

MDS の分子メカニズム

小川 誠司

要約 骨髄異形成症候群 (MDS) は血球形態の異常を伴う骨髄不全・血球減少と急性骨髄性白血病 (AML) への移行を特徴とする慢性骨髄系腫瘍で、主として 60 歳以上の高齢者に好発する。1990 年代に分子病態の理解が進んだ AML とは対照的に、従来、その病態には不明な点が多かったが、今世紀にはいって、本症の発症に関わる遺伝変異の同定が進みその病態の解明に著しい進展が認められた。特に、DNA メチル化やクロマチン修飾に関わる一群の遺伝子の異常に伴うエピジェネシス制御の異常や RNA スプライシングの異常は本症の病態を特徴づける病態として近年注目を集めている。本総説ではゲノム解析を通じた MDS 研究の最近の進歩について概説する。

Key words : 骨髄異形成症候群 (MDS), 全エクソンシーケンス, RNA スプライシング

(日老医誌 2013; 50: 576-582)

はじめに

骨髄異形成症候群 (MDS) は無効造血による血球減少、血球の形態異常と急性骨髄性白血病 (AML) への移行を特徴とする難治性造血器腫瘍である¹⁾。我が国における正確な疫学統計はないが、米国における検討からの推計によれば、我が国においても年間 5,000 例以上が発症し、近年人口の高齢化と二次性 MDS のリスクとなる化学療法剤の汎用化ともなって、近年増加傾向にある。治療については、5q を特徴とする一部の病型に対する lenalidomide²⁾ や高リスク MDS の一部に対する 5Azacytidine の有効性が示されているが³⁾、同種造血幹細胞を除いて根治的な治療手段は知られていない。患者の多くは移植の適応とならない 60 歳以上の高齢者であることから、より副作用が少なくかつ有効な治療手段の開発が急務である。一方、その分子病態については、今世紀に入る以前には RAS 遺伝子や TP53 遺伝子の変異が MDS の進展に関わることが知られるのみで、MDS の発症の基盤となる遺伝子変異に関する知見に乏しく、その分子病態の多くは不明であった。ところが、近年、高密度マイクロアレイによるゲノムコピー数解析技術とゲノムシーケンス技術の革新によって、MDS の発症や進展に関わる遺伝子異常が次々と同定され、その分子病態の解明に大きな進展が認められつつある。

ゲノム異常としての MDS

他の悪性腫瘍と同様、MDS はゲノムの異常に起因する造血前駆細胞のクローン性増殖によって引き起こされる疾患である。従って MDS の病態を理解するためにはこのようなゲノムの異常によってどのような遺伝子の機能が障害され、その結果どのような生物学的効果が生ずるのかを理解することが本質的に重要である。MDS においては、AML の場合に責任遺伝子同定の有力な手段となった病型特異的な染色体異常が殆ど認められないことから、従来、その責任遺伝子の同定は難航を極めたのであるが、近年、ゲノム解析技術の格段の進歩を背景としてその発症に関わる遺伝子異常の同定が急速に進んでいる⁴⁾。

MDS におけるゲノムの異常の解析

MDS における責任遺伝子の同定の最初の突破口となったのは、高密度 SNP アレイを用いたゲノムワイドなコピー数解析技術の開発と、これに続く大量並列シーケンス技術の開発である。SNP アレイは当初、ゲノムワイド関連解析に必要とされる大規模 SNP タイピングの目的に開発されたアレイであるが⁵⁾、数十万から百万を超えるアレル特異的なプローブから得られるシグナルを定量的に評価することにより、ゲノムコピー数の測定を可能にしており、現在広く癌ゲノムの解析に用いられている解析技術である^{6)~8)}。癌ゲノムに生じた微細なゲノムコピー数の変化の検出とともに、従来の解析技術で

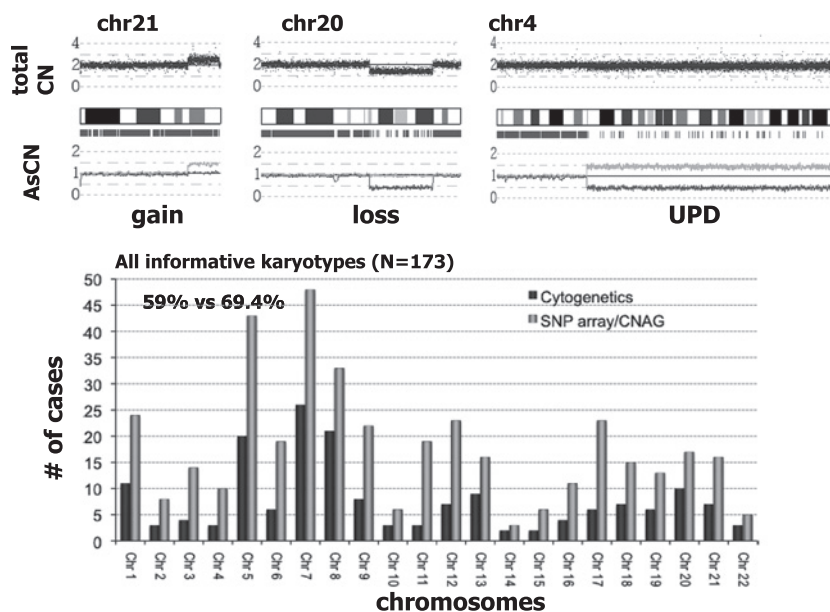


図1 SNP アレイを用いたゲノムコピー数の定量

SNP アレイによるゲノムコピー数解析では、数十万～数百万個のアレル特異的なプローブにおけるシグナルを定量的に評価することによって、従来の染色体分析では全く同定ができなかった微細なゲノムコピー数の変化を詳細に捉えることができる。SNP アレイによるゲノムコピー数解析では、従来の染色体分析と比較して、1.5 倍程度多数のコピー数変化を同定することができる。

は原理的に困難であった、コピー数の変化を伴わないヘテロ接合性の消失 (LOH) を鋭敏に捕らえることが可能で (図 1)⁹⁾、後述する *TET2* や *EZH2* は、MDS の SNP アレイによって同定された微小な欠失や LOH 領域の解析を通じて見出された遺伝子である。

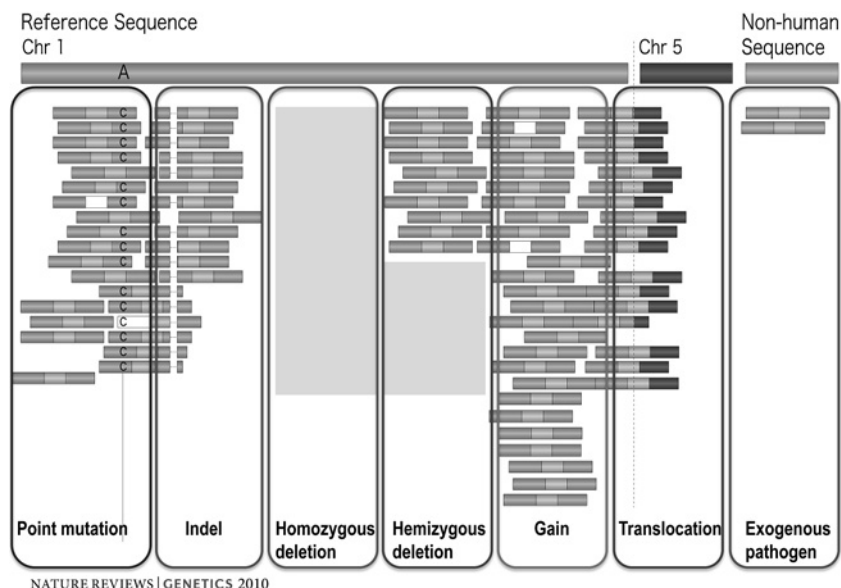
一方、最近広く普及しつつある大量並列シーケンス技術によって、がんにおける遺伝子変異のより直接的かつ網羅的な同定が可能となった。様々な platform がこの目的に開発されているが、代表的な platform の一つである Illumina 社のシーケンサでは、次世代シーケンサを用いて数百万から数億の単一 DNA 断片に由来する分子クラスター上で相補的な DNA 鎖の塩基伸長反応を行うことにより大量並列シーケンスが行われる。ここでは、多数の分子クラスターから得られる～100 bp 程度のショートリードをヒトゲノムの参照配列に照合したのち、シーケンスの過程で一定の確率で不可避免的に生ずるエラーを評価・除去することによりゲノムの 90% 以上の塩基配列が決定される¹⁰⁾。現在、その性能は一回の run あたり 6,000 億塩基対 (ヒトゲノム全長の 200 倍) に達しており、なおその性能の向上が図られつつある。大量並列シーケンスを用いたがんゲノムの解析では、がんおよび正常組織由来のゲノム DNA を平均 30～40 倍の深度でシーケンスしたのち、両者の塩基配列を比較検討することにより、がんゲノムで特異的に生じている体細胞

変異 (塩基置換、微小な配列の挿入や欠失) や染色体転座、ゲノムコピー数の異常を網羅的に同定することができる (図 2)¹¹⁾。また、がんの発症に関わるのは遺伝子配列のなかでアミノ酸の変化を伴うような変異が特に重要であることから、ゲノム配列の中からエクソン配列のみをハイブリダイゼーションによって濃縮し、これを上述した高速シーケンサで解析する全エクソンシーケンス解析もしばしば用いられる (図 3)¹²⁾。

近年の MDS 病態研究の主要な成果は、これらの技術を用いて明らかにされた新たな遺伝子変異の同定によってもたらされたものである。これらは (1) エピジェネシス制御に関わる一群の遺伝子に関する変異の発見と (2) RNA スプライシング装置を標的としたパスウェイ変異の発見に集約される。

エピジェネシス制御に関わる遺伝子変異の同定

フランス INSREM の O. Bernard らのグループおよびオランダの J. Jansen らのグループは MDS の SNP アレイ解析から見出された 4 番染色体の微小欠失領域から同染色体に集積する LOH の標的遺伝子として *TET2* 遺伝子を同定した¹³⁾¹⁴⁾。*TET2* 遺伝子は 4 番染色体の LOH を認める症例を中心として高頻度に遺伝子変異を生じており、MDS の他 AML や MPN においてもしばしば遺伝子変異や欠失によって不活化されていることが明らか



(Mathew Meyerson, Nat Rev Genetics, 2010より改編)

図2 全ゲノムシーケンスによるがんゲノムの解析

大量並列シーケンスを用いたがんゲノムの解析では、一塩基の置換、塩基の挿入や欠失、ゲノムコピー数の変化（ホモ接合性欠失、ヘミ接合性欠失、およびコピー数の増加）や染色体の転座を直接的に同定することが可能である。

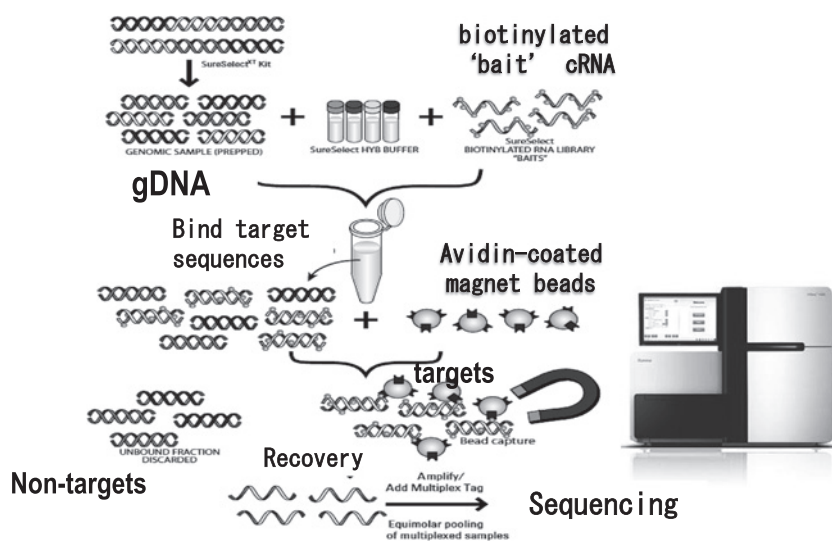
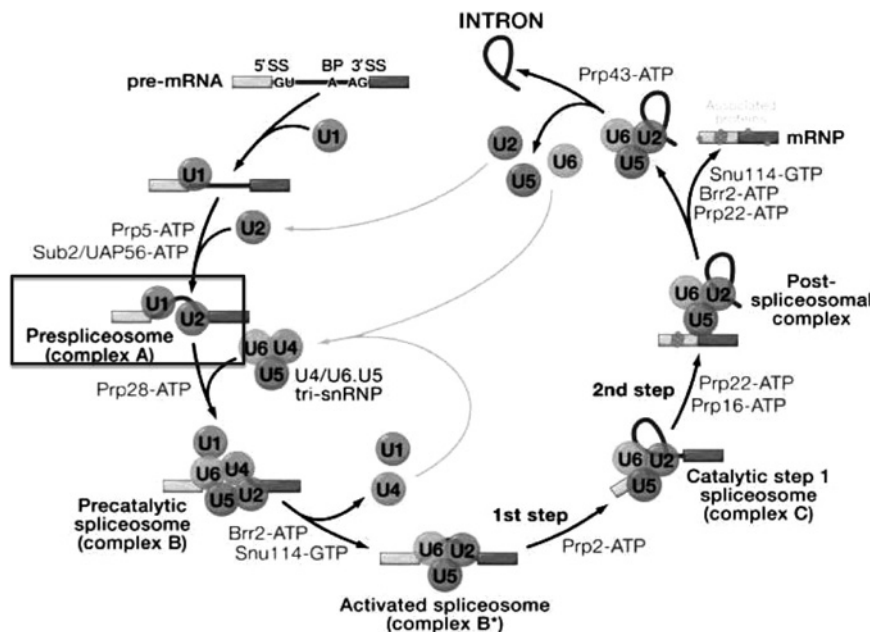


図3 大量並列シーケンスによる全エクソン解析

ゲノム配列のうちタンパクをコードする配列は全ゲノムの1/100程度である。全エクソンシーケンスでは、ゲノムDNAを断片化した後、全エクソンの配列を化学合成した“bait”配列とハイブリダイズさせたのち、これを回収し高速シーケンサで解析する。シーケンスの対象となる領域が全ゲノムの1/100程度であることから、アミノ酸置換を伴うような遺伝子変異を高率よく同定することができる。

となった。また、英国のN. Crossおよび上述のJansenらのグループは、7番染色体の微小欠失領域の解析からEZH2と呼ばれるポリコム複合体の構成要素がMDSの5~10%内外の症例で変異を生じていることを報告した

(図4)¹⁵⁾¹⁶⁾。一方、米国のT. LeyらのグループはAMLの全ゲノムシーケンスによってisocytate dehydrogenase 1 (IDH1)と呼ばれる、TCAサイクルの酵素をコードする遺伝子が、正常核型AMLの16%で繰り返し変



(Wahl MC, et al. Cell 136 : 701, 2009)

図6 RNA スプライシング装置

RNA スプライシングは、全ての有核細胞が有する遺伝情報の発現に必須のメカニズムで、多数のタンパク複合体がプレ伝令 RNA 上にリクルートされ、ATP の加水分解を含む一連の過程によって、エクソンの認識と介在配列（イントロン）の除去が行われ、最終的な伝令 RNA が作られる。MDS では RNA スプライシングに関わる複数の因子に変異が生ずるが、変異を生ずる因子の殆どはその初期における 3' スプライス部位の認識に関わる因子である。

についてはなお今後の研究を要する。

RNA スプライシングに関わる遺伝子の変異

上述したごとく、エピジェネシスの制御に関わる遺伝子の変異は MDS で高頻度に変異を認めることからその MDS の発症への関与は明らかである。一方、これらの変異を含めて今までに MDS で報告されてきた変異の殆どは AML や骨髄増殖性疾患などでもしばしば変異が認められることから、従来報告されてきた遺伝子変異のみでは、MDS に特異的な病態を説明することが難しい。また、これらの変異や染色体異常を全て勘案してもゲノムの異常が全く証明できない症例が 5~10% 内外の割合で認められる。MDS の発症のメカニズムに関する新たな突破口は大量並列シーケンスを用いた MDS の網羅的変異解析によってもたらされた。2011 年、Sanger 研究所の P. Campbell らのグループおよび我々の研究グループは MDS の全エクソン配列のシーケンスを行うことにより、RNA スプライシングに関わる一群の遺伝子が MDS および関連疾患で高頻度かつ特異的に変異を生じていることを報告した²³⁾²⁴⁾。すなわち、MDS では RNA スプライシングに関わる少なくとも 8 つの遺伝子

(SF3B1, SRSF2, U2AF35, ZRSR2, U2AF65, ZRSR2, SF1, PRPF40B) が、MDS の様々な亜型および CMML において、45~85% という非常に高い頻度に変異を生じていることが明らかとなった。一方、de novo AML や古典的な MPN ではこれらの変異頻度は 10% 以下となっていることから、これらの変異は骨髄異形成を特徴とする MDS および CMML にはほぼ特異的である。とくに、環状鉄芽球の増加 (>15%) を特徴とする RARS ないし RCMD-RS の病型においては、SF3B1 変異が 76~82% の割合で生じていること、また他の病型においても SF3B1 変異を有する症例では環状鉄芽球の軽度の上昇が殆どの症例で確認されることから、事実上鉄芽球性貧血の原因遺伝子となっていることが判明した²⁵⁾。

RNA スプライシングは、DNA から転写されたプレ伝令 RNA から、介在配列の除去とエクソン配列の再構成によって多様な伝令 RNA を生成するメカニズムで、有核細胞におけるタンパクの多様性を実現する上で重要な役割を担っている。機能的には 300 を超える多様なタンパクないしタンパクリボ核酸複合体がプレ伝令 RNA 上にリクルートされ、多数の反応をへてエクソン・イントロン境界の認識と介在配列の除去が行われる(図 6)²⁶⁾。

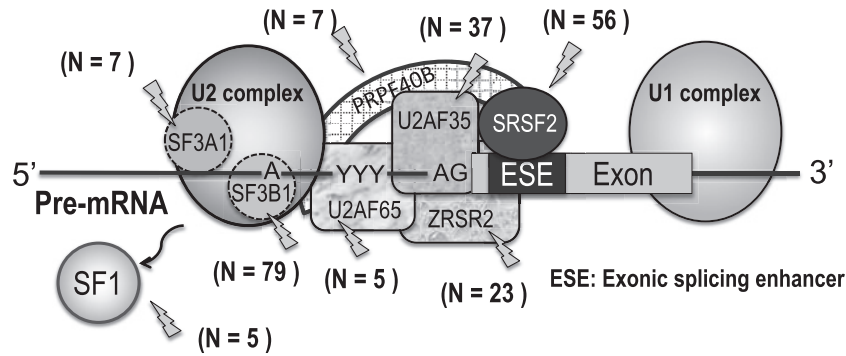


図7 MDSおよび関連疾患におけるスプライシング因子の変異

MDSおよび関連疾患では、スプライシング装置の、3'スプライス部位の認識に関わる一群の因子が選択的に変異を生じている(上段)。U2snRNPの構成要素であるSF3B1、SRSF2、ZRSR2を主要な標的として、3'スプライス部位の認識に関わる少なくとも8つの因子が互いにほぼ排他的に変異を生じていることから、3'スプライス部位の認識がこれらの変異の共通の機能的な標的であると考えられる。

RNA スプライシングの初期段階においては、U1snRNP複合体による5'スプライス部位の認識に続いて、U2AF35およびU2AF65からなるU2AFヘテロ二量体、ZRSR2、SF1およびスプライシングエンハンサーを認識するSRタンパク(SRSF1/2)とU2snRNP複合体による3'スプライス部位の認識が行われる²⁶⁾。興味深いことにMDSで変異を生ずる因子の殆どはRNAスプライシングの3'スプライス部位の認識に関わる分子で、これらの変異が殆ど重複することなく生じていることが顕著な特徴となっている(図7)²³⁾。このことは、これら一群の変異が3'スプライス部位の認識を機能的な標的として生じていること、その異常がMDSの発症に重要な役割を担っていることを強く示唆している。また、主要な変異標的となっているSF3B1、U2AF35、SRSF2およびZRSR2のうち、ZRSR2については、変異がコーディングのほぼ全長にわたって分布しており、多くがナンセンス変異ないしフレームシフト変異などタンパクの短小化を生ずる変異となっていることから、その機能の喪失がMDSの病態に重要であることが示唆される。一方、U2AF35ではS34とQ157、SRSF2ではP95、またSF3B1ではK700を中心とした5つ程度のアミノ酸部位にほぼ局限していることから、これらの変異が単純な機能喪失ではなく機能獲得型の変異となっていることが推察されている²³⁾²⁴⁾。

既に述べたとおり、これらの変異は骨髓異形成をともなうMDSおよびCMMLに特異的であることから、これらの病態を特徴づける変異となって可能性が強く示唆される。一方、変異アレルの導入によってRNAスプライシングの異常が惹起されることは一部の变異アレルについては示されているが、これらの変異がMDSの発症

を誘導するメカニズムについては明らかではなく、今後の検討が待たれるところである。

まとめ

近年のゲノム解析によるMDSの病態解明の進歩について概説した。ゲノムシーケンス技術の革新によって、がんゲノムの全塩基配列を決定するという従来全く考えられなかった方法で主要ながんの発症に関わる遺伝子変異を同定することが可能となった。本稿ではMDSにおけるゲノム解析の初期の成果をSNPアレイ解析や全エクソン解析を中心に紹介したが、今後全ゲノム解析も含めたより多数例での解析が進み、MDSの発症に関与する遺伝子変異の全貌がはっきりとされることが思われる。一方、このようにして見出された変異の機能的な詳細についてはなお多くが不明である。MDSの分子病態の理解と新たな治療手段の開発のためには、このような変異による機能的な効果を明らかにすることが是非とも必要である。また、こうして明らかにされた多数の遺伝子変異と予後・治療反応性を含めた臨床像との関連を明らかにすることも重要である。今後の研究成果が期待される。

文献

- 1) Corey SJ, Minden MD, Barber DL, Kantarjian H, Wang JC, Schimmer AD: Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 118-129.
- 2) List A, Dewald G, Bennett J, Giagounidis A, Raza A, Feldman E, et al: Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *The New England journal of medicine* 2006; 355: 1456-1465.
- 3) Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, et al: Efficacy of azacitidine

- compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *The lancet oncology* 2009; 10: 223-232.
- 4) Bejar R, Levine R, Ebert BL: Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011; 29: 504-515.
 - 5) Kennedy GC, Matsuzaki H, Dong S, Liu WM, Huang J, Liu G, et al: Large-scale genotyping of complex DNA. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 1233-1237.
 - 6) Matsuzaki H, Dong S, Loi H, Di X, Liu G, Hubbell E, et al: Genotyping over 100,000 SNPs on a pair of oligonucleotide arrays. *Nat Methods* 2004; 1: 109-111.
 - 7) Nannya Y, Sanada M, Nakazaki K, Hosoya N, Wang L, Hangaishi A, et al: A robust algorithm for copy number detection using high-density oligonucleotide single nucleotide polymorphism genotyping arrays. *Cancer Res* 2005; 65: 6071-6079.
 - 8) Yamamoto G, Nannya Y, Kato M, Sanada M, Levine RL, Kawamata N, et al: Highly sensitive method for genomewide detection of allelic composition in non-paired, primary tumor specimens by use of affymetrix single-nucleotide-polymorphism genotyping microarrays. *Am J Hum Genet* 2007; 81: 114-126.
 - 9) Sato-Otsubo A, Sanada M, Ogawa S: Single-Nucleotide Polymorphism Array Karyotyping in Clinical Practice: Where, When, and How? *Seminars in Oncology* 2012; 39: 13-25.
 - 10) Shendure J, Ji H: Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology* 2008; 26: 1135-1145.
 - 11) Meyerson M, Gabriel S, Getz G: Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. *Nature reviews Genetics* 2010; 11: 685-696.
 - 12) Campbell PJ, Stephens PJ, Pleasance ED, O'Meara S, Li H, Santarius T, et al: Identification of somatically acquired rearrangements in cancer using genome-wide massively parallel paired-end sequencing. *Nature genetics* 2008; 40: 722-729.
 - 13) Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Masse A, et al: Mutation in TET2 in myeloid cancers. *The New England journal of medicine* 2009; 360: 2289-2301.
 - 14) Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, Knops R, Aslanyan MG, Massop M, et al: Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nature genetics* 2009; 41: 838-842.
 - 15) Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones AV, et al: Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nature genetics* 2010; 42: 722-726.
 - 16) Nikoloski G, Langemeijer SM, Kuiper RP, Knops R, Massop M, Tonnissen ER, et al: Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nature genetics* 2010; 42: 665-667.
 - 17) Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, et al: Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *The New England journal of medicine* 2009; 361: 1058-1066.
 - 18) Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, et al: DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* 2010; 363: 2424-2433.
 - 19) Yan XJ, Xu J, Gu ZH, Pan CM, Lu G, Shen Y, et al: Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nature genetics* 2011; 43: 309-315.
 - 20) Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, et al: Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 2009; 324: 930-935.
 - 21) Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, et al: Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer cell* 2010; 18: 553-567.
 - 22) Fathi AT, Abdel-Wahab O: Mutations in epigenetic modifiers in myeloid malignancies and the prospect of novel epigenetic-targeted therapy. *Advances in hematology* 2012; 2012: 469592.
 - 23) Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, et al: Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* 2011; 478: 64-69.
 - 24) Papaemmanuil E, Cazzola M, Boulton J, Malcovati L, Vyas P, Bowen D, et al: Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *The New England journal of medicine* 2011; 365: 1384-1395.
 - 25) Malcovati L, Papaemmanuil E, Bowen DT, Boulton J, Della Porta MG, Pascutto C, et al: Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2011; 118: 6239-6246.
 - 26) Wahl MC, Will CL, Luhrmann R: The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 2009; 136: 701-718.