

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09486

研究課題名(和文) 腫瘍発生における多様なゲノム構造異常およびキメラ遺伝子形成の分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular analysis of variety of genomic rearrangements and chimeric genes in tumorigenesis.

研究代表者

滝 智彦 (TAKI, TOMOHIKO)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50322053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：血液腫瘍において、conjoined geneの形成と、キメラ転写産物形成の際のイントロンのエクソン化について明らかにした。Conjoined geneとは、隣り合った遺伝子間での融合遺伝子の形成であるが、我々は新規のconjoined geneを11種同定した。ゲノムアレイ解析ではconjoined geneの形成に伴うゲノムコピー数の変化は検出されず、転写レベルの現象であると考えられた。一方、染色体転座に伴うキメラ転写産物では、通常はイントロンとして除去される配列がしばしば転写産物の中に挿入されている。転座による遺伝子再構成の結果、イントロンのエクソン化が生じていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We identified the conjoined genes and exonization of intron sequence in chimeric transcripts in hematologic malignancies. Conjoined gene is a chimeric transcript created with the genes adjacent each other, and the novel eleven conjoined genes were identified in a diffuse large B-cell lymphoma cell line in this study. Genome array analysis did not detect any copy number alterations in the regions of conjoined genes, suggesting the formation of fusion genes in transcriptional level. On the other hand, in chimeric transcripts created by chromosome translocation, some intronic sequences were inserted into chimeric transcripts occasionally, suggesting the exonization of intron by gene rearrangement in chromosomal translocations.

研究分野：血液・腫瘍学、分子遺伝学

キーワード：がん ゲノム キメラ遺伝子 conjoined gene エクソン イントロン

1. 研究開始当初の背景

造血器腫瘍ではこれまで多くの染色体異常が解析され、臨床像との関連が明らかにされてきた。しかし、主として染色体転座により形成されると考えられていたキメラ遺伝子が、別の新しいタイプのゲノム構造異常によっても形成されることを最近我々は見出した。

(1) ゲノムの高度増幅領域におけるキメラ遺伝子の形成

我々は最近 homogeneously staining regions (HSRs) や double minute chromosomes (DMs) などの高度ゲノム増幅領域の中でさまざまなキメラ遺伝子が形成されていることを明らかにするとともに、そのゲノム構造を詳細に検討してきた。急性骨髄性白血病でしばしばみられる 8q24 の高度増幅では、増幅はある領域の単純な増幅ではなく、複数の領域の複雑な組み合わせによって形成されていた。その中から 2 種類の新規のキメラ遺伝子 *PVT1-NSMCE2* と *BF104016-NSMCE2* を同定した。

(2) 新しいタイプの非タンパク質コード遺伝子が関与するキメラ遺伝子

最近我々は、これまで知られていなかった新しいタイプの非タンパク質コード遺伝子が関与するキメラ遺伝子としてリボソーム DNA の 1 つである *RN28S1* が関与する 3 種類のキメラ遺伝子を同定した。その腫瘍における意義については明らかではないが、関与するそれぞれの遺伝子にはいずれも腫瘍との関連が知られており、新しいタイプの重要なキメラ遺伝子であると考えられた。

(3) 非コード遺伝子のキメラ遺伝子形成における重要性

RN28S1 が関与するキメラ遺伝子に加えて、以前我々は長鎖非コード遺伝子の 1 つである *PVT1* が多発性骨髄腫における 8q24 転座によって、複数の遺伝子との間にキメラ遺伝子を形成していることを見いだした。さらに、高度増幅領域の中で形成されるキメラ遺伝子にも *PVT1* 遺伝子が関与していた。このキメラ遺伝子での *PVT1* の融合相手の *NSMCE2* は、別の非コード遺伝子である *BF104016* とも融合していた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、最近少しずつ明らかになりつつあるこれまであまり注目されていなかった新しいタイプのゲノム異常について、その詳細な構造と生成メカニズムを明らかにするとともに、腫瘍における役割を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 次世代シーケンサーによる RNA シーケンス

イルミナ社の次世代シーケンサー (HiSCAN) により、ペアエンドの RNA シーケンスを行い、キメラ転写産物の同定を試み

た。

(2) SNP アレイによるゲノムコピー数解析
Affymetrix 社の SNP アレイ (SNP6.0) を用いてゲノムコピー数の解析を行った。

(3) RT-PCR 法およびゲノム PCR 法によるキメラ遺伝子のゲノム構造の解析

4. 研究成果

(1) リンパ腫細胞株における conjoined gene と遺伝子内再構成の同定

次世代シーケンサーによる RNA シーケンスのデータ解析から、びまん性大細胞型リンパ腫細胞株 KPUM-UH1 において隣り合った遺伝子間での融合遺伝子 (conjoined gene) を 17 種同定した。このうち 11 種は新規のものであり、6 種は in-frame での融合であった。また、12 種は他の臨床検体でも検出することができた。KPUM-UH1 から同定した 17 個の conjoined gene のゲノム領域について、Affymetrix 社の CytoScan HD アレイを用いてゲノムの欠失の有無を確認したが、いずれの領域にもコピー数の変化は認めず、conjoined gene の形成はゲノムレベルではなく転写レベルで生じていることが確認できた。KPUM-UH1 では、conjoined gene 以外にもタンパク質コード領域での融合を 7 個同定しており、現在これらについても解析を進めている。また、同一遺伝子内でのエクソンの順番が前後する遺伝子再構成を 10 種以上の遺伝子で同定した。これらの遺伝子再構成は主として遺伝子増幅部位から同定したが、欠失部位での形成も確認している。

(2) 質の悪い検体での RNA シーケンスによる新規キメラ転写産物の探索のための条件検討

白血病検体を用いて平成 26 年度までに行った RNA シーケンスでは、これまで染色体異常から予想されたキメラ転写産物の同定に成功しなかった。検討した検体の染色体異常は、もともとキメラ遺伝子を形成しないタイプであった可能性も考えられたため、*MLL* や *NUP98* 遺伝子などの関与が明らかになっている新たな 6 検体の解析を計画した。しかし、いずれも RNA の質が非常に悪いことが判明したため、質の悪い検体における RNA シーケンスの検出感度を確認するために、検体の半分の 3 検体をキメラ遺伝子が判明している検体とし、それらを陽性コントロールに位置づけて他の 3 検体の新規のキメラ遺伝子の同定を試みた。その結果、RIN 値 7.0 の検体および 3.4 の検体では、それぞれ既知の *NUP98-HOXA9* および *MLL-ENL* を同定でき、非常に質の悪い検体でも十分 RNA シーケンスによるキメラ転写産物の同定が可能であることが明らかになった。しかし、同じく *NUP98-HOXA9* が判明している RIN 値 2.9 の検体では、RNA シーケンスによって同様のキメラ転写産物を同定することはできなかった。その他の未知の検体の RIN 値は 6.6、5.1、4.8 であったが、染色体異常に合致するキメ

ラ遺伝子は同定されず、現在さらに詳細な解析を続けている。

(3) キメラ転写産物形成におけるエクソンのイントロン化

t(11;17)(q23;q25)を有する成人 AML からは予想された *MLL-SEPT9(AF17q25)*を同定したが、*MLL* の切断点はエクソン 10 の途中であり、融合した *SEPT9* のイントロン 1 の 24 塩基がキメラ転写産物内に挿入され、エクソン 2 からの *SEPT9* につながっていた。この融合では、挿入されたイントロン 1 の 3'端にスプライシングのコンセンサス配列が存在し、5'側に融合した *MLL* のエクソン 10 のスプライシングコンセンサス配列と一しょに、この部分をエクソンと認識する結果となったと考えられた。過去の解析データを確認したところ、他の複数のキメラ転写産物でも同様のイントロンのエクソン化が確認できた。転座によって新たに生じたゲノム構造によって、本来はスプライシングによって除去されてしまう領域がキメラ転写産物内に残るこのような現象の詳細な解析が、スプライシングに影響するゲノム構造の解明にもつながると考えている。

以上のように、研究開始当初には予想できなかったような新しいタイプの異常が、膨大なシーケンスデータや新規症例の解析から次々と見出されており、引き続きデータを詳細に解析することにより、ゲノム異常形成の正確なメカニズムを明らかにしていきたい。

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)

1. Yokokawa Y, Taki T, Akiyama M, Kobayashi S, Nagoshi H, Chinen Y, Morimoto A, Ida H, Taniwaki M. Unique clonal relationship between T-cell acute lymphoblastic leukemia and subsequent Langerhans cell histiocytosis with *TCR* rearrangement and *NOTCH1* mutation. *Genes Chromosomes Cancer* 54: 409-417, 2015
2. Takahashi T, Inoue A, Yoshimoto J, Kanamitsu K, Taki T, Imada M, Yamada M, Ninomiya S, Toki T, Terui K, Ito E, Shimada A. Transient myeloproliferative disorder with partial trisomy 21. *Pediatr Blood Cancer* 62: 2021-2024, 2015
3. Nagoshi H, Taki T, Chinen Y, Tatekawa S, Tsukamoto T, Maegawa S, Yamamoto-Sugitani M, Tsutsumi Y, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Okuno Y, Fujiwara S, Hata H, Kuroda J, Taniwaki M. Transcriptional dysregulation of the deleted in colorectal carcinoma gene in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Genes Chromosomes Cancer* 54: 788-795, 2015
4. Taga T, Watanabe T, Tomizawa D, Kudo K, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Iwamoto S, Nakayama H, Takahashi H, Shimada A, Taki T,

Toki T, Ito E, Goto H, Koh K, Saito AM, Horibe K, Nakahata T, Tawa A, Adachi S. Preserved high probability of overall survival with significant reduction of chemotherapy for myeloid leukemia of Down syndrome: A nationwide prospective study in Japan. *Pediatr Blood Cancer* 63: 248-254, 2016

5. Takahashi H, Watanabe T, Kinoshita A, Yuza Y, Moritake H, Terui K, Iwamoto S, Nakayama H, Shimada A, Kudo K, Taki T, Yabe M, Matsushita H, Yamashita Y, Koike K, Ogawa A, Kosaka Y, Tomizawa D, Taga T, Saito AM, Horibe K, Nakahata T, Miyachi H, Tawa A, Adachi S. High event-free survival rate with minimum-dose-anthracycline treatment in childhood acute promyelocytic leukaemia: a nationwide prospective study by the Japanese Paediatric Leukaemia/Lymphoma Study Group. *Br J Haematol* 174: 437-443, 2016

6. Kato M, Seki M, Yoshida K, Sato Y, Oyama R, Arakawa Y, Kishimoto H, Taki T, Akiyama M, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Mitsui N, Kajiwarra M, Mizutani S, Sanada M, Miyano S, Ogawa S, Koh K, Takita J. Genomic analysis of clonal origin of Langerhans cell histiocytosis following acute lymphoblastic leukemia. *Br J Haematol* 175: 169-172, 2016

7. Matsuo H, Nakamura N, Tomizawa D, Saito AM, Kiyokawa N, Horibe K, Nishinaka-Arai Y, Tokumasu M, Itoh H, Kamikubo Y, Nakayama H, Kinoshita A, Taga T, Tawa A, Taki T, Tanaka S, Adachi S. *CXCR4* overexpression is a poor prognostic factor in pediatric acute myeloid leukemia with low risk: a report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Pediatr Blood Cancer* 63: 1394-1399, 2016

8. Imamura T, Kiyokawa N, Kato M, Imai C, Okamoto Y, Yano M, Ohki K, Yamashita Y, Kodama Y, Saito A, Mori M, Ishimaru S, Deguchi T, Hashii Y, Shimomura Y, Hori T, Kato K, Goto H, Ogawa C, Koh K, Taki T, Manabe A, Sato A, Kikuta A, Adachi S, Horibe K, Ohara A, Watanabe A, Kawano Y, Ishii E, Shimada H. Characterization of pediatric Philadelphia-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with kinase fusions in Japan. *Blood Cancer J* 6: e419, 2016

9. Okuda T, Taki T, Nishida K, Chinen Y, Nagoashi H, Sakakura C, Ohtsuji E, Taniwaki M. Molecular heterogeneity in *APIP-FGFR2* fusion transcripts with diversity of genomic breakpoints in gastric cancer high-level amplifications at 11p13 and 10q26. *Oncol Lett* 13: 215-221, 2017

10. Kato M, Ishimaru S, Seki M, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, Kakiuchi N, Sato Y, Ueno H, Tanaka H, Inukai T, Tomizawa D, Hasegawa D, Osumi T, Arakawa Y, Aoki T, Okuya M, Kaizu K, Kato K, Taneyama Y, Goto H, Taki T, Takagi M, Sanada M, Koh K, Takita J, Miyano S,

Ogawa S, Ohara A, Tsuchida M, Manabe A. Long-term Outcome of Six-Month Maintenance Chemotherapy for Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *Leukemia* 31: 580-584, 2017

11. Hara Y, Shiba N, Ohki K, Tabuchi K, Yamato G, Park M, Tomizawa D, Kinoshita A, Shimada A, Arakawa H, Saito AM, Kiyokawa N, Tawa A, Horibe K, Taga T, Adachi S, Taki T, Hayashi Y. Prognostic impact of specific molecular profiles in pediatric acute megakaryoblastic leukemia in non-Down syndrome. *Genes Chromosomes Cancer* 56: 394-404, 2017

12. Hoshino T, Taki T, Takada S, Hatsumi N, Sakura T. Spontaneous remission of adult acute myeloid leukemia with t(8;16)(p11;p13)/*MOZ-CBP* fusion. *Leuk Lymphoma* 59: 253-255, 2018

〔学会発表〕(計 14 件)

1. Takashi Okuda, Tomohiko Taki, Kazuhiro Nishida, Yoshiaki Chinen, Hisao Nagoshi, Chouhei Sakakura, Masafumi Taniwaki. Diversity of genomic breakpoints in novel fusion gene *APIP-FGFR2* in a gastric cancer cell line. 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年

2. 奥田隆史, 滝 智彦, 西田一弘, 知念良顕, 名越久朗, 阪倉長平, 谷脇雅史. 胃癌細胞株の高度増幅領域より同定した新規融合遺伝子 *APIP-FGFR2* におけるゲノム切断点の多様性. 日本人類遺伝学会第 60 回大会, 2015 年

3. Yosuke Matsumoto, Tomohiko Taki, Yoshiaki Chinen, Ryuichi Sato, Hiroko Adachi, Shinsuke Mizutani, Hisao Nagoshi, Yuji Shimura, Mihoko Yoshida, Mio Sugitani-Yamamoto, Tsutomu Kobayashi, Junya Kuroda, Kazuho Shimura, Hiroto Kaneko, Masakazu Nakano, Shigeo Horiike, Yasuo Ohkawara, Kei Tashiro, Masafumi Taniwaki. Comprehensive analysis of conjoined genes in a DLBCL cell line, KPUM-UH1 by RNASeq. 第 78 回日本血液学会学術集会, 2016 年

4. Yusuke Hara, Norio Shiba, Kentaro Ohki, Genki Yamato, Myoung-Ja Park, Daisuke Tomizawa, Tomohiko Taki, Akitoshi Kinoshita, Hirokazu Arakawa, Akio Tawa, Keizo Horibe, Takashi Taga, Souichi Adachi, Yasuhide Hayashi. Molecular features and their clinical impact in infant acute myeloid leukemia. 第 78 回日本血液学会学術集会, 2016 年

5. 木下明俊, 滝 智彦, 林 泰秀, 渡邊智之, 宮地勇人, 松下弘道, 矢部みはる, 富澤大輔, 高橋浩之, 多和昭雄, 堀部敬三, 多賀 崇, 足立壯一. 5q-核型異常を持つ小児急性骨髄性白血病の臨床的特徴と予後. 第 58 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2016 年

6. 原 勇介, 柴 徳生, 大木健太郎, 大和玄季, 朴 明子, 富澤大輔, 滝 智彦, 木下明俊, 清河信敬, 荒川浩一, 多和昭雄, 堀部敬三, 多賀 崇, 足立壯一, 林 泰秀. 乳児急性骨髄性

白血病における *MLL* 遺伝子再構成及び *CBFA2T3-GLIS2* による予後層別化. 第 58 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2016 年

7. 滝 智彦. 「それぞれの癌」診断・治療の現状と展望. 小児がんにおける分子診断の現状と課題. 第 55 回日本癌治療学会学術集会, 2017 年

8. 滝 智彦. 小児血液・がん領域のゲノム医療において考慮すべき遺伝医療の特性と課題. 本セッション計画の背景について. 第 59 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2017 年

9. Happy Permatasari, 中畑新吾, 市川朝永, 齋藤祐介, 滝 智彦, 谷脇雅史, 森下和広. BCL11B 短鎖バリエントは成人 T 細胞白血病・リンパ腫の発症に關与する. 第 76 回日本癌学会学術総会, 2017 年

10. Happy Permatasari, 中畑新吾, 市川朝永, 齋藤祐介, 滝 智彦, 谷脇雅史, 森下和広. BCL11B 短鎖バリエントは成人 T 細胞白血病・リンパ腫の発症に關与する. 第 79 回日本血液学会学術集会, 2017 年

11. Yusuke Hara, Norio Shiba, Genki Yamato, Jun Okubo, Kentaro Ohki, Myoung-Ja Park, Manabu Sotomatsu, Daisuke Tomizawa, Tomohiko Taki, Akitoshi Kinoshita, Nobutaka Kiyokawa, Takashi Taga, Hirokazu Arakawa, Akio Tawa, Keizo Horibe, Souichi Adachi, Yasuhide Hayashi. Biology and Prognostic markers in young children with acute myeloid leukemia -the JCCG study, JPLSG AML-05-. 59th Annual Meeting of the American Society of Hematology. 2017 年

12. Genki Yamato, Norio Shiba, Kenichi Yoshida, Yusuke Hara, Kentaro Ohki, Jun Okubo, Myoung-Ja Park, Manabu Sotomatsu, Tomohiko Taki, Hirokazu Arakawa, Nobutaka Kiyokawa, Daisuke Tomizawa, Souichi Adachi, Takashi Taga, Keizo Horibe, Seishi Ogawa, Yasuhide Hayashi. Clinical features and prognostic impact of *RUNX1* and *PTPN11* mutations in pediatric acute myeloid leukemia—the JCCG study, JPLSG AML-05-. 59th Annual Meeting of the American Society of Hematology, 2017 年

13. Norio Shiba, Kenichi Yoshida, Yusuke Hara, Genki Yamato, Masashi Sanada, Yuichi Shiraiishi, Kentaro Ohki, Jun Okubo, Myoung-JA PARK, Daisuke Tomizawa, Tomohiko Taki, Manabu Sotomatsu, Keizo Horibe, Takashi Taga, Souichi Adachi, Akio Tawa, Satoru Miyano, Seishi Ogawa, Yasuhide Hayashi. RNA sequencing illustrates the genetic backgrounds of pediatric acute myeloid leukemia. 59th Annual Meeting of the American Society of Hematology, 2017 年

14. Ishimaru S, Okamoto Y, Imai C, Sakaguchi H, Taki T, Hasegawa D, Cho Y, Kakuda H, Sano H, Manabe A, Imamura T, Kato M, Arakawa Y, Shimonodan H, Sato A, Suenobu S, Inukai T, Watanabe A, Kawano Y, Kikuta A, Horibe K, Ohara A, Koh K. Nationwide survey of pediatric hypodiploid acute lymphoblastic leukemia in

Japan. 59th Annual Meeting of the American
Society of Hematology, 2017 年

〔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

滝 智彦 (TAKI, Tomohiko)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：50322053