

論文の内容の要旨

骨髄異形成症候群 944 例の標的シーケンスによる新たな分子メカニズムの理解と探索

氏名 永田 安伸

【研究の背景と目的】

骨髄異形成症候群, Myelodysplastic Syndrome (以下MDS) は、形態異常を伴う血球産生（無効造血）と高率の急性骨髄性白血病（以下AML）への移行を特徴としている。造血幹細胞に由来する腫瘍で多段階発癌のモデルが示唆されており、造血幹細胞移植を除いて根治的な治療法はない。MDSは多様性のある骨髄系腫瘍であり、患者それぞれにおける正確な診断とリスク分類に基づいた最適化された治療選択が現在の治療戦略上、必要不可欠である。染色体情報や細胞形態、末梢血のパラメータを用いた国際予後分類（以下IPSS）が従来用いられており、近年さらに改変されたIPSS（以下IPSS-R）が予後を細分類可能となった。

近年、次世代シーケンサーを活用した腫瘍ゲノムの網羅的な解析が行われ、既知のシグナル伝達や転写因子などのパスウェイだけでなく *TET2*, *IDH1/2*, *DNMT3A*, *ASXL1* や *EZH2* などのエピジェネティックやRNAスプライシングに関わるパスウェイの遺伝子変異が新たに同定され、MDSの病態に関わる変異遺伝子はますます多様になっている。しかし、実際にMDSの病態を理解し、臨床診療に生かされるためにこれらの変異が集約される手法は未だ確立されておらず、シーケンスの技術革新に伴うゲノミクスの恩恵は正確な評価がされていない。Bejarらは最近、複数の遺伝子変異を調査することにより、MDSにおける臨床転帰をより鋭敏に予測する可能性を報告した。

我々の研究目的は、革新的な遺伝子解析技術を用いることで判明する多数の遺伝子異常が臨床データに与える影響を検証し、さらなるMDSの病態解明を推進することである。

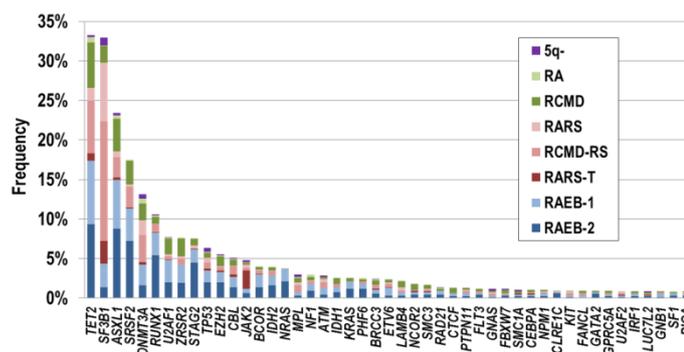
【研究の方法と主な成果】

既知もしくは変異が想定される遺伝子104個について、様々な種類のMDS944症例を対象に高速並列シーケンス技術を用いた遺伝子変異と欠失の解析を行い、これらの遺伝子異常が予後に及ぼす影響について検討を行った。

遺伝子異常は99個の遺伝子、864症例（91.5%）に認められ、1症例

あたり3個の変異/欠失が確認された。10%以上の頻度で変異していた遺伝子は、*SF3B1*, *TET2*, *ASXL1*, *SRSF2*, *DNMT3A*, *RUNX1*の6個であり、有意に変異が認められたのは47個の遺伝子であった（上図）。これらの多くは骨髄系腫瘍で既報の遺伝子であったが、*IRF1*, *CTCF*やコヒーシンプラスウェイに関わる遺伝子は新規に同定された。これらは様々な機能的パスウェイに分類され、最も高頻度であったのは64%でRNAスプライシングであり、続いてDNAメチル化、クロマチン修飾、転写因子、シグナル伝達の順であった。*SF3B1*は鉄芽球が増殖するタイプのMDSの82.2%（240/292）、5q-症候群タイプのMDSの24.3%（9/37）に認められ、MDSの病型により特徴的な変異が認められた。また*TP53*や*TET2*, *EZH2*などいくつかのがん抑制遺伝子については、アレイCGHやデジタルコピー数解析によりコピー数欠失が判明し、これらに関しては変異と組み合わせで解析が行われた。また、有意な変異遺伝子同士の相関について検討された結果、82個の組み合わせが有意であることが判明した。これは未報告の共存性や排他性の関連を含んでおり、*STAG2*や*IDH2*, *ASXL1*変異が共存しやすく、*SRSF2*変異と*DNMT3A*や*EZH2*, *IRF1*変異が排他的になっていることが示された。また*SF3B1*変異を有する症例は共存する変異数が少なく、*DNMT3A*と*JAK2*を除いた共通の遺伝子変異と排他関係になっていることが明らかとなった。

さらに今回の深い読み取り深度から正確な腫瘍内のアレル頻度が得られ、カイ二乗検定により腫瘍内異質性の有無について検定が可能となった。全944例について腫瘍内の異質性について検討したところ456症例（48.3%）が異質性ありと判断され、サブクローン数は変異数と相関しており、進行したMDSの病型で高頻度に認められた。平均の変異アレル頻度は主要な遺伝子においても様々なバリエーションが認められた。たとえば、MDSの亜型である血小板増加を伴う環状鉄芽球性貧血（以下RARS-T）症例は*SF3B1*変異と*JAK2*変異を共有することが知られているが、一例を除き*SF3B1*変異は共存する*JAK2*変異と比較すると有意にアレル頻度は高かった。このことはRARSやRCMD-RSなどの環状鉄芽球を有する病型で*SF3B1*変異が認められ、その後、*JAK2*変異を新たに獲得してRARS-Tが発症するモデルが強く示唆された。パスウェイ単位で考えると、RNAスプライシングやDNAメチル化は他のパスウェイと比較すると有意にアレル頻度が高く、これらの変異は腫瘍化の早期に起きている可能性が示唆された。クロ



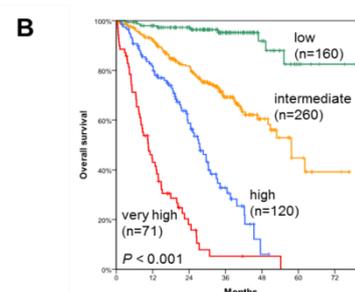
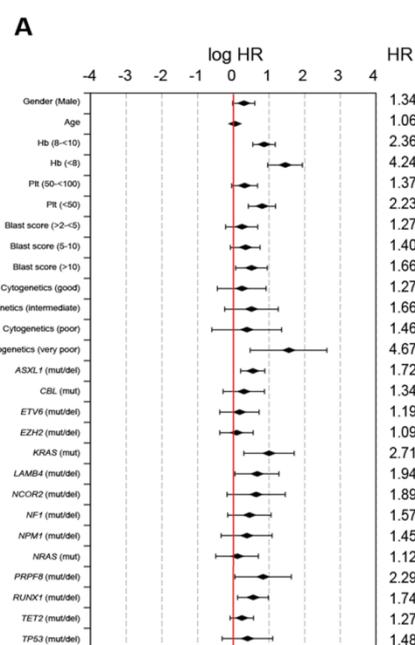
マチン修飾や転写はRAS パスウェイよりも高いアレル頻度であった。有意な変異遺伝子47個もしくは標的パスウェイ9個に関してそれぞれ遺伝子ごと、パスウェイごとに共存している変異のアレル頻度を比較したところ、有意にアレル頻度が異なる組み合わせは28遺伝子ペア、18パスウェイペアであった。これは腫瘍がクローナルな増殖を行う中で、主要な遺伝子変異に序列が存在する、すなわち絶対ではないもの遺伝子変異が起きる順番にはある程度の傾向が存在することが示唆された。

また、年齢、性別、染色体や末梢血などの臨床データと遺伝子異常について解析され、有意に*ASXL1*や*TET2*変異が男性に多く、*TET2*変異を持つ症例は持たない症例と比較して高齢であることが同定された。

【当該分野における研究業績の独創性とインパクト】

これはヒトのがんで初めて、100以上の遺伝子の変異/欠失について900例以上を対象に解析し予後との関連を見た大規模研究である。変異数が少ない症例はMDSの低リスク群が多く予後良好であり、一方変異数が多い症例は進行したMDSであることが判明した。MDSにおける腫瘍内のサブクローンの存在は以前から重要視されていたが、進行した予後不良のMDSにおいてサブクローンを有する割合が高く、このことは変異数が増えることにも関連していた。すなわち遺伝子変異が蓄積し、腫瘍内サブクローン数の増加を誘導することがMDSにおける腫瘍増殖の特徴であり、それが予後不良と関わるということが同定された。また、変異序列の存在も新たな重要な発見でありMDSの病態を解明するだけでなく、病勢の分子指標となる可能性が示唆された。

しかし、最も重要で新たに得られた知見は100以上の複数の遺伝子異常の状況が判明し、それらがMDS患者の臨床決断を促すための予後予測モデルを改善させたことである。実際に複数の遺伝子変異/欠失と予後には相関が認められ、今までにないモデルを構築する助けとなった。COX回帰によって遺伝学的因子が評価され、LASSO法の正則化によりモデル作成に関わる因子が決定された。年齢や性別、IPSS-Rに用いられるような臨床的な指標と予後に有意な影響を及ぼす14個の遺伝学的な指標を組み合わせる（図A）ことで新たに4つのリスクグループを区別し、有意に生存率を分類することが可能であった。赤池情報量規準などを用いて、臨床指標（IPSS-R）や遺伝学的指標をそれぞれ単独で用いた場合と比較した場合、このモデルは最も鋭敏に予後を分類することが判明した。実際に4つのリスクグループ（low, intermediate, high, very high）は3年生存率がそれぞれ95



. 2%, 69. 3%, 32. 8%, 5. 3%と有意かつ明確に予後を予測した (図B)。

【将来への展望】

大規模なコホートでの遺伝子解析はMDSの病態やクローナルな変化を解明するだけでなく、従来のリスク予測に用いられる臨床的指標と遺伝学的指標を組み合わせた全く新しい予後モデル構築の一助となる。MDSにおける多数の標的遺伝子の解析は実現可能であり、MDS患者の予後や生物学的な分類、診断を改善する有用な手法である。

今後次世代シーケンサーのコストはさらに下がり、研究室レベルから病院レベルでの解析が可能となることが見込まれている。臨床現場において、この研究から構築された遺伝学的指標を組み合わせた精度の高い予後予測モデルを適応することで、難治性であるMDS患者の治療決定に寄与し、結果として治療成績が向上することを展望とする。