

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461432

研究課題名(和文) 血液腫瘍におけるPVT1再構成と相手遺伝子の分子細胞遺伝学的解析ならびに臨床応用

研究課題名(英文) Molecular-cytogenetic studies of PVT1 rearrangements in hematological malignancies

研究代表者

谷脇 雅史 (Taniwaki, Masafumi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80163640

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)：8q24増幅をAMLとHL60で認め、NSMCE2再構成によるPVT1-NSMCE2とBF104016/CCDC26-NSMCE2を同定した。前者は、マーカー染色体を有するAMLで認め、PVT1エクソン1aとNSMCE2エクソン3が融合し、後者はHL60で認め、BF104016エクソン1とNSMCE2エクソン6が融合していた。BF104016はCCDC26の新規スプライスバリエーションと考えられた。PVT1、CCDC26、NSMCE2は全て8q24に存在する遺伝子であり、増幅にともなうキメラ遺伝子の形成機構としてクロモソリプシスが考えられた。

研究成果の概要(英文)：Specific chromosomal translocations in hematological malignancies are a clue of identifying rearranged gene at the region of breakpoints. To gain insight into the role(s) of dmns, we cytogenetically and molecularly analyzed 8q24 amplicons in acute myelogenous leukemia (AML) patient-derived leukemic cells and AML-derived cell line (HL60), identifying fusion transcripts between PVT1 exon 1a and NSMCE2 exon 3 in the patient, and a fusion gene between exon 6 of NSMCE2 and exon 1 of BF104016, a noncoding RNA sharing the sequence of CCDC26 exon 4. These novel chimeric RNAs, PVT1-NSMCE2 and CCDC26-NSMCE2, were identified in association with dmns showing 8q24 amplicons. Chromothripsis is a possible cytogenetic mechanism of generating these novel chimeric genes. PVT1 and CCDC26 are long intergenic non-coding RNAs (lincRNAs). Our study suggests that the fusion genes involving lincRNAs potentially plays as-yet-unknown oncogenic functional roles.

研究分野：血液内科学

キーワード：PVT1遺伝子 キメラmRNA 遺伝子増幅 骨髄性白血病 NSMCE2 クロモソリプシス

1. 研究開始当初の背景

血液腫瘍における 8q24 染色体異常は予後不良因子であり、*MYC* の過剰発現に関連し治療抵抗性の指標とされる。非ホジキンリンパ腫 (NHL) や多発性骨髄腫 (MM) だけでなく、急性骨髄性白血病 (AML) でも予後不良とする報告があり、血液腫瘍の発生や進展に共通した分子機構が考えられる。

しかし、8q24 染色体異常による血液腫瘍発生の初期変化と進展における分子メカニズムには不明な点が多い。実際、*MYC* の約 54Kb 下流に存在する非コード遺伝子である *PVT1* の再構成が骨髄腫の約 20% に認められ、*PVT1* 内には 5 個のマイクロ RNA 遺伝子が同定されていることから、研究が新たに展開している。また、AML では、5q-、7q- などを含む複雑な染色体異常を示す症例に *MYC* と *PVT1* の増幅が知られている (Ruecker F et al., J Clin Oncol 2006)。さらに、固形がんでは、乳がんや卵巣がんが *PVT1* の増幅が造腫瘍性に關与しており、siRNA の細胞導入によって増殖が抑制されることが報告されている (Guan Y et al. Clin Cancer Res 2007)。私共は、MM の腫瘍化に關与する遺伝子同定の研究から、MM の 8q24 染色体異常を 22.2% に検出し、8q24 異常の 58% では *PVT1* に切断点があり転座再構成を認めた (Nagoshi H et al., Cancer Res 2012)。転座相手遺伝子の解析から *PVT1-NBEA* と *PVT1-WWOX* のキメラ mRNA を検出し、MM の腫瘍化への關与を報告した (Nagoshi H et al., Cancer Res 2012)。

一方、血液腫瘍の治療成績は、リタキシマブ、イマチニブ、ボルテゾミブ、レナリドマイドなどの新薬が開発されてから着実に向上している。しかし、これらの分子標的薬には、特有の毒性がありときに重症化する。従って、分子標的薬の選択するた

めの指標の同定は急務である。加えて、自家造血幹細胞移植を併用した高用量化学療法への適応を決定する今日的な指標を明らかにすることも非常に重要である。

本研究は、8q24 染色体異常とその結果生じる *PVT1* 再構成を解析し、血液腫瘍における造腫瘍性の分子メカニズムを解明する。さらに、同定された遺伝子異常を層別化治療に寄与する分子遺伝学的な指標を同定することを目的として、以下の点を明らかにする。

2. 研究の目的

血液腫瘍における 8q24 染色体異常と *PVT1* 遺伝子の再構成を分子細胞遺伝学的に解析し、腫瘍化の分子機構を解明し、予後推定や治療選択に応用する。そのために、以下の点について研究する。

血液腫瘍で認められる 8q24 染色体異常の切断点を分子細胞遺伝学的に解析する。

PVT1 再構成を解析し切断点とキメラ mRNA を形成する相手遺伝子を同定する。

PVT1 キメラ mRNA を認める細胞株を用いてその機能を siRNA 導入により解析する。

3. 研究の方法

8q24 染色体異常の同定と切断点の解析: G 染色法で腫瘍細胞の核型を決定し 8q24 異常を同定する。8q24 異常の切断点は FISH でマッピングする。転座相手は SKY で同定する。

PVT1 遺伝子再構成と相手遺伝子の同定: 8q24 の切断点が *PVT1* にある場合には、SKY と高密度オリゴヌクレオチドアレイの結果を比較して相手遺伝子の切断点を同定する。RT-PCR の増幅産物の塩基配列を決定し、切断点領域の遺伝子再構成を解析する。また、不明の相

手遺伝子は cNDA bubble PCR で単離同定する。

PVT1 キメラ mRNA の機能解析：
PVT1 キメラ mRNA の増殖への関与について細胞株を用いて siRNA で検討する。

4. 研究成果

8q24 染色体増幅を示す難治性骨髄性白血病における新規ゲノム異常を解析した。マーカー染色体を有する急性骨髄性白血病 (AML) の 1 例, AML 39 例, 骨髄異形成症候群 (MDS) 1 例, 白血病細胞株 HL60, KG1, K562 を対象とした。HL60 は二重微小染色体 (dmits) を有する。方法は, 染色体分染法, spectral karyotyping (SKY), fluorescence in situ hybridization, オリゴヌクレオチドアレイ, RT-PCR, RQ-PCR, bubble PCR, 塩基配列決定法を用いた。8q24 染色体増幅を難治性 AML と HL60 で認め, NSMCE2 再構成による 2 種類のキメラ mRNA, PVT1-NSMCE2 と BF104016/CCDC26-NSMCE2 を同定した。前者は, マーカー染色体を有する AML で認められたものであり, PVT1 エクソン 1a と NSMCE2 エクソン 3 が融合していた。後者は HL60 で認められたものであり, BF104016 エクソン 1 と NSMCE2 エクソン 6 が融合していた。BF104016 は CCDC26 のエクソン 4 の一部をエクソン 1 としており, CCDC26 の新規プライスバリエーションと考えられた。これら 2 種類のキメラ mRNA を RT-PCR によりスクリーニングし, AML 1 例と K562 で PVT1-NSMCE2 を検出し, BF104016-NSMCE2 は検出されなかった。これらの異常 NSMCE2 キメラ mRNA の発現を RQ-PCR で定量的に検出できた。PVT1 と CCDC26 は何れも非翻訳遺伝子 long intergenic non-coding RNA (linc RNA) であり, NSMCE2 は細胞核内における遺

伝子の発現制御や活性化に関する翻訳遺伝子である。非翻訳遺伝子と翻訳遺伝子で形成されるこれらのキメラ mRNA の未知の重要な機能が示唆される。また, PVT1, CCDC26, NSMCE2 は全て 8q24 に存在する遺伝子であり, 増幅にともなうキメラ遺伝子の形成機構として chromothripsis (クロモスリプシス) が考えられた。

NSMCE2 蛋白質発現の結果は以下のとおりである。HL60 のウエスタンブロット解析では, NSMCE2 蛋白質発現が正常骨髄より若干亢進していたが, KG1 と比較して発現増強は認められなかった。免疫組織化学では, NSMCE2 蛋白質発現は単球と巨核球の細胞質で強陽性であり, AML 症例では正常骨髄に比較して発現亢進は認められなかった。

以上の結果は, 白血病発生に関与する新しい分子機構を解明する手がかりとなり得ると考えられる。

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 7 件)

1. Yasuda T, Tsuzuki S, Kawazu M, Hayakawa F, Kojima S, Ueno T, Imoto N, Kohsaka S, Kunita A, Doi K, Sakura T, Yujiri T, Kondo E, Fujimaki K, Ueda Y, Aoyama Y, Ohtake S, Takita J, Sai E, Taniwaki M, Kurokawa M, Morishita S, Fukayama M, Kiyoi H, Miyazaki Y, Naoe T, Mano H. Recurrent DUX4 fusions in B cell acute lymphoblastic leukemia of adolescents and young adults. Nat Genet. 2016 Mar 28. doi: 10.1038/ng.3535. [Epub ahead of print] (査読あり).
2. Yokokawa Y, Taki T, Chinen Y, Kobayashi S, Nagoshi H, Akiyama M, 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*. 2015 Jul;54(7):409-17 (査読あり) .

3. Mizutani S, Yoshida T, Zhao X, Nimer SD, Taniwaki M, Okuda T. Loss of RUNX1/AML1 arginine-methylation impairs peripheral T cell homeostasis. *Br J Haematol*. 2015 Sep;170(6):859-73. doi: 10.1111/bjh.13499. Epub 2015 May 26 (査読あり) .

4. Chinen Y, Sakamoto N, Nagoshi H, Taki T, Maegawa S, Tatekawa S, Tsukamoto T, Mizutani S, Shimura Y, Yamamoto-Sugitani M, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Kuroda J, Taniwaki M. 8q24 amplified segments involve novel fusion genes between NSMCE2 and long noncoding RNAs in acute myelogenous leukemia. *J Hematol Oncol*. 2014 Sep 23;7:68. doi: 10.1186/s13045-014-0068-2 (査読あり) .

5. Kuroda J, Kodama A, Chinen Y, Shimura Y, Mizutani S, Nagoshi H, Kobayashi T, Matsumoto Y, Nakaya Y, Tamura A, Kobayashi Y, Naito H, Taniwaki M. NS-018, a selective JAK2 inhibitor, preferentially inhibits CFU-GM colony formation by bone marrow mononuclear cells from high-risk myelodysplastic syndrome patients. *Leuk Res*. 2014 May;38(5):619-24. doi:10.1016/j.leukres.2014.03.001. Epub 2014 Mar 11 (査読あり) .

6. Kobayashi S, Taki T, Nagoshi H, Chinen Y, Yokokawa Y, Kanegane H, Matsumoto Y, Kuroda J, Horiike S, Nishida K, Taniwaki M. Identification of novel fusion genes with 28S ribosomal DNA in hematologic malignancies. *Int J Oncol*. 2014 Apr;44(4):1193-8. doi: 10.3892/ijo.2014.2291. Epub 2014 Feb 5 (査読あり) .

7. Chinen Y, Taki T, Tsutsumi Y, Kobayashi S, Matsumoto Y, Sakamoto N, Kuroda J, Horiike S, Nishida K, Ohno H, Uike N, Taniwaki M. The leucine twenty homeobox (LEUTX) gene, which lacks a histone acetyltransferase domain, is fused to KAT6A in therapy-related acute myeloid leukemia with t(8;19)(p11;q13). *Genes Chromosomes Cancer*. 2014 Apr;53(4):299-308. doi: 10.1002/gcc.22140. Epub 2014 Jan 21 (査読あり) .

{ 学会発表 }(計 5 件)

1. Chinen Y, Sakamoto N, Nagoshi H, Taki T, Kobayashi S, Nishida K, Maegawa S, Kiyota M, Mizutani S, Shimura Y, Yamamoto-Sugitani M, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Kuroda J, Taniwaki M. PVT1-NSMCE2 fusion gene enhances BCL-X expression and drug resistance in leukemia cells. 第 76 回日本血液学会学術集会 . 2014 年 10 月 31 日 .大阪国際会議場(大阪府・大阪) .

2. Chinen Y, Sakamoto N, Nagoshi H, Taki T, Kobayashi T, Nishida K, Maegawa S, Kiyota M, Mizutani S, Shimura Y, Yamamoto-Sugitani M, Matsumoto Y, Horiike S, Kuroda J,

Taniwaki M. Novel fusion genes, PVT1-NSMCE2 and CCDC26-NSMCE2 in acute myeloid leukemia harboring 8q24 amplicons. The 5th JSH International Symposium 2014. 2014年5月24日. アクトシティ浜松 コンgressセンター (Shizuoka Pref.・Hamamatsu).

3. Chinen Y, Sakamoto N, Nagoshi H, Taki T, Kobayashi S, Nishida K, Maegawa S, Nakayama R, Kiyota M, Mizutani S, Shimura Y, Yamamoto-Sugitani M, Kobayashi T, Matsumoto Y, Yokota S, Kuroda J, Horiike S, Taniwaki M. Novel fusion transcripts PVT1-NSMCE2 and BF104016-NSMCE2 resulting in depletion of NSMCE2 protein in acute myeloid leukemia harboring 8q24 amplicons. 55th ASH Annual Meeting. 2013年12月7~10日. Ernest N. Morial Convention Center (New Orleans, LA, USA).

4. Chinen Y, Sakamoto N, Nagoshi H, Taki T, Kobayahsi S, Nishida K, Nakayama R, Mizutani S, Shimura Y, Kiyota M, Sugitani M, Kobayashi T, Matsumoto Y, Kuroda J, Horiike S, Taniwaki M. Identification of novel fusion of NSMCE2 in acute myeloid leukemia harboring 8q24 amplification. 第75回日本血液学会学術集会. 2013年10月11~13日. ロイトン札幌・さっぽろ芸文館・札幌市教育文化会館(北海道・札幌).

5. Sakamoto N, Chinen Y, Nagoshi H, Taki T, Kobayashi S, Nishida K, Sugitani M, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Taniwaki M. Identification of novel

fusion transcripts involving NSMCE2 in acute myeloid leukemia harboring 8q24 amplification. 第72回日本癌学会学術総会. 2013年10月3~5日. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜).

〔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

谷脇 雅史 (Taniwaki, Masafumi)
京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：80163640

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：