

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460691

研究課題名(和文) 骨髄異形成症候群から急性白血病への病型移行に関わる分子の探索

研究課題名(英文) Search for the molecules involved in leukemic transformation of myelodysplastic syndromes

研究代表者

通山 薫 (TOHYAMA, KAORU)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：80227561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndromes; MDS)は、しばしば急性骨髄性白血病へ移行するが、そのメカニズムには未解明の部分が多い。本研究では、独自に樹立したMDS由来細胞株とその変異株、および細胞株樹立の発端となったMDS患者骨髄細胞を用いて全エクソーム解析とその相互比較を行った。CEBPAとNRASの変異を培養途上で検出し、また芽球性亜株出現時にHistone1H3C (K27M)変異、さらに一部の亜株にTET2変異を見出した。

今後個々の遺伝子レベルでの意義を見出し、MDSから急性白血病へ移行する病型進展の分子機構解明に向けて、さらに発展的な検索が必要である。

研究成果の概要(英文)：Myelodysplastic syndromes (MDS) often transform to acute myeloid leukemia, but its mechanisms remain almost uncertain. We utilized an MDS-derived cell line and various sublines together with the bone marrow sample from the original MDS patient, and performed whole exome sequencing of each cell line. Consequently, we found several important gene mutations such as CEBPA, NRAS, Histone1H3C (K27M) and TET2.

Now we are investigating the role of each gene mutation towards searching for the molecules involved in leukemic transformation of MDS.

研究分野：病態検査学

キーワード：網羅的遺伝子解析 腫瘍関連遺伝子 造血障害 白血病移行

1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndromes; MDS) は高齢者を中心に増加しつつある難治性の造血障害であるが、骨髄中の幼若細胞が次第に増加してしばしば急性骨髄性白血病 (AML) へ移行するという腫瘍性性格も有している。しかしその過程で起こるゲノム変異やエピゲノムレベルでの変化の分子機構については多くが未解明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、応募者が樹立した MDS 由来細胞株とそこから派生した亜株を用いて全エクソーム解析をおこない、MDS から急性白血病へ移行する病型進展の分子機構の一端を解明することである。MDS から急性白血病へ移行する分子機構の解明はこの疾患の病態理解に重要であるだけでなく、その分子機構が明らかになればそれを特異的に阻害する治療法を開発することによって、MDS の病態悪化を防止するという新しい治療戦略・予後改善法の開拓につながる。

3. 研究の方法

MDS 患者骨髄細胞を増殖因子 IL-3 存在下に培養した結果樹立された細胞株 MDS92 と、それ以後 MDS92 の継代培養中に樹立された芽球性亜株 MDS-L、さらに IL-3 を添加しなくても増殖する MDS-LGF をはじめとする MDS 細胞株ラインアップ合計 9 細胞株、さらに患者骨髄細胞検体とその初期培養細胞、計 11 個のサンプルからゲノム DNA を抽出して全エクソーム解析をおこない、点突然変異・挿入変異・欠失変異を網羅的に検出した。なお全エクソーム解析は外部委託でおこなった。それらの中から、(1) 初期培養細胞の時点で既に見られ、以後の細胞株にも受け継がれている共通の変異、(2) MDS92 の段階で出現し、以後の亜株に共通の変異、(3) MDS92 の段階にはなく、以後の亜株の途中で獲得した変異の抽出を試みた。(1) の変異は患者骨髄内で既に現れていた変異とほ

ぼみなすことができると考えた。本研究ではとくに(2)(3)の細胞株成立および継代培養に伴い段階的に出現した変異をリストアップして、その中に造血器腫瘍関連遺伝子変異として国際的な腫瘍体細胞変異カタログ (COSMIC) に登録されている変異があれば、それらを中心に病型進展に関与する候補遺伝子を探索・選出することとした。次に一部の変異した腫瘍関連遺伝子に対する阻害薬を該当遺伝子変異のある細胞の培養系に添加し、その影響について検討した。

4. 研究成果

(1) 初期培養細胞の時点で既に見られ、以後の細胞株にも受け継がれている共通の変異: *CEBPA* 変異、*N-RAS* 変異は初期培養段階で検出されたが、意外なことに患者骨髄細胞検体では検出されなかった。培養途上で出現したのか、元々患者骨髄中に極めて微小の変異クローンがあったのかの判別はついていない。今後超高感度ターゲットシーケンシングを実施して結論を得る予定である。なお *CEBPA* 変異、*N-RAS* 変異は、それ以降各細胞株に受け継がれていることがわかった。

(2) MDS92 の段階で出現し、以後の亜株に共通の変異: 現時点では注目に値する候補は得られていない。

(3) MDS92 の段階にはなく、以後の亜株の途中で獲得した変異: MDS92 から MDS-L へ移行する段階で *Histone1H3C* 変異 (K27M) が検出された。この変異は小児脳幹腫瘍で報告があり、JMJD3 阻害薬が有効とされているが、MDS-L への特異的抑制効果はインビトロでは明確でなかった。どの亜株にも *EZH2* には有意な変異が見出されていないが、ヒストン修飾の観点からさらに検討する必要がある。

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 4 件)

Okamoto S, Tsujioka T, Suemori S, Kida J, Kondo T, Tohyama Y, Tohyama K. Withaferin A suppresses the growth of myelodysplasia and leukemia cell lines by inhibiting cell cycle progression. *Cancer Sci* (査読有) Vol.107, 2016, pp.1302-1314.
(DOI: 10.1111/cas.12988)

Tsujioka T, Yokoi A, Itano Y, Takahashi K, Ouchida M, Okamoto S, Kondo T, Suemori S, Tohyama Y, Tohyama K. Five-aza-2'-deoxycytidine-induced hypomethylation of *cholesterol 25-hydroxylase* gene is responsible for cell death of myelodysplasia/leukemia cells. *Sci Rep* (査読有) Vol.5, 2015, pp.16709(e1-12).
(DOI: 10.1038/srep16709)

Hyoda T, Tsujioka T, Nakahara T, Suemori S, Okamoto S, Kataoka M, Tohyama K. Rigosertib induces cell death of an MDS-derived cell line by DNA damage-induced G2/M arrest. *Cancer Sci* (査読有) Vol.106, 2015, pp.287-293.(DOI: 10.1111/cas.12605)

木田潤一郎、通山 薫 .〔特集 骨髄異形成症候群 (MDS) の病態解析と治療の進歩〕5q - 症候群の分子病態解析研究の進歩、血液内科 Vol.71, 2015, pp.581-586.

〔学会発表〕(計 4 件)

通山 薫 . 特別講演「骨髄系腫瘍へのアプローチ --- 形態学の視点から --- WHO-2016 も少々」, 第 14 回日本検査血液学会北海道支部総会、2016 年 6 月 11 日、札幌市.

通山 薫 . 講演「みんなで取り組もう、

MDS の異形成判定」, 日本検査血液学会第 14 回冬季セミナー、2016 年 2 月 27 日、宮城県松島町.

通山 薫 . 講演「血液検査技師が知っておくべき MDS --- 血球の異形成の捉え方、考え方」, 日本検査血液学会第 13 回冬季セミナー、2015 年 2 月 14 日、千葉市.

通山 薫 . シンポジウム 17「造血器腫瘍の先端医療を支える臨床検査」: 診断確定・病型分類のための血液検査・形態診断 ~ 骨髄異形成症候群、第 61 回日本臨床検査医学会学術集会、2014 年 11 月 25 日、福岡市.

〔図書〕(計 4 件)

通山 薫 . 骨髄異形成症候群の診断・治療・予後因子 A 骨髄異形成症候群の診断と病型分類、造血器腫瘍アトラス改訂第 5 版 (谷脇雅史、横田昇平、黒田純也 編著)、日本医事新報社、2016、pp.411-420.

通山 薫 . 白血球系疾患・腫瘍性疾患 8 . 骨髄異形成症候群、血液専門医テキスト 改訂第 2 版 (日本血液学会 編集)、南江堂、2015、pp.243-251.

通山 薫 . 治療誘発性骨髄異形成症候群、血液疾患診療ハンドブック-診療の手引と臨床データ集改訂第 3 版 (吉田弥太郎 編)、医薬ジャーナル社、2015、pp.186-196.

通山 薫 . 血液疾患各論「4 章 疾患の理解と治療、骨髄異形成症候群」5q - 症候群、最新ガイドライン準拠 血液疾患診断・治療方針 (金倉 譲 編集)、中山書店、2015、pp.249-p253.

〔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

<http://www.kawasaki-m.ac.jp/lh/>

6．研究組織

(1)研究代表者

通山 薫 (TOHYAMA, Kaoru)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：80227561

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

辻岡 貴之 (TSUJIOKA, Takayuki)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：50330551

未盛 晋一郎 (SUEMORI, Shin-ichiro)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：60330552

(4)研究協力者

なし