

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09647

研究課題名(和文) 小児再生不良性貧血の免疫抑制療法反応性を予測するバイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Development of biomarkers to predict immunosuppressive therapy reactivity of aplastic anemia in children

研究代表者

村松 秀城 (Muramatsu, Hideki)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00572570

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)：小児再生不良性貧血患者113例の解析を行い、PNH血球陰性・テロメア長短縮が独立した免疫抑制療法反応の予後不良因子であることを同定した。(Haematologica 2015)。また、トロンボポイエチン(TPO)値が高値の症例では有意に反応不良であった(Pediatr Blood Cancer. 2016)。さらに先天性造血不全に関連した184遺伝子のターゲットシーケンスを開発し(Genetics in Medicine 2017)、特発性再生不良性貧血患者 181例を対象に実施したところ、26例で関連する遺伝子変異が同定され、先天性造血不全遺伝子のスクリーニングの有用性が示された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed 113 patients with aplastic anemia (AA) in children and identified that absence of PNH-type blood cells and telomere shortening are independent poor prognostic factors for immunosuppressive therapy (IST) reaction (Haematologica 2015). We also identified that patients with high thrombopoietin (TPO) levels showed significantly lower response rate to IST (Pediatr Blood Cancer. 2016). Furthermore, we developed a target sequencing system of 184 genes associated with congenital hematopoietic failure (Genetics in Medicine 2017), and performed on 181 patients with idiopathic AA. In 26 cases, relevant gene mutations were identified, indicating the usefulness of screening for congenital hematopoietic failure genes in pediatric AA patients.

研究分野：免疫

キーワード：小児血液学 再生不良性貧血

1. 研究開始当初の背景

小児再生不良性貧血(Aplastic anemia; AA)は骨髄低形成および汎血球減少を特徴とするまれな血液疾患である。細胞障害性T細胞が造血幹細胞を攻撃することがその病因であると考えられており、HLA一致血縁ドナーからの骨髄移植が第一選択の治療法である。ドナーが得られない患者には抗胸腺細胞グロブリン(Anti-thymocyte globulin; ATG)とシクロスポリン(Cyclosporine A; CyA)による免疫抑制療法(Immunosuppressive therapy; IST)が標準的治療法となっている。現在、AA患者に対する免疫抑制療法の治療奏効率は40~70%で、長期生存率は90%である。しかし、ISTを受けるAA患者のうち、およそ30~60%の患者は反応が得られないまま、ATGとCyAの強力な免疫抑制作用により重症感染症に罹患するリスクがあり、その後の代替ドナーからの造血幹細胞移植の成功率にも負の影響を与える。このことから、AA患者においてISTの反応性を予測することができるバイオマーカーの開発が望まれている。過去の研究では、患者の年齢・性別・診断から治療までの期間・白血球数・好中球数・リンパ球数・網状赤血球数・微小PNH型血球・リンパ球テロメア長(Sakaguchi H, Muramatsu H, et al. Haematologica 2014)などが予後予測因子であることが報告されているが、残念ながらいずれの因子を用いても実臨床においてISTを行う必要がない患者であると判断するには不十分である。

そこで我々は、これまでそれぞれ単独で報告されたバイオマーカーであるPNH型血球とテロメア長の両方をISTで治療された小児AA症例において測定し、ISTの反応性に対する影響を検討することとした。また、本研究では、これらの臨床情報を有する多数の患者保存検体を用いて、ATG血中濃度測定・遺伝子変異プロファイリング・サイトカインプロファイリングを行い、AA患者に対するIST反応予測により有用な新たなバイオマーカーの探索・同定を行う。新たなバイオマーカーの確立により、ISTに反応する可能性がほとんどない症例を抽出することが可能となれば、AA患者に対して不必要なIST治療を回避し、代替ドナーからの造血幹細胞移植をfront-lineの治療として選択する治療戦略が成り立つ可能性がある。

AAに対する免疫抑制療法ではATGが用いられるが、その体内動態は個人差が大きいことが知られている。我々は、ウサギIgGをELISA法で検出することで、患者体内のウサギATG血中濃度を測定する系を確立した。AA患者に対するISTにおけるATG血中濃度の臨床的影響はこれまでにほとんど検討されていない。本研究では、

IST後のATG血中濃度を測定し、ISTにおけるより適切なATG投与量、投与法を検討する。

小児AA患者の重要な鑑別診断に、Fanconi貧血などの遺伝性造血不全症候群があるが、検討すべき疾患および遺伝子数が多く、これまで網羅的に遺伝子診断を行うことは困難であった。今回我々は、次世代シーケンスを利用した関連約190遺伝子のターゲットシーケンスを各種小児血液疾患の患者53例に実施し、うち24例(45%)で原因遺伝子同定に成功している。

本研究では、IST治療を受けたAA患者検体でターゲットシーケンスを実施し、遺伝性造血不全症候群を正確に診断するとともに、遺伝性造血不全症候群の原因となる遺伝子上の遺伝子多型がISTの治療反応性に与える影響について検討する。小児AAでは、トロンボポエチン(TPO)・IL-17をはじめとした各種サイトカイン・細胞成長因子の血中濃度が上昇していることが報告されている。本研究では、Bio-Plexを用いて、数十種類のサイトカインについてプロファイリングを行い、IST反応性に影響を与えるバイオマーカーの同定を目指す。

2. 研究の目的

HLA一致血縁ドナーが得られない小児再生不良性貧血に対する標準的な治療法は抗胸腺細胞グロブリンとシクロスポリンによる免疫抑制療法であるが、その治療奏効率は40~70%であり、またその反応性を事前に予測することは困難である。近年、非血縁骨髄移植などHLA一致血縁ドナー以外からの造血幹細胞移植の成績が向上してきたことから、初期治療を選択するうえで免疫抑制療法の治療反応予測は臨床的に非常に重要であると考えられる。

本研究の目的は、再生不良性貧血患者の臨床検体を用い、PNH血球・テロメア長測定・サイトカインプロファイリング・ATG血中濃度測定・遺伝子変異プロファイリングを行い、免疫抑制療法に対する反応性予測に有用なバイオマーカーを同定することである。

3. 研究の方法

名古屋大学小児科に保存された臨床検体を用いて、小児AAにおけるIST反応性を予測するバイオマーカーの検索を行った。すなわち、微小PNH型血球・テロメア長の測定、IST後のATG血中濃度の測定、遺伝性血液疾患を対象として設計したオリジナル遺伝子パネルを用いてターゲットシーケンス、サイトカイン・プロファイリングを行い、IST反応性を予測するバイオマーカー

一を多面的に探索した。

4. 研究成果

我々は、免疫抑制療法で治療した小児再生不良性貧血患者 113 例の解析を行い、多変量解析で PNH 血球陰性・テロメア長短縮がそれぞれ独立した反応不良に関連する因子であることを同定した（図 1）。

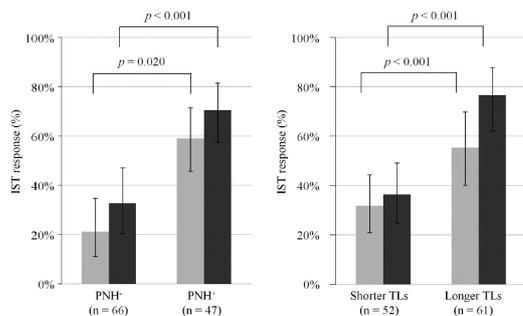


図 1 .PNH 血球とテロメア長による免疫抑制療法の反応率

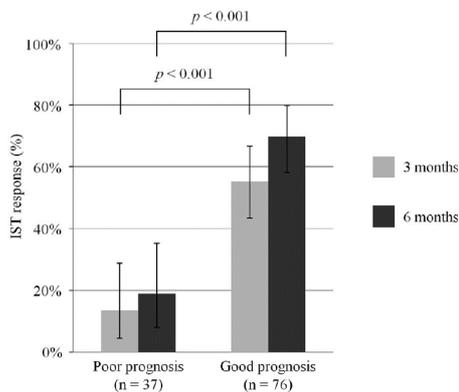


図 2 .2 因子(PNH 血球およびテロメア長)を組み合わせた予後予測モデルによる免疫抑制療法の反応率

この 2 因子により同定された予後不良群の免疫抑制療法後 6 か月の反応率はわずかに 19%であり（図 2）初期治療として非血縁骨髄移植を検討すべき症例を事前に予測できる可能性が示された (Narita A, Muramatsu H, et al., Haematologica 2015)。

また、85 例の免疫抑制療法で治療した小児再生不良性貧血患者の診断時の保存血性を用いて各種サイトカイン値を検討したところ、免疫抑制療法が反応しなかった症例では、トロンボポイエチン (TPO) 値が有意に高値であった (Elmahdi S, Muramatsu H, et al., Pediatr Blood Cancer. 2016)（図 3）。また、TPO 高値 (>1796.7pg/mL) の例では、有意に免疫抑制療法に対する反応率が低かった（図 4）。

さらに先天性造血不全に関連した 184 遺伝子のターゲットシーケンスを開発し

(Muramatsu H, et al., Genetics in Medicine 2017)、特発性再生不良性貧血患者 181 例を対象に実施したところ、26 例で関連する遺伝子変異が同定され、先天性造血不全遺伝子のスクリーニングの有用性が示された。

なお、ATG 血中濃度についても研究期間中に検討を行ったが、前方視的臨床研究登録例において測定しているため、現時点では IST 有効性との相関の評価は完了していない。

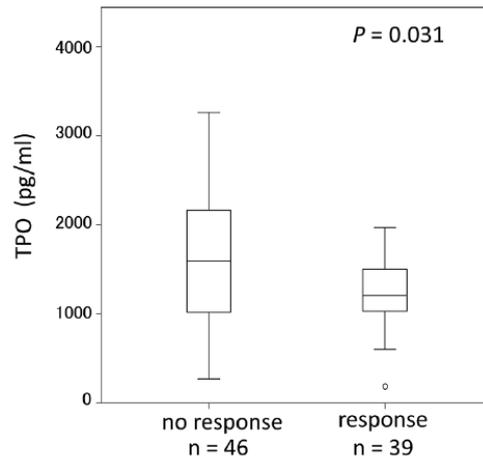


図 3 .免疫抑制療法を実施した再生不良性貧血患者における TPO 値

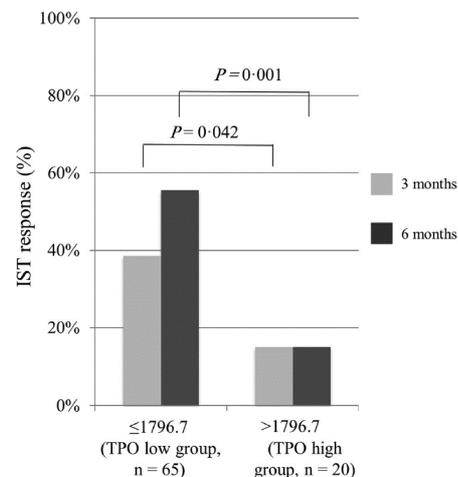


図 4 .TPO 高値群は、有意に免疫抑制療法に対する反応性が不良である。

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）

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Slack J, Albert MH, Balashov D, Muramatsu H, Gennery AR, et al., Outcome of hematopoietic cell transplantation for DNA double-strand break repair disorders, J Allergy Clin

Immunol, 査読有, 2018 Jan, 141(1): 322-328. e10.

doi: 10.1016/j.jaci.2017.02.036.

Narita A, Muramatsu H, Okuno Y, Sekiya Y, Suzuki K, Hamada M, Kataoka S, Ichikawa D, Taniguchi R, Murakami N, Kojima D, Nishikawa E, Kawashima N, Nishio N, Hama A, Takahashi Y, Kojima S, Development of clinical paroxysmal nocturnal haemoglobinuria in children with aplastic anaemia, Br J Haematol, 査読有, 2017 Sep, 178(6): 954-958. doi: 10.1111/bjh.14790.

Kurata T, Shigemura T, Muramatsu H, Okuno Y, Nakazawa Y, A case of GATA2-related myelodysplastic syndrome with unbalanced translocation der(1;7)(q10;p10), Pediatr Blood Cancer, 査読有, 2017 Aug; 64(8).

doi: 10.1002/psc.26419.

Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Doisaki S, Narita A, Sakaguchi H, Kawashima N, Wang X, Xu Y, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Sanada M, Takahashi Y, Kanno H, Yamaguchi H, Ohga S, Manabe A, Harigae H, Kunishima S, Ishii E, Kobayashi M, Koike K, Watanabe K, Ito E, Takata M, Yabe M, Ogawa S, Miyano S, Kojima S, Clinical utility of next-generation sequencing for inherited bone marrow failure syndromes, Genet Med, 査読有, 2017 Jul, 19(7): 796-802.

doi: 10.1038/gim.2016.197.

Sekinaka Y, Mitsuiki N, Imai K, Yabe M, Yabe H, Mitsui-Sekinaka K, Honma K, Takagi M, Arai A, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Muramatsu H, Kojima S, Hira A, Takata M, Ohara O, Ogawa S, Morio T, Nonoyama S, Common Variable Immunodeficiency Caused by FANCD Mutations, J Clin Immunol, 査読有, 2017 Jul;37(5):434-444.

doi: 10.1007/s10875-017-0396-4.

Nishikawa E, Yagasaki H, Hama A, Yabe H, Ohara A, Kosaka Y, Kudo K, Kobayashi R, Ohga S, Morimoto A, Watanabe KI, Yoshida N, Muramatsu H, Takahashi Y, Kojima S, Long-term outcomes of 95 children with moderate aplastic anemia treated with horse

antithymocyte globulin and cyclosporine, Pediatr Blood Cancer, 査読有, 2017 May; 64(5).

doi: 10.1002/psc.26305.

Ichimura T, Yoshida K, Okuno Y, Yujiri T, Nagai K, Nishi M, Shiraishi Y, Ueno H, Toki T, Chiba K, Tanaka H, Muramatsu H, Hara T, Kanno H, Kojima S, Miyano S, Ito E, Ogawa S, Ohga S, Diagnostic challenge of Diamond-Blackfan anemia in mothers and children by whole-exome sequencing, Int J Hematol, 査読有, 2017 Apr;105(4):515-520.

doi: 10.1007/s12185-016-2151-7.

Ikeda F, Yoshida K, Toki T, Uechi T, Ishida S, Nakajima Y, Sasahara Y, Okuno Y, Kanezaki R, Terui K, Kamio T, Kobayashi A, Fujita T, Sato-Otsubo A, Shiraishi Y, Tanaka H, Chiba K, Muramatsu H, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kenmochi N, Miyano S, Ogawa S, Ito E, Exome sequencing identified RPS15A as a novel causative gene for Diamond-Blackfan anemia, Haematologica, 査読有, 2017 Mar;102(3):e93-e96.

doi: 10.3324/haematol.2016.153932.

Elmahdi S, Muramatsu H, Narita A, Ismael O, Hama A, Nishio N, Okuno Y, Xu Y, Wang X, Takahashi Y, Kojima S, Markedly High Plasma Thrombopoietin (TPO) Level is a Predictor of Poor Response to Immunosuppressive Therapy in Children With Acquired Severe Aplastic Anemia. Pediatr Blood Cancer, 査読有, 2016 Apr;63(4):659-64.

doi: 10.1002/psc.25820.

Narita A, Muramatsu H, Sekiya Y, Okuno Y, Sakaguchi H, Nishio N, Yoshida N, Wang X, Xu Y, Kawashima N, Doisaki S, Hama A, Takahashi Y, Kudo K, Moritake H, Kobayashi M, Kobayashi R, Ito E, Yabe H, Ohga S, Ohara A, Kojima S; Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group., Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and telomere length predicts response to immunosuppressive therapy in pediatric aplastic anemia, Haematologica, 査読有, 2015 Dec;100(12):1546-52.

doi: 10.3324/haematol.2015.132530.

〔学会発表〕(計 10 件)

ターゲットシーケンス解析を施行した

小児造血不全移植例の解析, 口頭, Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Doisaki S, Narita A, Sakaguchi H, Kawashima N, Wang X, Xu Y, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Sanada M, Takahashi Y, Kanno H, Yamaguchi H, Ohga S, Manabe A, Harigae H, Kunishima S, Ishii E, Kobayashi M, Koike K, Watanabe K, Ito E, Takata M, Yabe M, Ogawa S, Miyano S and Kojima S, 第40回日本造血細胞移植学会総会, 2018/2/1-3.

Bone marrow transplantation for children with acquired bone marrow failure, ポスター, Hama A, Manabe A, Hasegawa D, Nozawa K, Suzuki K, Narita A, Muramatsu H, Takahashi Y, Watanabe K, Ohara A, Ito M and Kojima S, EWOG-S/SAA2017, 2017/12/9-12.

Clinical sequencing of 375 patients with inherited and acquired bone marrow failure syndromes, ポスター, Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Doisaki S, Narita A, Sakaguchi H, Kawashima N, Wang X, Xu Y, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Sanada M, Takahashi Y, Kanno H, Yamaguchi H, Ohga S, Manabe A, Harigae H, Kunishima S, Ishii E, Kobayashi M, Koike K, Watanabe K, Ito E, Takata M, Yabe M, Ogawa S, Miyano S and Kojima S, EWOG-S/SAA2017, 2017/12/9-12.

Genetic background of idiopathic bone marrow failure syndromes in children, ポスター, Narita A, Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Wang X, Kojima D, Xu Y, Kawashima N, Nishio N, Hama A, Takahashi Y, Hasegawa D, Manabe A, Sakaguchi H, Yoshida N, Kato K, Miyano S, Ito M, Ogawa S and Kojima S, EWOG-S/SAA2017, 2017/12/9-12.

Risk Factors for Donor-Type Aplasia after Bone Marrow Transplant in Children with Acquired Bone Marrow Failure, ポスター, Hama A, Muramatsu H, Narita A, Narita K, Kitazawa H, Hamada M, Kataoka S, Murakami N, Ichikawa D, Taniguchi R, Kojima D, Suzuki K, Nishikawa E, Okuno Y, Kawashima N, Nishio N, Masafumi Ito, Kojima S and Takahashi Y, 59th ASH Annual Meeting & Exposition, 2017/12/9-12.

Correlation of bone marrow morphology

with clinical findings and gene alterations in patients with Diamond-Blackfan anemia, 口頭, Hama A, Tsutomu Toki, Akie Kobayashi, Muramatsu H, Okuno Y, Daisuke Hasegawa, Kazue Nozawa, Takahashi Y, Ken-ichiro Watanabe, Atsushi Manabe, Masafumi Ito, Etsuro Ito and Kojima S, 第59回日本小児血液・がん学会, 2017/11/9-11.

Germline mutation in pediatric patients with aplastic anemia, 口頭, Narita A, Muramatsu H, Okuno Y, Wang X, Xu Y, Kawashima N, Nishio N, Hama A, Sakaguchi H, Yoshida N, Kato K, Kojima S and Takahashi Y, 第59回日本小児血液・がん学会, 2017/11/9-11.

次世代シーケンスによるファンconi貧血遺伝子診断が可能な時代におけるFANCD2モノユビキチンの意義, 口頭, 川島希, 奥野友介, 村松秀城, 濱麻人, 片岡伸介, 濱田太立, 市川大輔, 村上典寛, 小島大英, 鈴木喬悟, 西川英里, 成田敦, 西尾信博, 中沢洋三, 小島塾二, 高橋義行, 第79回日本血液学会学術集会, 2017/10/20-22.

Clinical sequencing in inherited bone marrow failure syndromes, 口頭, Okuno Y, 第79回日本血液学会学術集会 (Symposium), 2017/10/20-22.

Clinical sequencing of 375 patients with inherited and acquired bone marrow failure syndromes, 口頭, Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Doisaki S, Narita A, Sakaguchi H, Kawashima N, Wang X, Xu Y, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Sanada M, Takahashi Y, Kanno H, Yamaguchi H, Ohga S, Manabe A, Harigae H, Kunishima S, Ishii E, Kobayashi M, Koike K, Watanabe K, Ito E, Takata M, Yabe M, Ogawa S, Miyano S and Kojima S, 第79回日本血液学会学術集会, 2017/10/20-22.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村松 秀城 (MURAMATSU, Hideki)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00572570

(2) 研究分担者

小島 勢二 (KOJIMA, Seiji)
名古屋大学・医学系研究科・名誉教授
研究者番号：20313992

(3) 連携研究者

奥野 友介 (OKUNO, Yusuke)
名古屋大学・医学部附属病院・特任講師
研究者番号：00725533

(4) 研究協力者

なし