

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860781

研究課題名(和文) 低リスクMDSのメチル化阻害剤の有効性と相関する遺伝子異常の探索

研究課題名(英文) Exploration of genes associated with efficacy of DNA methyltransferase inhibitors for low risk MDS.

研究代表者

南谷 泰仁 (Nannya, Yasuhito)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60451811

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)：骨髄異形成症候群を対象としたメチル化阻害剤の治療抵抗性メカニズムを解明するために、アザシチジン治療が奏効した後に再燃した症例を対象として、全エクソームシーケンシングを行い、さらに機能や配列に基づく選別によって28遺伝子を抽出した。同時に、shRNAライブラリを用いて細胞株MOLM13にアザシチジン抵抗性を付与する遺伝子を選定した。これらの遺伝子を発現抑制したところアザシチジン作用条件下でも細胞増殖能が保持されており、重要な候補と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We conducted whole exome sequencing in patients with MDS and detected mutations specifically seen in azacitidine resistant phase, which were further narrowed down according to their functions and structures. Clone evolution during resistance acquisition was also analyzed with deep sequencing. Additionally, we screened responsible genes for azacitidine resistance using shRNA library system. We verified these candidate genes by demonstrating that suppression of the candidate genes conferred resistance to azacitidine in-vitro assays.

研究分野：造血器腫瘍

キーワード：骨髄異形成症候群 抵抗性メカニズム 全エクソームシーケンシング shRNAライブラリ

1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群(MDS)は、無効造血による骨髄不全と急性骨髄性白血病への進展を特徴とするクローン性疾患である。根治療法である造血幹細胞移植の適応にならない患者にはメチル化阻害剤であるアザシチジンが使用されることが多いが、単剤での寛解導入率が20%に過ぎず、高リスクの場合一旦反応しても多くは1年で進行を認める。アザシチジンの有効性もしくは二次性不応のメカニズムに関しては、TET2 遺伝子の変異が存在する症例においてアザシチジンの治療効果が高いこと (Itzkson R et.al, Leukemia 25:1147-; 2011)、BCL2L10 のメチル化の程度が高い症例ではアザシチジンの奏成功率が低いこと (Voso MT et.al, Leukemia 25:1910-; 2011)、高リスク MDS において、CD4+細胞および CD34+細胞における STAT3 の過剰発現がアザシチジンの抵抗性に關与していること (欧州血液学会 2012 #913)、低リスク MDS において PI-PLCβ1 遺伝子の発現上昇がアザシチジンによる血液学的奏功と相關すること (Follo MY et.al, Leukemia 26:943-; 2012) が報告されているが、controversial な報告もあり、十分に解明されているとは言い難い。

2. 研究の目的

本研究では、MDS を対象としたメチル化阻害剤による治療において、有効性と相關する遺伝学的異常を明らかにすることを目的とする。さらに、同定された遺伝子が MDS の造血不全という病態形成に果たすメカニズムを明らかにすることも目的である。この研究が進むことによって、メチル化阻害剤を使用する患者の選別や、耐性克服の治療法の開発につながる知見を得ることができる。

3. 研究の方法

(1)アザシチジン二次性不応症例の抽出

我々の施設で MDS に対してアザシチジン治療が奏効した後に再燃した(アザシチジンによる治療で PR 以上もしくは SD+HI が得られたものの、再燃を認めた)患者を抽出した。具体的には以下の4症例を抽出した。

患者	治療経過	芽球数	染色体検査
No.1 69歳,女性 RAEB1	初診時	3.0%	42, XX, der(5;21)(p10;q10),add(8)(q24.1),-13,-18,-22
	治療中	1.5%	46, XX
	再燃時	20%	分裂細胞得られず
No.2 76歳,女性 RAEB2	初診時	18.7%	-3, -5を含む複雑核型異常
	治療中	4.0%	-5を含む複雑核型異常
	再燃時	12.4%	-5を含む複雑核型異常
No.3 76歳,男性 RAEB1→ AML-MRC	初診時	2.2%	46, XY, del(20)(q12q13)
	治療中	3.0%	46, XY
	再燃時	12.5%	分裂細胞得られず
No.4 79歳,男性 AML-MRC	初診時	9.4%	-7を含む複雑核型異常
	治療中	1.0%	46, XY
	再燃時	47.7%	分裂細胞得られず

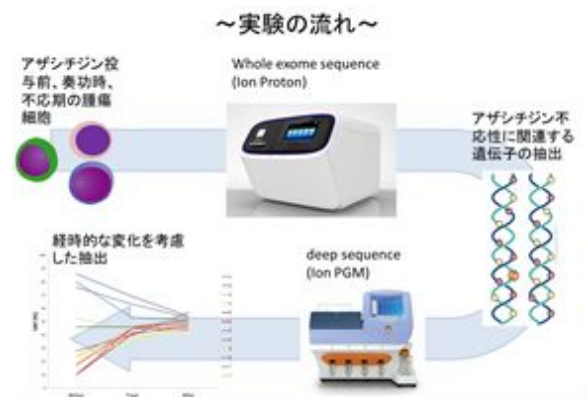
これは、奏功時と再発時の遺伝子プロファイ

ルを比較することによって、疾患発症ではなくアザシチジンの耐性の成立に關与する遺伝子異常を特異的に抽出することができると考えたためである。

(2)全エクソーム解析

上記の症例のゲノムを抽出し、Ampli-Seq kit® を用いてライブラリを作成し Ion Proton Sequencer® (Life technologies©)にて全エクソームシーケンスを行った。アザシチジン抵抗性と關与の疑われる変異に關しては Sanger Sequencing 法にて確認を行った。

候補遺伝子に關しては、変異箇所を含む領域(200-350bp)をPCRで増幅し、精製後アダプターを来ライゲーションして Ion PGM®を用いてディープシーケンシングを行い、経時的な新出や増加傾向が認められるかを検討した。

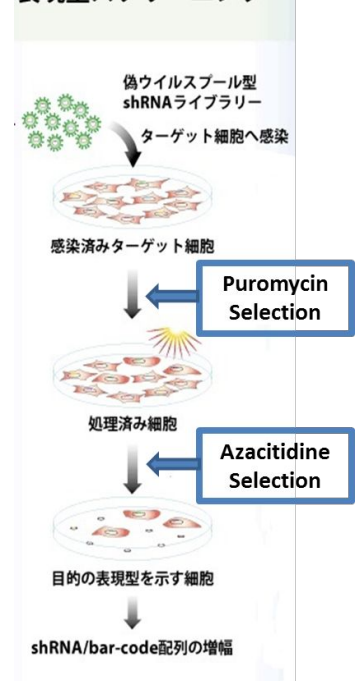


(3)細胞株を用いたアザシチジン耐性遺伝子の探索

Cellecta 社の DECIPHER®

(shRNA ライブラリ)を用い、MDS 由来の細胞株である MOLM13 に感染させたものに対してアザシチジンを1000nMの濃度で作用させ、生存している細胞を回収した。アザシチジン投与前、アザシチジン投与後、コントロールの細胞のDNAを抽出し、shRNA ライブラリを作製した。これに対して Ion Proton®を用いてシーケンスを行った。shRNA のバーコード配列を抽出し、Decipher Barcode

表現型スクリーニング



Deconvoluter®を用いて shRNA 情報を割り当てた。shRNA の抽出作業には CLC Genomics Workbench®を使用し、Kal's 検定(p<0.0001)にて絞り込みを行った。

(4)候補遺伝子の機能解析

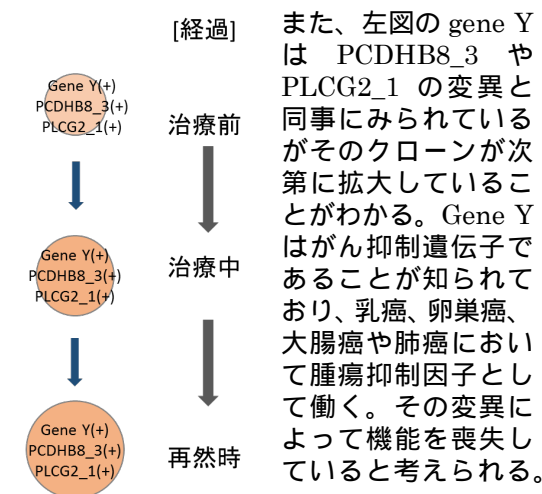
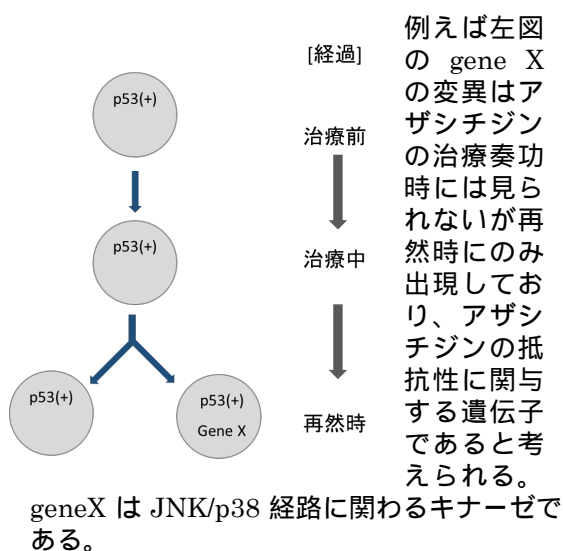
全エクソーム解析の結果、アザシチジンの耐性に関与している可能性があると考えられた遺伝子を対象として、細胞増殖に対する影響を調べた。対象遺伝子の sh-RNA を作成し細胞株 MOLM13 に感染させ、通常の増殖及びアザシチジン作用時の増殖を比較した。陽性コントロールとして、メチル化による発現低下がアザシチジンの耐性と関与しているとされる Bcl2L10 を用いた。

4. 研究成果

(1)アザシチジン二次性不応症例に対する網羅的遺伝子解析

4 症例に対して全エクソームシーケンスを行い、アザシチジンの投与前には存在せず投与後に新たに認められた非同義単塩基の変化を抽出したところ、4 症例で各々2300, 4601, 2976, 1871 箇所を認めた。これらの変化箇所からデータベースに登録されている SNP と考えられている変化を除去し、さらに変化のあるアレルの頻度が 30%以上であるものを抽出した。その結果、4 症例で各々24, 29, 36, 18 箇所の変化が残った。これら全ての変化について、その箇所を含む遺伝子を調べ、その遺伝子の既知の機能や配列をもとに、造血系に発現しているもの、もしくは腫瘍増生に関与している可能性があるという観点から 28 遺伝子を選択した。これらは Sanger Sequencing によって変異を確認した。

これらの遺伝子を Ion PGM®を用いたディープシーケンシングを行った。その結果、詳細に治療経過における遺伝子変異プロファイルの変化が判明した。下記に例を示す。



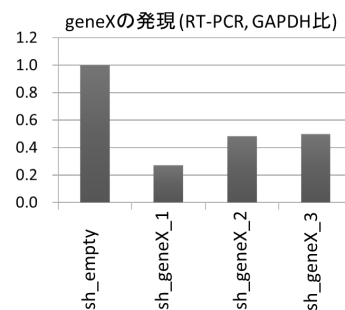
このようにアザシチジン耐性を誘導する遺伝子変異の候補として7つが抽出された。これらの遺伝子変異は MDS で通常よく認められる変異ではなく、アザシチジン耐性にのみ関わる遺伝子変異であると考えられた。

(2) 細胞株を用いたアザシチジン耐性遺伝子の探索

shRNA ライブラリをトランスフェクトした MOLM13 細胞株にアザシチジンを 1000nM の濃度で投与し 29 日間培養を継続した後に 30 日目日目に残存細胞を回収し、これらの細胞の shRNA ライブラリを解析した。これによって、アザシチジン耐性化細胞において発現が低下する遺伝子群が検証できる。2 回のアザシチジン添加実験でそれぞれ 253 個、44 個の遺伝子が候補として挙がり、2 つの遺伝子群との共通項として、7 つの遺伝子を抽出することが出来た。これらの遺伝子は、クローニングおよび shRNA コンストラクトの作製を行い、in vitro で骨髄系腫瘍の細胞株を用いたアザシチジン耐性化を確認中である。

(3)候補遺伝子の機能解析

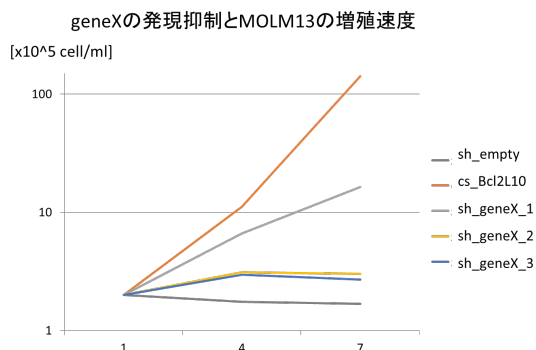
geneX について、3 種類の sh-RNA を作成して MOLM13 にトランスフェクトして geneX の発現抑制を確認した。geneX 発現抑制細胞は、コントロールと比べて約 2 倍の増殖速度を示した。



アザシチジンの耐性との関係性を調べるために、アザシチジンを 7 日間連日投与して MOLM13 の増殖速度を検討したところ、geneX の発現を抑制した細胞はコントロール 東京大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科

講師

ルと比較して著明な増殖亢進を示した。特に強く発現が抑制されている細胞では約 10 倍の増殖亢進がみられた。



同様の結果が geneY に対する発現抑制系についてもみられた。

これらの結果から、これらの候補遺伝子の発現を低下させることはアザシチジンによる細胞増殖抑制効果を打ち消すことが確認された。

今後、これらの候補遺伝子がアザシチジン耐性に関わるメカニズムの解明を進め、治療法の開発を目指す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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)研究代表者

南谷泰仁 (NANNYA YASUHITO)

東京大学 医学部附属病院 講師

研究者番号：60451811

(2)研究分担者

(3)連携研究者

吉見 昭秀 (YOSHIMI AKIHIDE)

東京大学 医学部附属病院 助教

研究者番号：80609016

(4)研究協力者

塚本 彩人 (TSUKAMOTO AYATO)