

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08394

研究課題名(和文) 胚細胞変異を有する骨髄系腫瘍の前がん病変がクローン選択を受ける分子病態の解明

研究課題名(英文) Elucidating the mechanisms of clonal evolution of myeloid neoplasms with germline predisposition

研究代表者

昆 彩奈 (Kon, Ayana)

京都大学・医学研究科・特定講師

研究者番号：20772403

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)：近年、晩発性の家族性骨髄系腫瘍患者検体の遺伝子解析を通じて明らかになった、先天性骨髄系腫瘍の最大のリスク因子であるDDX41胚細胞/体細胞変異に関して、変異をもつ細胞がクローン選択を受ける分子メカニズムの検討を行った。病態を模倣するDdx41変異マウスモデルの作成と解析を行い、単一細胞解析をふくむ高速シーケンス技術を取り入れたアプローチを用いて、変異により惹起される細胞自律的/非自律的な分子病態を明らかにし、新規治療標的の開発の可能性も検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、先天性骨髄系腫瘍の最大のリスク因子であるDDX41胚細胞/体細胞変異に関して、変異をもつ細胞がクローン選択を受ける分子メカニズムの詳細な検討により、変異により惹起される細胞自律的/非自律的な分子病態を多角的に解明した点で、高い学術的な独自性を有する。さらに、新規治療標的の開発の可能性も検討し、がんの治療予後の向上に資する社会的意義の高い研究成果が得られた。本研究で新たに生じた疑問に関する検討を継続し、病態のさらなる理解とその制御による新たな治療法の開発を目指したい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the molecular mechanisms underlying the clonal selection of hematopoietic cells harboring DDX41 germline/somatic mutations, which were previously identified through genetic analysis of late-onset familial and sporadic myeloid neoplasms. We generated Ddx41 mutant mouse models and examined the molecular pathogenesis using methodology including single-cell and omics analysis. Through this, we have elucidated the cell-autonomous/non-autonomous molecular pathogenesis induced by the Ddx41 mutations. Furthermore, we investigated the potential for identifying new therapeutic targets based on our discoveries.

研究分野：血液腫瘍病態学、腫瘍生物学

キーワード：骨髄異形成症候群 急性骨髄性白血病 胚細胞変異

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

MDSの発症過程においては、腫瘍の起源となる遺伝子変異が造血幹細胞レベルで生じ、そこから、新たな変異の獲得とクローン選択によって発症にいたると考えられている。近年、造血器腫瘍を発症していない場合であっても、骨髄系腫瘍で頻りに認められるドライバー変異を有する「クローン性造血」が高頻度に認められることが報告された (Jaiswal et al., *N Engl J Med.* 2014, Genovese et al., *N Engl J Med.* 2014, Xie et al., *Nat Med.* 2014)。さらに、*DDX41* に代表される新規の胚細胞変異が同定され、MDSを発症するはるか以前にすでにドライバー変異が存在することが明らかとなった (Polprasert et al. *Cancer Cell* 2015, Sebert et al. *Blood* 2019)。従来、家族性 MDS/AML の原因遺伝子としては、*RUNX1*, *CEBPA*, *GATA2* の胚細胞変異が知られていたが、これらは全て若年発症であった。近年、晩発性の家族性 MDS/AML 患者検体の遺伝子解析を通じて、*DDX41* の機能喪失型の胚細胞変異が 5%以上と高頻度に認められるのに加えて、約半数の症例では、胚細胞変異を有するアレルの対側アレルに、セカンドヒットの体細胞変異 (典型的には p.R525H 変異) が認められることが明らかにされた (Polprasert et al. *Cancer Cell* 2015, Lewinsohn et al. *Blood.* 2016)。国内外の後続研究により、家族歴のない孤発性 AML 症例の 3-5%もの症例において *DDX41* の胚細胞性変異が明らかにされ (Cardoso et al. *Leukemia.* 2016, Kobayashi et al. *Leukemia.* 2017, Sebert et al. *Blood.* 2019)、最新の WHO2016 国際腫瘍分類においても *DDX41* 関連骨髄性腫瘍は新病型に採用された (Arber et al. *Blood.* 2016)。このように、*DDX41* 胚細胞性変異は先天性 MDS/AML の最大のリスク因子と認識されているものの、*DDX41* 変異による骨髄系腫瘍発症のメカニズムや、典型的には低アレル頻度で認められる *DDX41* 体細胞変異がクローン進化においてどのような役割を果たすかの機能的意義については多くが不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、先天性 MDS/AML において最も高頻度に認められる素因である *DDX41* 胚細胞性変異、およびセカンドヒットとして生じる *DDX41* 体細胞変異に関して、

生まれながらにして *DDX41* 胚細胞変異をもつ細胞が、長い時間をへて、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

初期のクローン選択に続いて、新たな *DDX41* 体細胞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、骨髄系腫瘍の発症にいたるのか

DDX41 変異をもつ症例に対する治療介入の可能性はあるか

という問いをたて、病態を模倣するマウスモデルの作成、および単一細胞レベルでのシーケンス技術を取り入れたアプローチを用いて、その分子病態の解明を目指し、その制御による新たな革新的な治療法の開発につなげることである。

3. 研究の方法

研究代表者らは、本研究開始までに、*DDX41* 変異による骨髄系腫瘍発症の分子メカニズムを解明するために、*Ddx41* 遺伝子の条件的ノックアウト (KO) マウス、およびホットスポット体細胞変異 (p.R525H) に関する条件的ノックイン (KI) マウスを作成し、さらに両者を交配することで、*Ddx41* R525H/null マウスを作出した。*Ddx41* ヘテロ KO マウスまたはヘテロ KI マウスは長期観

察にて MDS を発症しないものの、*Ddx41* R525H/null マウスは骨髄不全を発症し大多数が死亡した。RNA シーケンスにより、*Ddx41* R525H/null マウスの造血幹細胞では、cGAS-STING 経路を代表とする自然免疫伝達経路が活性化しており、インターフェロンや炎症性サイトカインの著明な発現亢進が細胞自律的に惹起されることが骨髄不全の原因となることが示唆された。本研究では、我々が作成した上述のマウスモデルを用いて以下の検証を行う。

(1) *DDX41* 胚細胞変異をもつ細胞がクローン選択を受けるメカニズムの解明

DDX41 胚細胞変異をもつ細胞により形成される炎症環境などの造血幹細胞ニッチによる細胞非自律的(non-cell autonomous)な影響により、*DDX41* 変異を持つ造血幹細胞 (前がん病変) がクローン選択を受ける可能性について検証する。野生型あるいは *Ddx41* null/wt マウス (胚細胞変異のモデル) をレシピエントマウスとして、*Ddx41* 変異マウスの骨髄細胞を、野生型または *Ddx41* null/wt マウス由来のコンペティター骨髄細胞と混合して骨髄移植し、経時的に末梢血でのドナーキメリズムを評価することによって、*Ddx41* 変異造血幹細胞がクローン選択を受けるかどうかを評価する。さらに、コンペティター細胞由来の造血細胞を対象として単一細胞 RNA シーケンスを行い、各細胞集団の割合や、それぞれの細胞分画ごとの遺伝子発現を解析することにより、*Ddx41* 変異細胞による細胞非自律的な影響を評価する。

(2) *DDX41* 体細胞変異の獲得がクローン進化においてどのような役割を果たすかの解明

Ddx41 R525H/null マウスの造血幹細胞では、cGAS-STING 経路を代表とする自然免疫伝達経路が強く活性化しており、インターフェロン誘導遺伝子や炎症性サイトカインの著明な発現亢進による炎症反応が細胞自律的に惹起され骨髄不全で早期に死亡することを明らかにした。しかし、このマウスモデルでは、ほぼすべての造血細胞が R525H/null アレルを有しているため、自然免疫応答を担当する骨髄系およびリンパ系の分化細胞によるインターフェロンや炎症性サイトカインの産生が過剰である可能性が考えられる。患者では、典型的には *DDX41* R525H/null のアリル頻度が低く、クローン選択をうけるものの腫瘍細胞のうち一部を占めるにとどまる。したがって、強すぎない適度な炎症環境が、クローン選択において重要である可能性も想定される。そこで、変異マウス由来の造血細胞を、様々な比率でコンペティター細胞 (野生型または *Ddx41* null/wt マウス由来の骨髄細胞) とまぜてレシピエントマウスに移植することにより、*Ddx41* 変異を持つ細胞がクローン選択をうけるかどうかを観察する。

(3) *DDX41* 変異をもつ症例に対する新規治療法開発の可能性についての検討

Ddx41 変異マウスを *Sting* KO マウスと交配させることにより、cGAS-STING 自然免疫経路の活性化を抑制し、病気の発症を阻止することができるかを評価する。

4 . 研究成果

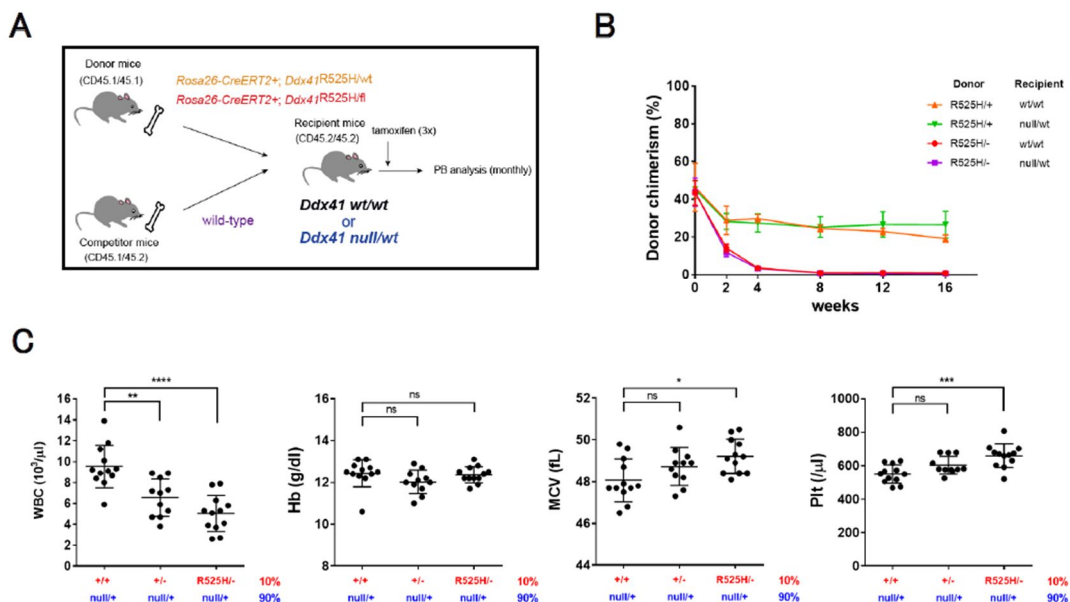
DDX41 胚細胞変異をもつ細胞、および *DDX41* 体細胞変異を獲得した細胞がクローン選択を受けるメカニズムの解明

DDX41 変異前がん細胞と、*DDX41* 胚細胞変異細胞により形成される周囲微小環境との相互作用とを解明できるマウスモデルを、我々が作成した 3 種類の遺伝子改変マウス (*Ddx41* に関する条件的ノックアウト、条件的ノックイン、恒常的ヘテロノックアウトマウス) を用いて構築した。第一に、*DDX41* 胚細胞変異をもつ細胞により形成される微小環境による細胞非自律的(non-cell autonomous)な影響により *DDX41* 変異を持つ造血幹細胞 (前がん病変) がクローン選択を受ける

可能性については検証するために、Rosa26-CreERT2 を発現するヘテロノックイン ($Ddx41^{R525H/+}$) またはヘミ接合型ノックイン ($Ddx41^{R525H/-}$) から採取した骨髓細胞をドナー細胞とし、野生型のコンペティターから採取した骨髓細胞と等量ずつ混ぜて、レシピエントの $Ddx41$ 野生型 ($Ddx41^{wt/wt}$) あるいは $Ddx41^{null/wt}$ マウス (胚細胞変異のモデル) へと骨髓移植を行った (図 1A)。移植後 1 か月後からタモキシフェン 0.5mg × 6 回を投与して、変異アレルの発現を誘導した。1 か月毎のドナーキメリズムの追跡にて、ヘミ接合型変異を有する造血幹細胞のクローン選択は認められず、また、レシピエント細胞の違い (すなわち、骨髓微小環境の違い) による違いも少なくとも 16 週までの段階では認めなかった。 (図 1B)

また、 $DDX41$ 胚細胞変異にセカンドヒットの体細胞変異を獲得したクローンは、典型的にはクローン拡大した後も腫瘍細胞のうち一部 (~10%) を占めるにとどまることから、強すぎない適度な炎症環境が、変異細胞が生存してクローン選択をうけるために重要であるという仮説を立てた。 $Ddx41$ 野生型 ($Ddx41^{+/+}$)、ヘテロノックアウト ($Ddx41^{+/-}$) またはヘミノックイン ($Ddx41^{R525H/-}$) 由来の骨髓細胞と、 $Ddx41^{null/wt}$ マウス (胚細胞変異のモデル) 由来の骨髓細胞とを 1 : 9 で混合して骨髓移植を行い血算データを追跡すると、ドナー細胞が $Ddx41^{+/-}$ および $Ddx41^{R525H/-}$ である場合に、WBC 減少を起こし、ドナー細胞が $Ddx41^{R525H/-}$ である場合には大球性貧血や形態異常を示すこともあきらかになった (図 1C)。コンペティターの $Ddx41^{+/-}$ 細胞は、共に移植したドナー細胞が $Ddx41$ 野生型 ($Ddx41^{+/+}$)、ヘテロノックアウト ($Ddx41^{+/-}$)、ヘミノックイン ($Ddx41^{R525H/-}$) のいずれであるかの違いにより、シングルセル RNA シーケンス解析にて、大きく異なる細胞分化のパターンを示した。さらに、これらのマウスから採取した血漿の網羅的プロテオミクス解析により、ある種の液性因子が、ドナー細胞が $Ddx41^{R525H/-}$ である場合に有意に変化を認めた。これらの結果より、 $Ddx41^{R525H/-}$ 細胞が産生する炎症性サイトカイン等が、周囲の細胞の造血に対して細胞非自律的な影響を与えることが示唆された。

図 1



DDX41 変異をもつ症例に対する新規治療法開発の可能性についての検討

DDX41 蛋白は STING と直接結合して下流の自然免疫経路を活性化することが *in vitro* の実験で報告されていること、また我々のこれまでの実験より、*Ddx41* 変異マウスでは細胞自律的な cGAS-STING 自然免疫経路の亢進を示す証拠が得られたことから、*Ddx41* 変異マウスを *Sting* ノックアウトマウスと交配させて、cGAS-STING 自然免疫経路の活性化を抑制し、病気の発症を阻止することができるかを評価した。*Ddx41* 変異マウスと *Sting* ノックアウトマウスとのダブル変異マウスでは、生存率や造血表現型の改善に一定の効果がみとめられ、cGAS-STING 経路を阻害することが *Ddx41* 変異を持つ骨髄系腫瘍の予後改善に資する可能性について、一定の有用性が検証された。STING 経路を介さない標的も存在することが示唆され、RNA シーケンスにて、複数の遺伝子の発現異常を同定した。したがって、*Sting* 経路の抑制は一定の効果は期待できるものの、*Sting* 経路以外の異常のさらなる理解と、これらを標的にすることが可能かについて、今後検討する必要があると考えている。

本研究全体として、*DDX41* 胚細胞性変異、およびセカンドヒットとして生じる *DDX41* 体細胞変異に関して、変異を獲得した細胞がクローン選択をうけるメカニズムの解明と、新規治療法開発が可能かという問いに対する多角的な検討より分子病態への理解が進んだ。未解明の課題については、引き続き研究を継続し、病態のさらなる理解とその制御による新たな治療法の開発を目指したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Tanaka A, Nishimura K, Saika W, Kon A, Koike Y, Tatsumi H, Takeda J, Nomura M, Zang W, Nakayama M, Matsuda M, Yamazaki H, Fukumoto M, Ito H, Hayashi Y, Kitamura T, Kawamoto H, Takaori-Kondo A, Koseki H, Ogawa S	4. 巻 37
2. 論文標題 SETBP1 is dispensable for normal and malignant hematopoiesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 1802 ~ 1811
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-023-01970-5	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 Makishima H, Saiki R, Nannya Y, (17人省略), Kon A, (28人省略), Maciejewski JP, Ogawa S.	4. 巻 141
2. 論文標題 Germline DDX41 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 該当する

1. 著者名 Takeda J, Kenichi Y, (9人省略), Kon A (12/41番目), (途中省略), Makishima H, Ogawa S	4. 巻 3
2. 論文標題 Amplified EPOR/JAK2 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13件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Ayana Kon, Masahiro M Nakagawa, Keisuke Kataoka, Nobuyuki Kakiuchi, Hideki Makishima, Manabu Nakayama, Haruhiko Koseki, Yasuhito Nannya, Seishi Ogawa
2. 発表標題 Functional roles of DDX41 mutations in the development of myeloid malignancies
3. 学会等名 the 17th International Congress on Myelodysplastic Syndromes (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ayana Kon, Masahiro M Nakagawa, Keisuke Kataoka, Nobuyuki Kakiuchi, Hideki Makishima, Manabu Nakayama, Haruhiko Koseki, Yasuhito Nannya, Seishi Ogawa
2. 発表標題 Functional roles of germline and somatic DDX41 mutations in the pathogenesis of myeloid malignancies
3. 学会等名 The 2nd JCA-AACR Precision Cancer Medicine International Conference
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ayana Kon, Masahiro M Nakagawa, Keisuke Kataoka, Nobuyuki Kakiuchi, Hideki Makishima, Manabu Nakayama, Haruhiko Koseki, Yasuhito Nannya, Seishi Ogawa
2. 発表標題 Pathogenic Mechanisms of DDX41 Mutations in the Development of Myeloid Malignancies
3. 学会等名 The 13th JSH International Symposium 2023 in Tsukuba
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ayana Kon, Masahiro M Nakagawa, Keisuke Kataoka, Nobuyuki Kakiuchi, Hideki Makishima, Manabu Nakayama, Haruhiko Koseki, Yasuhito Nannya, Seishi Ogawa
2. 発表標題 Pathogenic Mechanisms of DDX41 Mutations in the Development of Myeloid Malignancies
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ayana Kon, Masahiro M Nakagawa, Keisuke Kataoka, Nobuyuki Kakiuchi, Hideki Makishima, Manabu Nakayama, Haruhiko Koseki, Yasuhito Nannya, Seishi Ogawa
2. 発表標題 Pathogenic Mechanisms of DDX41 Mutations in the Development of Myeloid Malignancies
3. 学会等名 第85回日本血液学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ayana Kon, Masahiro M Nakagawa, Keisuke Kataoka, Nobuyuki Kakiuchi, Hideki Makishima, Manabu Nakayama, Haruhiko Koseki, Yasuhito Nannya, Seishi Ogawa
2. 発表標題 Pathogenic Mechanisms of DDX41 Mutations in the Development of Myeloid Malignancies
3. 学会等名 65th ASH Annual Meeting & Exposition (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ayana Kon, Masahiro M Nakagawa, Azumi Tomita, Keisuke Kataoka, Nobuyuki Kakiuchi, Hideki Makishima, Manabu Nakayama, Haruhiko Koseki, Yasuhito Nannya, Seishi Ogawa
2. 発表標題 Pathogenic Mechanisms of DDX41 Mutations in the Development of Myeloid Malignancies
3. 学会等名 3rd Regional Symposium on Myelodysplastic Syndromes (MDSR 2024)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Ayana Kon, Masahiro M Nakagawa, Keisuke Kataoka, Hideki Makishima, Manabu Nakayama, Haruhiko Koseki, Yasuhito Nannya, Seishi Ogawa
2. 発表標題 Elucidating the mechanism of clonal evolution of DDX41 mutated cells in myeloid malignancies
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ayana Kon, Masahiro M Nakagawa, Keisuke Kataoka, Hideki Makishima, Manabu Nakayama, Haruhiko Koseki, Yasuhito Nannya, Seishi Ogawa
2. 発表標題 Elucidating the mechanism of clonal evolution of DDX41 mutated cells in myeloid malignancies
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ayana Kon, Masahiro M Nakagawa, Keisuke Kataoka, Nobuyuki Kakiuchi, Yotaro Ochi, Hideki Makishima, Manabu Nakayama, Haruhiko Koseki, Yasuhito Nannya, Seishi Ogawa
2. 発表標題 Functional roles of DDX41 mutations in the development of myeloid malignancies
3. 学会等名 27th Congress of EHA (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ayana Kon, Masahiro M Nakagawa, Keisuke Kataoka, Ryosaku Inagaki, Hideki Makishima, Manabu Nakayama, Haruhiko Koseki, Yasuhito Nannya, Seishi Ogawa
2. 発表標題 The molecular pathogenesis of DDX41-mutated myeloid neoplasms
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ayana Kon, Masahiro M Nakagawa, Keisuke Kataoka, Ryosaku Inagaki, Hideki Makishima, Manabu Nakayama, Haruhiko Koseki, Yasuhito Nannya, Seishi Ogawa
2. 発表標題 The molecular pathogenesis of DDX41-mutated myeloid neoplasms
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ayana Kon, Masahiro M Nakagawa, Keisuke Kataoka, Ryosaku Inagaki, Hideki Makishima, Manabu Nakayama, Haruhiko Koseki, Yasuhito Nannya, Seishi Ogawa
2. 発表標題 Functional roles of DDX41 mutations in the development of myeloid malignancies
3. 学会等名 63rd ASH Annual Meeting and Exposition (国際学会)
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
---------	---------