

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08835

研究課題名(和文) 骨髄増殖性腫瘍とその二次性白血病における initiating 変異の同定と機能解析

研究課題名(英文) Initiating mutations in myeloproliferative neoplasms and secondary acute myeloid leukemia

研究代表者

牛島 洋子 (Ushijima, Yoko)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：6075552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄増殖性腫瘍(MPN)から転化した二次性急性骨髄性白血病(sAML)の一部はMPNドライバー変異を欠き、MPNとsAMLに共通したinitiating変異の重要性が示唆されている。JAK2変異陰性sAML症例においてMPN期と共通して検出されたZNF143、SMARCC2、UBR4変異をinitiating変異候補として検討した。MPNおよび/またはsAML症例80例における遺伝子変異解析ではこれら変異の普遍性は示されなかった。3遺伝子変異陽性症例のsAML寛解期検体における単一細胞を用いた変異解析から、多発多段階の変異獲得によると考えられる多様な変異パターンが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、MPN-sAML症例ペア検体を含む多数症例検体における解析により、MPNおよびsAMLが症例間においても1症例内においても多彩な進展形式をとることが示され、MPNから転化したsAMLが極めて難治性で予後不良である一因と考えられた。sAMLはMPN発症から10年前後の長期間を経て生じ、また、その頻度は高くないことから、今回集積された検体は新たなアプローチによる病態解明を今後図るうえでも意義を有すると考えられる。

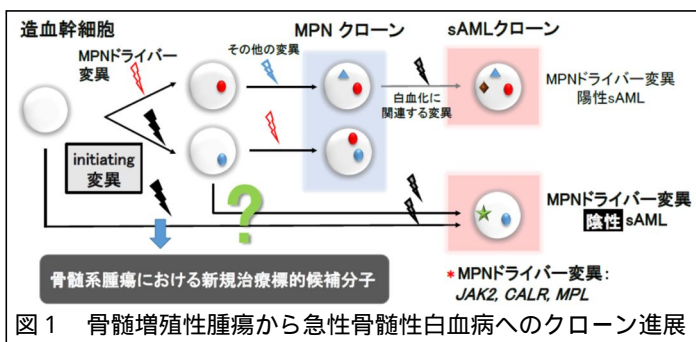
研究成果の概要(英文)：Acute myeloid leukemia secondary to Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms (MPNs) often lacks a driver mutation in MPN such as JAK2V617F, which indicates initiating mutations common to both MPN and secondary AML (sAML) play a key role in their occurrence and development. We selected mutations in ZNF143, SMARCC2 and UBR4, which were detected in a patient with sAML without MPN driver mutation, as candidates for initiating mutations in this study. Genetic analysis of 80 patients with MPN and/or sAML revealed that these mutations are uncommon in MPN and sAML. Single-cell analysis of a sample taken from the sAML patient with these three mutations during complete remission revealed diverse patterns of mutations, which indicates multiclonal and multistep tumorigenesis in MPN and sAML.

研究分野：血液内科、造血器腫瘍

キーワード：骨髄増殖性腫瘍 急性骨髄性白血病 クローン進展

### 1. 研究開始当初の背景

(1) フィラデルフィア染色体陰性骨髄増殖性腫瘍 (MPN) から転化した二次性急性骨髄性白血病 (sAML) は治療抵抗性で急性白血病の中でも極めて予後不良である。MPN から転化した sAML の一部は *JAK2* 変異などの MPN ドライバー変異を欠く。このことは、MPN ドライバー変異以外の MPN と sAML に共通した initiating 変異が、MPN および sAML の発生に重要であることを示唆する (図 1)。MPN および sAML における initiating 変異の同定とその機能解明は、骨髄系腫瘍の分子基盤解明、さらに、新たな治療標的候補分子の同定につながると考えられる。



(2) 申請者らは、*JAK2* 変異陽性 MPN から *JAK2* 変異陰性 sAML を発症した 1 症例における遺伝子変異解析から、MPN と sAML にほぼ同アレル頻度で検出される変異を有する 3 遺伝子: *ZNF143*, *SMARCC2*, *UBR4* を同定した。*ZNF143* は転写因子として骨髄系分化に必須な転写因子の発現亢進に関与し、固形腫瘍で高発現しており、MPN 1 例において変異が報告されている。*SMARCC2* は SWI/SNF クロマチンリモデリング複合体の構成因子であり、SWI/SNF 複合体の各サブユニットでは欠失や変異が悪性腫瘍で高頻度で検出されている。悪性腫瘍との関連は未報告である *UBR4* と共に、これらの遺伝子は initiating 変異候補であると考えられ、本研究での解析対象とした。

### 2. 研究の目的

MPN および sAML 多数症例検体を用いた解析により MPN と sAML に共通して検出された initiating 変異候補: *ZNF143*, *SMARCC2*, *UBR4* 変異の骨髄系腫瘍における普遍性について検討し、また、変異遺伝子の機能解析を行うことで、骨髄系腫瘍における initiating 変異の同定と意義の解明を図る。

### 3. 研究の方法

(1) 標的遺伝子変異検出系の確立: *ZNF143*, *SMARCC2*, *UBR4* 各遺伝子の全エクソン、および、MPN ドライバー変異である *JAK2*, *CALR*, *MPL* 変異をターゲットとした次世代シーケンシング (NGS) 系の確立を、Nextera XT キット®および Miseq®を用いて図った。

(2) 標的遺伝子変異の MPN および sAML 症例における検討: MPN および sAML 症例の骨髄または末梢血検体を集積し、解析対象とした。集積検体から DNA を抽出し、確立した NGS 系を用い、*ZNF143*, *SMARCC2*, *UBR4*, *JAK2*, *CALR*, *MPL* について変異解析を行った。また、sAML 検体においては、骨髄系腫瘍に関与する 54 遺伝子の変異についても既に確立された NGS 系を用いて解析を行った。

(3) sAML 寛解期検体における NGS 解析および単一細胞変異解析: *ZNF143*, *SMARCC2*, *UBR4* 変異を有する sAML 症例の完全寛解期骨髄検体を用い、正常造血幹細胞および残存する白血病幹細胞が存在すると思われる lineage マーカー陰性 CD34 陽性 CD38 陰性 (Lin-CD34+CD38-) 分画細胞をセルソーターを用いて分取し、sAML 検体において認められた遺伝子変異について NGS 解析を行った。また、同分画において単一細胞を分取し、本研究の背景となった解析時の条件からサンガーシーケンシング条件を改良し、単一細胞レベルでの遺伝子変異について解析した。

### 4. 研究成果

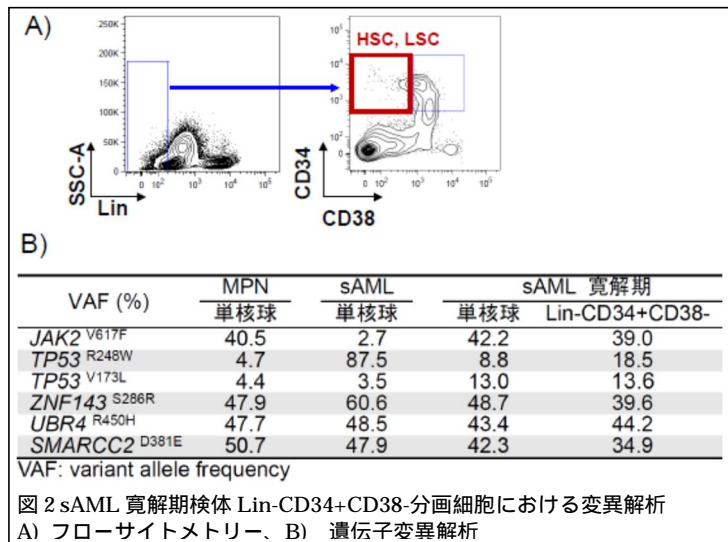
(1) 標的遺伝子変異検出系の確立: *ZNF143* および *SMARCC2* では全エクソン、*UBR4* では 106 エクソン中 102 エクソン、また、MPN におけるドライバー変異である *JAK2*, *CALR*, *MPL* の各変異を解析対象とした NGS による DNA 変異解析系を確立した。

(2) MPN-sAML 症例ペア検体での遺伝子変異解析: 新たに集積された 3 症例のペア検体における骨髄系腫瘍関連遺伝子変異の NGS 解析では、2 例は MPN ドライバー変異陽性 sAML (*JAK2*, *MPL* 変異各 1 例)、1 例は MPN ドライバー変異 (*JAK2* 変異) 陰性 sAML であることが示された。既に集積されていた 6 症例と併せた MPN-sAML ペア検体 9 症例において、MPN

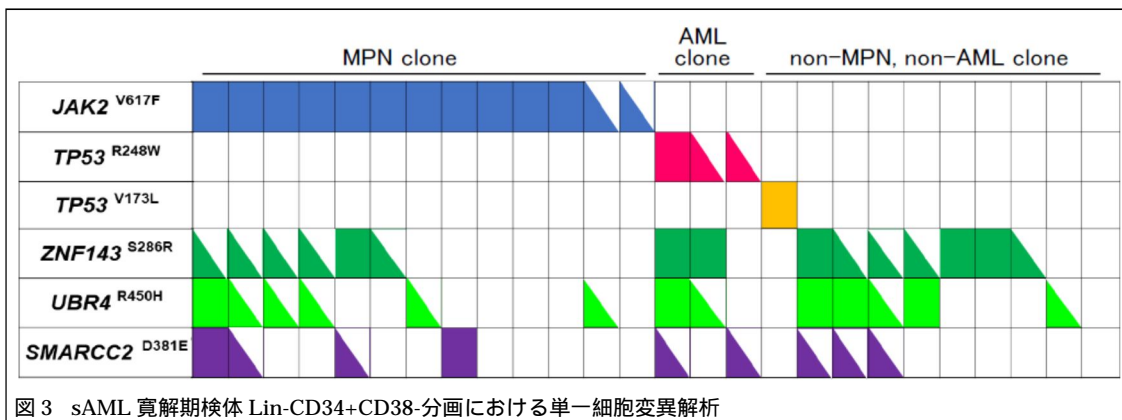
ドライバー変異は *JAK2* 変異 6 例、*CALR* 変異 1 例、*MPL* 変異 1 例、*CALR* 変異と *MPL* 変異の重複 1 例であり、MPN 変異陰性 sAML3 例（いずれも MPN ドライバー変異は *JAK2*）、同変異陽性 sAML6 例であった。MPN 検体では他に *TET2*、*TP53* に 3 例、*ASXL1* に 2 例、*EZH2*、*PHF6* に各 1 例で変異が認められた。sAML 検体では 9 例中 MPN ドライバー変異陰性 3 例を含む 7 例において *TP53* 変異が検出され、他に MPN 検体と比較して新たに獲得された変異として *NRAS* に 2 例、*CBL*、*RUNX1*、*CEBPA*、*SRSF2*、*U2AF1*、*IDH2*、に各 1 例で変異が認められた。

(3) 標的遺伝子変異の MPN および sAML 症例における検討：MPN-sAML ペア検体症例 9 例を含む全 80 例、MPN80 検体、sAML13 検体における *ZNF143*、*SMARCC2*、*UBR4* 変異の NGS 解析では、既同定の 1 例を除き、これら遺伝子に変異は認められなかった。この結果より、*ZNF143*、*SMARCC2*、*UBR4* 変異は、本研究の端緒となった症例における initiating 変異である可能性があるものの、骨髄系腫瘍において普遍性を有する可能性は高くないと考えられた。そこで、これら遺伝子変異の機能解析を行う当初の計画を変更し、これら変異を有する sAML 症例におけるクローン進展について、本研究で確立した NGS 系を用い、解析をさらに進めることとした。

(4) sAML 寛解期検体における NGS 解析：Lin-CD34+CD38- 分画細胞における NGS 解析では、MPN と比較して AML において高頻度に認められ sAML クローンに特徴的と考えられる *TP53* <sup>R248W</sup> 変異が、単核球と比較してより高頻度に認められ、寛解期において白血病細胞が残存する分画であることが示唆された。一方、*ZNF143*、*SMARCC2*、*UBR4* 変異は Lin-CD34+CD38- 分画細胞において単核球と同頻度に認められ、MPN および sAML 発生のより早期に獲得されている変異であることが示唆された (図 2)。



(5) sAML 寛解期検体における単一細胞変異解析：Lin-CD34+CD38- 分画から分取した単一細胞 96 検体のうち 26 検体において、sAML において認められた 5 遺伝子変異 (図 2B) において解析が可能であった。変異の検出頻度は分画全体における NGS 解析における変異頻度 (図 2B) とほぼ合致した。*JAK2* <sup>V617F</sup> と *TP53* <sup>R248W</sup> とは同一細胞には検出されず、*ZNF143*、*SMARCC2*、*UBR4* 変異は *JAK2* <sup>V617F</sup> 陽性細胞と *TP53* <sup>R248W</sup> 陽性細胞いずれにおいても検出された (図 3)。これらより、*ZNF143*、*SMARCC2*、*UBR4* 変異を有する細胞から MPN クローンと AML クローンとが各々生じたことが示唆された。一方で、これら変異を有しない *JAK2* <sup>V617F</sup> 陽性細胞も複数認められ、異なる細胞または時期に *JAK2* 変異が獲得されたことが示唆され、最近報告された MPN における多発多段階の変異獲得による発生過程の一端を示すものと考えられた (文献 1)。*ZNF143*、*SMARCC2*、*UBR4* 変異は本研究で解析対象とした sAML 症例における initiating 変異である可能性を改めて示すとともに、骨髄系腫瘍における非常に複雑で多彩なクローン進展を示すものである。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawashima N, Ishikawa Y, Kim JH, Ushijima Y, Akashi A, Yamaguchi Y, Hattori H, Nakashima M, Ikeno S, Kihara R, Nishiyama T, Morishita T, Watamoto K, Ozawa Y, Kitamura K, Kiyoi H	4. 巻 13
2. 論文標題 Comparison of clonal architecture between primary and immunodeficient mouse-engrafted acute myeloid leukemia cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1624
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-29304-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	清井 仁  (Kiyoi Hitoshi)		
研究協力者	石川 裕一  (Ishikawa Yuichi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------