

論文の内容の要旨

論文題目 骨髄系腫瘍におけるコヒーシ複合体の変異

氏名 昆 彩奈

骨髄異形成症候群(MDS : myelodysplastic syndromes)は、骨髄異形成を伴う血球産生異常と急性骨髄性白血病(AML; acute myeloid leukemia)への移行を特徴とする治療抵抗性の慢性骨髄性腫瘍であり、治療反応性や予後の異なる多様な病態が含まれる。高齢者に好発するが、現時点で唯一の根治的治療法である同種造血幹細胞移植は、高齢患者への適応は合併症の観点から厳しく制約されることから、疾患特異的な原因分子・病態の解明と、これらの分子を治療の標的とする有効かつ副作用の少ない治療薬剤の開発が強く望まれる。

MDS の発症に関わる遺伝子変異については、以前から知られていた *TP53* や *NRAS* の変異を除いて長く不明であったが、ここ5年位の間、アレイ CGH 法や SNP アレイを用いた網羅的なコピー数異常解析を通じて、*c-CBL* (Sanada et al, Nature 2009)や エピゲノム修飾に関わる遺伝子である *TET2*, *ASXL1*, *EZH2* などの複数の標的遺伝子の変異が同定された。(Shih et al, Nat. Rev. Cancer, 2012) しかしこれらの方法によっても、MDS の約 20% の症例では、コピー数異常や遺伝子変異が検出されず、新たな解析手法が求められていた。

一方で、近年になり、従来の Sanger 法に比べて短時間に膨大なシーケンスデータが得られる次世代シーケンサーが登場したことにより、がんが生じた様々な種類の複雑なゲノムの異常を高速かつ網羅的に検出することが可能になった (Metzker et al, Nat. Rev. Genet. 2009)。AML においては同技術により DNA メチル化修飾に関わる遺伝子である *DNMT3A* や *IDH1/2* の変異が報告された (Ley et al, NEJM 2010, Mardis et al, NEJM 2010)。

そこで MDS の原因となる遺伝子変異の全貌を解明することを目的として、29 症例の MDS および関連疾患を対象として、次世代シーケンサーを用いて全エクソン解析を行った。本解析を通じて、RNA スプライシング分子変異が MDS に高頻度かつ特徴的に生じていることが明らかになっているが、(Yoshida et al, Nature 2011)、その他にも、これまでに報告されていない多数の遺伝子変異が見出された。それらのほとんどは単一の症例にのみ認められる変異であり、おそらくは白血病発症においては機能していない変異と考えられたが、複数の症例において変異を認める新たな遺伝子として、コヒーシ複合体の主要な構成タンパク質の一つをコードする *STAG2* 遺伝子を見出した。さらに、単一の症例のみに認められた変異ではあったが、コヒーシ複合体に関連するほかの遺伝子として *STAG1* 遺伝子および *PDS5B* 遺伝子に変異が認められた。

コヒーシは、*STAG*, *RAD21*, *SMC1*, *SMC3* という4つのタンパク質から構成されるタンパク質複合体であり、細胞分裂の際にリング状の構造をとり姉妹染色体を取り囲み染色体同士の接着を助けることで、染色体の異常分配を防ぐ役割を果たすほか、近年では転写調節に重要な役割

を果たすことが報告され注目されている。コヒーシン複合体の構成タンパク質の germline 変異は、先天性の多臓器形成不全症を呈する Cornelia de Lange 症候群や Roberts 症候群の原因であることが知られている。

そこで、コヒーシン複合体遺伝子変異の詳細を調べるために、MDS, AML, CMML (慢性骨髄単球性白血病)、CML (慢性骨髄性白血病)、MPN (骨髄増殖性腫瘍) を含む多数症例 (581 症例) の骨髄系腫瘍を対象として、コヒーシン複合体を構成する遺伝子およびその関連遺伝子 9 遺伝子に関して、高速シーケンス解析を行った。また、このうちの 453 症例に関しては、SNP アレイを用いたコピー数解析も併せて行った。この結果、コヒーシン複合体の主要な 4 つの構成要素である *STAG2*, *RAD21*, *SMC1A*, *SMC3* の遺伝子変異および欠失が、AML の 12.1% (19/157), MDS の 8.0% (18/224), CMML の 10.2% (9/88), MPN の 6.3% に生じていることが明らかとなった。これらの複数のコヒーシン構成要素の変異は概ね排他的に生じていることから、これらの変異がコヒーシンの機能を共通の標的として生じていることが示唆された。

STAG2 変異のほとんど (32/33 例) および全ての *RAD21* 変異 (9/9 個) は遺伝子領域全体に認められ、ナンセンス変異、フレームシフト変異、スプライスサイト変異であることから、機能喪失型の変異であると考えられた。一方で、*SMC1A* および *SMC3* に認められた変異は、コヒーシンがリング状の複合体を形成するために重要と考えられているドメインに生じたミスセンス変異であり、変異によりハプロ不全やドミナントネガティブの機序を介して機能喪失を招くと考えられた。

コヒーシン変異は、骨髄系腫瘍で共通に変異していることが知られている他の遺伝子変異と高頻度に共存しており、とくに *TET2*, *ASXL1*, *EZH2* と有意に共存していた。コヒーシン変異を有する 20 症例について、コヒーシン遺伝子変異と、共存する遺伝子変異についてディープシーケンシングを行った結果、ほとんどのコヒーシン遺伝子変異は腫瘍の主要な集団に生じていることが明らかになり、白血病発症において初期に生じる変異であることが示唆された。

コヒーシン遺伝子変異が白血病発症において果たす役割を調べるために、4 個のコヒーシン複合体の変異細胞株を含む 17 個の骨髄性白血病に由来する細胞株において、*STAG1*, *STAG2*, *RAD21*, *SMC3*, *SMC1A*, *NIPBL* の発現をウェスタンブロットにより検討したところ、*RAD21* 遺伝子のフレームシフト変異をもつ細胞株 (Kasumi-1) では *RAD21* の発現低下が認められたが、コヒーシン複合体の遺伝子に変異をもつ他の細胞株では、変異遺伝子の発現の有意な低下は認められなかった。一方、コヒーシン複合体の遺伝子に変異は認められないにもかかわらず、*STAG2* (KG-1)、および *STAG1*, *STAG2*, *RAD21*, *NIPBL* の発現の有意な低下の認められる細胞株 (MOLM-13) が存在した。これらの例を除くと、全可溶化画分におけるコヒーシン複合体の構成タンパク質の発現とコヒーシン複合体の変異に有意な相関は認められなかったが、クロマチン結合画分においては、1 つ以上のコヒーシン複合体の構成タンパク質の変異あるいは発現の低下を認める細胞株において、*SMC1A*, *SMC3*, *RAD21*, *STAG2* を含む 1 つ以上のコヒーシン複合体の構成タンパク質の発現の有意な低下が認められた。すなわち、コヒーシン複合体の構成タンパク質ひとつの機能低下により、クロマチンに結合するコヒーシン複合体が減少する可能性が示唆された。

RAD21 遺伝子の変異をもつ白血病細胞株(Kasumi-1)、および *RAD21* および *STAG2* の発現の低下を認める細胞株(MOLM-13)に、野生型の *RAD21*、および、野生型の *RAD21* または *STAG2* を強制発現させることにより、コヒーシン複合体における変異および発現低下の細胞増殖に及ぼす効果について検討した。野生型の遺伝子の強制発現により、これらの細胞株の増殖は有意に抑制されたが、コヒーシン遺伝子の変異あるいは発現低下を認めない細胞株においては、増殖の有意な抑制は観察されなかったことから、これらのコヒーシン複合体の構成タンパク質の変異あるいは発現低下は、白血病細胞の増殖に関与している可能性が示された。

発現アレイ法により、*RAD21* 遺伝子の変異をもつ白血病細胞株(Kasumi-1)において、野生型の *RAD21* 遺伝子の強制発現による遺伝子発現プロファイルの変化について検討した。計 63 個の遺伝子については再現性のある遺伝子発現の変化が確認され、コヒーシン複合体に変異をもつ白血病細胞では、コヒーシン複合体の機能的な異常により遺伝子発現の変化が誘導される可能性が示唆された。

近年、*STAG2* 変異により姉妹染色体の結合異常を介した異数性が引き起こされることが報告され、発癌を招く機序と考えられていた(Solomon et al, Science 2011)。しかし、我々の変異解析の結果では、予想に反して、骨髄系腫瘍においてはコヒーシン変異を有する症例の半数は正常核型であり、コヒーシン変異の有無により核型の差は見られなかった。この観察結果は、少なくとも生体内においては、コヒーシン変異は異数性以外の機序を通じて白血病発症を招くことを示唆している。

一方で、コヒーシン複合体が長距離に及ぶ *cis* の相互作用を通じてゲノムワイドな遺伝子発現の制御に関わることを示す証拠が近年得られつつある。ゼブラフィッシュにおいては、*Rad21* および *Smc3* が造血系の制御に不可欠な *Runx1* の発現制御に関与することが示されており、また、ショウジョウバエでは、*NIPBL* 遺伝子の相同遺伝子である *Nipped-B* 遺伝子の発現が 80% まで障害されても染色体の分配に異常は生じないが、遺伝子発現の制御に障害が認められる。こうした観察結果は、コヒーシン複合体の変異が遺伝子発現の異常を通じて骨髄系細胞の正常な産生を障害することにより、白血病化にかかわる可能性を示唆している。

本研究は、従来報告されてきた DNA 修飾やクロマチン修飾以外の新しいクラスの遺伝子異常であるコヒーシンのパスウェイ変異が骨髄系腫瘍の発症に重要な役割を担っていることを明らかにしたもので、骨髄系腫瘍の分子病態を理解するうえで新たな視点を提供する研究成果と考えられる。