

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16084

研究課題名(和文) 骨髄異形成症候群・白血病の発症におけるクローン進化の分子メカニズムの解析

研究課題名(英文) Elucidating the molecular mechanisms underlying the clonal evolution of leukemic stem cells

研究代表者

昆 彩奈 (Kon, Ayana)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：20772403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子変異を獲得した造血幹細胞がクローン選択をうけて、骨髄異形成症候群(MDS)や急性骨髄性白血病を発症する分子メカニズムの解明を目的として本研究を行った。白血病融合遺伝子MLL-AF9を遺伝子導入した白血病マウスモデル、およびRcas/TVAシステムを用いた造血幹細胞特異的遺伝子導入マウスモデルを作成し、遺伝子変異を導入した造血幹細胞がつけるクローン選択の変遷を明らかにした。また、MDSで高頻度に変異をみとめるRNAスプライシング因子の変異をもつ細胞株を用いたゲノムワイドな機能的スクリーニングを通じて、変異細胞のクローン選択をもたらす標的候補遺伝子を探索した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髄異形成症候群(MDS)および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。本研究結果は、治療抵抗性のがんであるMDSの複雑な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 founding clones, we generated two leukemic mice models, including MLL/AF9 driven leukemic mice models and pre-leukemic mice models using RCAS/TVA mediated gene transfer. By exome sequencing of serial BM samples of these mice models, we clarified the detailed clonal architecture over time. Further, we performed genome-wide screens using CRISPR/Cas9 technology to identify novel candidate genes that are essential for splicing factor mutated cells to be clonally selected. Findings from this study are expected to contribute significantly to the advance of understandings of MDS.

研究分野：血液腫瘍病態学

キーワード：骨髄異形成症候群 急性骨髄性白血病 クローン進化 RCAS/TVAシステム マウスモデル

## 1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群 (**Myelodysplastic syndromes; MDS**)は、血球形態の異常を伴った骨髄不全と急性骨髄性白血病(**Acute myelogenous leukemia; AML**)への移行を特徴とし、高齢者に好発する慢性骨髄性腫瘍である。近年、DNA シーケンス技術に代表されるゲノム解析技術の格段の進展を背景とした遺伝子変異の包括的な探索を通じて、**MDS** および **AML** においては、我々およびその他のグループの研究により、**RNA** スプライシング因子 (**Yoshida et al., Nature 2011**)、コヒーシン複合体 (**Kon et al., Nat Genet. 2013**)などの新たな遺伝子変異が同定され、その発症・進展に重要な役割を担うドライバー変異に関する知見の集積が進んだ。

一方、白血病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て前白血病幹細胞として存在することが証明され (**Shlush et al, Nature 2014**)、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モデルが提唱されている (**Welch et al, Cell 2012; Yoshizato et al, N Engl J Med. 2015**)。骨髄系腫瘍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、ヒエラルキーを持って段階的に獲得されること、特定の変異は他の変異と有意に共存しないし排他することも明らかになった (**Haferlach et al., Leukemia 2014**)。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、炎症性サイトカインなどの要因に依存している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。

また、**MDS** で最も高頻度に認められるスプライシング因子変異による **MDS** の発症メカニズムについては、**Srsf2 P95H** 変異、**Sf3b1 K700E** 変異、**U2af1 S34F** 変異のいずれの遺伝子変異についての条件的ノックインマウスモデルにおいても、変異を有する造血幹細胞は、競合的骨髄再構築法による評価にて造血能の低下を示し、クローン選択において不利に働くことが、我々を含む複数のグループから再現性をもって報告されている(**Kim et al., Cancer Cell 2016, Obeng et al., Cancer Cell 2016, Shirai et al., Cancer Cell 2016, Kon et al., Blood 2018, Smeets et al., Blood 2018**)。異なるスプライシング因子をコードする遺伝子に生じた変異が同様の表現型を示すことから、変異により惹起されるスプライシング異常とは異なる他の共通の機序がスプライシング因子変異を有する造血幹細胞の造血能の低下の原因となる可能性があるが、その分子メカニズムは解明されていない。したがって、新たなアプローチによる **MDS** の発症、進展の分子メカニズムについての本態解明が望まれている。

## 2. 研究の目的

骨髄異形成症候群(**MDS**)および急性骨髄性白血病(**AML**)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。

発がんの初期に生じた遺伝子変異がどのような分子メカニズムによってクローン選択を受けるのか (**がんの初期発生**)

初期のクローン選択に続いて新たな変異を獲得した細胞集団は、どのような分子メカニズムによってクローン選択を受けて、クローンサイズの拡大と多様性の増大を生じ、最終的に **MDS/AML** の発症にいたるのか (**がんのクローン進化**)

についての分子メカニズムを解明することを目的として本研究を行った。

### 3. 研究の方法

#### 1. MLL/AF9 白血病マウスモデルによるクローン進化過程の解明

野生型マウスから **FACS** により純化した骨髓系前駆細胞分画 (**GMP** 細胞) に白血病融合遺伝子 **MLL-AF9** を発現するレトロウイルスベクターを感染させて、遺伝子導入をおこなった。次に、レシピエントマウスに致死量放射線照射をしたのちに、**MLL-AF9** 発現 **GMP** 細胞を経静脈的に骨髓移植した。数か月後にレシピエントマウスが白血病を発症した時点で、骨髓細胞を採取し、新たなレシピエントマウスへと継代移植をおこなった。白血病細胞を繰り返し継代移植を行う各時点で、白血病細胞の有する遺伝子異常を全エクソン解析により網羅的に検出することを通じて、クローン構成の変化を追跡した。

#### 2. 造血幹細胞特異的遺伝子導入システムによるクローン進化過程のモデリング

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。

#### 3. スプライシング因子変異をもつ造血幹細胞がクローン進化を受けるメカニズムの検討

**MDS** の発症過程において、スプライシング因子の変異が造血幹前駆細胞クローンの選択をもたらし分子メカニズムを検討した。

第一に、造血環境や炎症がクローン選択において果たす役割の検討を行った。スプライシング因子の変異は **MDS** 発症の初期段階に生じることが多く、さらなる遺伝子変異を獲得するまでの間に初期のクローン選択を受けると考えられるが、変異ノックインマウスの解析 (**Kon et al., Blood 2018**) では、変異を有する造血幹細胞は競合的骨髓移植にてクローン選択を受けないことが分かっている。スプライシング因子変異は、骨髓系腫瘍で高頻度に認められる他の **class** の遺伝子変異と比較して、より高齢者におけるクローン造血において認められるとの観察結果から、加齢による造血環境の変化や炎症環境等の外的要因がクローン選択において重要な役割を果たす可能性があるかと仮定した。そこで、**S100a9 Tg** マウス (炎症モデル) や高齢マウスモデルを用いて、スプライシング因子変異を有する造血幹細胞がクローン選択を受けられるかを検討した。

第二に、**CRISPR/Cas9** システムを用いたゲノムワイドな機能的スクリーニング法を用いたアプローチを行った。まず、スプライシング因子変異体 (**SRSF2 P95H, U2AF1 S34F, U2AF1 Q157R**) および **Cas9** を導入した **Cas9** 発現スプライシング変異ヒト白血病細胞株を樹立した。これらの細胞株に、全ゲノムを対象とした **sgRNA** を発現するレンチウイルスベクタープールを作成して感染させることにより、**CRISPR** ゲノムワイドスクリーニングを行った。レンチウイルス **sgRNA** ベクタープールを感染させた直後に抽出した **input DNA** と、7回以上継代した後

の細胞から抽出した **output DNA** を鋳型にして、**sgRNA** 部分を含む配列を **PCR** にて増幅し、次世代シーケンサー**NovaSeq** を用いたアンプリコンシーケンスを行った。その結果、継代培養の過程で有意に濃縮した遺伝子群およびドロップアウトした遺伝子群を複数同定した。複数の細胞株、および **SRSF2** 変異, **U2AF1** 変異で共通する標的に焦点を当てて、標的候補遺伝子群の絞り込みを行った。

#### 4. 研究成果

##### 1. MLL/AF9 白血病マウスモデルによるクローン進化過程の解明

白血病融合遺伝子 **MLL-AF9** を遺伝子導入したマウス造血前駆細胞を骨髄移植したマウスモデルを作成し、白血病細胞を繰り返し経代移植を行う各時点で、白血病細胞の有する遺伝子異常を全エクソン解析により網羅的に検出することを通じて、クローン構成の変化を追跡した。継代移植を重ねるのにしたがって、白血病発症に至る期間の短縮と病勢の進行が認められ、その背景では、白血病細胞が、**Ptpn11**, **Braf**, **Gnb2** をはじめとする複数の遺伝子変異を生じ、各クローン集団における遺伝的多様性の獲得に寄与したことを明らかとした。(Kotani, Kon et al., **Leukemia 2018**)

##### 2. 造血幹細胞特異的遺伝子導入システムによるクローン進化過程のモデリング

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。引き続き本研究を継続し、クローン選択の変遷の解析や、分子病態の解明を進める方針である。

##### 3. スプライシング因子変異をもつ造血幹細胞がクローン進化を受けるメカニズムの検討

第一に、スプライシング変異造血細胞がクローン選択をうける過程において、造血環境や炎症が果たす役割の検討を行った。スプライシング因子の変異は **MDS** 発症の初期段階に生じることが多く、さらなる遺伝子変異を獲得するまでの間に初期のクローン選択を受けると考えられるが、変異ノックインマウスの解析では、変異を有する造血幹細胞は競合的骨髄移植にてクローン選択を受けないことが分かっている。スプライシング因子変異は、骨髄系腫瘍で高頻度に認められる他の **class** の遺伝子変異と比較して、より高齢者におけるクローン造血において認められるとの観察結果から、加齢による造血環境の変化や炎症環境等の外的要因がクローン選択において重要な役割を果たす可能性があるかと仮定した。そこで、**MDS** 患者のニッチ細胞で発現が亢進していることが知られている **S100A9** に関するトランスジェニックマウス(**S100a9 Tg** マウス)をレシピエントマウスとして、致死量放射線照射をしたのちに、スプライシング因子変異マウス

由来の骨髄細胞を経静脈的に移植をすることで、炎症環境を有するニッチ環境をモデルした。しかし、経時的にドナーキメリズムを追跡したが、変異細胞はクローン選択を受けなかった。また、生後1年以上の高齢マウス由来のスプライシング変異細胞をもちいて、野生型レシピエントマウスに骨髄移植を行い、クローン選択を受けるかどうかを検証したが、変異細胞のクローン選択は認められなかった。

つぎに、**MDS** で高頻度に変異をみとめるスプライシング因子の変異が、造血幹前駆細胞クローンの選択をもたらす分子メカニズムを解明するために、**CRISPR/Cas9** システムを用いたゲノムワイドな機能的スクリーニングを行った。具体的には、スプライシング因子変異体 (**SRSF2** 変異, **U2AF1** 変異) を導入したヒト白血病細胞株を樹立し、全ゲノムを対象とした **sgRNA** を発現するレンチウイルスベクタープールを作成して感染させることにより、**CRISPR** スクリーニングを行った。その結果、継代培養の過程で有意に濃縮した遺伝子群およびドロップアウトした遺伝子群を複数同定した。ゲノムワイドな機能的スクリーニングを行い、継代培養の過程で有意に濃縮した遺伝子群およびドロップアウトした遺伝子群から、クローン選択をもたらす標的候補遺伝子群の絞り込みを行った。今後は、当該標的分子の機能解析を継続し、スプライシング因子変異細胞がクローン選択を受ける分子病態の解明を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ayana Kon	4. 巻 61
2. 論文標題 Clonal evolution of myelodysplastic syndromes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Rinsho Ketsueki	6. 最初と最後の頁 358 ~ 367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.61.358	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 Ochi Y, Kon A, Sakata T, Nakagawa MM, Nakazawa N, 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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ayana Kon	4. 巻 61
2. 論文標題 Clonal evolution of myeloid malignancies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Rinsho Ketsueki	6. 最初と最後の頁 1120 ~ 1129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.61.1120	査読の有無 無
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 Masaki S, Ikeda S, Hata A, Shiozawa Y, Kon A, Ogawa S, Suzuki K, Hakuno F, Takahashi SI, Kataoka N.	4. 巻 10
2. 論文標題 Myelodysplastic Syndrome-Associated SRSF2 Mutations Cause Splicing Changes by Altering Binding Motif Sequences	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	6. 最初と最後の頁 338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fgene.2019.00338	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 Kakiuchi N, Yoshida K, Uchino M, Kihara T, Akaki K, Inoue Y, Kawada K, Nagayama S, Yokoyama A, Yamamoto S, (中略), Kon A (22/54), (中略), Haga H, Hirota S, Ikeuchi H, Nakase H, Marusawa H, Chiba T, Takeuchi O, Miyano S, Seno H, Ogawa S.	4. 巻 577
2. 論文標題 Frequent mutations that converge on the NFKBIZ pathway in ulcerative colitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 260 ~ 265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-019-1856-1	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 Kotani S, Yoda A, Kon A, Kataoka K, Ochi Y, Shiozawa Y, Hirsch C, Takeda J, Ueno H, Yoshizato T, Yoshida K, Nakagawa MM, Nannya Y, Kakiuchi N, Yamauchi T, Aoki K, Shiraishi Y, Miyano S, Maeda T, Maciejewski JP, Takaori-Kondo A, Ogawa S, Makishima H.	4. 巻 33
2. 論文標題 Molecular pathogenesis of disease progression in MLL-rearranged AML.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 612-624
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-018-0253-3	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11件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

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 The functional role of compound DDX41 germline and somatic R525H mutations in the development of myeloid neoplasms
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
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 The functional characterization of compound DDX41 germline and somatic R525H mutations in the development of myeloid malignancies
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
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 Ayana Kon, Yasuhito Nannya, Keisuke Kataoka, Manabu Nakayama, Haruhiko Koseki, Masashi Sanada, Hideki Makishima, Marshall Masahiro Nakagawa, Seishi Ogawa
2. 発表標題 Biological characterization of the U2af1 S34F mutation in the pathogenesis of myelodysplasia
3. 学会等名 24th Congress of the European Hematology Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayana Kon, Masahiro Marshall Nakagawa, Yasuhito Nannya, Keisuke Kataoka, Yotaro Ochi, June Takeda, Kenichi Yoshida, Manabu Nakayama, Haruhiko Koseki, Hideki Makishima, Seishi Ogawa
2. 発表標題 The role of compound DDX41 germline and somatic mutations in myeloid neoplasms
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayana Kon
2. 発表標題 スプライシング因子変異による骨髄異形成症候群発症の分子病態の解明
3. 学会等名 日本癌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ayana Kon, June Takeda, Keisuke Kataoka, Kenichi Yoshida, Masahiro Marshall Nakagawa, Tetsuichi Yoshizato, Manabu Nakayama, Haruhiko Koseki, Hideki Makishima, Seishi Ogawa
2. 発表標題 Functional analysis of DDX41 germline and somatic mutations in myeloid neoplasms.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ayana Kon, June Takeda, Keisuke Kataoka, Kenichi Yoshida, Masahiro Marshall Nakagawa, Tetsuichi Yoshizato, Manabu Nakayama, Haruhiko Koseki, Hideki Makishima, Seishi Ogawa
2. 発表標題 Functional analysis of DDX41 germline and somatic mutations in myeloid neoplasms.
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ayana Kon, Yasuhito Nannya, Marshall Masahiro Nakagawa, Keisuke Kataoka, Masashi Sanada, Manabu Nakayama, Haruhiko Koseki, Seishi Ogawa
2. 発表標題 Biological characterization of the U2af1 S34F mutation in the pathogenesis of myelodysplasia
3. 学会等名 60th ASH Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ayana Kon
2. 発表標題 STAG2 mutations alter epigenetic and transcriptional dynamics in myeloid neoplasms.
3. 学会等名 Meeting of Leukemic and Hematopoietic Stem Cells in Tokyo (招待講演)
4. 発表年 2019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 第82回日本血液学会学術集会（招待講演）
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
研究協力者	小川 誠司 (Ogawa Seishi)  (60292900)	京都大学・大学院医学研究科・教授   (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
---------	---------