(q13;q22)における *RUNX1-LRP16(MACROD1)*、t(11;21)(p14;q22)における *RUNX1-C11ORF41* など、多数の融合遺伝子を同定し海外の学術誌に発表した。

(2) 一方、次世代シーケンス技術の発展により、ゲノム解析は飛躍的な進歩を遂げ、がんの原因を特定する遺伝子研究は新時代を迎えている。RNA-seq 解析は、多彩な情報が得られ、異常転写産物の解析、遺伝子発現の解析、融合遺伝子の解析、遺伝子変異の解析など、さまざまな遺伝子異常の解析に有用である。特に融合遺伝子については、従来は同定が困難な融合遺伝子が網羅的に同定可能となり、数多くの新規融合遺伝子が報告されている。

2. 研究の目的

本研究課題は、次世代シーケンサーを用いた RNA-sequence によるトランスクリプトーム解析により、複雑核型を呈する造血器腫瘍から新たな融合遺伝子、異常転写産物、遺伝子変異を同定するとともにその機能解析を進め、複雑核型を呈する造血器腫瘍の発症機構の解明と治療標的となりうる新たな分子を探索することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 検体と次世代シーケンス

遺伝子転写産物の網羅的な解析はトランスクリプトーム解析と呼ばれるが、RNA から作製した cDNA ライブラリーを、次世代シーケンサーを用いて網羅的に遺伝子配列を決定することにより行われる (RNA-seq)。我々は、複雑核型を有した白血病症例を主とした造血器腫瘍 48 検体において RNA-seq を行い造血器腫瘍に関連する遺伝子を解析した。RNA-seq は、凍結保存検体から RNA を抽出し、cDNA ライブラリーを作成後、イルミナ HiSeq1500 により、paired-end リードにて 100bp sequence し、1 検体あたり 4~8 千万リードのデータを得た。

(2) コンピューター解析

得られたデータは、CLC Genomics Workbench にて、ヒトゲノム hg19 の遺伝子情報をレファレンスとしてマッピングするとともに、キメラ遺伝子はオープンソースの融合遺伝子解析ソフト TopHat-Fusion と deFuse により解析を進め、得られたデータはエクセルにダウンロードし、マクロ機能を用いて解析プログラムを作製し多面的な解析を行った。遺伝子変異の pathogenic score については、COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer) のインターネットサイトから (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>)、FATHMM (Functional Analysis Through Hidden Markov Models) prediction により Pathogenic score を推定した。

(3) *RUNX1-GR1K2as* の機能解析

RUNX1-GR1K2as を IL-3 依存性細胞株 32D に遺伝子導入し、サイトカインへの反応性と増殖を解

析した。安定したデータを得るために、10%ウマ血清を含む培地を用いて実験を行った。*RUNX1-GRK2as*を導入した32Dでは、短縮型*RUNX1*が発現しGranulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)への過剰反応性を示したことから、*RUNX1-GRK2as*導入によるG-CSF receptor (G-CSFR)の発現の変化を、FACSを用いて解析した。さらに、顆粒球分化への影響について、G-CSF添加前後における細胞の分化を、マウスの顆粒球分化抗原であるGr1発現の変化により、FACSを用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 本研究課題では、複雑核型を有する白血病を主とした造血器腫瘍48検体においてRNA-seqを行い、解析を進めた。コンピューター解析はCLC genome workbenchを用いて、マッピングデータ、遺伝子変異解析、遺伝子発現解析を行った。融合遺伝子はオープンソースの融合遺伝子解析ソフトTopHat-FusionとdeFuseにより解析を進めた。こうして得られたデータは、融合遺伝子、遺伝子変異、遺伝子発現の解析結果について、それぞれ症例ごとにエクセルシートにダウンロードし、マクロ機能を用いた解析プログラムを作製して集計するとともに、多面的な解析を行った。

(2) 初診時に、CBFB-MYH11陽性の急性骨髄単球性白血病、FAB分類M4Eoで発症し、再発時には2次性/治療関連白血病として複雑核型を呈した症例から、*RUNX1-GRK2as*を同定した。*GRK2*は6q16、*RUNX1*は21q22に位置するが、これに関連する染色体異常はG-bandingおよびSKYによる染色体解析において認められず、微小転座に由来するものと考えられた。*RUNX1-GRK2as*を導入した32Dでは、短縮型*RUNX1*が発現するが、これによりIL3存在下にもG-CSFRが発現するとともに、IL3非存在下でG-CSF刺激による増殖が増強することがわかった(図1A)。短縮型*RUNX1*を発現した32Dでは、G-CSF刺激により、Gr1の発現増加が誘導されるものの、Gr1高発現分画は減少していた(図1B,C)。このことから、短縮型*RUNX1*の発現が、顆粒球系細胞株を一定の分化段階にとどめる可能性が示唆された。本症例では、初診時と再発時に共通するpathogenicスコアの高い遺伝子変異が複数同定され、この中には複数のChinese oral squamous cell carcinomaで報告があるNOTCH1 Q1134Rが含まれていた(表1)。さらに、再発時には新た

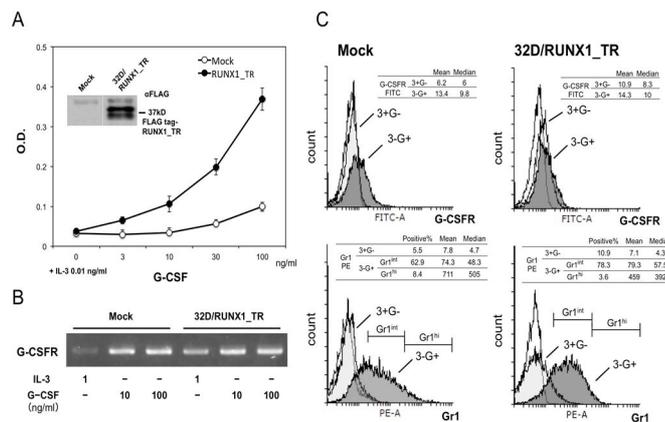


図 1

表 1 Mutation profile of initial diagnosis and relapse

Gene	Mutation	Allele frequency (%)		FATHMM prediction pathogenic score*
		Initial diagnosis	Relapse	
MTMR9	R409H	60.0	41.7	0.98
GPBAR1	R43C	58.6	52.6	0.95
ITFG3	P71L	55.3	51.8	0.98
HDAC9	Q122H	52.7	83.3	0.80
TNS1	R970W	45.5	51.4	0.98
DYSF	R345W	45.5	25.0	0.91
NOTCH1	Q1134R	36.2	61.1	0.94
NCOA3	E163K	34.5	30.8	0.98
TP53	G245S	0.0	93.5	0.99

*FATHMM (Functional Analysis through Hidden Markov Models) prediction pathogenic score is cited from COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) web site (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>).

(表1)。さらに、再発時には新た

に TP53 の変異が加わっていた。これらのことから、本症例は複数の高 pathogenic スコア遺伝子変異を有する白血病前駆細胞が存在し、初診時は CFBF-MYH11 が加わり M4Eo を発症し、再発時は TP53 の変異が加わって 2 次性白血病を発症したと推察された (文献 1)。

(3) 三重転座、t(8;12;21)(q22:p12;q22)を示した *RUNX1-RUNX1T1* 陽性、急性骨髄性白血病(AML)において *TM7SF3-VPS13B* および *VPS13B-RUNX1* 融合遺伝子を同定した。*VPS13B* は *RUNX1T1* のテロメア側約 700kb に位置し、3' 側が 12p12 と転座して、*TM7SF3* と融合し *TM7SF3-VPS13B* を形成し、5' 側が 21q22 に転座して、*RUNX1* と融合し *VPS13B-RUNX1* を形成するという複雑な転座が明らかとなった (図 2)。*VPS13B* は先天異常であるコーエン病の責任遺伝子として知られている。コーエン病では好中球減少と骨髄における顆粒球の左方移動が生じるが、この症例では *RUNX1-RUNX1T1* 陽性 AML に比べ分化傾向が減弱しており、*VPS13B* の破壊が白血病の表現型に影響を与えている可能性が考えられた(文献 2)。

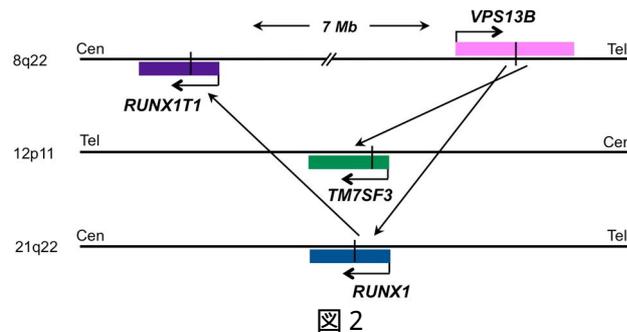


図 2

(4) 12 番染色体に異常を有する AML2 症例から同定した *ETV6-ABCC9* および *ETV6-IAPP* 融合遺伝子は、それぞれ *ETV6* の exon 1 と *ABCC9* (ATP-binding cassette, sub-family C member 9) の 5' UTR、*ETV6* の exon 4 と *IAPP* (islet amyloid polypeptide) の 5' UTR が融合した形を取る。*ABCC9* および *IAPP* は、通常は造血系細胞での発現が殆どない遺伝子である。前者では、12 番染色体上に欠失、後者では微小な逆位が生じ融合遺伝子が形成されることがわかった (図 3)。いずれも融合タンパクとしては発現しないが、それぞれの遺伝子のコーディング領域全長を含んでいた。GFP の融合タンパクを形成するコンストラクトを作製し発現を調べたところ *ABCC9* の発現は認められたが、*IAPP* は認められなかった。このことから、*ETV6* exon 1 との融合であれば、その 3' 側に融合した遺伝子は発現するが、exon 4 との融合では発現は困難と考えられた。こうした結果は、*ETV6* の転座に起因する他の遺伝子の異所性発現を考える上で興味深い。

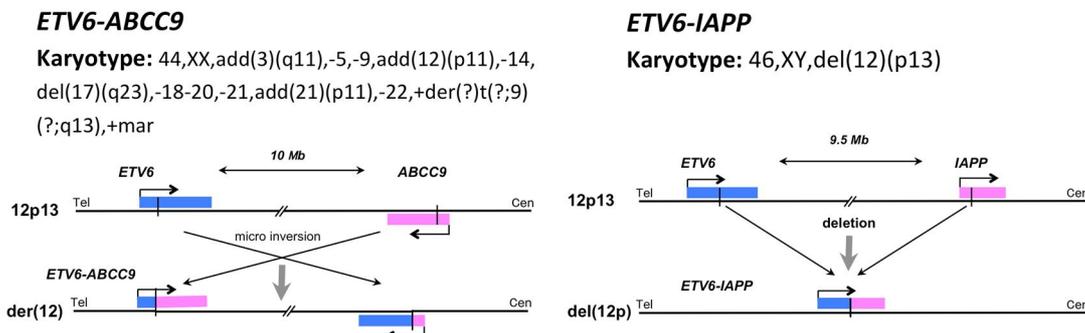


図 3

(5) CD4+CD56+芽球性 NK 細胞白血病の再発時に、t(4;18)(q31;q21)を含む複雑核型を呈した症例において、4q31 に位置する *MAML3* と、18q21 に位置する *TCF4* が inframe で融合する *TCF4-MAML3* を同定した。この症例では、*TCF4* および *MAML3* の高発現が認められた。また、一般に AML にお

いて *MAML3* は高発現していた。*MAML3* の融合遺伝子では、WNT シグナルの亢進が関与するとの報告があるが、本症例においても、GSEA(Gene Set Enrichment Analysis)発現解析にて、WNT シグナル関連遺伝子の高発現を認めた。

(6) $t(6;9;22)(q25;q34;q11.2)$ を有する *BCR-ABL1* 陽性、慢性骨髄性白血病において、6q25 に位置する *ARID1B* の exon 4 と、22q12.2 に位置する *EMID1* の exon 12 の inframe での融合が確認された。*ARID1B* は、その変異がいくつかの固形癌に関与することが知られている。また、*EMID1* は *BCR* からテロメア方向に 6Mb 離れて位置するため、 $t(6;9;22)(q25;q34;q11.2)$ は、 $t(6;22)(q25;q12.2)$ と $t(9;22)(q34;q11.2)$ という異なる二つの転座を含んでいることが明らかとなった。

<引用文献>

1. Abe A, Yamamoto Y, Katsumi A, Yamamoto H, Okamoto A, Inaguma Y, Iriyama C, Tokuda M, Okamoto M, Emi N, Tomita A. Truncated RUNX1 generated from the fusion of RUNX1 to antisense GRIK2 via a cryptic chromosome translocation enhances sensitivity to granulocyte colony-stimulating factor. *Cytogenetic and Genome Research* 2020 (in press). doi: 10.1159/000508012
2. Abe A, Yamamoto Y, Katsumi A, Okamoto A, Tokuda M, Inaguma Y, Yamamoto K, Yanada M, Kanie T, Tomita A, Akatsuka Y, Okamoto M, Kameyama T, Mayeda A, Emi N. Rearrangement of *VPS13B*, a causative gene of Cohen syndrome, in a case of RUNX1-RUNX1T1 leukemia with $t(8;12;21)$. *Int J Hematol*. 2017 Dec 20. doi: 10.1007/s12185-017-2387-x.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Abe A, Yamamoto Y, Katsumi A, Yamamoto H, Okamoto A, Inaguma Y, Iriyama C, Tokuda M, Okamoto M, Emi N, Tomita A.	4. 巻 -
2. 論文標題 Truncated RUNX1 generated from the fusion of RUNX1 to antisense GRIK2 via a cryptic chromosome translocation enhances sensitivity to granulocyte colony-stimulating factor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cytogenetic and Genome Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000508012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Inoue C, Sobue S, Kawamoto Y, Nishizawa Y, Ichihara M, Abe A, Hayakawa F, Suzuki M, Nozawa Y, Murate T.	4. 巻 525
2. 論文標題 Involvement of MCL1, c-myc, and cyclin D2 protein degradation in ponatinib-induced cytotoxicity against T3151(+) Ph+leukemia cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 1074-1080
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.02.165.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Abe A, Yamamoto Y, Katsumi A, Okamoto A, Tokuda M, Inaguma Y, Yamamoto K, Yanada M, Kanie T, Tomita A, Akatsuka Y, Okamoto M, Kameyama T, Mayeda A, Emi N.	4. 巻 108
2. 論文標題 Rearrangement of VPS13B, a causative gene of Cohen syndrome, in a case of RUNX1-RUNX1T1 leukemia with t(8;12;21)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Hematol.	6. 最初と最後の頁 208-212
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-017-2387-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Inoue C, Sobue S, Aoyama Y, Mizutani N, Kawamoto Y, Nishizawa Y, Ichihara M, Abe A, Hayakawa F, Suzuki M, Nozawa Y, Murate T.	4. 巻 15
2. 論文標題 BCL2 inhibitor ABT-199 and JNK inhibitor SP600125 exhibit synergistic cytotoxicity against imatinib-resistant Ph+ ALL cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Rep.	6. 最初と最後の頁 69-75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2018.07.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Abe A, Yamamoto Y, Iba S, Kanie T, Okamoto A, Tokuda M, Inaguma Y, Yanada M, Morishima S, Mizuta S, Akatsuka Y, Okamoto M, Kameyama T, Mayeda A, Emi N	4. 巻 55
2. 論文標題 ETV6-LPXN Fusion Transcript Generated by Gain of t(11;12)(q12.1;p13) in a Patient with Relapsing Acute Myeloid Leukemia with NUP98-HOXA9	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Genes Chromosomes Cancer	6. 最初と最後の頁 242-250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/gcc.22327	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Abe A, Mizuta S, Okamoto A, Yamamoto Y, Kameyama T, Mayeda A, Emi N.	4. 巻 38
2. 論文標題 Transcriptional activation of platelet-derived growth factor receptor and GS homeobox 2 resulting from E26 transformation-specific variant 6 translocation in a case of acute myeloid leukemia with t(4;12)(q12;p13)	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Int J Lab Hematol	6. 最初と最後の頁 15-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ijlh.12450.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Niwa Y, Minami Y, Abe A, Hayakawa F, Yamada K, Naoe T	4. 巻 57
2. 論文標題 Wnt signaling is associated with cell survival in the interaction between acute myeloid leukemia cells and stromal cells	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Leuk Lymphoma	6. 最初と最後の頁 2192-2194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3109/10428194.2015.1124995	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安部明弘、山本幸也、山本秀行、徳田倍将、稲熊容子、岡本晃直、入山智沙子、富田章裕、岡本昌隆、恵美宣彦
2. 発表標題 TCF4-MAML3融合遺伝子を認めたCD4+CD56+芽球性NK細胞白血病の1例
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安部明弘、山本幸也、岡本晃直、入山智沙子、徳田倍将、稲熊容子、蟹江匡治、富田章裕、赤塚美樹、岡本昌隆、亀山俊樹、前田 明、恵美宣彦
2. 発表標題 ETV6の再構成による異所性遺伝子発現を認めた急性骨髄性白血病の二症例
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安部明弘、山本幸也、岡本晃直、徳田倍将、稲熊容子、柳田正光、蟹江匡治、富田章裕、赤塚美樹、岡本昌隆、亀山俊樹、前田 明、恵美宣彦
2. 発表標題 再発急性骨髄性白血病において微小転座から複数のスプライシング産物を認めたRUNX1-GRIK2融合遺伝子
3. 学会等名 第79回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 安部明弘、水田秀一、山本幸也、岡本晃直、伊庭佐知子、徳田倍将、稲熊容子、柳田正光、森島聡子、蟹江匡治、富田章裕、赤塚美樹、岡本昌隆、亀山俊樹、前田 明、恵美宣彦
2. 発表標題 ETV6転座によるPDGFR とGSX2の高発現を認めたt(4;12)を有するAMLの一例
3. 学会等名 第78回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2016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
研究 分 担 者	恵美 宣彦 (EMI NOBUHIKO) (30185144)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	山本 幸也 (YAMAMOTO YUKIYA) (90410703)	藤田医科大学・医学部・准教授 (33916)	