

令和 2 年 11 月 27 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15368

研究課題名(和文)末梢血を用いて腫瘍性血小板増加症を診断する画期的診断法の確立

研究課題名(英文) Identification of promising marker(s) for essential thrombocythemia diagnosis by differential gene expression approach

研究代表者

小松 則夫 (KOMATSU, Norio)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：50186798

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)：本態性血小板血症(essential thrombocythemia: ET)の診断では、しばしば反応性血小板増多症の除外が問題となる。本研究では、RNA-Seqを用いて両者の遺伝子発現プロファイルを比較することにより、ETに特異的な診断マーカーを同定することを目指し、ETと反応性血小板増多症との鑑別に有用な57遺伝子を同定した。この57遺伝子のRPKM値を用いた主成分分析により、ETと反応性血小板増多症とを明確に区別できた。さらに、定量的PCR法による候補遺伝子の絞り込みの結果、CREB3L1遺伝子の発現量のみでETと反応性血小板増多症とを鑑別できる可能性があることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、骨髄増殖性腫瘍と、それ以外の理由により血球数の増加をきたしている、反応性の症例をひとつの遺伝子の発現量で鑑別できることを見出した。この成果は、骨髄増殖性腫瘍の診断に有用であると考えられるため、有用性の評価を含めたさらなる検討を進めることで、医療の現場に多大なる貢献ができるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Diagnosis of essential thrombocythemia (ET) often faces to the difficulty of excluding the evidence for reactive thrombocytosis. This study aims to identify the novel genetic marker(s) to be used for the ET diagnosis, comparing the RNA expression profiles of ET and reactive thrombocytosis by the usage of RNA-Seq.

We successfully identified 57 genes to diagnose ET. Principal component analysis using reads per kilobase of exon per million mapped reads (RPKM) of the genes can clearly distinguish ET and reactive thrombocytosis. Validating the candidate genes by qPCR approach, CREB3L1 was identified. CREB3L1 was highly expressed among the patients having ET, in contrast, no expression was detected among neither patients having reactive thrombocytosis nor healthy controls. We showed the possibility of diagnosing ET by only quantifying the RNA expression of CREB3L1.

研究分野：血液学

キーワード：骨髄増殖性腫瘍 診断マーカー 網羅的遺伝子発現解析 本態性血小板血症 血小板増多

## 1. 研究開始当初の背景

骨髄増殖性腫瘍 (myeloproliferative neoplasms: MPN) は、造血幹細胞レベルで生じた体細胞変異により、主に骨髄系細胞が異常増殖する疾患群である。MPN の 1 つである本態性血小板血症 (essential thrombocythemia: ET) は、骨髄中の異常な造血幹細胞から分化した巨核球が原因となり、末梢血中の血小板数が著増する疾患である。ET 患者では、血小板数の増加により血栓や易出血のリスクが増大するのみならず、罹患期間の長期化に伴って予後不良の線維症や白血病へ移行することもあるため、診断を確定させ、適切な治療を施すことが重要である。ET 患者の約 80% では *JAK2V617F*、*MPLW515L/K*、*CALR* におけるフレームシフト変異のいずれかが見出されるため、これらの遺伝子変異の検出が、ET 診断の強力な根拠となる。一方、遺伝子変異を持たない残りの 20% (triple negative ET) は、現状、遺伝子検査による診断が不可能であるため、非腫瘍性に血小板数が増加している症例 (反応性血小板増多症) の可能性を除外することにより診断しなければならない。ところが、反応性血小板増多の原因は多岐に亘り、また、ET に類似した臨床所見を呈するため、実臨床、ET と反応性血小板増多症との鑑別に難渋することが多い。

## 2. 研究の目的

上記を踏まえ、本研究では、ET と反応性血小板増多症の鑑別を可能とするための新規診断マーカーの同定を目的とする。申請者は、ET 患者において、*JAK2V617F* をはじめとする遺伝子変異の種類や有無に関わらず、同様の臨床所見を示すことに着目し、ET に共通する遺伝子発現プロファイルがあり、これが診断マーカーとして有用ではないかと考えた。そこで、ET 患者と、反応性血小板増多症をきたしていることが明らかな患者 (炎症、鉄欠乏性貧血などの基礎疾患を有する症例) のそれぞれの遺伝子発現プロファイルを比較するこ

とで、ET の診断マーカー同定を試みる。本研究はまた、同定された診断マーカーを用いた診断技術の確立と、その有用性評価をも目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 血小板 RNA の抽出

ET と反応性血小板増多症の大きな違いは、血小板数増加の原因が腫瘍性であるか非腫瘍性であるかという点である。そこで、両者の遺伝子発現プロファイルの比較をより明確化するため、多血小板血漿 (platelet rich plasma: PRP) より抽出した RNA (platelet RNA) を用いた。Platelet RNA は、ET 患者 9 名 (*JAK2V617F* 変異陽性 ET: 3 名、*MPLW515L/K* 変異陽性 ET: 3 名、*CALR* 変異陽性 ET: 3 名) と、反応性血小板増多症患者 6 名、臨床的に ET が疑われるが血小板増多の原因のはっきりしない症例 9 例 (triple negative ET: TN-ET) の末梢血より抽出した。

### (2) RNA-seq

3.1. にて抽出した platelet RNA の発現プロファイルを、RNA-seq により解析した。TruSeq Stranded Total RNA Ribo-Zero Human (Illumina) を用いてライブラリーを調整し、HiSeq-2000 にて解析を実施した。得られた fastq データをトリミングし (fastq 使用)、トリミング済みリードデータをヒトゲノムレファレンス (hg19) へマッピングした (STAR 使用)。得られた BAM ファイルよりリードカウントデータを抽出 (featureCount 使用) し、これを用いて発現プロファイルの比較解析を行った。

検体間のリード数や遺伝子間の見かけ上のリード数の補正のため、リードカウントデータを Trimmed mean of M values (TMM) 法により正規化し (edgeR 使用)、後述の differential expression analysis (DE 解析)、主成分分析 (principal component analysis: PCA) に利用した。

### (3) DE 解析

ET と反応性血小板増多症の 2 群間で、発現量に差がある遺伝子を抽出した。本解析では、確実に ET であることを担保するため、TN-ET 症例のデータを除外し、遺伝子変異陽性 ET と反応性血小板増多症の検体のリードカウントデータを用いて実施した。TMM 正規化後のリードカウントデータから、55,765 個の遺伝子の false detectable rate (FDR), log count per million base (logCPM), log fold-change (logFC) を算出した (edgeR 使用)。さらに、リードカウントと遺伝子のエクソン長から read per kilobase of exon per million mapped reads (RPKM) を算出し、この値を用いて遺伝子ごとの Area Under the Curve (AUC) 値を算出した (ROCR 使用)。以上の値をもとに候補遺伝子を抽出した。

候補遺伝子は FDR 値をもとに偽陽性率の低い遺伝子を抽出し、logCPM で一定以上の発現量をもつ遺伝子を、logFC を参照して 2 群間の発現量に差がある遺伝子を抽出した。抽出された遺伝子から、AUC 値を用いてさらに絞り込みをかけ、候補遺伝子とした。

### (4) PCA

DE 解析で抽出された候補遺伝子の RPKM を用いて PCA 解析を実施し、各検体の相対的な位置関係を可視化した。本解析では、TN-ET のデータを含めて実施し、TN-ET が ET、反応性血小板増多症のどちら側へ位置するか調べた。

### (5) 定量的 PCR (qPCR)

抽出された候補遺伝子の発現が、真に ET と反応性血小板増多症とで異なるかを、qPCR 法を用いて検証した。本研究による RNA-seq のデータに加え、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) の公開データベースから platelet RNA をサンプルソースとした RNA-seq の fastq データをも利用し、疾患群と対照群とで発現量に違いのない遺伝子を抽出し、これを内部標準遺

伝子として、候補遺伝子の発現量を比較した。

## 4. 研究成果

### (1) 発現変動遺伝子の抽出

#### DE 解析

logFC までを用いたフィルタリングにより、55,765 遺伝子から 303 遺伝子を絞り込んだ。得られた 303 遺伝子のうち、より診断マーカーとして有望なものを絞り込むため、AUC 値を計算し、ヒストグラムで表したところ、最頻値は 0.9-0.95 であることがわかったため (Fig. 1), AUC > 0.95 を満たす遺伝子のみを抽出したところ、57 遺伝子を候補遺伝子として同定できた。

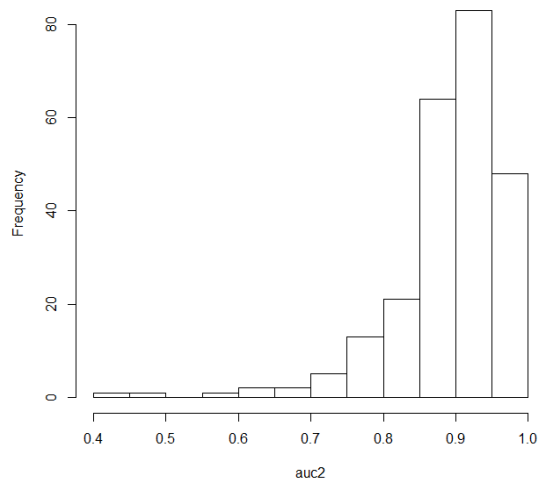


Fig. 1. 303 遺伝子の AUC 値のヒストグラム。

#### PCA

DE 解析で抽出された 57 遺伝子の RPKM 値を用いて、PCA を行った (Fig 2)。PCA により、ET と反応性血小板増多症が離れた位置でクラスターを形成することがわかり、57 遺伝子の発現プロファイルで ET と反応性血小板増多症を判別できることが示唆された。

一方、TN-ET は概ね ET 側でクラスターを形成したが、2 症例は反応性血小板増多症側へプロットされた (Fig. 2A, B)。そこで、これらの臨床情報を調べたところ、いずれの検体も鉄欠乏性貧血であったことがわかり、ET と反応性血小板増多症との鑑別に、本研

究によって抽出された 57 遺伝子の発現量が有用であることが示された。

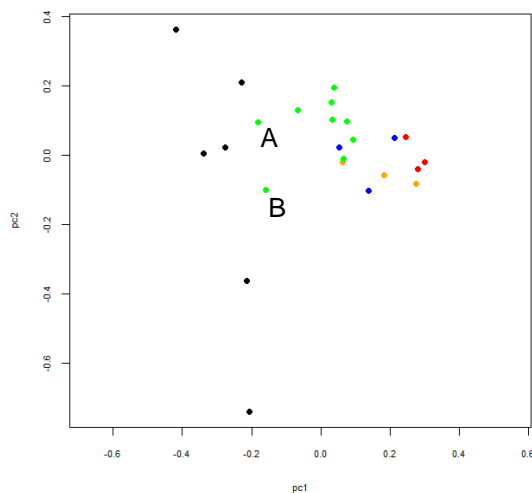


Fig. 2. 57 遺伝子の RPKM による PCA. 赤 : JAK2V617F 陽性 ET, 青 : MPLW515L/K 陽性 ET, 橙 : CALR 変異陽性 ET, 緑 : TN-ET, 黒 : 反応性血小板増多症.

## (2) qPCR による候補遺伝子の検証

4.1.2.までにおいて抽出した 57 遺伝子の発現が真に ET と反応性血小板増多症とで差があるかを確認するため, qPCR 法による検証を試みた。本研究において, サンプルソースは platelet RNA であるため, qPCR 法による遺伝子発現量定量の際に一般的に利用される, GAPDH や ACTB などは内部標準遺伝子として適切でない可能性が考えられた。そこで, 本研究で得たリードカウントデータに加え, データベース上で公開されている, platelet RNA を用いた RNA-seq (Myron GB, et al., Cancer Cell 2015) の fastq データよりリードカウントデータを抽出し, これらを用いて発現変動の小さい遺伝子を抽出することにした。RPKM 値と変動係数 (coefficient of variation :CV) を用いて抽出したところ, 5 遺伝子を選定できた。このうち, 比較的恒常的に生体内で発現していることが知られ, ハウスキープ遺伝子とされている B2M 遺伝子を内部標準遺伝子として用いることにした。

決定した内部標準遺伝子により, 57 遺伝子

の発現量を qPCR 法により定量した。その結果, CREB3L1 の発現量が ET において特に高く, 反応性血小板増多症や, 健常人では検出されないことがわかり, 診断マーカーとして極めて有望な可能性があることがわかった。

## (3) 診断マーカーとしての CREB3L1 の有用性評価

同定した遺伝子の有用性を確認するため, 収集する検体を拡大し, qPCR 法によって CREB3L1 の発現量を定量した。その結果, ET においてのみならず, 他の MPN 症例 (PV, PMF) においても CREB3L1 が発現していることがわかった。一方, コホートを拡大しても, 反応性血小板増多症患者や健常人では, この遺伝子の発現は見られないことが明らかとなった (Fig. 3)。さらに, ET, PV, PMF とは異なる要因により発症することが明らかとなっている慢性骨髄性白血病 (chronic myeloid leukemia: CML) においては発現が見られなかったため, CREB3L1 は, ET と反応性血小板増多症の鑑別のみならず, MPN の診断そのものに利用できる可能性があることが示唆された。

### <参考文献>

Myron GB, et al., RNA-Seq of tumor-educated platelets enables blood-based pan-cancer, multiclass, and molecular pathway cancer diagnostics. Cancer Cell 28(5): 666-676, 2015.

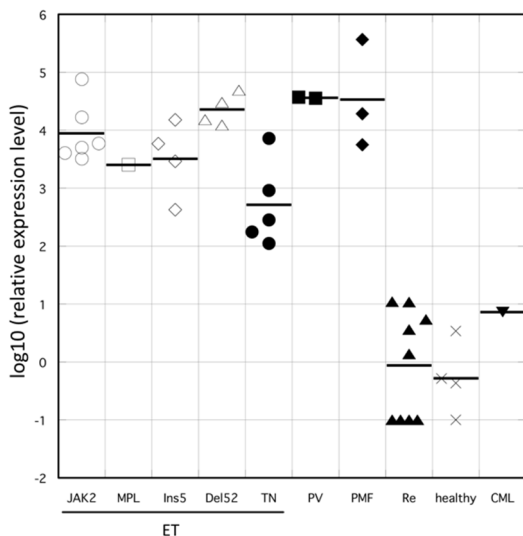


Fig. 3. CREB3L1 の発現量比較.

## 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)

出願状況 (計 1 件)

名称: 骨髄増殖性腫瘍の診断

発明者: 森下総司, 小松則夫, 山脇紗耶, 常田聡, 伊藤昌可, 川路英哉

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2018-078074

出願年月日: 平成 30 年 4 月 16 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<https://www.juntendo.ac.jp/hospital/clinic/ketsuekinaika/>

[https://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/ketsueki\\_naika/](https://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/ketsueki_naika/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小松 則夫 (KOMATSU, Norio)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号: 50186798

### (2) 研究分担者

森下 総司 (MORISHITA, Soji)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号: 10635866

河合 純 (KAWAI, Jun)

国立研究開発法人理化学研究所・予防医療・診断技術開発プログラム・副プログラムディレクター

研究者番号: 30391923

荒木 真理人 (ARAKI, Marito)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号: 80613843

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

### (4) 研究協力者

( )