

令和元年6月25日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2018

課題番号：17H04990

研究課題名(和文) 骨髄異形成症候群におけるクローン構造の継時的解析

研究課題名(英文) Chronological analysis of clonal architecture in myelodysplastic syndromes

研究代表者

吉里 哲一 (Yoshizato, Tetsuichi)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：70786392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨髄異形成症候群のクローン構造の継時的変化を評価し、臨床判断に有用な分子マーカーを同定することを目的とした。

ARID2の異常を骨髄異形成症候群の約1%の症例に同定し、ARID2異常と巨核球異形成との関連を明らかにした。造血器腫瘍再発モデルとして連続的にMLL/AF9陽性マウス白血病細胞をマウスに移植し、新規標的としてGNB2変異を同定した。スプライシング因子変異より生じるスプライシング異常に関して網羅的に解析し、その標的を同定した。更に、予後不良であるTP53変異陽性例では、一時的ではあるがDNAメチル化阻害剤に対する治療反応性が良好なことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髄異形成症候群は高率に急性骨髄性白血病へ高率に移行する予後不良の血液腫瘍である。骨髄異形成症候群は高齢者に多く、今後高齢化社会の進行により発症率は上昇すると考えられ、予後を改善することは非常に重要である。本研究では、骨髄異形成症候群に生じているゲノム異常を様々な手法を用いて評価し、ARID2やGNB2などの新規標的遺伝子を多数同定した。また、TP53変異は非常に予後の悪い変異として知られているが、DNAメチル化阻害薬が一時的にはあるものの有効であることを明らかにした。DNAメチル化阻害薬投与後に同種造血幹細胞移植を実施することで予後が改善できる可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to identify the molecular markers of myelodysplastic syndromes through evaluating the chronological change of clonal architectures. We found genetic abnormalities involving ARID2 in about 1% of cases and revealed its association with megakaryocyte dysplasia (Sakai H et al. Leukemia 2018). MLL/AF9 positive mouse leukemia cells were serially transplanted to mice by mimicking repeated recurrences. Through this experiment, we identified GNB2 mutation as a novel target (Kotani S et al. Leukemia 2019). In myelodysplastic syndromes, splicing factors are the most common targets of mutations. We comprehensively analyzed splicing abnormalities caused by splicing factor mutations and identified their targets (Shiozawa Y et al. Nat Com 2018). We revealed that cases with TP53 mutations, which is a well-known poor prognostic marker, showed a relatively good response to DNA methylation inhibitor Azacitidine, although this response was not durable (in preparation).

研究分野：ゲノム解析

キーワード：骨髄異形成症候群 ゲノム解析 遺伝子変異

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndromes: MDS)は無効造血による血球減少と二次性の急性骨髄性白血病(secondary acute myeloid leukemia: sAML)へ高率に移行する前白血病病態に特徴付けられる難治性慢性骨髄性腫瘍であり、この造血不全と白血病への移行により MDS の予後は左右される。しかしながら骨髄異形成症候群は、不均一な疾患であり、疾患内多様性が高く、個々の患者により、造血不全の程度、白血病移行のリスクは大きく異なる。また骨髄異形成/骨髄増殖性腫瘍(myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms: MDS/MPN)は、2008年の WHO 分類改訂以前は骨髄異形成症候群と同一カテゴリーに分類されていたが、臨床所見や予後の違いから 2008 年の改定で新たな疾患カテゴリーとして分類されるようになった。しかしながら骨髄異形成/骨髄増殖性腫瘍と骨髄異形成症候群はしばしば相互移行することが知られており、これら 3 疾患(骨髄異形成症候群、二次性の急性骨髄性白血病(骨髄異形成/骨髄増殖性腫瘍)には何らかの遺伝的共通基盤が存在していることを示唆している。

一方で、骨髄異形成症候群に対する次世代シーケンサを用いた変異解析は、我々の研究室も含め、近年全世界的に精力的に実施されており、SF3B1、U2AF1、SRSF2、ZRSR2 などのスプライシング因子、DNMT3A や TET2、IDH1/2、ASXL1、EZH2 などのエピジェネティック関連分子などの遺伝子異常が同定されており (Yoshida et al. Nature 2011, Bejar R et al., N Engl J Med. 2011; Haferlach T et al., Leukemia 2014; Papaemmanuil E et al., Blood 2014)、骨髄異形成症候群における遺伝子異常の全貌が明らかになりつつある。また、TP53、RUNX1、ASXL1 などの一部の遺伝子変異は不良な予後と関与することを我々及び他のグループが報告している (Bejar R et al., N Engl J Med. 2011, Haferlach T et al., Leukemia 2014; Papaemmanuil E et al., Blood 2014)。

しかしながら症例内のクローン構造の評価は検出されたアレル頻度が推定してものがほとんどであり、クローンの継時的な挙動は少数例でしかなされておらず (Walter M.J. et al. N Engl J Med. 2012, Walter M.J. et al. Leukemia 2013, Mossner M et al. Blood 2016, Ojames P et al. Leukemia 2016)、どのようなクローンを持っていると二次性の急性骨髄性白血病(に移行しやすいか、二次性の急性骨髄性白血病(への進展においてどのような変異が獲得されるか、進展した際に元のクローンはどうなっているか)に関しては知見が乏しい。また臨床では治療が奏効しているにもかかわらずクローンが残存している場合、消失群と予後が異なる可能性があるが治療反応性と特定のクローンの挙動に関する知見も乏しい。

骨髄異形成症候群における唯一の根治的治療は、同種造血幹細胞移植であるが、感染症やドナー・レシピエント間の免疫応答に起因する移植片対宿主病などの合併症、生着不全、再発などにより、同種造血幹細胞移植は移植関連死亡が高く、長期的な生存は約 40%の症例でしか得られない。我々は現在、日本骨髄バンクより移植前検体を用いて移植前ゲノム異常の予後に及ぼす影響を解析しており、TP53 変異や RAS pathway の変異、複雑核型などの因子が独立した予後不良因子として同定された。しかし、この研究では、継時的な検体を得ることができず、移植後の再発に先行してどのようなクローン構造の変化が生じているかに関する知見は乏しい。クローンの経時的挙動を理解することで、骨髄異形成症候群の病態の解明につながり、また個々の症例のより正確な予後予測が可能になり、適切な治療の選択をすることで予後の改善・医療費の削減につながると考えられ、骨髄異形成症候群の経時的に採取された検体を用いたゲノム解析とその解析データを用いた予後への影響に対するエビデンスの構築を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、継時的に採取された骨髄異形成症候群とその関連疾患患者由来の DNA 検体を用いて、次世代シーケンサによる体細胞変異の同定、また同定された変異の経時的挙動を評価することで、骨髄異形成症候群の病型の移行や治療介入、その後の再発に伴うクローン構造の変化を明らかにすることを目的とする。更に臨床データとともに統合的に解析することにより、臨床判断に有用な予後予測マーカーを同定することを目的とする。

また骨髄異形成症候群における唯一の根治的治療法である同種造血幹細胞移植前後におけるクローン構造の変化を評価することで、移植後再発に関連するマーカーを同定し、早期介入による予後改善の可能性を検討する。

3. 研究の方法

日本国内・海外の共同研究先にて採取された末梢血または骨髄由来の DNA、RNA 検体に対して、骨髄異形成症候群の主要標的遺伝子を標的とした標的シーケンスを実施した。シーケンスデータを解析し、体細胞変異・コピー数異常を同定した。継時的検体も併せてシーケンスすることでその挙動を評価した。一部検体に関してはより網羅的にクローン構造を評価するために、全エキソンシーケンス・全ゲノムシーケンスを実施、スプライシング異常・発現解析を実施するために RNA シーケンスを実施した。臨床データとともに包括的にデータ解析を実施し、特定の治療に対する変化や病型進展に伴うクローン構造の変化を評価した。また臨床上有用な分子マーカーの抽出や機能解析も実施した。

4. 研究成果

1) 骨髄性腫瘍の新規ドライバー遺伝子である ARID2 を大規模コホートで評価し、約 1%の症

例に変異またはコピー数異常が認められること、変異は主要進展の初期段階で獲得されていることを明らかにした。また ARID2 変異/欠失と巨核球異形成との関連を明らかにした(Sakai H et al. Leukemia 2018)。

2) 造血器腫瘍は治療により寛解に至った後も、しばしば再発する。造血器腫瘍再発モデルとして連続的に MLL/AF9 陽性マウス白血病細胞を C57BL/6 マウスに移植した。移植の回数を重ねるにつれ、再発期間が短くなり、ゲノム異常も蓄積することを明らかにした。さらに新規標的として GNB2 変異を同定し、その機能を評価した(Kotani S et al. Leukemia 2019)。

3) 骨髄異形成症候群では約 1/3 の症例においてスプライシング因子が変異しているが、RNA シーケンスを実施し、スプライシング因子変異より生じる RNA スプライシング異常に関して網羅的に解析し、スプライシング異常の標的遺伝子を同定した(Shiozawa Y et al. Blood 2017, Shiozawa Y et al. Nat Com 2018)。

4) 健常人においても加齢に伴い変異を持った造血細胞のクローン性拡大が認められ、clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP)と呼ばれている。この CHIP 陽性例では、骨髄異形成症候群を含めた造血器腫瘍発症のリスクが陰性例に比べ高いことが知られているが、造血器腫瘍発症の必要十分条件は不明である。本研究では、CHIP の変異スペクトラムを骨髄異形成症候群の変異スペクトラムと比較し、変異獲得の順序、骨髄異形成症候群症例における予後への影響を評価した(論文投稿中)。

5) TP53 変異陽性の骨髄異形成症候群症例の予後は、極めて不良である。骨髄異形成症候群における唯一の根治的治療は、同種造血幹細胞移植であるが、この同種造血幹細胞移植を実施しても TP53 変異陽性例の大多数の症例は、早期再発をきたす。本研究では TP53 変異陽性例では、一時的ではあるが DNA メチル化阻害剤であるアザシチジンに対する治療反応性が良好なことから、アザシチジン投与後にクローンサイズが縮小する傾向があることを明らかにした(論文準備中)。アザシチジンによる TP53 変異クローン縮小後に、同種造血幹細胞移植を実施することで TP53 変異陽性例の予後を改善できる可能性が示唆される。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

1. Kotani S, Yoda A, Kon A, Kataoka K, Ochi Y, Shiozawa Y, Hirsch C, Takeda J, Ueno H, Yoshizato T, Yoshida K, Nakagawa MM, Nannya Y, Kakiuchi N, Yamauchi T, Aoki K, Shiraishi Y, Miyano S, Maeda T, Maciejewski JP, Takaori-Kondo A, Ogawa S, Makishima H. Molecular pathogenesis of disease progression in MLL-rearranged AML. *Leukemia*. 2019 Mar;33(3):612-624. doi: 10.1038/s41375-018-0253-3.
2. Shiozawa Y, Malcovati L, Galli A, Sato-Otsubo A, Kataoka K, Sato Y, Watatani Y, Suzuki H, Yoshizato T, Yoshida K, Sanada M, Makishima H, Shiraishi Y, Chiba K, Hellström-Lindberg E, Miyano S, Ogawa S, Cazzola M. Aberrant splicing and defective mRNA production induced by somatic spliceosome mutations in myelodysplasia. *Nat Commun*. 2018 Sep 7;9(1):3649. doi: 10.1038/s41467-018-06063-x.
3. Kon A, Yamazaki S, Nannya Y, Kataoka K, Ota Y, Nakagawa MM, Yoshida K, Shiozawa Y, Morita M, Yoshizato T, Sanada M, Nakayama M, Koseki H, Nakauchi H, Ogawa S. Physiological Srsf2 P95H expression causes impaired hematopoietic stem cell functions and aberrant RNA splicing in mice. *Blood*. 2018 Feb 8;131(6):621-635. doi: 10.1182/blood-2017-01-762393.
4. Sakai H, Hosono N, Nakazawa H, Przychodzen B, Polprasert C, Carraway HE, Sekeres MA, Radivoyevitch T, Yoshida K, Sanada M, Yoshizato T, Kataoka K, Nakagawa MM, Ueno H, Nannya Y, Kon A, Shiozawa Y, Takeda J, Shiraishi Y, Chiba K, Miyano S, Singh J, Padgett RA, Ogawa S, Maciejewski JP, Makishima H. A novel genetic and morphologic phenotype of ARID2-mediated myelodysplasia. *Leukemia*. 2018 Mar;32(3):839-843. doi: 10.1038/leu.2017.319.
5. Shiozawa Y, Malcovati L, Galli A, Pellagatti A, Karimi M, Sato-Otsubo A, Sato Y, Suzuki H, Yoshizato T, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, Makishima H, Boulwood J, Hellström-Lindberg E, Miyano S, Cazzola M, Ogawa S. Gene expression and risk of leukemic transformation in myelodysplasia. *Blood*. 2017 Dec 14;130(24):2642-2653. doi: 10.1182/blood-2017-05-783050.
6. Negoro E, Nagata Y, Clemente MJ, Hosono N, Shen W, Nazha A, Yoshizato T, Hirsch C, Przychodzen B, Mahfouz RZ, Kuzmanovic T, Sekeres MA, Makishima H, Ogawa S, Maciejewski JP. Origins of myelodysplastic syndromes after aplastic

〔学会発表〕(計 5件)

1. Yoshizato T. Impact of genetic alterations in stem cell transplantation for myelodysplastic syndromes. The 80th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Osaka, Japan. 2018/10/14
2. Yoshizato T. Impact of genetic abnormalities on outcome in patients with MDS after stem-cell transplantation. The Nordic MDS Group (NMDSG) meeting 2017 autumn. Stockholm, Sweden. 2017/11/09
3. Yoshizato T. Somatic mutation in MDS and its effect on outcome. The 79th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Tokyo, Japan. 2017/10/22
4. Yoshizato T, Nannya Y, Atsuta Y, Shiozawa Y, Yoshida K, Onizuka M, Kataoka K, Chiba K, Tanaka H, Shiraishi Y, Sanada M, Itonaga H, Kanda Y, Miyazaki Y, Miyano S, Makishima H, Ogawa S. U2AF2 mutations in myelodysplastic syndromes. The 79th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Tokyo, Japan. 2017/10/21
5. Yoshizato T, Nannya Y, Atsuta Y, Shiozawa Y, Yoshida K, Kataoka K, Shiraishi Y, Sanada M, Kanda Y, Miyazaki Y, Miyano S, Makishima H, Ogawa S. U2AF2 mutations in myelodysplastic syndromes. The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Yokohama, Japan. 2017/09/29

〔図書〕(計0件)

該当なし

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。