

博士論文 (要約)

骨髄異形成症候群における transposable element の解析

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 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 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、白血病芽球増加を伴わない MDS with multilineage dysplasia (MDS-MLD) 13 例 (40.6%)、白血病芽球増加を伴う 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。ターゲットシーケンスで 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 シーケ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。本研究ではまず repName ごとの発現を定量化し比

較検証した。続いて ID (個別領域) ごとの発現も定量化し比較検証した。

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 fold-change (\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。

repName ごとの解析で LTR の発現様式が MDS 病型を層別化するか検証した。転写産物の発現量に基づく発現変動 LTR のヒートマップを作成した。LTR の発現様式は MDS-MLD、MDS-EB、AML-MRC をクラスタリングしなかった。LTR (repName) の各サンプルごとの発現量を次元削減して可視化した uniform manifold approximation and projection (UMAP)を作成した。LTR (repName) の発現様式は MDS-MLD、MDS-EB、AML-MRC を層別化しなかった。以上より、幹細胞と前駆細胞で発現変動する LTR (repName) の発現は MDS-MLD、MDS-EB、AML-MRC 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 ID を有しており、類似した塩基配列が複数領域に散在している。repName ごとの解析では LTR の発現様式は 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階層での解析を行った。個別領域ごとの転写産物の発現を定量化した

normalized count を算出し、正常骨髄 (NBM) を比較群とした発現差異解析を行った。LTR (個別領域) の各サンプルごとの発現量を次元削減して可視化した UMAP を作成した。repName の発現様式と異なり、個別領域の発現様式では AML-MRC の幹細胞はクラスターを形成した。続いて、LTR がどのような発現変動を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 \log_2 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、 \log_2 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、 \log_2 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相関している可能性を示唆した。

個別領域の解析で、AML-MRC は UMAP で独立したクラスターを形成したが、どの LTR (個別領域) が AML-MRC 特異的であるのか検証した。repName の階層の分類では、幹細胞 (stem cell) で発現上昇していた主な個別領域において、Harlequin-int (117 領域、10.54%) や LTR2B (20 領域、1.80%) が、AML-MRC 特異的に発現上昇していた。幹細胞 (stem cell) で発現低下していた主な個別領域において、LTR31 (7 領域、0.94%) や MSTD-int (5 領域、0.67%) が、AML-MRC 特異的に発現低下していた。前駆細胞 (progenitor cell) で発現上昇していた主な

個別領域において、LTR33A (2 領域、2.15%) や MER52D (2 領域、2.15%) が、AML-MRC 特異的に発現上昇していた。前駆細胞 (progenitor cell) で発現低下していた主な個別領域において、LTR16E1 (2 領域、2.15%) や MER11B (2 領域、2.15%) が、AML-MRC 特異的に発現低下していた。

MDS-MLD もしくは MDS-EB だけで発現変動していた LTR (個別領域) と AML-MRC だけで発現変動していた LTR (個別領域) が、どのゲノム領域に存在するのか検証した。MDS-MLD もしくは MDS-EB 特異的に発現変動していた LTR (個別領域)、AML-MRC 特異的に発現変動していた LTR (個別領域) いずれにおいても、ゲノム領域は intron が最も多く、次いで intergenic 領域が多かった。Homer annotatePeak.pl を用いて各 LTR (個別領域) に最も近い遺伝子を同定した。LTR と近傍遺伝子の発現量の相関係数 (R) をゲノム領域ごと (intron, intergenic) に算出した。MDS-MLD もしくは MDS-EB 特異的に発現変動していた LTR (個別領域)、AML-MRC 特異的に発現変動していた LTR (個別領域) いずれにおいても、intron と intergenic 領域ともに近傍遺伝子との相関係数 (R) の絶対値は低かった。すなわち intron と intergenic 領域にある発現変動 LTR は近傍遺伝子とは独立した発現様式を示すことが明らかになった。

LTR の発現パターンは MDS-MLD と MDS-EB を区別しなかった。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、*ZRSR2* 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、 \log_2 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るものの、幹細胞と前駆細胞で変動 LTR は異なっていた。

以上、本研究では MDS 患者における LTR の発現様式を明らかにし、幹細胞と前駆細胞では発現が変動する LTR が異なり、AML に進行した症例は MDS より発現量の変化が大きくなることを示した。さらに MDS もしくは AML で特異的に発現変動する LTR を同定した。TE 解析は MDS に対する疾患特性の理解を深めるとともに、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は MDS における TE 解析の進展につながる基盤的データで

あり、これをもとに 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 の発現様式が特定されれば、難治性疾患である MDS の研究の発展にも貢献できるものと考ええる。

