

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16174

研究課題名（和文）急性リンパ性白血病における変則V(D)J組み換えの微小残存病変としての有用性

研究課題名（英文）Illegitimate V(D)J recombination as an MRD marker in acute lymphoblastic leukemia

研究代表者

岡田 耕平 (Okada, Kohei)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：30792501

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）：急性リンパ性白血病においてV(D)J組み換えの機序により、IKZF1欠失が高頻度に起こることを確認した。IKZF1欠失は腫瘍特異的に起きており、微小残存病変を検出するマーカーとなり得る。我々はFISH法で4つの異なるタイプのIKZF1欠失を検出できるプローブを開発した。本法を用い、臨床症例で簡便迅速にIKZF1欠失を判定できることを確認するとともに、両アリルで異なるIKZF1欠失をきたす症例があること、欠失部位が免疫グロブリン領域に挿入される症例があることを見出した。また、デジタルPCR法でIKZF1 4-7欠失を定量的に検出する方法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性リンパ性白血病において、FISHやデジタルPCRなどの簡便な検査により腫瘍特異的な変異を検出できる方法を確立した。IKZF1欠失は急性リンパ性白血病における予後不良因子として知られるが、これまで標準的な測定方法がなかった。白血病細胞の治療においては、微小残存病変がフォローできることで、治療効果が続いていることの確認や、再発の早期発見が可能となり、各症例の治療反応性に最適化した個別化治療が可能となる。FISHやデジタルPCRによるIKZF1欠失の検出はこのような微小残存病変マーカーとして有用と考えられる。

研究成果の概要（英文）：V(D)J mediated IKZF1 deletion occurred frequently in acute lymphoblastic leukemia. IKZF1 deletion occurred only in leukemic cells and potentially become a marker detecting minimal residual disease. We developed FISH probe detecting all 4 different types of IKZF1 deletion. We verified the FISH method could detect IKZF1 deletion fast and easily in clinical samples. We found the samples which showed allelic IKZF1 deletion or insertion of the deleted IKZF1 fragment into immunoglobulin region. We also developed digital PCR method which quantitatively detect IKZF1 4-7 deletion.

研究分野：臨床血液

キーワード：V(D)J組み換え 微小残存病変

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

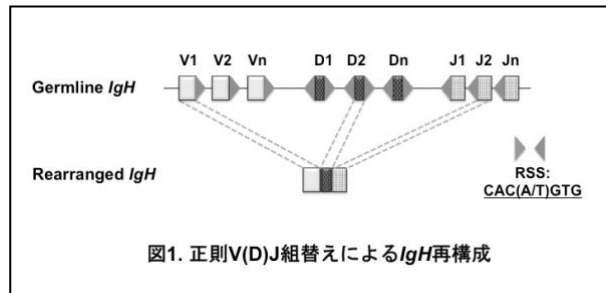
1. 研究開始当初の背景

<急性リンパ性白血病（ALL）治療の臨床的問題点>

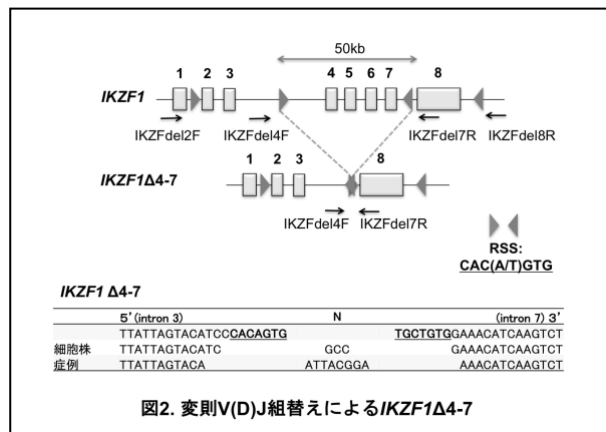
成人の ALL は化学療法では、長期生存率が 30-40%と報告されており、予後不良な血液悪性腫瘍である。同種造血幹細胞移植が行われ、長期生存を得ている症例も多く存在するが、治療関連死の割合が 20-30%と高いことから、慎重に移植適応を判断する必要がある。予後不良因子であるフィラデルフィア（Ph）染色体を有する場合は、同種造血幹細胞移植の適応であり、RQ-PCR による *BCR-ABL* の検出を微小残存病変（MRD）のマーカーとする事が可能である。治療経過中の MRD の残存も、予後不良因子として扱われ、同種造血幹細胞移植の適応となる。しかし、正常核型 ALL では、簡便に測定できる MRD マーカーがないため、移植適応の判断が困難であった。ALL において腫瘍特異的な TCR/IgH 遺伝子再構成に注目した骨髓微小残存病変量測定は令和元年度になり診療報酬請求ができるようになったが、腫瘍特異的な遺伝子再構成の同定をしたのち、モニタリングは 2 回までしか許容されていない。

<変則 V(D)J 組み換え>

通常、V(D)J 組み換えは、前駆 B、T 細胞の段階で免疫グロブリン重鎖 (*IgH*)、T 細胞受容体 (*TCR*) を標的として起きる (図 1)。V (D) J 組み替えは RAG1/2 複合体が、2ヶ所の Recombination Signal Sequence (RSS) に結合して、その間を切り取ることで起こる。さらに切断点の間にターミナルデオキシリボヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) 活性により数 bp から 20bp ほどのランダムな N-nucleotide が挿入されるため、個々の組み替え配列は細胞特異的な配列となり、多様な抗原に対する免疫応答が可能となっている。



ALL は RAG1/2、TdT を高発現する腫瘍であり、*IgH*、*TCR* 以外にも RSS に類似した配列が存在する遺伝子領域の欠失を来す (変則 V(D)J 組み換え)。例えば *IKZF1* はイントロン領域に存在する RSS (類似) 配列で変則 V(D)J 組み替えを起こし、エクソン 4~7 の欠失変異を生じる (図 2)。



欠失領域は 50kbp 程の領域であり、切断点を挟んだプライマーで PCR を行くと、正常アレルは増幅されず、欠失が起きたアレルのみが増幅される。症例毎に挿入される N-nucleotide が異なるため、切断点は症例特異的な配列となり、他検体のコンタミネーションを見分ける事が可能である。このような変則 V (D) J 組み替えによる欠失変異は、種をまたいでおきており、ヒトにおいてもマウスにおいても ALL で報告されている 1)。

2. 研究の目的

ALL は RAG1/2、TdT を高発現する腫瘍であることから、*IgH*、*TCR* 以外にも多くの遺伝子が潜在的な組み替えシグナル配列 (RSS) で、RAG1/2 複合体が組み替えを起こし欠失変異が生じる (表 1)。これらの“変則 V(D)J 組み換え”による遺伝子内欠失の領域は、20kbp 以上であり、切断点を挟んだプライマーで PCR では、正常アレルは増幅されず、欠失アレルのみが増幅される。ALL における変則 V(D)J 組み換え遺伝子を検索することで、これまで MRD マーカーがなかった症例に、簡便、高感度な MRD マーカーを見つけれられる可能性がある。急性リンパ性白血病 (ALL) における変則 V(D)J 組み換えによる遺伝子内欠失が微小残存病変 (MRD) マーカーとして有用であることを示す。

| V(D)J欠失の種類 | 頻度 | 出典 |
|-------------------|-------------------|---------------------------------------|
| TAL1 | 13% | Aplan P et al. Blood 1992 |
| CDKN2A | 20-30% | Kitagawa Y et al. J Biol Chem. 2002 |
| IKZF1 | 16%(Ph陰性) | Caye A et al. Hematologica. 2013 |
| BTG1 | 8.3%(Ph陰性) | Waanders E et al. PLoS Genetics 2012 |
| SLX4IP | 30% | Meissner B et al. Hum Mol Genet. 2014 |
| CD200/BTLA | 4.8% | Ghazavi F et al. Haematologica 2005 |
| ERG | 3.2% | Clappier E et al. Leukemia 2014 |
| PTEN | 8.0% | Mendes RD et al. Blood 2014 |

表1. ALLにおける変則V(D)J欠失の発現頻度

3. 研究の方法

1. 腫瘍細胞株を用いて、各変則 V(D)J 組み換え関連遺伝子欠失 (以下 V(D)J 欠失) の PCR での検出感度を検討し、至適プライマーを設定する。

これまでに変則 V(D)J 欠失の標的遺伝子として *TAL1*, *CDKN2A*, *IKZF1*, *BTG1*, *SLX4IP*, *CD200/BTLA*, *ERG*, *PTEN* が報告されている。まず腫瘍細胞株から抽出したゲノム DNA を用いて、前述の候補遺伝子の欠失の有無を既報プライマーを用いた PCR で検出し、陽性検体を得る。

腫瘍細胞株は、MOLT4, Jurkat, PALL2, MY, Raji, ALL/MIK, Reh, CEM などの B および T リンパ芽球性白血病細胞株を用いる。検出できた V(D)J 欠失が、腫瘍特異的であることを、ダイレクトシーケンス法で確認する。

2. 変則 V(D)J 欠失標的について、デジタル PCR で変異を検出できる検査系を樹立する。

定性的な PCR の系が完成した後、デジタル PCR をもちいた MRD の定量評価を目指す。

RQ-PCR による MRD 検出は感度が良い一方、個々の白血病が何コピーの転写産物を作るかは明らかではないため、陽性だった場合に、何細胞に 1 つが白血病細胞なのかはわからず、定量値は RNA1 μg あたりのシグナル数、あるいは GAPDH などハウスキーピング遺伝子の発現との比で表される。一方変則 V(D)J 欠失は、ゲノム DNA をテンプレートとしており、何細胞に 1 個の腫瘍細胞が残存するかを定量的に計測する事が可能である。

4. 研究成果

急性リンパ性白血病細胞株及び臨床検体を用いて、PCR 法にて *IKZF1*, *BTG1*, *CDKN2A*, *SLX4IP*, *TAL1*, *CD200/BTLA*, *ERG* の変則 V(D)J 組み換えによる欠失変異を確認した。検出できた V(D)J 欠失については、ダイレクトシーケンスにて、欠失部位の配列を確認し、V(D)J 組み換えによる腫瘍特異的欠失が起きていることを確認した。最も欠失頻度が多いのは *IKZF1* であり、*IKZF1* 欠失に注目して以後の検討を行った。急性リンパ性白血病において *IKZF1* 欠失は予後不良因子となることが報告されているが、大規模コホートの次世代シーケンスあるいは MLPA 法による検討が中心で、これまで日常臨床で検出可能な標準検査法が確立されていない。我々は 4 つのパターンの *IKZF1* 欠失 ($\Delta 2-7$, $\Delta 2-8$, $\Delta 4-7$, $\Delta 4-8$) の全てで欠失する共通部位に対する FISH プローブを作成し、*IKZF1* 下流近傍のプローブと組み合わせることで、*IKZF1* 欠失を検出する FISH プローブを開発した(図 3)。臨床検体を用いて有用性を検討したところ、*IKZF1* 欠失細胞を定量的に検出する他、*IKZF1* 遺伝子が乗る 7 番染色体のモノソミーや、4 倍体白血病も検出可能であった(図 4)。さらに、*IKZF1* 欠失部位が失われずに、2 番染色体の免疫グロブリン軽鎖領域に挿入されている症例を見出し、ALL においては V(D)J 組換え機構を介した遺伝子領域同士の組換えが起き得ることを見出した(図 4F)²⁾。

次に我々は *IKZF1* 欠失の中で最も頻度の多い *IKZF1* $\Delta 4-7$ について、デジタル PCR で定量的に変異アリル頻度を検出する方法を開発した(図 5)。*IKZF1* $\Delta 4-7$ を FAM プローブで検出し、コントロールとして *RNaseP* を VIC プローブで検出するデザインとした。VIC の陽性率 (VIC%)、FAM の陽性率 (FAM%) から、*IKZF1* $\Delta 4-7$ 細胞割合 (%) は以下の式で求められる。

$$IKZF1\Delta 4-7 \text{ 細胞割合 (\%)} = \frac{FAM\% \times 2}{VIC\%} \times 100 (\%)$$

IKZF1 欠失細胞株及び臨床検体のゲノム DNA の段階希釈を用いて、デジタル PCR 法と RQ-PCR 法との相関を検討した。デジタル PCR 法と RQ-PCR 法で *IKZF1* 欠失細胞割合測定値は高い相関を示した(図 6)。デジタル PCR では段階希釈による検量線を書く必要がなく、絶対定量が可能である。*IKZF1* 欠失はゲノム DNA で検出することができ、検体採取から半日ほどで結果を得ることができ

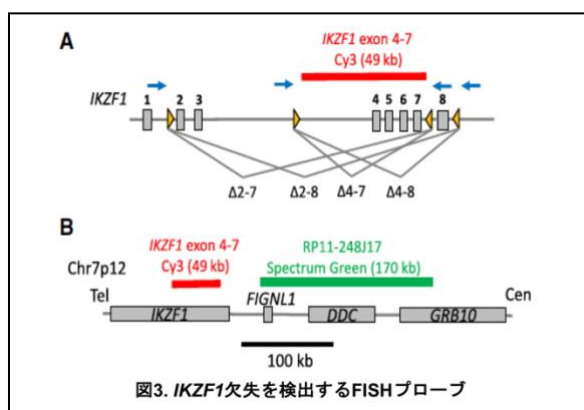


図3. *IKZF1*欠失を検出するFISHプローブ

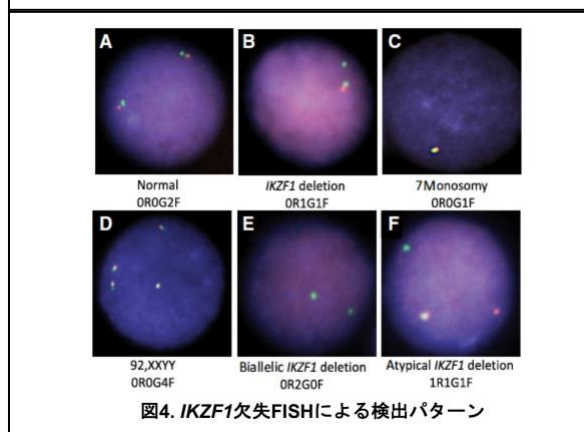


図4. *IKZF1*欠失FISHによる検出パターン

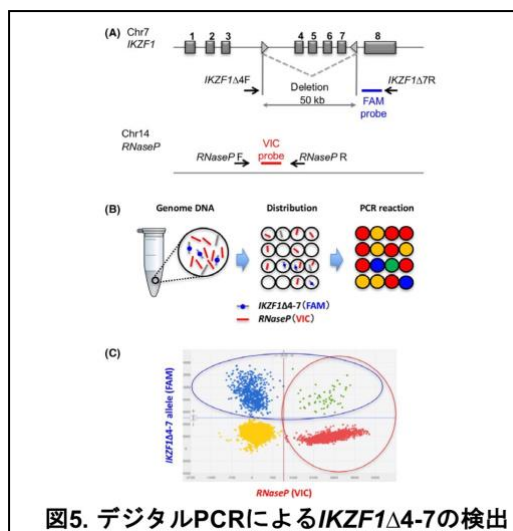


図5. デジタルPCRによる*IKZF1* $\Delta 4-7$ の検出

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Hashiguchi J, Onozawa M, Oguri S, Fujisawa S, Tsuji M, Okada K, Nakagawa M, Hashimoto D, Kahata K, Kondo T, Shimizu C, Teshima T. | 4. 巻 20 |
| 2. 論文標題 Development of a Fluorescence in Situ Hybridization Probe for Detecting IKZF1 Deletion Mutations in Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 J Mol Diagn. | 6. 最初と最後の頁 446-454 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jmoldx.2018.02.005 | 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 Hashiguchi J, Onozawa M, Okada K, Amano T, Hatanaka KC, Nishihara H, Sato N, Teshima T. | 4. 巻 41 |
| 2. 論文標題 Quantitative detection of IKZF1 deletion by digital PCR in patients with acute lymphoblastic leukemia. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Int J Lab Hematol. | 6. 最初と最後の頁 e38-e40 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ijlh.12945. | 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0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

| | | |
|---|--------------|---------------|
| 産業財産権の名称 IKZF1 遺伝子変異を検出するための核酸プローブセット及び当該プローブセットを用いたIKZF1 遺伝子変異の検出方法 | 発明者 小野澤真弘 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、51900452817 | 出願年 2019年 | 国内・外国の別 国内 |

〔取得〕 計0件

〔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 |
|-------|----------------------------------|------------------------------|----|
| 研究協力者 | 小野澤 真弘 (ONOZAWA MASAHIRO) | 北海道大学・血液内科・講師 (10101) | |

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 協力者 | 橋口 淳一 (HASHIGUCHI JUNICHI) | 北海道大学・血液内科 (10101) | |