

論文の内容の要旨

論文題目 骨髄異形成症候群における transposable element の解析

氏名 黒澤修兵

骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndrome, MDS) は主に高齢者に発症する血液悪性腫瘍であり、異常な造血幹細胞の増殖と分化による血液形態の異形成、無効造血と呼ばれる病的アポトーシスを特徴とする。正常な血液細胞の減少に伴う易感染、貧血、出血傾向といった臨床症状を呈し、急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia, AML) へ移行するリスクも併せ持つ。

MDS 発症の主な原因は、造血幹細胞の後天的な遺伝子異常の獲得であり、近年の次世代シーケンズ解析によって様々な遺伝子変異が明らかになっている。中でも DNMT3A、TET2、ASXL1、EZH2 といったエピジェネティック遺伝子の変異が MDS で高頻度に同定されており、DNA メチル化やヒストン修飾といったエピジェネティックな転写制御の破綻が MDS の病態に重要な役割を果たすと考えられている。

MDS の予後は不良であり、国際予後スコアリングモデル revised international prognostic scoring system (IPSS-R) の中間リスク群でも診断後の生存期間は 3 年と報告されている。唯一の根治療法は造血幹細胞移植であるが、一部の症例は再発し、移植関連合併症による非再発死亡や生活の質低下の課題も抱えている。近年根治療法ではないが、DNA メチル化阻害薬の有効性が報告されており、実臨床で幅広く使用されている。

Transposable element (TE) はゲノム内を転移する性質をもつ塩基配列であり、ヒトゲノムの約半分を占めている。TE は transposase を利用して cut-and-paste で転移する DNA-only transposon と、逆転写酵素によって相補的 DNA を合成することで copy-and-paste で転移する retrotransposon に大別される。後者は、末端に反復配列 long-terminal repeat (LTR) を持つ retroviral-like retrotransposon と、LTR を持たない nonretroviral retrotransposon に分類される。Retroviral-like retrotransposon は過去のウイルス感染の痕跡と考えられており、retrovirus に似た構造を有する。Nonretroviral retrotransposon の代表例は long interspersed nuclear element (LINE) に属する LINE-1 や、short interspersed nuclear element (SINE) に属する Alu、SINE/VNTR/ALU (SVA) である。LINE-1 はエンドヌクレアーゼ遺伝子と逆転写酵素遺伝子を有するのに対して、Alu や SVA は固有のそれらを持たず、LINE-1 からコードされたタンパク質を借用して転移すると考えられている。

生命進化の過程で TE のほとんどは転移の際の不完全な逆転写や変異挿入によって転移活性を失い、ヒトでは LINE-1、Alu、SVA の数十コピーのみが転移活性を保持しており、それらも通常 DNA メチル化などのエピジェネティックな制御によって発現が抑制されている。しかし転移の役割とは別に、TE はタンパク質を発現しており、胎盤における栄養膜細

胞の形成、DNA メチル化やヒストン修飾、クロマチン・アクセシビリティ、インターフェロン応答、抗ウイルス免疫、細胞老化といった様々な生理現象に関与している。

悪性腫瘍の病態においても TE が関与することが報告されている。血液悪性腫瘍においては AML や悪性リンパ腫の原因遺伝子を TE が活性化することが報告されているが、一方で血液悪性腫瘍の治療薬である DNA メチル化阻害薬が TE の活性化を利用して抗腫瘍効果を発揮することも報告されている。しかしながら、MDS の病態と TE の関連性に関しては未だ不明な点が多い。そこで本研究では MDS もしくは AML 患者の骨髄検体から幹細胞と前駆細胞を純化し、RNA シークエンス解析を行い、TE の発現変動の詳細を検証した。

患者数は 32 例で、それぞれ診断時の骨髄検体を入手した。年齢の中央値は 78 (37–87) 歳、男性は 22 例 (68.8%) だった。WHO 分類第 4 版改訂版による病期分類では、白血球芽球増加を伴わない MDS with multilineage (MDS-MLD) 13 例 (40.6%)、白血球芽球増加を伴う MDS with excess blasts (MDS-EB) 15 例 (46.9%)、急性白血病に進展した AML with myelodysplasia-related changes (AML-MRC) 4 例 (12.5%) であった。国際予後スコアリングモデル IPSS-R は Very low 1 例 (3.1%)、Low 5 例 (15.6%)、Intermediate 8 例 (25.0%)、High 9 例 (28.1%)、Very high 9 例 (28.1%) だった。ターゲットシークエンスで 2 例以上で検出された遺伝子変異は、ASXL1 変異 7 例 (21.9%)、TP53 変異 7 例 (21.9%)、RUNX1 変異 7 例 (21.9%)、DNMT3A 変異 5 例 (15.6%)、TET2 変異 4 例 (12.5%)、EZH2 変異 3 例 (9.4%)、SRSF2 変異 3 例 (9.4%)、ZRSRF2 変異 3 例 (9.4%)、CBLC 変異 2 例 (6.3%) だった。比較群として健常人 (normal bone marrow, NBM) 4 例の骨髄検体を入手した。年齢の中央値は 33.5 (31–44) 歳、男性は 2 例 (50.0%) だった。

RNA シークエンスによる発現差異解析で、転写産物のアノテーションに使用した RepeatMasker は、TE を 21 種類の repClass、56 種類の repFamily、1395 種類の repName に分類している。各 repName は更に複数の ID を有しており、様々な領域に散在している。MDS 幹細胞と前駆細胞ごとに発現差異解析を行い、NBM コントロールと比較して発現が変動していた TE を探索した。repClass の階層では LTR が最も多く発現変動していた。NBM を基準とした発現量変化 (\log_2 fold-change [FC]) を、DNA、LINE、LTR、SINE 間で比較したが、4 者の中で LTR の \log_2 FC が最も変動していた。以降の解析では LTR に着目して行った。

NBM に対する MDS-MLD、MDS-EB、AML-MRC の発現差異解析で有意に変動していた LTR (repName) を調べたところ、幹細胞と前駆細胞の両方で発現上昇していた LTR37B、LTR3B_、両方で発現低下していた LTR13A を除いて、幹細胞と前駆細胞で変動していた LTR (repName) は異なっていた。幹細胞もしくは前駆細胞で発現変動していた repFamily はいずれも ERV1 が最も多く、幹細胞で発現上昇していた LTR の 60.9% (n = 14)、発現低下していた LTR の 40.0% (n = 2)、前駆細胞で発現上昇していた LTR の 53.3% (n = 8)、発現低下していた LTR の 60.0% (n = 3) を占めていた。LTR (repName) の normalized count に基づく各サンプルごとの主成分解析を行ったところ、幹細胞と前駆細胞ともに、LTR

(repName) の発現パターンは MDS-MLD、MDS-EB、AML-MRC を層別化しなかった。また IPSS-R スコアの違いによる層別化はみられなかった。以上より、MDS 幹細胞と前駆細胞で発現変動する LTR (repName) の発現パターンは MDS 病型を層別化するような有意な差がないことが示された。

先の記述で述べたように、各 repName は複数の個別領域 (ID) を有しており、様々な領域に散在している。repName ごとの解析では LTR の発現パターンは MDS-MLD、MDS-EB、AML-MRC を区別しなかったため、続いて個別領域ごとの解析を行った。NBM に対する MDS-MLD、MDS-EB、AML-MRC の発現差異解析で有意に変動していた LTR (個別領域) を調べたところ、repName ごとの結果と似たように、MDS 幹細胞と前駆細胞の両方で 881 領域が発現上昇しており、121 領域が発現低下していたが、他の領域は MDS 幹細胞もしくは前駆細胞特異的に変動していた。repName ごとの結果と異なり、幹細胞もしくは前駆細胞で発現変動していた repFamily はいずれも ERVL-MaLR が最も多く、幹細胞で発現上昇していた LTR の 46.5% (n = 1446)、発現低下していた LTR の 51.6% (n = 642)、前駆細胞で発現上昇していた LTR の 47.2% (n = 991)、発現低下していた LTR の 51.4% (n = 93) を占めていた。LTR (個別領域) の normalized count に基づく各サンプルごとの主成分解析を行ったところ、repName の発現パターンと異なり、個別領域の発現パターンでは AML-MRC の幹細胞は独立したクラスターを形成した。IPSS-R スコアの違いによる層別化はみられなかった。

LTR (個別領域) の normalized count において、AML-MRC は主成分解析で独立したクラスターを形成したが、LTR がどのように変動しているか検証するため、MDS-MLD、MDS-EB、AML-MRC における NBM を基準とした LTR (個別領域) の発現量変化を log₂ fold change (FC) で比較した。幹細胞で発現上昇していた LTR は、MDS-MLD と MDS-EB に比較して AML-MRC で、log₂ FC が有意に高かった。また幹細胞と前駆細胞で発現低下していた LTR は、MDS-MLD と MDS-EB に比較して AML-MRC で、log₂ FC が有意に低かった。これらの結果は MDS から AML への進行が LTR の発現上昇もしくは低下と関連している可能性を示唆した。

LTR の発現パターンは MDS-MLD と MDS-EB を区別せず、IPSS-R で層別化しても同様の結果であった。MDS は多種多様な遺伝子変異を有する heterogenous な疾患群であるため、ターゲットシーケンスで同定された ASXL1 変異、DNMT3A 変異、EZH2 変異、RUNX1 変異、SRSF2 変異、TET2 変異、TP53 変異、ZRSRF2 変異 8 つの遺伝子変異の有無で群別して LTR (個別領域) の発現差異解析を行った。ターゲットシーケンスでいずれの変異も同定されなかった症例 6 例を比較群とした。MDS-MLD、MDS-EB、AML-MRC での解析と同様に、個別領域の normalized count を DESeq2 を用いて正規化して、log₂ FC を算出した。幹細胞では ASXL1 変異のあるサンプルで最も LTR が発現上昇しており (28 領域)、前駆細胞では TP53 変異のあるサンプルで最も LTR が発現上昇していた (85 領域)。幹細胞、前駆細胞ともに EZH2 変異のあるサンプルで最も LTR が発現低下しており、幹細胞で

129 領域、前駆細胞 で 204 領域 発現低下していた。SRSF2 変異と ZRSR2 変異のあるサンプルで発現上昇していた LTR を除く全ての発現差異解析で重複は認められるものの、幹細胞と前駆細胞で変動 LTR は異なっていた。

各遺伝子変異のあるサンプルで変動していた LTR (個別領域) が、ヒストン修飾に関する ASXL1 変異と EZH2 変異の間で、DNA メチル化に関する DNMT3A 変異と TET2 変異の間で重複するか検証した。ASXL1 変異と EZH2 変異間の比較では、幹細胞で発現上昇していた LTR と発現低下していた LTR のうち、それぞれ 5 領域 (ASXL1 変異の 17.9%と EZH2 変異の 83.3%) と 8 領域 (ASXL1 変異の 36.4%と EZH2 変異の 6.2%)が重複していた。前駆細胞で発現上昇していた LTR と発現低下していた LTR のうち、それぞれ 19 領域 (ASXL1 変異の 28.8%と EZH2 変異の 100.0%) と 55 領域 (ASXL1 変異の 69.6%と EZH2 変異の 27.0%)が重複していた。DNMT3A 変異と TET2 変異間の比較では、幹細胞で発現上昇していた LTR のうち、それぞれ 13 領域 (DNMT3A 変異の 68.4%と TET2 変異の 92.9%) が重複していた。幹細胞で発現低下していた LTR に重複はなかった。前駆細胞で発現上昇していた LTR と発現低下していた LTR のうち、それぞれ 31 領域 (DNMT3A 変異の 63.3%と TET2 変異の 100.0%) と 3 領域 (DNMT3A 変異の 4.8%と TET2 変異の 4.5%)が重複していた。

以上、本研究では MDS と MDS から移行した AML (AML-MRC) における TE の発現を RNA シークエンスを用いて詳細に解析した。TE の中では LTR が最も多く発現変動していたが、LTR の発現を repName と個別領域の階層で解析したところ、repName では ERV1 が最も多く、個別領域では ERVL-MaLR が最も多く確認された。LTR の発現パターンは MDS-MLD と MDS-EB の間で違いはみられなかったが、いずれの解析でも幹細胞と前駆細胞で発現パターンは異なっていた。TE 解析は MDS に対する疾患理解を深め、MDS から AML への移行に関連することが示唆された。本研究で得られた知見が MDS に対する TE 解析の更なる飛躍につながることを切に願う。MDS の分子病態や DNA メチル化阻害薬の反応性に関連する TE の発現パターンが特定されれば、難治性疾患である MDS の予後の改善にも貢献できるであろう。