

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16582

研究課題名（和文）オートファゴソーム形成に着目した骨髄異形成症候群の予後解析と層別化

研究課題名（英文）Analysis of autophagosome formation in myelodysplastic syndrome

研究代表者

大西 威一郎 (Onishi, Ichiroh)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：70750214

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）：本研究は、骨髄異形成症候群（MDS）において、腫瘍性造血細胞のオートファジーの有無を免疫染色にて検討した初めての研究である。LC3Bの免疫染色にて、オートファジーを有する症例では、有意に予後が不良となることを見出し、LC3Bの免疫染色によりMDS患者の層別化、従来の化学療法に加えて、オートファゴソーム阻害薬を用いることで、患者の予後を改善しうる可能性を見出した。細胞株を用いて、オートファゴソーム阻害薬の有用性を検証していきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、LC3Bの免疫染色によりMDS患者の層別化が可能であることを示しており、今後MDS患者の治療方針等にも関係する可能性のあるものである。そのためには、さらに大規模な症例での検討、MDSの白血病化前の細胞株を用いた検討も、今後必要である。

研究成果の概要（英文）：This is the first study to examine the presence or absence of autophagy in neoplastic hematopoietic cells by immunohistochemistry in myelodysplastic syndrome (MDS). LC3B immunohistochemistry found that patients with autophagy had a significantly poorer prognosis, and LC3B immunostaining was used to stratify MDS patients, and in addition to conventional chemotherapy, autophagosome inhibitors were used. We have found that it may improve the prognosis of patients by using it. We would like to verify the usefulness of autophagosome inhibitors using cell lines.

研究分野：血液病理学

キーワード：骨髄異形成症候群 オートファゴソーム LC3B 予後解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群(Myelodysplastic syndrome 以下 MDS)は、末梢血中では血球減少を来すにも関わらず、骨髄では形態異常を示す造血細胞が増殖するという特徴をもつ、骨髄性腫瘍の一種である。急性白血病に移行しやすく、予後不良な疾患で様々な病型に分かれる。近年、次世代シーケンサーによる解析により、MDS 患者における遺伝子変異が多数同定されている。中でも、RNA splicing に関わる U2AF35 や SF3B1 の変異は MDS 患者において初めて同定され、かつ高頻度に認められる。U2AF35 S34F の変異は、autophagy に必須な ATG7 のスプライシングに関与しており、U2AF35 S34F によってスプライシングされた ATG7mRNA は、正常よりも長いポリ A 配列を持つ。この異常 ATG7mRNA から翻訳された ATG7 タンパクは、autophagy を誘導することが出来ない(Fig.1)。また、autophagosome 膜には LC3B というタンパク質が発現している。LC3B は、autophagosome 膜の伸長に働くタンパクであり、その発現量は autophagy 活性や autophagosome の数を反映する。Autophagy は細胞の生存に必須なものであり、その活性が腫瘍細胞の生存率、ひいては患者の生命予後にも関わる可能性がある。

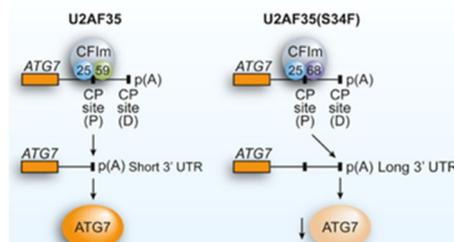


Fig.1 U2AF35 の変異が ATG7 のスプライシング異常を引き起こす

(Park SM, Ou J, Chamberlain L, et al. 2016)

2. 研究の目的

本研究では、MDS 患者の骨髄における autophagosome 形成を、LC3B を標的とした免疫染色と U2AF35 遺伝子解析と併せて評価し、その結果と患者の予後の相関解析を目的とした。ホルマリン固定パラフィン包埋病理切片(Formalin-fixed, paraffin embedded: FFPE)を用いた、LC3B を標的とした免疫染色によって autophagosome 形成を評価する方法はこれまで報告されていないため、FFPE での免疫染色による LC3B の評価の妥当性も併せて検討する。

3. 研究の方法

：FFPE を用いた免疫染色による、autophagosome 評価の確認

ヒト由来 MDS 細胞株である SKM-1 細胞を、EBSS(脱栄養培地)で4時間培養し栄養飢餓状態にすることで autophagy を誘導した。コントロール群である RPMI (ウシ胎児血清入り通常培地)で培養した SKM-1 細胞のサイトスピン標本(非 FFPE)を作成し、メタノール固定後 LC3B を標的とした蛍光免疫染色を行った。1次抗体には、抗ヒト LC3B Rabbit polyclonal 抗体、二次抗体は蛍光色素 FITC 付き抗 Rabbit 抗体、核染色には DAPI を用いた。同時に、上記の autophagy 誘導した細胞とコントロール群の FFPE を作成し、LC3B を標的とした酵素抗体法による免疫染色(ポリマー法)を行った。抗体は蛍光免疫染色に用いたものと同様で、発色素には vector blue を用いた。核染色は LC3B の詳細な染色性評価のため行わなかった。LC3B 陽性ドット数の増加が見られれば autophagy が亢進しているとみなし、サイトスピン標本での蛍光染色、FFPE での酵素抗体法での染色性を比較した。

：免疫染色による MDS 患者骨髄検体の LC3B の発現解析と、MDS 患者の予後の相関

東京医科歯科大学附属病院病理部にて診断された MDS 患者 60 症例の FFPE106 検体を用いて、実験の酵素抗体法と同様に LC3B を標的とした免疫染色を行うことで、autophagosome の形成を評価した。標本の造血細胞の 20%以上にドット状陽性が見られたものを LC3B(+)群とし、LC3B(-)群との予後を比較した。

：MDS 患者骨髄検体における U2AF35 の変異の有無と、患者の予後の相関

免疫染色に用いた FFPE のうち 47 検体から TaKaRa DEXPAT™を用いて DNA を抽出した。次に、U2AF35 S34F と U2AF35 Q157R に相当する部位を標的としたプライマーを作成し、KOD-FX による PCR 法で DNA を増幅した。PCR 産物をサンガー法にてシーケンス解析し、変異の有無と患者の予後の相関を調べた。

4. 研究成果

< ；FFPE を用いた免疫染色による、autophagosome 評価の確認 >

autophagy を誘導した SKM-1 細胞のサイトスピン標本(非 FFPE)の蛍光免疫染色では、コントロール群に比べて、autophagosome 形成を示すドット状の LC3B 陽性像が多数観察された。(Fig.2)。また autophagy を誘導した細胞の FFPE の免疫染色においても、コントロール群に比べてドット状の LC3B 陽性像が多く確認でき、蛍光抗体法と比較しても遜色ないものであった(Fig.3)。陽性

ドットの例を赤矢印に示した。また、コントロール群の画像を Fig4,5 に示した。

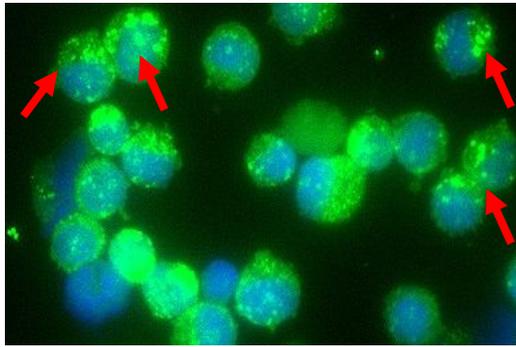


Fig.2 autophagy 誘導した細胞の蛍光免疫染色
緑色の LC3B 陽性ドットが著明 (赤矢印)。

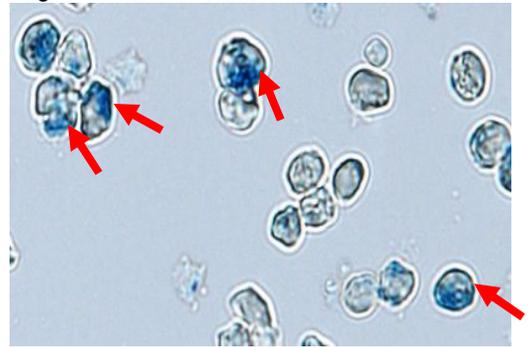


Fig.3 autophagy 誘導した細胞の FFPE の免疫染色。
青色の LC3B 陽性ドットが著明 (赤矢印)。

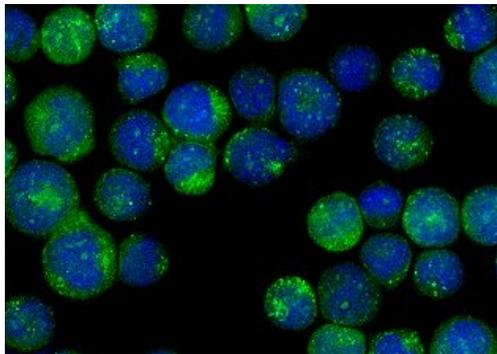


Fig.4 コントロール群の蛍光免疫染色。
緑色の LC3B 陽性ドットが、autophagy 誘導群と比較して少ない。なお、核を青染している。

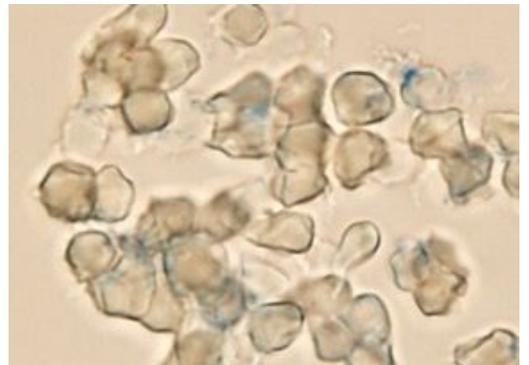


Fig.5 コントロール群の FFPE の免疫染色。
青色の LC3B 陽性像は、autophagy 誘導群と比較して少なく、また dot 状陽性像が確認できない。

FFPE を用いた免疫染色においても、蛍光抗体法と同様の結果が得られたことから、FFPE 標本を用いた LC3B を標的とした免疫染色によって、autophagosome の形成を評価することの妥当性が示された。

< 免疫染色による MDS 患者骨髄検体の LC3B の発現解析と、MDS 患者の予後の相関 >
免疫染色によって 31 症例が LC3B(+)、28 症例が LC3B(-)と判定された。LC3B(+)と判定された免疫染色を Fig.6 に、同視野の HE 染色画像を Fig.7 に示す。生存曲線を Fig.8 に示す。LC3B(+)群の方が LC3B(-)群よりも有意に予後不良であった(p<0.03)。

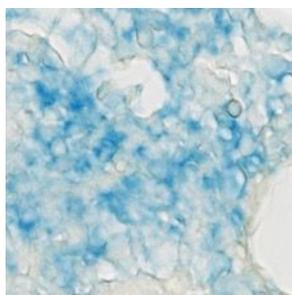


Fig.6 LC3B(+)と判定された免疫染色結果。
青い LC3B 陽性ドット(赤矢印)が著明。

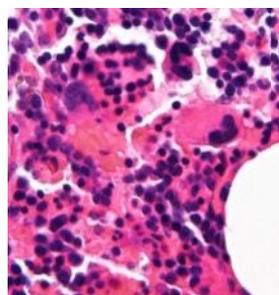


Fig.7 HE 染色画像

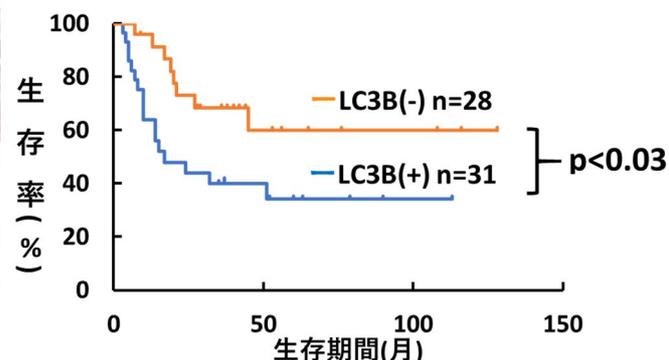


Fig.8 LC3B 陽性群と陰性群の生存曲線

LC3B(+)群の方が LC3B(-)群よりも有意に予後不良であった。このことから、LC3B 免疫染色を用いて簡便に、MDS 患者の予後層別化が可能であるといえる。今回は標本の造血細胞の 20%以上

に陽性ドットが見られるもの LC3B(+), それ以下のものを LC3B(-)と判断したが、カテゴリーを陰性、弱陽性、強陽性などという形でより細分化した場合の予後との関連を今後検討したいと考えている。また、LC3B(+)群が、LC3B(-)群に比べて有意に予後不良であったことの原因として、LC3B(+)群では autophagy によってアミノ酸補給をしたり、抗がん剤を分解したりすることで腫瘍細胞がより生存できたことが考えられる。そのため、MDS 患者に対して抗がん剤(アザシチジン)と autophagy 阻害剤(クロロキン)を併用する治療が有効である可能性があり、その検証をヒト MDS 由来の細胞である SKM-1 細胞を用いて行いたい。現に、急性リンパ性白血病の細胞株に抗がん剤と autophagy 阻害剤を同時投与すると細胞がより死滅した、という報告がある。

< : MDS 患者骨髄検体における U2AF35 の変異の有無と、患者の予後の相関 >

U2AF35 S34F と U2AF35 Q157R 部位が解読可能であった検体は、47 検体中 36 検体であった。そのうち、U2AF35 S34F に変異が見られたのは 1 検体のみ、U2AF35 Q157R 変異も 1 検体のみであり、いずれもオートファゴソーム形成が確認された症例であった。

本研究で用いた検体は骨髄穿刺吸引組織であり、組織量として少量である。さらに FFPE では、ホルマリン固定による DNA とタンパク質の結合や、パラフィン包埋による DNA の断片化により、一般的には遺伝子解析するのが難しいとされている。しかし、本研究では 47 検体中 36 検体でターゲット周辺の塩基配列を同定できたため、遺伝子解析は良好であったといえる。U2AF35 に変異を有する腫瘍細胞率が低い可能性、長期保存に伴う FFPE による DNA の劣化の影響もあり、その細胞がもつ遺伝子変異の検出は困難であった可能性がある。また、両ターゲットともに正常とされた 30 検体のうち、 で LC3B(-)、つまり autophagosome 形成が低下していると判断されたものが 15 検体含まれていた。したがって、実験精度の問題に加えて、他の autophagy 関連遺伝子の変異や、U2AF35 のメチル化の異常など、U2AF35 遺伝子変異以外の原因により autophagosome 形成が低下している検体の存在も示唆される。以上のことを踏まえて、今後 MDS における autophagy の役割を詳細に検討するためには、ホルマリン固定、パラフィン包埋による DNA の変性・断片化を回避し実験精度を上げるために患者由来新鮮骨髄検体を用いて、U2AF35 やその他 autophagy 関連遺伝子(ATG7 など)の遺伝子解析、LC3B やその他 autophagy 関連因子のタンパク解析を行うことが必要である。

また細胞株を用いて、オートファゴソームの貪食機能を阻害するヒドロキシクロロキンと、従来より治療に用いられるアザシチジンとの併用により、より殺細胞効果が高められるか、解析を進める必要がある。

参考文献

1. Yoshida, K., Sanada, M., Shiraishi, Y. et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* 478, 64-69 (2011)
2. Park SM, Ou J, Chamberlain L, et al. U2AF35(S34F) Promotes Transformation by Directing Aberrant ATG7 Pre-mRNA 3' End Formation. *Mol Cell*. 2016;62(4):479-490.
3. Tanida I., Ueno T., Kominami E. (2008) LC3 and Autophagy. In: Deretic V. (eds) *Autophagosome and Phagosome. Methods in Molecular Biology™*, vol 445. Humana Press
4. Lee YK, Lee JA. Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy. *BMB Rep*. 2016;49(8):424-430.
5. Takahashi H, Inoue J, Sakaguchi K, Takagi M, Mizutani S, Inazawa J. Autophagy is required for cell survival under L-asparaginase-induced metabolic stress in acute lymphoblastic leukemia cells. *Oncogene*. 2017;36(30):4267-4276.

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kitagawa Masanobu, Kurata Morito, Onishi Iichiroh, Yamamoto Kouhei	4. 巻 70
2. 論文標題 Bone marrow niches in myeloid neoplasms	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 63～71
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.12870	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Iichiroh Onishi
2. 発表標題 骨髄異形成症候群におけるオートファゴソームの解析
3. 学会等名 第108会 日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京医科歯科大学包括病理学 研究業績 http://www.tmd.ac.jp/med/pth2/custom.html

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------