

研 究 報 告 書
2019 年度：A 課題

2021 年 4 月 22 日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀 田 知 光 殿

研究施設 日本医科大学

住 所 東京都文京区千駄木 1-1-5

研究者氏名 永田 安伸



(研究課題)

骨髄異形成症候群 (MDS) から白血病発症に至るまでのクローニング進化機序の解明

2019年4月1日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたので
ご報告いたします。

【要旨】

骨髓異形成症候群(Myelodysplastic Syndrome: MDS)は血液がんの一種であり、高率に急性骨髓性白血病を発症し予後不良である。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の存在を考慮すると、個々の遺伝子変異の腫瘍発症への役割を同定するのは容易ではない。本研究では、時系列に集積された試料を解析することでクローニング構造を解明し、経時的にどのように腫瘍化が促進され最終的に白血病に進展するのかを明らかにする。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。

【背景】

MDSにおいては複数の遺伝子変異が蓄積することでクローニングが拡大し病勢が進行するモデルが提唱されているが、これまでの論文からアレル頻度が高い遺伝子と低い遺伝子が存在していることが判明している¹。この結果は、多くの腫瘍細胞が有する変異（ドミナント変異）と一部の腫瘍細胞が有する変異（セカンドダリ変異）が混在しているため、初期のクローニング拡大に関わる遺伝子と後期のクローニング拡大（e.g., サブクローニング）に関わる遺伝子が異なる可能性を示唆している。これまでの研究は遺伝子変異の有無と臨床情報との相関に着目していることが多く、クローニング進展に伴う遺伝子変異ランキング（獲得時期）にフォーカスした解析は行われていなかった。

また、複数の遺伝子変異を有する場合、共存や排他など相関関係が報告されていることから、変異の獲得はランダムに起きるわけではなく一定の傾向があることが示唆されてきた。すなわち、最初に獲得される遺伝子変異が造血幹細胞のクローニングの発生を促し、後続しやすい遺伝子変異の選択に関わることでクローニングサイズが拡大、最終的にMDSを発症するモデルが考えられた。例えばMDSで最も高頻度に認められるスプライシング異常に関わる遺伝子において、SRSF2変異はTET2変異を共存しやすく単球が増加する慢性骨髓单球性白血病(CMML)になる一方、SF3B1変異はJAK2変異を共存しやすく血小板増加と環状鉄芽球(RS)を伴う不応性貧血となっていた²。しかしながら、これらの解析では共存・排他関係

のみが判明するのみで遺伝子変異の起きるランキング（e.g., 遺伝子 AB の変異を有する場合、A が先か B が先か）に関する解析が十分にはなされていなかった。そのため、クローン構造を推定し遺伝子変異のランキング付けを行うことで臨床因子に及ぼす影響を評価した。

【結果】

パイクローンと呼ばれる単一細胞シークエンス技術を用いて検証がされているクローン推定法を用いて 1,809 症例の MDS に対してクローン推定を行い遺伝子変異の序列に関する解析をおこなった³。次世代シークエンサーによる標的シークエンシングを行うことで 3,971 個の変異が同定され、これらがクローン構造の推定に用いられた。859 症例が複数クローンを有しておりクローンを 2 個有する症例が 512 例、3 個が 226 例、4 個以上は 121 例であった。代表的な症例を提示する。（図 a）最も大きなクローンの形成に関わる変異をドミナント変異、それ以外の小クローンに関わる変異をセカンダリ変異と定義し、それぞれの変異がクローン進展とともにどのように腫瘍進展に関わるのか解析を行った。2,155 個のドミナント変異と 1,816 個のセカンダリ変異に二分化され、平均のコピー数補正後のアレル頻度は 40.6% と 19.4% であった。それぞれ遺伝子に着目したところ、*SF3B1*, *U2AF1*, *TP53*, *DNMT3A*, *IDH2*, *SRSF2*, *TET2* は有意にドミナント変異になりやすく、*ASXL1*, *JAK2*, *CBL*, *KRAS* は有意にセカンダリ変異になりやすかった（図 b）。また、ドミナント変異とセカンダリ変異の共存排他関係に着目したところ有意な 37 ペア（30 個の共存と 7 個の排他）が同定された（図 c）。例えばドミナント *TP53* 変異を有する症例は有意にセカンダリ *TP53* 変異を共存し両アレルヒットを引き起こす一方、セカンダリ *ASXL1* 変異が排他関係であったことから *ASXL1* 変異はクローン進展に寄与していない可能性があった。ドミナント *SF3B1* 変異はセカンダリ *JAK2* 変異と共存関係にあったが、ドミナント *JAK2* 変異はセカンダリ *SF3B1* 変異と有意な相関を示さず、*SF3B1* 変異が最初に獲得され *JAK2* 変異が後から獲得されるランキングが提唱された。

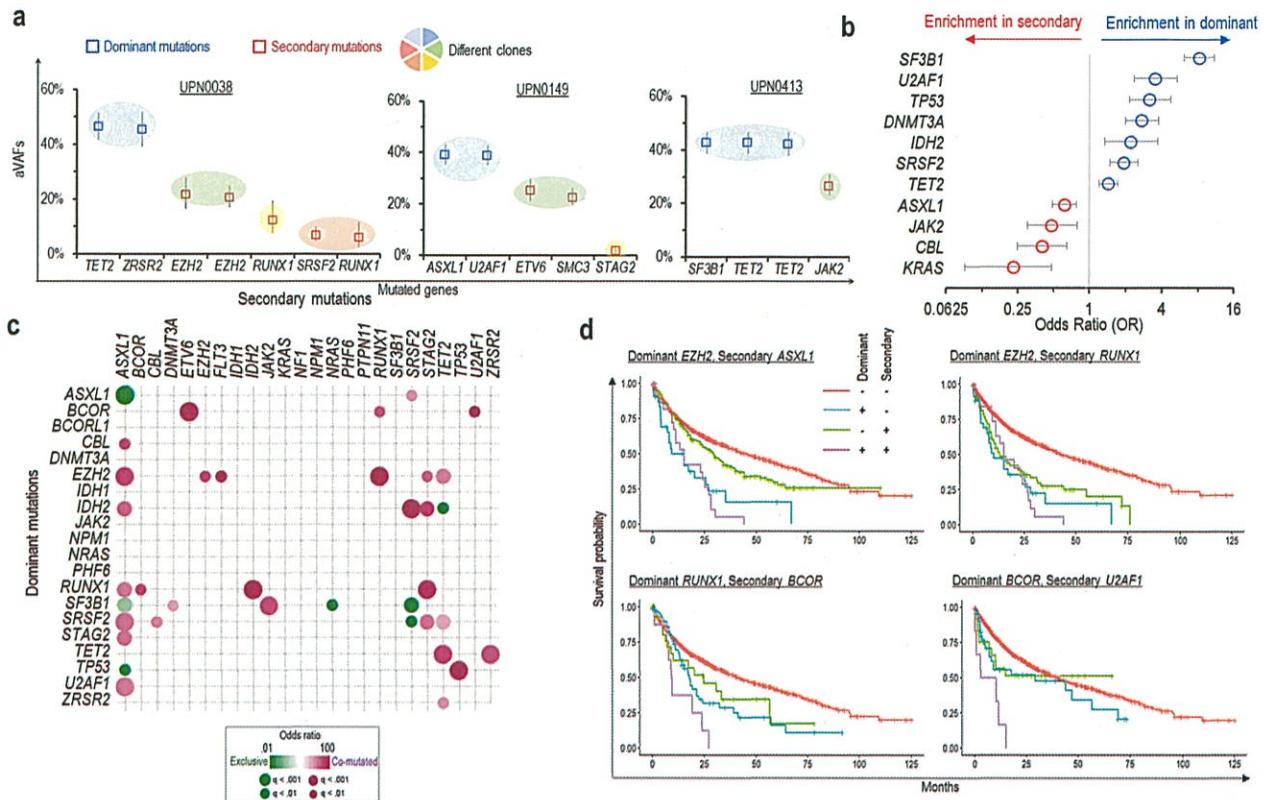


図. ドミナント/セカンダリ変異の特徴

a: 代表的な3症例のクローニングモデル。y軸にコピー数補整後の変異アレル頻度、x軸に変異遺伝子。青でドミナント変異、赤でセカンダリ変異が記されている。パイクローン法で推定されたクローニングは異なる色の円で描出されている。b: オッズ比と95%信頼区間、ドミナント変異に有意になりやすい遺伝子は青、セカンダリ変異になりやすい遺伝子は赤でそれぞれ結果が描出されている。c: ドミナント変異とセカンダリ変異の相関。37個の有意なペアが描出されており、共存はマゼンタ、排他は緑で示されている。円の大きさは多重検定で補整後のP値、色の濃さは相関係数をそれぞれ示している。d: 生存曲線。ドミナント変異、セカンダリ変異を共存する症例、いずれかを有する症例、どちらも持たない症例の4群が描出されている。グラフの上に遺伝子が記されている。

次にこのような変異のランキングが臨床転機に及ぼす影響について評価を行った。TET2やSRSF2はMDS/MPNで高リスクであるCMMLにおいて高頻度に変異が認められるが、クローニング構造に着目したところ、TET2が最初の変異となり引き続いてSRSF2変異を獲得している症例において表現型がより顕著であった。SRSF2変異が最初でTET2変異が後の場合はCMMLへの進展に有意差を認めず、この順番で変異を獲得することが非常にCMMLの病態形成には重要であることが示唆された。これら以外の有意であった共存排他関係に着目したところ、12ペアが有意に白血病への進展のリスクに関わっていた。例えばドミナントRUNX1変異を有する症例はセカンダリIDH2, STAG2, ASXL1変異を獲得しやすくなり高リ

スク MDS である RAEB に進展していた。一方、ドミナント *SF3B1* 変異を有する症例はセカンダリ *DNMT3A* 変異を獲得しやすかったが有意に低リスク MDS と関連していた。生存解析の結果、共存する 9 ペアが有意に予後に関わっていた。予後はドミナント *EZH2* 変異により悪化しているが、セカンダリ *ASXL1* 変異を獲得することでさらに増悪しており、これら二つの遺伝子変異が協調関係に働くことで病勢の進展を導いていることが示唆された（図 d）。ドミナント *BCOR* 変異、セカンダリ *U2AF1* 変異はいずれも単独の異常では予後に影響を及ぼさなかつたが、両方をペアで有する症例は極めて予後不良であった。また、MDS における標準治療の一つであるメチル化阻害剤の治療反応性についても検討をおこなった。メチル化阻害剤で治療が行われ国際ワーキンググループの基準を用いて治療判定（反応群 vs. 非反応群）が可能であった 179 症例が解析対象となった。*TET2* 変異があると反応しやすく、*ASXL1* 変異があると治療抵抗性となることが既知であったため、今回の解析はこの二つの遺伝子にフォーカスした。ドミナント *TET2* 変異は治療反応性と関連していたがセカンダリ *TET2* 変異では消失していた。一方、ドミナント *ASXL1* 変異では治療抵抗性とは関連を認めなかつたが、セカンダリ *ASXL1* 変異を有する症例は治療抵抗性であった。

【謝辞】

がん研究振興財団、がん研究助成事業を基に本研究は実査されたものであり、厚く御礼申し上げます。本研究の遂行にあたりご協力をいただきましたすべての研究者、検体を提供頂きました患者様とご家族、すべての方にこの場をお借りし深く感謝申し上げます。

【参考文献】

1. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2014;28(2):241-247.
2. Nagata Y, Maciejewski JP. The functional mechanisms of mutations in myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. 2019.
3. Nagata Y, Makishima H, Kerr CM, et al. Invariant patterns of clonal succession determine specific clinical features of myelodysplastic syndromes. *Nat Commun*. 2019;10(1):5386.