

令和 3 年 6 月 29 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15679

研究課題名(和文) 移植関連血栓性微小血管障害における補体関連遺伝子の変異解析

研究課題名(英文) A mutation analysis of complement-related genes in transplant-associated thrombotic microangiopathy

研究代表者

山田 愛 (YAMADA, AI)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：90816688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：移植関連血栓性微小血管障害(TA-TMA)の予測因子同定のために現在までに既に米国成人の病因として知られる17遺伝子をはじめ、さらに関連する可能性のある23遺伝子を含んだ40遺伝子の解析を行う計画をたてた。宮崎大学のみでは症例数は限定的であり、より多くの検体を得るために近畿大学、横浜市立大学、鹿児島大学との共同研究とし、各施設の医の倫理委員会の承認を得た上で、TA-TMA合併20例ならびに非合併20例のエクソーム解析を行った。TA-TMA合併例で低頻度バリエーション(CFHR5, CFHR4, THBD, C1RLなど)を認めたと、統計学的有意差の検証のためにさらなる症例集積を検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児の血液腫瘍領域において造血幹細胞移植は大きく予後改善に貢献してきた。一方、予期せぬ致死合併症が生じることがあるが、TA-TMAは代表的合併症の1つである。TA-TMA発症には何らかの素因を有している患者に、大量化学療法をはじめとする様々なストレス下で血管内皮障害が生じることが端緒と考えられている。TA-TMAの病因となりうる遺伝子バリエーションが同定されれば、移植前にスクリーニングを行うことにより予防が可能となり、将来的に造血幹細胞移植を行う患者たちに多くの恩恵が与えられると期待できる。

研究成果の概要(英文)：We planned to analyze 40 genes, including 17 genes, that are known to be involved in the etiology of transplant-associated thrombotic microangiopathy (TA-TMA) in American adults, in order to identify the causative variants of TA-TMA in Japanese children. We collaborated with Kindai University, Yokohama City University Graduate School of Medicine, and Kagoshima University to analyze a large number of samples. After receiving approval from all institutional review boards, we performed exome sequencing for 20 cases with TA-TMA and 20 cases without TA-TMA. Several low-frequency variants (e.g., CFHR5, CFHR4, THBD, and C1RL) were found in patients with TA-TMA; however, more samples would be analyzed in order to determine whether these variants are significant.

研究分野：小児血液腫瘍

キーワード：移植関連血栓性微小血管障害 造血幹細胞移植(HSCT) TA-TMA疾患パネル ターゲットシーケンシング
ブチャー法 次世代シーケンサー 低頻度バリエーション

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

小児がんの治療成績は造血幹細胞移植(HSCT)導入により向上してきた。合併症である感染症や移植片対宿主病(GVHD)は移植技術や支持療法の向上に伴い制御可能になってきたものの、移植関連血栓性微小血管障害(TA-TMA)は現在でも代表的な致死性の移植関連合併症であり、病態解明や治療法の開発が急務である。TA-TMAは血管内皮細胞障害により溶血性貧血、血小板減少と腎機能障害など臓器障害を来す疾患である。TA-TMAはHSCTの30-35%に発生するとされ(Laskin BL, et al. 2011 Blood)、移植前処置、重症感染症、GVHD、カルシニューリン阻害薬などのさまざまな因子により血管内皮障害が生じることが端緒と考えられている。その病態の一部には補体活性化が関与しC5b-9複合体(膜侵襲複合体)が過剰形成され、血小板や血管内皮細胞が活性化し血栓が産生されると考えられている。病態完成後の治癒は極めて困難で、発症後の致死率は60-90%と高く、HSCT後合併症において最も克服すべき疾患である(Khosla J, et al. 2017 Bone Marrow Transplant)。TA-TMAの発症には、血栓性微小血管障害や補体活性化に関連する遺伝子に機能異常を有する患者にストレスが加わることが要因と考えられている。それらの遺伝子にバリエーションを有していても通常生活では問題とならず、大量化学療法やHSCTのストレス下で血管内皮障害が生じTMAに至ると考えられる。これらの知見から、TA-TMA発症の高リスク群をHSCT前に同定できれば、前処置の軽減化、GVHD予防としてのカルシニューリン阻害薬の回避、TA-TMA病態完成後の臓器障害に至る前にC5に対するモノクローナル抗体であるエクリズマブ投与を行うなどの早期介入が可能となり治療成績の向上に寄与することができる。これまで発症リスクを予測することは困難であったが、補体活性化や血栓性微小血管障害の病因となる17遺伝子のバリエーションを解析し、3つ以上のバリエーションを有する患者においてTA-TMA発症リスク群となることが米国成人より報告された(Jodele S, et al. 2016 Blood)。しかし、一方でこれらのバリエーションは人種間での差が大きく、日本人、さらには小児に応用するためには日本国内で解析を進める必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、TA-TMAを来した患者の血液を用いてTA-TMAの予測因子同定のために、現在までに病因として知られる17遺伝子(CFH, CFHR1, CFHR3, CFHR4, CFHR5, CD55, CD59, CD46, CF1, CFB, CFP, C5, ADAMTS13, CFD, C3, C4)をはじめ、さらに関連する可能性のある23遺伝子を含んだ40遺伝子のターゲットシーケンス解析を行い、日本人のTA-TMAにおける遺伝子バリエーションの型や頻度を明らかにする。さらに、移植前患者検体を用いてターゲットシーケンス解析結果を蓄積することでHSCTにおけるTA-TMAの予測が可能であるか解析する。将来的にこれらの解析系を用いて移植前ターゲットシーケンスでスクリーニングを行い、高リスク群を抽出する。抽出された高リスク群に対しては前処置の軽減化、GVHD予防のカルシニューリン阻害薬回避、TMA発症後の臓器障害に至る前にC5に対するモノクローナル抗体であるエクリズマブ投与を行うなど早期介入を行うことにより、移植成績の向上に寄与することが可能となることを目的とした。

3. 研究の方法

HSCT を施行した症例、さらに TA-TMA 合併例の患者検体および既存検体を対象とした。当院で HSCT を施行した症例、共同研究施設での症例を対象とし、検体は診断時あるいは HSCT 前に採取した末梢血のゲノム DNA を使用した。患者選択基準に年齢制限や原疾患に制限は設けず、検体提供に関しては同意が得られたもののみとした。収集したゲノム DNA はかすさ DNA 研究所にすべて送付した。また扱う検体はすべて匿名化し、どの研究対象者の資料・情報であるか直ちに判別できないよう管理した。これらの検体を用いて、下記の研究を遂行した。

(1) ターゲットシーケンスキャプチャー法を用いて TA-TMA との関連の可能性のある 40 遺伝子の TA-TMA パネルを作製する。

(2) HSCT 症例を集積し、TA-TMA 合併、非合併症例に分類し次世代シーケンサーを用いて 40 遺伝子の解析を行い、遺伝子バリエーションと TA-TMA の発症について解析する。

(3) 対象患者の臨床情報を抽出し、TA-TMA 発症との相関を認める因子について解析する。

(1)-(3)の解析から、TA-TMA の発症に関与する遺伝子バリエーションならびにリスク因子を同定することで、バリエーションによる TA-TMA 発症予測、バリエーション部位や数による重症化のスコアリング、さらにバリエーション部位による有効な治療法の確立を目指す。

4. 研究成果

(1) ターゲットシーケンスキャプチャー法を用いて TA-TMA との関連の可能性のある 40 遺伝子の TA-TMA パネルを作製する。

かすさ DNA 研究所との共同研究により、エクソン、隣接するイントロン、非翻訳領域について特定領域を濃縮する均等化ターゲットキャプチャー技術を用いて TA-TMA 病因と報告がある 17 遺伝子(CFH, CFHR1, CFHR3, CFHR4, CFHR5, CD55, CD59, CD46, CF1, CFB, CFP, C5, ADAMTS13, CFD, C3, C4)に加え、TA-TMA に関連する可能性が考えられる補体関連、凝固線溶系、サイトカインの遺伝子 23 遺伝子を加えた 40 遺伝子についての TA-TMA 疾患パネルを作製した。

物質名	遺伝子名	Gene ID
factor H	CFH	3075
factor H related 1	CFHR1	3078
factor H related 3	CFHR3	10878
factor H related 4	CFHR4	10877
factor H related 5	CFHR5	81494
DAF	CD55	1604
CD59	CD59	966
MCP	CD46	4179
factor I	CFI	3426
factor B	CFB	629
properdin	CFP	5199
C5	C5	727
ADAMTS13	ADAMTS13	11093
factor D	CFD	1675
C3	C3	718
C4BP α	C4BPA	722
thrombomodulin	THBD	7056
serpin family G member 1	C1NH	710
complement C3b/C4b receptor 1	CR1	1378
plasminogen	PLG	5340
diacylglycerol kinase epsilon	DGKE	8526
von Willebrand factor	VWF	7450
complement C1r subcomponent like	C1RL	51279
interleukin 1 alpha	IL1A	3552
interleukin 1 beta	IL1B	3553
interleukin 12A	IL12A	3592
interleukin 12B	IL12B	3593
tumor necrosis factor	TNF	7124
serpin family E member 1	SERPINE1	5054
serpin family B member 2	SERPINE2	5055
thromboxane A2 receptor	TBXA2R	6915
intercellular adhesion molecule 1	ICAM1	3383
interferon gamma	IFNG	3458
prostaglandin I2 receptor	PTGIR	5739
prostaglandin I2 synthase	PTGIS	5740
vascular endothelial growth factor A	VEGFA	7422
selectin E	SELE	6401
selectin P	SELP	6403
tissue factor (coagulation factor III)	F3	2152
ANGPT2	angiopoietin 2	285

(2)HSCT 症例を集積し、次世代シーケンサーを用いて 40 遺伝子の解析を行い、遺伝子バリエーションと TA-TMA の発症について解析する。

宮崎大学小児科のみでは症例数は限定的であったため、より多くの検体を得て解析を行うために近畿大学、横浜市立大学、鹿児島大学との共同研究とし、各施設の医の倫理委員会の承認を得た上で症例集積を行った。研究期間期間近まで集積を行い、最終的に TA-TMA 合併 20 例ならびに非合併 20 例が集積された。基本的にはこれらの検体の診断時もしくは移植前に採取した末梢血のゲノムをかずさ DNA 研究所で次世代シーケンサー HiSeq2500 を使用し、解析は NextGENe ソフトウェアを用いた。すべてのバリエーションから common SNPs を除外し、コーディングバリエーション、フレームシフト、スプライシングバリエーションを抽出した。

TA-TMA 合併例で低頻度バリエーションをより多く認め(TA-TMA ; 1.25/1 症例、非合併例 ; 1/1 症例)、TA-TMA 合併例のみに確認されたバリエーション(CFHR5, CFHR4, THBD, C1RL)も存在したが集積症例が 20 例と少数で統計学的有意差は見いだせなかった。そのうち C1RL は過去に TA-TMA での報告は認めておらず興味深い。TA-TMA の病因に寄与している可能性を考慮し、統計学的有意差を検証するためにさらなる症例集積を検討中である。

コントロール						
1	ADAMTS13	missense variant				
2	C5	stop_gained	CFP	splice_region_variant&intron_variant		
3	0					
4	CFH	missense variant	CFH	missense variant		
5	VWF	missense variant				
6	0					
7	ADAMTS13	missense variant				
8	CD46	missense variant				
9	0					
10	CFH	missense variant				
11	CFI	missense variant				
12	VWF	missense variant	C5	missense variant		
13	CD55	stop_gained	CFD	frameshift variant	ADAMTS13	missense variant
14	C5	missense variant				
15	CD46	missense variant				
16	0					
17	0					
18	VWF	missense variant				
19	VWF	missense variant				
20	0					

TA-TMA						
1	CFH	missense variant				
2	CFH	missense variant				
3	ADAMTS13	missense variant				
4	CD46	missense variant				
5	CFB	missense variant	ADAMTS13	missense variant		
6	0					
7	0					
8	CFI	missense variant	C5	missense variant	C5	missense variant
9	VWF	missense variant				
10	C1RL	missense variant				
11	CFHR5	stop lost	CD46	missense variant		
12	0					
13	C3	missense variant	C5	missense variant		
14	CFH	missense variant				
15	ADAMTS13	missense variant				
16	CFHR4	missense variant	THBD	missense variant		
17	CFHR5	missense variant	VWF	missense variant	ADAMTS13	missense variant
18	0					
19	C5	missense variant				
20	CFI	frameshift variant	ADAMTS13	missense variant	ADAMTS13	splice_region_variant&intron_variant

(3) 対象患者の臨床情報を抽出し、TA-TMA 発症との相関を認める因子について解析する。

当院症例は患者の臨床情報の取得は容易であるが、共同研究機関からの患者情報の収集に関しては、一部まだ回答を得ることができておらず情報収集が完了していないため、解析が行えていない。収集している臨床情報としては、年齢、性別、臨床診断、治療前臓器障害の有無、ドナーソース、HLA 一致度、前処置内容、感染症合併の有無、GVHD 予防薬の種類、GVHD の有無/重症度、最終転帰、観察期間としている。臨床症状の収集がすべて完了した後に TA-TMA 合併例と非合併例で何らかの差異が認められないかの解析を行う。これらの解析から、TA-TMA 発症に關与するバリエーションならびにリスク因子を同定する。

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0件

〔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
研究協力者	小原 収 (ohara osamu)	公益財団法人かずさDNA研究所 (82508)	
研究協力者	坂田 尚己 (sakata naoki)	近畿大学 (34419)	
研究協力者	竹内 正宣 (takeuchi masanobu)	横浜市立大学附属病院	
研究協力者	岡本 康裕 (okamoto yasuhiro)	鹿児島大学 (17701)	

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
---------	---------