

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08320

研究課題名(和文) 20番染色体長腕上の骨髄異形成症候群疾患関連遺伝子の同定と分子機構の解明

研究課題名(英文) Identification of candidate genes on long arm of chromosome 20, which are involved in molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes

研究代表者

志関 雅幸 (Shiseki, Masayuki)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90260314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄異形成症候群の分子病態を明らかにするために、高頻度に見られる20番染色体長腕欠失領域からの疾患関連遺伝子の単離を目指し、32の遺伝子の解析を試みた。次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異解析では、発見された変異の頻度は低く、その意義は不明であった。一方、遺伝子発現レベルの解析では、PTPN1、PLCG1、BCAS4の3つの遺伝子の発現が有意に低下し、かつ発現低下が生存期間に影響を与えることが示された。また、発現低下にはプロモータ領域のメチル化の関与が示された。遺伝子導入による解析でPTPN1の発現低下が赤血球系の分化、成熟過程を障害していることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to identify and to characterize genes which are located on long arm of chromosome 20, and are involved in molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes (MDS). We analyzed selected 32 genes. No recurrent mutations were found in all coding regions of 32 genes in MDS patients. Expressions of PTPN1, PLCG1, and BCAS4 genes were reduced in MDS patients. Methylation of promoter regions in these genes results in reduced expression in MDS without deletion of long arm of chromosome 20. Reduced expressions of these three genes were associated with worse overall survival of the patients. Molecular and cellular biological analyses indicated that reduced expression of PTPN1, which encodes protein tyrosine phosphatase, causes up-regulation of JAK2-STAT5 pathway, leading to alteration in proliferation and differentiation processes in erythroid series.

研究分野：分子病態学

キーワード：骨髄異形成症候群 染色体異常 がん抑制遺伝子 20番染色体長腕欠失

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨髄異形成症候群は、造血幹細胞の後天的な異常に基づくクローン性増殖を基盤とする疾患である。血球減少と異常な芽球の増加を特徴とし、白血病への進展を来す疾患である。有効な治療法に乏しい難治性疾患であり、高齢者に多い。急速な高齢化社会を迎えるわが国においては、今後さらに増加が予想される疾患である。

その分子病態の解明は進みつつあり、網羅的ゲノム解析などで、遺伝子変異解析が行われているが、極めて多数の遺伝子変異が発見され、分子病態は複雑かつ不均一であると考えられる。また、それらの変異の生物学的な意義については十分解析されてはいない。また、変異以外の分子病態、例えばエピジェネティックなメカニズムに基づく遺伝子発現の異常などの解析はまだ十分に行われていない。

(2) 本疾患においては、高頻度で見られる染色体異常がいくつか知られている。その一つに 20 番染色体長腕欠失がある。骨髄異形成症候群以外にも急性白血病や骨髄増殖性腫瘍においてみられる染色体欠失である。染色体欠失によりいつのアレルが喪失する遺伝子(群)の中に、骨髄異形成症候群に関連するものが存在すると想定している。そして、それらは欠失の結果生じる機能異常が骨髄異形成症候群の発症にかかわるがん抑制遺伝子ではないかと想定している。染色体欠失を手がかりに、共通欠失領域を決定し、そこから、疾患関連遺伝子を分離同定しようとする試みがなされてきている。20 番染色体長腕に関しては、我々を含めた複数のグループが共通欠失領域からの疾患関連遺伝子候補の単離・同定を試みている。これまでに、いくつかの候補遺伝子が報告されているが、十分に解析されてはいない。共通欠失領域が広い場合、候補遺伝子が複数存在している可能性も想定される。我々が同定した 20 番染色体長腕上の共通欠失領域上には、150 以上の遺伝子が存在している。その中で、これまでの報告から、がん抑制遺伝子としての機能が想定されている遺伝子や正常造血や造血器腫瘍においての役割が想定されている遺伝子 32 について優先的に解析することとした。候補遺伝子に変異あるいは発現低下による機能異常が病態に関与するがん抑制遺伝子としての性質を持つ遺伝子であるとの仮説を基に検討を行うこととした。

2. 研究の目的

20 番染色体長腕欠失を伴う骨髄異形成症候群症例を基に、我々が Array-CGH 法により同定した 20 番染色体長腕上の共通欠失領域に存在する遺伝子から¹⁾、骨髄異形成症候群の分子病態に関与する遺伝子(群)を同定し、それらの異常の臨床的意義やどのようなメカニズムをもって関与するかといった生物

学的意義を明らかにすることが本研究の目的である。その異常と病型や予後との関連、あるいは治療標的となりうるかを検討する。最終的な本研究の目標は研究成果を基に、難治性疾患である骨髄異形成症候群の新規治療法の開発につなげることである。

3. 研究の方法

(1) 疾患関連候補遺伝子の同定 - 変異解析
共通欠失領域に存在する 32 の遺伝子について変異解析を実施した。まず 20 番染色体長腕欠失を伴う骨髄異形成症候群症例 10 症例に関して、次世代シーケンサーを用いて 32 遺伝子のエクソンシーケンスを実施した。診断時の骨髄検体から高分子 DNA を抽出して解析を行った。変異が認められた遺伝子に関しては、サンガー法で確認したのち、より多数の症例での検討を行い、変異が recurrent なものであるかどうかを確認した。

(2) 疾患関連候補遺伝子の同定 - 発現解析
32 の遺伝子の発現について定量的 RT-PCR(RQ-PCR)によって解析を行った。骨髄異形成症候群 48 症例(20 番染色体長腕欠失を伴う症例 20 症例とそれ以外の症例 28 症例)の骨髄検体より単離した単核球より RNA を抽出して発現解析を行った。

(3) 遺伝子変異あるいは発現低下の臨床的意義の検討
Recurrent な変異あるいは発現低下が見られた遺伝子に関しては、その臨床的意義を検討した。臨床データ(病型、血液データ、生存データなど)との関連について解析を行った。

(4) 発現低下メカニズムの解明
20 番染色体長腕欠失を伴わない症例においても発現低下が認められた遺伝子については、そのメカニズムを明らかにするために、プロモータ領域のメチル化についてメチル化特異的 PCR 法を用いて解析を行った。さらに、アザシチジン処理による発現誘導の有無を、患者骨髄単核球および細胞株を用いて検討した。

(5) 遺伝子変異あるいは発現低下の生物学的意義の検討
Recurrent な変異が見られた遺伝子、有意な発現低下が見られた遺伝子については、その生物学的意義を検討した。発現ベクターを構築して、骨髄系腫瘍細胞株に目的とする遺伝子を導入することで強制発現させる、あるいは RNAi や低分子阻害薬により発現や活性を抑制することによる影響について細胞生物学的、分子生物学的、生化学的解析を行った。

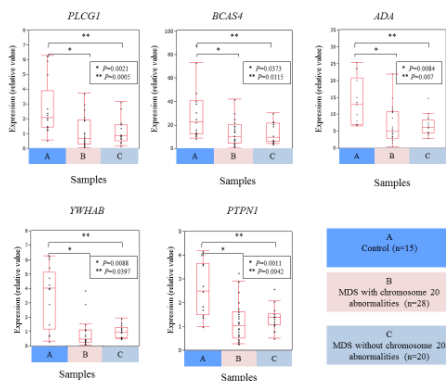
4. 研究成果

(1) 変異解析

20 番染色体異常を伴う骨髄異形成症候群患者 10 名の診断時の骨髄サンプルを用いて、次世代シーケンサー-SoLiD により、32 遺伝子の変異解析を行った。Insertion, deletion およびナンセンス変異は検出されず、ミスセンス変異が STK4 遺伝子 (R117Q)、NCOA3 遺伝子 (P447Q) にそれぞれ一か所ずつ発見された。そこで、この二つ遺伝子のコーディング領域に関して、変異が見つかった部位を含めてサンガー法により変異解析を行った。20 番染色体異常を伴う症例を含めて、225 症例、325 の骨髄サンプルより単離した高分子 DNA を用いて検索した。しかしながら、STK4 遺伝子変異については、R117Q を含めて変異は検出されなかった。一方、NCOA3 遺伝子に関しては、新たに 2 症例に missense 変異 (R353L、R1163W) が認められた。変異の頻度は、STK4 遺伝子については、非常にまれと考えられた。一方 NCOA3 遺伝子に関しては複数の変異が発見されたものの、頻度は 1%程度と少なく、検出された変異と骨髄異形成症候群の分子病態との関連については不明であった。

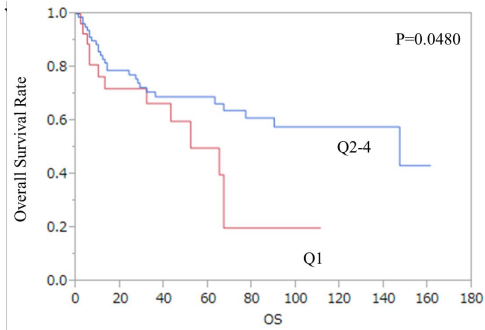
(2) 発現レベルの解析およびその臨床的意義に関する検討

患者骨髄細胞中の 32 遺伝子の発現レベルに関して RQ-PCR 法による解析を行った。32 遺伝子のうち、患者群およびコントロール群の両方で発現がほとんど見られなかった 2 つの遺伝子を除く 30 の遺伝子に関して分析を行った。その結果 19 の遺伝子の発現レベルが、20 番染色体欠失を伴う症例でコントロール群に比して有意に低下していた。5 つの遺伝子 (PLCG1, PTPN1, ADA, BCAS4, YWHAB) については、20 番染色体長腕欠失を伴わない骨髄異形成症候群症例においても発現低下が見られた (図 1)。

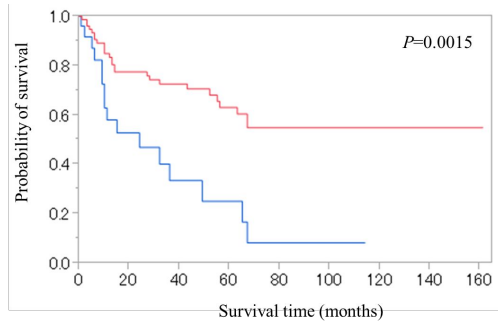


(図 1) コントロール群と MDS 群での各遺伝子の発現レベル

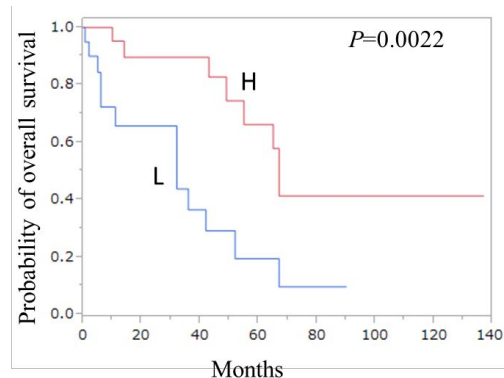
さらに発現低下と臨床病像や生存期間などとの関連を解析したところ、PLCG1, PTPN1, BCAS4 の発現低下と生存期間との関連が見られ、発現低下症例では有意に生存率が悪いことが示された (図 2,3,4)。



(図 2) PTPN1 発現レベル全生存との関係 (最も発現レベルの低い四分位群 Q1 (赤い線) とそれ以外の生存の関係)



(図 3) PLCG1 発現レベル全生存との関係 (最も発現レベルの低い四分位群 Q1 (青い線) とそれ以外の生存の関係)



(図 4) BCAS4 発現レベルと全生存との関係。高発現群 (H) と低発現群 (L) の比較

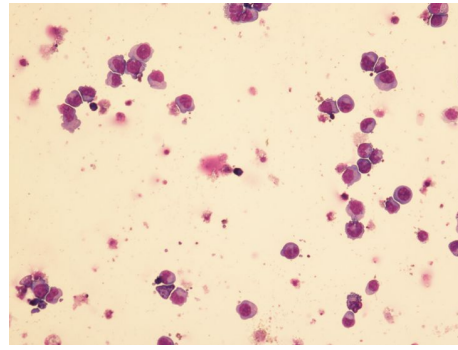
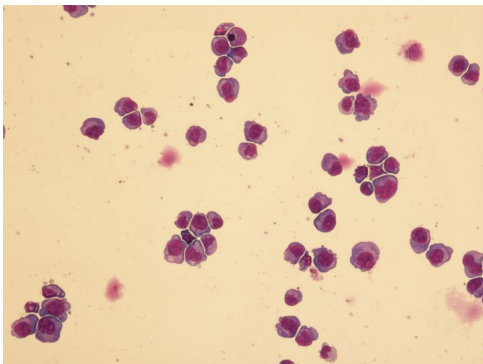
これらの結果から、32 遺伝子の中で、PTPN1, PLCG1, BCAS4 の 3 つの遺伝子の発現低下と骨髄異形成症候群分子病態との関連が示唆された。

(3) 染色体欠失以外の発現レベル低下のメカニズムの検討

20 番染色体長腕欠失が認められない症例における発現低下のメカニズムとして各遺伝子のプロモータ領域のメチル化を想定して解析を行った。具体的には、発現低下が見られた症例に関して、骨髓サンプル由来単核球から高分子 DNA を抽出し、メチル化特異的 PCR を実施した。その結果、*PTPN1* 遺伝子、*PLCG1* 遺伝子のプロモータ領域のメチル化が確認された。また、発現低下が見られる症例の骨髓単核球細胞を低メチル化薬 (5-アザシジン) 処理したところ、*PTPN1*、*PLCG1* の発現上昇が確認された。*BCAS4* に関しては現在までの結果からは同様な現象を確認できていない。

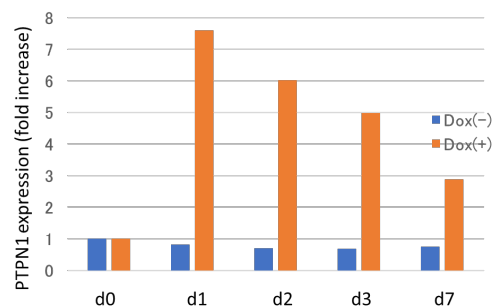
(4) *PTPN1* 遺伝子発現低下の生物学的意義の検討

PTPN1 遺伝子の発現低下の生物学的意義を検討するために *PTPN1* の過剰発現系の確立、低分子阻害薬による酵素活性抑制の影響について検討した。*PTPN1* がコードする PTP-1B は、タンパクチロシン脱リン酸化酵素であり、チロシンキナーゼに拮抗する作用をもち、リン酸化によって活性調節を受ける各種酵素の機能調節を担う。細胞増殖に参与する各種の酵素活性を抑制するように働く可能性が示されており、がん抑制遺伝子としての機能が想定されている。しかし、がんの種類によっては、逆にがん遺伝子として機能する可能性も示唆されており、細胞内経路において複雑な役割を果たしている可能性がある。数多くの基質がこれまでに報告されている。JAK2 および STAT5 の脱リン酸化が特に重要と考えられるが、これまで PTP-1B の骨髓系腫瘍における意義は十分に明らかになっていない。そこで、まず本研究室で樹立した、ドキシサイクリン(DOX) により目的とする遺伝子の発現調節可能な K562 細胞株 (白血病細胞株) の亜株を用いて、*PTPN1* 遺伝子を導入して解析を行った。強制発現により、細胞増殖速度の低下と、形態変化 (赤血球への分化傾向) を認めた (図 5)。

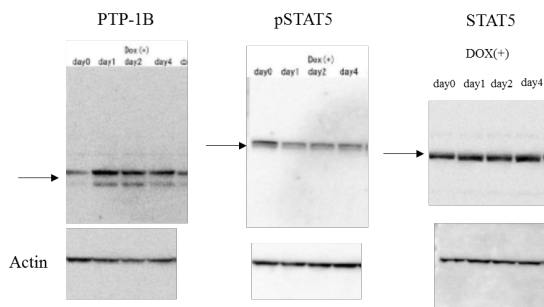


(図 5) *PTPN1* 過剰発現による K562 細胞の形態的变化 (上段は DOX(-), 下段は DOX(+)) による発現誘導後)

この時に *PTPN1* 遺伝子強制発現とともに、STAT5 のリン酸化が抑制され、BCL-xL などの抗アポトーシス分子や細胞増殖に参与するいくつかの遺伝子発現の抑制が観察された (図 6、7)。また、この効果は PTP-1B 阻害薬により打ち消されることが示された。



(図 6) DOX 添加後の *PTPN1* 発現誘導 (RQ-PCR)



(図 7) PTP-1B タンパク誘導と STAT5 リン酸化の変化 (ウエスタンブロット法)

一方で、JAK2 の下流にあるが STAT5 が関与しない赤血球分化に関連する分子 (GATA-1 など) の発現が *PTPN1* の過剰発現後に誘導されていることが明らかとなった。このことから *PTPN1* は細胞増殖を抑制

する一方で赤芽球系の増殖・分化機構の調節に関与し、PTPN1 の機能異常は細胞増殖促進をもたらすと同時に分化成熟障害をもたらす可能性が示された。骨髓異形成症候群患者由来の SKM-1 に関してもテトラサイクリンにより発現調節が可能な強制発現系を構築しており、同様の実験を実施する。

<引用文献>

(1) Okada M, Suto Y, Hirai M, Shiseki M, Usami A, Okajima K, Teramura M, Mori N, Motoji. Microarray CGH analyses of chromosomal 20q deletions in patients with hematopoietic malignancies. *Cancer Genet.* 205: 18-24, 2012 年

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2件)

(1) Wang YH, Imai Y, Shiseki M, Tanaka J, Motoji T. Knockdown of the Wnt receptor Frizzled-1 (FZD-1) reduces MDR1/P-glycoprotein expression in multidrug resistant leukemic cells and inhibits leukemic cell proliferation. *Leukemia Res.* 67: 99-108, 2018 年 doi. 10.1016/j.leucleres.2018.01.020 (査読あり)

(2) Shiseki M, Ishii M, Tanaka J. Clinical significance of reduced PLCG1 expression in myelodysplastic syndromes. *東京女子医大総合研究所紀要* 36:58-59, 2017 年(査読なし)

[学会発表](計6件)

(1) Shiseki M, Ishii M, Ohwashi M, Yoshinaga K, Mori N, Tanaka J. Clinical significance of reduced expression of the genes located within common deleted region of del(20q) in patients with myelodysplastic syndromes. 23rd congress of the European Hematology Association. (Stockholm, Sweden) 2018 年

(2) Osanai S, Shiseki M, Ryuzaki M, Kato Y, Iizuka Y, Watanabe A, Tanaka N, Ishiyama M, Shinohara A, Kazama H, Kentaro Yoshinaga K, Tanaka J. Factors associated with long-term survival in patients with refractory anemia with excess of blasts. 第80回日本血液学会総会(東京) 2017 年

(3) 志関雅幸、長内聡子、吉永健太郎、田中淳司 骨髓異形成症候群における診断時フェリチン値の臨床的意義に関する検討 第41回日本鉄バイオサイエンス学会(東京) 2017 年

(4) Shiseki M, Ishii M, Ohwashi M, Yoshinaga K, Mori N, Tanaka J. Molecular mechanisms and clinical significance of reduced PTPN1 expression in myelodysplastic syndromes. 22nd congress of the European Hematology Association (Madrid Spain) 2017 年

(5) 志関雅幸、石井真由子、宮崎真理、吉永健太郎、森直樹、田中淳司 骨髓異形成症候群における PLCG1 遺伝子の発現低下の臨床的意義 第79回日本血液学会総会(横浜) 2016 年

(6) Shiseki M, Ishii M, Miyazaki M, Yoshinaga K, Mori N, Tanaka J. Reduced PLCG1 expression is associated with inferior survival in myelodysplastic syndromes 57th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition (Orlando, FL, USA) 2015 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

志関 雅幸 (SHISEKI Masayuki)
東京女子医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 9 0 2 6 0 3 1 4