

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08547

研究課題名(和文) 骨髄異形成症候群に合併した肺胞蛋白症のドライバー遺伝子変異の解析

研究課題名(英文) Analysis of driver gene mutations in pulmonary alveolar proteinosis associated with myelodysplastic syndrome.

研究代表者

石井 晴之 (Ishii, Haruyuki)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：30406970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、骨髄異形成症候群(MDS)に続発する肺胞蛋白症の病因や病態を解明するために、そのドライバー遺伝子変異を解析することを目的とした。2020年～2022年の3年間でコロナ禍も大きく影響し、13例のMDS-SPAP症例の遺伝子変異を解析した。21個の遺伝子変異があり、U2AF1とASXL1が31%、TET2、ZRSR2、STAG2が23%にみとめられていた。これらはMDS自体にも遺伝子変異としてみられるものであるが、U2AF1はMDSの6-8%程度の頻度である。そのため、RNAスプライシングに関連するU2AF1がMDS-SPAPのドライバー遺伝子の候補となる可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

稀少肺疾患であるMDS-SPAPを対象にした集学的研究は少ない。MDS-SPAPは生存期間中央値17か月、2年生存率42%と著しく予後不良な疾患である。これまで我々の研究から、続発性PAP診断時の%DLcoが50%以下、ステロイド治療下が死亡リスク因子として予後予測因子は解明してきたが、病因につながる研究が求められてきた分野である。そのため、今回の研究において症例数は十分ではなかったが、MDS-SPAPのドライバー遺伝子変異の候補はU2AF1を筆頭に、エピジェネシス制御に関わるASXL1が病因に関連している可能性が示唆された結果は、今後のさらなる研究に繋がる成果にはなったと思われる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to analyze the driver gene mutations of alveolar proteinosis secondary to myelodysplastic syndrome (MDS) in order to elucidate the etiology and pathogenesis of this disease. Because the disease under study is a rare lung disease, the number of new cases available for analysis was unexpectedly low for the three-year period 2020-2022, due in large part to the pandemic of COVID-19. However, analysis of genetic mutations in 13 MDS-SPAP cases was performed and 21 genetic mutations were identified. Of these, U2AF1 and ASXL1 were found in 31% (4/13), followed by TET2, ZRSR2, and STAG2 in 23% (3/13). These are also found as genetic mutations in MDS itself without SPAP, but U2AF1 is about 6-8% frequent in MDS. Therefore, U2AF1, which is associated with RNA splicing, was considered a possible candidate driver gene for MDS-SPAP.

研究分野：肺胞蛋白症

キーワード：肺胞蛋白症 骨髄異形成症候群 遺伝子変異

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺胞蛋白症(pulmonary alveolar proteinosis :PAP)の大部分は血清中の抗 GM-CSF 自己抗体陽性の自己免疫性 PAP であり、続発性 PAP は抗 GM-CSF 自己抗体陰性かつ多種の基礎疾患が併存しており PAP 全体の約 8%と非常に稀な疾患のため病因も不明のままである。厚生省難病情報センターの指定難病として平成 27 年から肺胞蛋白症が認定されたが、自己免疫性 PAP または先天性 PAP のみで続発性 PAP は対象疾患になっていない。そのため続発性 PAP の病態・病因の解明を進めていかなければならない。我々は、これまで続発性 PAP の基礎疾患は血液疾患、特に MDS が最も多いことを報告(*Eur Respir J 2011*)し、MDS に合併した続発性 PAP(MDS-SPAP)が著しく予後不良であることも報告したきた(*BMC pulm Med 2014*)。MDS-SPAP では MDS の血液所見が低リスク群であっても 2 年生存率が 40%と著しく予後不良であること、また MDS-SPAP では 1 番と 8 番に高率に染色体異常がみられることに気付いた。そして MDS-SPAP では肺胞マクロファージが異型化し染色体異常を有する症例(*Ann Am Thorac Soc 2015*)を経験している。これらは顆粒球マクロファージ系の癌化を意味し、分化を司る転写因子やシグナル蛋白の変異が存在する可能性を示唆される所見であることから、肺胞マクロファージの機能・核型異常において、顆粒球マクロファージ系のドライバー遺伝子変異に着目するようになった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、MDS-SPAPのドライバー遺伝子変異のプロフィールを明らかにし、病因と考えられる肺胞マクロファージ機能異常を分子レベルで解析することである。この研究によってドライバー遺伝子変異が得られれば、将来的にMDS-SPAPの発症予測因子として重要であり、MDSに対する造血幹細胞移植の新たな適応条件になりうる可能性をもっている。

3. 研究の方法

プロジェクト-1：MDS-SPAP 5 例において、エクソーム解析を行いドライバー遺伝子変異の候補をリストアップしていく。具体的には、MDS-SPAP 症例の EDTA 血 10ml から比重遠心法にて単核球を分離する。分離した単核球は MACS バッファーに懸濁し、100 万個あたり 5 μ l の MACS CD3 ビーズを添加し 30 分間 4 で反応させ、MACS mini column により CD3 陽性細胞をソートする。Flow through 分画を腫瘍細胞検体とし、CD3 陽性細胞を胚細胞コントロール検体とする。腫瘍細胞のエクソーム解析は胚細胞コントロール検体を対象に、体細胞遺伝子変異を同定する目的で行う。アジレント社のエクソームプローブキャプチャーシステム(SureSelect Human All Exon ver5)を用いてプリパレーションを行う。

プロジェクト-2：MDS-SPAP 30 例以上において MDS がん遺伝子ターゲットシーケンスと SNP アレイを行い、プロジェクト-1 で候補となった遺伝子変異を確認する。この解析のコントロールとして MDS を比較対象とする。このターゲットシーケンスは MDS-SPAP の単球または肺胞マクロファージを対象に、既知の遺伝子異常を効率よく検出しクローンサイズをより正確に評価する目的で行う。ターゲット領域のキャプチャーは、プロジェクト-1 で得られた候補遺伝子、および骨髄腫瘍における既知のドライバー遺伝子を対象領域としたベイトを設計して行う。続いて Illumina 社の NextSeq または HiSeq2500 あるいはその後継機器を用いてシーケンスし、変異コールは Genomon ver.3 を用いて行う。新規変異が抽出された場合には、アンブリコンシーケンスを用いて腫瘍検体および胚細胞検体を対象に変異のバリデーションを行う。ターゲットシーケンスで確認された変異候補はデータベースと参照し既知の報告あるも

のを採用し、それ以外はSNPの除去およびエラーの除去はGenomonパイプラインで行われる。
 プロジェクト-3：造血幹細胞移植治療を導入される MDS-SPAP 症例を対象に、骨髄移植前後の
 気管支肺胞洗浄(bronchoalveolar lavage: BAL)液中の肺胞マクロファージについて ドライバ
 ー遺伝子変異の変化、電子顕微鏡による形態評価、蛍光ビーズ貪食能、GM-CSF 刺激に
 よる STAT5 リン酸化、PPAR- γ 発現、CD163, CD205 などのマクロファージマーカー発現
 などを調査する。造血幹細胞移植の前後に施行した BAL 液から、洗浄液細胞沈渣を MACS バ
 ップファーに懸濁し、CD2 ビーズを用いて肺胞マクロファージとリンパ球分画に分離する。肺胞
 マクロファージ分画の一部は、2.5%グルタルアルデヒドで固定し微細形態を観察する。肺胞
 マクロファージ分画は karyostat により核型異常を検索する。可能であれば、FISH 法により異
 常核型を検出する。肺胞マクロファージ分画は、Flowcytometry にて CD163,205 の測定を行う。
 また、RPMI1640/10%FCS に懸濁し、100ng/ml GM-CSF 存在下および非存在下で 48 時間培養
 後、Latex beads 貪食、PPAR γ の上スタンプロットによる検出を行う。

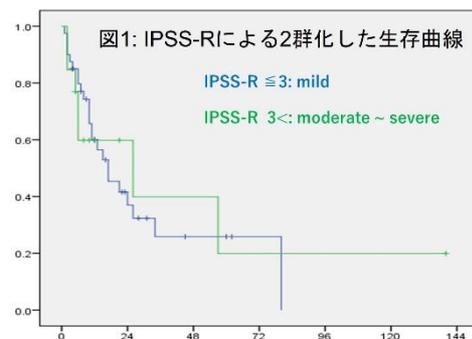
4. 研究成果

(1)本研究は稀少肺疾患のため新たな臨床検体を含めた症例集積が必須であった。そのため研究協力者による SPAP ネットワーク施設を全国に設置して研究を進めてきた。まず、8 番染色体異常(trisomy 8)を有する MDS-SPAP の 1 例について、末梢血単核球の exome sequence を行

い、TET2, ASXL1、そして RUNX1, STAG2, ZRSR2 などの遺伝子変異が検出された。また 5 例の MDS-SPAP において、ASXL1, TET2, U2AF1, BCOR, RUNX1, STAG2, ZRSR2 のターゲットシーケンスを行ったところ、3 例で ASXL1,

	Total n=63	IPSS-R ≥ 3 (n=40)	IPSS-R < 3 (n=13)
Age	58.4 \pm 12.4	58.1 \pm 13.6	56.9 \pm 11.3
Gender (M/F)	30/33	21/19	6/7
fever	24 (38%)	17 (42%)	4 (31%)
KL-6	2964(165-34000)	2964(165-20210)	2050(430-34000)
SP-D	174.5(21.3-2550)	179(30.5-2550)	138.5(21.3-580)
WBC	3350(200-15800)	4255(470-15800)	1515(200-11700)
Hb	9.5(4.8-16.7)	9.6(5.3-16.7)	7.7(4.8-11.7)
Plt	7.3(0.6-97.9)	8.4(1.9-97.9)	4.3(0.6-23)

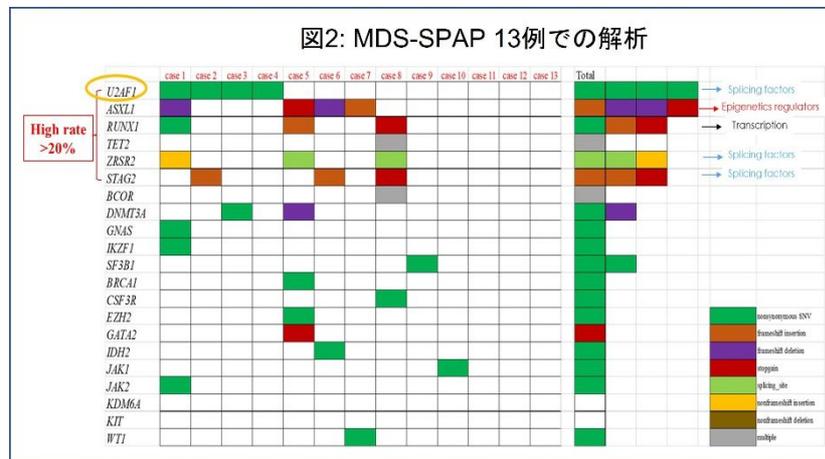
TET2、2 例で U2AF1 がみられることも確認した。我々の研究において 63 例の MDS-SPAP が症例集積されており、血液疾患としての MDS 所見から予後予測因子 IPSS-R スコアで 2 群化した対象を表に示す。MDS-SPAP においては、MDS の軽症リスクと中等症～重症リスク群ともに生命予後が著しく不良であることが明らかになった(図 1)。



(2)稀少肺疾患を対象として本研究では、2020年～2022年の3年間を新たな MDS-SPAP 症例の集積期間としていたが、解析可能な新規症例数が予想外に少なかった。本疾患の罹患率は100万人あたり1～2人と推測されている。しかし、コロナ禍でもあったことから MDS-SPAP ネットワークの拠点施設においても新規に診断される症例がほとんど経験されない状況であった。また MDS-SPAP 診断時には全身状態が不良で研究同意が難しい症例もみられ、本研究期間を1年延長したが、十分な症例数で解析することができなかった。

(3)プロジェクト1,2として13例の MDS-SPAP 症例の遺伝子変異を解析した。図2で示

すように、21 個の遺伝子変異が確認され、そのうち U2AF1 と ASXL1 が 31%(4/13) でみられ、次に TET2, ZRSR2, STAG2 が 23%(3/13) にみとめられていた。これらは SPAP を伴わない MDS 自体にも遺伝子変異としてみられるもの



であるが、U2AF1 は MDS の 6-8% 程度の頻度である。そのため、RNA スプライシングに関連する U2AF1 が MDS-SPAP のドライバー遺伝子の候補となる可能性が考えられた。本来であれば、プロジェクト 3 として新規 MDS-SPAP 症例の造血幹細胞移植治療前後での肺泡マクロファージでの解析を行いたかったのであるが、研究期間を延長したにもかかわらず対象症例が現れず施行できなかった。しかしながら、本研究での MDS-SPAP のドライバー遺伝子変異の候補は U2AF1 を筆頭に、エピジェネシス制御に関わる ASXL1 が病因に関連している可能性は示唆され、今後のさらなる研究に繋がる成果にはなったと思われる。

< 引用文献 >

Ishii H, Tazawa R, Kaneko C, et al. Clinical Features of Secondary Pulmonary Alveolar Proteinosis: Pre-mortem Cases in Japan. *Eur Respir J* 2011; 37: 465-68

Ishii H, Seymour JF, Tazawa R, et al. Secondary pulmonary alveolar proteinosis complicating myelodysplastic syndrome results in worsening of prognosis: a retrospective cohort study in Japan. *BMC pulm Med* 2014; 14: 37

Moriyama M, Yano T, Furukawa T, Takada T, Ushiki T, Masuko M, Takizawa J, Sone H, Tazawa R, Saijo Y, Ishii H, Nakata K. Possible Involvement of Lung Cells Harboring an Abnormal Karyotype in the Pathogenesis of Pulmonary Alveolar Proteinosis Associated with Myelodysplastic Syndrome. *Ann Am Thorac Soc.* 2015 Aug;12(8):1251-3. doi: 10.1513/AnnalsATS.201503-175LE.

Nishida A, Miyamoto A, Yamamoto H, et al. Possible association of trisomy 8 with secondary pulmonary alveolar proteinosis in myelodysplastic syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011 Jul 15;184(2):279-80. doi: 10.1164/ajrccm.184.2.279a.

Hasse D, Germing U, Schanz J, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood.* 2007 Dec 15;110(13):4385-95. doi: 10.1182/blood-2007-03-082404. Epub 2007 Aug 28.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 8.Oda M, Yamaura K, Ishii H, Kitamura N, Tazawa R, Abe M, Tatsumi K, Eda R, Kondoh S, Morimoto K, Tanaka T, Yamaguchi E, Takahashi A, Izumi S, Sugiyama H, Nakagawa A, Tomii K, Suzuki M, Konno S, Ohkouchi S, Tode N, Handa T, Hirai T, Inoue Y, Arai T, Asakawa K, Tanaka T, Takada T, Nonaka H, Nakata K	4. 巻 102(2)
2. 論文標題 Quantitative Evaluation of Changes in Three-Dimensional CT Density Distributions in Pulmonary Alveolar Proteinosis after GM-CSF Inhalation.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Respiration	6. 最初と最後の頁 101-109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000528038. Epub 2022 Dec 9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 石井晴之
2. 発表標題 続発性肺胞蛋白症
3. 学会等名 第57回日本肺サーファクタント界面医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井晴之
2. 発表標題 骨髄異形成症候群に合併した続発性肺胞蛋白症のドライバ-遺伝子
3. 学会等名 第63回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Haruyuki Ishii
2. 発表標題 Exploring the prognosis and pathogenesis of secondary pulmonary alveolar proteinosis
3. 学会等名 European Respiratory Society International Congress 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔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
研究分担者	田澤 立之 (Tazawa Ryushi) (70301041)	東京医科歯科大学・学生支援・保健管理機構・教授 (12602)	
研究分担者	竹内 志穂 (Takeuchi Shiho) (70422277)	新潟大学・医歯学総合研究科・特任准教授 (13101)	
研究分担者	中田 光 (Nakata Koh) (80207802)	新潟大学・医歯学総合病院・特任教授 (13101)	

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