

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15361

研究課題名(和文)再生不良性貧血におけるクローン性造血の起源の探求

研究課題名(英文) Investigation of the origin of clonal hematopoiesis in aplastic anemia

研究代表者

小川 誠司(OGAWA, SEISHI)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60292900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：

再生不良性貧血(AA)におけるクローン構造と病態に対する意義を明らかにすべく、439症例の患者検体に対して大規模シーケンスを実施した。36%の症例に変異を認め、BCOR・BCORL1・PIGA・DNMT3A・ASXL1の5遺伝子に高頻度に認めた。骨髄系腫瘍にもみられるDNMT3A・ASXL1変異症例は予後不良であり前白血病性格を有していた。BCOR・BCORL1・PIGA変異症例は予後良好であり、継時的なクローンサイズの拡大を認めず、免疫の回避によってクローン性を獲得すると考えられた。本研究によりAAの病態解明が進み、今後変異クローンの早期発見・治療介入による予後の改善が期待される。

研究成果の概要(英文)：Little is known about clonal architecture of aplastic anemia and its significance in the pathogenesis. In this study, we performed massive parallel sequencing to 439 cases with aplastic anemia and revealed the whole picture of genomic aberrations. Mutations were observed in 36% of the cases and biased to the 5 genes; BCOR/BCORL1, PIGA, DNMT3A and ASXL1. Mutations in genes including DNMT3A and ASXL1, which are frequently observed in myeloid tumors, were associated with poor prognosis and showed pre-leukemic feature. In contrast, clones with BCOR, BCORL1 and PIGA mutations were associated with favorable outcome and exhibited tendency not to expand, which indicate the possibility that these clones could escape from the attack by cytotoxic T cells and acquire clonal advantage. These results yielded insights about the pathogenesis of aplastic anemia and early detection of mutated clones and intervention towards cases with these clones might improve the prognosis of aplastic anemia.

研究分野：血液内科学

キーワード：血液内科学 血液免疫学 再生不良性貧血 体細胞変異 細胞障害性T細胞 クローン性造血

## 1. 研究開始当初の背景

再生不良性貧血は骨髄低形成により、汎血球減少症を呈する特発性骨髄不全症候群の一型である。その病態は細胞障害性 T 細胞 (CTL) による造血前駆細胞・幹細胞 (HSC) の排除が主体と考えられているが、CTL の標的となる抗原に関しては分かっていない。一方で、免疫学的機序が想定された非腫瘍性疾患であるにも関わらず、10%前後の症例が、骨髄異形成症候群や急性骨髄性白血病などの造血器腫瘍や発作性夜間血色素尿症などのクローン性疾患に移行することが知られている。また再生不良性貧血そのものにも発作性夜間血色素尿症型血球や染色体異常などのクローン性造血がしばしば認められるが、CTL による HCT の破壊とクローン性造血の関連に関しては不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

再生不良性貧血における骨髄系腫瘍の発症機序を解明することを目的とし、我々は以下の仮説を立て、検証することを試みた。再生不良性貧血では骨髄系腫瘍に先立つ遺伝子異常が生じ、自律性を以ってクローン拡大を来している一方、このクローンとは異なり、CTL の認識するエピトープに遺伝子変異が起こり、その結果免疫学的認識からエスケープすることにより、クローン性を獲得するクローンも存在する。

のエピトープがしばしば骨髄系腫瘍の発症に関わる分子上にあるために、エスケープを誘導した変異が骨髄系腫瘍の発症を誘導する。本研究により、再生不良性貧血におけるクローン性造血と骨髄系腫瘍の発症機序の解明、再生不良性貧血の治療成績の向上に格段の進展が得られると期待される。

## 3. 研究の方法

439 例から採取した末梢血全血または、顆

粒球より抽出した DNA に対し、骨髄系腫瘍の 106 の主要標的遺伝子に対して、次世代シーケンサーを用いた標的シーケンスを実施した。更に網羅的に再生不良性貧血におけるゲノム異常を評価するために、53 症例に対して全エクソンシーケンスを実施した。

また、継時的にサンプルを採取された症例に関しては、標的シーケンス・全エクソンで同定された変異の継時的挙動を解析した。更に、CTL からエスケープする変異エピトープは HLA クラス I を介して、CTL に提示される可能性が考えられたため、HLA タイピングを実施した。

変異エピトープと HLA の affinity を netMHC3.4(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC-3.4/>)を用いて評価した。データの解析には東京大学医科学研究所ヒトゲノムセンターのスーパーコンピュータを用いた。

## 4. 研究成果

本研究により再生不良性貧血におけるいくつかの重要な知見が得られた。

i) 再生不良性貧血におけるクローン構造標的シーケンスでは、249 の体細胞変異が 156 症例 (36%) に同定された。変異は、BCOR または BCORL1 遺伝子に最も高頻度に変異を認めた (9.3%)。続いて、PIGA (7.5%)、DNMT3A (8.4%)、ASXL1 (6.2%) に多く変異が同定された。変異陽性症例のうち 77% がこれら 5 遺伝子のいずれに変異を持っていた。再生不良性貧血における変異のスペクトラムは、骨髄異形成症候群と比較すると DNMT3A と ASXL1 変異は後天性再生不良性貧血と MDS・AML で共通に認められたが、PIGA と BCOR・BCORL1 変異は MDS に比べ後天性再生不良性貧血で高頻度に、TET2・スプライシング因子・JAK2・RUNX1・TP53

といった変異は低頻度であった。  
変異陽性率・変異数ともに年齢と相関し、その傾向は PIGA・BCOR・BCORL1 変異を除いて解析するとさらに顕著となった。全エクソンシーケンスで同定された変異は、加齢に伴う変異パターンである CpG ジヌクレオチド部位(シトシン-ホスホジエステル結合-グアニン)のシトシンからチミンへのトランジションに大きく偏向していた。

#### ii) 変異の予後における影響

BCOR と BCORL1 変異を有する症例は、免疫抑制剤に対する反応性が良好であった。

また、全生存・骨髄異形成症候群・急性骨髄性白血病への進展に対する影響を評価したところ、PIGA・BCOR・BCORL1 変異を有する一群は全生存・無進展生存に対して予後良好・それ以外の変異は予後不良な傾向を認めた。

#### iii) クローンの経時的挙動

遺伝子別に継時的挙動を評価したところ、DNMT3A・ASXL1 変異クローンは継時的に拡大する傾向を認めたが、PIGA・BCOR・BCORL1 変異クローンは不変または縮小する傾向を認めた

#### iv) 変異エピトープと HLA の affinity

1-4 の事実より再生不良性貧血におけるクローン性造血には、骨髄異形成症候群・急性骨髄性白血病でしばしば認められるような変異が生じていること、変異の獲得には加齢が関与していることが明らかになった。一方、PIGA・BCOR・BCORL1 変異は、骨髄系腫瘍よりも再生不良性貧血において高頻度に認め、また良好な予後に関与している、年齢との相関を認めない、継時的にそのクローンサイズは拡大しない傾向を示すなど他の変異とは異なった挙動を示した。PIGA 変異クローンは、PIGA 変異により

GPI アンカー蛋白を欠失することで、免疫機構を活性化させる分子を提示できなくなり、骨髄不全環境下で免疫細胞からの認識を回避し、相対的に増加する機序が想定されており、BCOR・BCORL1 も免疫監視機構からのエスケープによるクローン拡大を来している可能性が示唆された。

しかし、netMHC での評価では、変異型ペプチドと野生型ペプチドでは各症例の HLA との結合能の差を認めなかった。また、再生不良性貧血では、HLA-A \* 0201、A \* 02:06、A \* 31:01、B \* 40:02 アリルが片親性ダイソミーにより欠失しやすいことが知られているが(Katagiri et al. Blood 2011)、これらの HLA アリルの BCOR・BCORL1・PIGA のエピトープへの affinity に有意差は認めなかった。

本研究により再生不良性貧血におけるゲノム異常の全貌が明らかになった。DNMT3A・ASXL1 変異は、加齢の関与した骨髄系腫瘍への進展に先立って生じる前白血病性変化であることが示唆された。これらの変異を有する一群に対して早期治療介入することで予後の改善が図れる可能性があり今後の知見の蓄積が待たれる。一方、PIGA・BCOR・BCORL1 など CTL からのエスケープが示唆される変異も同定されたが、BCOR・BCORL1 変異クローンの選択される詳細なメカニズムに関しては解明に至らなかった。これらの変異による細胞固有の効果に起因する可能性も排除できず、今後マウスモデルを用いた機能解析を実施するなど別方向からアプローチしたい。

#### 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 3 件)

Yoshizato T, Dumitriu B, Hosokawa K, Makishima H, Yoshida K, Townsley D, Sato-Otsubo A, Sato Y, Liu D, Suzuki H, Wu CO, 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 Engl J Med.* 373(1):35-47. 2015

Young NS, Ogawa S. Somatic Mutations and Clonal Hematopoiesis in Aplastic Anemia. *N Engl J Med.* 373(17):1675-1676. 2015

Dumitriu B, Feng X, Townsley DM, Ueda Y, Yoshizato T, Calado RT, Yang Y, Wakabayashi Y, Kajigaya S, Ogawa S, Zhu J, Young NS. Telomere attrition and candidate gene mutations preceding monosomy 7 in aplastic anemia. *Blood* 125(4):706-9, 2015

〔学会発表〕(計 1 件)

Seishi Ogawa, Clonal hematopoiesis in acquired aplastic. KOGO conference. 2016年02月01日～2016年02月03日(ソウル)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

小川 誠司(Ogawa, Seishi)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号: 60292900

### (2)連携研究者

高折 晃史 (Takaori, Akifumi)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号: 20324625

### (3)連携研究者

中尾 眞二 (Nakao, Shinji)

金沢大学・医薬保健研究域医学系・教授

研究者番号: 70217660