

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医 学 ）	氏名	木 村 俊 介
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目 Recurrent SPI1 (PU.1) fusions in high-risk pediatric T cell acute lymphoblastic leukemia (高リスクの小児 T 細胞性急性リンパ芽球性白血病において繰り返し認められる SPI1 (PU.1) 融合遺伝子)			
論文審査担当者			
主 査	教 授	一 戸 辰 夫	印
審査委員	教 授	田 代 聡	
審査委員	准教授	仲 一 仁	
〔論文審査の結果の要旨〕 小児 T 細胞性急性リンパ性白血病 (T-ALL) の治療成績は近年著しく向上しているが，その 20-30% は治療抵抗性例や再発例である。さらにこれらの症例の予後は極めて不良である。また，その遺伝学的基盤は十分解明されておらず，現時点で有効な標準治療は確立していない。本研究では，難治性 T-ALL の分子病態に関連した遺伝子異常および融合遺伝子を同定する目的に，次世代シーケンサーを用いたゲノムワイドな解析を行った。 小児白血病研究グループ (TCCSG, JACLS) や関連施設から提供された初発時小児 T-ALL181 検体を用いて，全トランスクリプトーム解析と ALL に関連した 158 個の遺伝子，領域に対するオンコパネルシーケンス (ターゲットキャプチャー解析) による包括的プロファイリングを行った。すべてのゲノム解析や統計学的処理は R を用いて行った。 全トランスクリプトーム解析 (WTS) の結果，これまでに T-ALL で報告のある融合遺伝子 (<i>STIL-TAL1</i> など) に加えて，血球の分化において重要な転写因子である PU.1 をコードする <i>SPI1</i> 遺伝子の新規融合遺伝子 (<i>STMN1-SPI1</i> , <i>TCF7-SPI1</i>) を，解析した小児 T-ALL 例の 3.9% (181 例中 7 例) で同定した。この新規 <i>SPI1</i> 融合遺伝子は PU.1 の機能ドメインを保持し，T 細胞で高発現している <i>STMN1</i> や <i>TCF7</i> と in-frame 接続していた。 <i>SPI1</i> は正常の T 細胞の分化においては幼弱な胸腺細胞においてのみ発現し，commitment の前に発現が消失する。 <i>SPI1</i> 融合遺伝子例はこれらの遺伝子のプロモーターを利用するため，その他の T-ALL 例と比較して <i>SPI1</i> mRNA の発現が極めて高値となっており ($P = 9.6 \times 10^{-6}$)， <i>SPI1</i> の異常な高発現が持続していると考えられた。 Luciferase assay により，この新規 <i>SPI1</i> 融合遺伝子の機能を解析した。その結果， <i>SPI1</i> 融合遺伝子は野生型 <i>SPI1</i> と同等の機能を有していることが明らかとなった。また，マウス胸腺の CD4/8 double negative (DN) T 細胞に <i>SPI1</i> 融合遺伝子を導入し，cell growth assay で増殖能を，TSt4/DLL1 マウスストローマ細胞との共培養で分化能を検証した。その結果， <i>SPI1</i> 融合遺伝子を導入すると野生型 <i>SPI1</i> と同等の細胞増殖活性を保持し，DNT 細胞の分化段階で分化が停止することが明らかとなった。さらにマウスに <i>SPI1</i> 融合遺伝子を導入した造血幹細胞を移植することで，生体内でも同様に分化の停止がもたらされることも確認した。 WTS の発現データを用いてこの新規 <i>SPI1</i> 融合遺伝子を有する T-ALL の特徴を解析した。小児 T-ALL は発現データをもとに行ったコンセンサスクラスタリングにより 5 群に分類され，過去に発現アレイによる分類で報告された ETP 群，TLX 群，TAL1-RA 群，TAL1-RB 群に加えて，新たに本研究で同定された <i>SPI1</i> 融合遺伝子例のみで構成される <i>SPI1</i> fusion 群が分類された。変異パターンを解析した結果， <i>SPI1</i> fusion 群では NOTCH1 シグナルや RAS に関連した遺伝子異常を多く有していた。また， <i>SPI1</i> だけでなく， <i>MEF2C</i> など幼弱な T 細胞			

で特徴的に発現する遺伝子が高発現となっており、commitment など T 細胞の分化の過程において重要な役割を有する遺伝子の発現プロファイルがその他の T-ALL とは大きく異なっていた。

SPI1 融合遺伝子例の予後解析を行ったところ、7 例中 6 例が 3 年以内に早期再発死亡しており、その他の T-ALL 症例と比較して極めて予後不良であった (Log-rank $P = 1.12 \times 10^{-5}$)。多変量解析においても *SPI1* 融合遺伝子は独立した予後不良因子であった (HR = 8.66, 95%CI = 2.60-28.78, $P = 4.28 \times 10^{-4}$)。 *SPI1* 融合遺伝子例は、10 歳未満の比較的若年例に多く、初診時の白血球数が 10 万/ μ l 以上と高値であることが臨床的特徴であった。また、*SPI1* 融合遺伝子例は DN または CD4⁻/CD8⁺の免疫表現型を呈する幼弱な分化段階の T-ALL であったが、全例が CD5 強陽性であり初期前駆 T 細胞性急性リンパ芽球性白血病 (ETP-ALL) の基準は満たさなかった。

これらから、現在までに報告された T-ALL とは独立した特異なプロファイルを呈する極めて予後不良な *SPI1* 融合遺伝子を、日本人小児 T-ALL の 3.9% で同定した。 *SPI1* (PU.1) 融合タンパクは PU.1 の転写因子としての機能を保持しており、その恒常的な発現は細胞増殖を誘導し T 細胞の分化停止を引き起こした。今回の研究で、ハイリスクの小児 T-ALL における *SPI1* 融合遺伝子特有の機序を明らかとした。

以上の結果から、本論文は小児 T-ALL の 3.9% に *SPI1* 融合遺伝子を同定することで、新規予後不良群を明らかとしたことから、小児 T 細胞白血病の診断と治療に貢献すること大である。

よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	木村俊介
学位授与の条件	学位規則第4条第(1)・2項該当		
論文題目 Recurrent SPI1 (PU.1) fusions in high-risk pediatric T cell acute lymphoblastic leukemia （高リスクの小児 T 細胞性急性リンパ芽球性白血病において繰り返し認められる SPI1 (PU.1) 融合遺伝子）			
最終試験担当者			
主査	教授	一戸辰夫	印
審査委員	教授	田代聡	
審査委員	准教授	仲一仁	
〔最終試験の結果の要旨〕			
判定合格			
<p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成30年11月1日の第76回広島大学研究科発表会（医学）及び平成30年11月6日日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 次世代シーケンサーのプラットフォーム 2 SPI1 融合遺伝子と T-ALL 発症の機構 3 SPI1 融合蛋白によるシグナル伝達ならびに下流分子の役割と機能 4 SPI1 融合遺伝子陽性例の細胞学的、臨床的特徴 5 本結果からの分子標的治療薬開発の可能性 <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			