

令和元年9月2日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19203

研究課題名(和文)細胞のポピュレーションに着目した骨髄増殖性腫瘍の線維化予測因子の探索

研究課題名(英文) Finding poor prognostic factors of myelofibrosis targeting tumor cell population

研究代表者

森下 総司 (Morishita, Soji)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：10635866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄増殖性腫瘍と呼ばれる疾患群のうち、一部の疾患では二次性の骨髄線維症へ移行することが知られている。移行後の予後は極めて不良であることから、線維症の予後因子を見出すことを目的とした。これまでに、骨髄線維症において見出される遺伝子変異を対象としたターゲットリシーケンシングを100例超の骨髄線維症患者に対して実施し、ASXL1変異とSRSF2変異の存在が、骨髄線維症の予後不良に相関する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまでの報告と同様、ASXL1変異とSRSF2変異が骨髄線維症の予後不良因子である可能性が示唆された。実際にこれらの遺伝子変異を有する症例における予後を詳らかにする必要があるものの、将来的には、事前にこれらの遺伝子変異の有無を調べることで、骨髄移植など、より積極的な治療を選択できるようになると考えられ、社会的意義は大きいと言える。

研究成果の概要(英文)：The prognosis of primary myelofibrosis (PMF) is poor in comparison to that of other subtypes of myeloproliferative neoplasms. To investigate the relationship between mutations and prognosis of PMF, a massively parallel target sequencing identifying mutations on 72 regions locating at MPNs-relevant 14 genes (CSF3R, MPL, JAK2, CALR, DNMT3A, TET2, EZH2, ASXL1, IDH1/2, SRSF2, SF3B1, U2AF1, and TP53) have designed and the mutation spectrum of 101 Japanese patients having overt or prefibrotic PMF diagnosed by WHO 2016 criteria. As a result, 66 out of 101 PMF patients (65.3%) harbored any mutations other than JAK2, CALR, or MPL mutations. In the 66 patients, ASXL1 mutations were the most frequently detected (42.6%). The prognostic risk classification based on the combination of CALR and ASXL1 mutation revealed that the CALR-/ASXL1+ group had significantly higher mutation load ( $P < .001$ ). We also clarified that SRSF2 mutations strongly associated to the highly risks predicted by DIPSS ( $P < .05$ ).

研究分野：病態検査医学

キーワード：予後不良因子 骨髄線維症 骨髄増殖生腫瘍 ターゲットリシーケンシング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨髄増殖性腫瘍(myeloproliferative neoplasms: MPN)は、造血幹細胞レベルで後天的に獲得される遺伝子変異が原因で、幼若細胞から成熟血球細胞までの各分化段階の血球細胞が異常増殖する疾患である。MPNには、主に赤血球が増加する真性赤血球増加症(polycythemia vera: PV)、血小板が増加する本態性血小板血症(essential thrombocythemia: ET)、異常増殖した巨核球より分泌されるサイトカインにより骨髄の線維化をきたす原発性骨髄線維症(primary myelofibrosis: PMF)などが分類される。これら3疾患のうち、PVとETのおよそ10~15%程度が二次性の骨髄線維症(post-PV/ET myelofibrosis: post-PV/ET MF)へと移行することが知られている。移行後の全生存期間は約3年で、予後は極めて不良であることから、post-PV/ET MFへの移行リスクを把握し、いち早く治療へ結びつけることが重要である。これまでに、post-PV/ET MFの診断基準については提唱されている(Barosi G., et al., *Leukemia* 2008)が、線維化への移行リスクを明らかにした報告は存在しない。このような背景から、申請者のグループでは、MPNに共通して見出される遺伝子変異のひとつであるJAK2V617Fと呼ばれる点突然変異に着目し、患者の全JAK2遺伝子量に対するJAK2V617Fの存在率(JAK2V617F allele burden)が上昇する症例では線維化のリスクが高いことを報告した(図1, Morishita S., et al., *Int J Hematol* 2015)。ところが、線維症へ移行しない症例であっても、JAK2V617F allele burdenは罹患期間とともに上昇する傾向にあり、非移行群であっても急激な上昇を認める症例も存在するため、JAK2V617F allele burden 上昇量のみでは移行を予測できない。そこで申請者は、同程度のJAK2V617F allele burden であっても、細胞集団における野生型、ヘテロ変異型、ホモ変異型それぞれの細胞数が患者によって異なり、この違いが線維化に関係するのではないかと考えた。この仮説を実証するためには、患者の血球細胞集団から細胞をひとつずつ取り出し、それらの遺伝子変異を逐一決定する必要がある。また、遺伝子変異に基づく細胞数の違いが予後に影響することを示すには、望む遺伝子型の細胞を生きたまま選択的に分取し、これを用いた分子生物学的アプローチによる実証が必須である。

### 2. 研究の目的

上述を踏まえ、本研究課題では、(1)細胞を遺伝子変異に基づき生きたまま1細胞ずつ分離できる技術を開発すること、(2)開発した技術をもって、血球細胞を遺伝子変異に基づき野生型、ヘテロ変異型、ホモ変異型に分け、その数を比較することで線維化との関係を明らかにすること、を目的として研究を開始した。

### 3. 研究の方法

#### (1)骨髄線維症で見出される遺伝子変異を網羅的に解析できる技術の開発

上述のとおり、研究開始当時は細胞に蛍光標識された核酸プローブを導入し、細胞内で発現しているJAK2 mRNAを認識して蛍光を発するシステムの構築を目指し、開発を行っていた。本系の構築にあたり、まず、JAK2V617F部位を含む領域で設計され、蛍光標識された核酸プローブと、キャプチャーベイトを設計した。キャプチャーベイトはJAK2V617F変異を含む領域で、JAK2 mRNAと相補的な配列となるよう設計し、核酸プローブはキャプチャーベイトに相補的で、より短い鎖長となるよう設計した。設計したキャプチャーベイトを金ナノ粒子へチオール結合させたのち、これに核酸プローブをハイブリダイズさせた。ハイブリダイズさせた複合体を、JAK2野生型細胞株(UT-7/Epo)、JAK2V617Fホモ変異型細胞株(HEL)より抽出したtotal RNAと混合し、遺伝子型に対応した蛍光の発光が見られるかを試験管内で検討した。その後、金ナノ粒子複合体をUT-7/Epo株、HEL株に導入し、フローサイトメーターを用いることで、遺伝子型に基づいて細胞を分離できる条件を調べたが、核酸プローブの細胞への取り込みが困難なことが判明した。そこで、新たな遺伝子変異の獲得による細胞のポピュレーションの動的な変化に着目し、骨髄線維症で比較的高頻度に見出される遺伝子変異の有無を網羅的に解析できる技術を構築することとした。

骨髄線維症では、核酸のエピジェネティックな構造変化に関係する遺伝子や、遺伝子スプライシングに関わる遺伝子などに変異が見出されることが報告されている。そこで、オンラインで公開されているデータベースをもとに、骨髄線維症で比較的高頻度に見出される遺伝子変異としてCSF3R、MPL、JAK2、CALR、DNMT3A、TET2、EZH2、ASXL1、IDH1/2、SRSF2、SF3B1、U2AF1、TP53遺伝子を選定した。選定した14遺伝子の配列を全ゲノム中から抽出するため、ピオチン標識された核酸プローブを178種類用意し、これを断片化したゲノムDNAとハイブリダイゼーションさせたのち、ストレプトアビジンコートされたマグネティックビーズで回収した。回収されたDNA断片の配列を、次世代シーケンサー(MiniSeq, Illumina社)を用いて解読した。

#### (2)骨髄線維症患者を対象とした変異スペクトラムの解析

日本全国の100を超える検体提供施設の協力のもと、骨髄線維症患者101例を収集した。これらの患者を対象に、(1)で構築したシステムを用いて、遺伝子変異を探索した。得られたデータから、信頼性の低い遺伝子変異を除外するため、QC>20、エクソン上に存在する、アミノ酸の置換、もしくは欠失・挿入を伴う、コールされた遺伝子変異の頻度が3%以上である、

日本人におけるアレル頻度が0.5%以下である、もしくは、データベースに存在しない変異である、の条件を設け、これら5条件全てを満たした遺伝子変異を抽出して解析に用いた。変異スペクトラムの解析には、統計分析フリーソフトRのGenVisRパッケージを用いた。

### (3) 遺伝子変異の組み合わせによる予後予測システムを用いた解析

(2)で明らかとなった変異スペクトラムをもとに、患者を ASXL1 遺伝子変異と CALR 遺伝子変異の有無の組み合わせで2群にわけ、それぞれを予後不良群 (ASXL1 遺伝子変異陽性, CALR 遺伝子変異陰性)と予後良好群 (ASXL1 遺伝子変異陰性, CALR 遺伝子変異陽性)とした。それぞれの群における遺伝子変異の獲得数を比較するとともに、予後不良群でのみ見出される遺伝子変異を決定した。

### (4) 臨床情報を用いた骨髄線維症の予後予測システムに 관련된 遺伝子変異の探索

(3)と並行して、患者の臨床情報をもとにダイナミック IPSS (DIPSS) 法と呼ばれる予後予測システムを用いて、患者のリスク分類を行った。DIPSS では、患者は4グループ (Low, Int-1, Int-2, High) に分類されるが、本研究では、患者を低リスク群 (Low or Int-1), 高リスク群 (Int-2 or High) の2群にわけ、決定木解析を用いて、高リスク群に關係する遺伝子変異、もしくは、遺伝子変異の組み合わせを調べた。

## 4. 研究成果

### (1) 骨髄線維症患者を対象とした変異スペクトラムの解析

骨髄線維症患者 101 名を対象とした遺伝子変異のスペクトラムを図1に示す。この結果より、骨髄線維症では、実に 65.3% の症例で、ドライバー変異とされる JAK2, MPL, CALR 遺伝子変異の他に遺伝子変異を持つことが明らかとなった。また、それらのうち、もっとも高頻度に見られたのは ASXL1 遺伝子変異であり、その頻度は 42.6% であった。続いて、ドライバー変異の種類で遺伝子変異の獲得数を比較したが、有意な差は認められなかった。ところが、JAK2, MPL, CALR 遺伝子変異のいずれも有さない症例 (triple negative PMF) では、遺伝子変異の獲得数が少ない傾向があった。

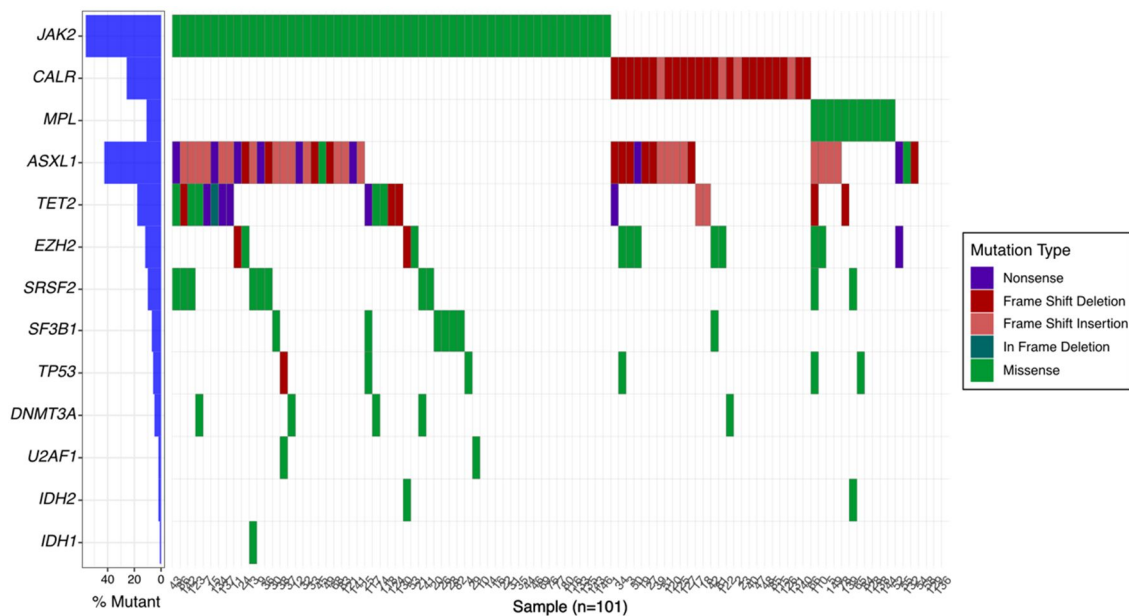


図1. 骨髄線維症患者の変異のスペクトラム。

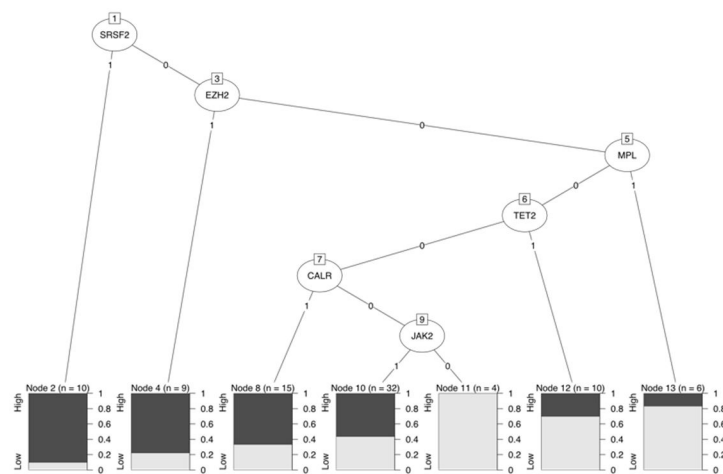
### (2) 遺伝子変異の組み合わせによる予後予測システムを用いた解析

(1)の結果をもとに、患者を ASXL1 遺伝子変異と CALR 遺伝子変異の組み合わせで2群に分けた。該当する症例数は、それぞれ、予後不良群 (ASXL1 遺伝子変異陽性, CALR 遺伝子変異陰性) 31例、予後良好群 (ASXL1 遺伝子変異陰性, CALR 遺伝子変異陽性) 14例であった。この2群の遺伝子変異数を比較すると、予後不良群において、有意に遺伝子変異数が多い ( $P < .001$ ) ことが明らかとなった。検定には Brunner-Munzel 検定を用いた。過去の報告で、遺伝子変異の獲得数が多いほど予後不良であることが明らかとなっており (Lundberg G. et al., Blood 2014), この結果は、ASXL1 遺伝子変異が骨髄線維症において予後不良因子となり得ることが考えられた。

### (3) 臨床情報を用いた骨髄線維症の予後予測システムに 관련된 遺伝子変異の探索

DIPSS 法によって患者の予後のリスク分類を行った。94例のリスク分類の結果をもとに、患者を低リスク群 (Low or Int-1), 高リスク群 (Int-2 or High) の2群にわけ、それぞれの患者の遺伝子変異のスペクトラムを用いて、もっとも高率にリスク分類を行うことができる遺伝子変異の組み合わせを決定木解析により決定した。得られた決定木を用いた場合の予測一致率は、69.8%であった。また、この決定木によれば、SRSF2 遺伝子変異陽性例において、高リスク群の

患者の割合が有意に高いこと ( $P < .05$ ), triple-negative PMF では全症例が低リスク群であることが明らかとなった(図2)。このことから, SRSF2 遺伝子変異が骨髄線維症の予後不良に関わる可能性があることが示唆された。



さらに (1)の結果と併せて考えると, triple-negative PMF は予後良好であることが考えられた。これらについては, ASXL1 遺伝子変異と SRSF2 遺伝子変異の有無と, ドライバー変異の有無で全生存率を解析する予定であり, 今後明らかになっていくものと推察される。

図2. 決定木解析による DIPSS リスク分類と遺伝子変異の関係。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計1件)

Edahiro Y, Araki M, Inano T, Ito M, Morishita S, Misawa K, Fukuda Y, Imai M, Ohsaka A, and Komatsu N. Clinical and molecular features of patients with prefibrotic primary myelofibrosis previously diagnosed as having essential thrombocythemia in Japan. *Eur J Haematol* 102(6) 516-520, 2019, 査読あり

### 〔学会発表〕(計2件)

Soji Morishita, Tomonori Ochiai, Kyohei Misawa, Tadaaki Inano, Yasutaka Fukuda, Yasumitsu Kurokawa, Yoko Edahiro, Marito Araki, Akimichi Ohsaka, and Norio Komatsu. Mutations in Epigenetic and Splicing Related Genes among Japanese Overt and Prefibrotic Primary Myelofibrosis Using Target Sequencing. The 10th JSH international symposium, Mie, Japan. 2019.

森下総司, 落合友則, 三澤恭平, 稲野資明, めで島麻衣, 大坂顯通, 小松則夫. ターゲット遺伝子シーケンスパネルによる原発性骨髄線維症の遺伝子変異解析. 第80回日本血液学会学術集会, 大阪, 2018年

### 〔図書〕(計0件)

### 〔産業財産権〕

#### 出願状況 (計1件)

名称: 骨髄増殖生腫瘍の診断

発明者: 森下総司, 小松則夫, 常田聡, 山脇紗耶, 伊藤昌可, 川路英哉

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2018-078074

出願年: 2018

国内外の別: 国内

#### 取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

### 〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。