

令和元年5月27日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16181

研究課題名(和文) 家族性骨髄異形成症候群の原因遺伝子の探索および機能解析

研究課題名(英文) Investigation of a causal gene of familial myelodysplastic syndromes and its molecular mechanism

研究代表者

高岡 賢輔 (TAKAOKA, KENSUKE)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60793180

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：家族性骨髄異形成症候群の原因遺伝子変異候補としてHLTF変異に注目し分子機能解析を施行した。HLTF変異体とMMS2における結合能がHLTF野生型に比し低下していることを示した。Hltfノックダウン移植マウスを作製し、移植骨髄細胞におけるc-kit陽性率はHltfノックダウン細胞で増加しておりHltfの機能低下がrepopulation capacityの増加へ関与することを示した。家族性骨髄異形成症候群2検体を用いて変異スペクトラム解析を施行した。2検体共にBRCA変異シグネチャーを認めこれにより本研究の家族性骨髄異形成症候群検体においてDNA二本鎖修復障害が実際に起こっていることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先行研究と併せ、家族性骨髄異形成症候群(MDS)の家系を用いて未報告のHLTF E259K 生殖細胞変異を同定し、患者検体においてDNA二本鎖切断修復低下を示唆するBRCA変異シグネチャーを明らかにした。分子機構として、HLTF変異体とMMS2との複合体形成能が低下し、(先行研究と併せ)PCNAポリユビキチン化が障害されていることを示した。稀少疾患であり分子機構も未知の部分が多い家族性MDSの検体を用いて全エクソンシーケンスを施行し未報告の生殖細胞変異を同定、さらには機能解析まで施行した本研究の意義は大きいと考えられる。今後HLTFと血液腫瘍のさらなる解析が望まれる。

研究成果の概要(英文)：Previous our research revealed that HLTF E259K is one of the candidate gene mutations of familial MDS. Molecularly, we found that an E259K mutation reduced the binding capacity of HLTF with MMS2. In murine bone marrow transplantation experiments, we revealed that the peripheral blood chimerism of the recipients with Hltf knockdown cells tended to be greater than that of control mice. We also found that the bone marrow c-kit positivity was also increased in Hltf shRNA-transduced cells compared with control-transduced cells in the bone marrow transplantation assay. To evaluate whether the HLTF mutation actually contributes to a DNA double-strand break repair deficiency, we performed mutation signature analysis of somatic mutations in samples of both MDS patients. BRCA mutational signature was detected in both familial MDS patients, suggesting that a DNA double-strand break repair was impaired in the HLTF-mutated familial MDS somatic samples.

研究分野：血液・腫瘍学

キーワード：家族性骨髄異形成症候群

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(MDS)は遺伝子異常をもつ造血幹細胞によって生じる単クローン性の造血器腫瘍であり、単一あるいは複数の血球系の減少、形態学的異形成、骨髄での無効造血、および急性骨髄性白血病の発症リスクを特徴とする。MDSの半数以上に染色体異常を認め未分化な造血細胞に生じた遺伝子異常が発症に関与するとされ、それらの遺伝子異常(代表的には *TET2*、*ASXL1*、*RUNX1*、*TP53*、*EZH2*、*NRAS*、*ETV6*、*CBL*、*IDH2* など)は次々に同定されてきてはいるが(N Engl J Med 2011;364:2496-506)その全貌は明らかではない。MDS重症例では、生存期間中央値8ヶ月程度と予後不良であり(Blood 2012;120(12):2454-65)病態の全貌の解明と新たな治療法の開発は急務である。

近年家族性に発症するMDSの存在が明らかになってきた(Br J Haematol 1993;84:536-8)。世界で60以上の家族性MDS家系の報告があり、大規模な調査としては英国からの27家系が大きい(Br J Haematol. 2012;158(2):242-8)。家族性MDSの原因として、生殖細胞における *GATA2* 遺伝子変異(Nat Genet 2011;43(10):1012-7)や *RUNX1*(Ther Adv Hematol 2013;4(4):254-69)、*CEBPA*(N Engl J Med 2004;351:2403-7)などの遺伝子変異が報告されてきたが、疾患概念が新しいこともあり、その機序や病態は未だに解明されていない。そこでわれわれは家族性MDSについてその原因となる遺伝子変異を同定し病態を解明するために本研究を行った。

われわれの先行研究にて1家系に4名のMDSを認める家系を用い、全エクソシーケンスを施行し最終的に12の生殖細胞の候補遺伝子変異を同定した。コロニーフォーミングアッセイにより、12の候補遺伝子の1つである *Hltf*(*helicase-like transcription factor*)をノックダウンしたマウス骨髄細胞の半固形培地におけるコロニー継代数が延長することを明らかにした。これらの結果よりわれわれは *HLTF* 変異が家族性MDSの病態に関与しているとの着想に至り *HLTF* の機能解析を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、家族性MDSの原因遺伝子を同定し、その遺伝子異常の機能解析から家族性MDSの病態を明らかにすること、および標的遺伝子が今後の治療標的になり得るかを検討することである。

3. 研究の方法

HLTF の *in vitro* および *in vivo* での機能解析

HLTF 変異体の家族性MDSに対する寄与を評価するため *HLTF* 変異体の機能を解析する。*HLTF* は *SWI/SNF* 複合体形成および増殖細胞核抗原(PCNA)のポリユビキチン化等を介しDNA修復機能を有することが知られているが(PNAS 2008 Mar 11;105(10):3768-73)これらの機能が *HLTF* 変異体で保持されるか *in vitro* の系で解析する。さらに *Hltf* 変異を導入、および野生型 *Hltf* をノックダウンしたマウス移植モデルの系で *Hltf* 異常がMDS発症に与える影響を解析する。

4. 研究成果

(1) *HLTF* 変異体の *in vitro* での機能解析

最初に shRNA の系を用い *HLTF* をノックダウンしたヒト赤白血病細胞株(HEL)および empty vector (EV)、*HLTF* 野生型、変異体を過剰発現したHELを用いて細胞増殖能を解析した。*HLTF* ノックダウン細胞はEV過剰発現細胞(コントロール細胞)と比し増殖能に有意差を認めなかった。*HLTF* 過剰発現の系においてもコントロール細胞に比し *HLTF* 野生型、変異体過剰発現細胞の増殖能に有意差を認めなかった。同様の系にて Annexin V を用いアポトーシスについて解析した。*HLTF* ノックダウン細胞はコントロール細胞と比し apoptosis status に有意差を認めず、EV過剰発現細胞と比し *HLTF* 変異体においても apoptosis status に有意差を認めなかった。

HLTF 野生型(WT)は *MMS2/UBC13* と結合し、増殖細胞核抗原(PCNA)をポリユビキチン化することが報告されている(上記PNAS2008)。*HLTF* 変異体と *MMS2*、*PCNA* における結合能について免疫沈降法を用いて評価した。HEK293T細胞を用いた *HLTF* 過剰発現の系で、*HLTF* 変異体と *MMS2* の結合が *HLTF* 野生型との結合に比し減弱することが免疫沈降法により示唆された(図1)。同様に *HLTF* 変異体と *PCNA* の結合について免疫沈降法を用いて評価したが *PCNA* については *HLTF* 野生型、変異体の結合能に差を認めなかった(図2)。

(2) *HLTF* の *in vivo* での機能解析

p53ヘテロノックアウトマウスの骨髄細胞にEV、*HLTF* 野生型、変異体を過剰発現し致死量放射線を照射したC57BL/6マウスに移植するマウス骨髄移植モデルを作製した。*HLTF* 野生型、変異体を過剰発現した細胞の末梢血キメリズムを観察したが、評価するに十分なキメリズムを得られなかった(ベクターの長さに伴う感染効率の問題等が考えられた)。

そこで、shRNAの系を用いて正常マウス(C57BL/6)c-kit陽性骨髄細胞の *Hltf* をノックダウンした細胞を致死量放射線を照射したC57BL/6マウスに移植し *Hltf* ノックダウンマウスを作製し解析する方針とした。*Hltf* 機能低下の造血幹細胞/前駆細胞における影響を調べるため、移

植マウスにおける移植細胞の末梢血キメリズムおよび c-kit 陽性率（移植骨髓細胞）を探索した。末梢血キメリズムはコントロールに比し、*Hltf* ノックダウン細胞で増加する傾向にあった（図3）。移植マウスの移植骨髓細胞における c-kit 陽性率はコントロールに比し、*Hltf* ノックダウン細胞で増加しており（図4）これらの結果は *Hltf* の機能低下が repopulation capacity の増加へ関与することが示唆された。

(3) 変異スペクトラム解析

本研究で得られたこの *HLTF* 変異が実際に DNA 修復の低下に寄与しているかを探索するため、家族性 MDS2 検体（末梢血検体）の全エクソンシーケンスの結果を用いて変異スペクトラム解析（mutation signature analysis）を施行した。その結果、家族性 MDS の 2 検体共に DNA 二本鎖切断修復の低下を示唆する BRCA 変異シグネチャーを認めた。これにより本研究の家族性 MDS 検体において DNA 修復障害が実際に起こっていることが示された。

先行研究の結果および以上の結果より、家族性 MDS 家系より全エクソンシーケンスによって同定した未報告の *HLTF* 変異により、MMS2、UBC13 との結合能低下を介し、PCNA のポリユビキン化が損なわれ、DNA 修復が障害されていることが示唆された（図5）。

図 1

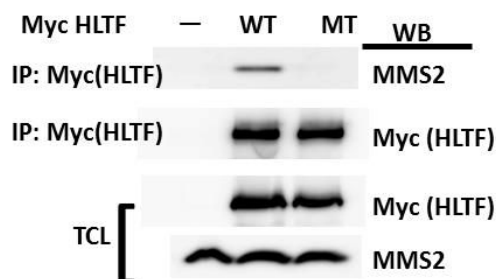


図 2

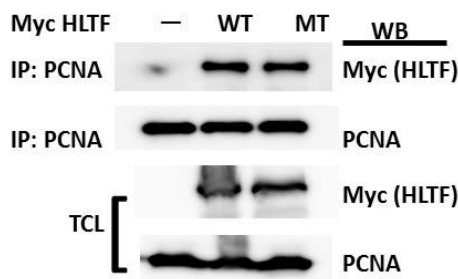


図 3

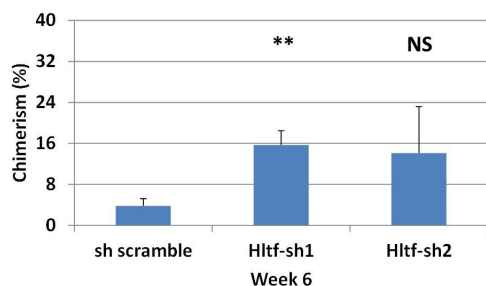


図 4

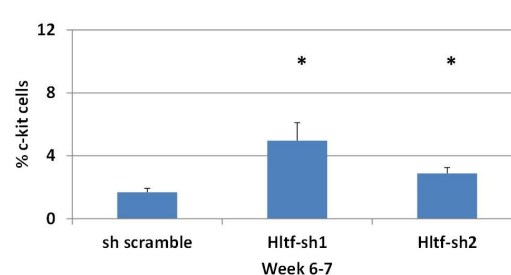
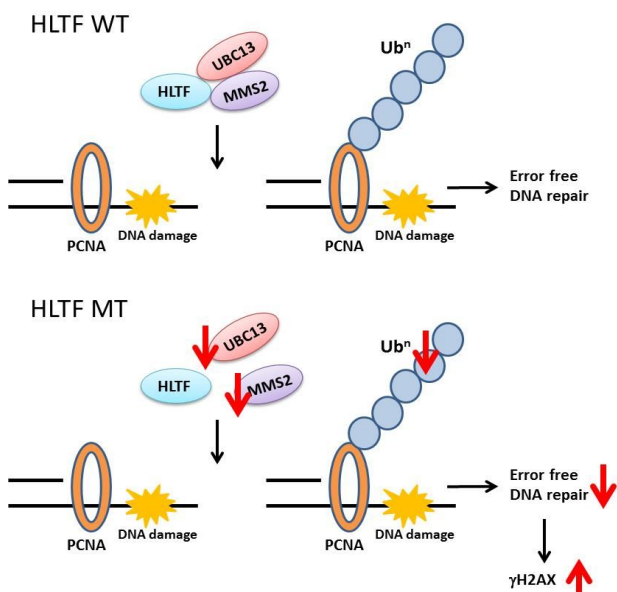


図 5



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Takaoka K^{*}, Kawazu M^{*}, Koya J, Yoshimi A, Masamoto Y, Maki H, Toya T, Kobayashi T, Nannya Y, Arai S, Ueno T, Ueno H, Suzuki K, Harada H, Manabe A, Hayashi Y, Mano H, Kurokawa M. A germline *HLTF* mutation in familial MDS induces DNA damage accumulation through impaired PCNA polyubiquitination.

Leukemia. 査読有 2019 Jan 29. (巻名、ページ数、現時点未) *co-first

DOI: 10.1038/s41375-019-0385-0.

〔学会発表〕(計 3 件)

高岡賢輔、家族性 MDS における HLTF 変異により PCNA のポリユビキチン化が損なわれ DNA 損傷が蓄積する、第 79 回日本血液学会学術総会、2017 年

高岡賢輔、家族性骨髄異形成症候群から得られた HLTF 変異により PCNA のポリユビキチン化が損なわれ DNA 損傷が蓄積する、第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年

高岡賢輔、Human Germline HLTF E259K Mutation Identified in Familial MDS Patients Accumulates DNA Damage through Impaired PCNA Polyubiquitination、59th ASH Annual Meeting & Exposition、2017 年

〔その他〕

ホームページ等：なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者：なし

(2)研究協力者：なし

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。