

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02836

研究課題名（和文）TP53変異陽性MDSに対する脱メチル化剤有効性メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanisms for effectiveness of hypo-methylating agent for TP53-mutated MDS

研究代表者

南谷 泰仁（Nannya, Yasuhiro）

京都大学・医学研究科・特定教授

研究者番号：60451811

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：TP53遺伝子に変異を持つ骨髄異形成症候群は、非常に難治でありいまだ有効な治療が存在しない。しかし脱メチル化剤であるアザシチジンは高い寛解率を有しているが、多くの症例でやがて再発する。本研究では、TP53変異症例が、アレルの状態（ヒトが持つ2本の遺伝子のうち、片方に異常があるか両方に異常があるか）によって、生物学的特徴も臨床的意義も大きく異なることを示し、別個の病態と考えるべきであることを示した。さらに、アザシチジン治療前後の変異細胞集団（クローン）の大きさを調べ、変異の種類と治療後の大きさを調べることは病態の把握と予後予測の観点から重要であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TP53変異陽性骨髄異形成症候群をアレルの状態によって区別することで、予後予測が最適化され、移植適応などの治療方針も変化する。アザシチジン治療前後の変異パターンとその大きさを計測することで、病態の把握が正確になり、長期予後予測の精度が高まる。特に治療後クローン性造血がみられるという知見は、治療後残存クローンの正しい解釈に重要である。

研究成果の概要（英文）：TP53 mutated myelodysplastic syndromes are extremely refractory and there is still no effective treatment. Recently, the demethylating agent, azacitidine, has been reported to have a high remission rate, but many cases eventually relapse. In this study, we showed that TP53 mutated MDS cases have very different biological features and clinical significance depending on allele status (whether one or both of the two human genes are altered), and should be considered as distinct conditions. Furthermore, we examined the size of the mutant cell population (clone) before and after azacitidine treatment, and showed that it is important to examine the type of mutation and its size after treatment in order to understand the pathogenesis and predict prognosis.

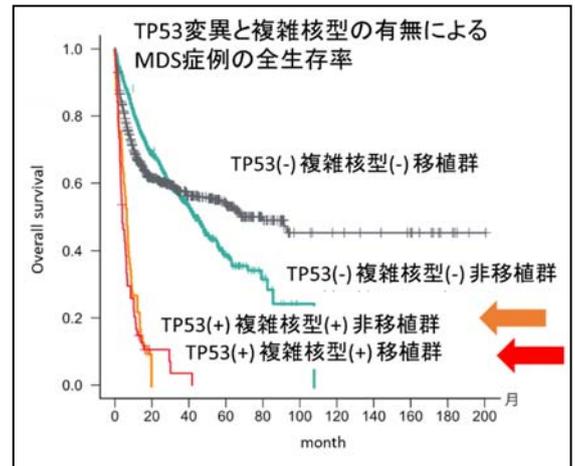
研究分野：造血器腫瘍学

キーワード：骨髄異形成症候群 脱メチル化剤 有効性マーカー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アザシチジンは MDS に対する標準治療として位置づけられており、アザシチジンの有効性を示すバイオマーカーを探索する研究が複数おこなわれてきたが(Bejar et al, *Blood* 2014, Tobiasson et al, *Oncotarget* 2016, Itykson et al, *Leukemia* 2011)、実用的なバイオマーカーの同定に至らなかった。我々は、本邦で行われた MDS に対する移植コホートの解析を通じて TP53 陽性 MDS が特徴的な遺伝学的プロファイルをもちきわめて予後が悪いことを示した(右図 Yoshizato et al. *Blood* 2017)。さらに MDS に対してアザシチジンを使用する前向き臨床試験の検体解析を通じて、TP53 遺伝子の変異がアザシチジンの臨床効果と関連することを見いだした。しかし同時に、アザシチジン治療によって一時的な効果が得られても早期再発によって長期的な成績の向上と結びつかないという現実も明らかとなった。この現状を克服するためには、TP53 陽性 MDS に対する脱メチル化剤の有効性や抵抗性獲得に関する生物学的なメカニズムの解明が必要であると考えに至った。



### 2. 研究の目的

#### (1) TP53 アレルの状態による病態像の相違と臨床的影響の解明

TP53 変異症例は、-5/del(5q)や-7/del(7q)を伴う複雑核型を伴うことが多い。これらの症例は、非常に予後が不良であり、他のドライバー変異が少ないという特徴を持つ。一方、TP53 変異症例のなかには複雑核型を呈さない症例もあり、その場合にも同様に予後が不良であるかどうかは不明である。そのため、TP53 変異のアレルの状態による遺伝学的な特徴を調べることで、およびその予後への影響を調べることを目的とする。

#### (2) アザシチジンの治療前後の検体の比較によるクローンプロファイルの変化とその臨床的意義

現在、アザシチジンの治療効果判定には IWG response criteria (2006, 2019 改訂)が用いられるが、問題点もみられる。例えば MDS における芽球は、tumor burden を反映したものではない、MDS では形態異形成が存在するため、測定者間で芽球割合の測定値が一致しない、アザシチジンなど有効な限り継続する治療の最中に行う血球測定は、薬剤の影響を受けるため不正確であるなどの点が指摘されている。そこで、NGS を用いて測定した変異細胞の割合を用いることで、より客観的な response を示す指標となる可能性を探索することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) TP53 アレルの状態による病態像の相違と臨床的影響の解明

TP53 変異を、下記のように 1-hit と multi-hit に分類した。この区分のためには、コピー数およびアレル不均衡を調べる必要があり、その目的に我々の教室で開発したコピー数解析プログラムを用いた。TP53 全体で一つの変異があり、コピー数もアレル不均衡も認めない場合を 1-hit とする。次に、コピー数変化やアレル不均衡がなく、2 つの変異がある場合を考える。1 リードの中で 200~300 塩基を読む”short read sequence”ではこれらが異なるアレルに存在するかどうかは判定できないが、近傍に存在する 2 つの変異について phasing (同一アレルに存在するかどうかの確認)を確認するとほぼすべての場合において変異が異なるアレルに存在することが示されたため、これらも multi-hit と判断した。厳密にはこの場合も変異をもつ異なるアレルが、同一細胞に存在するか異なる細胞に存在するか、ということまでは判断できないが、鳩ノ巣原理を用いることが出来る検体ではほぼ同一細胞にみられることがわかった。そのためこの場合も multi-hit と判断した。

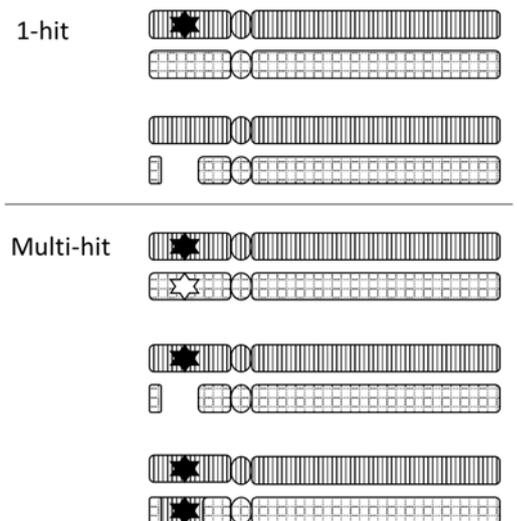


図2 TP53 変異のアレル状態の定義

#### (2)アザシチジン治療前後のクローン変化と長期予後への影響

本邦で行われた、アザシチジンの前向き臨床試験である JALSG-MDS212 試験と、カロリンスカ研究所で少なくとも 1 コースのアザシチジンの投与を受けた MDS もしくは MDS 転化急性骨髄性白血病の症例合計 341 症例を対象として、アザシチジン治療前後のクローンの変化を観察した。治療前後の臨床データおよび予後との影響を調べ、クローンの変化のプロファイルと、治療効果との相関を調べた。我が国で収集した別コホート (少なくとも 1 コースのアザシチジンの投与を受けた MDS もしくは MDS 転化急性骨

髓性白血病の症例) 110 例を用いて validation を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) TP53 アレルの状態による病態像の相違と臨床的影響の解明 ゲノム不安定性

図 3 は、1-hit 症例と multi-hit 症例に見られる遺伝学的な特徴を、異常の種類毎に調べたものである。第 17 番以外の染色体のうち異常を有する染色体の数を調べると、multi-hit の場合 5~6 もの染色体に異常を有するものの、1-hit の場合約 1 つの染色体しか異常を示さない(図 3A)。複雑核型を有する割合も、multi-hit の場合 91%にのぼるが、1-hit の場合わずかに 13%である(図 3B)。このように、1-hit と multi-hit の間ではゲノムの不安定性に大きな違いがあることがわかる。次に、併存する driver 遺伝子変異の数について検討する。TP53 以外の driver 変異の数は、multi-hit の場合約 1 つであるのに対して、1-hit の場合は中央値が 2 つである(図 3C)。併存する driver 変異の profile をみてみると、1-hit の場合 TET2, SF3B1, ASXL1, DNMT3A, SRSF2, RUNX1 が 10%以上の症例に併存していた。一方 multi-hit の場合もっとも併存していた遺伝子変異が DNMT3A で、それでも約 10%の症例にみられるのみであった(図 3D)。

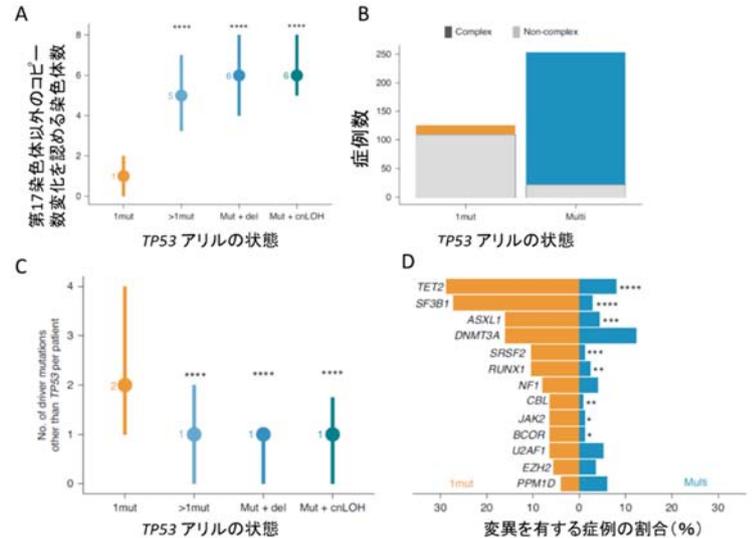


図 3 TP53 変異のアレル状態とゲノムプロファイルの特徴

##### MDS の亜型とリスク分類

MDS の亜型について検討すると、multi-hit 症例は 1-hit の症例と比較して有意にヘモグロビン値、血小板値、好中球数が低く、骨髄の芽球割合が高い。そのため multi-hit 症例は芽球が高いことを反映して WHO 分類では AML-MRC、EB1、EB2 の割合が多くなる(図 4A)。治療関連性 MDS (t-MDS)が多いことも特徴である。IPSS-R によるリスク分類では、血球減少、芽球割合の増加に染色体不安定性も加味されるため、multi-hit 症例では very poor の症例の割合が非常に高くなる(図 4B)。

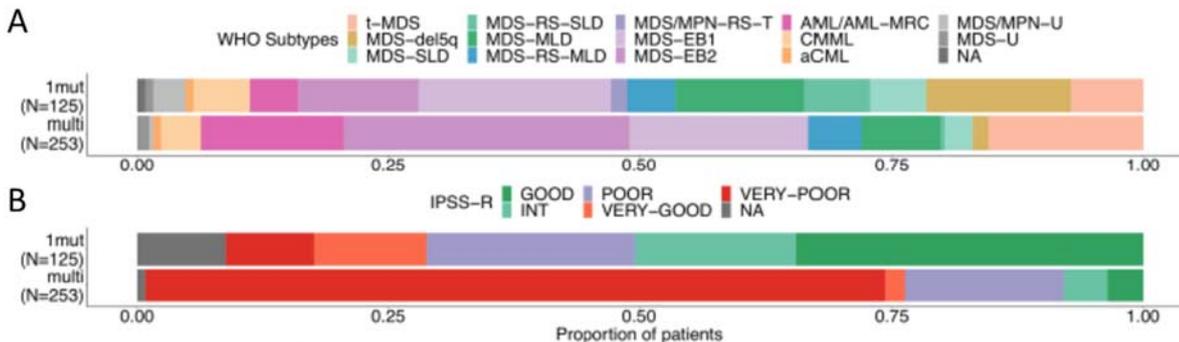


図 4 TP53 変異のアレル状態と MDS の表現型

##### 全生存率と AML 進展割合への影響

次に、全生存率を検討する。予想されるように、multi-hit 症例の予後は、TP53 変異のない症例と比べて有意に不良であるが、興味深いことに 1-hit 症例の全生存率(OS)と、AML への進展の累積割合は、TP53 陰性群のデータとほぼ同じであった(図 5A,5B)。OS と AML への進展に対する多変量解析を行うと、TP53 の 1-hit 変異の存在は OS, AML への進展のいずれに対しても有意な影響はみられなかった。これとは対照的に、multi-hit 変異の存在は OS, AML への進展ともに有意かつ大きな影響を有しており、多変量解析でも年齢、血球数、骨髄芽球割合、

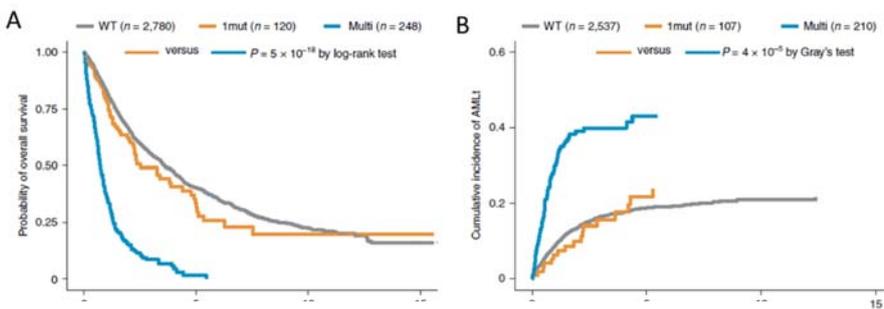


図 5 TP53 変異のアレル状態と MDS の予後

核型リスクなど他の因子とは独立した予後不良因子として抽出された。

(2)アザシチジン治療前後のクローン変化と長期予後への影響  
TP53変異とアザシチジンの血液学的有効性

治療後の血液学的効果については、TP53の multi-hit 変異およびその場合にはほぼ併存するコピー数異常 (-5/del(5q) や -7/del(7q), 17pLOH) が、CR の到達に相関していた(図 6A)。臨床的因子を加えた多変量解析を用いても TP53 の multi-hit 変異は、CR 到達に有意な因子であった(図 6B)。しかし全生存率(OS)に対しては TP53 の multi-hit 変異は有意に予後不良因子となった。上記の cohort 同様、1-hit の TP53 変異症例の予後は TP53 正常型と変わらなかった (図 6C,D)。

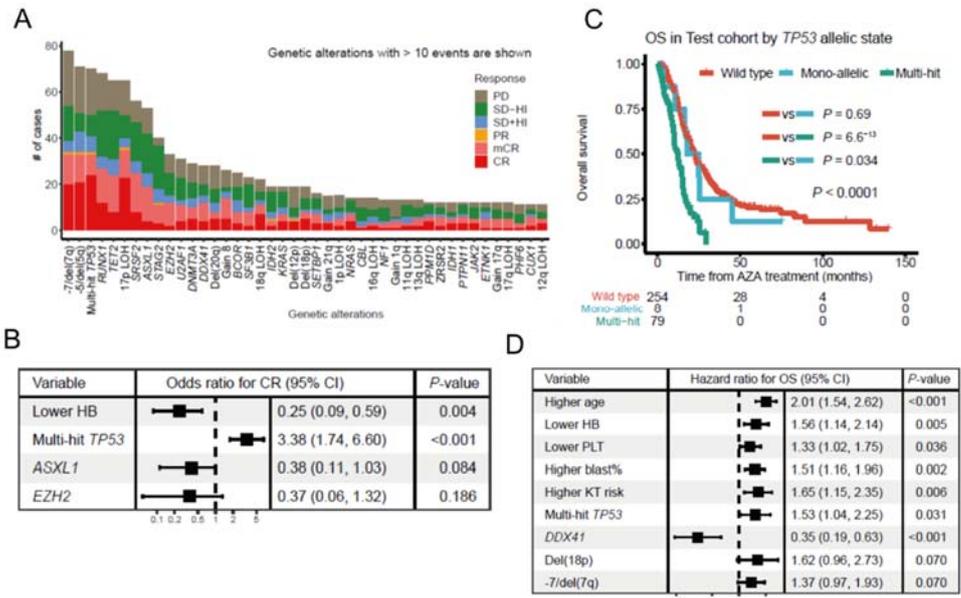


図 6 TP53 変異とアザシチジンの有効性

CR 症例における TP53 変異クローンの変化

次に、治療前後におけるクローンの変化を調べ、変異遺伝子毎にその変化と臨床的効果の相関を調べた。ここでは治療前後を通じて最大クローンのグループに属する major clone を定義し、その治療後のサイズを計測したところ、臨床効果とよく相関した(図 7A)。CR 達成例において TP53 変異症例は最も多く、ほとんどの場合 major clone であった(図 7B)。また、治療後によく縮小しており、クローンのサイズ変化と臨床的効果の間に強い相関が見られた(図 7C)。

臨床的効果と相関しないクローンの変化

一方で、major clone の大きさの変化と臨床的効果が相関しない症例も存在した。まず臨床的に CR が得られたにもかかわらず、major clone が縮小しない症例を調べたところ、major clone の大きさは変化しないが subclone の縮小がみられた。その場合、major clone は健常者のクローン性造血によくみられる TET2, DNMT3A などが構成しており、subclone を RAS 経路遺伝子などシグナル経路関連遺伝子が構成していることが多いことが観察された。これはアザシチジンによってクローン性造血の状態に戻ることを示唆するものであった。一方、major clone が縮小しているにもかかわらず、臨床的効果がみられない症例も存在した。それらの症例は、圧倒的に DDX41 の胚細胞変異を持つ症例が多くみられた。DDX41 の胚細胞変異を持つ症例は、多くが DDX41 の体細胞変異を持つがそのクローンサイズは有意に他のドライバー変異と比べて小さく、しかし芽球の割合は多いという特徴を有していた

一方で、major clone の大きさの変化と臨床的効果が相関しない症例も存在した。まず臨床的に CR が得られたにもかかわらず、major clone が縮小しない症例を調べたところ、major clone の大きさは変化しないが subclone の縮小がみられた。その場合、major clone は

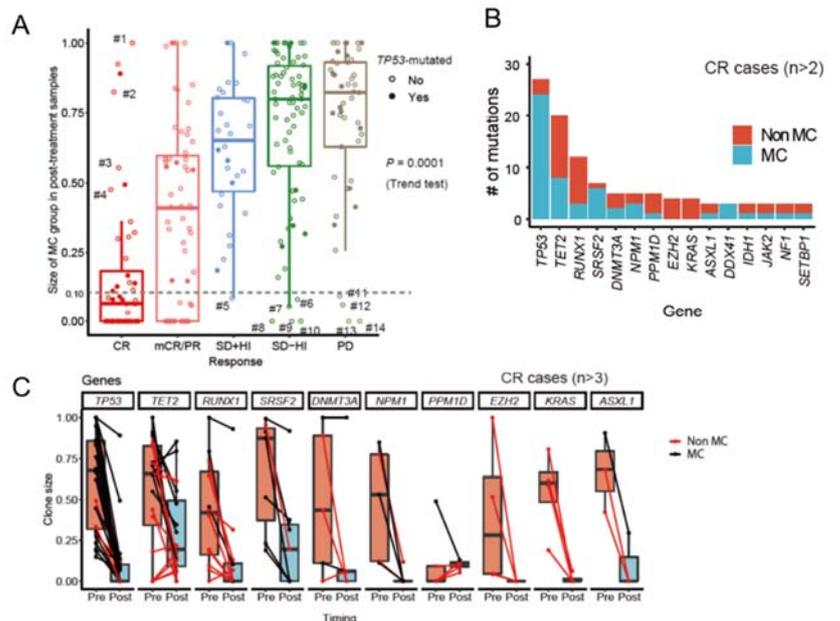


図 7 治療後 major clone のサイズと臨床的反応性

健常者のクローン性造血によくみられる *TET2*, *DNMT3A* などが構成しており、subclone を RAS 経路遺伝子などシグナル経路関連遺伝子が構成していることが多いことが観察された。これはアザシチジンによってクローン性造血の状態に戻ることを示唆するものであった。一方、major clone が縮小しているにもかかわらず、臨床的な効果がみられない症例も存在した。それらの症例は、圧倒的に *DDX41* の胚細胞変異を持つ症例が多くみられた。*DDX41* の胚細胞変異を持つ症例は、多くが *DDX41* の体細胞変異を持つがそのクローンサイズは有意に他のドライバー変異と比べて小さく、しかし芽球の割合は多いという特徴を有していた。

アザシチジン治療後にみられるクローン性造血

一方、治療後に新たに出現したクローンの特徴を調べた。アザシチジン治療後には *PPM1D* 変異クローンが出現する頻度が高く(図 8A)、特に *TP53* 変異陽性例が奏功した場合に出現していた(図 8B)。単細胞解析によって、*TP53* 変異クローンと *PPM1D* 変異クローンは異なっており(図 8C)、*PPM1D* クローンの出現は *TP53* 変異クローンが再度増大する際には退縮した。これらの結果から、アザシチジン治療後に非腫瘍性のクローン性造血が出現することがあり、腫瘍の増悪とは関係ないことが示唆された。

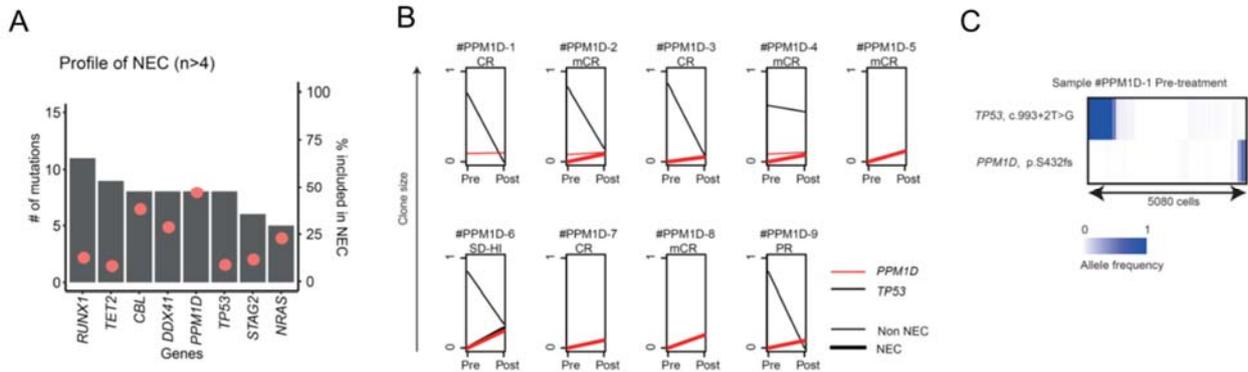


図 8 治療後にみられる *PPM1D* 変異クローン

治療後クローンサイズを用いた長期予後予測性能の向上

治療前の遺伝子変異プロファイルや治療後の最大クローンのサイズを、従来用いられていた予後予測因子 (IPSS-R、血液学的反応性) に加えて OS の予測モデルを作成したとこと、多変量解析にて遺伝子変異プロファイルと治療後の最大クローンのサイズが独立した予後予測因子であることが示された(図 9A)。また、validation cohort を用いて予後予測性能を測定したところ、治療前の遺伝子変異プロファイルや治療後の最大クローンを加えることによって、予後予測性能が向上することが示された(図 9B)。

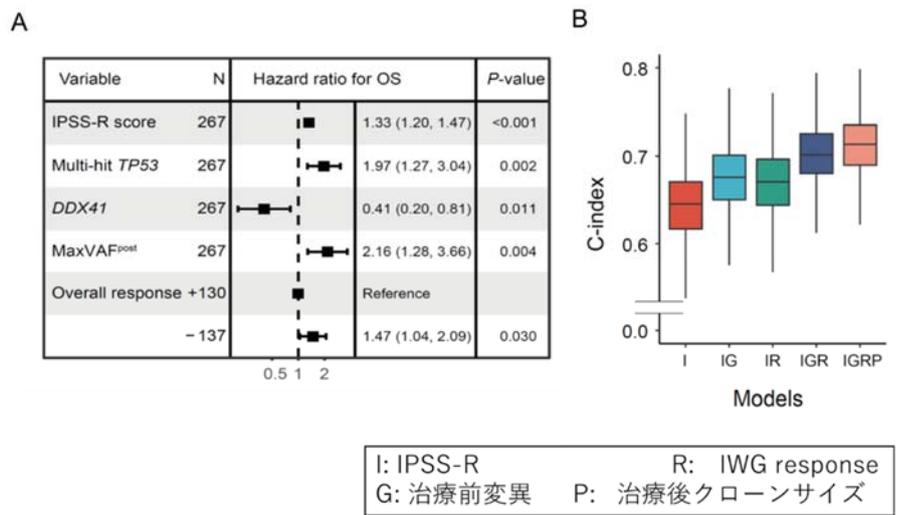


図 9 治療後クローンサイズの予後予測性能

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Bernard Elsa, Nannya Yasuhito, et. al.,	4. 巻 -
2. 論文標題 Implications of TP53 allelic state for genome stability, clinical presentation and outcomes in myelodysplastic syndromes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Medicine	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/s41591-020-1008-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9件（うち招待講演 3件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yasuhito Nannya et., al
2. 発表標題 Molecular characteristics that predict response to azacitidine therapy
3. 学会等名 第61回米国血液学会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuhito Nannya et., al
2. 発表標題 Molecular characteristics that predict response to azacitidine therapy
3. 学会等名 MDS symposium 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuhito Nannya et., al
2. 発表標題 Novel classification of genetic events and subtypes in myeloid tumors revealed by Integrated omics analysis
3. 学会等名 第78回日本癌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuhito Nannya et., al
2. 発表標題 Novel combinations of genetic events and subtypes in myeloid tumors revealed by Integrated analysis
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuhito Nannya, et.,al
2. 発表標題 Comprehensive analysis for genetic factors predictive of azacitidine treatment for MDS.
3. 学会等名 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuhito Nannya
2. 発表標題 Impact of genetic alterations on transplant outcomes for MDS
3. 学会等名 The 40th Japan Society of Hematopoietic Cell Transplantation (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 南谷泰仁
2. 発表標題 高リスクMDSの新規治療について
3. 学会等名 The 80th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuhito Nannya, et.,al
2. 発表標題 Comprehensive analysis for genetic factors predictive of azacitidine treatment for MDS.
3. 学会等名 The 80th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuhito Nannya, et.,al
2. 発表標題 Genome-wide analysis of non-coding alterations in pan-myeloid cancers using whole genome sequencing.
3. 学会等名 60th American Society of Hematology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018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
研究協力者	宮崎 泰司  (Miyazaki Yasushi)	長崎大学・原研内科・教授  (17301)	
研究協力者	宮野 悟  (Miyano Satoru)	東京医科歯科大学・M&D データサイエンスセンター・センター長  (12602)	

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			
スウェーデン	Karolinska Institue			
米国	Memorial Sloan Kettering Cancer Center			