

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution
- 研究開発課題名： (日本語) 成人B細胞性急性リンパ性白血病における融合遺伝子の情報に基づく分子生物学的な理解と新しい治療戦略の考案
(英語) Molecular and biological understanding of B-cell acute lymphoblastic leukemia based on fusion genes and developing a new treatment strategy
- 研究開発担当者 (日本語) 独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター 生体情報解析室 室長 安田 貴彦
- 所属 役職 氏名： (英語) Division of Biological Information Analysis, Clinical Research Center, National Hospital Organization, Nagoya Medical Center
- 実施期間： 平成28年9月1日 ～ 平成29年3月31日
- 分担研究 (日本語) 網羅的融合遺伝子解析による融合遺伝子の同定
開発課題名： (英語) Identification of fusion genes by comprehensive fusion gene analysis
- 研究開発分担者 (日本語) 独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター 生体情報解析室 室長 安田 貴彦
- 所属 役職 氏名： (英語) Division of Biological Information Analysis, Clinical Research Center, National Hospital Organization, Nagoya Medical Center
- 分担研究 (日本語) 臨床データと検体の管理・遺伝子解析計画の倫理承認取得・融合遺伝子による白血病発症機構の解明
開発課題名： (英語) Storage and analysis of clinical data, preservation of samples, and investigation of mechanisms of leukemia development by fusion genes.

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人名古屋大学医学部附属病院血液内科 講師 早川文彦
所属 役職 氏名 : (英語) Fumihiko Hayakawa, Senior lecturer, Department of Hematology,
Nagoya University Hospital

分担研究 (日本語) バイオインフォマティクスによる網羅的融合遺伝子解析
開発課題名 : (英語) Comprehensive analysis of fusion transcript through bioinformatics

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京大学大学院医学系研究科ゲノム医学講座・
特任講師・河津正人
所属 役職 氏名 : (英語) Graduate School of Medicine, Department of Cellular Signaling,
Project Lecturer, Masahito Kawazu

分担研究 (日本語) マウスモデルを用いた新規融合遺伝子の機能解析
開発課題名 : (英語) Functional analysis of novel fusion genes by means of mouse models
of leukemia.

研究開発分担者 (日本語) 学校法人愛知医科大学 医学部 生化学講座 教授 都築 忍
所属 役職 氏名 : (英語) Shinobu Tsuzuki, Designated Professor, Department of
Biochemistry, Aichi Medical University, School of Medicine

II. 成果の概要（総括研究報告）

急性リンパ性白血病（Acute Lymphoblastic Leukemia: ALL）は種々のゲノム異常の蓄積で発症するが、その中でも融合遺伝子は生物学的特性を顕著に特徴づけるものである。また、融合遺伝子は年齢ごとに ALL で見つかる種類、頻度とも大きく異なることが知られており、一定の年代で区切られた情報を得ることは ALL の治療を考える上で非常に重要である。特に、成人は小児領域に比べて、ALL の治療成績は極めて不良であり、融合遺伝子の情報に基づく新しい治療戦略を考案していくことは、社会的にも要望が強いと思われる。

次世代がん研究シーズ戦略的育成プログラム（2016 年 3 月 31 日終了）では、Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) で収集された ALL202-U 研究の残余検体（15-24 歳）を用いて、RNA シーケンスを用いた網羅的融合遺伝子解析が行われた。本研究では、その研究を継続・発展させるため、新たに ALL202-O 研究の残余検体（25-64 歳）を用いて網羅的融合遺伝子解析を行うことを計画した。

分担研究者早川を中心に、ALL202-O 研究の RNA を用いた網羅的遺伝子解析のプロトコール（ALL202O-EWS 研究）が立案された。研究代表施設と参加施設の倫理申請が行われ、最終的に 67 施設 226 検体(89%)分が倫理委員会の承認を得て解析可能となった。

本年度は、これらのうち、B 細胞性 ALL 72 検体の解析を開始した。研究代表施設の次世代シーケンサー HiSeq2500 を用いてシーケンス解析を行い、得られた生リードは、分担研究者河津に送付後 バイオインフォマティクス解析が行われた。融合遺伝子解析と発現解析が行われ、その結果は研究代表者に返却された。得られた結果の解釈を行い、新規・既知を含め融合遺伝子の探索を行った。融合遺伝子解析の偽陽性を減らすため、適切に設定したフィルターを用いることにより、融合遺伝子の特異性を高め、最終的には RT-PCR 法で融合遺伝子の同定を行った。47 症例（65%）に ALL 発症と関係のある（可能性が高い）融合遺伝子を同定することに成功した。

本研究と先に行われた ALL202-U 解析の結果と合算することにより、15 歳から 64 歳までの幅広い年齢の融合遺伝子が明らかとされた。先述のように、年齢と融合遺伝子の関係は、一つの重要な課題であるため、高頻度の融合遺伝子に関しては、融合遺伝子の種類・頻度と年齢の関係を統合的に解析する。また、臨床上、治療・層別化の観点から臨床上重要な集団である Ph-like ALL はクラスタリング解析により 2017 年度に同定を行う。

同定された新規融合遺伝子ならびに意義の高い融合遺伝子に関しては、その機能を明らかにするため、機能解析を行う。分担研究者都築により、B 細胞性 ALL の機能解析には、多分化能を有する未分化細胞ではなく、B 細胞にコミットした段階で融合遺伝子を発現させることが最適なアッセイ法であることが明らかにされた。今後この系を用いて融合遺伝子の機能解析を行っていく。

Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) occurs as a result of accumulation of genome mutations, and fusion genes are a hallmark of this disease. Types and frequencies of fusion genes found in ALL are reported to differ significantly according to age. Thus, fusion gene information divided by age is important to understand biological characterization of ALL. Considering that treatment outcome in adult patients with ALL is especially inferior compared to childhood, there would be a social demand for new treatment strategies based on fusion gene analysis.

We previously performed RNA-seq using samples from ALL patients (15-24 age) enrolled in Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) ALL202-U study and fusion genes were analyzed

comprehensively in the Project for Development of Innovative Research on Cancer Therapeutics (P-DIRECT). To continue and develop this study, we further plan to analyze fusion gene in ALL patients (25-64 age) enrolled in JALSG 202-O cohort.

ALL202O-EWS study was established by Dr. Hayakawa to analyze fusion genes comprehensively in ALL patients enrolled in ALL202-O study using RNA-seq. This plan received ethical committee approval by representative and participating institute. Totally, 226 samples from 67 institute were approved by ethical committee.

In this year, we performed RNA-seq for 72 B-ALL samples. Sequence raw data was send to Dr. Kawazu and he performed fusion gene and gene expression analysis. To remove false-positive data in fusion gene analysis, we used some appropriate filters and could obtain more specific calls of fusion gene candidate. As a result, we could identify functionally relevant fusion genes in 47 (65%) ALL patients.

Combined with the results of ALL202-U analysis, we clearly and comprehensively clarified fusion genes in 15-64 aged ALL patients. Through these data, we analyzed relationship between age and common fusion gene. We will further identify Ph-like ALL patients by clustering analysis, who are possible to receive either targeted therapy or stratified treatment.

We further perform functional analysis for novel and clinically relevant fusion gene *in vivo*. Dr. Tsuzuki established more effective mouse pro-B cell transplantation assays in which fusion genes were retrovirally transduced in pro-B cells, not stem cells. We will analyze fusion genes functionally through this system.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 5 件、国際誌 1 件）

1. 安田貴彦. AYA 世代 ALL のゲノム異常. 腫瘍内科. 2016, 18, 635-41
2. 早川文彦 改訂造血器腫瘍 WHO 分類 2016~概要と意義～ 急性リンパ性白血病 血液フロンティア 2017, 27, 387-391
3. 早川文彦 染色体転座・遺伝子再構成による白血病発症機序 日本臨床 2016, 74, 222-226
4. 早川文彦 白血病における遺伝子ゲノム研究の動向 急性リンパ性白血病 日本臨床 2016, 74, 446-450
5. 早川文彦 村田誠 急性リンパ性白血病におけるゲノム解析と免疫療法 血液内科 2016, 73, 592-597
6. Morishita T, Hayakawa F, Sugimoto K, Iwase M, Yamamoto H, Hirano D, Kojima Y, Imoto N, Naoe T, Kiyoi H. The photosensitizer verteporfin has light-independent anti-leukemic activity for Ph-positive acute lymphoblastic leukemia and synergistically works with dasatinib. Oncotarget. 2016, 7, 56241-56252.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 思春期・若年成人急性リンパ性白血病における新規融合型がん遺伝子 DUX4-IGH の発見、口頭、安田 貴彦、都築 忍、河津 正人、早川 文彦、小島 進也、上野 敏秀、清井 仁、直江 知樹、間野 博行、第 75 回日本癌学会学術総会、横浜、2016 年 10 月、国内。
2. AYA 世代急性リンパ性白血病における網羅的融合遺伝子解析、口頭、安田 貴彦、都築 忍、河津 正人、早川 文彦、小島 進也、上野 敏秀、清井 仁、直江 知樹、間野 博行、第 75 回日本癌学会学術総会、横浜、2016 年 10 月、国内。
3. New molecular targets of B-cell acute lymphoblastic leukemia. 口頭、早川文彦、安田貴彦、間野博行 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016.10.8, 国内
4. Genetic abnormalities of AYA ALL and its treatment strategy by pediatric like protocols. 口頭, 早川文彦, 第 78 回日本血液学会学術集会, 2016.10.15, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当なし