

DDX41 変異による R-loop の蓄積が造血器腫瘍を発症させる機序の解明

松井啓隆

国立がん研究センター 中央病院 臨床検査科

【研究の背景】

近年、急性骨髄性白血病(Acute myeloid leukemia, AML)や骨髄異形成症候群(Myelodysplastic neoplasms, MDS)を含む骨髄性造血器腫瘍において、10%以上と決して低くない頻度で生殖細胞系列病的遺伝子バリエントが発症に関与することが示されている。骨髄性造血器腫瘍の WHO 分類(第 5 版)では、遺伝的背景を伴う造血器腫瘍は、先行する血小板減少の有無と他臓器の異常の有無を基準に 3 つのカテゴリーに分類され、さらにこれは責任遺伝子または症候群別に 14 種類に細分されている。遺伝的背景を伴う造血器腫瘍の責任遺伝子として最も頻度が高いもののひとつが、*DDX41* である。本遺伝子は DEAD-box 型 RNA ヘリケースをコードし、翻訳産物(*DDX41* タンパク質)は主に核内で RNA の構造変換に関与すると考えられているが、生理的な機能や、本遺伝子にバリエントを有する造血細胞が骨髄性造血器腫瘍を発症する機序はまだ大半が不明である。

DDX41 バリエントによる骨髄性造血器腫瘍は、もともと片方のアレルに生殖細胞系列病的バリエントを有する個体が、後にもう片方のアレルに体細胞バリエントを獲得して発症する傾向が高いことが知られる。また、生殖細胞系列バリエントの多くがナンセンスバリエントやスプライスサイトバリエントを中心とする機能欠失型バリエントであるのに対し、体細胞バリエントは大半がヘリケースドメイン内の p.R525H に集中することが特徴である(Matsui and Hirata, IJH 2024)。臨床的には、遺伝的背景を有するにもかかわらず発症年齢が 60 代後半から 70 代と遅いこと、骨髄が低形成傾向を示すことが多いことなどが知られており、他の骨髄性造血器腫瘍とは明らかに異なる疾患表現型を示す。本遺伝子バリエントによる造血器腫瘍に対する血縁者間造血幹細胞移植では、ドナー選択の際に生殖細胞系列バリエントの有無を考慮する必要性が議論されており、実際、本遺伝子バリエントを持つドナー細胞に由来する AML の再発例も報告されている。今後造血器腫瘍に対する遺伝子パネル検査が実臨床下で行われるようになると、これまで見逃されてきた、本遺伝子バリエントによる造血器腫瘍の例がさらに多く検出されるようになることが予想される。このため、*DDX41* 異常による骨髄性造血器腫瘍の発症機序を理解し、かつそこから、早期介入を含む治療法の確立を目指す必要性が生じている。

これまで、骨髄性造血器腫瘍と関連付けた *DDX41* の機能解析は、我々自身のものを含め複数の論文が世に出されているが、実際のところ、細胞株やマウスを用いた実験系で本遺伝子バリエントの意義付けを行うことには限界があるのも事実である。これは、特に生殖細胞系列バリエントと体細胞バリエントの組み合わせを模倣するようなモデルでは、速やかに細胞が増殖活性を失い細胞死に至るためである。造血細胞移植マウスモデルで一部の個体が MDS に類似した病態を示すようになることは報告されているものの、安定的な系の確立が難しいことは、本疾患の包括的な理解を目指すうえでの妨げとなってきた。

【目 的】

造血器腫瘍の発症や進展に深く関与する、*DDX41* p.R525H バリエントの意義を明らかにすることを目的とした研究を実施した。p.R525 はヘリケースドメイン内の ATP が結合する部位に相当し、我々は過去に、p.R525H バリエントを持つ *DDX41* は ATPase 活性の減弱を呈することを報告した(Kadono et al. Exp Hematol 2016)。また、p.R525H バリエントを発現する細胞や *DDX41* の発現を減弱させた細胞は細胞増殖活性を大きく損なうが、この際ゲノム上には、R-loop と呼ばれる、DNA:RNA ハイブリッドと単鎖 DNA から構成される特殊な構造体が増加することを示してきた(Shinriki et al. Leukemia 2022)。我々は、

DDX41 が RNA スプライシングと転写伸長とを連携させる役割を担うと考えている。DDX41 の発現や機能が損なわれると、転写された RNA のスプライシング効率が低下する結果、R-loop が形成されやすい状況に至る。その結果、転写制御機構と DNA 複製機構との衝突が起りやすくなり、DNA 複製ストレスが生じる。DDX41 異常による DNA ストレスは必ずしも顕著なものではないが、顕著で無いがゆえに、細胞は複製ストレスを完全に修復しないままに分裂期を迎え、そこでチェックポイント機構が働くために G2 アレストを起こす。また、分裂に至った細胞では DNA 損傷が多く認められ、アポトーシスが誘導される (Matsui, Ontotarget 2024)。

本研究では、この一連の現象が p.R525H バリエントの獲得とどのように結びつか検討した。このため、Ddx41 p.R525H を発現誘導できる遺伝子改変マウスの造血幹細胞 (HSC) の遺伝子発現解析、および、生殖細胞系列バリエントと p.R525H バリエントを有する MDS 症例のシングルセルトランスクリプトーム解析 (scRNA-seq) を行った。

【方 法】

以下の 2 つの研究を実施した。

1) *Ddx41* 遺伝子改変マウスの HSC における遺伝子発現変化の解析

本マウスは、コンディショナルに *Ddx41* p.R525H を発現するマウスと、同遺伝子の片アレルを欠失したマウスとを掛け合わせて得られた、*Ddx41* R525H^{-/-}マウス (Shinriki et al. Leukemia 2022) を用いて行った。約 20 か月齢の高齢マウスと約 10 週齢のマウスにタモキシフェンを投与して p.R525H を発現誘導し、セルソーティングにより CD150⁺CD48⁻ LSK 分画を単離した。本細胞から RNA を抽出し、RNA シークエンス解析を行った。

2) *DDX41* バリエントを有する MDS 症例の scRNA-seq 解析

MDS と診断され、既知の生殖細胞系列バリエントを有し、かつ p.R525H 体細胞バリエントを持つ患者さんから文書による同意を受け、CD34 陽性骨髄細胞を用いて scRNA-seq 解析を行った。TAS-Seq と称する高効率なライブラリー作成方法を用い、また凍結保存を経ず生細胞から直接処理する手順を採用することで、高品質なライブラリー作成を可能とした。加えて、R525 部位の genotyping を組み合わせることで、シングルセルレベルで、p.R525H バリエントを持つ細胞と生殖細胞系列バリエントのみを持つ細胞とを区別した遺伝子発現解析の基盤を構築した。

【結 果】

1) *Ddx41* 遺伝子改変マウスの HSC における遺伝子発現変化の解析

研究の背景に記載の通り、*Ddx41* R525H^{-/-}マウスでタモキシフェンにより p.R525H の発現を誘導すると速やかに造血不全に陥った。得られた CD150⁺CD48⁻ LSK 細胞で RNA-seq 解析を行うと、R525H^{-/-}細胞 (ヘテロノックアウトマウスに p.R525H を誘導したもの) と R525H/WT (野生型マウスで p.R525H を誘導したもの) とでは遺伝子発現変化のパターンが大きく異なり、両アレルの異常が *DDX41* 関連造血器腫瘍に特異的な変化を導くことが示唆された。

2) *DDX41* バリエントを有する MDS 症例の scRNA-seq 解析

約 3 万の細胞に対して、解析に有効な遺伝子発現情報が得られた。また、p.R525 部位の genotyping を行い、生殖細胞系列バリエントのみを持つ細胞約 7 千、p.R525H を持つ細胞約 1 万に区別し、両者の遺伝子発現を直接的に比較した (Matsui et al. preprint)。本症例では正常ドナー細胞と比べ HSC 分画が顕著に減少する一方、GMP 分画への蓄積が認められた。また詳細な解析の結果、Early GMP 分画において本来 HSC で機能すべき転写制御の存在が示唆されるとともに、Early GMP を起点とする細胞分化の遷移が認められたことから、本例では、この細胞分画が MDS stem cell として機能していると考えられた。

p.R525H バリエントを持つ細胞と持たない細胞との直接比較では、赤血球系への特定の分化段階において、p.R525H を有する細胞特異的に細胞分裂障害が起こることが明らかとなった。GSEA 解析の結果、これには R-loop の蓄積を伴うことが示唆され、我々がこれまでに示してきた細胞株やマウスで認められた R-loop の増加が、細胞種特異的に臨床検体でも認められた。骨髄球系細胞における遺伝子発現の相違は軽微で、p.R525H バリエントを持つ細胞と持たない細胞との相互作用の影響が示唆された。

【考 察】

近年の網羅的遺伝子変異解析の進展により、遺伝的素因を伴う骨髄性造血器腫瘍の頻度が過去に想定されていたよりも高い傾向にあることが明らかとなりつつある。とりわけ、*DDX41* 遺伝子バリエーションに関連する MDS や AML は、発症年齢が高い点、骨髄低形成を示す傾向にある点、男性に発症することが多い点などのほかに無い特徴があり、遺伝的素因を伴う骨髄性造血器腫瘍の中でも最も頻度が高いもののひとつであることもあつて (Arai et al. IJMS 2024)、近年注目を集めている。一方で、RNA ヘリケースを責任遺伝子とする造血器腫瘍はこれまであまり知られておらず、*DDX41* の生理学的な機能も明確でないこともあり、疾患発症機序はまだ多くが明らかにされていない。自然免疫応答への関与も示唆されているが (Singh et al Cell Rep 2022)、我々が解析した範囲では臨床検体においてその傾向は明らかではなかった。生殖細胞系列 *DDX41* バリエーションについても、個々のバリエーションに対する病的意義の有無も十分に明らかでないことから (Matsui and Hirata. IJH 2024, Tierens et al, Front Oncol 2023)、今後造血器腫瘍遺伝子パネル検査が実臨床レベルで開始されたのち、臨床現場で混乱が生じることも懸念される。このようなことから、*DDX41* 関連造血器腫瘍の疾患特異性をバリエーションの病的意義と関連付けながら研究する必要性が生じている。

本研究では、マウスモデルとヒト疾患細胞とを駆使し、体細胞バリエーションとして最も典型的な p.R525H の意義を明らかにした。本研究で採用したアプローチをさらに多数症例で採用することで、本疾患の全容が明らかとなることが期待される。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

現在造血器腫瘍においても、腫瘍細胞が獲得した遺伝子バリエーションのパターンから疾患を層別化し、治療方針の決定に役立てることが標準的になりつつある。さらに、生殖細胞系列バリエーションの有無を考慮し造血幹細胞移植ドナーを選定することや、長期的な予後予測を踏まえた対応を図るなどの必要性が生じている。このようななかで、遺伝的素因を伴う骨髄性造血器腫瘍の原因として特に頻度が高い *DDX41* の機能を明らかにすることは、その表現型の特殊性と相まって大きな意義があるといえ、今後も本研究を継続する必要がある。

【参考・引用文献】

- 1) [Matsui H](#). *DDX41* and its unique contribution to myeloid leukemogenesis (Editorial). *Oncotarget* 15: 442-443, 2024.
- 2) [Matsui H](#), Hirata M. Evaluation of the pathogenic potential of germline *DDX41* variants in hematopoietic neoplasms using the ACMG/AMP guidelines. *Int J Hematol* 119(5): 552-563, 2024.
- 3) Arai H, [Matsui H](#), Chi S, Utsu Y, Masuda S, Aotsuka N, Minami Y. Germline variants and characteristic features of hereditary hematological malignancy syndrome. *International Journal of Molecular Sciences* 25(1): 652, 2024
- 4) Shinriki S, Hirayama M, Nagamachi A, Yokoyama A, Kawamura T, Kanai A, Kawai H, Iwakiri J, Liu R, Maeshiro M, Tungalag S, Tasaki M, Ueda M, Tomizawa K, Kataoka N, Ideue T, Suzuki Y, Asai K, Tani T, Inaba T, [Matsui H](#). *DDX41* coordinates RNA splicing and transcriptional elongation to prevent DNA replication stress in hematopoietic cells. *Leukemia* 236(11): 2605-2620, 2022.
- 5) Tierens A, Kagotho E, Shinriki S, Seto A, Smith AC, Care M, Maze D, Sibai H, Yee KW, Schuh AC, Kim DDH, Gupta V, Minden MD, [Matsui H](#), Capo-Chichi JM. Biallelic disruption of *DDX41* activity is associated with distinct genomic and immunophenotypic hallmarks in acute leukemia. *Front Oncol* 13. 1153082, 2023.
- 6) Singh RS, Vidhyasagar V, Yang S, Arna AB, Yadav M, Aggarwal A, Aguilera AN, Shinriki S, Bhanumathy KK, Pandey K, Xu A, Rapin N, Bosch M, DeCoteau J, Xiang J, Vizeacoumar FJ, Zhou Y, Misra V, [Matsui H](#), Ross SR, Wu Y. *DDX41* is required for cGAS-STING activation against DNA virus infection. *Cell Rep*. 39(8):110856, 2022.
- 7) Kadono M, Kanai A, Nagamachi A, Shinriki S, Kawata J, Iwato K, Kyo T, Oshima K, Yokoyama A, Kawamura T, Nagase R, Inoue D, Kitamura T, Inaba T, Ichinohe T, [Matsui H](#). Biological implication of somatic *DDX41* p.R525H mutation in acute myeloid leukemia. *Exp. Hematol*. 44(8): 745-754, 2016.