

平成 30 年 6 月 24 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08639

研究課題名(和文) 次世代ハイスループット・レパトア解析による自己免疫性血液疾患の病態解明と標的治療

研究課題名(英文) Pathophysiology and targeted treatment of autoimmune hematological diseases based on the next generation high-throughput TCR/BCR repertoire analysis

研究代表者

廣川 誠 (Hirokawa, Makoto)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50241667

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)：特発性血小板減少性紫斑病の発症機序を明らかにするために次世代シーケンサーを用いて血液中B細胞が有するIgG型B細胞抗原受容体を解析した。59種類のIGHVサブファミリーの使用頻度について健常人と比較するとIGHV4-28セグメントの使用頻度が高いことが判明した。186種類のIGHV4-28クローンが特発性血小板減少性紫斑病症例において同定され、これらのうち135クローンはIGHJ4と再構成していることが判明した。これらのB細胞クローンの抗原特異性は不明であるが、CDR3領域にsomatic hypermutationがみられることから、何らかの抗原による選択圧がかかっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To identify the pathological B-cell clones in primary ITP, we have investigated the repertoires of IgG-BCRs of peripheral blood B cells by using the high-throughput DNA sequencing. Unbiased amplifications of IgG-BCRs were performed by adaptor-ligation PCR. The amplicons were sequenced by next-generation sequencing. Comparisons of the IGHV repertoires covering fifty-nine IGHV subfamilies between the patients and controls revealed an increased usage of IGHV4-28 in ITP patients. The 186 distinct IGHV4-28-carrying sequences were identified in ITP patients and 135 out of these clones used the IGHJ4 gene segment. The present study has demonstrated the preferential usage of the rearranged IGHV4-28/IGHJ4 gene by circulating IgG B cells in ITP. Although the antigen specificity of BCRs encoded by the IGHV4-28/IGHJ4 gene in the present patient cohort remains to be elucidated, prolonged antigenic pressure appears to shape this characteristic BCR repertoire.

研究分野：内科学、血液内科学、免疫学

キーワード：特発性血小板減少性紫斑病 Bリンパ球 B細胞抗原受容体 レパトア NGS

## 1. 研究開始当初の背景

特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) は代表的な抗体依存性自己免疫性血液疾患であり、日本において毎年約 3,000 人の新規患者が発生する比較的頻度の高い指定難病である。ITP における血小板自己抗体の認識する主な抗原として、血小板膜糖タンパク GPIIb/IIIa および GPIb/IX が明らかにされているが、約 50% の患者において自己抗体の抗原特異性は不明であり、その免疫病態の解明が急がれている。一方、骨髓異形成症候群は造血幹細胞の後天的遺伝子変異に基づく腫瘍性病変であると一般的には理解されているが、一部の症例では血球減少に対して免疫抑制療法が奏効することが知られており、その病態形成に免疫学的機序が関与する例があると考えられている。

## 2. 研究の目的

本研究の主な目的は、次世代シーケンサーとバイオ・インフォマティクスを用いた次世代 B 細胞抗原受容体レパトア解析技術を用いて、特発性血小板減少性紫斑病の免疫病態に直接関わる B 細胞クローンを同定し、その抗原受容体の構造とその抗原特異性を明らかにすることを第一義的な目的とする。第二義的な目的は骨髓異形成症候群における血小板減少症の免疫病態を明らかにすることである。本研究により免疫学的血小板減少症に対する新規治療法の開発に貢献することが期待される。

## 3. 研究の方法

本研究への参加同意の得られた患者よりヘパリン化末梢血 10~20ml の提供を受け、単核球を分離後 RNA 抽出、cDNA 合成を行い、T 細胞抗原受容体および B 細胞抗原受容体のレパトア解析を行う。レパトア解析は共同研究者の鈴木らが開発した次世代シーケンサーおよびバイオ・インフォマティクスを利用した解析手法を用いる。

本解析技術は共同研究者の鈴木らが開発した adaptor-ligation PCR 法と次世代シーケンス技術を使った T 細胞抗原受容体および B 細胞抗原受容体レパトア解析法を用いる。この技術は、①非バイアス遺伝子増幅技術、②ロングリード次世代シーケンス、③クラウド型高速バイオインフォマティクスソフトからなる新規のレパトア解析法であり、従来の電気泳動パターンやクロナルピークの検出に依存しないので、微量に存在する病的リンパ球クローンの識別が容易であり、高感度化を実現できる。クラウド型遺伝子解析ソフトウェアにより大規模な遺伝子配列情報を高速処理し、T 細胞抗原受容体および B 細胞抗原受容体遺伝子の高速検索を行う。この方法では 1 ラン当たり 100 万リード (400Mb) の解読が可能であり、理論的には 100 万分の 1 の病的 T 細胞・B 細胞クローンを検出、同定することが可能である。

## 4. 研究成果

代表的な IgG 抗体依存性自己免疫性血液疾患の一つである特発性血小板減少性紫斑病における病的 B 細胞クローンの同定を試みて、11 例の特発性血小板減少性紫斑病および 9 例の健常人コントロールを対象として、次世代シーケンサーを用いた網羅的 B 細胞抗原受容体レパトア解析を行った。

20 個のサンプルから全体で 2,009,943 個の in-frame read および 315,469 個の unique read を得た。59 種類の IGHV サブファミリーの解析により特発性血小板減少性紫斑病では IGHV4-28 サブファミリーの使用頻度が高いこと、IGHJ4 セグメントとの再構成頻度が高いこと、さらに IGHV4-28/IGHJ4 の CDR3 領域では somatic hypermutation がみられることを見出した。これらの結果は何らかの抗原による選択圧が特発性血小板減少性紫斑病では生じていることを示唆している。

## 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 13 件)

- ① Yanada, M., Kurosawa, S., Kobayashi, T., Ozawa, Y., Kanamori, H., Kobayashi, N., Sawa, M., Nakamae, H., Uchida, N., Hashimoto, H., Fukuda, T., Hirokawa, M., Atsuta, Y., Yano, S. (2017) Reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic cell transplantation for younger patients with acute myeloid leukemia: a registry-based study. *Bone Marrow Transplant.* 査読有、52(6), 818-824.  
doi: 10.1038/bmt.2016.358.
- ② Nagao, T., Hirokawa, M. (2017) Diagnosis and treatment of macrocytic anemias in adults. *J Gen Fam Med* 査読有、18(5), 200-204.  
doi: 10.1002/jgf2.31.
- ③ 廣川 誠 (2017) 赤芽球癆: 疾患概念・病囚・病態. 日本臨牀、査読無、75(増刊号 1), 431-436.  
[http://www.nippon-rinsho.co.jp/backnum/z\\_mokuji/7501Z.html](http://www.nippon-rinsho.co.jp/backnum/z_mokuji/7501Z.html)
- ④ 廣川 誠 (2017) 後天性赤芽球癆の特徴と治療の実際. 新薬と臨牀、査読無、66(3), 62-67.  
<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=aa9syrsc/2017/006603/008&name=0294-0299j&UserID=158.215.8.21>
- ⑤ 廣川 誠 (2017) 成人大球性貧血の診断. *Medical Practice*、査読無、34(7), 1213.  
[http://www.bunkodo.co.jp/mp\\_34/magazine\\_detail\\_1.html](http://www.bunkodo.co.jp/mp_34/magazine_detail_1.html)

- ⑥ 廣川 誠, 藤島直仁, 面川 歩, 植木重治 (2015) 再生不良性貧血と赤芽球癆の病態と治療. 日本内科学会雑誌、査読無、104、1405-1412.  
https://doi.org/10.2169/naika.104.1405
- ⑦ 廣川 誠 (2016) 赤芽球癆診療の進歩と今後の展望. 臨床血液、査読無、57(2)、110-116.  
doi: 10.11406/rinketsu.57.110. Review. Japanese.
- ⑧ Ueki, S., Konno, Y., Takeda, M., Moritoki, Y., Hirokawa, M., Matsuwaki, Y., Honda, K., Ohta, N., Yamamoto, S., Takagi, Y., Wada, A., Weller, PF. (2016) Eosinophil extracellular trap cell death-derived DNA traps: Their presence in secretions and functional attributes. *J Allergy Clin Immunol.* 査読有、137(1):258-67.  
doi: 10.1016/j.jaci.2015.04.041.
- ⑨ Jiajia, L., Guo, Y.-M., Onai, N., Ohyagi, H., Hirokawa, M., Takahashi, N., Tagawa, H., Ubukawa, K., Kobayashi, I., Tezuka, H., Minamiya, Y., Ohteki, T., Sawada, K. (2016) Cytosine-phosphorothionate-guanine oligodeoxynucleotides exacerbates hemophagocytosis by inducing tumor necrosis factor-alpha production in mice after bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 査読有、22、627-636.  
doi: 10.1016/j.bbmt.2015.12.018.
- ⑩ Yamashita, T., Fujishima, N., Miura, M., Niioka, T., Abumiya, M., Shinohara, Y., Ubukawa, K., Nara, M., Fujishima, M., Kameoka, Y., Tagawa, H., Hirokawa, M., Takahashi, N. (2016) Effects of CYP3A5 polymorphism on the pharmacokinetics of a once-daily modified-release tacrolimus formulation and acute kidney injury in hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Chemother Pharmacol.* 査読有、78(1), 111-118.  
doi: 10.1007/s00280-016-3060-4.
- ⑪ Arai, Y., Kanda, J., Nakasone, H., Kondo, T., Uchida, N., Fukuda, T., Ohashi, K., Kaida, K., Iwato, K., Eto, T., Kanda, Y., Nakamae, H., Nagamura-Inoue, T., Morishima, Y., Hirokawa, M., Atsuta, Y., Murata, M. (2016) GVHD working group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Risk factors and prognosis of hepatic acute GVHD after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 査読有、51(1), 96-102.  
doi: 10.1038/bmt.2015.205. 廣川 誠 (2015) 赤芽球癆の診断と治療. 臨床血液、査読無、56(10)、62-71.  
doi: 10.11406/rinketsu.56.1922. Japanese.
- ⑬ Hirokawa, M., Sawada, K., Fujishima, N., Teramura, M., Bessho, M., Dan, K., Tsurumi, H., Nakao, S., Urabe, A., Fujisawa, S., Yonemura, Y., Kawano, F., Oshimi, K., Sugimoto, K., Matsuda, A., Karasawa, M., Arai, A., Komatsu, N., Harigae, H., Omine, M., Ozawa, K., Kurokawa, M. (2015) PRCA Collaborative Study Group. Longterm outcome of patients with acquired chronic pure red cell aplasia (PRCA) following immunosuppressive therapy: a final report of the nationwide cohort study in 2004/2006 by the Japan PRCA collaborative study group. *Br J Haematol.* 査読有、169(6):879-86.  
doi: 10.1111/bjh.13376.
- 〔学会発表〕 (計 6 件)
- ① Hirokawa, M., Fujishima, N., Teramura, M., Sawada, K., Bessho, M., Dan, K., Tsurumi, H., Nakano, S., Urabe, A., Fujisawa, S., Yonemura, Y., Kawano, F., Sugimoto, K., Matsuda, A., Karasawa, M., Arai, A., Komatsu, N., Harigae, H., Tohyama, K., Saito-Moriya, A., Matsumura, I., Omine, M., Ozawa, K., Kurokawa, M., Arai, S., Mitani, K. (2017) Identification of Adverse Risk Factors for Survival in Acquired Pure Red Cell Aplasia Receiving Immunosuppressive Therapy By the Japan PRCA2004/2006 Study and Introduction to the New Cohort Study PRCA2016. 59<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Hematology, December 9-12, Atlanta
- ② Fujishima, N., Togashi, M., Hasegawa, R., Watanabe, K., Saga, A., Omokawa, A., Saga, T., Ueki, S., Takahashi, N., Kitaura, K., Suzuki, R., Hirokawa, M. (2017) High-throughput sequencing of IgG B-cell receptors reveals frequent usage of the rearranged IGHV4/IGHJ4 gene in primary immune thrombocytopenia in adults. 59<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Hematology, December 9-12, Atlanta
- ③ 廣川 誠, 藤島直仁, 澤田賢一, 張替秀郎, 松田 晃, 小松則夫, 通山 薫, 米村雄士, 中尾眞二, 齋藤明子, 松村 到, 荒井俊也, 黒川峰夫 (2017) 後天性慢性赤芽球癆の長期予後を明らかにするための多施設共同前向き観察研究(PRCA2016)中間報告, 第 79 回日本血液学会学術集会, 10 月, 東京
- ④ Hirokawa, M. (2016) Recent updates in acquired pure red cell aplasia in the adults. Taiwan-Japan Hematology Forum HST-EHA Joint Symposium and Special

- Lecture, April 16-17, Taiwan
- ⑤ 廣川 誠 (2015) 赤芽球癆の診断と治療 (教育講演), 第 77 回日本血液学会学術集会, 10 月, 金沢
- ⑥ Hirokawa, M., Sawada, K., Fuishima, N., Teramura, M., Bessho, M., Dan, K., Tsurumi, H., Nakao, S., Urabe, A., Fujisawa, S., Yonemura, Y., Kawano, F., Oshimi, K., Sugumoto, K., Matsuda, A., Karasawa, M., Arai, A., Komatsu, N., Harigae, H., Omine, M., Ozawa, K., Kurokawa, M. (2015) Long-term outcome of patients with acquired chronic PRCA following immunosuppressive therapy. ,第 77 回日本血液学会学術集会, 10 月, 金沢

〔図書〕 (計 9 件)

- ① 廣川 誠 (2017) 赤芽球癆. 小澤敬也, 中尾眞二, 松村 到 (編) 血液疾患最新の治療 2017-2019. 南江堂, 東京, pp.109-112.
- ② 廣川 誠 (2017) 赤芽球癆. 猿田享男, 北村惣一郎 (監) 1336 専門家による私の治療. 2017-18 年度版. 日本医事新報社, 東京, pp.693-694.
- ③ 廣川 誠 (2017) 赤芽球癆. 桐戸敬太 (企画) 貧血症 診断と治療の ABC 125. 最新医学社, 大阪, pp.99-106.
- ④ 廣川 誠 (2016) 慢性赤芽球癆の病態と治療. Annual Review2016 血液 高久史磨, 小澤敬也, 金倉 讓, 小島勢二, 矢富裕 (編), 中外医学社 東京 49-55
- ⑤ 廣川 誠 (2016) 赤芽球癆. 血液科研修ノート 永井良三 (監) 神田善伸 (編), 診断と治療社 東京.247-250
- ⑥ 廣川 誠 (2015) 赤芽球癆. 血液専門医テキスト改訂第 2 版 日本血液学会 (編) 南江堂, 東京, 196-198.
- ⑦ 廣川 誠 (2015) 赤芽球癆. 今日の治療指針 2015, 医学書院, 東京, 650-651.
- ⑧ 廣川 誠 (2015) 赤芽球癆. 最新ガイドライン準拠血液疾患診断・治療指針 金倉讓 (編) 中山書店, 東京, 214-218.
- ⑨ 廣川 誠 (2015) 赤芽球癆. 医学大辞典 第 20 版, 南山堂, 東京, 1364.

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣川 誠 (HIROKAWA, Makoto)

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50241667

(2) 研究分担者

鈴木隆二 (SUZUKI, Ryuji)

国立相模原病院・診断治療研究室・室長

研究者番号：70373470

(3) 研究分担者

藤島直仁 (FUJISHIMA, Naohito)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号：70422152

(4) 連携研究者

北浦一孝 (KITAURA, Kazutaka)

国立相模原病院・診断治療研究室・研究員

研究者番号：00518136

(5) 連携研究者

松谷隆治 (MATSUTANI, Takaji)

国立相模原病院・診断治療研究室・研究員

研究者番号：70372290