

令和 6 年 4 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02711

研究課題名(和文)全ゲノム-マルチオミクス情報に基づく日本型有毛白血病の分子病態解明と標的治療開発

研究課題名(英文) whole genome and multiomics analysis of hairy cell leukemia japanese variant

研究代表者

横山 和明 (YOKOYAMA, KAZUAKI)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：00647498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：日本固有の希少がんである有毛細胞白血病日本型(HCLjv)の分子病態解明と標的治療開発を目的に、欧米型HCL(BRAF.pv600E陽性)と合わせた全ゲノム解析を行った。その結果HCLjv例の2割に癌遺伝子Xの新規の構造異常が見られ、病態として強力なEmuエンハンサーハイジャックによるXの過剰発現による腫瘍化が推定された。Xはがん抑制遺伝子Y,Zの機能喪失変異と高率に共存していた。細胞株と用いた検討では、Xの過剰発現がPI3K/Akt経路の活性化を引き起こし、さらにはYの欠損がNFkb2の活性化を誘導した。作成したXfloxマウスを用いて、今後in vivoでのXの腫瘍原性解析を予定している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、現在標準治療のない、日本固有の希少がん、有毛細胞白血病日本型(HCLjv)について、その分子病態を解明と標的治療法の開発を目指して全ゲノム解析を行い、癌遺伝子X、がん抑制遺伝子Y,Zの変異を見出した。本研究により、癌遺伝子Xによる、腫瘍化のメカニズム解明と、それに基づく新しい治療法開発への道が開かれる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：In an effort to elucidate the molecular pathology and develop targeted therapies for Hairy Cell Leukemia-Japanese variant (HCLjv), a rare cancer unique to Japan, we conducted whole genome analyses in comparison with Western-type HCL (positive for BRAF.pv600E mutation). Our findings revealed novel structural abnormalities in the oncogene X in 20% of HCLjv cases, suggesting tumorigenesis driven by overexpression of X through hijacking of the strong Emu enhancer. The overexpression of X frequently coexisted with loss-of-function mutations in the tumor suppressor genes Y and Z. Further investigations using cell lines demonstrated that overexpression of X activates the PI3K/Akt pathway, while loss of Y induces activation of the NFkb2 pathway. Future studies will involve in vivo analysis of the oncogenic potential of X using floxed mice engineered to specifically assess the role of X in tumorigenesis.

研究分野：血液腫瘍

キーワード：有毛細胞白血病 全ゲノム解析 エンハンサー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

有毛細胞白血病(Hairy cell leukemia : HCL)は、細胞表面の全周にわたる毛髪状の長い絨毛状突起を特徴とする、クローナルな成熟 B 細胞が骨髄や脾臓において増殖する、比較的緩徐な臨床経過をとる極めて希少な低悪性度腫瘍である。HCL のうち、我が国に多い日本型 HCL(HCL-japanese variant, HCL-jv)は、欧米に多い、古典型(HCL-classical, HCL-c)やそのバリエーション型(HCL-variant, HCL-v)とも臨床病態が異なるが、我が国からしか報告がなく、未だその存在が世界では認められていない、我が国固有の一亜型である。HCL に共通する臨床症状は、腫瘍細胞の骨髄浸潤による血液異常 (HCL-c や HCL-v では汎血球減少、 HCL-jv では白血球増加) と脾臓浸潤による著明な脾腫である。HCL の標準治療はプリンアナログであるが、HCL-c では奏功が期待できるのに対し、HCL-v の一部の例や、HCL-jv では耐性を示す事が問題である。近年の網羅的ゲノム解析により、HCL-c では BRAF V600E 変異を全例に認める事、HCL-v では BRAF 変異は陰性であるが、MAP2K1 変異を一部の症例に認める事等が報告され、HCL-c や HCL-v ではプリンアナログ耐性例に対する BRAF 阻害剤や MEK 阻害剤など標的治療も開発されている。一方で、HCL-jv ではその希少性故に、BRAF 変異は陰性である事以外には遺伝学的背景に関する研究はこれまでなく、標準治療も確立していない。以上より、我が国固有の HCL-jv の遺伝学的背景の解明に基づく日本発 disease entity の再提唱と、標的治療の開発が急務である。この様な背景の中、横山は希少がんを主な対象とした全ゲノム解析 (WGS) による臨床シーケンス研究において、HCL-jv 1 例の WGS を行い、3 つの新規遺伝子変異を同定した。具体的には、i) 癌遺伝子 X (転写因子) が免疫グロブリン重鎖エンハンサー (E $\mu$ ) の近傍に位置する、大規模なゲノム構造変異 (structural variant:SV) が当該症例に起きている事(図 1)、そしてそれにより、癌遺伝子 X の過剰発現が引き起こされる可能性が考えられた事、ii) NF- $\kappa$ B 経路の抑制制御因子 Y 遺伝子の機能喪失変異により、NF- $\kappa$ B 経路の脱制御による活性化が引き起こされる変異、iii) ヒストン修飾によるエピジェネティクス制御に関わる Z 遺伝子の機能喪失変異、の 3 変異であった。i) はこれまで癌においても報告のない新規変異(SV)であり、ii)、iii) も他の成熟 B 細胞腫瘍である、びまん性大細胞型リンパ腫の一部に報告あるとする 1、2 報があるものの、HCL においてはこれまで報告のない変異であった。さらに分担者の木村は、i)、ii) の機序による癌遺伝子 X の過剰発現、NF- $\kappa$ B 経路の脱制御、が実際に当該症例において生じているかを、患者腫瘍検体を用いて、フローサイトメトリー、ウエスタンブロット法を用いて検討した。その結果、癌遺伝子 X の過剰発現と NF- $\kappa$ B 経路制御因子 Y の欠失による NF- $\kappa$ B 経路の活性化を実際に確認し得た。更に重要な事は、本症例では Y に関する標的治療薬として、NF- $\kappa$ B 経路を抑制する Bortezomib が考慮された事である。

以上の背景、目的、予備成果より、1) HCL-JV 症例を集積して WGS を行い、3 変異の遺伝学的・臨床的妥当性を検討する事、2) 3 変異の機能的意義を in vitro/in vivo で検討する事、

3) 分子標的薬候補として Bortezomib の有効性を in vivo で検討する事、を目的とした本研究を着想した。

## 2. 研究の目的

わが国固有の希少がんである、HCL-jv における全ゲノム解析情報に基づく分子病態解明と標的治療の基盤開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

### 1) WGS を用いた HCL-jv における全ゲノム情報基盤の構築

1 例の WGS による予備検討で検出し得た前述の 3 変異が、多数例の WGS 解析においても同様に、HCL-jv に特徴的な頻度の高い遺伝子変異として検出されるかを検討した

### 2) 細胞株を用いた X, Y の機能的検討

X, Y を正常 B 細胞不死化株にレンチウイルスベクターを用いて強制発現させ、機能的解析を行った。

### 3) X 異常を持つヒト HCL 細胞株の想定される薬剤 Bortezomib の薬剤効果の検討

### 4) X 異常を持つヒト HCL 細胞株の免疫抑制マウスへの xenotransplant の系の確立

### 5) X 異常を in vivo で再現する X flox マウスの作成

## 4. 研究成果

1) HCLjv, HCLv(n=17)と、欧米型である HCLc(n=14)の腫瘍検体を収集し、解析可能検体において、X, Y, Z のうち X が BRAF.p.V600E 変異を持たない HCLjv 例において約 25%の例において、構造異常(SV)を有する事。いずれも強力な Emu エンハンサーのハイジャックによる癌遺伝子 X の過剰発現が考えられる事(図 1)、Y, Z それぞれ高頻度に X の SV と共存する事を見出した。

2) 腫瘍化機序として、X の過剰発現により、リン酸化 Akt が誘導され、PI3K/Akt 経路の活性化が示唆される事、また、Y の欠損により、NFkb2 p52 active form (non-canonical NFkb)経路の活性化が誘導される事を細胞株を用いた実験で証明した(図 2)。

3) HCL 細胞株を用いた検討では、Bortezomib 投与により濃度依存性に増殖が抑制され、NFkb2 経路、Akt 経路の活性が抑制された

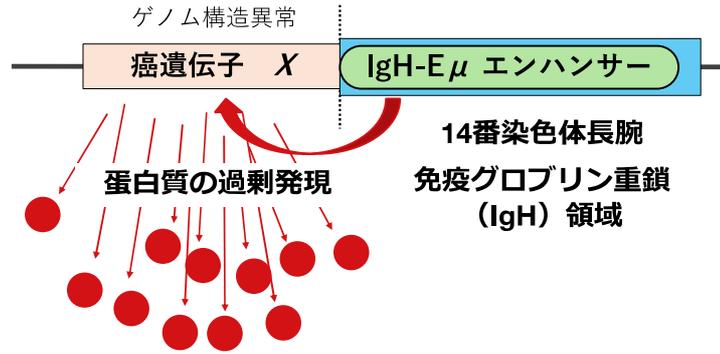
4) X 異常を持つヒト HCL 細胞株の免疫抑制マウスへの xenotransplant の系を確立した

5) X 異常を in vivo で再現する X flox マウスを作成した(図 3)。

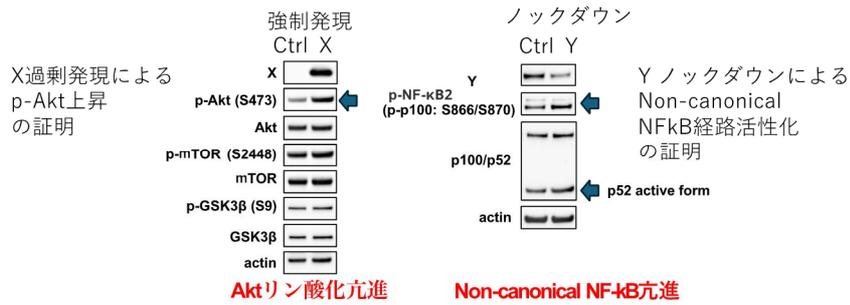
以上により、により、HCL-jv において、遺伝子変異に基づく精密診断法、新規標的治療基盤の

確立ができた。また日本発疾患概念の再提唱等の効果が期待できると考えている。

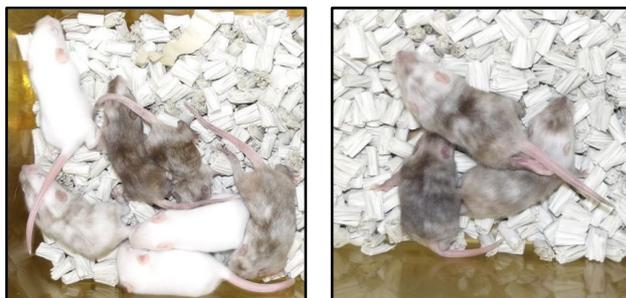
## 図1 XによるIgH Eμ エンハンサーハイジャック (仮説):



## 図2 RPMI1788細胞(正常B細胞不死化株)を用いた X-Akt経路、Y-non-canonical NF-kB経路の検証



**図3**  
**X異常を再現するX flox キメラマウスを作成した**



2024/  
3/10誕生  
3/21撮影

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hayashi Y, Kawabata KC, Tanaka Y, Uehara Y, Mabuchi Y, Murakami K, Nishiyama A, Kiryu S, Yoshioka Y, Ota Y, Sugiyama T, Mikami K, Tamura M, Fukushima T, Asada S, Takeda R, Kunisaki Y, Fukuyama T, Yokoyama K, et al.	4. 巻 39
2. 論文標題 MDS cells impair osteolineage differentiation of MSCs via extracellular vesicles to suppress normal hematopoiesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Rep	6. 最初と最後の頁 110805
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.110805.	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 該当する

1. 著者名 Abe S, Tago S, Yokoyama K, Ogawa M, Takei T, Imoto S, Fuji M.	4. 巻 15
2. 論文標題 Explainable AI for Estimating Pathogenicity of Genetic Variants Using Large-Scale Knowledge Graphs.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancers (Basel)	6. 最初と最後の頁 1118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers15041118.	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 該当する

1. 著者名 Sahara N, Yokoyama K, Matsunaga T, Kitahara S, Fujii T, Kobayashi S, Yusa N, Shimizu E, Imoto S, Tojo A, Ohno N.	4. 巻 18
2. 論文標題 Anti-inflammatory effects of ruxolitinib on chronic neutrophilic leukemia harboring CSF3R-T618I mutation with bilateral renal abscesses.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Leuk Res Rep.	6. 最初と最後の頁 100348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lrr.2022.100348. eCollection 2022.	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 Hayashi Y, Kawabata KC, Tanaka Y, Uehara Y, Mabuchi Y, Murakami K, Nishiyama A, Kiryu S, Yoshioka Y, Ota Y, Sugiyama T, Mikami K, Tamura M, Fukushima T, Asada S, Takeda R, Kunisaki Y, Fukuyama T, Yokoyama K, et al.	4. 巻 39
2. 論文標題 MDS cells impair osteolineage differentiation of MSCs via extracellular vesicles to suppress normal hematopoiesis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 110805
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.110805.	査読の有無 無
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 Takeda Reina, Yokoyama Kazuaki, Fukuyama Tomofusa, Kawamata Toyotaka, Ito Mika, Yusa Nozomi, Kasajima Rika, Shimizu Eigo, Ohno Nobuhiro, Uchimaru Kaoru, Yamaguchi Rui, Imoto Seiya, Miyano Satoru, Tojo Arinobu	4. 巻 12
2. 論文標題 Repeated Lineage Switches in an Elderly Case of Refractory B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia With MLL Gene Amplification: A Case Report and Literature Review	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 e-publishing
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2022.799982	査読の有無 無
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 Ogawa Miho, Yokoyama Kazuaki, Imoto Seiya, Tojo Arinobu	4. 巻 13
2. 論文標題 Role of Circulating Tumor DNA in Hematological Malignancy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2078 ~ 2078
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13092078	査読の有無 無
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 Suzuki Masaki, Kasajima Rika, Yokose Tomoyuki, Ito Hiroyuki, Shimizu Eigo, Hatakeyama Seira, Yokoyama Kazuaki, Yamaguchi Rui, Furukawa Yoichi, Miyano Satoru, Imoto Seiya, Yoshioka Emi, Washimi Kota, Okubo Yoichiro, Kawachi Kae, Sato Shinya, Miyagi Yohei	4. 巻 10
2. 論文標題 Comprehensive molecular analysis of genomic profiles and PD-L1 expression in lung adenocarcinoma with a high-grade fetal adenocarcinoma component	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Lung Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1292 ~ 1304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/tlcr-20-1158	査読の有無 無
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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Akira Nishimura, Kazuaki Yokoyama, Masatoshi Takagi et al.
2. 発表標題 Myeloid/Natural Killer (NK) Cell Precursor Acute Leukemia As a Novel Distinctive Leukemia Entity
3. 学会等名 第83回日本血液学会総会 プレナリー セッション
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shuhei Koide, Motohiko Oshima, Akira Nishiyama, Koichi Murakami, Yaeko-Nakajima Takagi, Naoki Itokawa, Nozomi Yusa, Kazuaki Yokoyama, Kiyoshi Yamaguchi, Yoichi Furukawa, Arinobu Tojo, Tomohiko Tamura, Atsushi Iwama.
2. 発表標題 Unraveling heterogeneity of aged hematopoietic stem cells by single-cell RNA sequence analysis
3. 学会等名 第83回日本血液学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 横山和明 清水英悟	4. 発行年 2021年
2. 出版社 厚生労働省	5. 総ページ数 -
3. 書名 令和3年度厚生労働省委託事業がんの全ゲノム解析に関する人材育成推進事業 テキスト4章	

〔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	井元 清哉 (IMOTO SEIYA) (10345027)	東京大学・医科学研究所・教授  (12601)	
研究分担者	木村 晋也 (KIMURA SHINYA) (80359794)	佐賀大学・医学部・教授  (17201)	
研究分担者	石井 敬人 (ISHII HIROTO) (90814294)	東京慈恵会医科大学・医学部・助教  (32651)	

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
---------	---------