

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461461

研究課題名(和文) 未知血友病A発生病機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the unknown mechanisms underlying the pathogenesis of hemophilia A

研究代表者

稲葉 浩 (Inaba, Hiroshi)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：90183178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究は未知血友病A発生病機構を解明することを目的とした。一般的な解析方法では病変変異が検出できなかった5症例を対象とした。原因遺伝子(F8)の詳細な解析から、3症例についてはF8内から病変変異が検出された。1例の解析からは、サンプルDNAのソースの重要性を示唆する重要な知見が得られた。別の2例の解析では、本邦初となるX染色体長腕内での大規模な構造異常(逆位)を同定した。病変変異未検出の2例では、次世代シーケンシングによるF8の網羅的解析を施行し、各症例からそれぞれ1か所ずつ、イントロンの深部に病変候補となり得る非常に稀なvariantを検出したが、現時点で血友病との因果関係は不明である。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate unknown mechanisms underlying the pathogenesis of hemophilia A. Five hemophilia A patients in whom an etiological variant could not be identified by a standard analysis were investigated. A more detailed analysis of the responsible gene (F8) revealed the causative variant in 3 patients. The analysis of one of these cases revealed a meaningful finding that suggested the importance of the source from which the sample DNA was obtained. The analysis of the other two cases revealed large structural variants (inversion) on the long arm of the X chromosome that had not previously been detected in Japan. An exhaustive analysis of the F8 was performed using next-generation sequencing for the remaining two cases in which the etiology had not been detected. In each case, a very rare variant was detected deep inside the intron. Although this might have been the causative variant, its causal relationship with hemophilia remains to be elucidated.

研究分野：血液凝固学

キーワード：血友病 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

血友病 A は X 染色体性劣性の遺伝形式をとる先天性出血性疾患であり、平成 22 年度の調査では、本邦における患者数は 4,394 名と報告されている。血友病 A 患者の病因遺伝子変異解析は、原因遺伝子である *F8* が 1984 年にクローニングされて以来、世界的な規模で進められた。その結果、血友病 A の約 25% が *F8* イントロン 22 内の配列に起因する X 染色体の逆位によって発症することが明らかとなった。また、この逆位以外の変異については、非常に多様であることが確認されており、国際的なデータベースには 2012 年 6 月の時点で 3,089 例の症例から検出された計 1,492 種類にもおよぶ変異が登録されている。本邦での血友病 A 患者の遺伝子解析は、我々の施設を含めた 3 施設が主となって施行している状況にある。我々は 1987 年から本邦の血友病 A 患者の *F8* 解析に着手し、これまでに約 180 症例の解析を行ってきたが、5 例については *F8* のコーディング領域の詳細な解析にも関わらず、病因と考えられる遺伝子変異が検出できなかった。同様の報告はドイツのグループからもなされている。*F8* が全長 186kb におよぶ巨大な遺伝子であることから、これまでのコーディング領域を中心とした解析では、*F8* のおよそ 10% を解析しているに過ぎない。したがって、病因変異が検出できない症例では、解析がおよんでいない領域に何らかの病因遺伝子変異が潜んでいる可能性が高いのではないかと考えられる。

しかしながら近年、新規血友病 A 発生機構の存在を示唆するような報告がなされた。ひとつは mRNA レベルで確認されている。異所性発現される第 VIII 因子遺伝子の mRNA の解析から、病因遺伝子変異が検出できなかった症例の一部では、mRNA の著しい減少がみられたという報告である。しかし mRNA が減少する機構は解明されていない。もうひとつは翻訳後の障害である。第 VIII 因子および第 V 因子の小胞体からゴルジ体への輸送には、LMAN1 (ERGIC-53) と MCFD という 2 つのシャペロンが関わっており、これらの異常が第 VIII・V 因子の欠乏状態を引き起こすという報告がある。この報告の障害は、第 VIII 因子のみならず第 V 因子も欠損することから、血友病 A に特異的な発生機構であるとは考えられないが、第 VIII 因子タンパク質合成後の修飾過程や細胞内輸送過程における同様の障害が血友病 A を発生させる可能性は考慮すべきである。

これらのことから我々は、ゲノム DNA、翻訳、翻訳後修飾、細胞内輸送、異化のいずれかの過程に生じる未知の障害が血中第 VIII 因子の欠乏を起こし、血友病 A 発生につながっているであろうと考え、本研究を計画するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、一般的な解析で病因遺伝子変

異が検出できない症例に焦点を絞り、その血友病 A 発生機構を、遺伝子およびタンパク質の両側面からのアプローチにより解明する。

さらに、得られた機構の引き起こす血友病 A のフェノタイプも併せて詳細に解析し、血友病 A の総合的な理解を深め、新規治療薬や治療法への応用を図る。

3. 研究の方法

(1) DNA 解析

a. *F8* 遺伝子解析

本研究において解析対象とした症例は、世界的にスタンダードな *F8* のコーディング領域の塩基配列解析では異常がされないことを確認しているが、これをもう一度確認した。すなわち、PCR とダイレクトシーケンスを用い、*F8* の全 26 のエクソンとその近傍の領域、および 5' および 3' 非翻訳領域には異常がないことを確認した。そのうえで、やはり変異が検出できなかった場合には可能な限り広範囲に解析領域を拡大した。特に、発現制御に関与する可能性が推測される配列や 3' 非翻訳領域の miRNA 結合モチーフ配列などの部分の解析を重点的に進めた。

b. *F8* 中の重複の確認

大規模な構造変異の存在について確認を行った。これまでの解析から大規模な欠失については存在しないことを確認しているが、大規模な重複については未解析であった。そこで、エクソン数を解析する目的で MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) 法を施行した。

c. *F8* 全塩基配列の解析

前述のように *F8* は全長 186kb におよぶ巨大な遺伝子であるが、近年開発された次世代シーケンサーを用いれば、全塩基配列を決定することが可能である。この方法を用い、これまで解析がおよばなかったイントロンの深部の解析を試みた。実際の方法としてはアンプリコンシーケンス法を適用した。*F8* 遺伝子全体を 14 分割して、KOD FX neo (東洋紡)を用いて、ロングレンジ PCR にて増幅した (図 1)。

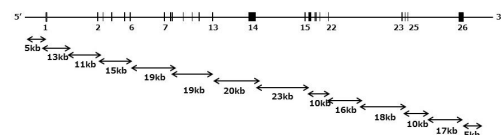


図 1 第 VIII 因子遺伝子のロング PCR

得られた PCR 産物は illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE ヘルスケア)で精製した。精製した PCR 産物は等モルになるように混合し、Nextera XT DNA Sample Prep Kit (イルミナ)を用いてライブラリーを作製した。MiSeq (イルミナ)と MiSeq reagent kit nano v2 (イルミナ)を用い、Paired-End でシーケンスし、得られた配列

は GRCh37/hg19 にアライメントして解析した。
d. バイオインフォマティクス

次世代シーケンス解析結果は Variant Studio データ解析ソフトウェア(イルミナ)を用いてアノテーションをつけた。また、構造変異の検出は、BWA(Burrows-Wheeler Aligner)でアライメントした結果を BreakDancer ソフトウェアで解析した。

(2) RNA 解析

イントロンの内部に存在する変異は、DNA レベルでの確認が困難な場合であっても mRNA の発現量低下やスプライシング異常として検出される可能性がある。第 VIII 因子の産生細胞といわれる類洞内皮細胞での発現は確認することができないため、血液中の細胞での異所性発現で *F8* mRNA を解析した。発現量はリアルタイム PCR によって相対定量した。また、スプライシング様式は RT-PCR によって解析した。

(3) 新規症例の解析

我々はすでに約 180 症例の血友病 A の *F8* 遺伝子解析を行ってきたが、さらなる症例の解析を継続的に進めていくことは、本研究の目的を達成するうえで重要であると考えられたため、本研究期間中、継続的に新規症例の解析を施行した。

4. 研究成果

(1) 末梢血幹細胞移植後の患者の解析

解析対象とした患者の 1 名は、詳細な背景の確認から、末梢血幹細胞移植を受けていたことが判明した。そのため、血液細胞由来の DNA を用いていたこれまでの解析では変異が検出できなかった可能性が示唆された。そこでサンプルを口腔粘膜由来の DNA に替えて再解析したところ、血液細胞由来 DNA では確認できなかった 1 塩基置換 (c.6,274-8A>G) がイントロン 21 の 3' スプライス部位から検出された。この置換は変異や多型としてこれまでに報告のないものであった。各種スプライシング予測ソフトを用いた解析から、この置換は異常なスプライシングを起こすであろうことが予測され、病因となる可能性が非常に高いと考えられた。しかしこの部位のエレクトロフェログラムは、野生型のアデニンが優位に検出され、変異体のグアニンのシグナルはわずかに混入する程度でしかなく、グアニンのシグナルがアーチファクトの可能性も否定できなかった。そこでさらに、爪から DNA を抽出し、同部位の配列を解析した。その結果、爪では変異体のみと判断できるシグナルで確認された。

この症例の解析は新規血友病 A 発生機構の発見には繋がらなかったが、サンプル DNA を得る組織が適切でないと病因変異を検出できない可能性を再認識する重要な知見となった。未だ確固たる結論に至っていないが、第 VIII 因子の主たる産生細胞は肝臓の類洞内皮細胞とされている。したがって、血友病 A の病因遺伝子解析は本来、類洞内皮細胞の

F8 を解析すべきであろう。本症例は人工的なキメラとなっており、血液細胞が他の体細胞とは異なる遺伝子型であったために病因変異が検出できなかった。しかしながら、これと同様な状態は、体細胞モザイクとして自然に存在する可能性があり、このような場合にも血液細胞由来の DNA 解析では病因変異を検出できないと考えられる。このことから、これまで病因変異が検出できなかった症例では、サンプル DNA を抽出する組織を替えることが効果的である可能性が示唆された。

(2) 本邦初の逆位の同定

平成 25 年度の解析において、対象症例の 1 例では、エクソン 2 以降が正常なスプライシングを受けて存在していることが異所性発現される mRNA の解析から確認できた。重症血友病 A を引き起こす病因として、イントロン 1 内の配列 (int1h) に起因する X 染色体内の逆位が諸外国から報告されているおり、mRNA の解析結果は、本症例がその逆位である可能性を示唆するものであった。そこでプライマーを設計・合成し、ロング PCR にて解析したところ、予想通りイントロン 1 に起因する逆位が確認できた。この逆位の国内での検出はこの症例が初めてであり貴重な知見となった。その後の研究期間中の解析から、別のもう 1 例からもこの逆位が検出された。諸外国からの報告によれば、この逆位は重症血友病 A の 1-5% 程度の頻度で存在するとされている。これまで本邦では報告がなかったが、本研究により、本邦にも諸外国と同程度の頻度でこの逆位が存在するであろうことが判明した。

(3) *F8* の次世代シーケンス解析の開発と施行

平成 26 年度以降、次世代シーケンスを導入し *F8* の網羅的解析を施行した。次世代シーケンスを用いた *F8* の詳細な解析は、現時点でドイツからの報告が 2 報¹⁾²⁾あるのみであり、国内では極めて先駆的な解析となった。当初は病因変異が同定できていない症例のみの解析を計画し、施行した。しかしその解析から複数の variant が検出され、各 variant の血友病との因果関係を検討する必要が生じた。

まず、検出された各 variant のアノテーションを確実につけ、血友病との関わりについて考察した。しかしながらアノテーションのみでは病因を特定することはできなかった。次に既存の国際的データベースを参照し、各 variant の検出頻度から検討した。しかし、データベースの内容があいまいなことが多く、また、参照したい部分のデータは、特に日本人の解析データについては不十分であった。

そこで独自の解析から in-house のデータベースを作成する必要があると判断するに至った。すでに病因変異が同定されている血友病 A 症例も可能な限り解析することを計画し、平成 26・27 年度に計 45 例の血友病 A 症

例の F8 の網羅的解析を施行した。その結果、当初、複数存在した病因変異候補 variant は、最終的に各症例からはそれぞれ 1 か所ずつにまで絞り込まれた。それぞれの variant はイントロンの深部に位置し、非常に稀な variant であった。この 2 つの variant は Combined Annotation Dependent Depletion 解析において高いスコアを示し、病因変異である可能性が示唆されたが、研究期間中に血友病 A との因果関係について明らかにすることはできなかった。

今後、ゲノム編集の技術を用いた発現実験を行い、これら variant の病因としての可能性、およびその血友病発症メカニズムについて検討していく予定である。

<引用文献>

Pezeshkpoor B, Zimmer N, Marquardt N, Nanda I, Haaf T, Budde U, Oldenburg J, El-Maarri O. Deep intronic 'mutations' cause hemophilia A: application of next generation sequencing in patients without detectable mutation in F8 cDNA. *J Thromb Haemost.* 2013 Sep;11(9):1679-87. doi: 10.1111/jth.12339.

Bach JE, Wolf B, Oldenburg J, Müller CR, Rost S. Identification of deep intronic variants in 15 haemophilia A patients by next generation sequencing of the whole factor VIII gene. *Thromb Haemost.* 2015 Oct;114(4):757-67. doi: 10.1160/TH14-12-1011.

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)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Inaba H, Shinozawa K, Seita I, Otaki M, Suzuki T, Hagiwara T, Amano K, Fukutake K. Genotypic and phenotypic features of Japanese patients with mild to moderate hemophilia A. *Int J Hematol* 査読有 97 巻 2013 758-64 DOI: 10.1007/s12185-013-1341-9.

〔学会発表〕(計 8 件)

稲葉 浩, 鈴木隆史, 篠澤圭子, 天野景裕, 福武勝幸 骨髄移植を受けた血友病 A の解析から 2016 年 6 月 18 日 奈良春日野国際フォーラム(奈良市・奈良県)

稲葉 浩, 篠澤圭子, 天野景裕, 福武勝幸 血友病 A の病因遺伝子解析に対する次世代シーケンスの有用性の評価 日本血液学会 2015 年 10 月 17 日 石川県立音楽堂(金沢市・石川県)

稲葉 浩, 篠澤圭子, 天野景裕, 福武勝幸 サイレンと変異を病因とする可能性が示唆された軽症血友病 A 日本血栓止血学会 2015 年 5 月 21~23 日 甲府市総合市民会館(甲府市・山梨県)

稲葉 浩, 篠澤圭子, 萩原 剛, 鈴木隆史, 天野景裕, 福武勝幸 血友病 A の病因遺

伝子解析に対する次世代シーケンス応用の試み 日本臨床検査医学会 2014 年 11 月 23 日 福岡国際会議場(福岡市・福岡県)

稲葉 浩, 篠澤圭子, 天野景裕, 福武勝幸 血友病 A の病因遺伝子解析に対する次世代シーケンスの応用 日本血液学会 2014 年 11 月 1 日 大阪国際会議場(大阪市・大阪府)

Hiroshi Inaba, Keiko Shinozawa, Kagehiro Amano, Katsuyuki Fukutake The synonymous mutation, c.120C>A; p.(L40=), in F8 maybe cause mild hemophilia A. *International Society on Thrombosis and Haemostasis Jun.* 24, 2014, Toronto (Canada)

Hiroshi Inaba The etiology of hemophilia hiding deep inside the F8 intronic sequence. 2013 East Asia Hemophilia Forum, Sep. 7-8, 2013, Seoul (Korea)

稲葉 浩, 篠澤圭子, 鈴木隆史, 清田育男, 大瀧 学, 萩原 剛, 天野景裕, 福武勝幸 重症血友病 A を引き起こす遺伝子変異の特徴 日本血栓止血学会 2013 年 5 月 30 日~6 月 1 日 山形国際ホテル(山形県・山形市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲葉 浩 (INABA, Hiroshi)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号: 90183178