

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K09905

研究課題名(和文) デジタルPCR法による好酸球増多症候群の診断のマルチバイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Development of a multi-biomarker for the diagnosis of hypereosinophilic syndrome by digital PCR

研究代表者

定 明子 (SADA, AKIKO)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：90467655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：原因不明な様々な好酸球増加症は好酸球増多症候群(HES)と総称される。一部のHESにはチロシンキナーゼ阻害剤イマチニブが有効な例が存在するがその分子メカニズムは不明である。本研究は様々な原因の好酸球増多症患者の末梢血血球を用いて、病態に関連する異常な遺伝子発現量をPCRアレイ法によりスクリーニングし、デジタルPCR法により少量mRNA量を測定するHESの診断性および治療反応性予測のバイオマーカーの開発を試みた。数人のイマチニブが有効なFIP1L1-PDGFR α 陰性HESではイマチニブが標的とする単一あるいは複数の遺伝子発現量が亢進し治療反応性バイオマーカーとなる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原因不明の好酸球増加症であるHESと診断される患者は現在も絶えず、好酸球増加性疾患を鑑別するのに有効な診断技術はまたない。

本研究の目的は末梢血中において好酸球増加症の様々な病態と関連した複数の遺伝子の発現異常を調べることにより、好酸球増加症が良性か悪性か、イマチニブ(慢性骨髄性白血病の治療薬)が有効か否かに関連するバイオマーカーを複数組み合わせ、複雑なHESの病態を予測する診断法を開発することである。

本研究で解明する好酸球増加症の様々な病態に関連した複数遺伝子発現パターンの違いは、マルチバイオマーカーとしての臨床応用が可能であり好酸球性疾患の診断技術の向上に貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Hypereosinophilic syndromes (HES) are heterogeneous diseases associated with eosinophilia of unknown cause. In some patients with HES, the tyrosine kinase inhibitor imatinib is effective, but the molecular mechanism is not well understood. We attempted to develop biomarkers for diagnosing HES and predicting therapeutic responses.

Using peripheral blood cells of patients with various eosinophilia, we screened the abnormal gene expression level related to the pathological condition of eosinophilia by the PCR array. Then, we tried to develop a system to measure the small amount of mRNA by the digital PCR method.

In some FIP1L1-PDGFR α -negative HES, in which Imatinib is effective, the expression levels of several genes targeted by Imatinib are upregulated and can serve as biomarkers for therapeutic response.

研究分野：血液内科学

キーワード：好酸球増加症候群

1. 研究開始当初の背景

好酸球の増加を起こす疾患は様々であり、高度な好酸球増加症では症状や一般検査からは原因を特定することが困難なことが多い。原因不明の好酸球増加症である HES は、良性疾患や悪性疾患などさまざまな種類の好酸球増加症を含むが、適切な診断・治療法の選択に結びつく有用な指標は存在しない。

代表者らは全国多施設からの依頼症例に対し共同して診断を行い、イマチニブが有効な *FIP1L1-PDGFR*(F-P)キメラ遺伝子の有無を検査し、HES の臨床像や実態を調査してきた。

その経験から固形癌や血液腫瘍に伴う様々な悪性疾患や日常診療で遭遇する良性疾患の中にも著名な末梢血好酸球増加症を伴うことがあること、F-P キメラ遺伝子を持たない症例にもイマチニブ有効例があることなどがわかってきた。臨床診断ができない複雑な好酸球増多症を診断するために、これまでのひとつの遺伝子変異バイオマーカーを診断の拠り所にする方法ではなく、病態に関連して変動する複数の遺伝子発現量異常をパターン化して病態を包括的に評価するスクリーニング検査が切望されている。

2. 研究の目的

本研究では好酸球増加症の鑑別診断にかかる時間の短縮や診断精度を高めるために、好酸球増多症の病態と関連性のある複数の遺伝子発現パターンを多数の遺伝子群の中から選び出し、微量な mRNA 発現量の測定が可能なデジタル PCR 法を用いて同時測定するマルチバイオマーカー診断システムを開発する。

3. 研究の方法

(1). 好酸球増加症の臨床像と疫学解析

多施設共同研究による好酸球増多症候群の臨床研究において得られた様々な好酸球増加症の臨床データを整理し、臨床像と疫学データを解析した。

(2). PCR アレイの遺伝子発現解析によるバイオマーカー候補のスクリーニング

過去に研究の一環として好酸球増加症患者から採血された末梢血由来白血球において *FIP1L1-PDGFR* キメラ遺伝子検査を行った後に凍結保存された残余検体を用いた。PCR アレイ法により、チロシンキナーゼ、EGF/PDGF シグナル伝達経路、細胞周期、低酸素経路の 4 種類のシグナル関連遺伝子トータル約 380 個の遺伝子発現量を測定し、多変量解析により病態と関連する遺伝子を選出した。

(3). デジタル PCR 法によるバイオマーカー候補遺伝子の発現解析

(2)で得られたバイオマーカー候補遺伝子群に対し、デジタル PCR 法による遺伝子発現の定量解析を行う。

4. 研究成果

(1). 好酸球増加症の臨床像と疫学解析

202 名の様々な好酸球増加症患者では、図 1 に示すように末梢血中好酸球増加症の程度を末梢血好酸球数 500/ μ l, 1500/ μ l, 5000/ μ l を区切りに軽度、中等度、高度と分けると、過半数(76.7%)が高度の好酸球増加症であった。また、特発性(原因不明)、原発性(骨髄の異常が原因の血液腫瘍)、反応性(骨髄以外が原因のアレルギー性や寄生虫感染症など)の割合はそれぞれ 22%、14%、63%であり反応性好酸球増加症が非常に多いことがわかった(図 2(a))。男女比は原発性好酸球増加症群が男性優位(27:2)を示し、原因は不明であるが *FIP1L1-PDGFR* 遺伝子陽性例のほとんどが男性であるという報告に合致していた(図 2(b))。

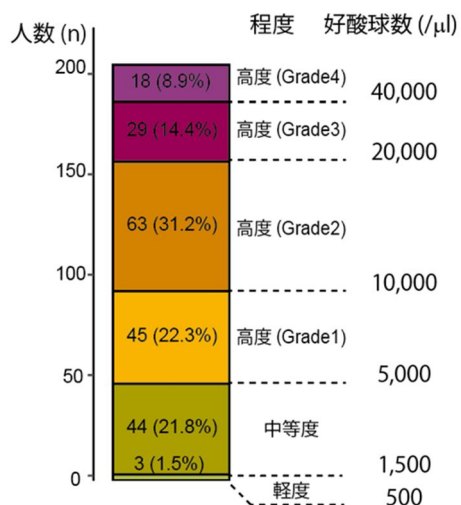


図1. 好酸球増加症患者の好酸球増加症の程度と割合 (%)

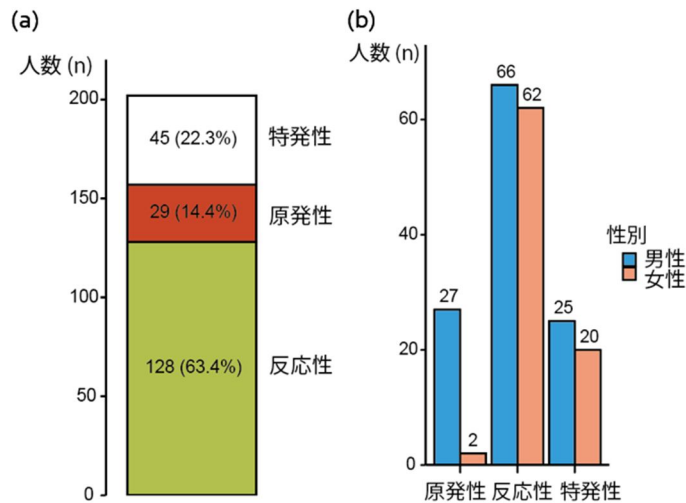


図2. 好酸球増加症の原因(a)と男女比(b)

(2). PCR アレイの遺伝子発現解析によるバイオマーカー候補のスクリーニング

PCR アレイ解析は様々な代表的な原因の好酸球増加症患者 11 名(F-P 陽性白血病、F-P 陰性白血病、前白血病、進行性 HES、固形癌、良性疾患)の末梢血検体を用いて行った。そのうちイマチニブが有効な症例は 3 例あり、それぞれイマチニブが標的とする単一あるいは複数の遺伝子発現量がイマチニブ不応例と比較して亢進しており治療反応性への関連性が示唆された。また、良性疾患、悪性疾患では複数遺伝子発現量パターンには明らかな違いが認められた(論文投稿準備中)。

(3). デジタル PCR 法によるバイオマーカー候補遺伝子の発現解析

デジタル PCR 法とは、核酸(mRNA/DNA)を含む微量なサンプル中に 2 万個もの微細なドロップレット(泡)を作成し、それぞれの反応系で個別に PCR 反応を行う。すなわち微量なサンプルを用いて 2 万回の PCR 法を同時に行う精度の高い遺伝子発現定量法である。(2)で得られたバイオマーカー候補遺伝子の発現パターンがデジタル PCR 法でも再現可能かについて検討中である。デジタル PCR 法での複数遺伝子発現量の同時測定はスクリーニング検査の臨床応用に繋がり、診断に至るまでの時間を短縮することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計7件

| | |
|---------------------------|---------------------|
| 1. 著者名 定明子 | 4. 発行年 2021年 |
| 2. 出版社 科学評論社 | 5. 総ページ数 301-307 |
| 3. 書名 特集 好酸球性肺疾患Update | |

| | |
|--------------------------|---------------------|
| 1. 著者名 定明子 | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 科学評論社 | 5. 総ページ数 506-512 |
| 3. 書名 特集 血液疾患の新たな標的治療 | |

| | |
|--------------------------|-----------------------|
| 1. 著者名 定明子 | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 医学書院 | 5. 総ページ数 1085-1088 |
| 3. 書名 新臨床内科学 (矢崎義雄監修) | |

| | |
|-----------------------------|------------------|
| 1. 著者名 矢崎 義雄監修 | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 医学書院 | 5. 総ページ数 1960 |
| 3. 書名 新臨床内科学 [デスク判] 第10版 | |

| | |
|--------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 定 明子 (編集: 通山 薫、張替秀郎) | 4. 発行年 2018年 |
| 2. 出版社 文光堂 | 5. 総ページ数 418 |
| 3. 書名 血液細胞アトラス | |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 定 明子 (編集代表 直江知樹) | 4. 発行年 2018年 |
| 2. 出版社 医薬ジャーナル社 | 5. 総ページ数 464 |
| 3. 書名 WHO血液腫瘍分類 改訂版 WHO分類2017をうまく活用するために | |

| | |
|-------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 編集: 通山 薫、張替秀郎 | 4. 発行年 2018年 |
| 2. 出版社 文光堂 | 5. 総ページ数 418 |
| 3. 書名 血液細胞アトラス | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|