

医科学研究 I

小児急性リンパ性白血病における

DUX4::IGH 融合遺伝子の検出

氏名：大津 遥香

学籍番号：5401021H

所属研究室：小児科

指導教員：江口 真理子先生、石前 峰斉先生

森谷 京子先生、加賀城 真理先生

宮本 真知子先生、大澤 美緒先生

田中 千尋先生、梶田 優子先生

責任指導者による確認

本レポートの作成は、提出者本人が行い、研究不正に該当する剽窃、偽造、捏造を行っていないことを確認しました。

指導教員署名

【要約】

急性リンパ性白血病は小児患者で最も多く見られる白血病であり、その患者が持つ融合遺伝子について調べることはより適切で正確な治療法の選択に繋がる。本研究では実際の患者に対して遺伝子解析を行い、融合遺伝子の構造を調べた。その結果、白血病の原因遺伝子である *DUX4::IGH* 融合遺伝子の存在と、遺伝子内での *ERG* 遺伝子の欠失が明らかになった。このような発見を通じて、より多くの白血病患者に適用される新たな治療薬が開発されることが期待される。

【緒言】

白血病は血液のがんの一種で、白血球系細胞が無限に増殖する病気である。その中でも急性リンパ性白血病（ALL）は小児患者で最も多い白血病で¹⁾²⁾、リンパ球へ分化するはずの細胞がうまく分化できず、血液細胞としての機能を持たない未分化な状態で異常に増殖する病気である。染色体異常などにより異なる遺伝子が融合することによってできる遺伝子は「融合遺伝子」と呼ばれ、がん細胞の異常な増殖を引き起こす原因となることがわかっている。白血病の患者がもつ融合遺伝子について調べることは、病型の正確な診断や予後の予測、治療方針の決定に役立てることができる¹⁾。そのため、本研究では愛媛大学医学部附属病院小児科において急性リンパ性白血病と診断された患者について、診断マーカーにより存在が疑われた融合遺伝子が実際に存在するのか、そしてそれがどのような構造をとっているのかを調べることで、今後のより良い治療に繋げることを目的とした。

【症例提示】

症例は5歳男児。倦怠感、頭痛、微熱がありかかりつけの小児科を受診した。顔面蒼白や肝脾腫などの所見が得られ、血液検査では貧血、血小板の減少と芽球増多が確認され、急性白血病が疑われた。

骨髄検査より、芽球が97%存在することが確認され、細胞表面マーカーにおいて、B細胞系抗原ではCD19, CD10, CD22, cyCD22, cyCD79a, μ 鎖が陽性、T細胞系抗原ではCD2が一部陽性、骨髄（単球）系抗原ではCD371が陽性であった。CD2とCD371が陽性であったことから、*DUX4::IGH*融合遺伝子を有する可能性が疑われた。染色体は正常核型であった。外注検査でのキメラ遺伝子スクリーニング検査はすべて陰性であった。

【実験方法】

1、単核球分離

血液 7 mL を等量の PBS（富士フィルム和光純薬）で希釈した。次に 50 mL の遠心チューブ内で 7 mL の Lymphoprep（コスモバイオ）上層に 14 mL の希釈血液を重層し、 $800\times g$ 、20 分、室温で遠心分離（以下「遠心」とする）した。遠心後、Lymphoprep と血漿の境目に生じる白い単核球層をパスツールピペットで回収した。回収した画分を、PBS を用いて希釈し、 $250\times g$ 、10 分で遠心した。遠心後、上澄みを取り除き PBS を追加して再び同様に遠心した。その後、PBS を混合し、死細胞を染色するトリパンブルー染色液（ナカライテスク）を用いて血球の数を数えた。

2、DNA 抽出

抽出を行う前日に前処理を行った。サンプルが凍った状態でバッファ A (10 mmol/L Tris、10 mmol/L NaCl、10 mmol/L EDTA、pH8.0) を 500 μ L 加え、直ちに 20 mg/mL プロテイナーゼ K (富士フィルム和光純薬) を 5 μ L 加えてよく攪拌した。その後、10%SDS を 25 μ L 加えてゆっくり転倒混和し、スピンドウンした。そして、 55°C に一晩静置した。

翌日、サンプルをピペッティングした後、10 mg/mL RNase (ニッポンジーン) を 5 μ L 加えて攪拌し、スピンドウンして 37°C で 2 時間静置した。Phase Lock Gel, Heavy (Quantabio) にフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール=25:24:1 (以下 PCI とする) を 500 μ L 入れておき、そこにサンプルを全量移したのち、7 分間転倒混和し、室温で $12000\times g$ 、10 分間遠心した。上層の DNA 層を新しい 1.5 mL チューブに移し、PCI を 500 μ L 加えて 7 分間転倒混和した後、室温で $12000\times g$ 、10 分間遠心した。この上層の DNA 層を移し転倒混和・遠心する過程をタンパク層が無くなるまで繰り返した。タンパク層が無くなったら、DNA 層を新しい 1.5 mL チューブに移し、水飽和ジエチルエーテル (上層) を 500 μ L 加えて 7 分間転倒混和し、室温で $12000\times g$ 、10 分間遠心した。そして下層の DNA 層を新しい 1.5 mL チューブに移した。次に、3 mol/L 酢酸ナトリウムを 50 μ L、冷やした 100 %エタノールを 1 mL 加えて白い糸の塊ができるまでゆっくり転倒混和した。細かい白い DNA の出現を確認したら、 4°C 14000 rpm 10 分間遠心し、上清を除去した。冷やした 70%エタノールを 1 mL、壁面に付着した DNA を洗い流すようにして加え、再び 4°C 14000 rpm 10 分間遠心し、上清を除去した。上清を丁寧に取り除き、蓋を開けたまま 5 分乾燥させ、TE 150 μ L 加えて攪拌せずに 4°C で一晩静置した。

さらに翌日、経口の大きいチップでピペッティングして溶解させ、NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) で吸光度、Qubit (life technologies) で濃度を測定し、チューブに濃度を記載して-20°Cに保存した。

3、RNA 抽出

NucleoSpin miRNA (MACHEREY-NAGEL) を用いて RNA を抽出した。サンプルが凍った状態で Lysis Buffer ML 300 μL を添加して 5 秒間、2 回のボルテックスにより混合し、室温で 5 分間静置した。NucleoSpin Filter を Collection Tube にセットし、静置したサンプルを加えて 11000 $\times g$ 、1 分間遠心した。遠心後、NucleoSpin Filter を取り除いた。ろ液に 100%エタノール 150 μL を添加し、すぐにボルテックスで 5 秒間、2 回混合して室温で 5 分間静置した。NucleoSpin RNA Column を Collection tube にセットし、静置していた溶液をカラムに添加して 14000 $\times g$ 、1 分間遠心した。この操作で large RNA と DNA が NucleoSpin RNA Column に吸着し、small RNA とタンパク質はろ液に含まれた。このろ液を(1) とする。

カラムを新しい Collection tube にセットし、Buffer MDB 350 μL をカラムに加えた。11000 $\times g$ 、1 分間遠心した後、ろ液を捨て、同じチューブにカラムをセットした。rDNase 溶液 100 μL をカラムに加え、蓋を開けたまま室温で 15 分間反応させた。このカラムを(2)とする。

(1) のろ液に Buffer MP 300 μL を加え、蓋を閉めてボルテックスで 5 秒間、2 回混合した。11000 $\times g$ 、3 分間遠心してタンパク質を沈殿させた。NucleoSpin Protein Removal Column を Collection tube にセットし、上清をカラムに添加して 11000 $\times g$ 、1 分間遠心した。NucleoSpin Protein Removal Column を取り除き 800 μL の Buffer MX を加えて、すぐにボルテックスで 5 秒間、2 回混合した。これを(3)とする。

Large RNA を結合済みの (2) の NucleoSpin RNA Column に (3) の溶液 600 μL を添加して 11000 $\times g$ 、30 秒間遠心し、ろ液を捨て、同じチューブにカラムをセットした。この操作を繰り返し、すべての (3) の溶液をカラムに加えた。Buffer MW1 600 μL をカラムに加え、11000 $\times g$ 、30 秒間遠心した後、ろ液を捨て同じチューブにカラムをセットした。Buffer MW2 700 μL をカラムに加え、11000 $\times g$ 、30 秒間遠心した後、ろ液を捨て同じチューブにカラムをセットした。Buffer MW2 250 μL をカラムに加え、11000 $\times g$ 、2 分間遠心してカラムを乾燥させた。カラムを新しい Collection tube にセットし、RNase-free H₂O 30 μL を加えて蓋を開けたまま室温で 1 分間静置した。蓋を閉めて 11000 $\times g$ で 30 秒間遠心して RNA を溶出した。NanoDrop で吸光度、Qubit で濃度を測定した。

4、逆転写反応

ReverTrakita® qPCR RT Master Mix (TOYOBO) を用いて逆転写を行った。
RNA100 ng を 65°C で 5 分間静置し、氷上で急冷した。氷上にて、5×RT Master Mix 2 μL、Nuclease-free Water を加えて計 10 μL とした。タッピングにて攪拌し、逆転写反応 37°C 60 分間、50°C 5 分間、酵素失活反応 98°C 5 分間、反応後 4°C で静置し、-20°C で保存した。

5、RT-PCR

SapphireAmp® Fact PCR Master Mix(タカラバイオ) を用いて RT-PCR を行った。
鋳型として患者の cDNA、正常コントロールの cDNA、陰性コントロールに distilled water (以下 DW とする) を用いた。

Primer は、*ERG* 遺伝子の検出に

Forward primer 5'-CGTCCTCCTCCAGCGACTATG-3'

Reverse primer 5'-GCGGCTGAGCTTATCGTAGTTC-3'

GAPDH 遺伝子の検出に

Forward primer 5'-GTTCGACAGTCAGCCGCATCTTC-3'

Reverse primer 5'-CAGGGGTGCTAAGCAGTTGGTG-3' を用いた。

それぞれの鋳型 0.5 μL に SapphireAmp® Fact PCR Master Mix 12.5 μL、Primer Forward (10 pmol/μL) 0.5 μL、Primer Reverse (10 pmol/μL) 0.5 μL、DW 11.0 μL を加えて各 25 μL とした。

RT-PCR 反応は、95°C 2 分間の後、98°C 5 秒間、65°C 5 秒間、72°C 10 秒間を 40 回繰り返し、72°C 3 分間、反応後 4°C で静置し、-20°C で保存した。

6、電気泳動

泳動 buffer は TAE、gel は 2% Agarose gel を用いて 100 V で 20 分間電気泳動を行った。DNA マーカーは ExcelBand 100 bp DNA Ladder (SMOBIO) を用いた。*ERG* 遺伝子のバンドを切り取った。

7、ゲルからの DNA 断片の精製

QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いてゲル精製を行った。ゲル 89.3 mg に 267.9 μ L の Buffer QG を入れ、2 分ごとにボルテックスにより混合しながら 50°C で 10 分間静置した。ゲルが完全に溶解してから、溶液が黄色であることを確認した。その後、2-プロパノール 89.3 μ L を加え、転倒混和した。QIAquick spin column を 2 mL collection tube にセットし、溶液を加えて 17900 $\times g$ 、1 分間遠心した。ろ液を捨て、カラムに Buffer QG を 0.5 mL 添加して 17900 $\times g$ 、1 分間遠心した。同様に、Buffer PE を 0.75 mL 添加して 17900 $\times g$ 、1 分間遠心した。そして、ろ液を捨て 17900 $\times g$ 、1 分間遠心した。QIAquick column を 1.5 mL tube にセットし、Buffer EB 30 μ L を加えて 4 分間静置した。17900 $\times g$ で 1 分間遠心して DNA を溶出した。

8、Sequence PCR

BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて Sequence PCR を行った。BigDye Terminator Premix 0.6 μ L、BigDye Sequence Buffer 1.9 μ L、Primer (10 pmol/ μ l) 0.5 μ L、上記で溶出した鋳型 DNA 4.0 μ L、DW 3.0 μ L を混合し、計 10 μ L とした。

PCR 反応は、96°C 1 分間の後、96°C 10 秒間、50°C 5 秒間、60°C 2 分間を 30 回繰り返し、反応後 4°C で静置し、-20°C で保存した。

9、ゲルろ過

空カラムを 2 mL Collection tube にセットし、スラリー状に調整した Sephadex G-50 (DNA grade) ; 75% Slurry in 滅菌水 (milliQ) をカラムに 800 μ L 入れ、500 $\times g$ 、2 分間遠心した。ゲルが充填されたカラムを 1.5 mL tube にセットし、Sequence PCR 産物を全量ゲルに乗せ、500 $\times g$ 、2 分間遠心した。そして 60°C で 10 分間乾燥させた。次に 15 μ L の HiDi™ Formamide (Applied Biosystems) を加えて混合し、95°C で 2 分間静置した。その後すぐに氷上へ移し 5 分間静置した。Spindown し泳動用 4 連 tube にサンプルを移した。SeqStudio Genetic Analyzer (Applied Biosystems) にて Sequence を泳動した。

10、PCR

Tks Gflex™DNA Polymerase(タカラバイオ) を用いて PCR を行った。鋳型として患者の DNA、正常コントロールの DNA、陰性コントロールに DW を用いた。

Primer は、*DUX4::IGH* 遺伝子の検出に

Primer forward 5'-CAGGGGCAGATGCAAGGCATCC-3'

Primer reverse 5'-GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA-3'

GCK 遺伝子の検出に

Primer forward 5'-GTGGCCCTGTCAACTGTTAC-3'

Primer reverse 5'-GCCCCCAGCCTTAGTTTTGG-3' を用いた。

それぞれの鋳型 0.5 μ L に 2×Gflex PCR Buffer (2×) 12.5 μ L、Primer Forward (10 pmol/ μ L) 0.5 μ L、Primer Reverse (10 pmol/ μ L) 0.5 μ L、Tks Gflex DNA Polymerase 0.25 μ L、DW 10.75 μ L を加えて各 25 μ L とした。

PCR 反応は、94°C 1 分間の後、98°C 10 秒間、64°C 15 秒間、68°C 2 分間を 35 回繰り返し、68°C 3 分間、反応後 4°C で静置し、-20°C で保存した。

11、DNA-PCR の電気泳動

泳動 buffer は TAE、gel は 2% Agarose gel を用い、RT-PCR 産物と DNA マーカーを流し入れて 100 V で 20 分間電気泳動を行った。*DUX4::IGH* 遺伝子のバンドを切り取った。

12、ゲルからの DNA 断片の精製

7、ゲルからの DNA 断片の精製と同様の操作を行った。ただし用いるゲルと Buffer QG はそれぞれ 69.6mg、208.8 μ L、その後加えた 2-プロパノールは 69.6 μ L とした。

13、Sequence PCR

8、Sequence PCR と同様の操作を行った。ただし、BigDye Terminator Premix 0.6 μ L、BigDye Sequence Buffer 1.9 μ L、Primer (10 pmol/ μ L) 0.5 μ L、上記で溶出した鋳型 DNA 7.0 μ L を混合し、計 10 μ L とした。

14、ゲルろ過

9、ゲルろ過と同様の操作を行った。

【結果】

1、単核球分離

単核球分離により、血液 7 mL から血球が 3.9×10^6 個回収できた。これを DNA 抽出用に 2.9×10^6 個、RNA 抽出用に 1.0×10^6 個ずつに分けた。

2、DNA 定量

DNA の濃度は $68.9 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 、260 nm の吸光度と 280 nm の吸光度の比は 1.89 であった。

3、RNA 定量

RNA の濃度は $104 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 、260 nm の吸光度と 280 nm の吸光度の比は 2.15 であった。

4、RT-PCR 電気泳動

電気泳動の結果、図 1（次ページ）が得られた。*ERG* 遺伝子の RT-PCR において、患者サンプル 1 で正常コントロール 2 では見られない 300 bp 程度のバンドが見られたため、その部分を切り取った。

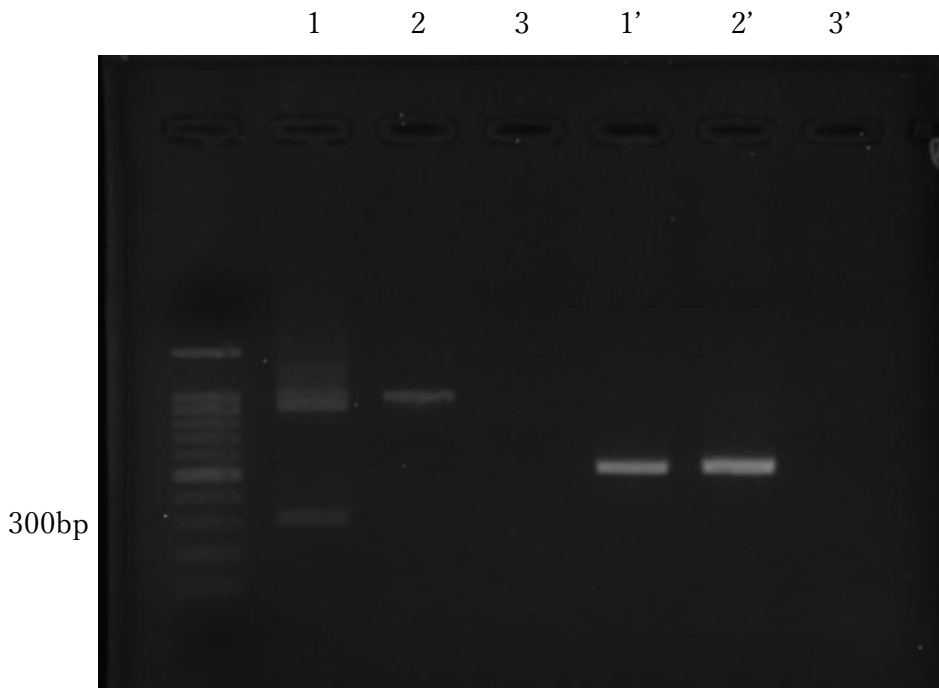


図1: RT-PCR 電気泳動の結果

ERG 遺伝子の患者サンプルを「1」、正常コントロールを「2」、陰性コントロールを「3」とし、*GAPDH* 遺伝子の患者サンプルを「1'」、正常コントロールを「2'」、陰性コントロールを「3'」とする。(撮影条件は Exposure:0.200sec Gain:10 Gamma:1.0)

5、RT-PCR のシーケンス結果

図2 (次ページ) は解析の結果得られた患者の塩基配列を示す。この結果、患者の持つ変異は *ERG* 遺伝子において exon3 から exon9 が欠失し、exon2 と exon10 が結合したものであると分かった。

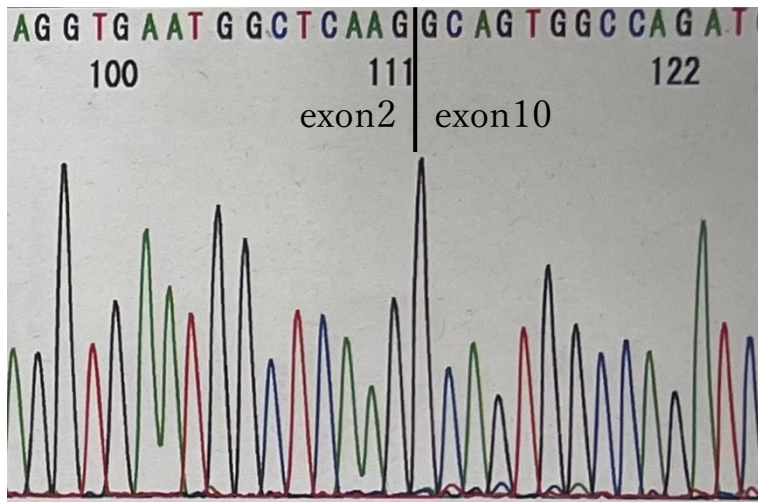


図2：患者サンプルにおける exon2 と exon10 の結合部

6、PCR

電気泳動の結果、図3が得られた。*DUX4::IGH* 遺伝子の DNA-PCR において、患者サンプル1で正常コントロール2では見られない400 bp 程度のバンドが見られたため、その部分を切り取った。

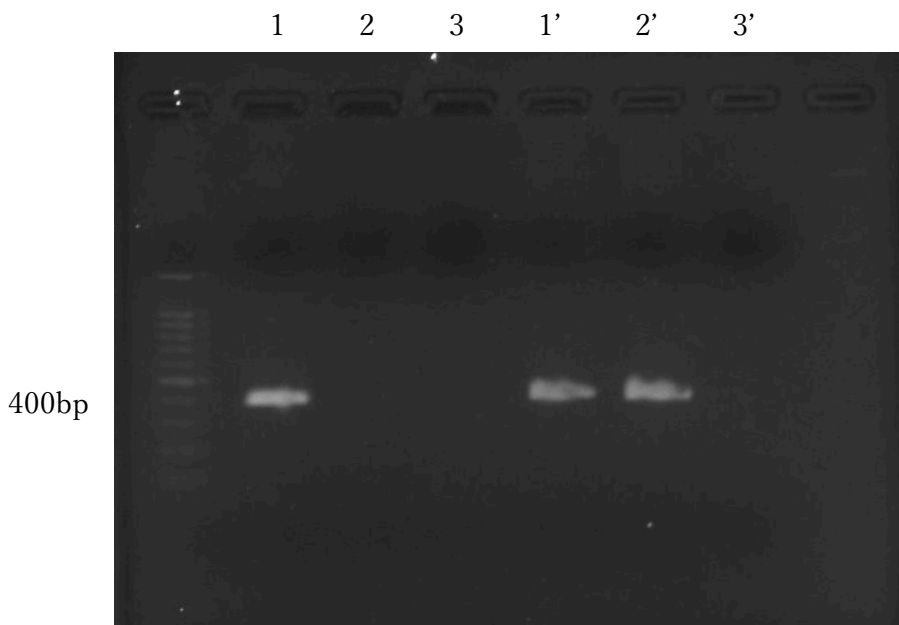


図3：PCR 電気泳動の結果

DUX4::IGH 遺伝子の患者サンプルを「1」、正常コントロールを「2」、陰性コン

コントロールを「3」とし、*GCK*遺伝子の患者サンプルを「1」、正常コントロールを「2」、陰性コントロールを「3」とする。(撮影条件は Exposure:0.450sec Gain:10 Gamma:1.0)

7、PCR のシーケンス結果

図4は解析の結果得られた患者の塩基配列を示す。この結果、患者の持つ変異遺伝子は *DUX4* と *IGH* が結合したものであると分かった。

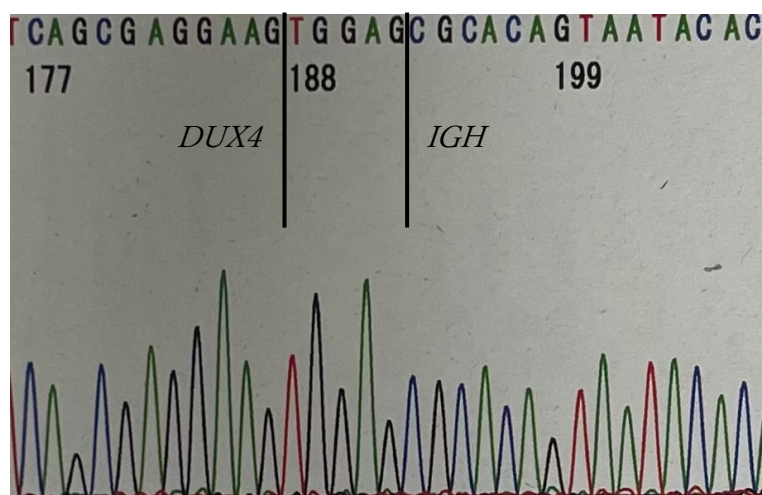


図4：患者サンプルにおける *DUX4* と *IGH* の結合部

【考察】

遺伝子内における *ERG* 遺伝子の欠失は、*DUX4* 遺伝子が関係する種類の白血病でよく見られる特徴として知られている¹⁾⁴⁾。RT-PCR より患者の *ERG* 遺伝子には exon3 から exon9 の欠失が認められ、PCR より *DUX4::IGH* 融合遺伝子のバンドも確認されたため、患者は *DUX4::IGH* 融合遺伝子を有する急性リンパ性白血病であると考えられる。東京大学大学院医学系研究科の間野博行教授らのグループは、*DUX4::IGH* 融合遺伝子が急性リンパ性白血病の直接的な原因として最も多く見られたとし、その働きを抑制することがより良い治療法に繋がるだろうと述べている。

治療成績の向上や、合併症の軽減のためには予後因子に基づく適切な層別化が不可欠である³⁾。小児急性リンパ性白血病において、異常のある遺伝子が *ETV6::RUNX1*、*DUX4* 融合遺伝子、*NUTM1* 融合遺伝子、*ZNF384* 融合遺伝子など

の場合は予後良好、*TCF3::PBX1*、*iAMP21*、*PAX5*融合遺伝子などの場合は予後中間、低二倍体、*KMT2A*融合遺伝子、*BCR::ABL1*、*MEF2D*融合遺伝子などの場合は予後不良とされている²⁾。*DUX4::IGH*融合遺伝子を有する白血病は予後良好群に属することから、本研究を行った患者はプロトコルに沿った化学療法により寛解し、現在は維持療法が行われている。このように適切な治療を選択することができたのは検査や遺伝子解析のおかげであり、それらの重要性が分かる。今後 *DUX4::IGH*融合遺伝子をはじめとする白血病の原因遺伝子を直接標的とする分子標的薬が開発されれば、より速く副作用の少ない治療が可能になるだろう。また、従来の治療法に抵抗を示すことの多い予後不良群に属す白血病についても、白血病細胞の分子異常を直接標的とする薬が新たな治療の選択肢となる可能性がある。加えて、予後因子は治療法の進歩に伴う治療成績の向上によって予後因子としての意義を失うことがある³⁾。つまり、新たな治療法の発見によりそれまで予後不良とされていた原因遺伝子や要因が予後に影響しなくなる、などということが起こるとのことだ。実際、東京小児がん研究グループ (TCCSG) での臨床試験では男児の予後は女児の予後に比べて不良であったが、精巣再発の減少や治療成績の向上により性差が無くなった³⁾。このように、新たな治療法の開発は治療成績の向上や患者の負担軽減、予後の改善などにつながる可能性がある。これら新しい分子標的薬の開発にはドライバー変異である遺伝子異常の同定²⁾、各白血病の精密な層別化や個別化、国際共同試験の遂行³⁾など様々な試みが求められる。これらによって、より多くの白血病患者がより効果的で負担の少ない治療を受けられるようになることを期待したい。

【謝辞】

本研究を行うにあたり、多大なるご指導を賜りました小児科の先生方をはじめ、全ての方々に心より感謝申し上げます。本研究を通して得られた学びを活かし、先生方のような小児科医を目指して一層精進してまいります。

【参考文献】

- 1) 江口真理子/石前峰斉/石井榮一：特集 小児のがん-最近の動向 1 白血病. 小児科 2019 ; 60 : 1009-1020
- 2) 石前峰斉/江口真理子：小児白血病におけるゲノム医療研究の進歩. 血液内科

2022 ; 84 : 578-587

3) 康勝好 : B 前駆細胞性急性リンパ性白血病の治療戦略. 臨床血液 2022 ; 63 : 816-825

4) Kyoko Moritani et al : Rapid Identification of *DUX4::IGH* Fusion in Acute Lymphoblastic Leukemia. eJHaem 2025 ; 6 : 1-7

5) Takahiro Yasuda et al : Recurrent DUX4 fusions in B cell acute lymphoblastic leukemia of adolescents and young adults. nature genetics 2016 ; 48 : 569-574