

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17412

研究課題名（和文）クローン構造解析による骨髄異形成症候群から白血病発症までの分子病態の解明

研究課題名（英文）Clarifying clonal architecture diversity of leukemia derived from myelodysplastic syndromes

研究代表者

永田 安伸（Nagata, Yasunobu）

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：90739575

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）：本研究の目的は骨髄異形成症候群から急性白血病に至る経時的試料を解析することで、腫瘍化を促進させ最終的に白血病に進展する腫瘍発症メカニズムの解明であった。標的シーケンシング解析を行うことで高感度に遺伝子変異が同定されアレル頻度に注目することでクローン進化を正確に追尾できる結果が得られた。予後や有害事象を含む臨床情報との相関解析を行うことで、BCL2阻害剤など新規薬剤に対する治療反応性がTP53やIDH1/2などの遺伝子異常によって層別化できることが明らかとなった。これらの成果は遺伝子異常を用いて治療反応を予測し、個々の患者における最適な治療法選択の一助になるという点で非常に重要性が高いと考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子変異を持つ実際の患者に最も有効な治療法を選択する手法は定まっていないため、経時的試料を解析することで、腫瘍化を促進させ最終的に白血病に進展する腫瘍発症メカニズムを明らかにし、新たな治療戦略の構築に資することを目指していた。本成果により、治療抵抗性に関わる遺伝子異常やその特徴が明らかとなり、実際の患者に適切な治療を選択するための新たな要因となった点で学術的意義が高い。今後、前向きな臨床試験で本成果が検証され、治療成績の改善というエビデンスが期待される点で社会的意義が高いと考える。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to analyze samples over time from myelodysplastic syndrome to acute leukemia in order to elucidate the mechanism of tumorigenesis that promotes tumorigenesis and ultimately progresses to leukemia. Targeted sequencing analysis was used to identify gene mutations with high sensitivity, and the clonal evolution could be accurately tracked by focusing on allele frequencies. Correlation analysis with clinical information, including prognosis and adverse events, revealed that the response to novel drugs such as BCL2 inhibitors can be stratified by genetic abnormalities such as TP53 and IDH1/2. These results are of great importance in predicting treatment response using genetic abnormalities and helping to select the optimal treatment for individual patients.

研究分野：血液内科

キーワード：骨髄異形成症候群 次世代シーケンサー クローン進化

1. 研究開始当初の背景

白血病や悪性リンパ腫、骨髄異形成症候群 (Myelodysplastic syndromes; MDS) に代表される造血器腫瘍は、原因や予後が異なる多様な病態を含む不均一な疾患群である。慢性の経過を辿る一部の病型は分子標的薬が著効するため、長期生存が可能である。しかし、その他多くの病型では抗がん剤などの化学療法が必要であり、その際に同じ診断で同じ治療を行っても、治療効果を事前に予測することは困難である。また、造血器腫瘍は高齢者に多く発症するため今後の急激な高齢化に伴って患者数がさらに増加する。完全治癒を目的に原因そのものを取り除こうとする造血幹細胞移植は患者にかかる身体的な負担が大きく、高頻度に合併症が認められることから、高齢者に適用することは稀である。そのため、患者ごとに正確な予後予測を行い、副作用が少なく有効な症例を選択して治療を行うことが求められている。造血器腫瘍はがん細胞と正常細胞が混在する不均一な集団であり、固形腫瘍と比較すると試料に含まれる腫瘍の割合が少ない。そのため、従来のサンガーシーケンシング法によりいくつかの遺伝子変異が発見されていたものの、その検出感度は低かった。そのため、造血器腫瘍に特異的な遺伝学的異常はほとんど同定されておらず、分子病態の理解は不十分であった。こうしたことから、個々人に最適な治療法を提供するための予後予測や個別化医療の確立に大きな弊害が生じている。

2. 研究の目的

MDS には平均して約 10 個の体細胞変異が存在し、RNA スプライシングに関わる遺伝子変異が初期に起き、RAS パスウェイに関わる遺伝子変異が後期に獲得されることを明らかにした (図 1)¹。しかし、腫瘍化に直接かかわるような遺伝子異常が腫瘍細胞に複数個共存しており、同一患者の腫瘍内における不均一な存在を考慮すると、個々の遺伝子変異の腫瘍発症への役割を同

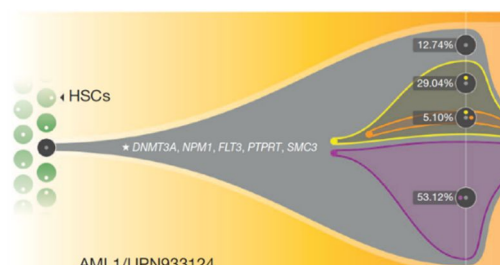


図1. MDSにおける段階的な遺伝子変異の獲得とクローン進化の多様性

定するのは容易ではない。造血幹細胞に体細胞性変異が起きることによってクローン化し、次の変異を獲得することで増大、一部はサブクローンとなり最終的に目に見える形で腫瘍を発症する。このようなクローン進化の多様性は MDS の特徴であるが、クローン構造が遺伝子変異の獲得とともに経時的にどのような変化が腫瘍化を促し最終的に白血病に進展するのか、についてはわかっていない。これらを明らかにすることで腫瘍発症メカニズムを解明し新たな治療戦略の構築に資することを目指す。

3. 研究の方法

(1) MDS から白血病を発症するまでの時系列サンプルにおけるクローン進化の解析

RNA スプライシング因子を始めとする遺伝学的異常の時間的・空間的な挙動を網羅的かつ

正確に追尾し解析する。そのために、MDSの発症初期から進行期、最終的に白血病に至るまでの、数年～数十年という長期間にわたる時系列の試料を全エクソンシーケンスし、詳細なクローン構造を解明する。それぞれ異なる病期に採取された腫瘍試料は、詳細に分画されすでに研究施設で凍結保存されている。この腫瘍試料について、高深度のシーケンス解析を行うことで、体細胞性変異とそれらのアレル頻度を正確に決定し腫瘍比率を見積もることで、MDSのクローン進化と多様性の拡大の過程を正確に描出する。各試料から分画された多数のコロニーを変異解析することで遺伝子型を決定し推定されたクローン構造を検証する。また、得られた変異アレルを患者・健常人の骨髄や臍帯血から分画されたヒト造血幹細胞へ遺伝子導入することで、変異の効果とクローン進化の解析を行う。

(2) 新たな胚細胞性変異の発見

腫瘍試料とペアになっている胚細胞試料について遺伝学的多型を決定し、その中で腫瘍の発症に関わる多型を「胚細胞性変異」として抽出する。また、非遺伝学的疾患で胚細胞性変異に着目し、がん化に影響を及ぼす多型を「胚細胞性変異」として捉え、網羅的な解析を行った研究はこれまで報告がない。そのため得られた多型が病気に関わっているかどうかを判定する明確な基準はなく、その病的意義は現時点で過小評価されていた。本研究法は6万人の健常人を全エクソン解析したデータ (M lek et al, Nature, 2016)を比較対象とし、がんに関わる多型を胚細胞性変異として捉えるという点で新奇である。これによりどのように造血幹細胞の形態、増殖能や分化能を変化させるのか明らかにする。遺伝形式からの理論的情報とその家族特有の情報を加味することにより、胚細胞性変異を持っている場合どれくらいの頻度でどのようにMDSの発症に関わるのかを解明する。予備実験の結果、これまで報告のない SAMD9/9L 遺伝子の胚細胞性変異をすでに同定し、健常人にはこの胚細胞性変異は認められず、これを持つ細胞がMDSに高頻度の5番染色体短腕の欠失を含む体細胞異常を誘導することを明らかにしている (図2)。

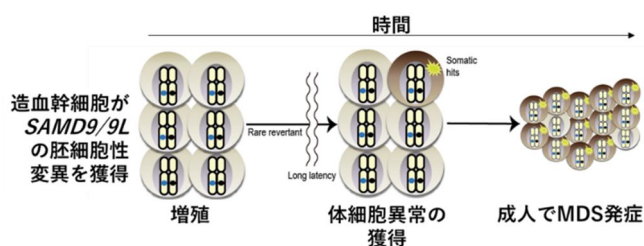


図2. 胚細胞性変異による新たなMDS発症モデル

(3) サブクローン解析による再発メカニズムの解明

がんは腫瘍内における不均一により、複数の異なる細胞集団から成り立っている。クローナル変異を獲得した一部の細胞が新たな変異を獲得しサブクローンを形成する (図3)。治療抵抗性を獲得したサブクローンは再発に関わり、予後と密接に連携する。症例毎に変異アレル頻度を用いて腫瘍試料内の腫瘍含有率を見積もった後、同定されたすべての遺伝子異常に関してクローンとサブクローンに分類する。がんにおける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から、サブクローンの遺

伝学的特徴を明らかにすることで、再発のメカニズムを解明する。健常人や MDS 患者から分画されたヒト造血幹細胞において、得られた遺伝子を導入もしくは欠失させ、機能的特徴を明らかにする。

4. 研究成果

(1) クローン進化の遺伝学的特徴の解明

193 症例の MDS が解析対象となった。予後不良な染色体異常を有している難治症例の試料に注目し、数年～最大 20 年間にわたる臨床情報の収集を行った。MDS から急性白血病に発展するまでの時系列解析が可能である 24 症例が抽出された。次世代シーケンサーで解析し体細胞性変異を抽出、白血病発症前後でそれらと比較することで消失するクローン、拡大するクローンの同定が可能であった。白血病発症時期にクローンが増大している症例が多かった。遺伝子ごとに分類し詳細を確認したが有意差は認めなかった。白血病

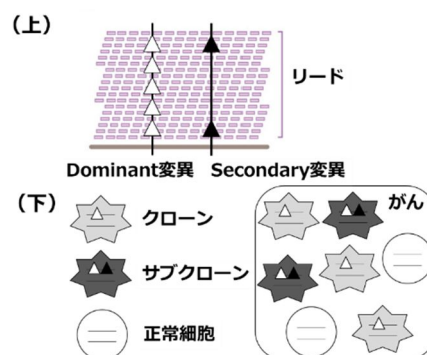


図3. サブクローンの模式図

発症後にクローンサイズが縮小している群は従来の化学療法への治療反応が良好であった。現在、遺伝子異常を特異的に阻害もしくは活性化する抗がん剤の開発が進んでおり、新たに保険適用となった FLT3 阻害剤や BCL2 阻害剤など保険収載され実際の臨床現場でも使用可能になっている。しかし、事前に治療反応性を予測することは困難であり、有害事象が発生することから治療効果の高い患者を事前に選択する手法の開発が急務となっている。今後の展望として、遺伝子異常の有無により治療反応性を予測し、治療反応が良好な群を選択的に抽出することで個別化医療の確立に寄与し、治療成績が改善する可能性が期待される。

(2) 機械学習アルゴリズムを用いた遺伝学的異常と臨床的特徴の潜在的な相互依存の解明

研究者らはこれまで人工知能を用い、機械学習アルゴリズムを用いることで MDS の遺伝子病変、形態、臨床的予後の間の潜在的な相互依存を解明してきた (図 4)²。本研究においても同様の解析を行った。血球減少や異形成など臨床学的特徴を複数有する症例が多数であり、これらの遺伝学的特徴をバイアスなく網羅的にグループ分けが可能となるコンセ²ンスクラスタリング手法を用いて層別化を行った。次にページアン機械学習手法を用いて変異パターンのみを認識させ、患者それぞれの類似性の有無を評価した。決定木を作成し、すべての患者を対象に、

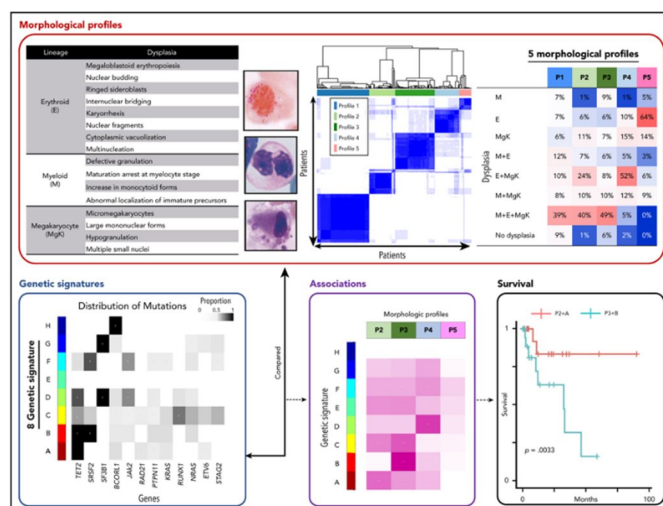


図4. 機械学習アルゴリズムによる遺伝学的異常と臨床的特徴の相互依存

遺伝子変異の有無をもとに進行される樹形図を用いて変異シグニチャーを同定した。これら変異シグニチャーや異形成プロファイルによる分類が臨床的に有用である可能性が示唆された。

(3) DDX41 胚細胞性変異の新たな特徴

DDX41 変異は、特に過剰な芽球を有する MDS において、高い芽球比率および AML 転換のリスクと関連し、胚細胞変異と体細胞変異の両方が MDS で報告されている³。

我々のグループは、高リスクの MDS から二次性 AML への進行中にしばしば獲得される変異である AML 関連 1 型変異が、DDX41 変異体とのそれぞれの比較では再現されないことを明らかにした⁴。さらに、DDX41 変異症例は全生存期間が良好で、DDX41 野生型症例とは異なり、国際予後分類によって割り当てられたリスク分類や TP53 変異の状態に影響されなかった(図 5)。興味深いことに、レトロスペクティブな解析では、DDX41 変異例は非変異例よりも予後が良く、特にメチル化阻害剤で治療した場合に予後が良くなることを報告した。

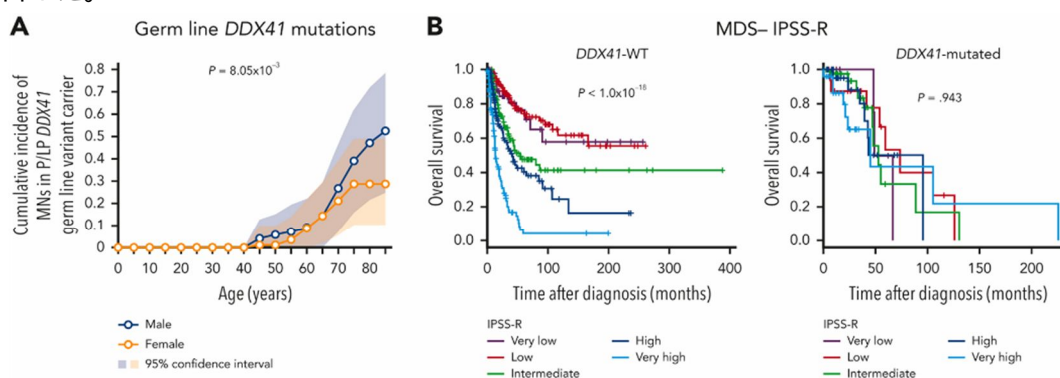


図5.DDX41胚細胞性変異の特徴

< 引用文献 >

1. Ding L, Ley TJ, Larson DE, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 2012;481(7382):506–10.
2. Nagata Y, Zhao R, Awada H, et al. Machine learning demonstrates that somatic mutations imprint invariant morphologic features in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2020;136(20):2249–2262.
3. Polprasert C, Schulze I, Sekeres MA, et al. Inherited and Somatic Defects in DDX41 in Myeloid Neoplasms. *Cancer Cell*. 2015;27(5):658–670.
4. Makishima H, Saiki R, Nannya Y, et al. Germ line DDX41 mutations define a unique subtype of myeloid neoplasms. *Blood*. 2023;141(5):534–549.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Radakovich N, Meggendorfer M, Malcovati L, Hilton CB, Sekeres MA, Shreve J, Roupail Y, Walter W, Hutter S, Galli A, Pozzi S, Elena C, Padron E, Savona MR, Gerds AT, Mukherjee S, Nagata Y, Komrokji RS, Jha BK, Haferlach C, Maciejewski JP, Haferlach T, Nazha A.	4. 巻 5(21)
2. 論文標題 A geno-clinical decision model for the diagnosis of myelodysplastic syndromes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 4361-4369
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2021004755.	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 Awada H, Durmaz A, Gurnari C, Kishtagari A, Meggendorfer M, Kerr CM, Kuzmanovic T, Durrani J, Shreve J, Nagata Y, Radivoyevitch T, Advani AS, Ravandi F, Carraway HE, Nazha A, Haferlach C, Sauntharajah Y, Scott J, Visconte V, Kantarjian H, Kadia T, Sekeres MA, Haferlach T, Maciejewski JP.	4. 巻 138(19)
2. 論文標題 Share Machine learning integrates genomic signatures for subclassification beyond primary and secondary acute myeloid leukemia.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1885-1895
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/blood.2020010603.	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 Adema V, Khouri J, Ni Y, Rogers HJ, Kerr CM, Awada H, Nagata Y, Kuzmanovic T, Advani AS, Gerds AT, Mukherjee S, Nazha A, Sauntharajah Y, Madanat Y, Patel BJ, Sole F, Nawrocki ST, Carew JS, Sekeres MA, Maciejewski JP, Visconte V, Carraway HE.	4. 巻 62(3)
2. 論文標題 Analysis of distinct SF3B1 hotspot mutations in relation to clinical phenotypes and response to therapy in myeloid neoplasia.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Leuk Lymphoma	6. 最初と最後の頁 735-738
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/10428194.2020.1839647.	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 Samuel T., Wang Janet, Wei Ruipeng, Shi Ruqi, Adema Vera, Nagata Yasunobu, Kerr Cassandra M., Kuzmanovic Teodora, Przychodzen Bartlomiej, Sole Francesc, Maciejewski Jaroslaw P., LaFramboise Thomas	4. 巻 34
2. 論文標題 Rare germline variant contributions to myeloid malignancy susceptibility	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 1675 ~ 1678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-019-0701-8	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 Nagata Yasunobu, Zhao Ran, Awada Hassan, Kerr Cassandra M., Mirzaev Inom, Kongkiatkamon Sunisa, Nazha Aziz, Makishima Hideki, Radivoyevitch Tomas, Scott Jacob G., Sekeres Mikkael A., Hobbs Brian P., Maciejewski Jaroslaw P.	4. 巻 136
2. 論文標題 Machine learning demonstrates that somatic mutations imprint invariant morphologic features in myelodysplastic syndromes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 2249 ~ 2262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2020005488	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 Adema Vera, Khouri Jack, Ni Ying, Rogers Heesun J., Awada Hassan, Nagata Yasunobu, Kuzmanovic Teodora, Advani Anjali S., Gerds Aaron T., Mukherjee Sudipto, Nazha Aziz, Sauntharajah Yogen, Madanat Yazan, Patel Bhumika J., Sol Francesc, Nawrocki Steffan T., Maciejewski Jaroslaw P., Visconte Valeria, Carraway Hetty E.	4. 巻 62
2. 論文標題 Analysis of distinct SF3B1 hotspot mutations in relation to clinical phenotypes and response to therapy in myeloid neoplasia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Leukemia & Lymphoma	6. 最初と最後の頁 735 ~ 738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10428194.2020.1839647	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 Yui Shunsuke, Wakita Satoshi, Nagata Yasunobu, Sakaguchi Masahiro, Yamanaka Satoshi, Marumo Atsushi, Nakayama Kazutaka, Hirakawa Tsuneaki, Inokuchi Koiti, Yamaguchi Hiroki	4. 巻 19
2. 論文標題 Safety and efficacy of high dose cytarabine MEAM therapy and other treatments for auto peripheral blood stem cell transplantation: A retrospective comparative study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 136 ~ 148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ajco.13780	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 Takeda June, Yoshida Kenichi, Nannya Yasuhito, Yoda Akinori, Okuda Rurika, Kon Ayana, Chiba Kenichi, Tanaka Hiroko, Shiraishi Yuichi, Nagata Yasunobu, Miyazaki Yasushi, Kitano Toshiyuki, Takaori-Kondo Akifumi, Makishima Hideki, Ogawa Seishi	4. 巻 3
2. 論文標題 Amplified <i>EPOR</i> / <i>JAK2</i> Genes Define a Unique Subtype of Acute Erythroid Leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood Cancer Discovery	6. 最初と最後の頁 410 ~ 427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2643-3230.BCD-21-0192	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 Makishima Hideki, Saiki Ryunosuke, Nannya Yasuhito, Shiraishi Yuichi, Nagata Yasunobu, Kakiuchi Nobuyuki, Chiba Shigeru, Ohyashiki Kazuma, Maciejewski Jaroslaw P., Ogawa Seishi	4. 巻 141
2. 論文標題 Germ line <i>DDX41</i> mutations define a unique subtype of myeloid neoplasms	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 534 ~ 549
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2022018221	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 Sakaguchi Masahiro, Nagata Yasunobu, Terasaki Yasuhiro, Takeyoshi Atsushi, Yasuda Shunichi, Honma Shunsuke, Kinoshita Ryosuke, Marumo Atsushi, Asayama Toshio, Yui Shunsuke, Wakita Satoshi, Okamoto Muneo, Kajimoto Yusuke, Inokuchi Koichi, Yamaguchi Hiroki	4. 巻 90
2. 論文標題 Epstein-Barr Virus-Related Hemophagocytic Lymphohistiocytosis with Central Nervous System Symptoms	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Nippon Medical School	6. 最初と最後の頁 126 ~ 135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1272/jnms.JNMS.2023_90-105	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 永田 安伸	4. 巻 64
2. 論文標題 骨髄異形成症候群における遺伝子変異を用いた予後予測	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 355 ~ 368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.64.355	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Jiadan Sheng, Yasunobu Nagata, Atsushi Marumo, Masahiro Sakaguchi, Satoshi Wakita, Junya Kuroda, Shinichiro Mori, Nobuhiko Uoshima, Shinichi Kako, Yoshinobu Kanda, Katsuhiko Shono, Atsushi Satake, Hiroki Yamaguchi
2. 発表標題 Clinical impact of IDH1/2 mutations in AML patients treated with Venetoclax
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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