ゲノム切断点同定による AML1-ETO 陽性急性白血病の予後解析と転座メカニズムの解明

小野澤真弘

北海道大学大学院医学研究科 血液内科

【研究の背景】

白血病において t(8;21)は inv16 と並び、予後良好の染色体異常として認識されているが、inv16 とは異なり、t(8;21)白血病には予後不良の一群があることが多くの臨床家によって認識されている。我々は臨床検体を用いた解析で、inv16 では、融合遺伝子由来転写産物である CBFb-MYH11 の発現の症例間の違いは 1log(～10 倍)に収まるが、t(8;21)による AML1-ETO では、初発時の骨髄検体で、3log(～1000 倍)におよぶ症例間の発現のばらつきがあることを見出した。初発時骨髄の芽球比率の違い(骨髄中 20-98%)を考慮しても、これだけの融合遺伝子発現量の差は説明がつかない。AML1-ETO の転写は、5'側である AML1 のプロモーターによって規定されていると想定されるが、AML1 プロモーターの配列は症例間に差がないと考えられる。症例間に差があるとすれば、ゲノム上の切断融合点の配列である。これまでの研究成果から、エンハンサー活性を持つ配列が、切断融合点に挿入されることで、融合遺伝子の発現量が増加する可能性が考えられる。

【目　　的】

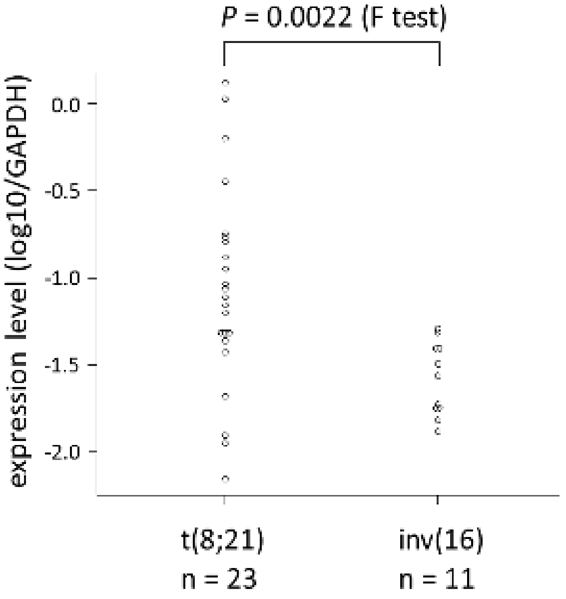
血液臨床において、一般には予後良好とされる t(8;21)白血病には、予後不良の一群があることが広く認識されている。我々は融合遺伝子である AML1-ETO 転写産物の発現の差が、症例間で 1000 倍におよぶことを見出した。本研究では、t(8;21)を伴う白血病症例において、AML1 と ETO 遺伝子のゲノム上の融合部位の配列を解析することで、切断点の位置や、切断点への外来配列挿入が、融合遺伝子産物の転写量や予後に影響するかどうかを明らかにするとともに、染色体転座のメカニズムについて検討する。

【方　　法】

t(8;21)転座を伴う急性骨髄性白血病において、21 番染色体上の AML1 遺伝子は 8 番染色体上の ETO 遺伝子と融合し、AML1-ETO 融合遺伝子を形成する。RT-PCR で検出される転写産物は AML1 exon5 と ETO　exon2 とが融合したものであり、t(8;21) 症例共通の転写物である。一方、AML1 遺伝子と ETO 遺伝子のゲノム上の切断融合点は個々の症例で異なっている。切断点の存在する AML1 intron5、ETO intron1 はそれぞれ約 25kbp、59kbp の距離があり、通常の PCR では増幅困難な距離である。複数のプライマーを設定し、Long PCR を駆使することで、切断点を含む断片を増幅しシークエンスを行う。挿入配列により転写産物の発現量が変化するかどうかを検討する。また、挿入配列をクローニングし、レポーターアッセイによって、挿入配列がエンハンサー活性を持つことを示す。また得られた切断融合点の配列から、転座の好発する共通配列が存在するかどうか切断点前後の配列のホモロジー解析を行う。

【結　果】

t(8;21)または inv(16)を伴う白血病検体を用いて検討した。t(8;21)を伴う白血病 23 例と inv(16)を伴う白血病 11 例で、それぞれの転写産物である *AML1-ETO*、*CBFb-MYH11* の発現を GAPDH 比で確認したところ、AML1-ETO で有意に発現量のばらつきが大きかった(右図)。*AML1-ETO* 転写産物の融合は全例において AML1 exon5 と ETO exon2 で起きていた。AML1 intron5、ETO intron1 に forward、reverse primer を設定し、long PCR にてゲノム上の融合点の同定を試みた。t(8;21)白血病 23 例中、19 例で *AML1-ETO* の融合点を、15 例で *ETO-AML1* の融合点を同定した。各遺伝子の切断部位は全て症例特異的であり、症例間で完全に同じ切断点をもつものは認めなかった。AML1 上の切断部位は intron5 の領域(25kb)に広く分布した。ETO 上の切断部位は exon1a と exon2 の間の領域(59kb)のうち exon1a と exon1b の間(20kb)に集積した。融合部位の配列は、①切断点同士が融合したタイプ(blunt end)、②数 bp の相同配列を共有して融合したタイプ(microhomology)、③どちらの遺伝子にも属さない塩基配列挿入を認めるタイプ(nucleotide addition)の3つの様式を認めた。同定された 34 箇所の融合部位は、blunt end 9 箇所、microhomology 12 箇所、nucleotide addition 13 箇所だった。Nucleotide addition については、1-5 塩基で鋳型のある長い配列挿入は認めなかった。



AML1 intron5 の特定部位が AML1-ETO 融合遺伝子に残っている症例で *AML1-ETO* 転写産物の発現量が高い傾向を認めたが、統計的有意差は出ていない。

【考　察】

融合遺伝子のゲノム上の切断融合部位は、cluster は認めるものの、全ての症例で特異的なものだった。切断部位に特徴的な共通の配列モチーフは見いだせなかった。転写促進部位である H3K27 アセチル化部位周辺や、DNase hypersensitivity cluster 領域に切断点が集積していた。AML1-ETO 融合遺伝子低発現のもので c-kit 変異が多い傾向があり、他の遺伝子変異の関連、予後との関連についてさらなる検討を要する。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

t(8;21)白血病においては、c-kit 変異、CD56 発現などの予後不良の分子マーカーが報告されているが、本研究では AML1-ETO 融合遺伝子の発現量が、ゲノム上の切断融合部位と関連している可能性について解析し、新たな予後予測因子となることが明らかとなれば、各症例の治療選択にも有効である。これまで判別不能だった予後不良群を検出することで、治療戦略を強化し治療成績の向上が期待できる。

【参考・引用文献】

Onozawa M, Zhang Z, Kim YJ, Goldberg L, Varga T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Aplan PD.
Repair of DNA double-strand breaks by templated nucleotide sequence insertions derived from distant regions of the genome.
Proc Natl Acad Sci U S A. 111(21):7729-34. 2014
Onozawa M, Aplan PD.Templated Sequence Insertion Polymorphisms in the Human Genome.

Front Chem. 2016 Nov 16;4:43. Review.