

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591389

研究課題名(和文)好酸球増多症候群に対する新しいバイオマーカーに基づいた診断と標準治療法の確立

研究課題名(英文)Development of novel diagnostic and therapeutic biomarkers for hypereosinophilic syndrome

研究代表者

定 明子(SADA, AKIKO)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：90467655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：好酸球増多症候群(HES)は原因が不明な好酸球増加症を伴う疾患群である。本研究では、全国多施設からの依頼症例に対し情報提供と助言により診断を行い、RT-PCR法によりFIP1L1-PDGFRα(F-P)キメラ遺伝子を検索した。また、様々な好酸球増加症候群の患者既存検体からリン酸化ペプチドを抽出しnanoLC-MS/MSによる質量分析を行った。その結果、F-Pキメラ陽性群と反応性好酸球増加症群との間にはリン酸化パターンに明らかな違いがあり、両者が区別されることがわかった。このリン酸化の違いに着目すれば、HESの原因解明や鑑別診断に有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hypereosinophilic syndrome (HES) is a heterogeneous disorders characterized by prolonged eosinophilia with causes unknown. We clarified the clinical differential diagnosis of the patients who participated in this study, and tested for the existence of FIP1L1-PDGFRα chimeric mRNA by RT-PCR. Moreover, we also performed phosphoproteomic studies by mass spectrometry (nanoLC-MS/MS) using the phosphopeptides extracted from peripheral blood of various patients and found the different profiles with which correlate the underlying condition of eosinophilia. This information of phosphopeptides could be useful in the differential diagnosis of HES.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：好酸球増多症候群 チロシンキナーゼ リン酸化プロテオミクス

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。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、RT-PCR法により *FIP1L1-PDGFR* (F-P) キメラ遺伝子検査を行い、HES の臨床像や実態を調査してきた。F-P キメラ遺伝子は分子標的治療薬が有効な分子異常であることから、その検出は診断・治療方針の両面で臨床的に非常に重要である。しかし、その陽性率は HES の 2 割未満であり、F-P キメラ陰性 HES の一部でもイマチニブが有効な例が知られている。イマチニブ有効例では未知のチロシンキナーゼ異常の関与が示唆され、新しいバイオマーカーの同定が望まれている。

2. 研究の目的

HES においてイマチニブ有効群と無効群の間にはチロシンリン酸化蛋白発現の違いが認められることが推察される。そこで、本研究では様々な原因の好酸球増加症におけるリン酸化蛋白の情報を比較することにより、好酸球増加症の鑑別と分子標的治療法の選択の指標となり得る新規バイオマーカーの開発を試みた。

3. 研究の方法

(1) HES 患者を担当する全国多施設の担当医からの依頼を受け、共同して診断を行った。書面による同意が得られた症例では静脈血から採取した血液細胞を当施設に凍結保存し、nested RT-PCR 法による F-P キメラ遺伝子検査を行い、残りの凍結保存検体を以下の蛋白質発現解析に使用した。

(2) 凍結保存血球細胞から可溶性蛋白質を抽出し抗リン酸化チロシン残基抗体によるウエスタンブロット法を行った。

(3) 同様に凍結保存検体からリン酸化ペプチドを抽出し nanoLC-MS/MS による質量分析を行った。

(4) 統計ソフトあるいはデータマイニングソフトを用いて多変量解析やデータマイニングにより、質量分析で得られたデータを用いて症例間のリン酸化ペプチド発現の比較解析を行った。

4. 研究成果

(1) 全国多施設からの問合せ症例の累積件数約 280 件のうち、過半数は反応性好酸球増加症 (サイトカイン依存性) が疑われた。F-P キメラ陽性例を含む *PDGFR* 遺伝子再構成に関

連した腫瘍性好酸球増加症は全体の 6% であり、反応性好酸球増加症を除外した HES 症例中では 20% の頻度で認められた。諸外国からの文献報告によると F-P キメラ陽性頻度は 5% ~ 50% と幅広く、高度な好酸球増加を伴う反応性好酸球増加症を母集団からどの程度除外するかによって異なる。一般的に F-P キメラ陽性率は反応性好酸球増加症を除外した HES のうち 10-20% と考えられており、本研究で観察された陽性率は諸外国の頻度とほぼ合致していると思われる。

(2) 十数人の患者末梢血保存検体から抽出した可溶性蛋白質を用いて抗リン酸化チロシン残基抗体を用いたウエスタンブロット法では、類似した症例毎に異なるリン酸化蛋白の発現パターンが確認できた。臨床データと照らし合わせ、*PDGFR* に該当する高分子量のチロシンリン酸化の違いは、好酸球増加症の原因とイマチニブ反応性に関連性があることが推察された。しかし、検体に含まれる蛋白は微量であり、ウエスタンブロット法および免疫沈降法などの抗体を用いた技術では、目的とする蛋白を同定することはできなかった。

(3) リン酸化蛋白発現の違いを検出するため、数十例の患者検体を用いて一斉にリン酸化プロテオミクス解析を行った。その結果約 8000 種類に及ぶ大規模なリン酸化ペプチドのデータが得られた。クラスター分析では HES 診断群と反応性好酸球増加症など HES 以外の疾患群に大別され、分散分析では F-P キメラ陽性群と明らかな反応性好酸球増加症群との間にはリン酸化パターンに明らかな違いが認められた。この違いの要因をさらに探索することにより HES の個別化につながるバイオマーカー候補を特定することは可能と思われた。

(4) さらに詳細な解析を進めるため、得られた実験データとそれぞれの蛋白の機能との関連性やシグナル伝達経路での位置づけを行うための準備として、実験データに関連する蛋白の機能などの関連情報のデータベースを作成した。現在ヒトを対象とした大規模リン酸化プロテオーム解析の報告例はなく、本研究結果からは既知情報にとらわれない先駆的な情報が得られることが期待される。データマイニングおよびバイオインフォマティクスによる好酸球増加症に伴う解析を試みており、今後も本研究を継続し、解析を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(計 17 件)

Uchida T, Kitaura J, Nakahara F, Togami K, Inoue D, Maehara A, Nishimura K, Kawabata KC, Doki N, Kakihana K, Yoshioka K, Izawa K, Oki T, Sada A, Harada Y, Ohashi K, Katayama Y, Matsui T, Harada H, Kitamura T. Hes1 upregulation contributes to the development of FIP1L1-PDGRA-positive leukemia in blast crisis. *Experimental hematology* 2014;42:369-79 e3(査読あり)

Minagawa K, Wakahashi K, Kawano H, Nishikawa S, Fukui C, Kawano Y, Asada N, Sato M, Sada A, Katayama Y, Matsui T. Posttranscriptional modulation of cytokine production in T cells for the regulation of excessive inflammation by TFL. *J Immunol*. 2014 ;192(4):1512-24.(査読あり)

Sakane-Ishikawa E, Kodaka T, Tsunemine H, Itoh K, Akasaka H, Kusama T, Imaizumi K, Taketomi M, Sada A, Katayama Y, Itoh T, Takahashi T. Eosinophilia and bone lesion as clinical manifestations of aggressive systemic mastocytosis. *J Clin Exp Hematop*. 2013;53(3):207-13.(査読あり)

Kawano H, Suzuki T, Ishii S, Wakahashi K, Kawano Y, Sada A, Minagawa K, Ueno D, Yamasaki T, Itoh T, Yokozaki H, Katayama Y. Recurrence of abdominal large-vessel vasculitis and development of severe Sweet syndrome after a single cycle of 5-azacytidine in a patient with myelodysplastic syndrome. *Eur J Haematol*. 2014;92(4):362-4. (査読あり)

定明子, 松井利充. 好酸球増加を伴う造血器腫瘍 ~ 変わりゆく HES/CEL (hypereosinophilic syndrome/chronic eosinophilic leukemia) の概念 ~ 血液フロンティア 2014;24:37-47(査読無)

Sato M, Asada N, Kawano Y, Wakahashi K, Minagawa K, Kawano H, Sada A, Ikeda K, Matsui T, Katayama Y. Osteocytes regulate primary lymphoid organs and fat metabolism. *Cell Metab*. 2013;18(5):749-58.(査読あり)

Kawano H, Wakahashi K, Ebara S, Ishii S, Suzuki T, Kawano Y, Sada A, Minagawa K, Matsui T, Kawakami F, Hayashi Y, Itoh T, Katayama Y. Unusual hepatic involvement with significant fibrosis

in adult T cell leukemia. *Ann Hematol*. 2014 ;93(5):897-8.(査読あり)

Asada N, Katayama Y, Sato M, Minagawa K, Wakahashi K, Kawano H, Kawano Y, Sada A, Ikeda K, Matsui T, Tanimoto M. Matrix-embedded osteocytes regulate mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell Stem Cell*. 2013 ;12(6):737-47.(査読あり)

Kawano H, Yamamoto D, Uchihashi Y, Wakahashi K, Kawano Y, Sada A, Minagawa K, Katayama Y, Kohmura E, Souri M, Ichinose A. Severe inhibitor-negative acquired factor XIII/13 deficiency with aggressive subdural haemorrhage. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2013;24(6):638-41.(査読あり)

Kawano H, Minagawa K, Wakahashi K, Kawano Y, Sada A, Matsui T, Hirano H, Shiomi H, Ku Y, Katayama Y. Successful management of obstructive jaundice due to gallstones with eculizumab in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Intern Med*. 2012;51(18):2613-6.(査読あり)

Kawano H, Minagawa K, Wakahashi K, Kawano Y, Sada A, Matsui T, Katayama Y. [Diminished expression of CD5 and/or CD7 surface antigens as the first clue of diagnosis for monoclonal T lymphocytosis]. *Rinsho Ketsueki*. 2012;53(8):785-7.(査読あり)

Kobayashi D, Kogawa K, Imai K, Tanaka T, Sada A, Nonoyama S. Hyper-eosinophilia in granular acute B-cell lymphoblastic leukemia with myeloid antigen expression. *Pediatr Int*. 2012;54(4):543-6.(査読あり)

森永 信吾 高一, **定明子**. 発熱・肝腫大を呈した小児特発性好酸球増多症候群. *臨床血液* 2012;53:83-6.(査読あり)

Wakahashi K, Yamamori M, Minagawa K, Ishii S, Nishikawa S, Shimoyama M, Kawano H, Kawano Y, Kawamori Y, Sada A, Matsui T, Katayama Y. Pharmacokinetics-based optimal dose prediction of donor source-dependent response to mycophenolate mofetil in unrelated hematopoietic cell transplantation. *Int J Hematol*. 2011;94(2):193-202.(査読あり)

定明子, **松井利充**. 造血器腫瘍をもつと理解しよう 改定WHO2008分類をふまえて 好酸球増加症へのアプローチ. 日本検査血液学会雑誌 2011;12:231-9. (査読無)

皆川健太郎, **定明子**, **松井利充**. 一般内科医がみる血液疾患 血液専門医との効率的な連携のために:血液疾患の診断へのアプローチ 白血球増多の鑑別診断. Medicina 2011;48:1722-5. (査読無)

定明子, **松井利充**. 骨髄増殖性腫瘍(MPN)の最新の進歩:慢性好酸球性白血病・特発性好酸球増多症候群の診断と治療. 最新医学 2011;66:2558-65. (査読無)

〔学会発表〕(計 1件)

Yuka Sugimoto, **Akiko Sada**, Fumihiko Monma, Kohshi Ohishi, Masahiro Masuya, Toshimitsu Matsui and Naoyuki Katayama, A Novel FOXP1-PDGFRα Fusion Gene in A Case of Chronic Eosinophilic Leukemia. 2012.12.9. Atlanta,GA

〔図書〕(計 1件)

定明子, **松井利充**. 好酸球増加症候群(HES). 専門医のための薬物療法 Q&A 血液 小松則夫 編 127-137 2011 中外医学社

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/im3/rinsyo/ketueki/research.html>

<http://www.hosp.kobe-u.ac.jp/consultation/guide/departmen t/ketueki.html>

UMIN 臨床試験:登録番号 8653,8655,9140

6. 研究組織

(1)研究代表者

定明子 (Sada Akiko)

神戸大学・医学研究科・研究員

研究者番号: 90467655

(2)研究分担者

松井 利充 (Matsui Toshimitsu)

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号: 10219371

(平成23年4月~平成23年7月)

(3)連携研究者