

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21546

研究課題名（和文）新規単一細胞解析技術を用いた、段階的・階層的な変異獲得によるがん発症過程の解明

研究課題名（英文）Elucidating the contribution of the order of mutation acquisition to the clonal evolution of cancer using single-cell sequencing

研究代表者

小川 誠司（Ogawa, Seishi）

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：60292900

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：がんの発症における新たな変異獲得によるクローン選択の過程は、ランダムな過程ではなく、発症以前に生じた変異や環境に依存すると考えられているが、その分子論的基盤は十分に理解されていない。本研究では、代表的ながんである白血病において有意に共存しやすい組み合わせの遺伝子変異に焦点をあてて、同一の遺伝子変異の組み合わせを有するものの、変異の獲得順序の違うマウスモデルを構築し、最新のゲノム解析技術を用いて、変異の獲得順序や細胞間相互作用がクローン進化メカニズムの過程に及ぼす影響について分子レベルでの解明を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性骨髄性白血病は、加齢に伴い造血幹細胞に遺伝子変異が蓄積して発症する腫瘍性疾患であり、高齢化に伴い患者数が増加している。造血幹細胞が複数の変異を獲得し、クローン選択によって高度な多様性をもった細胞集団が形成される分子メカニズムについては、発症の本質に関わる問題であるにもかかわらず、なお多くが不明である。本研究成果は、同一の遺伝子変異の組み合わせを有するものの、変異の獲得順序の違うマウスモデルを用いて、がんの発症におけるクローン選択の過程の分子病態を明らかにしたもので、将来的には、難治性がんの治療成績向上に資する可能性がある意義深い研究成果と考えている。

研究成果の概要（英文）：Next-generation sequencing technology have revealed a comprehensive registry of driver mutations recurrently found in MDS patients. It has also been revealed that driver mutations are acquired and positively selected in a well-organized manner to allow for expansion of the initiating clone to compromise normal hematopoiesis. To understand the molecular mechanisms underlying the clonal evolution of leukemic clones, we generated several mice models-- 1) mice with different combination of driver mutations among the four driver mutations (SRSF2, STAG2, ASXL1, RUNX1) that is frequently observed in "chromatin-spliceosome" mutated AML subtypes, 2) pre-leukemic mice models using RCAS/TVA mediated gene transfer which harbored several combinations of mutations but the order of acquisition of the mutations are different. This study elucidated the contribution of the order of mutation acquisition to the clonal evolution of cancer.

研究分野：腫瘍学、血液腫瘍学

キーワード：単一細胞シーケンス 遺伝子変異 クローン進化 白血病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年高度に進化したシーケンス技術によって、遺伝子変異に基づいて直接的にがんの多様性や進化を論ずることが可能となった。申請者を中心とする研究グループは、造血器腫瘍を含む様々ながんのゲノム解析研究の分野で 1) RNA スプライシング因子(Yoshida et al., *Nature* 2011)やコヒーシ複合体の異常(Kon et al., *Nat. Genet.* 2013)など、従来想像できなかった「新たな変異標的」の同定、2) 遺伝子変異に基づく新たな病型の同定、3) 遺伝子変異の観点から描出される腫瘍内多様性の理解などに関して重要な貢献を行ってきた。一方、こうして得られた成果からは、新たに、がんの初期発生やクローン進化に関して新たな疑問も浮き彫りにされた。がんの発症の過程で獲得される遺伝子変異には、しばしば強い共存・排他関係が存在すること、一つのがん組織のなかで同一遺伝子に生ずる異なる変異が観察されることは、がんにおける新たな変異獲得によるクローン選択がランダムな過程ではなく、発症以前に生じた変異や環境に強く依存することを示唆している。しかし、その分子論的背景については、がんの病態の本質的な疑問であるにもかかわらず、ほとんど明らかになっていない。また、クローン選択において重要な役割を果たす新たな分子標的が明らかになれば、治療抵抗性のがんに対して従来にない新規の治療標的を提供できる可能性も期待できるが、その分子論的基盤は十分に理解されていない。

2. 研究の目的

がんは、単一の細胞を起源として増殖した(=クローン選択をうけた)、遺伝的に多様に細胞集団の異常な振る舞いによって引き起こされる疾患である。この増殖・選択は、ドライバー変異と総称される一群の体細胞変異によって駆動されることから、ドライバー変異の同定と、それがクローン選択を生ずるメカニズムの解明は、「がんはなぜ生じるか」を理解する上での中心的なテーマといえる。

代表的な「がん」である白血病の発症過程においては、腫瘍の起源となる遺伝子変異がしばしば造血幹細胞レベルで生じ、そこから、新たな変異の獲得とクローン選択によって、造血器腫瘍の発症にいたると考えられている。さらに、近年、健常高齢者や骨髄不全状態の患者では、白血病で頻繁に認められるドライバー変異を有する「クローン性造血」が高頻度に認められることが報告されている(Jaiswal et al., *NEJM* 2014, Genovese et al., *NEJM* 2014)。白血病の各症例においては複数の遺伝子変異が共存してみられるが、興味深いことに、白血病幹細胞において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(階層性)を持って段階的に獲得されること、しばしば強い共存・排他関係が存在すること、一つのがん組織のなかで同一遺伝子に生ずる異なる変異(“parallel 変異”)が観察されることも明らかになった(Haferlach et al., *Leukemia* 2014)。さらに、変異の獲得順序により、最終的には同じ組み合わせの遺伝子変異をもっていても病態が大きく変わることも報告された(Ortmann et al., *NEJM* 2015)。この観察結果は、がんの発症における新たな変異獲得によるクローン選択がランダムな過程ではなく、それ以前に生じた変異細胞や造血環境(ニッチ)との相互作用ががんのクローン進化において重要な役割を担うことを示唆しているが、その分子論的基盤は十分に理解されていない。そこで、本研究では、病態を模倣するマウスモデルや、最新のゲノム解析技術を用いて、変異の獲得順序や細胞間相互作用がクローン進化メカニズムの過程に及ぼす影響について分子レベルで理解することを目的とする。

3. 研究の方法

上述の研究目的を達成するために、代表的ながんである白血病において有意に共存しやすい組み合わせの遺伝子変異に焦点をあてて、遺伝子変異の獲得順序がクローン進化メカニズムに及ぼす影響を探索した。

第一に、”Chromatin-spliceosome”グループと呼ばれる予後不良の同一の病型グループに分類され(Papaemmanuil et al, *NEJM* 2016)、さらに互いに有意に共存しやすく、変異獲得順序に一定のヒエラルキー(階層性)があることを我々が明らかとした4つの遺伝子変異(RNAスプライシング因子 *SRSF2*、コヒーシン複合体 *STAG2*、転写因子 *RUNX1*、ポリコム複合体 *ASXL1*の変異)に着目した。*Stag2*と*Runx1*、*Stag2*と*Asx11*、*Stag2*と*Srsf2*のダブルミュータントマウスモデルの病態解析を進め、それぞれの変異の組み合わせの違いによるMDS発症機構の相違の検討を行った。

第二に、造血幹細胞特異的遺伝子導入システムとCRISPR/Cas9によるゲノム編集技術を用いて、MDSおよびAMLにおける主要な複数のドライバー遺伝子変異を*in vivo*でごく一部の造血幹細胞に導入したマウスを作成し、白血病発症におけるクローン進化の過程をモデリングした。具体的には、まず初めに、造血幹細胞分画に特異的に高発現する*Evi1*遺伝子座の下流に、トリ細胞に特異的に発現する*TVA*遺伝子を導入した*Evi1-TVA*ノックインマウス(Tajima et al., *Sci Rep.* 2017)と、*Rosa26*遺伝子座に*Cas9*遺伝子がノックインされたマウスを交配させた。白血病のドライバー変異として知られる複数の遺伝子に対するガイドRNAを発現するウイルスベクターを作成してプールし、経静脈的にマウスに感染させた。このウイルスは、*Rcas*ウイルスを改変したレンチウイルスであり、*TVA*遺伝子を発現する細胞のみに特異的に感染するため、一部の造血幹細胞のみに目的の遺伝子変異を導入することが可能であった。遺伝子導入できた細胞を蛍光マーカーにより追跡することにより、ドライバー遺伝子変異を導入された細胞がクローン選択を受ける過程の解明を行った。さらに、マウス由来の造血幹細胞を*ex vivo*で増幅させ、CRISPR/Cas9技術を用いて高効率に遺伝子変異を導入し、多数の造血幹細胞をレシピエントマウスに移植することで、放射線照射によるストレスのない生理的な条件下で生着可能なマウスモデルを用いて、同一の遺伝子変異の組み合わせを有するものの、変異の獲得順序の違うマウスモデルの構築を進めた。

4. 研究成果

第一に、”Chromatin-spliceosome”グループと呼ばれる予後不良の同一の病型グループに分類され、さらに互いに有意に共存しやすく、変異獲得順序に一定のヒエラルキー(階層性)があることを我々が明らかとした遺伝子変異(*SRSF2*、*STAG2*、*RUNX1*、*ASXL1*の変異)に着目した。まず、*Stag2*と*Runx1*に関するダブルノックアウトマウスの解析を通じて、*Stag2*と*Runx1*は、染色体のエンハンサー領域において共局在しており、両者が欠失することによって、エンハンサー-プロモーターのループ構造が破壊される結果、遺伝子発現調節の異常をもたらす結果、MDSを発症することを見出した。さらに、*Stag2*と*Asx11*、*Stag2*と*Srsf2*のダブルミュータントマウスをそれぞれ作出し、両変異の協調によるMDS発症メカニズムの解明を進めている。これまでに、異なる遺伝子変異の組み合わせで、異なる表現型および分子病態を示すことを明らかにしており、造血細胞を用いた網羅的なトランスクリプトーム解析、ATAC解析により、病気の発症におけるその詳細な分子メカニズムの解明を継続する予定である。

第二に、白血病クローン進化過程を、骨髄移植を用いないより生理的な実験系でモデリングするために、Rcas/TVA システムを用いて造血幹細胞特異的遺伝子導入モデル動物の作成を行った。白血病の既知のドライバー遺伝子計 17 遺伝子に対して、各 4-10 個の gRNA を発現するレンチウイルスベクターを作成した。まず、マウス由来細胞株である 3T3 細胞にレンチウイルス gRNA ベクターを感染させ、マーカー遺伝子でソーティングした細胞から DNA を抽出し、gRNA の標的領域のディープシーケンスにより、切断効率に優れた gRNA を選択した。その後、gRNA レンチウイルスを経静脈的にマウスに感染させ、経時的に末梢血での蛍光マーカーを追跡することにより、造血幹細胞に遺伝子変異を導入した。1 年間の観察にて、変異を導入したい造血幹細胞が多様なパターンでのクローン選択を受けることを明らかにした。このように、少数の造血幹細胞に *in vivo* で遺伝子変異を導入し、初期の遺伝子異常の獲得からがん発症・進展に至るまでの挙動を評価するのに有用なモデル動物を作成することができた。さらに、造血幹細胞を *ex vivo* で増幅し、上述のドライバー遺伝子について CRISPR/Cas9 システムを用いてノックアウトするシステムの確立を行った。まず、マウス由来の造血幹細胞を *ex vivo* で増幅させ(Wilkinson et al., *Nature* 2019)、CRISPR/Cas9 技術を用いて高効率に遺伝子変異を導入し、多数(1×10^6 個以上)の造血幹細胞をレシピエントマウスに移植することで、放射線照射によるストレスのない生理的な条件下で生着可能なマウスモデルを用いて、同一の遺伝子変異の組み合わせを有するものの、変異の獲得順序の違うマウスモデルの構築を試みた。引き続き本研究を継続し、変異の獲得順序によって、ドライバー変異の獲得順序ががん細胞そのものの振る舞いにどのような影響を与えるのか、初期のクローン選択に続く新たな変異を獲得した細胞が、それ以前に生じた変異細胞や造血環境との間にどのような相互作用を生じるかの探索を行う方針である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mylonas Elena, Seishi Ogawa et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Single-cell analysis based dissection of clonality in myelofibrosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-13892-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Ochi Yotaro, Kon Ayana, Ogawa Seishi et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Combined Cohesin/RUNX1 Deficiency Synergistically Perturbs Chromatin Looping and Causes Myelodysplastic Syndromes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Discovery	6. 最初と最後の頁 836 ~ 853
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/2159-8290.CD-19-0982	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
1. 著者名 OGAWA Seishi	4. 巻 96
2. 論文標題 Genetic basis of myelodysplastic syndromes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the Japan Academy, Series B	6. 最初と最後の頁 107 ~ 121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2183/pjab.96.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Todisco G, Creignou M, Galli A, Guglielmelli P, Rumi E, Roncador M, Rizzo E, Nannya Y, Pietra D, Elena C, Bono E, Molteni E, Rosti V, Catricala S, Sarchi M, Dimitriou M, Ungerstedt J, Vannucchi AM, Hellstrom-Lindberg E, Ogawa S, Cazzola M, Malcovati L.	4. 巻 35(8)
2. 論文標題 Co-mutation pattern, clonal hierarchy, and clone size concur to determine disease phenotype of SRSF2(P95)-mutated neoplasms.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 2371-2381
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41375-020-01106-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Yotaro Ochi, Ayana Kon, Seishi Ogawa et al.
2. 発表標題 COMBINED COHESIN-RUNX1 DEFICIENCY SYNERGISTICALLY PERTURBS CHROMATIN LOOPING
3. 学会等名 25th Congress of EHA (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kon A, Nakagawa MM, Inagaki R, Kataoka K, Ochi Y, Makishima H, Nakayama M, Koseki H, Nannya Y, Ogawa S
2. 発表標題 Functional characterization of compound DDX41 germline and somatic R525H mutations in the development of myeloid malignancies
3. 学会等名 62nd ASH Annual Meeting and Exposition (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masahiro M Nakagawa, Ryosaku Inagaki, Yutaka Kuroda, Yasuhito Nannya, Zhao Lanying, Yotaro Ochi, June Takeda, Xingxing Qi, Akinori Yoda, Ayana Kon, Nobuyuki Kakiuchi, Hideki Makishima, Shuichi Matsuda and Seishi Ogawa
2. 発表標題 Distinct pathogenesis of clonal hematopoiesis revealed by single cell RNA sequencing integrated with highly sensitive genotyping method
3. 学会等名 62nd ASH Annual Meeting and Exposition (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ayana Kon
2. 発表標題 骨髄系腫瘍のクローン進化
3. 学会等名 The 82nd Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担 者	昆 彩奈 (Kon Ayana) (20772403)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	

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