

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670446

研究課題名(和文) 骨髄異形成症候群における自己免疫機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of autoimmune mechanisms of myelodysplastic syndromes

研究代表者

小川 誠司 (OGAWA, SEISHI)

東京大学・医学部附属病院・その他

研究者番号：60292900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：再生不良性貧血(AA)はその経過中に骨髄異形成症候群(MDS)に代表されるクローン性造血器疾患を発症することが古くから知られている。そのメカニズムは未だ明らかではないが、遺伝子変異による細胞障害性T細胞(CTL)からのエスケープが重要な役割を担っている可能性が想定される。今回AAにおけるCTLとその標的抗原を同定する目的でAAにおける遺伝子変異の網羅的な探索を行ったところ、AAの60%内外の症例で遺伝子変異が同定された。変異は多様な遺伝子に生じていたが、一部はMDSにおける変異の標的と一致しており、変異によるCTLからのエスケープがMDSにおけるクローン性造血に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It was well known that many patients with aplastic anemia (AA) develop clonal disorders including myelodysplastic syndromes (MDS). Although the underlying mechanism is poorly understood, some escape from cytotoxic T-cells involved in AA pathogenesis is implicated in the progression to MDS. In this study, through a comprehensive analysis of somatic mutations in AA, we identified frequent somatic mutations of a wide variety of genes in as many as 60% of patients with AA. Some mutations affected known mutational targets in MDS, such as DNMT3A, ASXL1, and BCOR. Our results may indicate that these mutational targets could represent common targets of CTLs in AA, which when mutated, involved not only in escaping from CTL but also in clonal selection in MDS. It should be warranted in future studies to test whether these mutational targets encode common epitopes that are recognized by CTLs in AA.

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：骨髄異形成症候群 自己免疫 HLAテトラマー

1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群(MDS)、再生不良性貧血(AA)および発作性夜間血色素尿症(PNH)は、いずれも汎血球減少を呈する後天性骨髄不全の代表的な疾患であるが、これらの疾患群の一部の症例では長期の経過中に相互の病型移行が認められることから、従来、その病態における関連が古くから示唆されているところである。これらの疾患群では(AAにおいても)、体細胞変異や、染色体異常、X染色体の不活化の偏りなどによって確認されるクローン性造血が認められることは顕著な特徴で、AAやPNHにおいてはこうしたクローン性造血が体細胞変異による自己免疫からのエスケープ現象として生じていることが示唆されている。今回の研究は、少なくとも一部のMDSにおいては、AA/PNH同様の自己免疫が血球減少に関与しており、発症の初期においては、変異によって誘導される自己免疫に対するある種のエスケープが関わっているのではないかという仮説に基づく。研究を通じて、AA/PNH/MDSに共通する自己抗原が同定されるとともに、その免疫反応を担うCTLの特性を明らかにすることができれば、これらの疾患概念を大きく変える発見となる。

2. 研究の目的

本研究では、上記の仮説に基づいて、AAの責任抗原とこれを認識するCTLを同定した上で、CTLを認識するHLAテトラマーを作成し、これを用いて、MDS患者骨髄細胞中におけるCTLの有無と動態をアッセイすることにより、MDSにおける自己免疫の関与を検討する。具体的には、6pUPDクローンと関連する最も代表的なHLAアレル、B*4002を有する新規に診断されたAA患者からCTLを樹立し、胎児肝細胞cDNAライブラリーを用いた発現クローニングによってB*4002に提示されるAAの標的抗原を同定する。当該抗原とHLA B*4002からなるHLAテトラマーを作成し、HLA B*4002を有するMDS患者骨髄中のCTLを同定することにより、MDSにおける自己免疫の関与を明らかにする。

3. 研究の方法

1) HLA B*4002陽性のAA/PNH患者骨髄からのCTLの樹立

HLA B*4002はAAに伴う6pUPDにおいて最も高頻度に欠失するHLAアレルの一つである。そこで、免疫抑制療法未施行のHLA B*4002アレルを有するAA/PNH患者の骨髄検体よりT細胞分画を採取し、これをB*4002アレルを遺伝子導入し、放射線照射を施した肝がん由来細胞株HepG2ないし慢性骨髄性白血病由来細胞株K562と共培養することにより選択されるCTL細胞株を樹立することを試みる。

2) CTLにより認識される抗原のクローニング

でCTLが樹立された場合、樹立に用いた細胞株よりcDNAライブラリーを作成したのち、プールに分けて発現クローニングを試みる。プールをレトロウィルスベクターにより293T細胞に発現させたのち、CTLアッセイによって陽性を示すプールを同定し、プールの分割ののち、これを繰り返すことにより、抗原エピトープを含むクローンを同定する。続いて、同遺伝子のアミノ酸配列を用いたコンピュータ予測により、HLA B*4002に提示される可能性のあるエピトープを探索し、最終的にCTLが認識するエピトープを同定する。

3) 上記の方法によってエピトープの同定が困難な場合は、AA患者における体細胞変異を、次世代シーケンサを用いて網羅的に探索することにより、候補抗原の同定を行い、続いて当該試料の有するHLA上に提示される抗原をコンピュータ予測プログラムを用いて探索する。

4. 研究成果

当初予定した、「HLA B*4002陽性で免疫抑制療法の未施行の再生不良性貧血の患者」由来の骨髄および末梢血の入手が進まず、当初の研究計画の実行が困難であった。そこで、研究計画を再考し、「再生不良性貧血でしばしば生じているクローン性造血が、標的抗原の変異によって上記仮説のCTLからの攻撃をエスケープした結果である」という可能性に基づいて、AAで生じたクローン性造血で認められる体細胞変異を網羅的に解析することにより、当該HLAに提示される抗原の候補を同定することにより、当初の研究目的の遂行を試みた。

32例のAA患者の末梢血DNAについて全エクソン解析を行ったところ15例の患者検体について計68個の体細胞変異が確認された。興味深いことに、これらの体細胞変異はU2AF1, RUNX1など、MDSでもしばしば変異を生ずることが知られている遺伝子に生じていたが、その頻度分布はMDSとは異なっており、TET2, SRSF2, SF3B1などの変異は低頻度である一方、DNMT3A, ASXL1, BCOR, PIGA遺伝子の変異がもっとも高頻度に観察された。このことを確認する目的で、178例の再生不良性貧血症例を対象として、MDSその他の骨髄系腫瘍で高頻度に変異を来すことが知られている106個の遺伝子について、次世代シーケンサを用いたdeepシーケンスを行った。その結果、51例(33%)の症例に計84個の体細胞性変異が同定された。変異は同様に、DNMT3A (12.1%), BCOR (4.3%), PIGA (3.3%), ASXL1 (2.9%)に高頻度に認められ、nonsense (21%), frameshift (26%), splice site (9%)の変異に偏っていたことから、これらの変異がドラ

イパー変異としてクローン選択に関わっていることが示唆された。一方、上記の仮説に基づけば、変異遺伝子のなかに CTL の標的抗原をコードするものが存在し、変異部位を含む元々のペプチドが特定の HLA 分子上に提示されて AA における CTL の標的抗原となっていること、変異の結果 HLA に結合する能力が失われる結果、抗原として提示されなくなることに より CTL からのエスケープを来していること、さらにこれらの変異が一方でクローン選択に関わっている可能性が推測される。そこで、今後、これらの症例で一般人口と比較して出現頻度が高くなっている HLA クラス I 分子について、変異前にはそれらの HLA で提示されるが、変異分子自体は提示されないと予測される変異を、抗原予測プログラムにより検討することにより、AA における抗原の同定を試みる。このような抗原が実際に同定されれば、これを標的とする CTL クローンの存在を実証し、かつ、テトラマーアッセイによってこれらの CTL の挙動を定量的に測定することが可能となる。このことは、再生不良性貧血の病態のみならず、MDS の発症を理解するうえで、大きな breakthrough となると期待される。

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)

[雑誌論文](計 10 件)

1. Sakata-Yanagimoto, Ogawa, S(35/36), Chiba, S. Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma Nat Genet 有 46 :171-5 (2 0 1 4) 10.1038/ng.2872
2. Matsunawa, M. Yamamoto, R. Sanada, M. Sato-Otsubo, A. Shiozawa, Y. Otsu, M. Isono, K. Koseki, H. Nakauchi, H. Ogawa, S. Haploinsufficiency of Sf3b1 leads to compromised stem cell function but not to myelodysplasia .Leukemia 有 inpress (2 0 1 4)10.1038/leu.2014.73
3. Haferlach, T. Nagata, Y. Grossmann, V. Okuno, Y. Bacher, U. Nagae, G. Schnittger, S. Sanada, M. Kon, A. Alpermann, T. Yoshida, K. Roller, A. Nadarajah, N. Shiraishi, Y. Shiozawa, Y. Chiba, K. Tanaka, H. Koefler, H. P. Klein, H. U. Dugas, M. Aburatani, H. Kohlmann, A. Miyano, S. Haferlach, C. Kern, W. Ogawa, S. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes.Leukemia 有 28 :241-7 (2 0 1 4) 10.1038/leu.2013.336
5. Yoshida K, Sato-Otsubo A (6/33), Sanada M (7/33), Ito E, Ogawa S (33/33). The landscape of somatic mutations in Down

syndrome-related myeloid disorders Nat Genet 有 45: 1293-9 (2 0 1 3) 10.1038/ng.2759

6. Sato Y, Sato-Otsubo A (8/29), Sanada M (26/29), Ogawa S(29/29). Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. Nat Genet 有 45: 860-7 (2 0 1 3)10.1038/ng.2699
7. Sakaguchi, H. Okuno, Y. Muramatsu, H. Yoshida, K. Shiraishi, Y. Takahashi, M. Kon, A. Sanada, M. Chiba, K. Tanaka, H. Makishima, H. Wang, X. Xu, Y. Doisaki, S. Hama, A. Nakanishi, K. Takahashi, Y. Yoshida, N. Maciejewski, J. P. Miyano, S. Ogawa, S. Kojima, S. Exome sequencing identifies secondary mutations of SETBP1 and JAK3 in juvenile myelomonocytic leukemia. Nat Genet 有 45: 937-41 (2 0 1 3)10.1038/ng.2698
8. Muto, T. Sashida, G. Oshima, M. Wendt, G. R. Mochizuki-Kashio, M. Nagata, Y. Sanada, M. Miyagi, S. Saraya, A. Kamio, A. Nagae, G. Nakaseko, C. Yokote, K. Shimoda, K. Koseki, H. Suzuki, Y. Sugano, S. Aburatani, H. Ogawa, S. Iwama, A. Concurrent loss of Ezh2 and Tet2 cooperates in the pathogenesis of myelodysplastic disorders J Exp Med 有 210:2627-39(2013)10.1084/jem.20131144
9. Makishima H, Sanada M (5/30), Ogawa S (29/30) Somatic SETBP1 mutations in myeloid malignancies. Nat Genet 有 45: 942-6 (2 0 1 3) 10.1038/ng.2696
10. Kon A, Sanada M (4/41), Sato-Otsubo A (12/41), *Ogawa S (41/41). Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms Nat Genet 有 45 : 1232-7 (2013) 10.1038/ng.2731

[学会発表](計 3 件)

1. 吉里哲一, 小川誠司 et al., Spectrum of genetic alterations in acquired aplastic anemia. 18th Congress of EHA 2013 年 06 月 16 日. Stockholm (Sweden)
2. 吉里哲一, 小川誠司 et al., Spectrum of genetic alterations in acquired aplastic anemia. 第 75 回日本血液学会学術集会 2013 年 10 月 13 日 北海道
3. 吉里哲一, 小川誠司 et al., Spectrum Of Genetic Alterations In Acquired Aplastic Anemia. 2013 ASH Annual Meeting and Exposition 2013 年 12 月 08 日 New Orleans (USA)

[産業財産権]

出願状況 (計 1 件)

1) 発明の名称：RHOA 遺伝子及びその産物
である RHOA 蛋白質の新規変異の発見と、疾
患診断・治療への応用

発明者：千葉滋、坂田真実子、小川誠司

出願番号：特許、2013-526957、特許、
14/236276 (米国)、12827081,1 (欧州)

出願日：2013年5月1日 (国内、海外)

出願人：国立大学法人 東京大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 誠司 (OGAWA SEISHI)

東京大学医学部附属病院・届出診療医

研究者番号：60292900