

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893127

研究課題名(和文) 骨髄異形成症候群における病初期クローンメカニズムの解明

研究課題名(英文) Integrated analysis of clonal evolution at early stage of myelodysplastic syndrome.

研究代表者

永田 安伸 (Nagata, Yasunobu)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90739575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：再生不良性貧血から骨髄異形成症候群に進展した全22症例を全エクソン解析した結果、66個の遺伝子変異を認めた。これまで報告のあるPIGAに加え、BCOR, BCORL1など骨髄腫瘍で既知の遺伝子が、新たに再生不良性貧血でも変異していた。数十年にわたる時系列解析を行った結果、再生不良性貧血時には数%と微小であったクローンが、骨髄異形成症候群を発症するころには数十%まで拡大し、SETBP1遺伝子のような新規の遺伝子変異を獲得していることが明らかとなった。このように複雑なクローン構造の変化が病勢の進行に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We performed whole exome sequencing of 22 patients who diagnosed aplastic anemia and progressed myelodysplastic syndromes, which identified 66 mutations. They included not only PIGA which was already reported in aplastic anemia but also BCOR and BCORL1 which were not. Given analysis of different time points of several years from diagnosis, a tiny clone with mutations increased and acquired novel genetic alterations such as SETBP1 mutations, which related to advanced disease. In conclusion, variation of complicated clone structure informs the evolution from aplastic anemia to myelodysplastic syndrome.

研究分野：骨髄系腫瘍

キーワード：骨髄異形成症候群 全エクソンシーケンス 再生不良性貧血

1. 研究開始当初の背景

造血器腫瘍の一つである骨髄異形成症候群 (Myelodysplastic syndromes, MDS) は、汎血球減少と急性骨髄性白血病 (Acute myeloid leukemia, AML) への移行を特徴とする治療抵抗性の骨髄性腫瘍であり、原因・治療反応性・予後の異なる多様な病態が含まれる不均一な疾患群である。近年、大量並列次世代シーケンス技術の発展によりがんにおける体細胞性変異の網羅的な解析が可能となり、(1) RNA スプライシング因子の系統的な変異が MDS の病態に深く関わっていること、(2) 網羅的解析により明らかとなった遺伝子異常は鋭敏に予後を予測するということが報告されていた。

これらの革新的な遺伝子解析技術を応用することでさらに MDS 病態の詳細について解明を行う。これまでの多くの研究は、MDS 診断時の腫瘍検体を解析対象にしており、極早期の病初期における遺伝学的異常については明らかになっていない。すなわち臨床的に MDS と診断されるまで進行した症例のみが解析対象であるため、正常造血から潜在的な MDS 前段階を経て、最終的に MDS を発症するまでの間にどのような遺伝子異常が蓄積しクローン増殖を獲得するのかこれまで解明されていない。

MDS 発症の病初期における遺伝学的異常を探索する目的で、正常人数万人の骨髄検体を採取することは現実的には不可能である。そのため、効果的に研究を進める目的で我々は良性の血液疾患である再生不良性貧血 (Aplastic Anemia, 以下 AA) に着目した。AA は白血球、赤血球、血小板などが減少する汎血球減少と骨髄不全を特徴とする良性の疾患であるが、診断後 10 年で約 20% が MDS や急性骨髄性白血病などの骨髄系腫瘍を合併することが知られている。興味深いことに良性疾患である AA において 6 番染色体短腕を中心としたコピー数異常が 15% に認められ、骨髄系腫瘍と共通する遺伝子変異も報告されていることから、AA においても造血クローンの存在が示唆されている。しかしながら AA が最終的に骨髄系腫瘍を発症するメカニズムについてはほとんど解明されていない。これらの潜在的な造血クローンが時間経過でどのように MDS 発症に関与するのかを明らかにすることで、MDS の病初期におきる遺伝学的異常を解明する。具体的には下記の三点である。

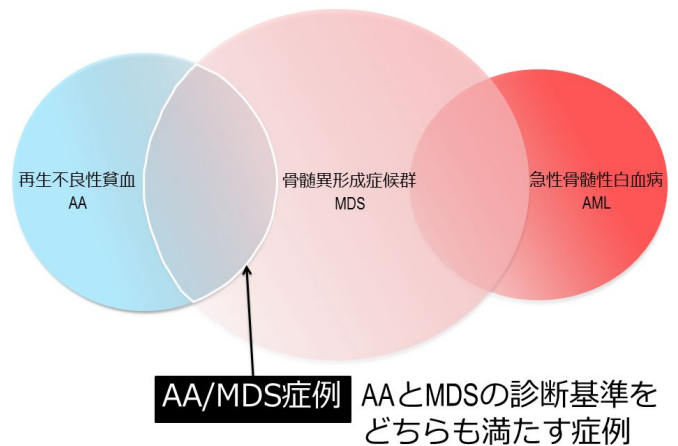
(1) MDS を発症するまで複数の経時的検体を解析可能な AA 症例について全エクソンシーケンス解析を行い、MDS の病初期におきる遺伝学的異常を明らかにする。

(2) 同定された遺伝学的異常について、異なるコホートの数十例の AA 症例を標的シーケンス解析することにより、MDS 発症前に存在する腫瘍クローンの特徴を明らかにする。

(3) 新規に同定された病初期クローン

と既知の病勢進行に関わる腫瘍クローンとを比較することで、極早期の腫瘍発症メカニズムを明らかにする。

図1：骨髄異形成症候群とその重複疾患



2. 研究の目的

近年、大量並列の次世代シーケンス技術の発展によりがんにおける体細胞性変異が同定され、様々ながん種の遺伝学的な特徴が明らかとなっており、造血器腫瘍の一つである骨髄異形成症候群 (Myelodysplastic Syndrome, 以下 MDS) においても特異的な変異が多数同定されている。これまでに申請者らは全エクソン解析にて新規に同定された高頻度の 100 個以上の変異遺伝子について 900 例以上の多数 MDS 症例において変異解析を行うことで、新たな相関や排他関係を同定し、遺伝学的情報を用いた鋭敏な新規予後予測モデルの構築を行うことが可能であった。

しかしながら、臨床的に MDS と診断されるまで進行した症例のみが解析対象であるため、正常造血から潜在的な MDS 前段階を経て、最終的に MDS を発症するまでの間にどのような遺伝子異常が蓄積しクローン増殖を獲得するのかこれまで解明されていない。ごくわずかのクローンが遺伝子変異を獲得することで増殖に有利に働き腫瘍が進展していくパターンが予想されるが、MDS を発症するまでの間に拡大するクローンと縮小するクローンのいずれかに分類される可能性がある。これらの病初期クローンの特徴を明らかにする意義は、クローンを拡大させる遺伝子変異に着目することで、それらを阻害する分子標的薬の投与が検討できることである。すなわち、腫瘍発症の極早期における個別化治療が可能となり、治療成績の改善が期待される。

MDS 発症時に同定される多数の変異の内、発症初期のクローン拡大に直接影響を及ぼす遺伝子異常がいずれかは明らかとなっておらず、MDS の病初期におきる遺伝学的異常の探索により極早期の腫瘍発症メカニズムを解明し、新たな治療戦略の構築に資す

ることを目指す。

3. 研究の方法

健常人が MDS を発症するまでの期間、経時的検体を解析することは発症頻度や倫理的観点から実現困難であることから、AA と診断され最終的に MDS を発症するまでの数年に渡り経時的検体が採取可能な症例を解析対象とする。具体的には金沢大学や米国・NIH など国内外の再生不良性貧血症例を蓄積している共同研究先と協力することで該当症例の選択が可能となり、全エクソン解析など次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子変異解析を行うことで高感度に腫瘍クローンを同定する。具体的な手法として、AA 患者の末梢血中から特異抗原ビーズを用いて顆粒球と T リンパ球それぞれの分画に分離しこれらをペアで解析を行う。抽出された DNA はアジレント社の Sureselect システムを用いて全エクソン領域を濃縮し、次世代シーケンサーであるイルミナ社の HiSeq を用いて全エクソン解析を行う。正常コントロールとして T リンパ球を用いることで顆粒球特異的な遺伝子異常を高感度に同定することが可能となる。全エクソン解析で判明した体細胞性変異については、変異領域を PCR 増幅しディープシーケンスを行うことにより正確な変異アレル比率の測定が可能であり、腫瘍クローンの拡大や縮小の有無を正確に評価することが期待される。

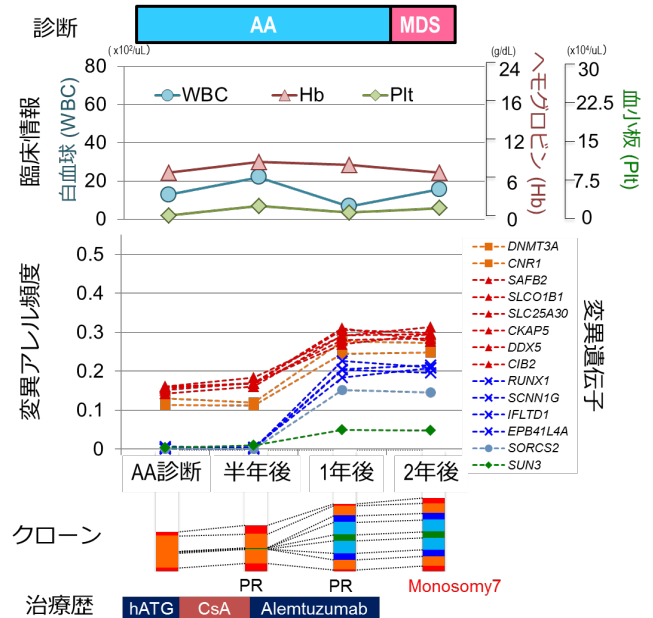
骨髄系腫瘍である MDS と良性疾患である AA は臨床的に鑑別が困難な症例も存在しており、どちらの特徴も重複が認められる。AA であれば、自己免疫による病態への関与が示され免疫抑制剤による治療効果が期待され、MDS ではメチル化阻害剤などのエピジェネティックドラッグによる治療効果が期待される。診断によって治療方法が大きくことなるため、どちらの病型に分類されるのかを正確に診断することは極めて有用性が高い。そのため、鑑別困難な重複症例を含む AA 検体についても遺伝学的異常の解明を行い、造血クローンの有無と臨床学的特徴の相関について検討を行う。

4. 研究成果

最終的に AA から MDS に進展した全 22 症例を解析した結果、66 個の遺伝子変異を認めた。これまで報告のある PIGA 遺伝子に加え、BCOR、BCORL1 など新規の遺伝子変異も認められた。AA の発症から MDS まで病勢が進行するまでの数年間にわたる時系列試料の解析結果、AA 時に数%と微小なクローンが骨髄異形成症候群を発症するところには数十%まで拡大していることが明らかとなった。典型的な 1 症例の結果を示す(図 2)。AA と診断された時点では、約 15%のアレル頻度で DNMT3A 変異を含むいくつかの遺伝子異常を有するクローンが存在していたが、

AA 診断から 1 年後にはこれらのクローンがアレル頻度 30%まで拡大していた、さらにこれらのクローンは MDS の直接の原因遺伝子の一つである RUNX1 変異を新規に獲得していた。また、SUN3 遺伝子変異はアレル頻度 5%程度であり、AA 診断時には認められなかったことからサブクローンとして存在し、MDS 発症に関わっている可能性が示唆された。

図2. AA発症からMDS進展までの時系列解析結果の1例



本研究結果より、以下の3点が得られた成果である。

- 1) AA 診断時に存在しているクローンが治療経過中に拡大することで MDS 発症に寄与する、
- 2) RUNX1 や SETBP1 遺伝子変異のような MDS に関連のある遺伝子異常を AA 治療経過中に獲得することで、AA 診断時から存在するクローンの進展に関わる、
- 3) サブクローンを新規に獲得することで MDS への進展に関わる、

このように複雑なクローン構造の変化が病勢の進行に関与していることが示唆されており、複数の遺伝子異常が時間経過により蓄積することで腫瘍が発生する“多段階発がんモデル”が仮定される。今後は前向き研究を行い、クローン構造が解明される症例数をさらに増加させることで検証することが必要と考えられる。

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)

- (1). Variegated RHOA mutations in adult T-cell leukemia/lymphoma. Nagata Y, Kontani K, Enami T, Kataoka K, Ishii R, Totoki Y, Kataoka TR, Hirata M, Aoki K, Nakano K, Kitanaka A, Sakata-Yanagimoto

M, Egami S, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Shiozawa Y, Yoshizato T, Suzuki H, Kon A, Yoshida K, Sato Y, Sato-Otsubo A, Sanada M, Munakata W, Nakamura H, Hama N, Miyano S, Nureki O, Shibata T, Haga H, Shimoda K, Katada T, Chiba S, Watanabe T, Ogawa S.
Blood. 2016 Feb 4;127(5):596-604. doi: 10.1182/blood-2015-06-644948.

(2). Somatic Mutations and Clonal Hematopoiesis in Aplastic Anemia.
Yoshizato T, Dumitriu B, Hosokawa K, Makishima H, Yoshida K, Townsley D, Sato-Otsubo A, Sato Y, Liu D, Suzuki H, Wu CO, Shiraishi Y, Clemente MJ, Kataoka K, Shiozawa Y, Okuno Y, Chiba K, Tanaka H, Nagata Y, Katagiri T, Kon A, Sanada M, Scheinberg P, Miyano S, Maciejewski JP, Nakao S, Young NS, Ogawa S.
N Engl J Med. 2015 Jul 2;373(1):35-47. doi: 10.1056/NEJMoa1414799.

(3). Integrated molecular analysis of adult T cell leukemia/lymphoma.
Kataoka K, Nagata Y, Kitanaka A, Shiraishi Y, Shimamura T, Yasunaga J, Totoki Y, Chiba K, Sato-Otsubo A, Nagae G, Ishii R, Muto S, Kotani S, Watatani Y, Takeda J, Sanada M, Tanaka H, Suzuki H, Sato Y, Shiozawa Y, Yoshizato T, Yoshida K, Makishima H, Iwanaga M, Ma G, Nosaka K, Hishizawa M, Itonaga H, Imaizumi Y, Munakata W, Ogasawara H, Sato T, Sasai K, Muramoto K, Penova M, Kawaguchi T, Nakamura H, Hama N, Shide K, Kubuki Y, Hidaka T, Kameda T, Nakamaki T, Ishiyama K, Miyawaki S, Yoon SS, Tobinai K, Miyazaki Y, Takaori-Kondo A, Matsuda F, Takeuchi K, Nureki O, Aburatani H, Watanabe T, Shibata T, Matsuoka M, Miyano S, Shimoda K, Ogawa S.
Nat Genet. 2015 Nov;47(11):1304-15. doi: 10.1038/ng.3415.

(4). BRCC3 mutations in myeloid neoplasms.
Huang D, Nagata Y, Grossmann V, Radivoyevitch T, Okuno Y, Nagae G, Hosono N, Schnittger S, Sanada M, Przychodzen B, Kon A, Polprasert C, Shen W, Clemente MJ, Phillips JG, Alpermann T, Yoshida K, Nadarajah N, Sekeres MA, Oakley K, Nguyen N, Shiraishi Y, Shiozawa Y, Chiba K, Tanaka H, Koeffler HP, Klein HU, Dugas M, Aburatani H, Miyano S, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Du Y, Ogawa S, Makishima H.
Haematologica. 2015 Aug;100(8):1051-7. doi: 10.3324/haematol.2014.111989.

〔学会発表〕(計 2件)

(1). Novel distributions and biological effects of RHOA mutations in Adult T-cell Leukemia/Lymphoma and other PTCLs
Yasunobu Nagata, Terukazu Enami, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Keisuke Kataoka, Akira Kitanaka, Aiko Sato, Yuichi Shiraishi, Kenichi Chiba, Hiroko Tanaka, Yusuke Shiozawa, Tetsuichi Yoshizato, Ayana Kon, Kenichi Yoshida, Masashi Sanada, Ken Ishiyama, Shuichi Miyawaki, Ryohei Ishii, Osamu Nureki, Satoru Miyano, Kazuya Shimoda, Toshiki Watanabe, Shigeru Chiba, Seishi Ogawa
第 76 回日本血液学会学術集会(大阪) 2014/11/1,

(2). 骨髄異形成症候群(288例)における網羅的DNAメチル化解析と標的遺伝子異常との統合解析、口頭、Yasunobu Nagata, Genta Nagae, Hiromichi Suzuki, Vera Grossmann, Yusuke Okuno, Ulrike Bacher, Susanne Schnittger, Yusuke Shiozawa, Tetsuichi Yoshizato, Ayana Kon, Tamara Alpermann, Kenichi Yoshida, Keisuke Kataoka, Masashi Sanada, Andreas Roller, Niroshan Nadarajah, Yuichi Shiraishi, Hans-Ulrich Klein, Martin Dugas, Kenichi Chiba, Hiroko Tanaka, Alexander Kohlmann, Satoru Miyano, Claudia Haferlach, Wolfgang Kern, Hideki Makishima, Torsten Haferlach, Hiroyuki Aburatani, Seishi Ogawa、第 74 回日本癌学会学術集会(名古屋)、2015/10/9、

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

永田 安伸 (NAGATA, Yasunobu)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号： 90739575