

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670448

研究課題名(和文)シグナルパスウェイ構成蛋白の発現・変異解析による造血抑制性サイトカインの同定

研究課題名(英文) Identification of cytokines responsible for the development of immune-mediated bone marrow failure using gene expression analyses of patients with aplastic anemia

研究代表者

中尾 眞二 (Nakao, Shinji)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：70217660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：再生不良性貧血(再不貧)発症の初期段階に關与するサイトカインを同定するため、シクロスポリン療法によって改善した非重症再不貧8例の未輸血・未治療時点での末梢血遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイにより解析した。その結果、赤血球外造血に關連するいくつかの遺伝子の高発現に加えて、造血幹細胞を静止期に保つIL10、CXCL12などのシグナルパスウェイが活性化されていることが明らかになった。また、免疫抑制療法によって改善した別の再不貧12症例に対するエクソームシーケンシングでは、骨髓異形成症候群で検出される遺伝子変異の他に、造血幹細胞を負に制御しているPEG3、SMARCA2などの変異が同定された。

研究成果の概要(英文)：In an attempt to identify cytokines responsible for the development of immune-mediated bone marrow failure, we determined gene expression profiles of peripheral blood leukocytes from eight untreated patients with non-severe aplastic anemia who had not been transfused. Expressions of several genes associated with erythropoiesis as well as signaling pathways involved in the expression of IL10 and CXCL12 were found to be augmented. Whole exome sequencing of peripheral blood leukocytes from 12 aplastic anemia patients who obtained a complete remission after immunosuppressive therapy revealed somatic mutations of genes related to hematopoietic stem cell quiescence such as PEG3 and SMARCA2.

研究分野：血液内科学

キーワード：再生不良性貧血 造血抑制性サイトカイン インターロイキン10 CXCL12 クローン性造血

### 1. 研究開始当初の背景

再不貧は、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が造血幹細胞を攻撃する結果発症すると考えられてきたが、6 番染色体短腕の片親性二倍体 (6pUPD) による HLA アレル欠失血球の動態を検討した我々の研究により、再不貧の病像を決定しているのは、むしろサイトカインであることが明らかになった (Katagiri, et al. Blood, 20011)。しかし、そのサイトカインの実体は明らかにされていない。

免疫病態が明らかな軽症・中等症の再不貧や、巨核球増加を伴わない血小板減少症 (前再不貧状態) では、発病後早期にシクロスポリン (CsA) を開始することによって 80% 以上の例で寛解を得ることができる。これは、造血を抑制しているサイトカインの産生を CsA が効率よく抑制する結果と考えられる。このため、病初期の再不貧患者の骨髓や末梢血単核細胞における遺伝子発現プロファイルを、CsA の投与前後や、健常者との間で比較すれば、造血抑制性サイトカインの産生につながるシグナルパスウェイ遺伝子が同定できる可能性がある。これまでの骨髓単核細胞の遺伝子発現検索では図 1 のように、NFAT2 パスウェイの亢進が観察されていた。またそ

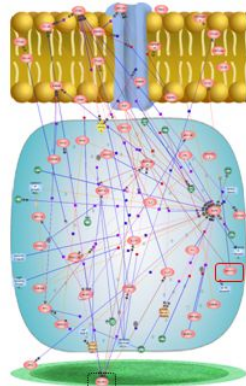


図 1. 非重症再生不良性貧血症時の骨髓単核細胞における高発現遺伝子のパスウェイ解析。FOXP3□、NFAT2□の高発現が認められる。

の中で、CsA の標的核内転写因子である NFAT の下流に位置する高発現遺伝子が同定できれば、それらが関与するパスウェイから、高発現している T 細胞サイトカインを推測できる可能性がある。

一方、免疫抑制療法によって改善した多くの再不貧患者では、PIGA 変異や 6pUPD 以外に複数の体細胞遺伝子変異があることが、最近の次世代シーケンサーを用いた解析により明らかになった。これらの中には細胞増殖にかかわる遺伝子が含まれていることから、造血幹細胞における抑制性シグナルに関わっている遺伝子変異を同定すれば、それらを利用して造血抑制性サイトカイン自身を同定できる可能性がある

### 2. 研究の目的

1) CsA 単剤療法によって改善が得られた前再不貧患者を対象として、CsA 投与前に採取した全血球の遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ解析により比較する。高発現していた遺伝子群のうち、NFAT による制御を受ける

遺伝子とそのシグナルパスウェイから、CsA によって産生が抑制される造血抑制性サイトカインを推測する。

2) 免疫抑制療法によって改善した再不貧患者末梢血白血球のエクソンシーケンサーを次世代シーケンサーにより解析し、変異遺伝子の中から、造血幹細胞抑制性サイトカインのシグナル伝達に関わる遺伝子を同定する。

### 3. 研究の方法

1) 発作性夜間血色素尿症 (PNH) 形質の血球が陽性で末梢血の再不貧または巨核球減少性血小板減少症患者から同意を得て全血 5 mL を Paxgene 採血管に採取する。その後の CsA 療法により血球減少の改善が確認された患者を対象として、アジレント社の DNA チップ 60k を用いることにより、遺伝子発現プロファイルを設定する。

2) CsA 単剤療法によって改善した再不貧患者の末梢血から DNA を採取し、イルミナ社の HiSeq を用いて全エクソンシーケンシングを行った。

### 4. 研究成果

1) 輸血歴のない PNH 型血球陽性骨髓不全 (非重症再不貧 6 例、巨核球減少性 2 例) の遺伝子発現プロファイルを同年齢の健常者対照 5 例と比較したところ、3635 個の遺伝子において有意な発現の差がみられた。患者において特に発現が高かったのは、高い順に *IFI27* (fold change [FC] = +17.7)、*HBBP1*、*CA1*、*DNAJB13*、*THEM5* であった。一方、患者において発現が低下していたのは、低い順に *MFAP3L* (FC = -6.7)、*FCER1A*、*GNAZ*、*CLC*、*CCR3* であった。パスウェイ解析では、IL-10、miR-483-3p、miR-10、miR-1 に関わる経路が再不貧では活性化していることが示唆された。これらの患者はその後 CsA によって速やかに造血能の改善が見られたことから、これらの発現 signature を利用することによって、自己免疫性造血不全を診断できる可能性がある。

しかし、症例数が限られているため、NFAT のシグナル経路を利用するサイトカインの同定には至らなかった。今後も症例数を増やして同様の検討を進める予定である。

2) 免疫抑制療法によって寛解が得られた 11 症例を対象として全エクソンシーケンシングを行ったところ、全症例において少なくとも 1 個の体細胞遺伝子変異が検出された。複数症例に渡って検出された遺伝子変異は、*ASXL1*、*BCOR/BCOR1*、*DNMT3A*、*PIGA* 以外には 3 症例で *RUNX1*、*U2AF1*、2 症例で *TET2*、*ITGA1*、*JAK2* であった。また、おのおの 1 例のみではあるが造血幹細胞の分化に抑制的に働く *PEG3*、*SMARCA2* にミスセンス変異がそれぞれ 43.9%、7.3% のサイズで検出された (図 2)。これらの異常幹細胞は、炎症性サイトカインが骨髓に存在する誘導的造血環境において、正常幹細胞よりも優先的に活性化されている可能性がある。ただし、現時点では 1) の

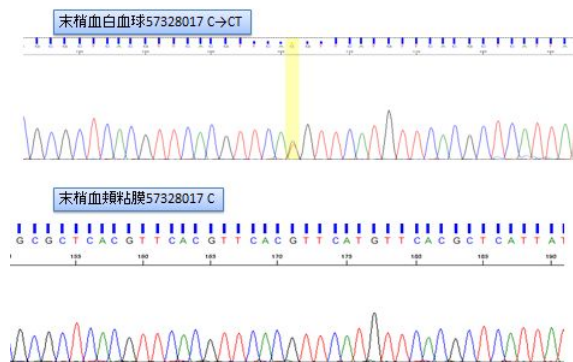


図2. 再生不良性貧血患者で検出されたPEG3遺伝子変異  
末梢白血球には、顆粒細胞にはない一塩基置換(C->T)が認められた。

シグナルパスウェイとの関係は不明である。  
今後も検討を続けていく予定である。

## 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)

[雑誌論文](計8件)

1. Yoshizato T, Dumitriu B, Hosokawa K, Makishima H, Yoshida K, Townsley D, Sato-Otsubo A, Sato Y, Liu D, Suzuki H, Wu C, Shiraishi Y, Clemente MJ, Kataoka K, Shiozawa Y, Okuno Y, Chiba K, Tanaka H, Nagata Y, Katagiri T, Kon A, Sanada M, Scheinberg P, Miyano S, Maciejewski JP, Nakao S, Young NS, Ogawa S. Somatic mutations and clonal hematopoiesis in aplastic anemia, *N Eng J Med*, 査読有, in press.
2. Inaguma Y, Akatsuka Y, Hosokawa K, Maruyama H, Okamoto A, Katagiri T, Shiraishi K, Murayama Y, Tsuzuki-Iba S, Mizutani Y, Nishii C, Yamamoto N, Demachi-Okamura A, Kuzushima K, Ogawa S, Emi N, Nakao S. Induction of HLA-B\*40:02-restricted T cells possessing cytotoxic and suppressive functions against hematopoietic progenitor cells from a patient with severe aplastic anemia. *Br J Haematol*, 査読有, in press.
3. Hosokawa K, Sugimori N, Katagiri T, Sasaki Y, Saito C, Seiki Y, Mochizuki K, Yamazaki H, Takami A, Nakao S. Increased glycosylphosphatidylinositol-anchored protein-deficient granulocytes define a benign subset of bone marrow failures in patients with trisomy 8. *Eur J Haematol*, 査読有, in press.
4. Watanabe S, Waseda Y, Kimura H, Takato H, Ohata K, Kondo Y, Kasahara K, Nakao S. Imatinib for bronchiolitis obliterans after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 査読有, in press.
5. Arahata M, Shimizu Y, Asakura H, Nakao S.

Persistent molecular remission of refractory acute myeloid leukemia with inv(16)(p13.1q22) in an elderly patient induced by cytarabine ocfosfate hydrate. *J Hematol Oncol*, 査読有, 2015;8:5.

6. Sugimori N, Espinoza JL, Trung LQ, Takami A, Kondo Y, An DT, Sasaki M, Wakayama T, Nakao S. Paraptosis cell death induction by the thiamine analog benfotiamine in leukemia cells. *PloS One*, 査読有, 2015;10:e0120709.
7. Hosokawa K, Takami A, Tsuji M, Araoka H, Ishiwata K, Takagi S, Yamamoto H, Asano-Mori Y, Matsuno N, Uchida N, Masuoka K, Wake A, Makino S, Yoneyama A, Nakao S, Taniguchi S. Relative incidences and outcomes of Clostridium difficile infection following transplantation of unrelated cord blood, unrelated bone marrow, and related peripheral blood in adult patients: a single institute study. *Transp Infectious Dis*, 査読有, 2014;16:412-20.
8. Hosokawa K, Yamazaki H, Nakamura T, Yoroidaka T, Imi T, Shima Y, Ohata K, Takamatsu H, Kotani T, Kondo Y, Takami A, Nakao S. Successful hyperbaric oxygen therapy for refractory BK virus-associated hemorrhagic cystitis after cord blood transplantation. *Transp Infectious Dis*, 査読有, 2014;16:843-6.

[学会発表](計2件)

1. Yoshitaka Zaimoku, Hiroyuki Maruyama, Kana Maruyama, Takamasa Katagiri, An T. T. Dao, Hiroyuki Takamatsu, Hirohito Yamazaki, Koichi Kashiwase and Shinji Nakao: Evidence that HLA-B\*40:02 and HLA-A\*31:01 are strongly involved in the presentation of autoantigens to CTLs responsible for the development of acquired aplastic anemia: Poster Session, #2948: The American Society of Hematology 56th Annual Meeting, December 7, 2014. Moscone Center, San Francisco, California, USA.
2. Tetsuichi Yoshizato, Bogdan Dumitriu, Kohei Hosokawa, Hideki Makishima, Kenichi Yoshida, Yusuke Okuno, Kenichi Chiba, Hiroko Tanaka, Yuichi Shiraishi, Yasunobu Nagata, Takamasa Katagiri, Ayana Kon, Michael Clemente, Masashi Sanada, Satoru Miyano, Shinji Nakao, Jaroslaw Maciejewski, Neal Young, Seishi Ogawa: Complete chronological history of clonal evolution in sMDS from acquired aplastic anemia: Plenary Session, LP-1, 第76回日本血液学会学術集会 2014年11月1日. 大阪国際会議場(大阪府大阪市).

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中尾 眞二 (NAKAO, Shinji)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：70217660

(2)連携研究者

小川 誠司 (OGAWA, Seishi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

授

研究者番号：60292900