

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893049

研究課題名(和文) 骨髄異形成症候群幹細胞のクローン進展におけるポリコム複合体の役割

研究課題名(英文) The role of polycomb complex on the clonal evolution in myelodysplastic syndrome

研究代表者

小沼 貴晶 (Takaaki, Konuma)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：00709553

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄異形成症候群は、血球減少のみで長期間経過するものから、前白血病状態として発見され、短期間に急性骨髄性白血病に移行するものまで多様である。本研究では、骨髄異形成症候群の病態進展においてエピジェネティック制御の異常が寄与しているかどうかを解析した。主に細胞株では、腫瘍促進に関係するような遺伝子がヒストン修飾により制御されていることが示唆された。これらの過程を制御することは、骨髄異形成症候群の新たな分子標的となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Myelodysplastic syndrome (MDS) has a varied clinical course, with some patients remaining asymptomatic with mild cytopenia for a long time, while others show progressive leukemia a short time after the diagnosis. In the present study, we analyzed whether epigenetic alternation could contribute to the disease progression of MDS. It is suggested that alteration of oncogene expression is regulated by histone modification. This study suggested a new role of epigenetic alternation in the disease progression of MDS and possibilities of these processes as new targets of novel molecular therapy.

研究分野：造血器疾患

キーワード：骨髄異形成症候群 ポリコム

1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群は、難治性の血球減少と骨髄の形態異常を特徴とする骨髄不全症候群の一つである。臨床的には、血球減少のみで長期間経過するものから、前白血病状態として発見され、短期間に急性骨髄性白血病に移行するものまで多様である。その本質は、増殖優位性を獲得した異常な造血幹細胞のクローン性疾患である。これらの細胞は、分化能は保持しているもののアポトーシスが亢進しているために無効造血となる。これら2つの特徴が失われた場合、急性骨髄性白血病に進展するものと考えられている。近年、骨髄異形成症候群症例の SNP アレイや次世代シーケンサーを用いた網羅的ゲノム解析では、がん遺伝子である NRAS や KRAS、がん抑制遺伝子である p53、転写因子である RUNX1 や ETV6 などの遺伝子変異と同様に、DNMT(DNAメチル基転移酵素)3A や TET2、IDH1/2 などの DNA のメチル化制御分子や、EZH2、SUZ12、EED、JARID2 や ASXL1 などのポリコーム複合体であるヒストン修飾制御分子などのエピジェネティクス制御機構の遺伝子変異や欠失が、高頻度に認められることが明らかとなった(Bejar R et al. *N Engl J Med* 364,2496,2011)。さらに、骨髄異形成症候群から急性骨髄性白血病への進展について、全ゲノムシーケンスによるクローン解析では、骨髄異形成症候群の段階でのクローンに遺伝子異常が加わることで、遺伝子変異が蓄積した新たなクローンが出現して、急性骨髄性白血病へ移行することが明らかとなった(Walter MJ et al. *N Engl J Med* 366,1090,2012)。実際、EZH2 や ASXL1 の遺伝子変異は生存に関して独立した予後不良因子であることから(Thol F et al. *J Clin Oncol* 29,2499,2011; Bejar R et al. *J Clin Oncol* 30,3376,2012)、急性骨髄性白血病への進展に寄与している可能性が示唆される。

一方、エピジェネティクスとは、DNA塩基配列の変化を伴わず、細胞形質としての遺伝子の発現パターンが、細胞分裂を経ても娘細胞に忠実に継承される遺伝子発現制御機構であり、これは、個体発生や細胞分化の過程において細胞記憶システムの一つとして機能する。エピジェネティックな遺伝子発現制御においては、DNAメチル化、ヒストン修飾、クロマチンリモデリング因子、microRNAなどが協調して、遺伝子発現を空間的、時間的に制御している。このうち、ポリコーム複合体は、Polycomb repressive complex 1 (PRC1)および PRC2 という巨大な複合体を形成して、ヒストンのN末端領域にメチル化、ユビキチン化などの修飾を介して、標的遺伝子の転写抑制状態を維持している。実際、多くのエピジェネティクス制御機構の遺伝子変異が認められたことから、骨髄異形成症候群の発症メカニズムおよびクローン進展として、がん遺伝子やがん抑制遺伝子の増幅、欠失、変異などのジェネティック

な異常と同様にエピジェネティクス機構の破綻も重要である可能性が推察されている。がん細胞で認められるエピジェネティクス異常は、DNA塩基配列の変化を伴わないため、可逆的であると考えられる。したがって、がん治療の有用な標的となりうる可能性が考えられ、既にいくつかの薬剤が骨髄異形成症候群を含む造血器悪性腫瘍の治療薬として使用されている。DNMT阻害剤である 5-azacytidine (5-Aza-CR) と 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR) は、DNA複製時に DNMT を捕捉することで DNAメチル化を阻害する。これらの DNMT 阻害剤は骨髄異形成症候群に対して承認されており、治療効果を認めた骨髄異形成症候群症例では、癌抑制遺伝子である p15INK4B のプロモーター領域のメチル化が消失していることが確認され、治療効果の一つの指標とされている。また、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤は、ヒストンのアセチル化により抑制されている遺伝子の発現を再活性化することで抗腫瘍効果を発揮する。HDAC阻害剤の中で、Suberoylanilide hydroxamic acids (SAHA) は皮膚T細胞性リンパ腫に対して承認されている。このように、エピジェネティクス機構を標的としたがん治療薬は非常に有用であり、さらなる開発が期待されている。

2. 研究の目的

骨髄異形成症候群は、骨髄不全症候群の一つであり、約30%の症例で急性骨髄性白血病に進展する。近年の網羅的ゲノム解析では、遺伝子変異と同様に DNA のメチル化制御分子や、ポリコーム複合体であるヒストン修飾制御分子などのエピジェネティクス制御機構の遺伝子変異が高頻度に認められる。一方、骨髄異形成症候群から急性骨髄性白血病へのクローン進展では、いくつかの遺伝子異常が加わることで引き起こされる。これらの中にはポリコーム複合体の遺伝子変異も含まれており、ヒストン修飾が変化することで発現異常をきたしている標的遺伝子は明らかではなく、その制御機構の解明や標的遺伝子の同定は、新規の骨髄異形成症候群の病態の新局面を明らかにするものと考えている。また、ヒストン修飾を標的とした治療法は、可逆的であると考えられるため、治療の有用な標的となりうる可能性についても検証する。

3. 研究の方法

骨髄異形成症候群の細胞株および骨髄異形成症候群から移行した急性骨髄性白血病の細胞株から抽出したDNAを用いて、ポリコーム複合体を含むヒストン修飾制御分子の遺伝子変異や欠失の有無を解析する。次に、ポリコーム複合体を含むヒストン修飾制御分子の遺伝子変異や欠失を認める骨髄異形成症候群の細胞株と、変異や欠失を認めない細胞株より total RNA を抽出して、全トランス

クリプトームシーケンシング解析を行う。一方で、ポリコーム複合体は、標的遺伝子のプロモーター領域にトリメチル化されたヒストン H3K27(H3K27me3)修飾やモノユビキチン化されたヒストン H2A(H2Aub1)修飾を導入することで、標的遺伝子の発現を負に制御している。そこで H3K27me3 および H2Aub1 のヒストン修飾抗体を用いたクロマチン免疫沈降シーケンシング(ChIP-sequence)解析を行い、ヒストン修飾の ChIP-sequence 解析のデータと全トランスクリプトームシーケンシング解析のデータと合わせて、ポリコーム複合体による直接発現制御されている標的遺伝子を同定する。

4. 研究成果

骨髄異形成症候群の細胞株を用いて、ヒストン修飾制御分子に遺伝子変異や欠失および発現異常があるかどうかを確認して、その変異や欠失の有無により、エピジェネティックに標的遺伝子の発現制御が行われているかどうかを転写活性化マーカーであるトリメチル化ヒストン H3K4、転写抑制マーカーであるトリメチル化 H3K27 およびモノユビキチン化ヒストン H2A の抗体を用いて、マグネットビーズによるクロマチン免疫沈降の最適な条件を検討した。現在、ヒストン修飾により制御されている標的遺伝子の同定を行っている。また、臨床検体として、骨髄異形成症候群やそこから進展した急性骨髄性白血病の症例の骨髄や末梢血を採取して、これまで報告されているエピジェネティクス制御に関連する遺伝子の遺伝子変異の有無を解析中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 19 件)

1. Konuma T, Takahashi S, Uchida N, Kuwatsuka Y, Yamasaki S, Aoki J, Onishi Y, Aotsuka N, Ohashi K, Mori T, Masuko M, Nakamae H, Miyamura K, Kato K, Atsuta Y, Kato S, Asano S, Takami A, Miyazaki Y; Adult Myelodysplastic Syndrome and Adult Acute Myeloid Leukemia Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Effect of granulocyte colony-stimulating factor combined conditioning in cord blood transplantation for myelodysplastic syndrome and secondary acute myeloid leukemia: a retrospective study in Japan. Biol Blood Marrow Transplant. In press. 査読あり

2. Konuma T, Kato S, Ooi J, Ebihara Y, Mochizuki S, Ishii H, Takei T, Oiwa-Monna M, Tojo A, Takahashi S. Second allogeneic transplantation using

unrelated cord blood for relapsed hematological malignancies after allogeneic transplantation. Leuk Lymphoma. In press. 査読あり

3. Ishii H, Konuma T, Kato S, Ota Y, Tojo A, Takahashi S. Eosinophilic gastroenteritis after allogeneic bone marrow transplantation. Ann Hematol. In press. 査読あり

4. Konuma T, Kato S, Ishii H, Oiwa-Monna M, Asano S, Tojo A, Takahashi S. Long-term outcomes of granulocyte colony-stimulating factor-combined conditioning in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from HLA-identical family donors for myeloid malignancies. Leuk Res. 2015 Jun;39(6):625-31. 査読あり

5. Ueda T, Nagamachi A, Takubo K, Yamasaki N, Matsui H, Kanai A, Nakata Y, Ikeda K, Konuma T, Oda H, Wolff L, Honda Z, Wu X, Helin K, Iwama A, Suda T, Inaba T, Honda H. Fbx110 overexpression in murine hematopoietic stem cells induces leukemia involving metabolic activation and upregulation of Nsg2. Blood. In press. 査読あり

6. Konuma T, Kato S, Ishii H, Takeda R, Oiwa-Monna M, Tojo A, Takahashi S. HLA-DRB1 mismatch is associated with a decreased relapse in adult acute myeloid leukemia after single-unit myeloablative cord blood transplantation. Ann Hematol. 2015 Jul;94(7):1233-5. 査読あり

7. Konuma T, Kato S, Ooi J, Ebihara Y, Mochizuki S, Oiwa-Monna M, Tojo A, Takahashi S. Third allogeneic stem cell transplantation (SCT) using unrelated cord blood for relapsed acute leukemia after second allogeneic SCT. Int J Hematol. 2015 Apr;101(4):392-7. 査読あり

8. Konuma T, Kato S, Yuji K, Ohno N, Uchimaru K, Takahashi S, Tojo A. Clearance of blasts from peripheral blood during induction chemotherapy using exponential decay model predicts complete remission and long-term survival in adult acute myeloid leukemia. Int J Lab Hematol. 2015 Jun;37(3):e59-62. 査読あり

9. Konuma T, Ooi J, Uchida N, Ogawa H, Ohashi K, Kanamori H, Aotsuka N, Onishi Y, Yamaguchi H, Kozai Y, Nagamura-Inoue T, Kato K, Suzuki R, Atsuta Y, Kato S, Asano S, Takahashi S. Granulocyte colony-stimulating factor combined regimen in cord blood transplantation for acute myeloid leukemia: a nationwide retrospective analysis in Japan. Haematologica. 2014 Dec;99(12):e264-8. 査読あり

10. Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Tojo A, Takahashi S. Myeloablative unrelated cord blood transplantation for Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: comparison with other graft sources from related and unrelated donors. *Ann Hematol*. 2015 Feb;94(2):289-96. 査読あり

11. Konuma T, Kato S, Oiwa-Monna M, Tojo A, Takahashi S. Single-unit cord blood transplant for acute lymphoblastic leukemia and lymphoma using an intensified conditioning regimen of total body irradiation, high-dose cytarabine and cyclophosphamide. *Leuk Lymphoma*. 2015 Apr;56(4):1148-50. 査読あり

12. Kato S, Konuma T, Tojo A, Takahashi S. Hemorrhagic hepatic cyst after allogeneic bone marrow transplantation. *Int J Hematol*. 2014 Sep;100(3):214-5. 査読あり

13. Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Kawamata T, Tojo A, Takahashi S. Comparable long-term outcome of unrelated cord blood transplantation with related bone marrow or peripheral blood stem cell transplantation in patients aged 45 years or older with hematologic malignancies after myeloablative conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014 Aug;20(8):1150-5. 査読あり

14. Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Ebihara Y, Mochizuki S, Yuji K, Ohno N, Kawamata T, Jo N, Yokoyama K, Uchimar K, Tojo A, Takahashi S. Impact of sex incompatibility on the outcome of single-unit cord blood transplantation for adult patients with hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant*. 2014 May;49(5):634-9. 査読あり

15. Miyagi S, Koide S, Saraya A, Wendt GR, Oshima M, Konuma T, Yamazaki S, Mochizuki-Kashio M, Nakajima-Takagi Y, Wang C, Chiba T, Kitabayashi I, Nakauchi H, Iwama A. The TIF1-HP1 system maintains transcriptional integrity of hematopoietic stem cells. *Stem Cell Reports*. 2014 Jan 23;2(2):145-52. 査読あり

16. Zimdahl B, Ito T, Blevins A, Bajaj J, Konuma T, Weeks J, Koechlein CS, Kwon HY, Arami O, Rizzieri D, Broome HE, Chuah C, Oehler VG, Sasik R, Hardiman G, Reya T. Lis1 regulates asymmetric division in hematopoietic stem cells and in leukemia. *Nat Genet*. 2014 Mar;46(3):245-52. 査読あり

17. Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Ebihara Y, Mochizuki S, Yuji K, Ohno N, Kawamata T, Jo N, Yokoyama K, Uchimar K, Tojo A, Takahashi S. Effect of ABO blood

group incompatibility on the outcome of single-unit cord blood transplantation after myeloablative conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014 Apr;20(4):577-81. 査読あり

18. Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Ebihara Y, Mochizuki S, Yuji K, Ohno N, Kawamata T, Jo N, Yokoyama K, Uchimar K, Asano S, Tojo A, Takahashi S. Single-unit cord blood transplantation after granulocyte colony-stimulating factor-combined myeloablative conditioning for myeloid malignancies not in remission. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014 Mar;20(3):396-401. 査読あり

19. Konuma T, Kato S, Oiwa-Monna M, Tojo A, Takahashi S. Pretransplant hyperferritinemia has no effect on the outcome of myeloablative cord blood transplantation for acute leukemia and myelodysplastic syndrome. *Ann Hematol*. 2014 Jun;93(6):1071-2. 査読あり

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 小沼貴晶、ほか. 急性骨髄性白血病に対する寛解導入療法における末梢血芽球のクリアランスの臨床的意義. 第 76 回日本血液学会学術集会 大阪 2014.11.1

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
小沼 貴晶 (Takaaki Konuma)
東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：00709553

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：