

令和 2 年 6 月 20 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10013

研究課題名(和文) 骨髄機能不全症候群の白血病化関連遺伝子検索とその病態寄与の解明

研究課題名(英文) Searching leukemia predisposition gene in bone marrow failure syndrome with functional analysis.

研究代表者

三井 哲夫(Mitsui, Tetsuo)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：30270846

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)：骨髄機能不全症候群のうち白血病化する代表的疾患の先天性好中球減少症におけるG-CSF受容体(CSF3R)遺伝子異常の前方視的解析で、新たな体性遺伝子変異が出現した例は2例あった。臨床経過に変化無い中、一過性にCSF3受容体膜貫通部直上部位にヘテロの遺伝子変異(Ala569Val)をみた例ともう1例はCSF3R 731のstop codon例であった。2例目は同時に8番と21番のトリソミークローンの出現があり、同種造血細胞移植が行われた。こうした結果は、先天性好中球減少症の患者さんのゲノム不安定性を実証するもので、無治療経過観察で、変異が自然消滅することも観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

こうした一過性のアミノ酸変化や切断型異常の出現は、先天性好中球減少症の患者さんにおけるゲノム不安定性を実証するもので興味深い。また1例目のものは、無治療経過観察の中で、変異は自然に消滅しており、この観察も意義深いと考えられる。他の解析継続症例にはCSF3Rの遺伝子変異は観られずその臨床経過も大きな変化はなく稀少疾患で長期の観察が必要な疾患群であり、数年という短期の検討では、有意な結果を得る事が困難であることが示された。

研究成果の概要(英文)：The genomic instability in patients with bone marrow failure syndrome was observed in a prospective study. An analysis of G-CSF receptor (CSF3R) gene was done in bone marrow failure syndrome, including congenital neutropenia which is a typical disease reported as progressing myelodysplasia and leukemia. Two somatic gene mutations revealed. One was a heterozygous gene mutation (Ala569Val) immediately above the transmembrane portion of the CSF3 receptor, and the other case was a stop codon case of CSF3R731. The first case had no change in her clinical course, and the mutation was disappeared in the six months later in her bone marrow (BM). The second case showed the 8th and 21st chromosome trisomy clones in his BM simultaneously, and allogeneic hematopoietic cell transplantation was performed. These results demonstrate genomic instability in patients with congenital neutropenia. The spontaneous mutation disappearance was also observed in untreated patients.

研究分野：医歯薬学

キーワード：CSF3受容体 G-CSF受容体切断型異常 骨髄機能不全症候群 白血病化

1. 研究開始当初の背景

先天性骨髄機能不全症候群のひとつである重症型先天性好中球減少症は、好中球絶対数の減少($<200/\mu\text{l}$)と易感染性を特徴としている。リコンビナント G-CSF 投与により、好中球数が増加し、致命的な感染症を回避出来るようになったが、G-CSF 投与後に骨髄異型性症候群や急性白血病(MDS/AML)に移行する症例が 10%程度みられている。この疾患の主な先天性の遺伝子異常には、好中球 elastase 2 (*ELA2*)と細胞骨格形成やアポトーシスに關与する *HAX1* の異常があり、それぞれ約 60%と 30%に觀られる。一方で、当初この疾患の先天性の遺伝子異常として報告された G-CSF 受容体(CSF3R)細胞質内領域のアミノ酸配列 716-731 の間に停止コドンが出現する(切断型)遺伝子異常は後天的であり、また骨髄異型性症候群や急性白血病移行に際して検出されることが明らかになった。この変異は、欧米では、先天性好中球減少症全体の 14-20%に認められ、同症から移行した MDS/AML においてはその 80%に切断型変異が見出されている。この切断型の CSF3R 受容体は、*in vitro* で細胞の未分化性の保持と増殖に働くことが示されており、白血病化に關連する重要な後天的遺伝子異常である可能性が高い。

G-CSF 受容体切断型遺伝子異常の病態意義を明らかにするために、我々は切断型 G-CSF 受容体トランスジェニックマウスを作成し、同マウスで実際に病態をある程度再現する事に成功した(Blood 101; 2990-, 2003)。このマウスに対して G-CSF 単独長期投与が及ぼす影響についても解析したが、通常量の G-CSF 投与 250 日前後では白血病発症には至っていない(Jpn J Clin Hematol 44;275, 2003)。

このため、実際の症例を臨床症状の経過把握と共に前向きに検討し病態進行に伴い変化する遺伝子異常を明らかにする試みを以前から行ってきた。

2. 研究の目的

今期、症例リクルートを引き続き募り、重症型好中球減少症と、得られればさらに拡げて骨髄機能不全症候群やその他の血液造血器異常疾患の自然経過中に *CSF3R* 切断型遺伝子変異や、その他の増殖関連転写因子の変異出現の前方視的解析を行う事を目的とした。臨床症状の変化と共に起こってくる新たな変異を検出できれば、その遺伝学的意義を *in silico* で検討したうえで、病的変化に意義があると考えられるものについて、細胞株や、マウスモデル等を用いた *in vitro* 解析に進め、腫瘍化に必須の真に重要な遺伝子を特定することを目的とした。

3. 研究の方法

骨髄不全症候群の中で、白血病や骨髄異形成症候群への移行がこれまでに明らかである先天性好中球減少症患者の解析を中心に、またその他の血液造血器異常疾患を対象に解析した。研究協力施設を募り、症例の情報と検体を継続的に提供してもらうと共に、末梢血と骨髄における血液細胞からゲノム DNA、メッセンジャー RNA を抽出、G-CSF 受容体遺伝子 (*CSF3R*) を遺伝子配列決定、十分な検体量を得られた検体については、その受容体刺激伝達系を含む、関連蛋白遺伝子 (*SHP2*, *Gab1*, *Gab2*, *Grb2*, *SOCS3*, *STAT3*, *STAT5*, *NRAS*, *KRAS2*) 変異解析を経時的に前向きに解析した。

既に白血病化した骨髄機能不全患者やその他の血液造血器異常疾患でも、白血病発症時や病態進行時の腫瘍検体が得られる上に、現在も生存中で血液細胞以外の体細胞由来ゲノムを得られる患者さんについて、腫瘍細胞とそれ以外の体細胞ゲノムの exome の比較検討解析を行った。これらの違いを明らかにすることで、腫瘍化する際に変化する遺伝子変異を網羅的に把握することを目的とした。その上で、それぞれの病的意義を検討した。

4. 研究成果

先天性好中球減少症の症例を集積し、CSF3 (G-CSF) 受容体遺伝子異常出現の前方視的解析を行った。先天性好中球減少症では 20 例を集積し、うち 7 例で経過中複数の継続解析を行うことができた。

解析開始の初めから血液細胞由来の CSF3 受容体遺伝子に変異が認められた症例は 3 例で、血液細胞由来のゲノムには変異があったものの爪、髪の毛のゲノム解析では検出できない *CSF3R* ゲノム intron におけるヘテロの変異、アミノ酸組成の変わらない変異、その意義が不明な Proline が Threonine に変化する変異の 3 種であった。Proline が Threonine への変異は、その病的意義については、これまでに報告の無い変異で、*in silico* 解析合わせ結果的に意義不明の変異 (variant of unknown significance) であった。

経過中、継続解析を行い得た 7 例の中、新たに遺伝子変異が出現した症例は 2 例あった。1 例

は G-CSF 投与中に、CSF3 受容体膜貫通部直上部位に一過性のヘテロの遺伝子変異を特定した (c.1947C>T: Ala569Val)。この変異は骨髄細胞由来の mRNA から同定され、口腔粘膜細胞由来ゲノム DNA からは検出されず、後天的変異と考えられた。この患者さんは臨床経過上、症状は変化しないまま、その 6 か月後の骨髄からはこの変異は認められなくなった。もう 1 例は stop codon の hot spot である CSF3R 731 の Gln の部位に、stop codon となる TAG の変異が混入する症例であった。この症例は臨床症状には、大きな変化は無いが、同時期に骨髄染色体解析で、8 番と 21 番のトリソミーのクローン出現があり、結果的に同種造血細胞移植が行われた。本研究において、G-CSF (CSF3) 受容体切断型遺伝子異常と同時期に染色体含め複数の遺伝子変異が起こった初めての検査上の病態悪化の例で、この 731stop codon クローンの割合と、この変異が出る以前の検体と、今回の移植前検体から得た遺伝子において、主たる候補遺伝子をターゲットにして次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析し、比較検討することを含め、解析を試みた。しかしながら、検体の絶対量の不足から、繰り返しの検討ができず、有意な解析結果を得ることはできなかった。これらの一過性のアミノ酸変化や切断型異常の出現は、先天性好中球減少症の患者さんにおけるゲノム不安定性を実証するもので興味深い。また 1 例目のものは、無治療経過観察の中で、変異は自然に消滅しており、この観察も意義深いと考えられる。

他の解析継続症例には CSF3R の遺伝子変異は観られず、その臨床経過も大きな変化はなかった。G-CSF 受容体刺激伝達系関連蛋白や、TP53、RAS 等についても一部遺伝子解析を行ったが、特別な変化は検出できなかった。また解析症例を増やす努力を引き続き行ったが、疾患自体の稀少性もあり、新規症例のリクルートはできずに終わっている。また、継続解析症例について、多くのものは数回の解析のみで終わっており、継続的に多数の検体を得る事が困難だった。

既に白血病化した骨髄機能不全患者やその他の血液造血器疾患で、生存中であり血液細胞以外の体細胞由来ゲノムを得られる患者さんについてのゲノム exome 解析については、多くの症例で、造血細胞移植が行われている為に、口腔粘膜擦過物を用いて本人固有のゲノムとの比較検討を試みたが、結果として口腔粘膜擦過物検体では、移植ドナーの遺伝子が相当な割合で混入しており、患者さん自身の遺伝子の変化を区別する事ができず有意な所見を得るのが困難であった。これら一連の解析の中、家族性血球貪食性リンパ組織球症がパーフォリン遺伝子 PRF1 片親性ダイソミーにより発症した初めての例を検出し、その他の PRF1 異常 2 例の報告と共に当地での集積性を含め論文報告した(文献 2)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mitsui T, Fujita N, Koga Y, Fukano R, Osumi T, Hama A, Koh K, Kakuda H, Inoue M, Fukuda T, Yabe H, Takita J, Shimada A, Hashii Y, Sato A, Atsuta Y, Kanda Y, Suzumiya J, Kobayashi R.	4. 巻 26
2. 論文標題 The effect of graft versus host disease on outcomes after allogeneic stem cell transplantation for refractory lymphoblastic lymphoma in children and young adults.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatr Blood Cancer	6. 最初と最後の頁 e28129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pbc.28129	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sato H, Kawasaki N, Kawasaki M, Abiko Y, Meguro T, Takahashi N, Izumino H, Kanno M, Numakura C, Sasaki A, Imamura T, Taki T, Mitsui T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Three Consecutive Cases of Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis, Including a Case Due to Maternal Uniparental Disomy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Pediatr Hematol Oncol.	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） 10.1097/MPH.0000000000001681.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujita N, Kobayashi R, Atsuta Y, Iwasaki F, Suzumiya J, Sasahara Y, Inoue M, Koh K, Hori T, Goto H, Ichinohe T, Hashii Y, Kato K, Suzuki R, Mitsui T	4. 巻 109
2. 論文標題 Hematopoietic stem cell transplantation in children and adolescents with relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Hematol	6. 最初と最後の頁 483-490
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-019-02608-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kanno M, Onoda T, Meguro T, Sato H, Mitsui T	4. 巻 60
2. 論文標題 Eltrombopag with i.v. immunoglobulin for safe splenectomy in refractory immune thrombocytopenia.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatr Int.	6. 最初と最後の頁 191-192
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ped.13446.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi R, Tanaka F, Nakazawa A, Ueyama JI, Sunami S, Mitsui T, Koga Y, Mori T, Osumi T, Fukano R, Ohki K, Sekimizu M, Fujita N, Kamei M, Mori T	4. 巻 105
2. 論文標題 Pediatric follicular lymphoma in Japan.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Hematol	6. 最初と最後の頁 849-853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-017-2209-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukano R, Sunami S, Sekimizu M, Takimoto T, Mori T, Mitsui T, Mori T, Saito AM, Watanabe T, Ohshima K, Fujimoto J, Nakazawa A, Kiyokawa N, Kobayashi R, Horibe K, Tsurusawa M	4. 巻 40
2. 論文標題 Clinical Features and Prognosis According to Immunophenotypic Subtypes Including the Early T-Cell Precursor Subtype of T-Lymphoblastic Lymphoma in the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group ALB-NHL03 Study.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Pediatr Hematol Oncol.	6. 最初と最後の頁 e34-e37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPH.0000000000000850	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 1件)

1. 発表者名 佐藤裕子
2. 発表標題 山形大学病院における小児胚細胞腫瘍 20年間45例の検討
3. 学会等名 第61回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawasaki Motoi
2. 発表標題 A Rare Case of Diaphragmatic Congenital Hemangioma with Massive Pleural Effusion
3. 学会等名 50th Congress of the International Society of Paediatric Oncology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤裕子
2. 発表標題 小児不応性血球減少症の若年女性例に対するエルトロンボパグの有効性
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018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
研究分担者	早坂 清 (Hayasaka Kiyoshi) (20142961)	山形大学・医学部・名誉教授 (11501)	
研究分担者	簡野 美弥子 (Kanno Miyako) (40400551)	山形大学・医学部・助教 (11501)	