

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年度

受付番号 201860314

氏 名

永田 安伸

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： オハイオ州クリーブランド （国名： 米国 ）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。
骨髄異形成症候群（MDS）におけるクローン進化機序の解明
3. 派遣期間： 平成 30 年 4 月 1 日 ～ 令和 2 年 3 月 31 日
4. 受入機関名及び部局名
クリーブランドクリニック、Department of Translational Hematology & Oncology Research

も可)

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

【1. 研究実施状況】

1) MDS 細胞におけるクローン進化の解析

2018 年 4 月から 2020 年 3 月までの期間に派遣先であるクリーブランドクリニックにおいて、これまで日本で培ったゲノム異常に関する知見をもとに合計 1,809 例の骨髄異形成症候群 (MDS) 患者の遺伝子変異データを解析した。申請者はこれまでの解析から、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。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性の存在を考慮する、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。造血幹細胞に体細胞性変異が起きることでクローン化し、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 (図 1)。

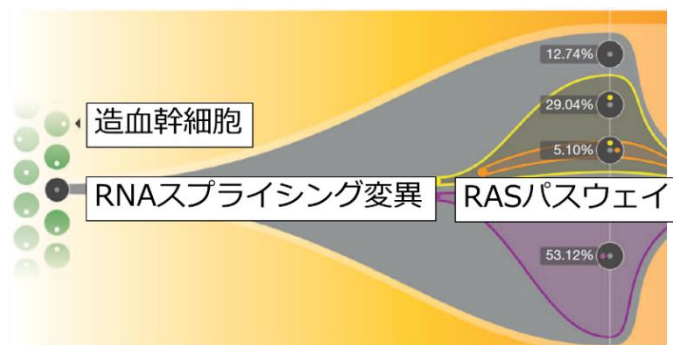


図1. MDSにおける段階的な遺伝子変異の獲得とクローン進化の多様性

1,809 症例の MDS データには年齢、性別、病型や予後などの臨床情報が付随しており、遺伝学的異常とこれらを融合することが可能であった。骨髄系腫瘍で高頻度に変異が認められた 36 個の遺伝子に関して標的シーケンスを行った。平均して 862 回の読み取り深度があり、エラーや多型を取り除き最終的に 3,971 個の体細胞性変異が同定された。また、1,782 症例 (98.5%) に関して、染色体検査、マイクロアレイ、デジタルコピー数解析を行い、染色体レベルでのコピー数増加、欠失、ヘテロ接合性の喪失 (Loss Of Heterozygosity (LOH))、片親性ダイソミー (Uniparental disomy (UPD)) を明らかにした。10% 以上の高頻度な遺伝学的異常として *TET2*, *SF3B1*, *ASXL1*, *1del(5q)*, *SRSF2*, Complex Karyotype, *del(7q)* が同定された (図 2a)。2% 以上の症例に認められた異常は 30 個であった。次に、遺伝子変異の種類に着目した。*TET2* 変異はタンパクが切断される切断型変異と一塩基置換に伴い 1 アミノ酸が変化するミスセンス型変異に大きく分類される。*DNMT3A* は 882 番目のアルギニン (R) に変異が集中することが知られているが、他の箇所にも異なる変異が生じる。このよう

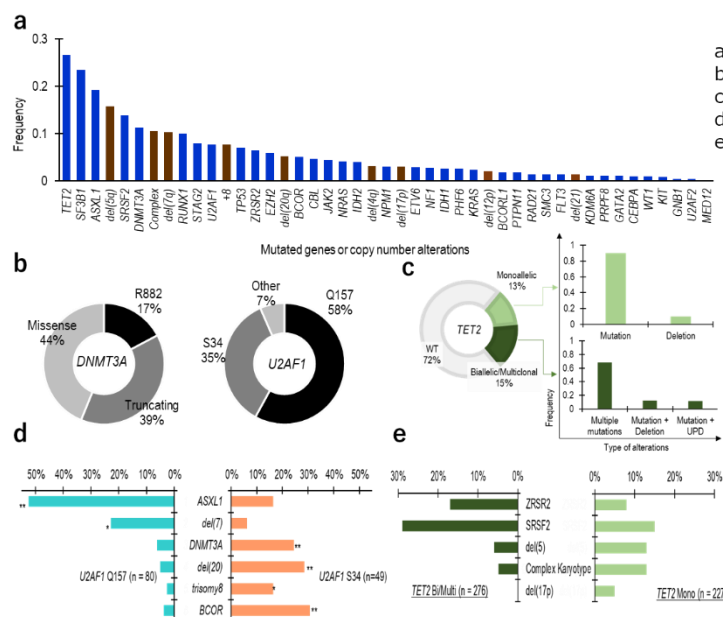


図2. MDSにおける異なるタイプ毎の遺伝子異常の特徴

に遺伝子単位で異なる変異のパターンに着目しそれらが MDS に及ぼす影響について評価した。複数の異なる遺伝子パターンが混在している 12 個の遺伝子について、評価した。*DNMT3A* 変異は R882 (17%)、切断型 (39%)、ミスセンス型 (44%) に分類された(図 2b)。同様に、*U2AF1* 変異の変異集中箇所は Q157 (58%) と S34 (35%) であり、*SRSF2* 変異は P95 のミスセンス型 (84%) と切断型 (16%) であった。

次に、パイクロン法を用いてクローン構造の推定を行った。対立遺伝子頻度、コピー数、およびヘテロ接合性の喪失 (LOH) 情報を使用して、がん細胞集団における変異の細胞頻度パターンを推定するための階層ベイズ統計モデルを実装するソフトウェア

であり、シングルセルシーケンス法で解析結果の検証が得られている手法である。859 症例において複数クローンが推定された。621 例においては、単一クローンと判定された。遺伝子変異はそれらが存在しているクローン毎に 2 群に分けられ、最大サイズのクローンに属する変異はドミナント変異、それ以外の小さなクローンに属する場合はセカンダリ変異として以降の解析に使用された。(図 3) 1,809 症例に同定された 3,891 個の遺伝子変異は、2,155 個のドミナント変異、1,816 個のセカンダリ変異に分類され、平均のアレル頻度は 40.6%と 19.4%であった。遺伝子ごとに頻度を比較したところ *SF3B1*, *U2AF1*, *TP53*, *DNMT3A*, *IDH2*, *SRSF2*, *TET2* は有意にドミナント変異であり、*ASXL1*, *CBL*, *JAK2*, *KRAS* はセカンダリ変異であった (図 4a,b.)。これらの結果は、獲得される遺伝子異常はランダムに起きるのではなく、特定のルールが存在していることを示唆すると考えられた。初めに特定の遺伝子に異常が起きることでクローンが拡大し、特別な組み合わせの遺伝子異常が蓄積されることでがん化がさらに進行するモデルが裏付けされた。そのため、ドミナント変異とセカンダリ変異の組み合わせ (ペア) について、相関関係を調査した。統計解析の結果、37 ペアが有意な相関を示し、30 個が協調関係、7 個が排他関係であった。例えば、*TP53* ドミナント変異は有意に *TP53* セカンダリ変異と協調し両アレル異常になっている一方、*ASXL1* セカンダリ変異とは排他し、有意に共存しにくくなっていた。*EZH2* ドミナント変異はセカンダリ変異として *ASXL1* や *RUNX1* と協調していた。これらの遺伝子異常が蓄積することで臨床病態に影響を及ぼすのか生存解析を行った。するとこれらのペアを有する患者群は変異無し、もしくははいずれかの遺伝子異常を持つ患者群に比べ予後不良であった。この結果は特定の遺伝子異常のペアがそれぞれ協調してがん化に関わっていることを明らかにした。

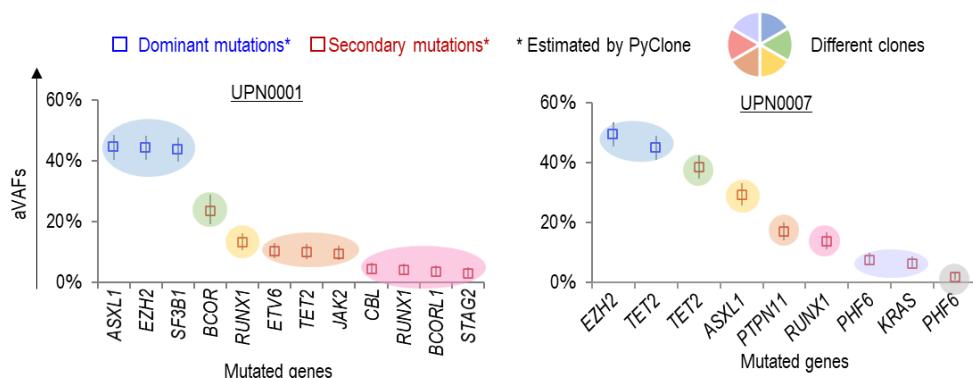


図3. 代表的な2症例のクローン構造

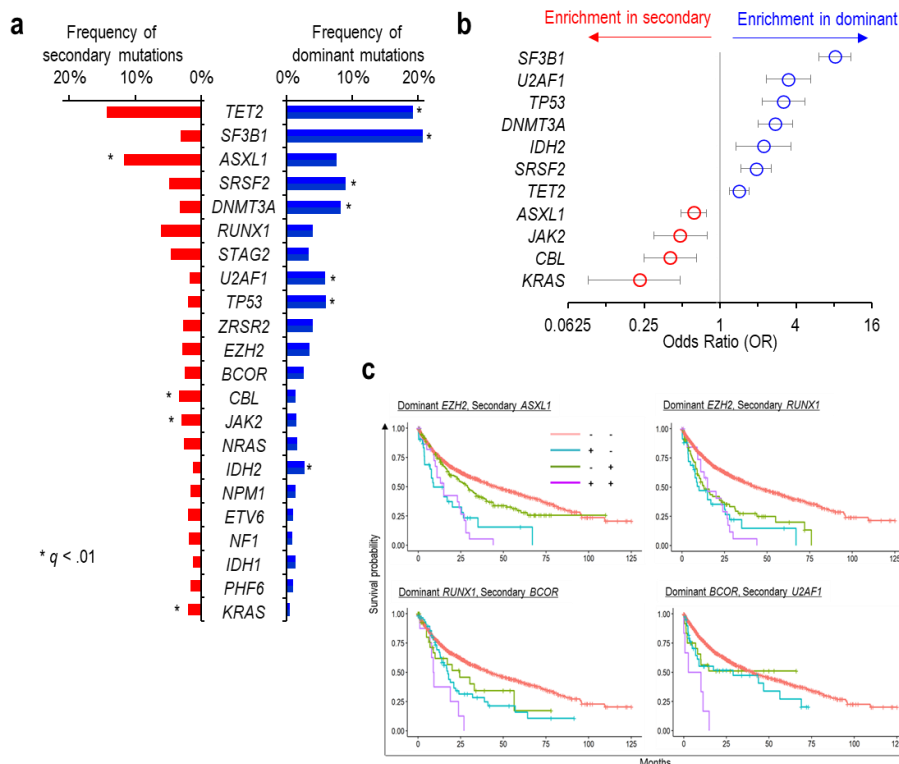


図4. ドミナント変異とセカンダリ変異の比較

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。具体的には、成人 MDS 症例に関して、皮膚や T リンパ球など MDS クローンが含まれていない胚細胞をソートし、標的シーケンス法を用いて遺伝子異常の有無を網羅的に解析した。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。網羅的な胚細胞性変異解析を行い、体細胞性変異との相関関係を明らかにすることで、造血クローンの多様性を解析する手法は申請者が独自に開発した方法であり、MDS の分子病態の解明に非常に大きな意味を持つ。成人 MDS799 症例に対してこれらの手法を用いて解析を行い、*SAMD9/SAMD9L* 遺伝子に胚細胞多型が認められた。26 個の多型が 24 症例(3%) に認められた。得られた多型は人種を加味した健常人コントロールにおいて 0.1%以下と低頻度であり、これまで報告のある小児 MDS とは重複が認められなかった。これらの多型は N 末に集中しており、特異な分布であると考えられた。これらの変異体を作成し細胞株に投与したところ、野生型と比較し有意に細胞生存を変化させたことから、これらの多型が *SAMD9/SAMD9L* の機能を変化させ腫瘍化に関わることが明らかとなった。

【2. 成果の発表・関係学会への参加状況】

これらの結果は 2018 年 12 月に開催された米国血液学会学術集会 (ASH annual meeting) にて発表された。また、これらの成果は、受入研究施設内で執り行われたポストドクトラルフェロー対象の The Alumni Association Career Development Postdoctoral Fellow Award 受賞につながった。

1) の結果は、*Nature Communications* 誌に、2) の結果は *Blood* 誌にそれぞれ論文として採択された。

1) Invariant patterns of clonal succession determine specific clinical features of myelodysplastic syndromes. **Nagata Y**, Makishima H, Kerr CM, Przychodzen BP, Aly M, Goyal A, Awada H, Asad MF, Kuzmanovic T, Suzuki H, Yoshizato T, Yoshida K, Chiba K, Tanaka H, Shiraishi Y, Miyano S, Mukherjee S, LaFramboise T, Nazha A, Sekeres MA, Radivoyevitch T, Haferlach T, Ogawa S, Maciejewski JP. *Nature Communications*. 2019 Nov 26;10(1):5386. doi: 10.1038/s41467-019-13001-y.

2) Germline loss-of-function *SAMD9* and *SAMD9L* alterations in adult myelodysplastic syndromes. **Nagata Y**, Narumi S, Guan Y, Przychodzen BP, Hirsch CM, Makishima H, Shima H, Aly M, Pastor V, Kuzmanovic T, Radivoyevitch T, Adema V, Awada H, Yoshida K, Li S, Sole F, Hanna R, Jha BK, LaFramboise T, Ogawa S, Sekeres MA, Wlodarski MW, Cammenga J, Maciejewski JP. *Blood*. 2018 Nov 22;132(21):2309-2313. doi: 10.1182/blood-2017-05-787390.

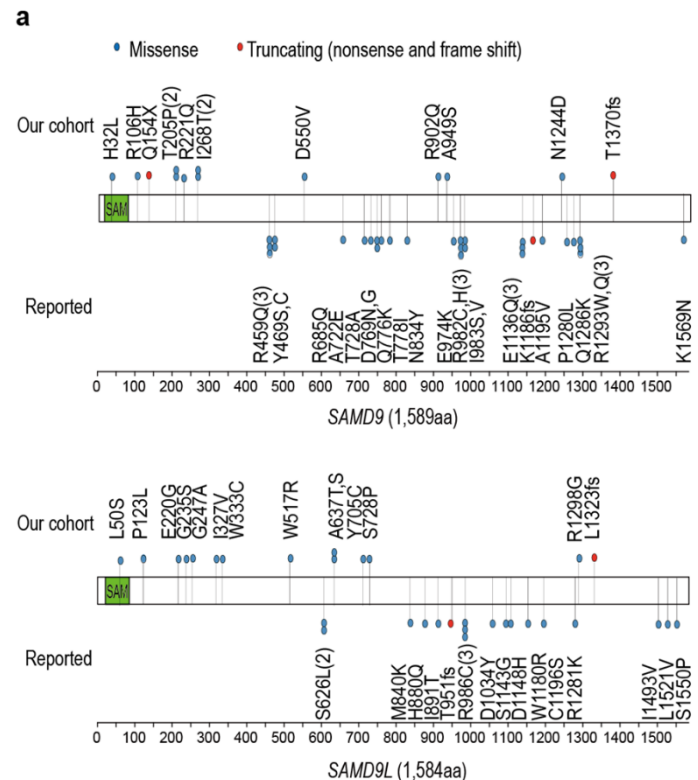


図5. *SAMD9/SAMD9L*胚細胞性多型