

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08366

研究課題名(和文) MDS病態の分子基盤の解明と新規予後予測システムの構築

研究課題名(英文) Molecular basis of MDS pathogenesis and construction of novel MDS prognostic model

研究代表者

大島 基彦(Oshima, Motohiko)

東京大学・医科学研究所・講師

研究者番号：70506287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：MDSの造血幹細胞分画、および前駆細胞分画を用いたATAC-seq解析により、MDSにおける変動領域には正常な分化に関わる領域が多く含まれることが示された。またモチーフ解析により予後と強く相関する転写因子群が抽出されると共に、転写因子ネットワーク変化に基づく独立したMDSサブグループが存在することが明らかになった。これらの結果は同じ検体、分画で行った遺伝子発現解析では必ずしも明確には示されず、クロマチン特性に注目した本研究により始めて明らかになった結果と言える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MDS幹細胞および前駆細胞分画を用いたクロマチン特性解析により、予後に関わる転写因子ネットワークを同定するとともに、転写因子ネットワーク変動に基づく新規のMDSサブグループが存在する事を明らかにした。今後、遺伝子変異との関わりや転写因子の標的遺伝子群などについてさらに詳細に検証を行うことで、新たなMDS病態の分子基盤を構築し、より適切な治療選択や新規治療法の開発に繋げる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：ATAC-seq analysis of MDS using stem and progenitor fraction revealed that, differentially accessible regions (DARs) in MDS include large amount of normal differentiation-related regions. We also found the transcription factor networks that strongly related to the prognosis and stratified MDS based on the transcription factor network abnormality in MDS stem and progenitor cells. These characteristic features were not clearly observed in the gene expression profiles from same samples, showing that these finding are the first to be revealed by focusing on chromatin characteristics.

研究分野：幹細胞分子医学、血液学

キーワード：MDS ATAC-seq 転写因子 造血器腫瘍

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndromes : MDS) は、造血幹細胞の異常に起因する疾患であり、造血細胞の異形成と無効造血に伴う末梢血の汎血球減少を特徴とする。また、高齢者に好発する疾患で、高齢化の進展により患者数が急増しており、治療成績の向上が非常に重要な課題となっている。治療に際して、低リスク患者は輸血や補助療法による治療を選択する一方で、高リスク患者は造血幹細胞移植かアザシチジンなどの治療を選択するが、低リスク患者への移植は逆に予後を悪化させることもあるため、病態に応じた適切なリスク評価と治療選択が非常に重要となる。MDS の予後予測システムとして現在最もよく使用されている IPSS-R は、芽球比率や染色体異常様式などの臨床情報をスコア化し予後进行分类するものだが、網羅的解析や近年明らかになった様々な遺伝子変異の解析とは独立しており、MDS 臨床病態の分子基盤に基づく、包括的な予後予測システムの構築と治療層別化が課題となっている。

2. 研究の目的

本研究では、ATAC-seq によるオープンクロマチン領域の網羅的解析を行い、MDS の分子病態を規定する転写制御ネットワーク異常を明らかにする。MDS は本来幹細胞を起源とする疾患であるため、MDS 幹細胞と前駆細胞の2分画を用いて、RNA-seq による遺伝子発現解析と、これまで MDS では報告のない ATAC-seq を同時に行い、遺伝子変異解析と合わせて、転写制御ネットワークの異常に基づく新たな MDS 病態の分子基盤を明らかにし、MDS の層別化と新規治療の開発に繋げることで、超高齢化社会において急増しつつある MDS における最適医療の実現を目指す。

3. 研究の方法

(1) 検体の収集と 幹・前駆細胞のソーティング

MDS-MLD (MDS with multilineage dysplasia)、MDS-EB (MDS with excess blasts) 検体に加え、骨髄異形成関連の変化を伴う AML-MRC (acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes)、MDS の基準に満たない ICUS/CCUS (idiopathic/clonal cytopenia of undetermined significance) および健常検体の骨髄検体から Lin⁻CD34⁺CD38⁻ 幹細胞分画 (stem cell) および Lin⁻CD34⁺CD38⁺ 前駆細胞分画 (progenitor cell) を純化し、網羅的オープンクロマチン領域解析 (ATAC-seq) と網羅的遺伝子発現解析 (RNA-seq) を行う。同時に CD34⁻ flow through 分画を用いて、Myeloid Neoplasms panel (Qiagen) を用いた Targeted deep sequencing (TDS) による遺伝子変異解析を行う。

(2) ATAC-seq、RNA-seq、Targeted deep sequencing の網羅的プロファイリング

ATAC-seq においては、各サンプルのピーク領域を定量化し、グループ間での変動について有意差検定を行い、オープンクロマチン変動領域を用いて転写因子モチーフ解析を行う。また、階層クラスタリングや主成分分析解析、t-SNE、NMF 等の次元削減法により、全体的な傾向に基づく MDS の分類を行う。幹細胞、前駆細胞それぞれに特異的な変化に加え、正常な分化に伴う変動についても注目し解析を行っていく。

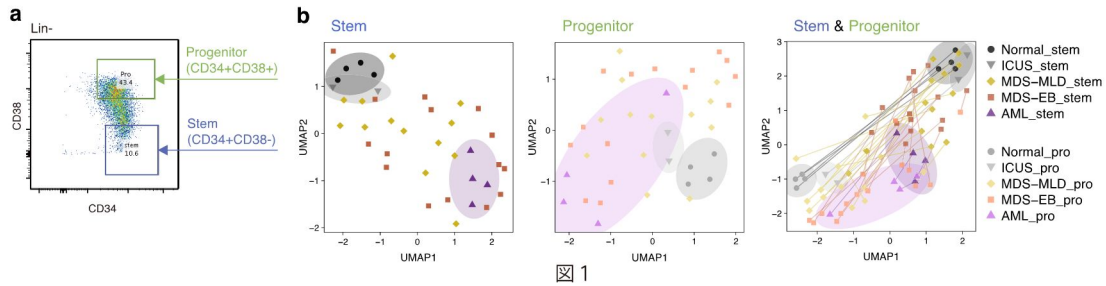
RNA-seq データについても、同様にグループ間の変動遺伝子群を用いて GO 解析、pathway 解析を行う。また、転写因子結合配列を含む変動ピーク領域に紐付けられた遺伝子の発現を検討し、MDS 固有の転写因子ネットワークの変化について明らかにする。

(3) 予後に関わるクロマチン変動の検証と MDS 検体の層別化

各検体の予後予測スコア IPSS-M およびスコア計算に使用される臨床情報と相関するピーク領域群を抽出し、機能解析を行う。また転写因子ネットワークの異常に基づく MDS の層別化を行う。

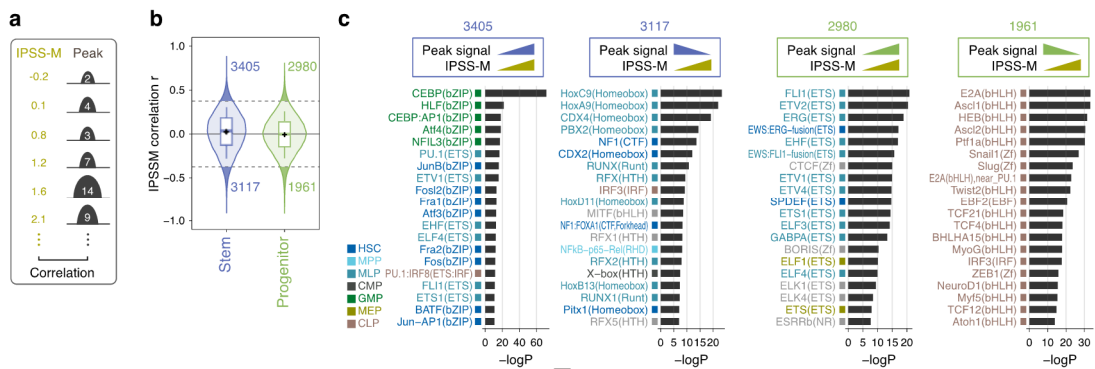
4. 研究成果

まず我々は、MDS-MLD 13 検体、MDS-EB 14 検体、AML-MRC 4 検体、ICUS/CCUS 2 検体に正常 4 検体に加え、各検体の stem cell 分画および progenitor cell 分画を用いて、RNA-seq、ATAC-seq を行った (図 1a)。ATAC-seq において検出されたサンプル毎のピーク領域を統合し、統合した



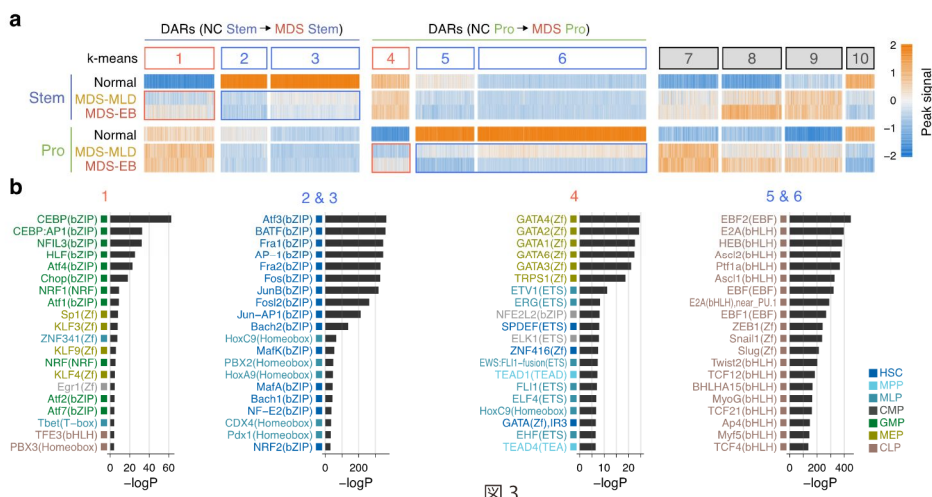
共通領域における各サンプルのリードカウントを正規化して比較を行った。UMAP を行った結果、stem cell 分画では正常検体および ICUS/CCUS と AML は明確に分かれており、MDS はその間に離散して存在している一方で、progenitor cell 分画ではより重なっている部分が多く見られており、クロマチン状態においては、stem cell 分画の方がより病態の多様性を反映していることが示唆された (図 1b)。

次に、予後に関わる転写ネットワークについて検証するため、検出された全ピークについて、ピーク値と IPSS-M スコアとのピアソンの相関係数を個別に計算し、有意に正または負の相関を示す領域群を、stem、progenitor それぞれについて抽出し、モチーフ解析を行った (図 2)。



Stem cell において、IPSS-M と正の相関を示す領域、すなわち予後の悪化に伴い開く領域には、CEBP が顕著にエンリッチしており、逆に閉じる領域には HoxA9 がエンリッチしていた。また Progenitor で開く領域には ETS family、閉じる領域には lymphoid 系転写因子がエンリッチしており、これらの転写因子ネットワークの変化が予後の悪化に関わる事が示唆された。

次に、MDS 変動領域の特徴について検証するため、(変動領域のピーク値を) 正常サンプルと併せて比較した結果、MDS 変動領域の半数以上は、正常な分化過程でも変動する領域であり、またいくつかの特徴的なクラスターに分かれる事が示された (図 3a)。このうち MDS stem では、分



化に先行して正常な progenitor に近づくような変化をする集団が見られる一方で、MDS progenitor では逆に正常な stem に近づくような変化が多くみられることが分かった。そこでこれらの特徴的な集団を用いてモチーフ解析を行ったところ、MDS stem において分化に先行して開く領域は CEBP が顕著にエンリッチしている一方で、先行して閉じる領域では AP1 family がエンリッチしていた (図 3b)。また progenitor では stem に近づき開く領域には GATA モチーフが、閉じる領域には lymphoid 系転写因子のモチーフがエンリッチしていた。

そこで次に、疾患サンプルの分化傾向についてより詳細に評価するため、正常の分化過程、お

よび MDS で変動する領域を用いて、stem cell から progenitor cell への分化レベルを 0 - 1 スケールで表す progenitor score を定義し、MDS stem cell の progenitor score を計算したところ、IPSS-M スコアと有意に正の相関を示す事が示された (図 4a)。MDS progenitor cell の

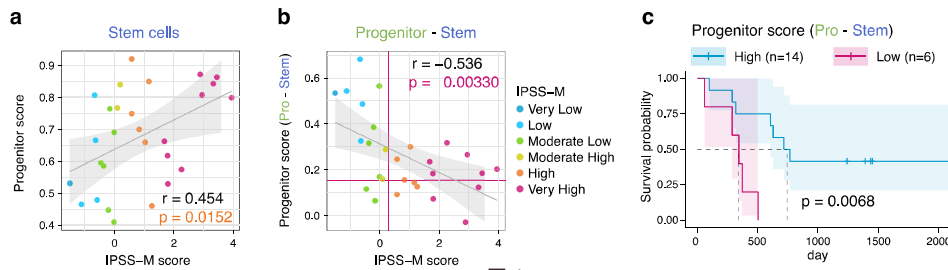


図 4

progenitor score は IPSS-M と有意な相関を示さなかったが、progenitor cell と stem cell のスコアの差分値と比較したところ、最も高い相関を示した (図 4b)。そこで Progenitor score の差分値を使って、解析に使用した検体の生存期間との関係について検証した。Progenitor score の差分値を、任意のしきい値で high 群 と low 群に分けたところ、High 群すなわち stem と pro の差が大きい群に比べて、low 群すなわちすなわち stem と pro の差が小さい群の方が著しく生存期間が短縮している事が明らかになった (図 4c)。

次に、転写因子ネットワーク制御の変化に基づく MDS の層別化を試みるため、stem、progenitor cell それぞれについて、MDS で大きく変動する複数の転写因子群の中で代表的な転写因子モチーフを選び、各サンプルにおける enrichment score を用いて K-means クラスタリングを行ったところ、ICUS/CCUS を含み、全体に変動の少ないグループ 1、stem、pro 両方で CEBP が高いグループ 2、AML を含み stem、pro 両方で KLF、stem で AP1、HoxA9 の変動が大きいグループ 3 に分かれた (図 5a)。グループ 2 と 3 の IPSS-M スコアは有意な差を示さなかった一方で、stem cell に

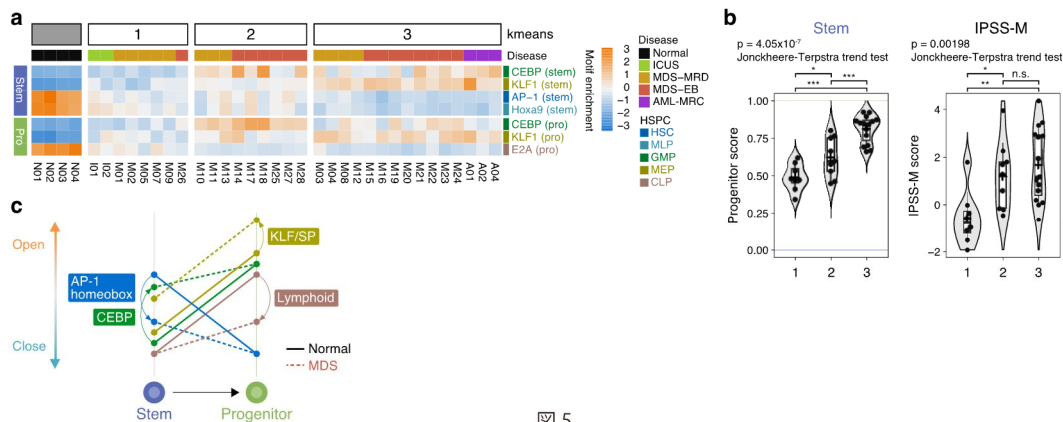


図 5

における Progenitor score には顕著な差が示された (図 5b)。このことは、既存の予後予測スコアでは差の見られない集団の中に、異なる転写因子ネットワーク特性を持つ集団が存在する事を示しており、特性の差異についてより詳細に検討することで、MDS の治療層別化に繋げることが期待できる。

本研究の結果から、Stem と progenitor の階層性は病態の進行に伴い失われ、stem cell では CEBP や HoxA9、progenitor cell では ETS family や Lymphoid 系転写因子ネットワークが変化している事が明らかになった (図 5c)。またクロマチンプロファイルに基づく Stem と progenitor の差異の程度は、MDS の予後と強く関わることが示された。更に転写因子ネットワークの変動に基づく新たな MDS 層別化が示され、より適切な治療選択への貢献が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Isshiki Y, Oshima M, Mimura N, Kayamori K, Miyamoto-Nagai Y, Seki M, Nakajima-Takagi Y, Kanamori T, Iwamoto E, Muto T, Tsukamoto S, Takeda Y, Ohwada C, Misawa S, Ikeda JI, Sanada M, Kuwabara S, Suzuki Y, Sakaida E, Nakaseko C, Iwama A.	4. 巻 7
2. 論文標題 Unraveling unique features of plasma cell clones in POEMS syndrome with single-cell analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e151482
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.151482	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 Aoyama Kazumasa, Itokawa Naoki, Oshima Motohiko, Iwama Atsushi	4. 巻 11
2. 論文標題 Epigenetic Memories in Hematopoietic Stem and Progenitor Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2187 ~ 2187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11142187	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 Itokawa Naoki, Oshima Motohiko, Koide Shuhei, Takayama Naoya, Kuribayashi Wakako, Nakajima-Takagi Yaeko, Aoyama Kazumasa, Yamazaki Satoshi, Yamaguchi Kiyoshi, Furukawa Yoichi, Eto Koji, Iwama Atsushi	4. 巻 13
2. 論文標題 Epigenetic traits inscribed in chromatin accessibility in aged hematopoietic stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-30440-2	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 Kuribayashi Wakako, Oshima Motohiko, Itokawa Naoki, Koide Shuhei, Nakajima-Takagi Yaeko, Yamashita Masayuki, Yamazaki Satoshi, Rahmutulla Bahityar, Miura Fumihito, Ito Takashi, Kaneda Atsushi, Iwama Atsushi	4. 巻 218
2. 論文標題 Limited rejuvenation of aged hematopoietic stem cells in young bone marrow niche	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 e20192283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20192283	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 Aoyama Kazumasa, Shinoda Daisuke, Suzuki Emi, Nakajima-Takagi Yaeko, Oshima Motohiko, Koide Shuhei, Rizq Ola, Si Sha, Tara Shiro, Sashida Goro, Iwama Atsushi	4. 巻 35
2. 論文標題 PRC2 insufficiency causes p53-dependent dyserythropoiesis in myelodysplastic syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 1156 ~ 1165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-020-01023-1	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 -

[学会発表] 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Oshima M, Takayama N, Nakajima-Takagi Y, Koide S, Harada H, Harada Y, Ding Y, Myojo T, Iwama A.
2. 発表標題 Molecular pathogenesis in MDS stem and progenitor cells
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大島基彦, 高山直也, 中島やえ子, 小出周平, 原田浩徳, 原田結花, 岩間厚志
2. 発表標題 クロマチン特性解析による骨髄異形成症候群の病態解明
3. 学会等名 第27回造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大島基彦, 高山直也, 中島やえ子, 小出周平, 岩間厚志.
2. 発表標題 MDS病態の分子基盤の解明と新規予後予測システムの構築
3. 学会等名 第25回造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2021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
---------	---------