

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15601

研究課題名（和文）遺伝性骨髄不全症候群に対する網羅的プロテオミクス解析

研究課題名（英文）Comprehensive proteomic analysis for inherited bone marrow failure syndrome.

研究代表者

若松 学（Wakamatsu, Manabu）

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00908882

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）：遺伝性骨髄不全症候群（IBMFS）は、先天的な遺伝子変異が原因で造血不全を示す症候群で、一部のIBMFS患者は急性骨髄性白血病や骨髄異形成症候群へと進展する。本研究では、IBMFS患者60例の末梢血単核球細胞を用いて、網羅的な深層プロテオミクス解析を行った。深層プロテオミクス解析に基づく非階層的クラスタリングでは、8個の新たなクラスターを同定しました。従来のショートリードによる遺伝子解析で診断が難しいシュワッハマン・ダイヤモンド症候群の補助診断として有用でした。本研究に基づく、IBMFS患者に対する迅速かつ簡便な診断システムの構築は、早期の診断と治療へと導き、予後の改善に寄与する可能性があります。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝性骨髄不全症候群（IBMFS）は、全身臓器の合併症や若年成人期で発がん素因を有する疾患が含まれ、適切な治療やフォローアップを提供するために精緻な診断が必要である。従来、ゲノム解析のみでは半数以上のIBMFS患者で疾患表現型の原因遺伝子を同定することができず、遺伝子解析を補完する新たな診断システムの構築が望まれていた。本研究では、IBMFS関連タンパク質を搭載したパネルを作製し、標的プロテオミクス解析を行い、大規模かつ迅速にプロテオミクス解析を実行するシステムを構築した。小児期や若年性成人で急性骨髄性白血病や骨髄異形成症候群を発症した患者のスクリーニング検査として実用化が望まれる。

研究成果の概要（英文）：Recent advances in in-depth proteomic analysis have enabled comprehensive quantitative analysis of >10,000 protein. Herein, a proteogenomic analysis integrated with transcriptome analysis for IBMFS was performed to reveal their biological features. Unsupervised proteomic clustering identified eight independent clusters, with the ribosomal pathway specifically downregulated in C1 and C2, enriched for DBA and SDS, respectively. Four patients with ADH5/ALDH2 deficiency showed significantly reduced ADH5 protein expression. Six patients with SDS had significantly decreased SBDS protein expression. To provide a large-scale rapid screening system for IBMFS, targeted proteomic analysis was performed in 417 samples. SBDS and ADH5 protein expressions were significantly reduced in SDS and ADH5/ALDH2 deficiency, respectively. The clinical application of targeted proteomic assays would help diagnose and screen IBMFS for which appropriate clinical screening tests are lacking.

研究分野：小児血液腫瘍

キーワード：遺伝性骨髄不全症候群 プロテオミクス解析 シュワッハマン・ダイヤモンド症候群

1. 研究開始当初の背景

遺伝性骨髄不全症候群 (Inherited Bone Marrow Failure Syndrome; IBMFS) は、先天的な遺伝子変異が原因となり、貧血、血小板減少、顆粒球減少などの造血不全を合併する症候群の総称である。多数の疾患を包括する概念であり、シュワッハマン・ダイヤモンド症候群 (Shwachman-Diamond syndrome; SDS)、ファンコニ貧血 (Fanconi anemia; FA)、ダイヤモンド・ブラックファン貧血 (Diamond-Blackfan anemia; DBA)、先天性角化不全症 (Dyskeratosis congenita; DC) などの疾患が含まれ、いずれの疾患も本邦で年間 10 例以下が新規に発症する稀な疾患である。IBMFS には、全身臓器の合併症や若年での発がん素因を有する疾患が含まれ、適切な治療法やフォローアップ体制を提供するために精緻な診断が必要不可欠である。例えば、IBMFS の代表的疾患であるファンコニ貧血では、遺伝的背景を有さない特発性再生不良性貧血患者に用いられる通常量のアルキル化剤による移植前処置を誤って投与した場合、致命的な臓器障害が出現することが知られている。このため、IBMFS 患者に対して迅速かつ正確な診断を行うことが臨床現場では求められる。

IBMFS の原因遺伝子として、これまでに 100 以上の遺伝子が同定され、網羅的遺伝子解析による診断率の向上が期待されている。次世代シーケンサー (next-generation sequencing; NGS) を用いた遺伝子解析が、その診断に有用であることが報告されているが、なお半数以上の 67% に相当する IBMFS 症例で原因遺伝子を同定できておらず、NGS 解析以外の診断システムの構築が必要である (図 1)。

近年、タンパク質の測定系における著しい技術革新があり、最新鋭の質量分析器を用いれば、約 9,000 種類の網羅的なタンパク質の同定と定量することが可能である。高深度 DIA (Data independent acquisition) プロテオミクス解析と呼ばれるこの解析技術を用いれば、キナーゼや転写因子などの従来は検出困難であった微量タンパク質も対象に包括的なタンパク質解析を行うことができる。本研究では高深度 DIA プロテオミクス解析を用いて、未だ確立した簡便な検査が存在しない SDS に対する迅速診断システムの構築を目指す。さらに約 9,000 種類に及ぶ網羅的タンパク質発現データをもとに、SDS 以外の他の IBMFS に対するタンパク質レベルでの病態解明や治療法の開発を検討することが可能であり、本研究が果たす意義は大きいと考えられる。

2. 研究の目的

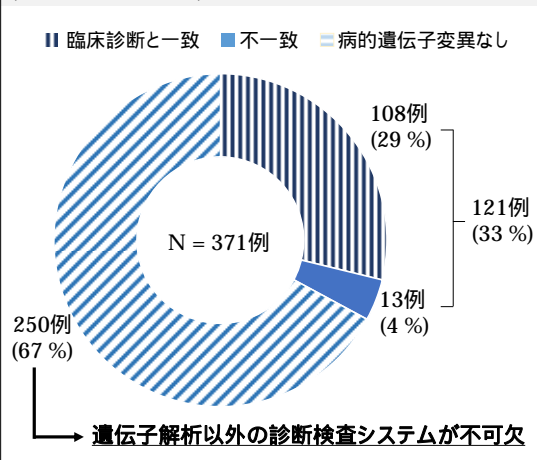
IBMFS の一つである SDS は、脾外分泌異常、血球減少、骨格異常を特徴とし、その 15~30% が骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndromes; MDS) や急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia; AML) へ進展する。輸血依存のある血球減少や MDS/AML へ進展した場合、根治療法として造血細胞移植が必要である。一部の SDS 患者は、乳幼児期に典型的な身体的特徴を認めず、成人期まで未診断のまま見逃される症例が存在する。最近の報告では、18~40 歳の MDS 患者のうち約 4% が SDS を背景疾患に有しており、その大部分の患者が小児期に見逃され、MDS を発症するまで一度も SDS と診断されなかったと報告された。つまり、(1) 乳幼児期に未診断のまま、SDS に特有の合併症に苦しんでいる小児例が存在する、(2) 成人期に発症した MDS/AML 患者に対して、SDS の背景疾患の評価が必要であること、を示唆している。

同様に、FA、DBA、近年新たに報告された IBMFS の一病型である ADH5/ALDH2 欠損症なども一部の症例が MDS/AML へ進展し、化学療法抵抗性であり、治療に難渋することが多い。IBMFS に対して、ゲノム解析を補完する迅速かつ簡便なスクリーニング検査法の開発することに成功すれば、実臨床で非常に有用な検査となる。本研究では、高深度 DIA プロテオミクス解析を用いて、IBMFS のタンパク質発現に基づく未だ確立した簡便な検査が存在しない SDS に対する迅速診断システムの構築を目指す。

3. 研究の方法

IBMFS 患者 60 人と健常対照者 14 人からなる探索コホートについて、高深度 DIA プロテオミクス解析、target-captured DNA 解析、RNA 解析によるオミックス解析を行った。網羅的 DIA プロテオミクス解析は、末梢血単核球サンプルからの消化ペプチドを Q Exactive HF-X (Thermo Fisher Scientific、米国マサチューセッツ州ウォルサム) のデータ非依存型取得質量分析計で処理した。さらに、標的となる IBMFS 関連タンパク質をターゲットとした診断プロテオミクス解

図1. 網羅的遺伝子解析によるIBMFSの診断率 (名古屋大学小児科)

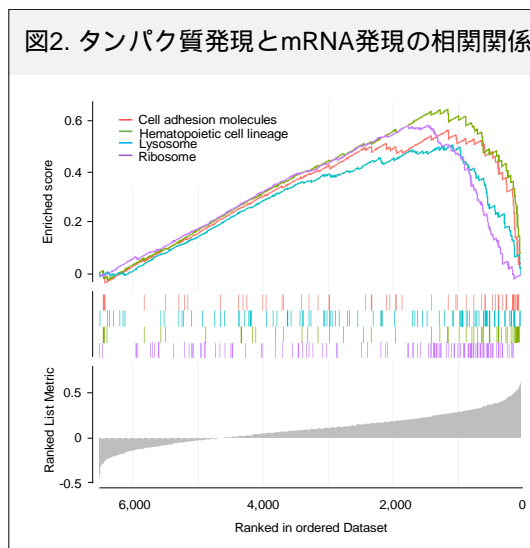


析を、EVOSEP ONE システム (EVOSEP、デンマーク、オーデンセ) を搭載した Orbitrap Exploris 480 質量分析計 (ThermoFisher Scientific) を用いて、拡大コホート (417 サンプル; IBMFS [n = 229]、再生不良性貧血 [n = 75]、骨髄異形成症候群 / 急性骨髄性白血病 [n = 113]、健常対照 [n = 27]) に対して実施した。本研究は名古屋大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認を得た上で実施した。

4. 研究成果

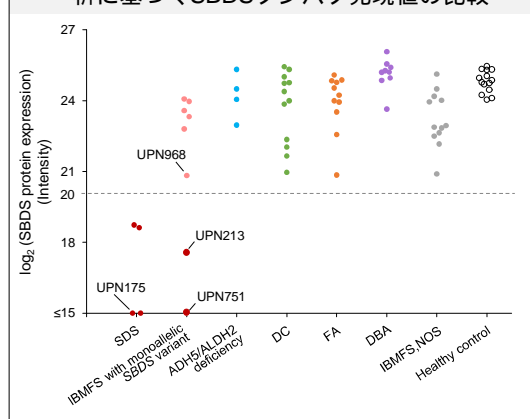
探索コホートは、臨床的に IBMFS と診断された患者で、かつ当科でターゲットシーケンス解析を実施した患者 60 例とした。探索コホートの患者から採取した末梢血単核球細胞 (PBMC) を用いて、最新の質量分析計 (Q-Exactive HF-X [Thermo Fisher Scientific 社]) で高深度 DIA プロテオミクス解析を行った。結果、1%の誤検出率以下で検出可能であった合計 8,741 個のタンパク質が同定され、うち 7,664 個 (87.7%) は 3 個以上のペプチドから構成されていた。アッセイの再現性を評価するために、7 サンプルは同一の PBMC からの網羅的プロテオミクス解析を重複して実施し、十分な再現性を認めることを確認した (相関係数[r]の中央値=0.8[範囲、0.78-0.84])。次に、高深度 DIA プロテオミクス解析を実施した同一 PBMC サンプルから抽出した RNA を用いて、探索コホート 60 例と健常対照 14 例を含む 74 サンプルで QuantSeq 3' mRNA シーケンス (RNA-seq) 解析を実施し、タンパク質発現と mRNA 発現の関係性を評価した (図 2)。両者の解析で発現データが評価可能であった 5,929 のタンパク質または mRNA 発現レベルを比較した結果、平均スピアマンの相関係数は 0.114 で予想される以上に相関関係は低く、その中で強く相関関係を示した生物学的プロセスは造血細胞系、細胞接着、リボソームのパスウェイであった。

図2. タンパク質発現とmRNA発現の相関関係



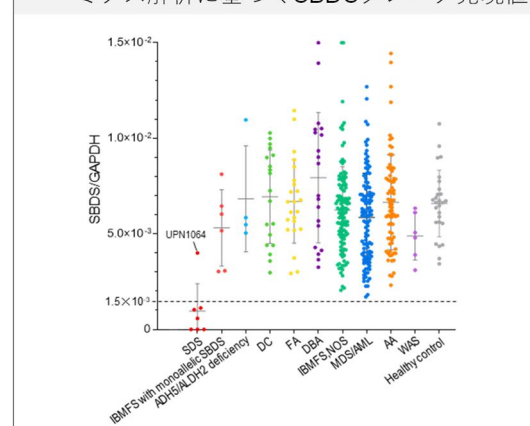
高深度 DIA プロテオミクス解析は、探索コホート 60 例と健常対照者 14 例から得られた 74 検体で実施した。教師なしクラスタリングにより、8 つの独立したプロテオミクスクラスター (C1 ~ C8) が同定され、リボソーム経路関連タンパク質の発現は C1 と C2 で特に低下していた。74 サンプルのうち、ADH5/ALDH2 欠損症患者 4 例は ADH5 タンパク質の発現が有意に低下し、残りの患者 70 例は正常発現であり、診断の一致率は 100%であった。さらに、74 検体中 6 検体で SBDS タンパク質の発現が有意に低下し、うち 2 サンプルはターゲットシーケンス解析では SBDS 遺伝子の病原性変異を片アレルしか検出されていない患者であったことから、プロテオミクス解析が遺伝子解析を補完する役割を果たすことが示唆された (図 3)。

図3. 探索コホートの高深度DIAプロテオミクス解析に基づくSBDSタンパク質発現値の比較



次に、IBMFS の大規模、かつ迅速なスクリーニングシステムを実用的な臨床環境で提供するために、拡大コホートとして IBMFS 患者を含む 417 サンプルに対して、ADH5 と SBDS タンパク質を検出する小パネルを作製し、標的プロテオミクス解析を行った。結果、SDS 患者では SBDS タンパク質の発現レベルが有意に低下していることが示された ($P = 4.98 \times 10^{-9}$) (図 4)。また、ADH5/ALDH2 欠損症では ADH5 タンパク質発現レベルが有意に低下していることも確認された ($P = 1.66 \times 10^{-6}$)。診断検査の感度および特異度は、SDS でそれぞれ 85.7% および 93.4%、ADH5/ALDH2 欠損症でそれぞれ 100.0% および 97.5% であり、早期診断および治療介入が必要な患者を同定するに十分と考えられる性能であることが示された。

図4. 拡大コホート417例における標的プロテオミクス解析に基づくSBDSタンパク質発現値



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Fujikawa Tomoko, Uemura Suguru, Hasegawa Daiichiro, Morisada Naoya, Nakamura Sayaka, Kozaki Aiko, Saito Atsuro, Kishimoto Kenji, Ishida Toshiaki, Mori Takeshi, Yakushijin Kimikazu, Katayama Yoshio, Yamashita Daiki, Wakamatsu Manabu, Hamada Motoharu, Muramatsu Hideki, Takahashi Yoshiyuki, Kosaka Yoshiyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Novel mutation in KIF23 causing congenital dyserythropoietic anemia type III in patients who underwent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Pediatric Blood Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pbc.30736	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 -

1. 著者名 Suzuki Kyogo, Wakamatsu Manabu, Ito Yoshifumi, Ishikawa Miki, Shimotakahara Akihiro, Futagawa Hiroshi, Yamamoto Yusuke, Nagamine Hiroki, Saito Osamu, Muramatsu Hideki, Yuza Yuki	4. 巻 71
2. 論文標題 Myeloproliferative disorder in a patient with RIT1 associated Noonan syndrome: Case report and literature review	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pediatric Blood Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pbc.30780	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 -

1. 著者名 Nagahama Jun, Nishikawa Takuro, Nakamura Tatsuro, Nakagawa Shunsuke, Kodama Yuichi, Terazono Hideyuki, Wakamatsu Manabu, Muramatsu Hideki, Yamashiro Yasuhiro, Kanno Hitoshi, Okamoto Yasuhiro	4. 巻 70
2. 論文標題 Severe thalassemia (Hb Zunyi) mimicking congenital dyserythropoietic anemia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pediatric Blood Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pbc.30706	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 -

1. 著者名 Yamashita Daiki, Muramatsu Hideki, Narita Atsushi, Wakamatsu Manabu, Tsumura Yusuke, et al	4. 巻 108
2. 論文標題 Hematological abnormalities in Jacobsen syndrome: cytopenia of varying severities and morphological abnormalities in peripheral blood and bone marrow	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 3438 ~ 3443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2022.282513	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 -

1. 著者名 Yamamori Ayako, Hamada Motoharu, Muramatsu Hideki, Wakamatsu Manabu, Hama Asahito, et al	4. 巻 98
2. 論文標題 Germline and somatic RUNX1 variants in a pediatric bone marrow failure cohort	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 American Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 E102-E105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ajh.26874	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 2件)

1. 発表者名 若松 学
2. 発表標題 遺伝性骨髄不全症候群に対するプロテオミクス解析による診断検査
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Manabu Wakamatsu
2. 発表標題 Diagnostic testing using in-depth proteomic analysis for inherited bone marrow failure syndrome
3. 学会等名 The 65th ASH Annual Meeting and Exposition (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Manabu Wakamatsu
2. 発表標題 Diagnostic utility of aldehyde degradation deficiency syndrome using proteomic analysis
3. 学会等名 The 3rd Regional Symposium on Myelodysplastic Syndromes (国際学会)
4. 発表年 2024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
---------	---------