

201438069A

厚生労働科学研究委託費  
革新的がん医療実用化研究事業

(委託業務題目)

高齢者 MDS におけるクローン進化の経時的理解に基づく  
新たな治療戦略の構築

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 小川 誠司

平成27(2015)年 3月



本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業（革新的がん医療実用化研究事業）による委託業務として、国立大学法人 京都大学が実施した平成26年度「小児白血病におけるバイオマーカーによる早期診断技術の確立と実用化に関する研究」の成果を取りまとめたものです。

厚生労働科学研究委託費  
革新的がん医療実用化研究事業

(委託業務題目)

高齢者 MDS におけるクローン進化の経時的理解に基づく  
新たな治療戦略の構築

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 小川 誠司

平成27(2015)年 3月

# 目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
高齢者 MDS におけるクローン進化の経時的理解に基づく新たな治療戦略の構築 小川 誠司	1
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. MDS における経時的検体の遺伝子異常に関する研究 小川 誠司	2
2. 高齢 MDS の段階的発症モデルに関する研究 坂田 麻実子	3
3. MDS における空間的多様性の解明に基づく至適な検体採取法の開発に 関する研究 宮崎 泰司	4
4. 発作性夜間血色素尿症の起源細胞に関する研究 中尾 眞二	5
5. 脱メチル化薬耐性克服に関する研究 大屋敷 一馬	8
III. 学会等発表実績	9
IV. 研究成果の刊行物・別刷	12

厚生労働科学研究委託費委託業務成果報告  
(総括)



高齢者 MDS におけるクローン進化の経時的理解に基づく新たな治療戦略の構築  
MDS および MDS 関連疾患における遺伝子変異と薬剤耐性に関する研究

担当責任者：（京都大学医学研究科 腫瘍生物学講座・教授・小川誠司）

**研究要旨：**骨髄異形成症候群（MDS）は高齢者に高頻度に認められる難治性の血液腫瘍である。近年の次世代シーケンス法により、病因に関係する様々な遺伝子異常が明らかとなったが、その多彩な臨床所見や、経過に伴う急性骨髄性白血病（AML）への移行を十分に説明するには至っていない。そこで、MDS および MDS 関連疾患における遺伝子異常に関して、経過的検討、細胞起源の検索、段階的発症モデルの検証を通じて、MDS のクローン進化に伴う病因・病態の解明を行った。加えて、脱メチル化薬の耐性機構の検討は、治療反応性に関する要因を発見する基盤を構築するのに有用であった。

A. 研究目的

MDSは、近年の遺伝子解析技術の進歩に伴い、分子異常の知見が加わった代表的ながんである。これらの結果を用いて、MDSの発症や進行を予測できるバイオマーカーや治療薬剤の有効性の評価法を確立し、分子病態に基づく個別化医療の実現に寄与する。

B. 研究方法

MDS、MDS 関連疾患に加えて、二次性白血病にいたる様々な経過で経時的に採取された試料由来の DNA について、全エクソンシーケンスをふくむ複数の方法により体細胞変異を検索した。MDS に関連した遺伝子異常のマウスモデルの検討、さらに脱メチル化薬耐性細胞株を用いた耐性機構の探索を併せて行った。

（倫理面への配慮）

本研究で行った臨床検体を用いた実験は、各分担施設における倫理審査委員会で審査され、必要に応じて適切に承認されている。検体提供者に関しては、人権擁護、個人情報保護に細心の注意を払って本研究を実施した。

C. 研究結果

MDS および MDS 関連疾患における遺伝子異常は、初期に獲得される変異と経過中に獲得されるものとは分類された。高頻度の遺伝子変異をもつマウスモデルの検討により遺伝子変異の白血病化への関与が示された。メチル化薬耐性機構の検索は、MDS における新たな薬剤感受性のメカニズムを明らかにした。

D. 考察

様々な MDS 関連疾患における臨床検体を用いて遺伝子検索を行い、細胞起源や病期進行に関する新たな遺伝学的病態が明らかとなった。高頻度に認めら

れた変異・新たな治療法に係る *in vitro*、*in vivo* の検討により、その病態が再確認された。

E. 結論

高齢者 MDS におけるクローン進化の過程が明らかにされ、それに基づく治療法検索の基盤が構築された。

F. 健康危険情報：なし

G. 研究発表

論文発表

1. Damm F, Mylonas E, Cosson A, Yoshida K, Della Valle V, Mouly E, Diop M, Scourzic L, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Kikushige Y, Davi F, Lambert J, Gautheret D, Merle-Beral H, Sutton L, Dessen P, Solary E, Akashi K, Vainchenker W, Mercher T, Droin N, Ogawa S, Nguyen-Khac F, Bernard OA. Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients. *Cancer Discov.* 2014
2. Shen W, Clemente MJ, Hosono N, Yoshida K, Przychodzen B, Yoshizato T, Shiraishi Y, Miyano S, Ogawa S, Maciejewski JP, Makishima H. Deep sequencing reveals stepwise mutation acquisition in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest.* 2014

学会発表

Seishi Ogawa Molecular Profiling of Myelodysplastic Syndromes 5/24/2014  
第5回 JSH 国際シンポジウム

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 特記事項なし

厚生労働科学研究委託費委託業務成果報告  
(業務項目)

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）  
委託業務成果報告書

高齢者MDSにおけるクローン進化の経時的理解に基づく新たな治療戦略の構築  
MDSにおける経時的検体の遺伝子異常に関する研究

担当責任者：(京都大学医学研究科 腫瘍生物学講座・教授・小川誠司)

**研究要旨**：今回、低リスク・高リスクMDSあるいは二次性のAMLにおける検体を検討することにより、診断のためのバイオマーカーの抽出、あるいは新規薬剤の治療ターゲットの発見を目指す。特に、同一症例において経時的検体をシーケンスすることにより、腫瘍内クローン階層性に関するより詳細な情報が得られる。各症例における臨床所見と関連させることにより、不明であった新たな予後因子や、治療反応性に関わる要因を同定する基盤を構築する。

A. 研究目的：本研究では、最新の遺伝子解析技術を用いて、クローン進化によって形成される病期の進行や治療反応性を含む多様な臨床的特性の分子基盤を動的に理解する。

B. 研究方法：低リスクMDSから高リスクMDS、二次性白血病にいたる様々な経過で経時的に採取されたMDS試料について、全エクソンシーケンスによる体細胞変異とそれらのアレル頻度をディープシーケンスにより正確に決定することで、腫瘍内のクローン構造を推定する。さらに、コロニー分離された多数のクローンの変異解析を用いてこれを検証する。クローンの経時的変化を理解することにより、MDS発症・進展に関わるバイオマーカーとなる分子を同定する。

(倫理面への配慮) 本研究で行った臨床検体を用いた実験は、京都大学の倫理審査委員会で審査され、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（2003年3月）」を遵守することを条件に承認された。検体提供者への人権擁護、個人情報保護に細心の注意を払って本研究を実施した。

C. 研究結果：低リスクMDSと高リスクMDSのシーケンス結果を比較検討することにより、病初期に獲得されるクローナル変異と後期に認められるサブクローナル変異を分離可能であった。クローナル変異を来す代表的な遺伝子はTET2やSF3B1などMDSの発症に関与する遺伝子であった。一方、サブクローナル変異はRUNX1やFLT3に高頻度に認められ、病期の進展に関与する可能性が考えられた。

D. 考察：次世代シーケンスにより認められる、一症例における複数の変異は、空間的・時間的に多様性があることが判明した。一方、それぞれのドラ

イバー変異において、獲得順序の規則性や高頻度の組み合わせといった非常に重要な知見も得られた。

E. 結論：様々な時間経過で経時的なサンプルを次世代シーケンスにより検討することは、MDSの発症・進展に関わる多彩な遺伝学的病態を把握するのに有用であった。今後、症例を蓄積すると同時に、これらの結果をバイオマーカー、治療標的を抽出するのに応用する。

F. 健康危険情報：なし

G. 研究発表  
論文発表

1. Damm F, Mylonas E, Cosson A, Yoshida K, Della Valle V, Mouly E, Diop M, Scourzac L, Shiraiishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Kikushige Y, Davi F, Lambert J, Gautheret D, Merle-Beral H, Sutton L, Dessen P, Solary E, Akashi K, Vainchenker W, Mercher T, Droin N, Ogawa S, Nguyen-Khac F, Bernard OA. Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients. *Cancer Discov*. 2014
2. Shen W, Clemente MJ, Hosono N, Yoshida K, Przychodzen B, Yoshizato T, Shiraiishi Y, Miyano S, Ogawa S, Maciejewski JP, Makishima H. Deep sequencing reveals stepwise mutation acquisition in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest*. 2014

学会発表

Seishi Ogawa Molecular Profiling of Myelodysplastic Syndromes. 5/24/2014  
第5回 J S H国際シンポジウム

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 特記事項なし



高齢者 MDS におけるクローン進化の経時的理解に基づく新たな治療戦略の構築  
高齢 MDS の段階的発症モデルに関する研究

担当責任者：（筑波大学・准教授・坂田麻実子）

**研究要旨**

加齢に伴い造血細胞には遺伝子変異が次第に積み重なることが報告されている。遺伝子変異を獲得した細胞はクローン拡大し、さらに異常が積み重なることにより、やがて MDS を発症すると考えられる。本研究では、加齢に伴う遺伝子変異および遺伝子発現変化の蓄積およびこれによる最終的な疾患発症のモデルとなるマウスを作製した。これにより、高齢 MDS の段階的発症の仕組みが明らかになるとともに、高齢 MDS の治療戦略開発の基盤となることが期待される。

**A. 研究目的**

これまでのゲノム解析結果から、高齢 MDS においては、加齢に伴う遺伝子変異、遺伝子発現変化が段階的に積み重なることにより発症することが想定される。こうした高齢 MDS の段階的発症について、実際にマウスモデルにより明らかにする。

**B. 研究方法**

造血細胞特異的に *TET2* 遺伝子を欠損するマウスと高齢において異常がみられる当該遺伝子改変マウスを交配した。

・造血器腫瘍発症の有無について経時的に採血し、末梢血についてフローサイトメトリー法により解析を行った。さらには、末梢血において白血球数が増加した場合には、骨髄をはじめとする臓器浸潤について解析した。

・白血病を発症したマウスの骨髄細胞を採取し、致死量放射線照射した同系マウスへ移植し、白血病の発症の有無を観察した。

（倫理面への配慮）

「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に従い、当施設で本研究計画を承認の上、行った。

**C. 研究結果**

造血細胞特異的 *TET2* 遺伝子欠損マウスと加齢細胞において異常がある当該遺伝子改変マウスを交配したマウスでは、極めて早期に骨髄系細胞の増加がみられ、白血病を発症した。さらにこの白血病発症マウスの骨髄を同系マウスに移植したところ、移植されたマウスにも、白血病を発症した。

**D. 考察**

本研究により、加齢においては、段階的に遺伝子変異が積み重なることにより、造血器腫瘍が発症する仕組みが明らかになった。今後は、このマウスモデルを用いた治療戦略を行う。

**E. 結論**

高齢 MDS の疾患モデルでは、段階的遺伝子異常を獲得することにより白血病へ進行することをマウスモデルで明らかにした。

**F. 健康危険情報**

なし

**G. 研究発表**

1. 論文発表

本研究は、治療モデル作成のための追加実験を行っている。これが完成次第、論文発表を予定する。

2. 学会発表

同上。

（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

高齢者 MDS におけるクローン進化の経時的理解に基づく新たな治療戦略の構築  
MDS における空間的多様性の解明に基づく至適な検体採取法の開発に関する研究

担当責任者：（長崎大学原爆後障害医療研究所・教授・宮崎泰司）

**研究要旨**

骨髄異形成症候群（MDS）を始めとする造血器悪性腫瘍のクローン変化を見るため、症例について経過中のクローン構成を検討した。急性骨髄性白血病で初診した例で、化学療法によって寛解。2年後より血小板を中心に血球増加があり、3年後には血小板増加を伴う骨髄異形成/骨髄増殖性腫瘍と診断された。種々の遺伝子異常を検討した結果、これらの病態はいずれも同一の造血幹細胞を基とするクローン性造血の変化と捉えられることが判明した。

**A. 研究目的**

MDS を始めとする造血器悪性腫瘍のクローン変化を見るため、急性骨髄性白血病治療後に寛解に至り、その後に骨髄増殖性腫瘍を発症した症例について経過中のクローン構成を検討した。

**B. 研究方法**

症例の急性骨髄性白血病（AML）診断時、完全寛解（CR）時、骨髄異形成/骨髄増殖性腫瘍（MDS/MPN）診断時、並びに患者類粘膜炎検体についてターゲットシーケンスを用いてクローン構成を解析した。

（倫理面への配慮）

長崎大学の倫理委員会承認を得、患者からの同意を取得して実施されている。

**C. 研究結果**

AML 診断時には NPM1, SRSF2, TET2 遺伝子に変異が見られたが、JAK2 遺伝子の変異はなかった。CR 時のサンプルでは NPM1 変異は消失していたが、SRSF2, TET2 変異は残存していた。MDS/MPN 診断時の変異解析では NPM1 変異は見られなかったものの、SRSF2, TET2 遺伝子の変異に加えて、新たに JAK2 遺伝子に変異が認められた。興味深いことにこれらの3試料において SRSF2, TET2 変異はそれぞれの遺伝子において同一部位の同一変異であり、一貫していた。

**D. 考察**

本例では AML, MDS/MPN の二つの異なる骨髄系の造血器悪性腫瘍を発症した。芽球の増加した AML と血小板が増加した MDS/MPN の時期では、末梢血・骨髄像も明らかに異なる造血器腫瘍と判断される。また、MDS/MPN は AML に対する化学療法とそれに引き続く CR のあと、2-3 年を経て診断されている。この間、芽球割合の増加や血球減少は無く、MDS/MPN は AML と異なることを支持している。しかし、遺伝子解析

からは AML, MDS/MPN の両方が SRSF2, TET2 遺伝子変異を持った単クローン性造血から発症していたと考えられる。MDS を含む高齢者の造血器腫瘍のクローン構成を考える上で貴重な例と考えられる。

**E. 結論**

AML と MDS/MPN の二つの造血器腫瘍が同一の単クローン性造血から発症したと考えられる症例を同定した。

**F. 健康危険情報**

なし

**G. 研究発表**

1. 論文発表  
(1) Itonaga H, Imanishi D, Wong YF, Sato S, Ando K, Sawayama Y, Sasaki D, Tsuruda K, Hasegawa H, Imaizumi Y, Taguchi J, Tsushima H, Yoshida S, Fukushima T, Hata T, Moriuchi Y, Yanagihara K, Miyazaki Y. Expression of myeloperoxidase in acute myeloid leukemia blasts mirrors the distinct DNA methylation pattern involving the downregulation of DNA methyltransferase DNMT3B. *Leukemia* 2014; 28(7): 1459-1466.  
(2) Hata T, Imanishi D, Miyazaki Y. Lessons from the Atomic Bomb About Secondary MDS. *Curr Hematol Malig Rep.* 2014; 9(4): 407-411.  
(3) Wong YF, Micklem CN, Taguchi M, Itonaga H, Sawayama Y, Imanishi D, Nishikawa S, Miyazaki Y, Jakt LM. Longitudinal Analysis of DNA Methylation in CD34+ Hematopoietic Progenitors in Myelodysplastic Syndrome. *Stem Cells Transl Med* 2014;3(10):1188-1198.

**H. 知的財産権の出願・登録状況**  
(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 高齢者 MDS におけるクローン進化の経時的理解に基づく新たな治療戦略の構築 発作性夜間血色素尿症の起源細胞に関する研究

担当責任者：（金沢大学医薬保健研究域医学系細胞移植学・教授・中尾眞二）

### 研究要旨

発作性夜間血色素尿症（paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: PNH）の起源細胞の性状を明らかにするため、*BCR-ABL* 融合遺伝子と *PIGA* 変異が共存する慢性骨髄性白血病（chronic myelogenous leukemia: CML）合併 PNH 症例を対象として、ニロチニブ療法後の PNH 型血球の推移を詳細に観察した。PNH 型血球は発病時からリンパ球にはみられず、ニロチニブにより *BCR-ABL* mRNA コピーが消失した後も 0.02% 程度の PNH 顆粒球・赤血球が残存した。したがって、本例の PNH は、クローンサイズの小さい *PIGA* 変異造血前駆細胞に *BCR-ABL* 融合遺伝子が生じた結果発症したと考えられた。また、PNH のようなクローン性疾患であっても、クローン拡大の原因となるドライバー変異を選択的に抑制できれば治癒が得られる可能性が示唆された。

### A. 研究目的

発作性夜間血色素尿症（paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: PNH）は、MDS と同様に、遺伝子変異（*PIGA* 変異）を来した造血幹細胞に由来するクローン性血液疾患である。*PIGA* 変異幹細胞自身には増殖優位性がないことから、クローン性増殖を来するためには何らかの二次的遺伝子変異が必要と考えられてきた。そのような増殖をもたらす二次的なドライバー変異遺伝子として、これまでに *HMG2*、*U2AF1* などが報告されてきた。しかし、これらの変異を選択的に解消する治療薬は存在しないため、元々の *PIGA* 変異細胞がどのような性状のものであったかは不明である。今回我々は、PNH に慢性骨髄性白血病（chronic myelogenous leukemia: CML）を合併したため、白血球や血小板の増加に加えて、著しい溶血性貧血を来した症例を経験した。この例はニロチニブによって *BCR-ABL* 変異を来した CML 細胞を排除できるため、PNH と CML の起源細胞について有用な情報が得られることが予想された。そこで、以下の検討を行った。

### B. 研究方法

【症例】患者は27歳、女性。2013年1月頃より微熱・全身倦怠感自覚したため近医受診したところ、高度の貧血と白血球増多を指摘されたため、兵庫県立がんセンター血液内科に紹介された。来院時の血液検査では白血球18,700/ $\mu$ l、ヘモグロビン 6.0 g/dl、血小板100万/ $\mu$ l、網赤血球20%、総ビリルビン1.9mg/dl、直接ビリルビン0.3mg/dl、LDH1963IU/lなどの異常が認められた。白血球分画では骨髄芽球から後骨髄球までの全段階の幼若顆粒球と9.2%の好塩基球が認められたことからCMLが疑われた。

末梢血の顆粒球 FISH では 98% に *BCR-ABL* の融合シグナルが認められ、骨髄 G-Banding 法でも 46, XX, t (9;22) (p23; q11.2) が 20 細胞中 20 に認められたため CML と診断された。一方、末梢血のフローサイトメトリーでは顆粒球・単球の 99% 以上、赤血球の 75.7% が PNH 形質であった。B 細胞、T 細胞、NK 細胞には PNH 型血球の有意な上昇はみられなかった。

以上より PNH による溶血性貧血を合併した CML の診断が確定した。

【方法】ニロチニブ投与開始後に患者の同意を得て定期的に末梢血を採取し、*BCR-ABL* mRNA コピー数と GPI アンカー膜蛋白欠失血球（PNH 型血球）の割合を定量的 PCR と高精度フローサイトメトリーにより決定した。

（倫理面への配慮）

PNH 型血球検索については金沢大学医学倫理審査委員会、末梢血を用いた *PIGA* 遺伝子変異検索について兵庫県立がんセンター医学倫理審査委員会の承認を得た。

### C. 研究結果

ニロチニブ 600 mg/日を開始したところ、開始直後に LDH が 4000IU/l 以上に上昇。ヘモグロビンも 4.3g/dl まで低下したため、一時ニロチニブの休薬を余儀なくされた。その後貧血が改善したため、ニロチニブを 400 mg/日で再開したところ、白血球数、血小板数、LDH は 1 か月後には正常化し、貧血も徐々に改善した。ニロチニブ投与 3 か月後に *BCR-ABL* 陽性顆粒球は消失、4 か月後に AmpCML は 5 コピー未満となった。治療開始後 9 か月目の国際スケールによる *BCR-ABL* mRNA 定量で MR<sup>4.5</sup> であることが確認された。

一方、PNH 型顆粒球の割合もニロチニブ開始後急速に低下し、治療開始後 3 か月には 0.16%、6 か月後



は 0.02% となった。しかし、微少な PNH 型血球は *BCR-ABL* mRNA が国際スケールで陰性 (MR<sup>4.5</sup>) となった後も検出され続け、治療開始後 12 か月目の PNH 型顆粒球は 0.02%、PNH 型赤血球は 0.02% であった。これらは治療開始後 19 か月目には消失した。

#### D. 考察

CML と PNH は、MDS と同様に造血幹細胞の遺伝子変異に基づくクローン性疾患と考えられている。しかし、その起源にあたる細胞がどのような性状の細胞であるかは、それを同定する良いマーカーやアッセイが存在しないため不明であった。本例は、*PIGA* 変異と *BCR-ABL* 融合遺伝子が併存する「造血幹細胞」によって PNH と CML の両者が同時発症したことから、CML 起源細胞由来の血球を、GPI アンカー膜蛋白欠失というマーカーを指標として追跡できるという特異なケースであった。得られた新知見は以下のようにまとめられる。

1. 本例における CML の起源細胞は、多能性をもつ造血幹細胞ではなく、リンパ球系への分化能を持たない前駆細胞であった。これは CML が多能性造血幹細胞疾患であるという従来の常識とは相反する結果であった。
2. *BCR-ABL* mRNA が国際スケールで MR<sup>4.5</sup> 未満となった後も微少な PNH 型血球が存在し続けたことから、本来は元々存在していた *PIGA* 変異前駆細胞に *BCR-ABL* 融合遺伝子が生じた結果、*PIGA* 変異クローンの著しい拡大を来したと考えられる。これは、起源細胞が微少な造血前駆細胞クローンであったとしても、*BCR-ABL* のような強いドライバー変異が二次的に起これば、溶血型の PNH を発症し得ることを示唆している。すなわち PNH も、必ずしも造血幹細胞疾患ではないことを意味している。
3. 本例の PNH は、ニロチニブというチロシンキナーゼインヒビターによって治癒 (PNH 型血球の消失) が得られた。PNH のような造血幹細胞異常に基づくクローン性疾患は、一部の自然寛解例を除いて、同種造血幹細胞移植を行わない限り治癒は得られないとされてきた。本例の経験は、個々の症例において *PIGA* 変異クローンの拡大を引き起こすドライバー変異を根絶しさえすれば、PNH も治癒さえ得ることを示している。
4. PNH 型血球の追跡によって、リンパ系への分化能を持たない造血前駆細胞が、少なくとも一年以上に渡って造血全体の 0.2% 程度を支持し続けることが示唆された。これは、マウスにおける恒常的な造血が、限られた分化能を持つ造血前駆細胞によって支持されているという Carmago らの最近の報告 (Nature 2014; 514:322) を支持

する所見と考えられる。

これらの証拠を確実なものにするため、現在 *PIGA* 変異の同定と、それを利用した *PIGA* 変異クローンの定量を試みている。

#### E. 結論

PNH 合併 CML に対するニロチニブ療法の経過を検討することによって、PNH と CML の両者の起源細胞が造血前駆細胞であり、*PIGA* 変異前駆細胞のドライバー変異を抑えることによって PNH の治癒が得られる可能性が示された。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1) 論文発表

1. Yoshizato T, Dumitriu B, Hosokawa K, Makishima H, Yoshida K, Townsley D, Sato-Otsubo A, Sato Y, Liu D, Suzuki H, Wu C, Shiraishi Y, Clemente MJ, Kataoka K, Shiozawa Y, Okuno Y, Chiba K, Tanaka H, Nagata Y, Katagiri T, Kon A, Sanada M, Scheinberg P, Miyano S, Maciejewski JP, Nakao S, Young NS, Ogawa S: Somatic mutations and clonal hematopoiesis in aplastic anemia, *N Engl J Med*, in press.
2. Inaguma Y, Akatsuka Y, Hosokawa K, Maruyama H, Okamoto A, Katagiri T, Shiraishi K, Maruyama Y, Tsuzuki-Iba S, Mizutani Y, Nishii C, Yamamoto N, Demachi-Okamura A, Kuzushima K, Ogawa S, Emi N, Nakao S: Induction of HLA-B\*40:02-restricted T cells possessing cytotoxic and suppressive functions against hematopoietic progenitor cells from a patient with severe aplastic anemia. *Br J Haematol*, in press.
3. Hosokawa K, Sugimori N, Katagiri T, Sasaki Y, Saito C, Seiki Y, Mochizuki K, Yamazaki H, Takami A, Nakao S: Increased glycosylphosphatidylinositol-anchored protein-deficient granulocytes define a benign subset of bone marrow failures in patients with trisomy 8. *Eur J Haematol*, 2014, in press.

##### 2) 学会発表

1. Yoshitaka Zaimoku, Hiroyuki Maruyama, Kana Maruyama, Takamasa Katagiri, An T. T. Dao, Hiroyuki Takamatsu, Hirohito Yamazaki, Koichi Kashiwase and Shinji Nakao: Evidence that HLA-B\*40:02 and HLA-A\*31:01 are strongly involved in the presentation of autoantigens to CTLs responsible for the development of acquired aplastic anemia: Poster Session, #2948: The

American Society of Hematology 56th Annual Meeting, December 7, 2014. San Francisco, California, USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし。

高齢者 MDS におけるクローン進化の経時的理解に基づく新たな治療戦略の構築：  
脱メチル化薬耐性克服に関する研究

担当責任者：（東京医科大学・血液内科学分野・主任教授・大屋敷一馬）

研究要旨

MDS 患者の治療選択肢で重要な位置を占める脱メチル化薬の効果予測、抵抗性の機序およびその克服を目指して本研究を行った。脱メチル化薬（5-azacytidine: Aza）耐性細胞株を樹立し、Aza 感受性細胞株とのピリミジン代謝経路に関与する酵素活性の相違点を見出すと共に、脱メチル化薬抵抗性に ATM/BRCA1 の恒常的な活性化と DNA 傷害性アポトーシスの抑制が関与していることを確認した。

A. 研究目的

MDS 患者における脱メチル化薬の初期抵抗性（primary resistance）、および抵抗性（secondary resistance）の機序の解明および、その克服を目指して本研究を行った。

B. 研究方法

脱メチル化薬（5-azacytidine: Aza）抵抗性細胞株 R-U937 および R-HL-60 を樹立し、Aza 暴露における DNMT3A、p-ATM、p-ATR、p-p53、p-CHK2 等の蛋白発現、メチル化度計測（SMMA 法：single-molecule methylation assay）およびメチレーションアレイによる DNA メチル化プロファイリングを検証した。さらに RT-PCR 法によるピリミジン代謝関連蛋白（AK3、CDA、UCK2、POLR2B）mRNA 発現、p-H2AX 免疫染色法による DNA 障害を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は細胞株および、その耐性細胞株樹立のため倫理的には抵触しない。

C. 研究結果

- 1) R-U937 では DNMT3A の著明な低下がみられると共に顕著な脱メチル化状態を示した。
- 2) Aza 耐性細胞では UCK2 および POLR2B の低下が共通してみられた。
- 3) 免疫染色の結果、Aza 耐性細胞では DNA 傷害反応と関係する p-H2AX の発現が Aza 暴露前に発現していた。
- 4) DNA 傷害反応と関係して、Aza 抵抗性細胞株では ATM/BRCA1 の恒常的な活性化がみられた。

D. 考察

脱メチル化薬抵抗性は ATM/BRCA1 の恒常的な活性化により DNA 傷害性アポトーシスからの回避が関与

していることが示唆された。

E. 結論

本検討の結果は脱メチル化薬の secondary resistance の機序と考えられ、臨床検体における Aza 抵抗例での確認と耐性化解除の糸口を見出す可能性を示唆している。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

Imanishi S, Umezu T, Ohtsuki K, Kobayashi C, Oh yashiki K, Oh yashiki JH: Constitutive activation of the ATM/BRCA1 pathway prevents DNA damage-induced apoptosis in 5-azacytidine-resistant cell lines. *Biochem Pharmacol*, 2014 89(3): 36: 1-9.

2. 学会発表

Imanishi S, Umezu T, Kobayashi C, Osuga M, Asano M, Oh yashiki K, Oh yashiki JH: A possible association between global DNA hypomethylation and azacytidine resistance in leukemia cells. 第76回 日本血液学会学術集会学術集会（2014年10月31日～11月2日）

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



### III. 学会等発表実績

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「高齢者MDSにおけるクローン進化の経時的理解に基づく新たな治療戦略の構築」

機関名 京都大学、筑波大学、長崎大学、金沢大学、東京医科大学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Molecular Profiling of Myelodysplastic Syndromes (口頭)	<u>Seishi Ogawa</u>	第5回 J S H 国際シンポジウム	5/24/2014	国内
Evidence that HLA-B*40:02 and HLA-A*31:01 are strongly involved in the presentation of autoantigens to CTLs responsible for the development of acquired aplastic anemia (Poster Session, #2948)	Yoshitaka Zaimoku, Hiroyuki Maruyama, Kana Maruyama, Takamasa Katagiri, An T. T. Dao, Hiroyuki Takamatsu, Hirohito Yamazaki, Koichi Kashiwase and <u>Shinji Nakao</u>	The American Society of Hematology 56th Annual Meeting, San Francisco, California, USA.	December 7, 2014.	国外
A possible association between global DNA hypomethylation and azacitidine resistance in leukemia cells. (ポスター)	Imanishi S, Umezu T, Kobayashi C, Osuga M, Asano M, <u>Ohyashiki K</u> , Ohyashiki JH	第76回 日本血液学会学術集会学術集会	10/24/-11/2,2014	国内

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「高齢者MDSにおけるクローン進化の経時的理解に基づく新たな治療戦略の構築」

機関名 京都大学、筑波大学、長崎大学、金沢大学、東京医科大学

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・ 外の別
Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients.	Damm F, Mylonas E, Cosson A, Yoshida K, Della Valle V, Mouly E, Diop M, Scourzic L, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Kikushige Y, Davi F, Lambert J, Gautheret D, Merle-Beral H, Sutton L, Dessen P, Solary E, Akashi K, Vainchenker W, Mercher T, Droin N, <u>Ogawa S</u> , Nguyen-Khac F, Bernard OA.	Cancer Discov.	2014	国外
Deep sequencing reveals stepwise mutation acquisition in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. J	Shen W, Clemente MJ, Hosono N, Yoshida K, Przychodzen B, Yoshizato T, Shiraishi Y, Miyano S, <u>Ogawa S</u> , Maciejewski JP, Makishima H.	Clin Invest.	2014	国外
Expression of myeloperoxidase in acute myeloid leukemia blasts mirrors the distinct DNA methylation pattern involving the downregulation of DNA methyltransferase DNMT3B.	Itonaga H, Imanishi D, Wong YF, Sato S, Ando K, Sawayama Y, Sasaki D, Tsuruda K, Hasegawa H, Imaizumi Y, Taguchi J, Tsushima H, Yoshida S, Fukushima T, Hata T, Moriuchi Y, Yanagihara K, Miyazaki Y.	Leukemia 2014; 28(7): 1459-1466.	2014	国外
Lessons from the Atomic Bomb About Secondary MDS.	Hata T, Imanishi D, <u>Miyazaki Y</u> , Curr Hematol	Malig Rep.2014; 9(4): 407-411.	2014	国外
Longitudinal Analysis of DNA Methylation in CD34+ Hematopoietic Progenitors in Myelodysplastic Syndrome.	Wong YF, Micklem CN, Taguchi M, Itonaga H, Sawayama Y, Imanishi D, Nishikawa S, <u>Miyazaki Y</u> , Jakt LM.	Stem Cells Transl Med 2014;3(10):1188-1198.	2014	国外



Somatic mutations and clonal hematopoiesis in aplastic anemia,	Yoshizato T, Dumitriu B, Hosokawa K, Makishima H, Yoshida K, Townsley D, Sato-Otsubo A, Sato Y, Liu D, Suzuki H, Wu C, Shiraishi Y, Clemente MJ, Kataoka K, Shiozawa Y, Okuno Y, Chiba K, Tanaka H, Nagata Y, Katagiri T, Kon A, Sanada M, Scheinberg P, Miyano S, Maciejewski JP, <u>Nakao S</u> , Young NS, <u>Ogawa S</u>	N Eng J Med.	in press	国外
Induction of HLA-B*40:02-restricted T cells possessing cytotoxic and suppressive functions against hematopoietic progenitor cells from a patient with severe aplastic anemia.	Inaguma Y, Akatsuka Y, Hosokawa K, Maruyama H, Okamoto A, Katagiri T, Shiraishi K, Murayama Y, Tsuzuki-Iba S, Mizutani Y, Nishii C, Yamamoto N, Demachi-Okamura A, Kuzushima K, <u>Ogawa S</u> , Emi N, Nakao S.	Br J Haematol	in press.	国外
Increased glycosylphosphatidylinositol-anchored protein-deficient granulocytes define a benign subset of bone marrow failures in patients with trisomy 8.	Hosokawa K, Sugimori N, Katagiri T, Sasaki Y, Saito C, Seiki Y, Mochizuki K, Yamazaki H, Takami A, Nakao S	Eur J Haematol	2014, in press.	国外
Constitutive activation of the ATM/BRCA1 pathway prevents DNA damage-induced apoptosis in 5-azacytidine-resistant cell lines.	Imanishi S, Umezu T, Ohtsuki K, Kobayashi C, Ohyashiki K, Ohyashiki JH	Biochem Pharmacol, 2014 89(3): 36: 1-9.	2014	国外

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

RESEARCH ARTICLE

# Acquired Initiating Mutations in Early Hematopoietic Cells of CLL Patients

Frederik Damm<sup>1,3</sup>, Elena Mylonas<sup>1,3</sup>, Adrien Cosson<sup>4,5</sup>, Kenichi Yoshida<sup>12,15</sup>, Véronique Della Valle<sup>1,3,9</sup>, Enguerran Mouly<sup>1,3,9</sup>, M'boyba Diop<sup>1,3</sup>, Laurianne Scourzic<sup>1,3,9</sup>, Yuichi Shiraishi<sup>13,14</sup>, Kenichi Chiba<sup>13,14</sup>, Hiroko Tanaka<sup>13,14</sup>, Satoru Miyano<sup>13,14</sup>, Yoshikane Kikushige<sup>16,17</sup>, Frederick Davi<sup>4,5,6</sup>, Jérôme Lambert<sup>7</sup>, Daniel Gautheret<sup>3,10</sup>, Hélène Merle-Béral<sup>4,5,6</sup>, Laurent Sutton<sup>11</sup>, Philippe Dessen<sup>1,3</sup>, Eric Solary<sup>2,3,8,9</sup>, Koichi Akashi<sup>16,17</sup>, William Vainchenker<sup>2,3,9</sup>, Thomas Mercher<sup>1,3,9</sup>, Nathalie Droin<sup>2,3,9</sup>, Seishi Ogawa<sup>12,15</sup>, Florence Nguyen-Khac<sup>4,5,6</sup>, and Olivier A. Bernard<sup>1,3,8,9</sup>