

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2016

課題番号：15H05668

研究課題名(和文) 骨髄異形成症候群の病態解明および治療標的分子の同定に関する研究

研究課題名(英文) Investigation of the pathogenesis of myelodysplastic syndromes and its therapeutic biomarkers

研究代表者

吉田 健一 (Yoshida, Kenichi)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50738226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄異形成症候群(MDS)症例のRNAシーケンスによりRNAスプライシング因子における変異によるRNAスプライシング異常のパターンを解析し、MDS発症のメカニズムを明らかにした。また、MDSは発現パターン、予後の異なる2群に大きくわかれることを見出した。経時的に採取されたMDS検体の全エクソン解析によりMDS症例では複雑なクローン構造の変化がみられることを示した。さらに、脱メチル化剤Azacitidine(AZA)治療前後に採取された検体の解析から完全寛解が得られた症例のほとんどはTP53変異例であり、TP53変異がAZA治療奏功性のマーカーとなることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：RNA sequencing of myelodysplastic syndromes revealed characteristic splicing abnormalities caused by mutations in RNA splicing factors, which were likely to be underlying mechanism of MDS pathogenesis. Gene expression analysis also separated MDS samples into two distinct groups, which were correlated with distinct prognosis. Whole-exome sequencing of serially collected MDS samples depicted complex pattern of clonal evolution in MDS patients with and without therapy. Targeted sequencing of MDS before and after treatment of demethylating agent, azacitidine, revealed that most patient achieving complete remission harbored TP53 mutations, suggesting that TP53 mutations could be a therapeutic marker of azacitidine treatment.

研究分野：造血器腫瘍

キーワード：骨髄異形成症候群

1. 研究開始当初の背景

2011年に申請者らの研究によって骨髄異形成症候群(MDS)においてはRNAスプライシング因子の遺伝子変異が、特異的かつ高頻度(45-85%)に認められることが明らかにされた(Yoshida et al., *Nature*. 2011)。さらに、その後の研究でMDSでは各症例において多くの遺伝子変異が共存してみられるが、遺伝子変異はランダムに獲得されるのではなく、ヒエラルキーを持って段階的に獲得されていることがわかってきた(Haferlach et al., *Leukemia*. 2014)。RNAスプライシング因子やDNAメチル化に関わる遺伝子は最も早期に獲得される変異であり、一方、RAS経路の遺伝子の変異は後期に獲得され腫瘍の進行に関わると考えられている。このようにMDSでは複数のドライバー遺伝子変異が段階的に獲得されているが、実際にMDSでは同一患者の腫瘍細胞における遺伝学的な多様性(ITH: intratumor heterogeneity)が存在することがわかってきている(Walter et al., *NEJM*. 2012)。しかし、その経時的な変化やITHの有無と治療成績や予後との関係については十分にわかっていない。

また、MDSでは現時点では造血幹細胞移植が唯一の根治的な治療であるが、一部の症例でazacitidine(AZA)やdecitabine(DEC)といった脱メチル化剤が有効である。MDSではTET2やDNMT3AなどのDNAメチル化に関わる遺伝子の変異も高頻度にみられるため、DNAメチル化の異常あるいはメチル化に関わる遺伝子異常が脱メチル化剤の作用機序に関与していることが示唆されるが、現時点では十分なエビデンスはなく、治療効果を予測できるようなマーカーも同定されていない。さらに、多くの症例では経過中に治療抵抗性が獲得されるが、そのメカニズムも十分にわかっていなかった。

したがって、MDSの主要な原因遺伝子異常であるRNAスプライシング因子によるMDS発症のメカニズム、MDSにおけるクローン構造や脱メチル化剤の作用および抵抗性獲得の機序を理解することは、MDSにおける今後の治療戦略を考える上で重要であると考えられた。

2. 研究の目的

- (1) RNAスプライシング因子の遺伝子変異のMDS発症における役割を明らかにする。
- (2) MDSにおけるクローン構造やその経時的な変化を明らかにすることにより、MDSの本質的な病態を明らかにする。
- (3) 脱メチル化剤による治療のMDSにおける作用機序や耐性獲得のメカニズムを明らかにし、MDSの予後改善を目指す。

3. 研究の方法

(1) MDS患者骨髄由来のRNA検体について次世代シーケンサーを用いたRNAシーケンズ解析を行い、RNAスプライシング因子の変異とRNAスプライシングのパターンや遺伝子発現の関係を解析し、MDS発症のメカニズムを解明する。

(2) 経時的に採取されたMDS検体の全エクソンシーケンズにより、MDSにおけるクローン構造、およびその経時的な変化を解析する。特に治療などの影響によりどのようにクローン構造が変化しているか、またクローン構造が治療効果や予後にどのような影響を及ぼしているかを明らかにする。

(3) 脱メチル化剤などによる治療前後に経時的に採取された多数のMDS試料について全エクソンシーケンズやドライバー遺伝子変異の標的遺伝子シーケンズ、メチル化解析を行い、遺伝子変異やメチル化状態により治療の効果にどのような影響がみられるか、また治療によりどのような変化がみられるかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 214症例のMDS患者骨髄単核球あるいはCD34陽性細胞検体から抽出した高品質なRNA検体を用いて、RNAシーケンズを行い、異常スプライシング産物を同定した。214症例中、これまでにMDSで変異が報告されているSF3B1、SRSF2、U2AF1、ZRSR2遺伝子の変異はそれぞれ28%、18%、5%、7%に認められ、それぞれの遺伝子について変異の有無によるスプライシングパターンの違いを検討した。SF3B1変異を有する症例について変異のない症例と比べて、スプライシングパターンを検討したところ、554個のSF3B1変異例で特徴的に増加あるいは減少がみられるスプライシング異常が同定されたが、このうち90%が3'スプライス部位の異常(誤認識)によるものであると考えられた2)(図1)。

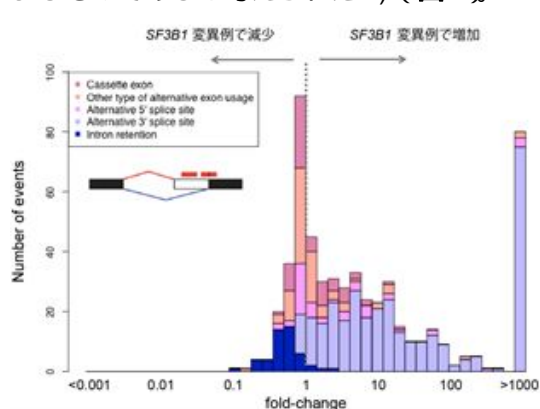


図1 SF3B1変異と強い相関がみられたスプライシング異常のパターン

この結果はSF3B1がU2 snRNP complexを構成して3'イントロンのbranch point sequenceの認識に関わっているという従来から知られている機能と一致する結果と考えられた。また、これらの3'スプライス部

位の異常の約半数は標的遺伝子のフレームシフトを起こし、この結果 *SF3B1* 変異により多くの遺伝子の機能異常が起こっていると考えられた。同様に、*SRSF2* 遺伝子変異を有する症例について変異のない症例と比べてスプライシングパターンを検討したところ、248 個の *SRSF2* 変異例で増加あるいは減少がみられるスプライシング異常が同定され、そのうち多くがエクソンスキッピングなどエクソン単位の異常と関係していた。この結果は、*SRSF2* がエクソン部分にあるエクソンスプライシングエンハンサーと結合してスプライシングに関わる分子を集めてスプライシングを促進する役割を持っていることに合致している。また、*U2AF1* 遺伝子の変異はオルタナティブエクソンの利用および 3' スプライス部位の誤認識と関係していた。*ZRSR2* は minor (U12-type) spliceosome を構成することが知られているが、*ZRSR2* 変異例は過去の報告と同様に U12 タイプのイントロンのイントロンリテンション(スプライスされるはずのイントロン配列が、スプライスされずに保持される)がみられていた。上記のように各遺伝子変異によるスプライシングの異常は多くの遺伝子に起こっていると考えられたが、その中で特定の遺伝子のスプライシング異常が MDS における表現型と関わっている可能性も考えられている。*SF3B1* 変異例でスプライシング異常が見られる遺伝子の中には、ヘム合成に関連した遺伝子が複数同定され、環状鉄芽球の生成に関わっていると考えられ、また *SRSF2* 変異例でスプライシング異常が見られる遺伝子には MDS でも変異が認められる *EZH2* が含まれており、*SRSF2* 変異によりできるスプライシングバリエーションでは早期に終止コドンが出現し、最終的に蛋白量が低下すると考えられた。さらに、RNA シークエンスにより MDS 症例の発現解析を行い、その結果 MDS 症例は大きく発現パターンから 2 群に分けられることがわかった。1 群(Class-I)は赤芽球系の遺伝子の発現の亢進に特徴づけられ、もう 1 群(Class-II)はシグナル分子や幹細胞に関わる遺伝子の発現が亢進しており、Class-II の症例では高頻度に白血病化がみられており、Class-I に比べて予後不良であった。本研究で同定された *TP53* 変異による脱メチル化剤の効果の予測や、遺伝子発現による予後予測は今後の臨床的な応用が期待される。

(2) MDS におけるクローン構造の解析については、12 症例について初診時を含めて 52 検体の経時的(観察期間:2.5-11年)に採取された試料について全エクソン解析を行い、同定された変異をさらに deep sequencing を行うことにより正確なクローン構造の解析を行った。

無治療で経過を観察していた症例、治療を行っている症例とも複雑なクローン構造の変化が観察され、しばしばドライバー変異を獲得した新たなクローンが経過中に出現して

いた(図2)。また、しばしば臨床的な兆候が現れる前に既に低頻度に新たなドライバー変異を獲得しているクローンの出現がみられる症例もあり、経時的に遺伝子異常をモニターすることは臨床上也有用であることが示唆された。

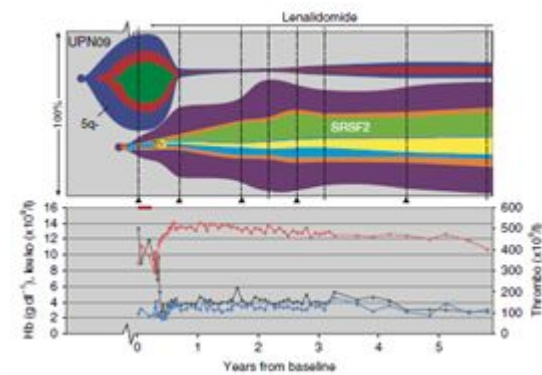


図2 MDS 治療中にみられたクローン進化

(3) 高リスク MDS で脱メチル化剤 Azacitidine(AZA)による治療前後に経時的に採取された 72 例の MDS 試料について骨髄性腫瘍におけるドライバー遺伝子の標的遺伝子シークエンスを行った。平均 1000depth と高深度でシークエンスすることにより、正確に変異アレル頻度を測定し、治療前後のクローンサイズおよびクローン構造の変化を解析することが可能であり、治療効果と関連する遺伝子異常について解析した。治療効果と変異アレル頻度から測定されたクローンサイズの変化はよく相関しており、寛解例ではクローンサイズが著明に減少していた(図3)。

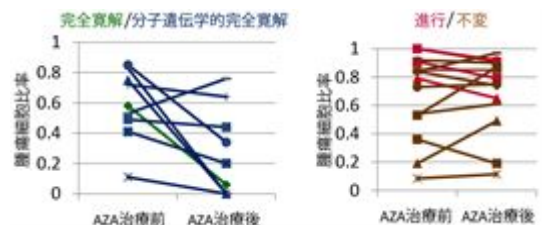


図3 AZA 治療前後のクローンサイズの変化と治療効果との関係

本コホートで最も高頻度に認められた遺伝子異常は *TP53* 変異であったが、完全寛解が得られた症例のほとんどは *TP53* 変異例であり、*TP53* 変異が Azacitidine 治療奏功性のマーカーとなることが示唆された(図4)。

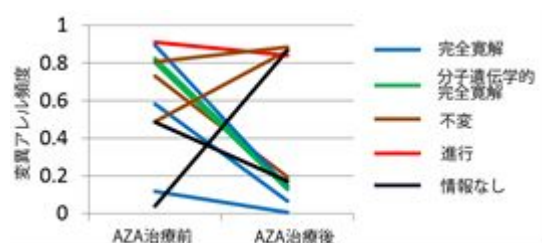


図4 *TP53* 変異陽性例における AZA 治療前後のアレル頻度の変化

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

da Silva-Coelho P, Kroeze LI, Yoshida K, Koorenhof-Scheele TN, Knops R, van de Locht LT, de Graaf AO, Massop M, Sandmann S, Dugas M, Stevens-Kroef MJ, Cermak J, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, de Witte T, Blijlevens NMA, Muus P, Huls G, van der Reijden BA, Ogawa S, Jansen JH. Clonal evolution in myelodysplastic syndromes. *Nat Commun.* 2017;8:15099. doi: 10.1038/ncomms15099.

Makishima H, Yoshizato T, Yoshida K, Sekeres MA, Radivoyevitch T, Suzuki H, Przychodzen B, Nagata Y, Meggendorfer M, Sanada M, Okuno Y, Hirsch C, Kuzmanovic T, Sato Y, Sato-Otsubo A, LaFramboise T, Hosono N, Shiraishi Y, Chiba K, Haferlach C, Kern W, Tanaka H, Shiozawa Y, Gómez-Seguí I, Husseinzadeh HD, Thota S, Guinta KM, Dienes B, Nakamaki T, Miyawaki S, Sauntharajah Y, Chiba S, Miyano S, Shih LY, Haferlach T, Ogawa S, Maciejewski JP. Dynamics of clonal evolution in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet.* 2017;49(2):204-212. doi:10.1038/ng.3742.

Yoshizato T, Nannya Y, Atsuta Y, Shiozawa Y, Iijima-Yamashita Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Suzuki H, Nagata Y, Sato Y, Kakiuchi N, Matsuo K, Onizuka M, Kataoka K, Chiba K, Tanaka H, Ueno H, Nakagawa MM, Przychodzen B, Haferlach C, Kern W, Aoki K, Itonaga H, Kanda Y, Sekeres MA, Maciejewski JP, Haferlach T, Miyazaki Y, Horibe K, Sanada M, Miyano S, Makishima H, Ogawa S. Genetic abnormalities in myelodysplasia and secondary acute myeloid leukemia: impact on outcome of stem cell transplantation. *Blood.* 2017;129(17):2347-2358. doi:10.1182/blood-2016-12-754796.

Mori T, Nagata Y, Makishima H, Sanada M, Shiozawa Y, Kon A, Yoshizato T, Sato-Otsubo A, Kataoka K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Ishiyama K, Miyawaki S, Mori H, Nakamaki T, Kihara R, Kiyoi H, Koefler HP, Shih LY, Miyano S, Naoe T, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Ogawa S, Yoshida K. Somatic PHF6 mutations in 1760 cases with various myeloid neoplasms. *Leukemia.* 2016 Nov;30(11):2270-2273. doi: 10.1038/leu.2016.212.

Hosono N, Makishima H, Mahfouz R, Przychodzen B, Yoshida K, Jerez A, LaFramboise T, Polprasert C, Clemente MJ, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Sanada M, Cui E, Verma AK, McDevitt MA, List AF, Sauntharajah Y, Sekeres MA, Boultonwood J, Ogawa S, Maciejewski JP.

Recurrent genetic defects on chromosome 5q in myeloid neoplasms. *Oncotarget.* 2017;8(4):6483-6495. doi:10.18632/oncotarget.14130.

〔学会発表〕(計10件)

Pedro da Silva-Coelho, Leonie I. Kroeze, Kenichi Yoshida, Theresia N. Koorenhof-Scheele, Louis T. van deLocht, Aniek O. de Graaf, Marion Massop, Marian J. Stevens-Kroef, Petra Muus, Gerwin Huls, Bert A. van der Reijden, Seishi Ogawa, Joop H. Jansen CLONAL ARCHITECTURE AND EVOLUTION IN MYELODYSPLASTIC SYNDROMES. 20th Congress of the European Hematology Association. 2015 June 12. Vienna, Austria.

Hideki Makishima, Kenichi Yoshida, Thomas LaFramboise, Tetsuichi Yoshizato, Matthew Ruffalo, Mikkael A. Sekeres, Bartłomiej Przychodzen, Hiromichi Suzuki, Masashi Sanada, Yasunobu Nagata, Yusuke Okuno, Yusuke Sato, Aiko Sato-Otsubo, Michael J. Clemente, Naoko Hosono, Yuichi Shiraishi, Kenichi Chiba, Hiroko Tanaka, Yusuke Shiozawa, Ines Gomez-Segui, Holleh Husseinzadeh, Swapna Thota, Kathryn Guinta, Brittney Dienes, Tsuyoshi Nakamaki, Shuichi Miyawaki, Yogen Sauntharajah, Shigeru Chiba, Satoru Miyano, Lee-Yung Shih, Seishi Ogawa, Jaroslaw P. Maciejewski. Clonal Dynamics in Myelodysplastic Syndromes. 2016 April 14. International Conference on Myelodysplastic Syndromes (ESH). Estoril, Portugal.

Hideki Makishima, Tetsuichi Yoshizato, Kenichi Yoshida, Thomas LaFramboise, Matthew Ruffalo, Mikkael Sekeres, Hiromichi Suzuki, Bartłomiej Przychodzen, Yasunobu Nagata, Manja Meggendorfer, Masashi Sanada, Yusuke Okuno, Yusuke Sato, Aiko Sato-Otsubo, Tomas Radivoyevitch, Naoko Hosono, Yuichi Shiraishi, Kenichi Chiba, Claudia Haferlach, Wolfgang Kern, Hiroko Tanaka, Yusuke Shiozawa, Inés Gómez-Seguí, Holleh Husseinzadeh, Swapna Thota, Kathryn Guinta, Brittney Dienes, Tsuyoshi Nakamaki, Shuichi Miyawaki, Yogen Sauntharajah, Shigeru Chiba, Satoru Miyano, Lee-Yung Shih, Torsten Haferlach, Seishi Ogawa, Jaroslaw Maciejewski. 2016 June 11. Dynamics of Clonal Evolution in Myelodysplastic Syndromes. 21st Congress European Hematology Association. Copenhagen, Denmark.

Hideki Makishima, Tetsuichi Yoshizato, Kenichi Yoshida, Yasunobu Nagata, Mikkael Sekeres, Yusuke Okuno, Yuichi Shiraishi,

Shigeru Chiba, Satoru Miyano, Lee-Yung Shih, Torsten Haferlach, Seishi Ogawa, Jaroslaw Maciejewski. Mutational Panel for Following Clonal Evolution in Myelodysplastic Syndromes. 第75回日本癌学会学術総会 2016年10月6日 横浜

June Takeda, Kenichi Yoshida, Hideki Makishima, Yuichi Shiraishi, Kenichi Chiba, Satoru Miyano, Shigeru Chiba, Norio Asou, Yasuyuki Miyazaki, Tomoki Naoe, Hitoshi Kiyoi, Seishi Ogawa. Clonal evolution following azacitidine therapy in patients with high-risk myelodysplastic syndromes. 第75回日本癌学会学術総会 2016年10月7日 横浜

Yusuke Shiozawa, Luca Malcovati, Anna Galli, Aiko Sato-Otsubo, Keisuke Kataoka, Yusuke Sato, Hiromichi Suzuki, Tetsuichi Yoshizato, Kenichi Yoshida, Masashi Sanada, Hideki Makishima, Yuichi Shiraishi, Kenichi Chiba, Eva Hellström Lindberg, Satoru Miyano, Mario Cazzola, and Seishi Ogawa. Molecular basis of splicing factor-mutated myeloid neoplasms. 第75回日本癌学会学術総会 2016年10月7日 横浜

June Takeda, Kenichi Yoshida, Tetsuichi Yoshizato, Yusuke Shiozawa, Hideki Makishima, Yasuhito Nannya, Hiromichi Suzuki, Yuichi Shiraishi, Yusuke Okuno, Kenichi Chiba, Satoru Miyano, Masashi Sanada, Toru Kiguchi, Nobuaki Dobashi, Kensuke Usuki, Shigeru Chiba, Norio Asou, Yasuyuki Miyazaki, Tomoki Naoe, Hitoshi Kiyoi, Yukio Kobayashi, Seishi Ogawa. Clonal evolution following azacitidine therapy in patients with high-risk myelodysplastic syndromes. 第78回日本血液学会学術集会 2016年10月13日 横浜

Hideki Makishima, Tetsuichi Yoshizato, Kenichi Yoshida, Mikkael Sekeres, Hiromichi Suzuki, Bartłomiej Przychodzen, Yasunobu Nagata, Manja Meggendorfer, Masashi Sanada, Yusuke Okuno, Yuichi Shiraishi, Kenichi Chiba, Claudia Haferlach, Wolfgang Kern, Yusuke Shiozawa, Shigeru Chiba, Satoru Miyano, Lee-Yung Shih, Torsten Haferlach, Seishi Ogawa, Jaroslaw Maciejewski. Clinical Impact of Somatic Mutations on Clonal Evolution in Myelodysplastic Syndromes. 第78回日本血液学会学術集会 2016年10月13日 横浜

Yusuke Shiozawa, Luca Malcovati, Anna Galli, Aiko Sato-Otsubo, Keisuke Kataoka, Yusuke Sato, Hiromichi Suzuki, Tetsuichi Yoshizato, Kenichi Yoshida, Masashi Sanada, Hideki Makishima, Yuichi Shiraishi, Kenichi Chiba, Eva Hellström Lindberg, Satoru Miyano, Mario Cazzola, Seishi Ogawa. The transcriptional and

alternative splicing landscape of myelodysplastic syndromes. 第78回日本血液学会学術集会 2016年10月14日 横浜

June Takeda, Yusuke Shiozawa, Yuichi Shiraishi, Yusuke Okuno, Keisuke Kataoka, Kenichi Chiba, Hiroko Tanaka, Masashi Sanada, Shigeru Chiba, Norio Asou, Hitoshi Kiyoi, Kiyotoshi Imai, Chikara Hirase, Nobuaki Dobashi, Toru Kiguchi, Yasushi Miyazaki, Tomoki Naoe, Hideki Makishima, Satoru Miyano, Seishi Ogawa, Kenichi Yoshida. Genetic Landscape and Clonal Evolution Following 5-Aza Therapy in Patients with High-Risk Myelodysplastic Syndromes. The 58th American Society of Hematology Meeting and Exposition. 2016 Dec 5. San Diego, U.S.A.

〔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〕
特記事項なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 健一 (YOSHIDA, Kenichi)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：50738226