

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：82402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08310

研究課題名(和文) 思春期若年成人白血病のクロモソリプシスによる悪性化機構解明とゲノム医療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of malignant transformation mechanism and application to genomic medicine in adolescent/young adult leukemia associated with Chromothripsis

研究代表者

川村 眞智子 (Kawamura, Machiko)

地方独立行政法人埼玉県立病院機構埼玉県立がんセンター(臨床腫瘍研究所)・病院 臨床検査科・科長

研究者番号：80450592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：がんは遺伝子変異の蓄積で発症するとされてきたが、クロモソリプシスは一度に1～数本の染色体に粉砕と再編成が起きる新しい発がん機構である。クロモソリプシスが白血病に関わる頻度は低いが予後は極めて不良である。遺伝的素因のある若年成人急性骨髄性白血病と、小児期に急性白血病に対する化学療法と放射線療法後に発症した治療関連性急性骨髄性白血病に、クロモソリプシスを見出した。両者で白血病細胞に、細胞質内微小核とTP53遺伝子変異を認め、前者はdouble minutes染色体内にMYC遺伝子増幅、後者は複雑核型染色体とNUP98::SETBP1融合遺伝子を検出した。診断と治療標的として役立つと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんは遺伝子変異の蓄積で発症するとされてきたが、クロモソリプシスは一度に1～数本の染色体(遺伝子)に粉砕と再編成が起きる新しい発がん機構である。クロモソリプシスが白血病に関わる頻度は低いが、予後は極めて不良である。遺伝的に素因のある若年成人の急性骨髄性白血病と、小児期に発症した白血病に対する化学療法と放射線療法後に発症した治療関連性急性骨髄性白血病に、クロモソリプシスを見出した。思春期・若年成人では、遺伝的背景のある人、小児期に放射線治療を受けた場合にはクロモソリプシスのリスクがある。顕微鏡所見が診断に重要であり、特徴的な遺伝子変異や、融合遺伝子は、治療標的として役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Cancer is thought to be caused by the accumulation of genetic mutations, but Chromothripsis is a new carcinogenesis mechanism in which one to several chromosomes are shattered and rearranged at once. Although Chromothripsis occurred leukemia rarely, the prognosis is extremely poor.

One case was a genetically predisposed young adult with acute myeloid leukemia, and the other case was therapy-related acute myeloid leukemia that developed longer than 10 years after chemotherapy and radiation therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood. While TP53 gene mutations and micronuclei in the cytoplasm of the leukemia cells were detected in both cases, the former detected the MYC gene amplification in the double minute chromosomes, and the latter detected the complex karyotype chromosome and the NUP98::SETBP1 fusion gene. These were considered useful as a diagnostic and therapeutic targets.

研究分野：白血病

キーワード：白血病 クロモソリプシス 思春期・若年成人世代 微小核 SNPアレイ 次世代シーケンス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

クロモスリプシスは一度に1~数本の染色体に粉碎が生じ、数十~数千におよぶDNA断片化と再結合が起こり、その結果キメラ mRNA や遺伝子欠失が多数生じるという、腫瘍の発生や進展に関わる分子メカニズムである。これまで腫瘍における遺伝子異常は多段階的に蓄積されると考えられていたが、近年の次世代シーケンス(NGS)解析によりクロモスリプシスが見出され、新たな発がん機構として注目されている。全てのがんの約3%、骨腫瘍の25%に見られるという(Stephens et al., Cell 144, 27, 2011)。その後小児髄芽腫、高リスク神経芽細胞腫においても報告され、クロモスリプシスの発生が *TP53* 変異と高い相関性を持つことが示された(Rausch et al., Cell 148, 59, 2012)。

先行研究で、クロモスリプシスが一部の急性白血病に存在することを報告した。Cytoscan HD/750K を用いたアレイ解析で、クロモスリプシスの疑い例を検出し、PNA (Peptide nucleic acid)-FISH で動原体の異常が確認し、動原体の異常はクロモスリプシスの発症機序と関連があることを示すことができた。白血病におけるクロモスリプシスは、marker 染色体、dmin (double minutes)染色体、Intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21)、複雑核型、染色体 17p 欠失等と関連があり、特に *TP53* 遺伝子変異と関連があることを報告した。

### 2. 研究の目的

クロモスリプシスに関わるがんは難治であり、発症機序は未だ不明な点が多い。NGS で難治性白血病にクロモスリプシスを検出し、クロモスリプシス関連白血病の細胞形態、染色体、遺伝子レベルでの特徴を明らかにするとともに、全ゲノムシーケンス(WGS)によらない同白血病的スクリーニング法を開発する。特に思春期・若年成人(Adolescent and young adults; AYA)世代の白血病は、小児期の白血病の再発、晩期合併症としての二次性(治療関連性)白血病、この世代に特異的に発症する白血病等、多種類が混在し、一般に予後不良である(Wood et al., Blood 117, 5803, 2016)。再発や二次性白血病は、抗がん剤や放射線治療によるゲノムや染色体の不安定性が発症に影響を与えていると考えられている。AYA 世代の白血病において、クロモスリプシスに関連して発症するものがないかを調べ、さらに発症機序を解明し治療ターゲットを探索する。

### 3. 研究の方法

先行研究の結果を踏まえ、AYA 世代を含めた全年齢層のクロモスリプシスを疑う急性白血病を解析対象とした。

- 1) クロモスリプシスが疑われる症例の探索と診断: 顕微鏡下では微小核 micronucleus の検出、およびクロモスリプシスによって生じる marker 染色体や ring 染色体、dmin 染色体等の G 分染法での同定により、クロモスリプシスの可能性が高い症例を抽出した。
- 2) CytoScan HD/750K アレイ解析: 高解像度マイクロアレイにより CNV (Copy Number Variation)、SNP(single nucleotide polymorphism)を含めた Thermo Fisher Scientific 社の Chromosome Analysis Suite (ChAS)で分子核型分析を行った。クロモスリプシス特有の、一部の染色体に遺伝子の増幅、欠失が集中するパターンの症例を抽出した。
- 3) 網羅的遺伝子パネル解析: OncoPrint Myeloid Research Assay (Thermo Fisher Scientific 社)を用い、急性骨髄性白血病(AML)の主要ターゲット遺伝子パネルで効率的に遺伝子変異を検出した。一部は WGS によって遺伝子変異を確認した。

- 4) マルチカラー-FISH を用い、G 分染法ではわかりにくい染色体異常を解析した。
- 5) PNA-FISH 法 (広島大学原爆放射線医学研究所田代聡教授と共同研究) を用いて、クロモスリプシスの原因となっている可能性のある動原体異常の有無について検討した。
- 6) クロモスリプシス疑い症例を選択し、NGS 解析 (RNA シークエンス, WGS) を用い診断を確定した。

#### 4. 研究成果

先行研究を含めて 77 例の白血病にアレイ解析を行い、クロモスリプシス様の 7 例を抽出した。PNA-FISH では動原体の異常を示すものが多く含まれていた。7 例中 4 例は複雑核型で dmin 染色体を持ち、アレイ解析で *MYC* 遺伝子を含む 8q24.13-21 の増幅があり、FISH で dmin 染色体上に *MYC* 遺伝子増幅が見られた。3 例は *TP53* 遺伝子変異と 17p 欠失があり、顕微鏡下で細胞質に微小核があり共通しており、1 例だけは *TP53* 遺伝子変異、17 番染色体の異常がなく、顕微鏡下の細胞質の微小核も少し異なり特徴的であった。4 例中 1 例が AYA 世代の白血病で、家族性のがん患者が複数みられ、*TP53* 遺伝子変異があり、顕微鏡でも微小核がみられた。

一方、AYA 世代の複雑核型急性白血病 3 例においてクロモスリプシスを疑い解析を行った。症例 1 は、小児期に急性リンパ性白血病(ALL)の治療のため化学療法と放射線療法を受けた治療関連性 AML で、アレイ解析で 11 番と 17 番染色体がクロモスリプシス様であった。先行研究で 11 番と 18 番染色体上にある *NUP98::SETBP1* 融合遺伝子、17 番染色体上にある *NME1-NME2::NME2* 融合遺伝子、*TP53* 遺伝子変異と 17p 欠失(LOH)を持っていた。この症例では、顕微鏡所見で細胞質に微小核がみられた。クロモスリプシスは、二重鎖切断後のテロメア欠失により染色体末端が融合し、染色体分裂を不安定にする breakage-fusion-bridge (BFB) が繰り返されることと関連しているともいわれている。本症例については、初発の白血病の診断時にこれらの変異があったのか、その後の治療により引き起こされたものかについてさらに解析中である。

症例 2 は、複雑核型染色体を持つ AYA 世代の T 細胞性 ALL であった。先行研究で、17p 欠失があり、アレイ解析では遺伝子の増幅、欠失が多数見られ、クロモスリプシス様と考えていたが、病的な *TP53* 遺伝子変異はなかった。さらに顕微鏡所見では、細胞質に微小核も検出できなかった。WGS から *CDKN2A/p16*, *CDKN2B/p15* の欠失や、*NOTCH1*, *KRAS* の遺伝子変異を持つことが分かった。RNA シークエンスで新規 *BCL11B::EVX1* 融合遺伝子を検出し、この ALL の発症に寄与していると考え機能解析を行っている。

症例 3 は、金子らが報告した家系的に遺伝性腫瘍の可能性のある dmin 染色体を持つ複雑核型を呈した AML であるが、この症例も顕微鏡で細胞質に微小核を持っていた。*TP53* 遺伝子変異、17p 欠失、アレイ解析で、他の成人症例と同様な染色体 8q24 周辺に遺伝子増幅を持つパターンを示していた。これについてはその他の成人症例と共にさらなる解析を行っている。

以上より、AYA 世代の白血病のアレイ解析でクロモスリプシス様パターンを示したものは、*TP53* 遺伝子変異のあった家族性腫瘍と考えられた dmin 染色体を持つ AML と、小児期の白血病に対する化学療法、放射線治療後の治療関連性白血病であった。両者は顕微鏡下で白血病細胞の細胞質に微小核があり、クロモスリプシスの存在が予測された。複雑型白血病を呈した T-ALL は、アレイ解析では *BCL11B::EVX1* 融合遺伝子の増幅と欠失が見られ、当初クロモスリプシスを疑ったが、RNA シークエンス解析、WGS 解析などの総合的な結果から定義を満たさないと考えた。この症例は顕微鏡の観察で微小核もなかった。クロモスリプシスはアレイ解析と白血病細胞の細胞質の微小核の観察である程度スクリーニングが可能であると考えた。

AYA 世代の白血病におけるクロモソリプシスは、遺伝的に *TP53* 遺伝子異常を持つものや、放射線療法や化学療法を受けた治療関連性白血病の場合に見られ、難治性であり、二重鎖切断の修復の異常が関連しているのではないかと考えられた。これらの症例は的確な診断と治療戦略が必要であり、さらなる分子病態の解明が急務と考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件(うち査読付論文 12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 Hara Y, Shiba N, Yoshida K, Yamato G, Kaburagi T, Shiraishi Y, Ohki K, Shiozawa Y, Kawamura M, Kawasaki H, Sotomatsu M, Takizawa T, Matsuo H, Shimada A, Kiyokawa N, Tomizawa D, Taga T, Ito E, Horibe K, Miyano S, Adachi S, Taki T, Ogawa S, Hayashi Y	4. 巻 62
2. 論文標題 TP53 and RB1 alterations characterize poor prognostic subgroups in pediatric acute myeloid leukemia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes, Chromosomes and Cancer	6. 最初と最後の頁 412 ~ 422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/gcc.23147	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 Mayumi Azusa, Tomii Toshihiro, Kanayama Takuyo, Mikami Takashi, Tanaka Kuniaki, Ueno Hiroo, Yoshida Hideki, Kato Itaru, Kawamura Machiko, Nakahata Tatsutoshi, Takita Junko, Hosoi Hajime, Imamura Toshihiko	4. 巻 29
2. 論文標題 The combination of ruxolitinib and Bcl-2/Mcl-1 inhibitors has a synergistic effect on leukemic cells carrying a SPAG9::JAK2 fusion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 1930 ~ 1938
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41417-022-00511-z	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 Kasai Fumio, Asou Hiroya, Ozawa Midori, Kobayashi Kazuhiko, Kuramitsu Hiroyuki, Satoh Motonobu, Kohara Arihiro, Kaneko Yasuhiko, Kawamura Machiko	4. 巻 33
2. 論文標題 Kasumi leukemia cell lines: characterization of tumor genomes with ethnic origin and scales of genomic alterations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 868 ~ 876
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13577-020-00347-5	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17件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Machiko Kawamura, Masayuki Haruta, Yasunobu Sekiguchi, Hirofumi Kobayashi, Fumio Kasai, Yasuhiko Kaneko
2. 発表標題 Double minute chromosomes in leukemia are associated with MYC amplification, TP53 alteration, and chromothripsis
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術集会(2022)横浜
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Machiko Kawamura, Hirofumi Kobayashi, Yasunobu Sekiguchi, Nobuo Maseki, Yasuhiko Kaneko
2. 発表標題 EP300-ZNF384 fusion gene-positive acute lymphoblastic leukemia with various developmental patterns
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会(2022)福岡
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Machiko Kawamura, Masayuki Haruta, Yasuhiko Kaneko
2. 発表標題 Novel BCL11B fusion gene in adolescent T-cell acute lymphoblastic leukemia with complex chromosomal abnormality
3. 学会等名 第64回 日本小児血液・がん学会学術集会(2022.11.25)東京
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川村眞智子、堀井洸佑、熊倉永莉香、岡田千春、桑野東子、小林一彦、金子安比古
2. 発表標題 二重微小染色体 (double minute) を持つ白血病における小核(micronuclei)の出現とMYC遺伝子増幅
3. 学会等名 第23回日本検査血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川村眞智子、春田雅之、金子安比古
2. 発表標題 二重微小染色体 (dmin) を持つ急性骨髄性白血病の分子生物学的解析
3. 学会等名 第68回日本臨床検査医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Machiko Kawamura, Masayuki Haruta, Yasuhiko Kaneko
2. 発表標題 First case report of the NUP98-SETBP1 fusion gene in therapy related acute myeloid leukemia
3. 学会等名 第63回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Machiko Kawamura, Hirofumi Kobayashi, Yasunobu Sekiguchi, Nobuko Kubota, Hiromi Yuasa, Nobuo Maseki, Yasuhiko Kaneko
2. 発表標題 A young adult case with B cell precursor ALL with t(1;1)(q21; q22) forming MEF2D-BCL9 fusion gene
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kawamura M, Haruta M, Kaneko Y
2. 発表標題 Clinical and biological analysis of acute myeloid leukemia (AML)-cutis
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kawamura M, Haruta M, Kaneko Y
2. 発表標題 A pediatric case with lineage switch from acute unclassified leukemia
3. 学会等名 第62回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kawamura M, Haruta M, Kaneko Y
2. 発表標題 Chromothripsis and a NUP98 fusion gene observed in an adolescent case with secondary acute myeloid leukemia
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術集会 (2019.9.28)京都
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口津加彩, 川村眞智子, 久保田靖子, 湯浅博美, 柵木信男, 金子安比古, 石川雅士, 西村ゆう, 小林泰文
2. 発表標題 急性骨髄性白血病の皮膚病変における細胞遺伝学的、遺伝子学的および免疫表現型の特徴
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会(2019.10.11)東京
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川村眞智子、春田雅之、金子安比古
2. 発表標題 思春期・若年成人の二次性急性白血病の3例の分子遺伝学的解析
3. 学会等名 第61回 日本小児血液・がん学会 (2019.11.16) 広島
4. 発表年 2019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	金子 安比古  (Kaneko Yasuhiko)  (50373387)	地方独立行政法人埼玉県立病院機構埼玉県立がんセンター (臨床腫瘍研究所)・臨床腫瘍研究所・その他   (82402)	



6. 研究組織（つづき）

	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	小林 泰文 (Kobayashi Hirofumi)  (50455375)	地方独立行政法人埼玉県立病院機構埼玉県立がんセンター (臨床腫瘍研究所)・病院 血液内科・副院長  (82402)	
研究分担者	春田 雅之 (Haruta Masayuki)  (80392190)	地方独立行政法人埼玉県立病院機構埼玉県立がんセンター (臨床腫瘍研究所)・臨床腫瘍研究所・研究員  (82402)	

	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	田代 聡 (Tashiro Satoshi)		
研究協力者	笠井 文生 (Kasai Fumio)		
研究協力者	今村 俊彦 (Imamura Toshihiko)		
研究協力者	関口 康宜 (Sekiguchi Yasunobu)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------