

骨髓異形成症候群の病初期におけるクローン進化の同定

Elucidation of clonal architecture in the early stage of myelodysplastic syndromes

京都大学
派遣期間
研究機関

永田 安伸
2016年4月1日 ~ 2017年3月31日
Department of Translational Hematology and Oncology Research
at the Taussig Cancer institute, Cleveland Clinic, Cleveland,
OH 44195, United States
Prof. Jaroslaw Maciejewski

研究指導者

Targeted and unbiased next generation sequencing (NGS) has contributed to a better understanding of the molecular pathogenesis of myeloid neoplasms, including myelodysplastic syndromes (MDS). MDS is a disease continuum characterized by a wide spectrum of often overlapping lesions that determine phenotype, while also serving as initiation and progression events. To delineate clonal dynamics of the early stage in MDS, we focused on aplastic anemia (AA). Because transient and low frequency clones have been described in AA, their pathophysiologic link to the overtly clonal complication of AA, secondary MDS following AA (sMDS). The etiology of sMDS within AA may include either expansion of a preexisting clone or truly late clonogenic events. We studied 300 AA and PNH patients, identifying 35 patients (11%) who evolved to sMDS. When these mutational spectrums were assessed, clonal hematopoiesis were shaped by multiple rounds of acquisition of new mutations and clonal selection with progression of anemia and neutropenia. Our results demonstrate that i) subclonal mutations indicative of oligoclonal hematopoiesis are frequent in AA, ii) the presence of specific permissive ancestral somatic events at the outset of AA predisposes patients to sMDS. Detailed understanding of such clonal dynamics and hierarchical complexity may have clinical significance.

研究の背景・目的・方法

がんは遺伝子の異常によって引き起こされる疾患であり、その起源となる細胞が変異を獲得し次の子孫細胞に引き継がれ増殖していく特徴がある。クローン選択を受けた細胞集団が腫瘍を形成し拡大することで通常の身体機能を損なうため、抗がん剤や放射線といった様々な治療が施される。血液がんの一つである骨髓異形成症候群 (Myelodysplastic syndromes, MDS) は、白血球、赤血球、血小板が減少する汎血球減少と急性骨髄性白血病 (Acute myeloid leukemia, AML) への移行を特徴とする治療抵抗性の骨髄性腫瘍であり、原因・治療反応性・予後の異なる多様な病態が含まれる不均一な疾患群である。次世代シーケンシング技術の発展によりスプライシングや DNA のメチル化に関わる異常ががんの

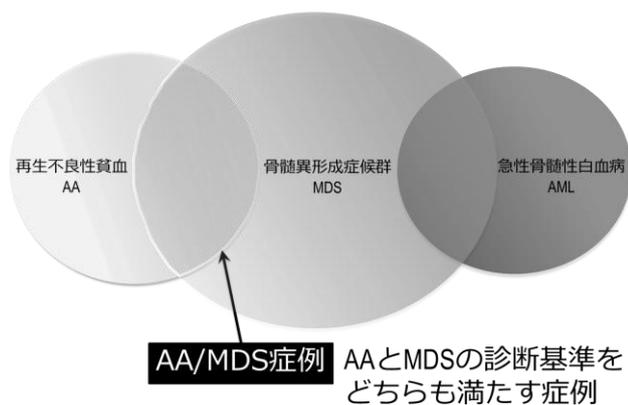
発症に関わることが明らかとなった。これまでの報告によると、平均して約 10 個の体細胞変異が MDS の病態に関与していた。しかし、これらの遺伝学的異常がどのような順序で獲得されクローン化し最終的に MDS の発症に関わるのか、その詳細な分子メカニズムは明らかとなっていない。

そこで本研究では「MDS の病初期に起きる遺伝学的異常の探索」を研究の主目的とした。これまでの多くの研究は臨床的に MDS と診断されるまで進行した症例のみが解析対象であった。すなわち正常造血から潜在的な MDS 前段階を経て、最終的に MDS を発症するまでの間にどのような遺伝子異常が獲得されるのか解明されていない。MDS 発症時に同定される多数の変異の内、発症初期のクローン拡大に直接影響を及ぼす遺伝子異常がいずれかは明らかとな

っておらず、MDS の病初期におきる遺伝学的異常の探索により極早期の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した。

MDS 発症率は年間 10 万人あたり約 5 人である。そのため、健常人を MDS 発症するまでの期間追跡し解析することは現実的には不可能である。そのため、効果的に研究を進める目的で申請者は MDS と関連する血液疾患である再生不良性貧血 (Aplastic Anemia, AA) に着目した。AA は汎血球減少と骨髄不全を特徴とする良性の血液疾患であるが、診断後 10 年で約 20% が MDS や AML などの骨髄系腫瘍を合併することが知られている (図 1)。興味深いことに AA において、6 番染色体短腕を中心としたコピー数異常が 15% に認められ、骨髄系腫瘍と共通する遺伝子変異も報告されていることからクローン造血の存在が示唆されている。AA 症例で MDS を発症するまでの期間、遺伝学的異常の解明を行い高感度に腫瘍クローンを同定する。

図1：骨髄異形成症候群とその重複疾患



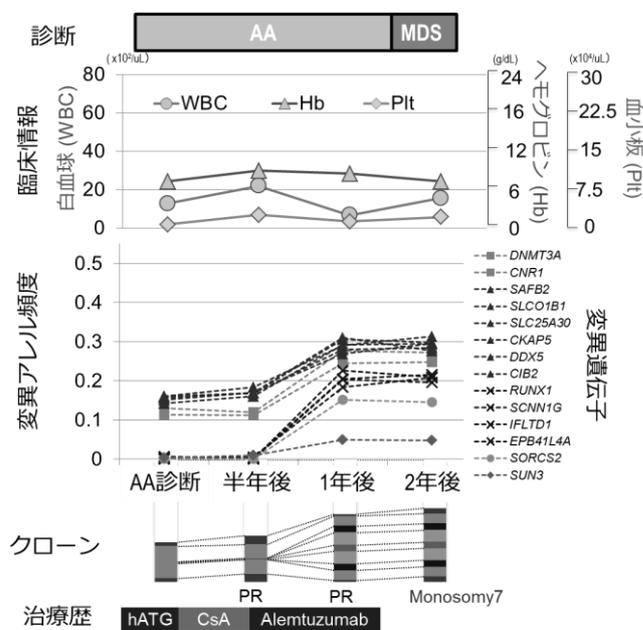
研究経過

AA 患者の末梢血中から特異抗原ビーズを用いて顆粒球と T リンパ球に分離しこれらをペアで解析を行った。抽出された DNA はアジレント社の Sureselect システムを用いて全エクソン領域を濃縮し、次世代シーケンサーであるイルミナ社の HiSeq を用いて全エクソン解析された。正常コントロールとして T リンパ球を用いることで顆粒球に特異的な遺伝子異常を高感度に同定することができた。AA 診断時から MDS 発症までに毎年保存されている採取細胞について解析を行い、年単位でのクローン進展の詳細に解析した。さらにディープシーケンス解析を追加することで、得られた変異のアレル頻度

を正確に決定した。それらにより、腫瘍クローンの拡大や縮小の有無を正確に評価可能であった。代表的な結果を下記に示す (図 2)。

AA は、自己免疫機序が病気の原因の一つであり免疫抑制剤により治療効果がある。一方、MDS は DNA メチル化の異常が病態に関わり、メチル化阻害剤により治療効果がある。すなわち、診断によって治療方法が大きく異なるため、どちらの病型に分類されるのかを正確に診断することは極めて有用性が高い。一部の AA 症例は、MDS と非常に臨床的特徴が似通っていることから鑑別が困難である。このような検体については変異解析を追加することで、遺伝子異常や造血クローンの有無を明らかにした。結果として AA と MDS をより鋭敏に分類可能であった。

図2. AA発症からMDS進展までの時系列解析結果の1例



考察

これまで健常人が、正常な造血状態から MDS を発症するまでの期間において、遺伝学的異常を時系列に解析した報告は無い。AA 発症から MDS に進展するまでを時系列で解析することにより、獲得された遺伝子変異がどのようにしてクローン拡大に関わっているのかを明らかにした。この点が本研究の最も大きな特色であった。国内の一般的な施設では MDS を発症するまでの長期間に渡り検体を追試できる症例を選択することは困難であった。AA 診断から MDS 発症まで複数年に渡る時系列検体や

大規模の AA/MDS 検体を集積している受入研究施設と近年の申請者が蓄積した次世代シーケンス解析技術を融合させることによって初めて可能となる独創的な研究であった。

研究の発表

口頭発表

1. Yasunobu Nagata, Hideki Makishima, Tomas Radivoyevitch, Cassandra M. Hirsch, Bartlomiej P. Przychodzen Teodora Kuzmanovic, Samuel Li, Kenichi Yoshida, Tetsuichi Yoshizato, Vera Adema, Eiju Negoro, Michael J. Clemente, Naoko Hosono, Yuichi Shiraishi, Kenichi Chiba, Hiroko Tanaka, Sudipto Mukherjee, Aziz Nazha, Francesc Sole, Hetty E. Carraway, Satoru Miyano, Thomas LaFramboise, Mikkael A. Sekeres, Seishi Ogawa and Jaroslaw P. Maciejewski, 「Landscape of Subclonal Mutations in Myelodysplastic Syndromes (MDS) Allows for a Novel Hierarchy of Clonal Advantage By Combining Germline and Somatic Mutations」, December 2016, 58th American Society of Hematology Annual Meeting & Exposition,

誌上発表

1. 該当無し