

令和元年5月28日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2016～2018

課題番号：16KT0113

研究課題名(和文) 骨髄異形成症候群の単一因子に依らない病態解明と予防法の基礎的検証

研究課題名(英文) Molecular mechanisms in the pathogenesis of myelodysplastic syndrome

研究代表者

指田 吾郎 (Sashida, Goro)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特別招聘教授

研究者番号：70349447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：高齢者に好発する骨髄異形成症候群は造血幹細胞より発生するクローン性造血器腫瘍である。生涯に涉った環境ストレスによる組織幹細胞の機能低下と疾患発症機構を理解するために、臨床検体を用いた解析に合わせて、マウス生体モデルを用いた遺伝学的解析と検証を展開した。本研究において、既存遺伝子発現データを併用した解析からも、炎症ストレスシグナルの亢進とMDS病態への関与が強く示唆された。こうした知見を元に、MDS発症を予防するために、感染ストレスシグナルを阻害する治療法の検証ほかに、正常な造血幹細胞・造血機能を有するエピゲノム状態に初期化する試みを実施している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

老化による複雑な生物学的応答のもとで、臓器の機能低下やがんを含めた疾患を発症させる機序は明白でない。高齢者に好発する骨髄異形成症候群は造血幹細胞より発生するクローン性造血器腫瘍であり、生涯に涉った環境ストレスによるがん発症の仕組みは不明であった。本研究課題では、MDS幹細胞の遺伝子発現解析データなどの統合的検証によってMDS発症の責任因子を絞り込むとともに、申請者が新たに作製したMDS発症モデルマウスを用いて、MDS発症機序の分子基盤解明を試みた。今後のさらなる研究の展開を図っている。

研究成果の概要(英文)：Myelodysplastic syndrome, which is more common in the elderly, is a clonal hematopoietic tumor that occurs from hematopoietic stem cells. In order to understand the functional decline of tissue stem cells due to environmental stress over life and the disease onset mechanism, we developed genetic analysis and verification using a mouse biological model in conjunction with analysis using clinical specimens. In this study, the analysis using existing gene expression data also strongly suggested the enhancement of inflammatory stress signal and the involvement in MDS disease state. Based on these findings, in order to prevent the onset of MDS, we have inhibited infection-stress signals as well as remodeled an epigenomic state of MDS stem cells into that of normal hematopoietic stem cells.

研究分野：血液内科

キーワード：骨髄異形成症候群 老化 造血幹細胞 クローン造血 環境ストレス

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

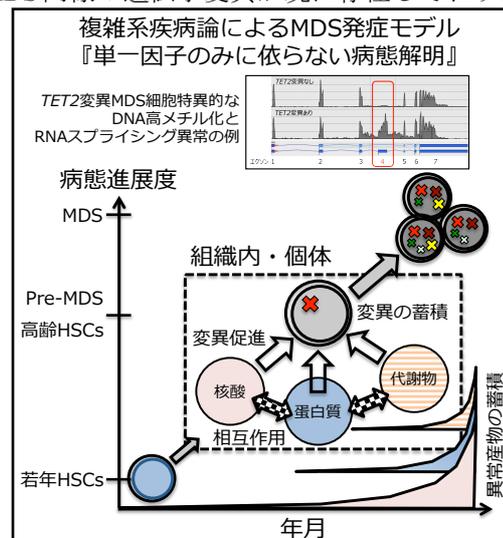
1. 研究開始当初の背景

骨髓異形成症候群(MDS)は造血幹細胞より発生するクローン性造血器腫瘍であり、貧血・易感染性・出血傾向といった造血機能不全症状を認める高齢者に好発するがんである。抗癌剤に抵抗性であり、一部は急性骨髄性白血病(AML)に進展する治療困難な疾患群である。完治が期待できる造血幹細胞移植に適応がない高齢患者は、DNAメチル化阻害剤 azacitidine によって輸血依存性の改善が期待されるが、生命予後の延長効果は限られる(Silverman LR, et al. J Clin Oncol 2012)。近年の大規模遺伝子変異解析によって、MDSの遺伝子変異の多くが、エピジェネティック制御遺伝子とRNAスプライシング因子であることが明らかとなった。エピジェネティック制御は、主にDNAシトシンメチル化とヒストンの後天的化学修飾に因り、正常造血幹細胞機能に不可欠である(Int J Hematol 2012)。MDSにおいても、DNA脱メチル化酵素 *TET2* 変異などに伴うエピゲノム異常が、MDS幹細胞発生と病態進展に重要であると認識されている。昨年、驚くべきことに70歳以上の健常高齢者の約5%に *TET2* や *DNMT3A* といったMDSと同様の遺伝子変異を持つクローナルな造血が起きていることが報告された(Xie M, et al. Nat Med 2014; Genovese G, et al. N Engl J Med 2014)。ただし、疫学データからも分かる様に、クローナルな造血のごく一部がMDSを発症するのであり、加齢に伴うMDS発症過程の仕組みは依然として不明である。加齢の生物学的意義について、近年の老化モデル生物研究によって、テロメア・酸化ストレス・感染・栄養・代謝など様々な細胞内因性・外因性のシグナル伝達と生体内ネットワークの恒常性破綻が、加齢に伴う疾患発生や病態進展に関与することが認識された。申請者は、こうした複雑系疾病論に基づいた組織・個体レベルでの単一因子のみに依らないゲノム・エピゲノム・蛋白質・代謝物の変異蓄積によるMDS発症過程の分子基盤の統合的な理解を目的とした。

2. 研究の目的

骨髓異形成症候群(MDS)は造血幹細胞より発生する単クローン性造血器腫瘍であり、貧血・易感染性・出血傾向といった造血機能不全症状を認める高齢者に多く発症するがんである。また一部患者は急性骨髄性白血病(AML)に移行し、従来の抗癌剤に抵抗性であり治療困難な疾患群である。唯一の完治が期待できる大量抗癌剤併用・造血幹細胞移植療法に適応がない高齢者の場合は、対症療法や輸血療法のほかにDNAメチル化阻害剤 azacitidine によって輸血依存性の改善効果が期待できる場合もあるが、生命予後延長効果は芳しくない(Silverman LR, et al. J Clin Oncol 2012)。近年の次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析によって、MDSに関与する遺伝子変異の多くが、*TET2*、*DNMT3A*、*EZH2*、*ASXL1* などエピジェネティック制御遺伝子と、*SF3B1*、*SRSF2* などRNAスプライシング因子であることが明らかとなった。エピジェネティック制御は、主にDNAシトシンメチル化とヒストンの後天的化学修飾によってなされる(Int J Hematol 2012)。がんはゲノム変異とエピゲノム変異が複数蓄積した分子病態であり、MDS発症過程において、DNA脱メチル化酵素 *TET2* 機能喪失型変異などに伴うエピゲノム異常が、MDS幹細胞の発生と病態を促進すると示唆されている。一方、細胞分化を制御する転写因子や細胞増殖に直接関与する *NRAS* 活性型変異などは病態後期に獲得される。昨年、驚くべきことに70歳以上の健常高齢者の約5%に *TET2* や *SF3B1* といったMDS同様の遺伝子変異が既に存在しており、造血器腫瘍発症以前からクローナルな造血が起きていることが相次いで報告された(Xie M, et al. Nat Med 2014; Genovese G, et al. N Engl J Med 2014)。ただし、疫学データからも分かる様にクローナルな造血のごく一部がMDSを発症するのであり(70歳以上にて最大0.05%程度)、加齢に伴うMDS発症過程の仕組みは依然として不明である。加齢の生物学的意義に関しては、近年のマウスを含めた老化モデル生物研究によって、テロメア・酸化ストレス・感染・栄養・代謝など様々な細胞内因性・外因性のシグナル伝達と生体内ネットワークの恒常性破綻が、加齢に伴う疾患発生や病態進展に関与することが認識されつつある。こうした知見に基づいて、申請者は個体レベルでの単一因子に依らないゲノム・エピゲノム・蛋白質・代謝物異常の協調作用によってMDS発症に至る仮説を得た(右図参照)。

一般的にがん細胞では、正常組織と比較してゲノムワイドな低メチル化と、CpGアイランドを含めたプロモーター領域のDNA高メチル化が認められる。MDSは *De novo* AMLよりもプロモーター領域DNAがメチル化されており、MDSの病態進展とともにDNA高メチル化が亢進する(Jiang Y, et al. Blood 2009)。研究分担者(松井)はMDS患者20例の造血幹/前駆細胞のmRNAシーケンスを行い、RNAスプライシングパターンを解析した。*TET2* 変異MDS症例では、*TET2* 野生型MDS症例と比較して、DNA高メチル化エクソンに一致してRNAスプライシング変異が生じていることを見出した。実際、DNAメチル化がRNAスプライシング制御に直接関与することは報告されており(Yearim A, et al. Cell Rep 2015)、野生型細胞において選択的エクソンに



における DNA メチル化レベルは恒常的エクソンに比べて低い(Gelfman S, et al. Genome Res 2013)。こうした知見に基づき、“内因性・外因性シグナルによるエピゲノム異常を介した MDS バイオマーカー蛋白によって、加齢に伴うクローナルな造血から MDS 幹細胞へと進展して MDS 発症に至る”仮説を得た。本研究では、遺伝子発現制御・エピゲノム解析・プロテオミクス解析の統合的検証によって MDS バイオマーカーを絞り込む。また、感染ストレスをかけて作製する MDS 予備群老化モデルマウスを用いて、MDS バイオマーカー機能抑制による MDS 発症予防のための基礎的検証も実施する。

3. 研究の方法

MDS 発症過程において、最初期に起こる主な遺伝子変異は *TET2* を始めとしたエピジェネティック制御遺伝子である。従って、MDS は遺伝子変異を契機として発症するエピゲノム疾患であるとも言えるが、組織・個体レベルにおいて様々な要因が協調してクローナル造血から MDS 発症に至る分子基盤は不明である。本研究課題では、始めに、MDS モデルマウスの MDS 幹細胞における DNA 高メチル化と遺伝子発現・選択的 RNA スプライシングや蛋白質レベルでの発現との関連を統合的に解析することで、MDS 病態進展に関与する MDS 責任因子・バイオマーカー候補群を検証した。次に、ヒトでは解析不可能な MDS 発症過程の分子基盤を解明するため、*Tet2* 欠損または *Tet2/Ezh2* 欠損 MDS マウスを用いて、MDS 幹細胞における遺伝子発現解析および DNA メチル化・RNA スプライシング解析を実施した。MDS 病態進展に関与する候補遺伝子・蛋白質の機能解析を、MDS 細胞またはマウスを用いた RNA 干渉またはゲノム編集によって実施することで、新規 MDS バイオマーカーを同定して、その MDS 幹細胞における機能解析を実施する。一方、こうした知見を MDS 予防と新規治療法開発に生かすために、クローナル造血を有する高齢者を再現する環境ストレスを負荷した MDS 予備群高齢モデルマウスを作製した。この MDS 予備群マウスを用いて、臨床で使われている DNA メチル化阻害剤のほかに、MDS 責任因子の発現抑制や機能阻害剤による MDS 発症予防効果の基礎的検証を実施する。以上、本研究課題では、エピゲノム異常を介して生じる MDS バイオマーカーの同定を通して、単一因子に依らない組織・個体レベルでの MDS 幹細胞発生および MDS 病態進展の分子基盤を解明するとともに、MDS 予防のための基礎的検証を実施した。

4. 研究成果

老化をもたらすストレスを契機とした生体内の複雑な生物学的応答のもとで、臓器・個体の機能低下やがんを含めた疾患を発症させる分子メカニズムは明白でない。高齢者に好発する骨髄異形成症候群は造血幹細胞より発生するクローン性造血器腫瘍であり、生涯に涉った環境ストレスによる組織幹細胞の機能低下と疾患発症機構を理解するために、臨床検体を用いた解析に先行させて、マウス生体モデルを用いた遺伝学的解析と検証を展開した。始めに、疫学的なデータから慢性炎症による過剰な炎症性サイトカインが臓器機能を障害することはよく知られているが、日常的な感染のストレスが蓄積して、臓器機能を障害するかは明白ではなかった。本研究において、既存遺伝子発現データを併用した解析からも、炎症ストレスシグナルの亢進と MDS 病態への関与が強く示唆された。そこで、感染ストレスがもたらす造血幹細胞の機能低下と MDS 発症の有無を始めに検証した。ウイルス/細菌感染ストレスを負荷した *Tet2* 欠損造血細胞キメラマウスを作製した。実際、ウイルス/細菌感染ストレスに暴露された野生型幹細胞は増殖活性が有意に低下して、造血機能の低下が認められた。一方、ウイルス/細菌感染ストレス暴露 *Tet2* 欠損幹細胞は、対照的に競合的増殖活性が亢進して有意に MDS を発症した。現在まで、感染ストレスは造血幹細胞の機能低下を引き起こすが、感染ストレス後の幹細胞に遺伝子変異が生じると MDS 発症を促進することが分かった。従って、感染ストレスによるエピゲノム変化が蓄積されて、加齢・前がん幹細胞から MDS が発症する機序が示唆された。こうした知見を元に、MDS 発症を予防するために、感染ストレスシグナルを阻害する治療の検証ほかに、正常な造血機能を有するエピゲノム状態に初期化する試みを引き続き実施している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Balogh P, Aldeman ER, Pluvinage JV, Capaldo BJ, Freeman KC, Singh S, Elagib KE, Nakamura Y, Kurita R, **Sashida G**, Zunder ER, Li H, Price EA, Schrier SL, Weissman IL, Figueroa ME, Pang WW, Goldfarb AN. RUNX3 levels in human hematopoietic progenitors are regulated by aging and dictate erythroid-myeloid balance. **Hematologica** 2019. In press.
2. Kubota S, Tokunaga K, Umezu T, Yokomizo-Nakano T, Sun Y, Oshima M, Tan KT, Yang H, Kanai A, Iwanaga E, Asou N, Maeda T, Nakagata N, Iwama A, Ohyashiki K, Osato M, **Sashida G**. Lineage-specific RUNX2 super-enhancer activates MYC and promotes the development of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. **Nature Commun** 2019; 10: 1653.
3. **Sashida G**, Oshima M, Iwama A. Deregulated Polycomb functions in myeloproliferative neoplasms. **Int J Hematol** 2019 Jan 31. epub ahead of print.
4. Wang C, Oshima M, Sato D, Matsui H, Kubota S, Aoyama K, Nakajima-Takagi Y, Koide S,

- Matsubayashi J, Mochizuki-Kashio M, Nakano-Yokomizo T, Bai J, Nagao T, Kanai A, Iwama A, **Sashida G**. Ezh2 loss promotes transformation of early T-cell precursors by propagating pathogenic DNA hyper-methylation at T-cell developmental regulator genes. **J Clin Invest** 2018; 128(9): 3872-86.
5. Hayashi Y, Zhang Y, Yokota A, Yan X, Liu J, Choi K, Li B, **Sashida G**, Peng Y, Xu Z, Huang R, Zhang L, Freudiger G, Wang J, Dong Y, Zhou Y, Wang J, Wu LY, Bu J, Chen A, Zhao X, Sun X, Chetal K, Olsson A, Watanabe M, Romick-Rosendale L, Harada H, Shih LY, Tse W, Bridges J, Caligiuri M, Huang T, Zheng Y, Witte D, Wang Q, Qu CK, Salomonis N, Grimes L, Nimer S, Xiao Z, Huang G. Pathobiologic Pseudohypoxia as a Putative Mechanism Underlying Myelodysplastic Syndromes. **Cancer Discovery** 2018; 8(11): 1438-1457.
 6. Aoyama K, Oshima M, Koide S, Suzuki E, Mochizuki-Kashio M, Kato Y, Tara S, Shinoda D, Hiura N, Nakajima-Takagi Y, **Sashida G**, Iwama A. Ezh1 Targets Bivalent Genes to Maintain Self-Renewing Stem Cells in Ezh2-Insufficient Myelodysplastic Syndrome. **iScience** 2018; 9: 161-174.
 7. Hasegawa N, Oshima M, **Sashida G**, Matsui H, Koide S, Saraya A, Wang C, Muto T, Takane K, Kaneda A, Shimoda K, Nakaseko C, Yokote K, Iwama A. Impact of combinatorial dysfunctions of Tet2 and Ezh2 on the epigenome in the pathogenesis of myelodysplastic syndrome. **Leukemia** 2017; 31(4): 861-871.
 8. **Sashida G**, Iwama A. Multifaceted role of the polycomb-group gene EZH2 in hematological malignancies. **Int J Hematol** 2017; 105(1): 23-30.
 9. **Sashida G**[#], Wang C, Tomioka T, Oshima M, Aoyama K, Kanai A, Mochizuki-Kashio M, Harada H, Shimoda K, Iwama A[#]. The loss of Ezh2 drives the pathogenesis of myelofibrosis and sensitizes tumor-initiating cells to bromodomain inhibition. **J Exp Med**. 2016; 213(8): 1459-77 [#]corresponding authors

〔学会発表〕（計 9 件）

1. **Sashida G**, Wang C, Oshima M, Aoyama K, Kanai A, Mochizuki-Kashio M, Harada H, Shimoda K, Iwama A. The loss of Ezh2 cooperates with an active JAK2 mutant in the pathogenesis of myelofibrosis and sensitizes tumor-initiating cells to bromodomain inhibition. International Society for Experimental Hematology. 2016 年 08 月 San Diego, USA
2. Aoyama K, Mochizuki-Kashio M, Oshima M, Koide S, Nakajima-Takagi Y, Maeda M, **Sashida G**, Iwama A. Role of the polycomb methyltransferase Ezh1 in myelodysplastic syndrome induced by Ezh2 insufficiency. American Society of Hematology 2016 年 12 月 San Diego, USA
3. **Sashida G**, Wang C, Sato D, Oshima M, Matsui H, Nakajima-Takagi Y, Mochizuki-Kashio M, Iwama A. Ezh2 loss promotes the transformation of ETP-ALL via suppressing T-cell differentiation regulators. 日本血液学会 2016 年 10 月 横浜
4. Yokomizo T, Tanaka D, Sho Kubota S, Oshima M, Harada Y, Kanai A, Iwama A, Harada H, Osato M, **Sashida G**. RUNX3 promotes the development of MDS/MPN overlap syndrome via enhancing expression of Myc in the absence of Tet2. American Society of Hematology 2017 年 12 月 Atlanta, USA
5. **指田吾郎** 骨髄異形成症候群におけるエピジェネティック制御の破綻 日本血液学会・招待講演 2017 年 10 月 東京
6. Bai J, Yokomizo-Nakano T, Kubota S, Iwama A, Harada H, **Sashida G**. Hmga2 promotes the development of MDS/MPN in the absence of Tet2. 日本血液学会 2018 年 10 月 大阪
7. Yokomizo T, Tanaka D, Harada Y, Oshima M, Kanai A, Iwama A, Osato M, Harada H, **Sashida G**. Super enhancer mediated-RUNX3 overexpression promotes myeloid malignancies. The 9th JSH International Symposium 2018 年 7 月 京都
8. Kubota S, Tokunaga K, Oshima M, Umezumi T, Kanai A, Tan KT, Yang H, Iwanaga E, Asou N, Maeda T, Iwama A, Ohyashiki K, Osato M, **Sashida G**. RUNX2 super enhancer promotes the development of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. The 9th JSH International Symposium 2018 年 7 月 京都
9. Kubota S, Tokunaga K, Umezumi T, Yokomizo T, Oshima M, Iwanaga E, Asou N, Iwama A, Ohyashiki K, Osato M, **Sashida G**. Lineage-specific RUNX2 super-enhancer activates MYC via translocation (6;8) to promote the development of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. American Society of Hematology 2018 年 12 月 San Diego, USA

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：松井 啓隆

ローマ字氏名：Matsui Hirotaka

所属研究機関名：熊本大学

部局名：大学院生命科学研究部

職名：教授

研究者番号（8桁）：60379849

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。