

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09026

研究課題名(和文) 骨髄異形成症候群から急性白血病へ移行する分子機構の探索～新規治療法開拓に向けて

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of 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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：MDS患者由来細胞株MDS92とその亜株は、MDSから急性白血病への流れを再現した一連の培養細胞モデルである。発端となった元患者骨髄細胞も加えた全エクソーム解析の結果、患者骨髄にTP53変異およびCEBPA変異が検出された。その培養中にNRAS変異が付加され細胞株樹立へとつながったと推定された。またMDS92から芽球用亜株へ移行する段階でHistone1H3C ドライバー変異が見出されたが、変異クローンの拡大はIL-3依存性で、IL-3非存在下では同変異のないクローンの存続が確認された。これら細胞株の遺伝子解析によって、MDSから急性白血病へ移行する分子機構解明への手掛かりが得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中高齢者に好発する血液難病であるMDSは急性白血病に移行すると著しく予後不良であり、この疾患の克服は社会的にも重要課題である。本研究は世界的にユニークなMDS細胞株およびそこから派生した急性白血病細胞株を用いて、MDSから急性白血病へ移行する分子機構の一端を解明したという学術的価値の高い内容である。また細胞株研究では新規薬剤の基礎的検討が繰り返し可能なことから、今後新たな治療法の開拓によってこの疾患の克服に繋げるという社会的にも期待できる成果といえる。

研究成果の概要(英文)： We established MDS92 cell line from a patient with myelodysplastic syndromes (MDS), and 5 sublines including MDS-L were isolated from MDS92. Further, MDS-L-2007 and MDS-LGF were obtained from MDS-L in the presence and absence of IL-3, respectively. Whole exome analyses demonstrated: TP53 mutation was found in the patient sample and was inherited by subsequent cell lines; CEBPA mutation was present in a part of the sample fraction; NRAS mutation emerged during culture. Such accumulated mutations could cause establishment of MDS92 cell line. Histone-H3 (K27M) mutation (H3-K27M) was newly detected in MDS-L. MDS-L cells were a mixture of H3-K27M-mutant and wild-type clones, and this mutation was inherited by MDS-L-2007 but not MDS-LGF. H3-K27M-mutant clones exerted growth advantage in the presence of IL-3 but did not without IL-3 probably because of strict IL-3 dependency of the mutant clones. We propose this series of cell lines as an in vitro model for leukemic evolution of MDS.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：骨髄異形成症候群 白血病化 遺伝子変異 網羅的ゲノム解析

## 1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndromes ; MDS) は主に中高齢者に発症する難治性の造血障害で、致命的な骨髄不全に陥る一方しばしば急性骨髄性白血病 (AML) へ移行する。病型移行に関して近年網羅的なゲノム解析結果が世界的に集約されつつあるが、個々の症例で遺伝子変化を追跡し得た例はごく限られており、上述のシナリオを実証した細胞モデルは存在しない。

## 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、MDS から AML へ移行する病型進展の分子機構の一端を解明し、病型進展を阻止する新しい治療戦略への道を開くことである。MDS から AML 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、MDS の病態悪化を阻止するという新しい予後改善法の開拓につながる。

## 3. 研究の方法

細胞株樹立の発端となった MDS 患者骨髄およびその初期培養細胞と、それを元に樹立された MDS92 に始まる一連の細胞株各々について、表面マーカー解析、全エクソーム解析をおこなって各細胞株の特徴を見出し、かつ健康人ゲノムレファレンス配列を基本にして、相互の変異比較をおこない、有意な遺伝子変異を抽出する。その中から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、国際腫瘍体細胞変異カタログなど既に集積されたゲノム情報データベースを参照しながら、病型進展に関与する候補遺伝子を探索・選出する。

さらに特定の遺伝子のウルトラディープターゲットシーケンシング、ヒストン H3 に注目して、27 番目リジン (K27) のジメチル化、トリメチル化を区別できる抗体 (抗 H3 K27me2、抗 H3 K27me3) による解析、細胞の single cell sorting によるクローニングに取り組む。

## 4. 研究成果

### (1) 一連の細胞株における腫瘍関連遺伝子変異の検出とその意義付け

MDS92 細胞株は遺伝子不安定性を有していると考えられ、長期間継代培養しているとはしばしば MDS-L に類似した幼若細胞から成る集団が抽出され、一方 MDS-L は元来増殖因子依存性であるが、その中から増殖因子がなくても増殖する亜株 MDS-LGF が樹立された。一連の細胞株 (ここでは MDS92 細胞株ファミリーと呼ぶ) は MDS 期から始まり AML へと段階的に悪性転換していく過程を再現しているものと考えられたので、MDS92 樹立の発端となった患者骨髄細胞保存検体を出発点として、一連の細胞株が派生していく過程でおこっているエクソームの変化を網羅的に解析した。

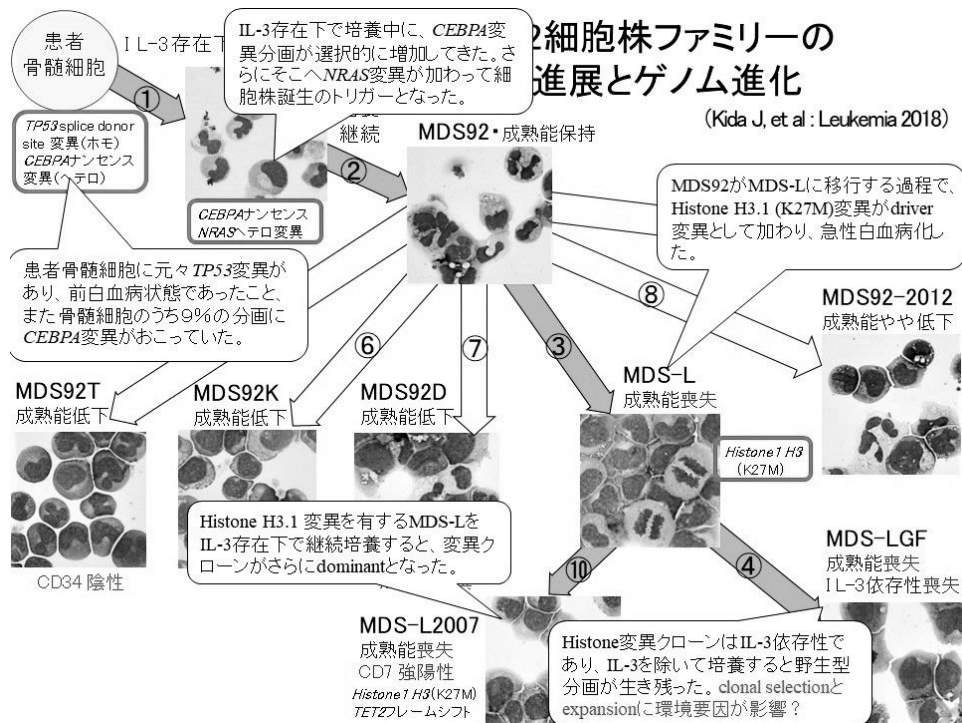
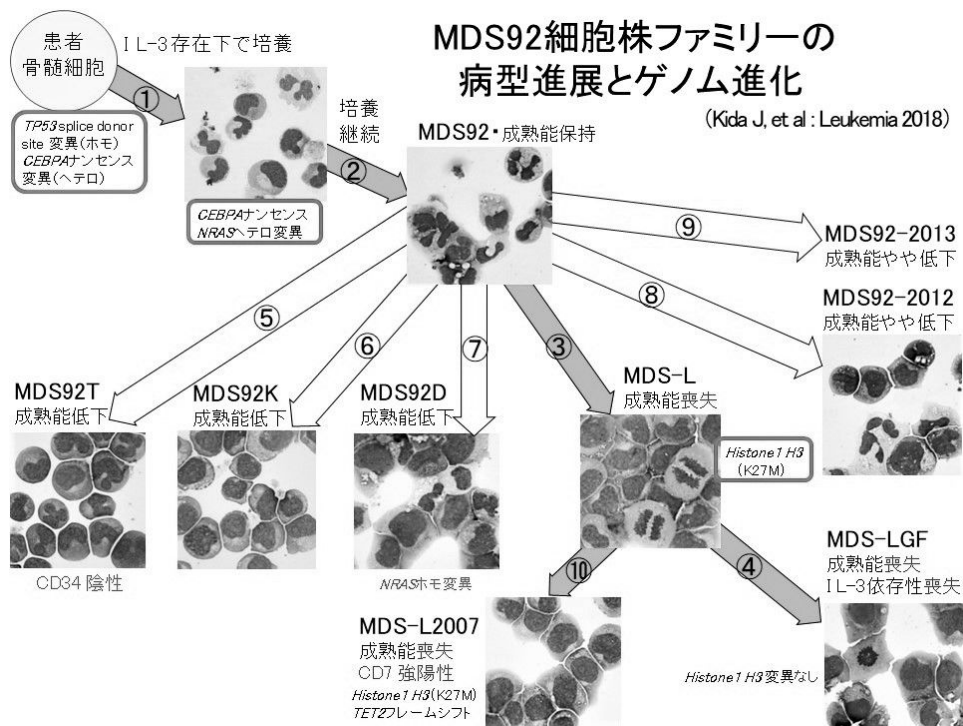
その結果、患者骨髄の段階ですでに *TP53* 変異があったこと、かつウルトラディープターゲットシーケンシングの結果、計算上骨髄細胞の約 9% の分画に *CEBPA* ヘテロ変異があり、その細胞を IL-3 存在下に *in vitro* 培養中に *NRAS* 変異が新たに加わったことが判明し、これらの変異の蓄積が MDS92 細胞株の樹立につながったと考えられた。さらにここから種々の芽球性亜株が派生したが、その中のひとつ MDS-L が出現する過程で *histone H3* (K27M) 変異という小児脳幹腫瘍で非常に高頻度に見られるドライバー変異が付加されたことが判明した。

### (2) *histone H3* (K27M) 変異と増殖優位性の関係性

MDS-L は樹立早期の段階では *histone H3* (K27M) 変異のあるクローンと同部位が野生型であるクローンの混合細胞集団であったが、IL-3 存在下に長期間継代したところ、ほぼすべてが *histone H3* (K27M) 変異クローンから成る亜株 MDS-L-2007 が得られた。一方 IL-3 非存在下で維持したところ、大部分の細胞が死滅した中でわずかに生き残った細胞集団 MDS-LGF が得られた。MDS-LGF は芽球の集団で、IL-3 がなくても増殖するが、驚いたことに *histone H3* 配列は野生型であった。*histone H3* 塩基配列を近傍の SNP 部位の違いを手掛かりとして single DNA レベルで丹念に解析した結果、MDS-L は *histone H3* (K27M) 変異配列をもった DNA と同部位の野生型配列をもった DNA の双方を有していたが、MDS-L-2007 は *histone H3* (K27M) 変異配列をもった DNA を、一方 MDS-LGF は *histone H3* 野生型配列をもった DNA を受け継いだことが判明した。

MDS-L を single cell cloning によって *histone H3* (K27M) 変異配列をもったクローンと同部位の野生型配列をもったクローンに分離してそれぞれを同数混合して IL-3 存在下に再培養すると、数か月の間に変異クローンが優位になること、一方同じ混合細胞集団を IL-3 非存在下に培養すると野生型クローンのほうがむしろ優位に維持されることがわかった。つまり *histone H3* (K27M) 変異はドライバー変異であるが、それを獲得したクローンはそれだけで腫瘍性増殖にひた走るとは限らず、悪性クローンの拡大は造血因子のような環境要因に影響されることが示唆された。

次に MDS92 細胞株ファミリーの病型進展と、同じ図に各要所におけるゲノム変異等を付記した図を示す。



### (3) MDS 細胞株ラインアップの有用性と課題及び今後の展望

MDS92 から MDS-L、MDS-L-2007、MDS-LGF に至る一連の細胞株は、世界的にも他に類を見ないユニークな細胞株ラインアップであろう。今回薬剤感受性の評価までは踏み込めなかったこと、細胞株由来のデータはごく限定的な意義を有するに過ぎない点は課題であるが、ゲノム変化の分子機構の探求、動物移植モデルでの検討など、細胞株だから可能となるような実験系を提示できたものと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tohyama K.	4. 巻 40
2. 論文標題 Present status and perspective of laboratory hematology in Japan: On the standardization of blood cell morphology including myelodysplasia: On behalf of the Japanese Society for Laboratory Hematology	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Laboratory Hematology	6. 最初と最後の頁 120 ~ 125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ijlh.12819	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 -

1. 著者名 Matsuda A, Kawabata H, Tohyama K, Maeda T, Araseki K, Hata T, Suzuki T, Kayano H, Shimbo K, Usuki K, Chiba S, Ishikawa T, Arima N, Nohgawa M, Ohta A, Miyazaki Y, Nakao S, Ozawa K, Arai S, Kurokawa M, Mitani K, Takaori-Kondo A	4. 巻 74
2. 論文標題 Interobserver concordance of assessments of dysplasia and blast counts for the diagnosis of patients with cytopenia: From the Japanese central review study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Leukemia Research	6. 最初と最後の頁 137 ~ 143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.leukres.2018.06.003	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 -

1. 著者名 Kida Jun-ichiro, Tsujioka Takayuki, Suemori Shin-ichiro, Okamoto Shuichiro, Sakakibara Kanae, Takahata Takayuki, Yamauchi Takahiro, Kitanaka Akira, Tohyama Yumi, Tohyama Kaoru	4. 巻 32
2. 論文標題 An MDS-derived cell line and a series of its sublines serve as an in vitro model for the leukemic evolution of MDS	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 1846 ~ 1850
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-018-0189-7	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 -

1. 著者名 Sun J, He X, Zhu Y, Ding Z, Dong H, Feng Y, Du J, Wang H, Wu X, Zhang L, Yu X, Lin A, McDonald T, Zhao D, Wu H, Hua WK, Zhang B, Feng L, Tohyama K, Bhatia R, Oberdoerffer P, Chung YJ, Aplan PD, Boulwood J, Pellagatti A, Khaled S, Kortylewski M, Pichiorri F, Kuo YH, Carlesso N, Marcucci G, Jin H, Li L	4. 巻 23
2. 論文標題 SIRT1 Activation Disrupts Maintenance of Myelodysplastic Syndrome Stem and Progenitor Cells by Restoring TET2 Function	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 355 ~ 369.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stem.2018.07.018	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 Morita Hiroyuki, Matsuoka Akihito, Kida Jun-ichiro, Tabata Hiroyuki, Tohyama Kaoru, Tohyama Yumi	4. 巻 108
2. 論文標題 KIF20A, highly expressed in immature hematopoietic cells, supports the growth of HL60 cell line	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 607 ~ 614
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-018-2527-y	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 -

1. 著者名 Kawabata H, Tohyama K, Matsuda A, Araseki K, Hata T, Suzuki T, Kayano H, Shimbo K, Zaike Y, Usuki K, Chiba S, Ishikawa T, Arima N, Nogawa M, et al.	4. 巻 106
2. 論文標題 Validation of the revised International Prognostic Scoring System in patients with myelodysplastic syndrome in Japan: results from a prospective multicenter registry	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 375 ~ 384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-017-2250-0	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 -

1. 著者名 Li L, Sheng Y, Li W, Hu C, Mittal N, Tohyama K, Seba A, Zhao YY, Ozer H, Zhu T, Qian Z	4. 巻 77
2. 論文標題 -Catenin Is a Candidate Therapeutic Target for Myeloid Neoplasms with del(5q).	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 4116 ~ 4126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-17-0202	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 Kobayashi T, Nannya Y, Ichikawa M, Oritani K, Kanakura Y, Tomita A, Kiyoi H, Kobune M, Kato J, Kawabata H, Shindo M, Torimoto Y, Yonemura Y, Tohyama K, et al	4. 巻 92
2. 論文標題 A nationwide survey of hypoplastic myelodysplastic syndrome (a multicenter retrospective study)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 American Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 1324 ~ 1332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ajh.24905	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 -

1. 著者名 Oben KZ, Alhakeem SS, McKenna MK, Brandon JA, Mani R, Noothi SK, Jinpeng L, Akunuru S, Dhar SK, Singh IP, Liang Y, Wang C, Abdel-Latif A, Stills HF Jr, St Clair DK, Geiger H, Muthusamy N, Tohyama K, Gupta RC, Bondada S.	4. 巻 8
2. 論文標題 Oxidative stress-induced JNK/AP-1 signaling is a major pathway involved in selective apoptosis of myelodysplastic syndrome cells by Withaferin-A	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 77436 ~ 77452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.20497	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3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kaoru Tohyama
2. 発表標題 Challenges in laboratory hematology in different regions of the world: Perspectives from Japan.
3. 学会等名 ISLH 2018 in Brussels (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 通山 薫
2. 発表標題 骨髄異形成症候群 (MDS) の形態診断---WHO分類2017年版をふまえて
3. 学会等名 第9回日本血液学会関東甲信越地方会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 通山 薫
2. 発表標題 骨髄異形成症候群 (MDS) の形態診断---WHO分類2017年版を踏まえて
3. 学会等名 第58回日本血液学会中国四国地方会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 通山 薫、張替秀郎	4. 発行年 2018年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 418
3. 書名 血液細胞アトラス 第6版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

川崎医科大学 検査診断学教室ホームページ <a href="http://www.kawasaki-m.ac.jp/lh/">http://www.kawasaki-m.ac.jp/lh/</a>
---

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
研究協力者	北中 明  (KITANAKA Akira)  (70343308)	川崎医科大学・医学部・教授   (35303)	研究期間中に教授に昇任
研究協力者	辻岡 貫之  (TSUJIOKA Takayuki)  (50330551)	川崎医科大学・医学部・准教授   (35303)	研究期間中に准教授に昇任
研究協力者	末盛 晋一郎  (SUEMORI Shin-ichiro)  (60330552)	川崎医科大学・医学部・講師   (35303)	