

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：35309

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16565

研究課題名（和文）血液形態学検査と遺伝子検査のマッチングによる骨髓異形成症候群の診断精度の向上

研究課題名（英文）Improving diagnostic accuracy of myelodysplastic syndrome by matching blood morphology and genetic testing

研究代表者

榊原 佳奈枝（SAKAKIBARA, Kanae）

川崎医療福祉大学・医療技術学部・講師

研究者番号：10791410

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）：MDS-RS患者の29%にSF3B1遺伝子変異を認めた。また、RS病型ではない症例においても、同様の遺伝子変異を認めた。ただし、本研究結果は既報と比較すると陽性率が非常に低かった。乖離の要因として、以下の点が挙げられる。一つ目は本研究の解析対象領域外に別の変異を有する可能性がある点、二つ目は解析対象検体が初診時以外も含まれている点である。SF3B1変異と環状鉄芽球判定による病型診断の一致率が最適となるカットオフ値を見出すためには、さらに検体数を重ね、経過を追った解析が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液形態学検査によってRS増加を認めても、SF3B1遺伝子変異は認めない場合もあるため、MDS-RS診断における鉄染色の重要性は今後も低くなることはない。現在、SF3B1遺伝子変異解析は日常診療でほとんど行われていないが、MDSにおけるリスク層別化だけでなく、治療アプローチのためにも有用な検査になり得る。本研究結果は前方視的だけでなく後方視的に集積された患者においても、これらの恩恵にあずかることが出来る可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：SF3B1 mutation was found in 29% of MDS-RS patients. Same mutation was also observed in non-MDS-RS cases. However, the results of this study showed low positive rate compared to previous reports. There are two reasons for the divergence. The first is the possibility of having other mutations outside the region analyzed in this study, and the second is that the samples other than those at the first visit are also included. In order to find the optimal cut-off value for the concordance rate between the SF3B1 mutation and ringed sideroblasts, it is necessary to further analyze the number of cases and follow the progress.

研究分野：血液検査学

キーワード：骨髓異形成症候群 SF3B1遺伝子変異 鉄染色

### 1. 研究開始当初の背景

骨髓異形成症候群 (MDS) は高齢者に好発する難治性の造血器腫瘍である。現在治癒を期待できる唯一の治療法は造血幹細胞移植である。しかし造血幹細胞移植の適応年齢から考えると、大多数の MDS 患者はその適応とはならない。高齢化先進国であるわが国においては、日常的に遭遇する疾患になりつつある。

MDS は血球減少や異形成を認める血球系統の数や芽球比率などにより病型区分されている。その中のひとつに、環状鉄芽球の増加を伴う骨髓異形成症候群 (MDS-RS) がある。MDS-RS では、RNA スプライシングに関わる遺伝子のひとつである *SF3B1* 変異が高頻度に認められると報告されている。WHO 分類改訂第 4 版でも *SF3B1* 変異の有無が MDS の診断基準に組み込まれており、この変異を臨床検査として検出することは非常に意義深い。しかしコストや手技の煩雑さなどの理由から、日常臨床で *SF3B1* 遺伝子の変異解析が行われることは稀である。

一方、鉄染色は以前より血液検査分野で実施されていた特殊染色のひとつで、血液細胞内の鉄代謝異常を判断するために用いられる。比較的容易な手技とその普及率の高さから、多くの医療施設ではこの鉄染色で環状鉄芽球の増加を証明している。

海外での調査によると、欧米における全 MDS 患者のうち約 20% の症例で *SF3B1* 変異を認め、そのほとんどに環状鉄芽球の増加が認められるとされている。わが国でも同様に、*SF3B1* 変異は MDS 患者で最も高頻度にみられる遺伝子変異である。しかし厚生労働省特発性造血障害調査研究班による疫学調査では、MDS-RS 症例はわずか 5% に過ぎず、欧米の報告と乖離している。

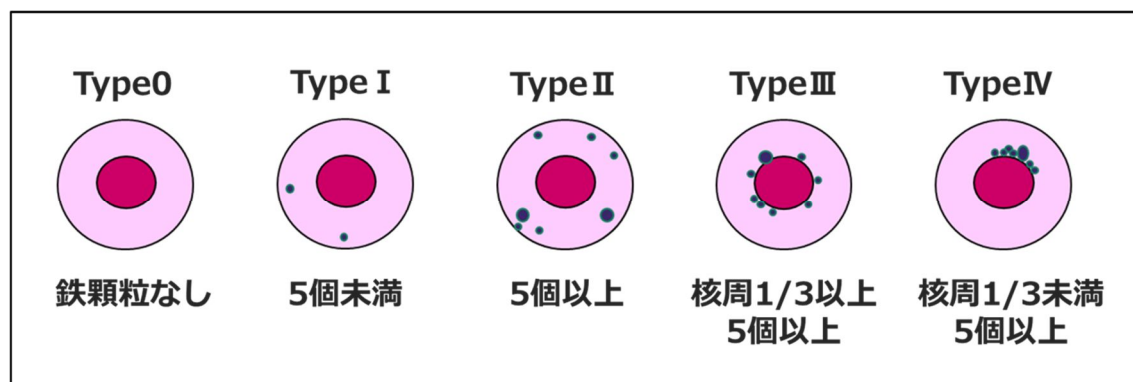
### 2. 研究の目的

MDS において *SF3B1* 変異と環状鉄芽球の増加がそれぞれどれくらいの割合で認められるのかを調べ、遺伝子型と表現型の一致率が最適となるカットオフ値を見出すことを目的とする。これにより MDS-RS における診断精度の向上が期待できるとともに、遺伝子変異解析が実施できず確定診断を望めない場合でも、高いエビデンスを持って細胞形態学的観点から病型診断に貢献できるものと考えられる。

### 3. 研究の方法

貧血精査のため骨髓穿刺が施行された 193 症例を対象とし、日常臨床検査にて作製、保存された May-Grünwald-Giemsa 二重染色標本からメス刃で検体を削り取り、QIAamp® DNA Mini Kit で DNA を抽出した。DNA 量の測定には NanoDrop™ One 超微量紫外可視分光光度計を使用した。PCR に用いるプライマーは *SF3B1* 遺伝子変異の最も集中する Exon15 領域に設定し、SimpliAmp™ Thermal Cycler を用いて PCR を実施した。PCR1st 産物の精製には QIAquick PCR Purification Kit を、PCR2nd 産物の精製には Sephadex™ G-50 Fine DNA Grade を使用した。DNA 塩基配列の解析は Applied Biosystems™ 3130xl DNA Analyzer で行い、得られた結果を Sequence scanner でシーケンス確認した後、Nucleotide BLAST プログラムにてヒト野生型塩基配列との相同性検索を行った。

環状鉄芽球 (RS) の判定は鉄染色標本を 1000 倍油浸で鏡検し、赤芽球 100 個における鉄芽球陽性率 (%) および RS 出現率 (%) を算出した。International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) が定義する分類法を基に、当研究室で新たに設定したカテゴリーを含む以下の 5 つの染色パターンに赤芽球を分類した。



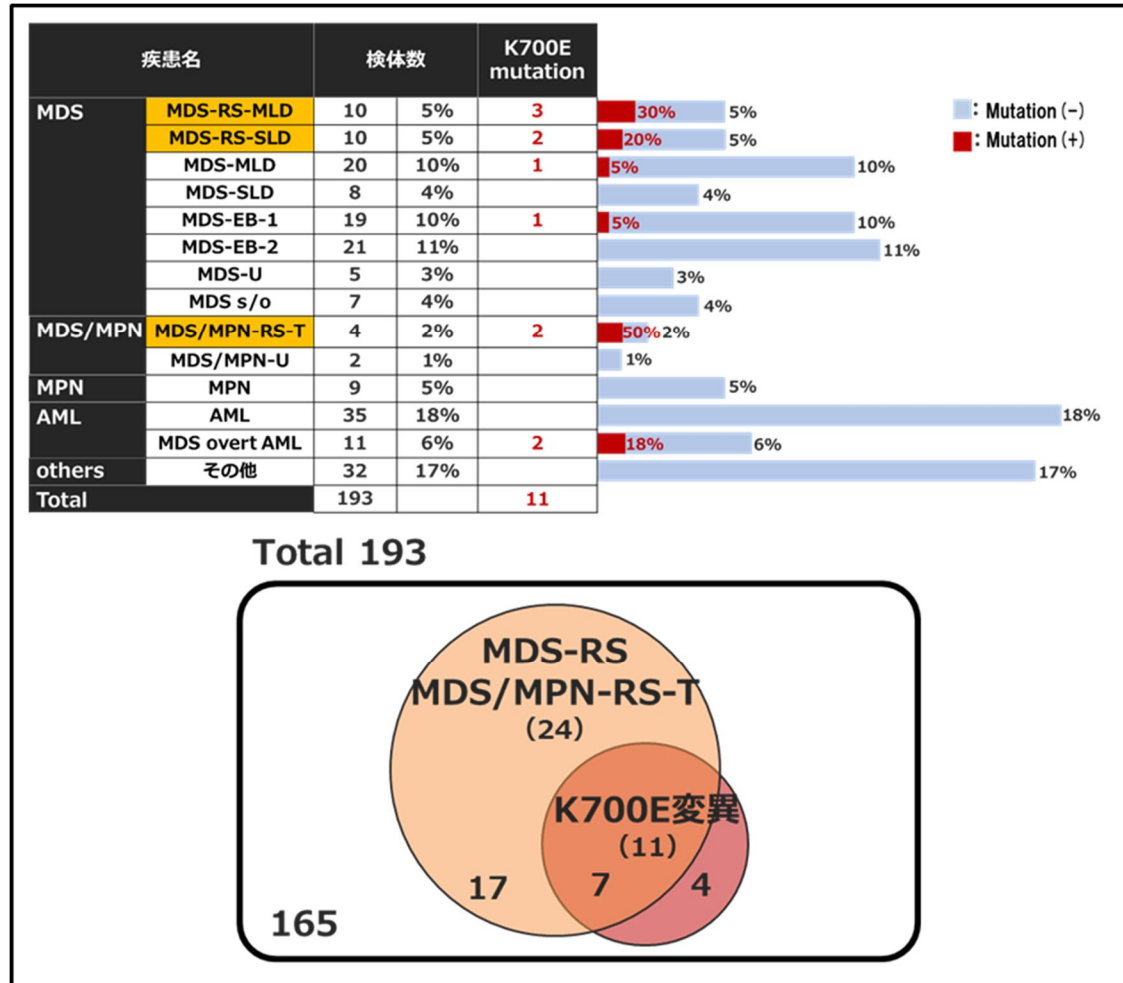
*SF3B1* 遺伝子変異解析の結果と RS 判定の結果を各検体でつぎ合わせ、関連の有無を調べた。

なお、本研究は川崎医科大学附属病院並びに川崎医療福祉大学倫理審査委員会の承認を得て実施した。

#### 4. 研究成果

193 例中 11 例( 6% )に *SF3B1* 遺伝子変異を認めた。変異の種類はいずれも K700E 変異( 700 番目のリシンがグルタミン酸に置換するミスセンス変異 )であった。疾患内訳は MDS-RS-MLD が 3 例、MDS-RS-SLD が 2 例、MDS/MPN-RS-T が 2 例、MDS overt AML が 2 例、MDS-MLD が 1 例、MDS-EB-1 が 1 例であった。また、RS 判定では RS 病型ではない検体 4 例を含む 11 例すべてに RS 増加傾向が認められた。

今回の対象検体 193 例のうち、診断名が RS 増加を特徴とする病型 ( MDS-RS-MLD、MDS-RS-SLD、MDS/MPN-RS-T ) であるものは 24 例であった。しかし、そのなかで K700E 変異を認めたのはわずか 7 例 ( 29% ) という結果であった。



RNA スプライシング関連因子の遺伝子変異は MDS に高率に認められることから、MDS 発症に大きく関与していることが示唆されている。なかでも MDS-RS 患者の約 80% に認められるとされる *SF3B1* 遺伝子変異は RS との相関が強く、陽性適中率は 98% との報告もある。我々の解析でも K700E 変異を認めた 11 例はすべて RS 陽性であり、同遺伝子と RS の関連の強さが伺えた。しかし RS を特徴とする病型に認められた *SF3B1* 遺伝子変異の頻度は 29% と、従来の報告と比較してかなり低かった。乖離した結果を受けて、我々は二つの要因を考えた。

一つ目は、Exon15 領域以外のホットスポットに変異が生じている可能性である。今回の解析で全塩基配列を確認できたのは Exon15 領域のみで、K700E 変異の検出しが行えていない。しかし *SF3B1* 遺伝子は特定のアミノ酸に変異が集中することが知られており、K700E を含めて 5 つのホットスポットが有名である。Malcovati L らの調査によると、それぞれ頻度の高い順に Exon15 領域の 700 番目 ( 57.5% )、Exon14 領域の 666 番目 ( 10.7% )、662 番目 ( 10.1% )、622 番目 ( 7.1% )、625 番目 ( 6.0% ) などが報告されている。これらの変異は相互排他的に出現するため、今回 Exon15 領域は野生型であっても他領域に変異が生じていることが示唆された。

二つ目は、対象期間外で遺伝子解析の結果が変動している可能性である。今回、研究対象期間として設定した 5 年間で複数回骨髄穿刺を行っていた検体のうち、遺伝子変異解析の結果が変動した症例が 3 例あった。対象検体の診断名は基本的に初診時のものであるため、治療や経過に伴って遺伝子変異の比率などに変化が生じていることが考えられた。

今後は Exon15 領域以外の変異検索を含めてさらに検体数を重ね、経過を追った解析が必要である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 榊原佳奈枝、通山 薫	4. 巻 22 (3)
2. 論文標題 特殊染色を極める-正しい手法・評価とピットフォール 15分でわかる鉄染色	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本検査血液学会雑誌	6. 最初と最後の頁 441-446
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 0件）

1. 発表者名 榊原佳奈枝
2. 発表標題 特殊染色を極める-正しい手法・評価とピットフォール 15分でわかる鉄染色
3. 学会等名 日本検査血液学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宇野 茜、榊原佳奈枝、辻岡貴之、北中 明、通山 薫
2. 発表標題 我が国における鉄染色手法と環状鉄芽球判定の実態調査
3. 学会等名 日本検査血液学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宇野 茜、榊原佳奈枝、北中 明、通山 薫
2. 発表標題 血液形態所見と遺伝子所見の関連を探索 ～環状鉄芽球判定とSF3B1解析によるMDS診断精度向上を目指して～
3. 学会等名 日本臨床検査医学会
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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