

令和元年6月17日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10032

研究課題名(和文) 網羅的遺伝子解析をとおして同定した家族性白血病原因遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of causative genes identified by comprehensive genetic analysis

研究代表者

盛武 浩 (Moritake, Hiroshi)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：40336300

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)：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1家系に患者共通のETV6生殖細胞新規変異を認めた。ETV6は転写抑制活性をもつことが知られているが、変異型導入細胞株を作製し細胞内局在、転写活性、コロニーフォーメーションアッセイを評価したが有意な変化を認めなかった。更にドナーマウスから骨髓前駆細胞を採取し変異型を導入し、レシピエントマウスに経静脈的に移植した。移植後、末梢血に有意な変化を認めず、白血球分画の評価でも野生型との間に有意な差を認めなかった。これらの結果から、新規ETV6変異単独では白血化に関わるリンパ球分化へのバイアスや血小板減少には関与しないことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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症例に生殖細胞変異を見出しその頻度は約1%とされる(Lancet Oncology, 2015)。ETV6生殖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生殖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の確立が重要である。ただし、今回のようにデータベースでは一塩基多型として扱われていないが表原型を示さない変異も含まれている可能性があり、機能解析をとおして適切な判断が重要である。

研究成果の概要(英文)：We performed comprehensive genetic analyses on five families in which at least two children developed acute leukemia among all of their relatives. Exome sequencing identified the same ETV6 germline mutations in the siblings with acute lymphoblastic leukemia in one family. ETV6 is a transcriptional repressor. We analyzed the subcellular localization, transcriptional activity, and colony formation assay using novel ETV6 mutation-transformed cells; however, we failed to detect a significant difference compared with wild-type cells. In addition, novel ETV6 mutation-transformed hematopoietic stem cells were transplanted to immunocompromised mice; however, no significant differences in peripheral blood components, including white blood cell differentiation, after engraftment were observed between wild-type and mutated-type cells. In conclusion, the novel ETV6 mutation identified in our family did not have any effect on lymphoid differentiation linked to leukomogenesis or thrombocytopenia.

研究分野：小児血液・腫瘍

キーワード：白血病 小児 ETV6遺伝子 生殖細胞変異 家族性 エクソーム解析

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

1. 研究開始当初の背景

急性白血病(AL)は急性リンパ性白血病(ALL)と急性骨髄性白血病に(AML)に2層別される。本邦での小児における年間発症数は ALL500、AML150、AL 全体で 650 例程度である。九州山口小児がん研究グループ(KYCCSG)は 1984 年から治療研究を行っており、1,900 例以上の AL の治療経験がある。しかし、家族内小児 AL 発症は ALL8 例、4 家系のみで、その報告は世界的にも極めて珍しい。がん家系の網羅的解析をとおした責任遺伝子同定は、AML で *RUNX1* 遺伝子 (Song et al. Nat Genet 1999) と *CEBPA* 遺伝子 (Smith et al. NEJM 2004; Pabst et al. J Clin Oncol 2008) の変異報告があるものの、ALL では *Pax5* 遺伝子 (Shah et al. Nat Genet 2014) や *ETV6* 遺伝子 (Noetzli et al. Nat Genet 2015) が同定されたに過ぎない。我々が全国から収集した 5 家系の網羅的遺伝子解析をとおして、同定した新規 *ETV6* 変異の機能解析を行う。

2. 研究の目的

2015 年に我々と同じ手法を用いた家族性白血病の解析をとおして *ETV6* 生殖細胞系列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値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行う。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 症例に生殖細胞変異を見出しその頻度は約 1%とされる。*ETV6* 生殖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* 生殖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検討するためにも、新規変異の表現型を解明することが重要である。

3. 研究の方法

今回見出した新規 *ETV6* 変異の機能解析として細胞内局在、転写因子機能、造血分化能を評価するために、新規 *ETV6* 変異型を導入したレトロウイルスベクターを作製した。まずそのベクターを用いて Hela 細胞を形質変換し細胞内局在を解析した。次に、*ETV6* 標的分子である MMP3, PF4, EGR1, TRAF1 についてレポーターアッセイと遺伝子発現解析を行った。Hela 細胞に野生型と変異型の発現ベクターおよび MMP3, PF4, EGR1, TRAF1 プロモーターベクターを導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。さらに、野生型と変異型を導入した Hela 細胞から定量的 PCR 法で遺伝子発現を比較した。*in vivo* の実験系ではマウス造血幹細胞分画(LSK)に変異型を導入し分化能変化をフローサイトメトリーで評価した。更にマウス LSK 分画に変異型を遺伝子導入後に放射線照射免疫不全マウスへの移植実験を行った。具体的には、5-FU を腹腔内投与したドナーマウスから骨髄前駆細胞を採取し GFP 標識されたレトロウイルスベクターを用いて Mock、野生型、変異型を導入した。レトロウイルスベクター感染 48 時間後、前処置 (X 線 10Gy 照射) を施行したレシピエントマウスに経静脈的に感染骨髄細胞を移植した。移植後 12 週まで末梢血測定および GFP 陽性細胞の割合を評価した。さらに末梢白血球の分画を Gr1, Mac1, B220, CD3 分画の推移で評価した。

4. 研究成果

形質転換した Hela 細胞の ETV6 細胞内局在に核内局在減少という変化はなかった。レポーター遺伝子アッセイで遺伝子発現解析を行ったが、変異型は ETV6 下流遺伝子群である MMP3, PF4, EGR1, TRAF1 の転写機能に変化をもたらさず野生型と同様の活性を保有していた。さらに、野生型と変異型を導入した Hela 細胞から定量的 PCR 法で遺伝子発現を比較したが同等であった。in vivo の実験としてマウス造血幹細胞分画(LSK)に変異遺伝子を導入し分化能をフローサイトメトリーで評価したが野生型と同様であった。次に、マウス造血再構築における新規 ETV6 変異の機能解析のため、5-FU 腹腔内投与ドナーマウスから骨髓前駆細胞を採取し GFP 標識ベクターを用いて Mock、ETV6 野生型、新規 ETV6 変異型を導入し、レトロウイルスベクター感染 48 時間後に X 線 10Gy を照射したレシピエントマウスに経静脈的に感染細胞を移植した。移植後 12 週まで定期的に 4 週毎に末梢血および GFP 陽性細胞割合を評価したが、白血球数、赤血球数、ヘモグロビン、血小板数に有意な差は認めなかった。さらに末梢白血球分画を Gr1, Mac1, B220, CD3 の推移で評価したがいずれの分画においても Mock および野生型との間に有意な差は認めなかった。これらの結果から、新規 ETV6 変異単独では白血化に関わるリンパ球分化へのバイアスや血球増多には関与しないことが明らかとなった。また、既報告では ETV6 変異では血小板分化障害をきたすことが示されているが、コロニーフォーメーションアッセイの結果と同じくマウス造血においても血小板産生能は保たれており、臨床的に同患者の血小板値が保持されていることと合致する所見であった。今後は、白血病発症に関与するか検討するため ETV6-RUNX1 との相互作用と白血病発症促進効果の検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. 盛武 浩：家族性白血病の診断・サーベイランス・治療．臨床血液，59(10)430-439(2018)[査読なし]
2. 盛武 浩：小児がんの現状と未来．宮崎県医師会医学誌，42(1)1-10(2018) [査読なし]

〔学会発表〕(計9件)

1. 盛武 浩：小児希少疾患の克服にむけて病態から考える．第 171 回日本小児科学会鹿児島地方会．(2019)
2. 盛武 浩：「Rare disease から学ぶ」．第 147 回熊本小児科学会 (2019)
3. 盛武 浩：家族性白血病の診断・サーベランス・治療．第 80 回日本血液学会学術集会，(2018)
4. 盛武 浩：小児がん:さらなる治療成績向上を目指して．平成 30 年度 延岡医会総会．(2018)
5. 盛武 浩:「子どものがんの現在・過去・未来」．宮崎大学医学部公開講座，(2018)
6. 盛武 浩：世界を視野に地域から始めよう．第 105 回日本小児科学会大分地方会平成 30 年度総会．(2018)
7. 盛武 浩：小児がん克服にむけて病態から考える．平成 30 年度宮崎県医師会勤務医部会前期講演会．(2018)
8. 盛武 浩:世界を視野に地域から始めよう:難知性小児がん克服への挑戦．第 17 回血液腫瘍フォーラム．(2018)

9. 盛武 浩 : 世界を視野に地域から始めよう. 第 83 回日本小児科学会宮崎地方会.
(2018)

〔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 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：森下 和広
ローマ字氏名：Morishita Kazuhiro

研究協力者氏名：古賀 友紀
ローマ字氏名：Koga Yuhki

研究協力者氏名：渡辺 浩良
ローマ字氏名：Watanabe Hiroyoshi

研究協力者氏名：辻 省次
ローマ字氏名：Tsuji Shoji

研究協力者氏名：森下 真一
ローマ字氏名：Morishita shinichi

研究協力者氏名：高木 正稔
ローマ字氏名：Takagi Masatoshi

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。