

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：13501
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2014～2015
課題番号：26860788
研究課題名(和文) 家族性血小板減少症を背景に発症したT細胞性急性リンパ性白血病患者の全ゲノム解析

研究課題名(英文) Whole genome sequencing of the T-cell acute lymphoblastic leukemia derived from familial platelet disorders

研究代表者
渡邊 敦 (WATANABE, Atsushi)
山梨大学・総合研究部・診療助教

研究者番号：30610498
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：家族性血小板減少症(以下FPD)と濃厚な白血病の家族歴を有し、11歳でT細胞性急性リンパ性白血病を発症した症例において、次世代シーケンサーを用いた全エクソンシーケンス解析を行った。FPDと白血病の背景因子となった可能性がある遺伝子変異として、SNPが785遺伝子、indelが15遺伝子に認められた。既報のFPDの原因遺伝子であるRUNX1遺伝子の直接的な異常は同定されなかったものの、過剰発現により同遺伝子を抑制すると報告されているSETBP1遺伝子にはindelが1個、SNPが2個認められた。白血病発症に直接的に関与する遺伝子変異としてSNPが150遺伝子、indelが14遺伝子に認められた。

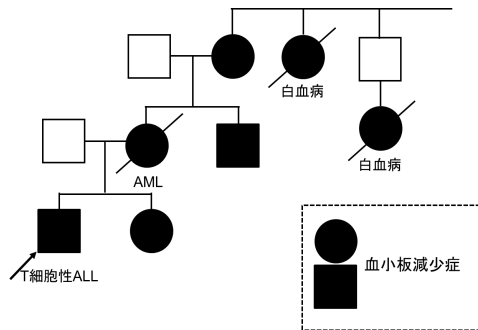
研究成果の概要(英文)：We performed whole genome sequencing of the patient of T-cell acute lymphoblastic leukemia derived from familial platelet disorder. Comparing he and his sister having thrombocytopenia without leukemia with his healthy father, 785 genes with SNPs and 15 genes with indels were found. There was no RUNX1 mutation, known as the cause of familial platelet disorder which develops to leukemia, but SETBP1, whose over-expression mutation was reported to suppress RUNX1 function, had an indel and two SNPs. Moreover, comparing his normal lymphocytes and his leukemic cells, 150 genes with SNPs and 14 genes with indels were found. These mutations might have relation to leukemogenesis. Especially, MTCH2 gene coding mitochondrial transport protein which is important for apoptosis had the aggregation of mutations. These genetical findings might be new insights to understand leukemogenesis and familial platelet disorder.

研究分野：小児血液腫瘍

キーワード：次世代シーケンサー 家族性血小板減少症 T細胞型急性リンパ性白血病

1. 研究開始当初の背景

小児の急性リンパ性白血病 (acute lymphoblastic leukemia) においては近年、多くの遺伝子異常が報告されており、分子細胞生物学的な発症メカニズムや、その予後因子としての意義の理解はめざましい進歩を遂げている。その一方で、遺伝的な背景、すなわち家系内の集積性を持って発症する急性リンパ性白血病症例は極めて稀である。今回、血小板減少症と濃厚な白血病の家族歴 (本人、妹、母親、母方叔父、母方祖母、母方祖母の同胞、母方祖母の同胞の娘が血小板減少症を呈しており、そのうち母親が急性骨髄性白血病、母方祖母の同胞、および、母方祖母の同胞の娘が何らかの白血病) を有し、11歳でT細胞性急性リンパ性白血病を発症した症例を経験した。(下記の家系図参照)



家族性の血小板減少症自体も非常に珍しい疾患であり、代表的なタイプとして造血に必須の転写調整因子である *RUNX1* 遺伝子に変異が確認された家族性血小板異常症 (Familial Platelet Disorder; 家族性血小板減少症) が、世界で 30 家系ほど報告されている。

しかし、家族性血小板減少症家系では一般的に壮年期以降に急性骨髄性白血病として白血病を発症しており¹⁾²⁾、今回のような T 細胞性急性リンパ性白血病を発症した報告は成人例での 1 例があるのみ³⁾である。したがって、本家系においては従来とは異なる *RUNX1* 遺伝子変異や *RUNX1* 遺伝子以外の遺伝子変異、ないし *RUNX1* 遺伝子に加えて何らかの付加的な遺伝的背景が存在する可能性が考えられる。

今回の症例では、従来の家族性血小板減少症症例が壮年期以降に急性骨髄性白血病を発症するのは異なり、小児期に T 細胞性急性リンパ性白血病を発症していることから、本症例の詳細な解析によって血小板減少に関連する遺伝的な素因を同定できる可能性がある。

さらに、近年になって多数同定されている小児急性リンパ性白血病における遺伝子異常がどのような段階を経て白血病の発症に寄与しているのかはいまだ不明な点も多い。

そこで患児の白血病細胞において獲得された遺伝子変異を同定すれば、小児の急性リンパ性白血病の発症過程を理解する手がかりが得られるものと期待される。

2. 研究の目的

本症例および本家系で、次世代シーケンサーを用いて全エクソンシーケンス解析を行うことで、家族性血小板減少症と T 細胞性急性リンパ性白血病の背景因子となった遺伝子変異の同定を試みる。

また、同定された遺伝子変異の急性リンパ性白血病全般における頻度と予後への影響を含めた臨床的意義を明らかにする。さらに、同定された遺伝子変異の生化学的・細胞生物学的な解析を行うとともに、患児の体細胞から樹立した iPS 細胞を用いて造血能を解析し、同疾患の病態生理を明らかにして小児白血病の発症機序の解明に貢献することを目指す。

3. 研究の方法

すでに母親は急性骨髄性白血病のため死亡しているため、患児および同胞と父親の体細胞において、次世代シーケンサーによって全エクソンシーケンスを行い、公共データベースと照合して遺伝子変異部位を特定する。また、患児の白血病細胞を同様に解析して、体細胞および公共データベースと比較照合することによって、白血病の発症に寄与した遺伝子変異部位を特定する。こうして同定された候補遺伝子については、遺伝的素因のない通常の白血病症例においても遺伝子異常の有無を検討して、予後への影響も含めた臨床的意義を明らかにする。

(1) 次世代シーケンサーによるシーケンス解析

DNA サンプルを Agilent SureSelect Human All Exon Kits v4 を使用してサンプル調製後、Illumina GA x で Paired End 76 bp シーケンスを行った。BWA で hg19 ゲノムにマッピングした後に、cutadapt で配列をトリミング、samtools、GATK を用いて SNP・Indel コールを行った。SNP、indel へのアノテーションは SnpEff を用いた。

(2) データ解析

患者本人の正常リンパ球および、おなじく家族性血小板減少症を有していながら白血病を発症していない妹のリンパ球と、健全な父親由来リンパ球とのシーケンス結果を比較し、本人及び妹に存在し父親に存在しない遺伝子変異を検索し、家族性血小板減少症に関連する候補遺伝子を抽出した。

患者本人の正常リンパ球と白血病細胞のシーケンス結果を比較し、白血化に関与したと考えられる候補遺伝子を抽出した。

これまでに報告されている家族性血小板減少症関連遺伝子の変異が、患児由来正常リンパ球および妹由来リンパ球のシーケンス結果に共通して存在するか検索した。

さらに、患児の体細胞から iPS 細胞を樹立し、iPS 細胞を invitro で造血組織へと分化させて、造血細胞の増殖や分化を解析し、健康人から樹立された iPS 細胞および RUNX1 遺伝子の変異が確認されている家族性血小板減少症家系から樹立された iPS 細胞と比較検討する。

なお、今回の症例と母親は、同種造血幹細胞移植において生着不全を来している。特に、今回の症例では、非血縁間臍帯血移植において従来の経静脈的な幹細胞輸注に比べてより高い生着が期待できるとされる骨髓内への幹細胞直接輸注を併用して移植したにもかかわらず拒絶された。すなわち、本家系では単に造血組織系の異常にとどまらず、骨髓環境に寄与するストローマ細胞や骨芽細胞においても造血を維持する上で何らかの欠陥がある可能性も示唆される。そこで、iPS 細胞からストローマ細胞も誘導して、その機能評価を試みる。

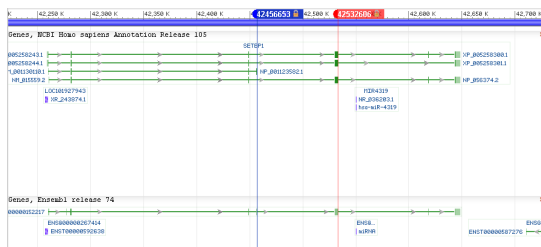
4. 研究成果

(1) 家族性血小板減少症に関わる遺伝子異常

785 遺伝子にのべ 1037 個の SNP が、15 遺伝子にのべ 18 個の indel が認められた。

このうち SETBP1 遺伝子には indel として 42456670 C CTCTT が、SNP として rs663651 A222T rs3744825 V1101I が認められた。いずれも、ヘテロの変異であった。

次の図は hg19 ゲノム上の SETBP1 遺伝子において、本症例および妹のリンパ球に存在し、父親には存在しない変異を記載したものである。



SETBP1 遺伝子の生殖細胞における変異は Schinzel-Giedion 症候群の原因であり、この

症候群において神経上皮性腫瘍をはじめ悪性腫瘍の合併が報告されている。

Makishima らは、SETBP1 遺伝子変異は直接的に家族性血小板減少症の原因疾患とされていないが、SETBP1 遺伝子が過剰発現すると、RUNX1 遺伝子の機能が低下すると報告している⁴⁾。この SETBP1 の機能低下に関連した特異的な変異点として Asp868, Ser869, Gly870, Ile871, Asp880 が挙げられているが、いずれも今回の症例からは同定されなかった。

(2) 白血化に関わる遺伝子異常

150 遺伝子にのべ 196 個の SNP が、14 遺伝子にのべ 19 個の indel が認められた。このうちアポトーシスに重要な役割を果たすミトコンドリア輸送蛋白をコードしている

MTCH2 遺伝子には、Indel として

47640434 T TTGTC

47640466 A AT が、

SNP として

rs77581661 R287Q

rs186601647 V24M

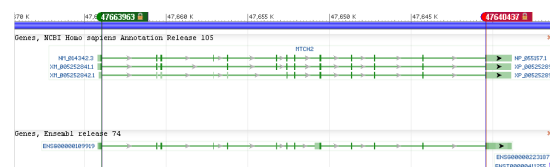
rs200816454 Y23H

rs201627714 P20R

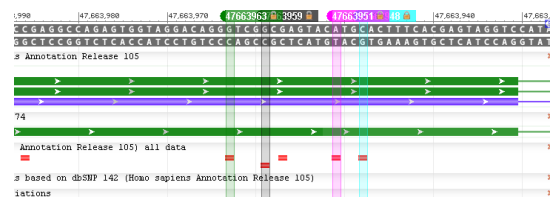
rs76185606 Q19*

が認められ、Exon1 に 4 個の SNP、Exon13 には 2 個の indel と 1 個の SNP が集積していた。特に rs76185606 は Q19* 変異により stop codon となっていた。

次の図は、hg19 ゲノム上の SETBP1 遺伝子において、本症例の白血病細胞に存在し、正常リンパ球に存在しない変異を記載したものである。



特に MTCH2 遺伝子の exon1 には 4 つの SNP が集積していた。



さらに exon13 には 1 つの SNP と 1 つの indel が存在した。これらの変異により exon13 は stop codon を獲得し、機能が低下することが示唆された。



MTCH1 はミトコンドリアに存在し、アポトーシス経路である tBID をリクルートすることで Bax/Bak を活性化する。そのため、今回同定された *MTCH1* 遺伝子の変異によってアポトーシス経路が破綻し、腫瘍化が引き起こされる可能性がある。

(3) 既知の家族性血小板減少症に関する候補遺伝子

代表的な家族性血小板減少症の原因遺伝子である *RUNX1* 遺伝子に加えて、

*ANKRD26*⁵⁾

*NR4A3*⁶⁾

*CBL*⁷⁾

*MYH10*⁸⁾

*CDC25c*⁹⁾

などの家族性血小板減少症との関連が報告されている遺伝子群について、患児由来リンパ球および妹由来リンパ球のシーケンズ結果を検索した。その結果、いずれの遺伝子も両者に共通した変異を同定することはできなかった。すなわち、今回同定した遺伝子変異には、既知の家族性血小板減少症に関する遺伝子変異とは異なる新規の変異が含まれている可能性がある。

なお、造血幹細胞移植の際に患児がヘモクロマトーシスを呈し、フォローアップ中に糖尿病性ケトアシドーシスを発症した経緯から、既知のヘモクロマトーシスと関連する遺伝子である *HFE*, *TFR2*, *SLC40A1*, *HJV*, *HFE2*, *HAMP* の変異についても検索した。いずれの遺伝子も SNP 変異は同定されなかった。Indel に関して、*SLC40A1* 遺伝子は患児のみ rs67682938 を有していた。さらに患児の rs5837154 のみ hetero であり、妹と父親は homo であった。ただし、輸血や移植を行っているのは患児本人のみであり、homo の変異を有する父親や妹がさらにヘモクロマトーシスとなりやすいかどうかは今回の解析では判別できない。

今回の解析では次世代シーケンサーの結果から家族性血小板減少症の確定的な候補遺伝子を同定するには至らなかった。この理由として、次世代シーケンサーによって得られたデータの解釈や候補遺伝子の抽出に極めて難渋したことが挙げられる。そのため、細胞株および iPS 細胞を用いた機能的な解析については実施していない。

しかしながら、代表的な家族性血小板減少症の原因遺伝子である *RUNX1* 遺伝子および既知の遺伝子変異も兄妹に共通して同定されたものは存在せず、このことは同疾患に未知の経路が関与している可能性を示唆する知見であった。したがって、本家系においては直接的な *RUNX1* 遺伝子変異を認めないものの、*SETBP1* 遺伝子などの候補遺伝子を介した家

族性血小板減少症が起こっているものと考えられ、同疾患の病態生理がさらに解明される緒を得たと考えられる。

<参考文献>

1) Song WJ, et al. Haploinsufficiency of *CBFA2* causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet.* 23:166-75, 1999.

2) Michaud J, et al. In vitro analyses of known and novel *RUNX1/AML1* mutations in dominant familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia: implications for mechanisms of pathogenesis. *Blood.* 99:1364-72, 2002.

3) Nishimoto N, et al. T cell acute lymphoblastic leukemia arising from familial platelet disorder. *Int J Hematol.* 92:194-7, 2010.

4) Makishima H, et al. Somatic *SETBP1* mutations in myeloid malignancies. *Nat Genet.* 2013 Aug;45(8):942-6.

5) Norris P, et al. *ANKRD26*-related thrombocytopenia and myeloid malignancies. *Blood.* 2013 Sep 12;122(11):1987-9.

6) Bleuteau D, et al. Down-regulation of the *RUNX1*-target gene *NR4A3* contributes to hematopoiesis deregulation in familial platelet disorder/acute myelogenous leukemia. *Blood.* 2011 Dec 8;118(24):6310-20.

7) Shiba N, et al. *CBL* mutation in chronic myelomonocytic leukemia secondary to familial platelet disorder with propensity to develop acute myeloid leukemia (FPD/AML). *Blood.* 2012 Mar 15;119(11):2612-4.

8) Bleuteau D, et al. Dysmegakaryopoiesis of FPD/AML pedigrees with constitutional *RUNX1* mutations is linked to myosin II deregulated expression. *Blood.* 2012 Sep 27;120(13):2708-18.

9) Yoshimi A, et al. Recurrent *CDC25C* mutations drive malignant transformation in FPD/AML. *Nat Commun.* 2014 Aug 27;5:4770.

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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
特に無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 敦 (WATANABE, Atsushi)
山梨大学・総合研究部・診療助教
研究者番号：30610498