

平成30年6月28日現在

機関番号：83904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20973

研究課題名(和文)ドナー由来骨髄不全症候群をモデルとした骨髄不全症候群の分子基盤の解明

研究課題名(英文)Molecular analysis of bone marrow failure syndrome modeled on donor derived bone marrow failure syndrome

研究代表者

安田 貴彦 (Yasuda, Takahiko)

独立行政法人国立病院機構(名古屋医療センター臨床研究センター)・その他部局等・その他

研究者番号：20723977

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):我々は、同種造血幹細胞移植後に、ドナー造血を維持しながらも、骨髄不全を呈する患者(ドナー由来骨髄不全症候群)を4症例同定することに成功した。本研究は、ドナー由来骨髄不全症候群患者の臨床検体を用いて、骨髄不全症候群が発症する分子生物学的な病態を明らかにすることを目的とする。全エクソン解析を行ったところ、体細胞変異は各症例5-10個程度確認され、それぞれの変異のアレル頻度は約5%程度と非常に低かった。4例のみの解析であるが、上記結果は全症例に該当することから、低アレル頻度の体細胞変異を伴うクローナルな造血が本疾患の一つの特徴であることが示唆された。

研究成果の概要(英文):We experienced four patients with bone marrow failure syndrome after allogeneic stem cell transplantation who sustain donor derived hematopoiesis. We aim to clarify a molecular mechanisms for development of bone marrow failure syndrome using specimens of patients of donor derived bone marrow failure syndrome. Whole exome sequencing revealed 5-10 somatic mutation with low allele frequencies in each patients. Low burden of clonal hematopoiesis with somatic mutations might be a characteristics of this complications after allogeneic stem cell transplantation.

研究分野：血液学

キーワード：骨髄不全症候群 造血幹細胞移植 ドナー由来 全エクソン解析

1. 研究開始当初の背景

骨髄不全症候群は、造血幹細胞の減少や質的な異常により持続的に血球が減少した状態を含む概念であり、再生不良性貧血、発作性夜間血色素尿症、低リスクの骨髄異形成症候群が含まれる。これらの患者の一部は、免疫抑制療法に反応し、血球減少が改善することから、従来より発症機序の一つとして、自己免疫学的な異常が報告されている。また、発作性夜間血色素尿症には、PIGA 遺伝子の体細胞変異が、骨髄異形成症候群には、モノソミー7などの染色体異常や RNA スプライシングファクターなどの遺伝子に多くの体細胞変異が検出されており、血球側の異常も発症に重要な役割を果たしていると考えられる。良性疾患と考えられていた再生不良性貧血にも、骨髄異形成症候群に関連する遺伝子異常とクローナルな造血が報告され (Yoshizato T. et al, N Engl J Med. 2015) 骨髄不全症候群は、自己免疫学的機序による造血細胞の破壊と、体細胞変異による造血細胞のクローナルな増生が共通の病態である。しかしながら、両者の関連性・因果関係に関しては明らかにされていない。次世代シーケンサーを用いた網羅的なゲノム解析により、血液腫瘍に関する分子生物学的な理解は格段の進歩を遂げた。しかし、一般にゲノム解析は疾患発症後の臨床サンプルを主な対象としており、解析により疾患成立に必要なゲノム異常が明らかにされるが、正常組織から疾患発症までの多段階にわたる発癌過程を研究することは困難である。これは、血液腫瘍発症前の臨床サンプルを通常手に入れることができないという点が大きく影響する。我々は、造血幹細胞移植後の稀な合併症であるドナー由来白血病に着目し、上記の問題が解決される可能性を示した (Yasuda T. et al, Leukemia. 2014)。このモデルでは、ドナー由来白血病を de novo の白血病、ドナーを健常者と想定し、

これら一連のサンプルに対して経時的なゲノム解析を行うことにより、de novo 急性骨髄性白血病が多段階の遺伝子変異蓄積ステップを経て、正常細胞から白血病へとトランスフォームしていく過程をゲノム学的に示すことに成功した。

上記モデルを白血病のみならず、骨髄不全症候群にも応用するため、移植後ドナー造血を得ながらも、骨髄不全症候群を発症した症例を4症例集積した。興味深いことに、この4症例の移植前疾患は、いずれも骨髄不全症候群であり、ドナー由来骨髄不全症候群は移植前疾患と密接に関連していることが示唆された。また、この結果は、ドナー由来白血病が移植前疾患とは無関係に、急性骨髄性白血病やハイリスクの骨髄異形成症候群などの骨髄系腫瘍を発症しやすい点と非常に対照的である (Hertenstein B. et al, Haematologica, 2005)。ドナー由来白血病は、ドナーに存在する血球の体細胞変異 (細胞内の異常) に依存する一方で、ドナー由来骨髄不全症候群は、レシピエントの造血環境 (細胞外の異常) に強く規定され、血球のクローン性造血は、厳しい造血環境に適応したクローンが持続的にセレクションされたものであるという解釈が1つの仮定として成り立つ。この解釈の妥当性を判断するため、このモデルの臨床サンプルのゲノム解析を行うことにより、骨髄不全症候群の発症に必要な分子生物学的な基盤を明らかにする。

2. 研究の目的

我々は、同種造血幹細胞移植後に、ドナー造血を維持しながらも、骨髄不全を呈する患者 (ドナー由来骨髄不全症候群) を同定することに成功した。本研究は、ドナー由来骨髄不全症候群患者の臨床検体を用いて、骨髄不全症候群が発症する分子生物学的な病態を明らかにすることを目的とする。骨髄不全は、体細胞変異を伴うクローン性造血 (細胞内の異常) と自己免疫学的な異常 (細胞外の異常)

の両方が発症機序として想定されているが、この両者の関連性は明らかではない。我々が既に報告したドナー由来白血病同様に、ドナー由来骨髄不全症候群は骨髄不全症候群のヒト *in vivo* モデルとして成立することが予想され、この疾患のゲノム解析が骨髄不全症候群発症の病態解明に向けて、重要な知見をもたらすことが期待される。

3. 研究の方法

クローン性造血と自己免疫学的機序による造血細胞破壊の因果関係を明らかにする。

ドナー細胞を正常コントロールとし、ドナー由来骨髄不全症候群の全エクソン解析を行うことにより、体細胞変異の有無、クローン性造血の存在を確認する。体細胞変異の塩基変化パターンを調べ、変異が生じたプロセスを推測する。

T細胞の自己免疫学的な活動を定量するため、ドナー由来骨髄不全症候群と原疾患のT細胞レパトアの評価を行い、T細胞のクローナリティーを評価する。クローナリティーが明らかな場合は、移植前・移植後に共通して、同じエピトープを認識する細胞がレシピエント体内に存在する可能性について検討を行う。これらの解析により、免疫学的機序がドナー由来骨髄不全症候群発症にどの程度寄与しているかを明らかにする。

4. 研究成果

ドナー由来骨髄不全症候群の全エクソン解析
ドナー由来骨髄不全症候群のサンプルを4症例収集した。体細胞変異同定のための正常コントロールとしてドナー細胞のDNAを設定し、骨髄不全症候群の検体とペアで全エクソン解析を行い、非同義体細胞変異を同定した。その結果、体細胞変異は各症例5-10個程度確認された。それぞれの変異のアレル頻度は約5%程度と非常に低く、さらに4サンプルすべてに共通して見られた。また、一般的に再

生不良性貧血、骨髄異形成症候群で高頻度に見られるような体細胞変異は確認されなかった。4例のみの解析であるが、上記結果は全症例に該当することから、低アレル頻度の体細胞変異を伴うクローナルな造血が本疾患の一つの特徴であることが示唆された。

シグナチャー解析により変異が生じたプロセスを推測する予定であったが、サンプル数が少なく、解析が実施できなかった。

全エクソン解析で得られた各サンプルのSNPsの情報を用い、骨髄不全サンプルとドナーサンプルの自己同一性を調べた。STR法と同じく本疾患がドナー由来の造血であることを再度証明した。

T細胞レパトア解析

疾患発症の機序として自己免疫学的異常の関与を検討するため、移植前・移植後の患者検体を用いてT細胞のレパトア解析を行った。T細胞のクローナリティーは患者ごと、あるいは移植前後で変化を示したが、一定の傾向を示さなかった。また、移植前後で同じ遺伝子再構成の配列をもつT細胞の同定を試みたが、同定は困難であった。本研究において、ドナー由来骨髄不全症候群におけるT細胞性自己免疫学的機序の関与を明らかにすることはできなかった。

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 9件)

Tanaka Y, Kawazu M, Yasuda T, Tamura M, Hayakawa F, Kojima S, Ueno T, Kiyoi H, Naoe T, Mano H. Transcriptional activities of DUX4 fusions in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2018, In Press, 査読あり

Yasuda T, Hayakawa F. Acute lymphoblastic leukemia of adolescents and young adults: from

the viewpoint of physicians.
Rinsho Ketsueki, 2017,58 卷(8号),1031-1037, doi: 10.11406/rinketsu.58.1031, 査読あり

Kawazu M, Kojima S, Ueno T, Totoki Y, Nakamura H, Kunita A, Qu W, Yoshimura J, Soda M, Yasuda T, Hama N, Saito-Adachi M, Sato K, Kohsaka S, Sai E, Ikemura M, Yamamoto S, Ogawa T, Fukayama M, Tada K, Seto Y, Morishita S, Hazama S, Shibata T, Yamashita Y, Mano H. Integrative analysis of genomic alterations in triple-negative breast cancer in association with homologous recombination deficiency. PLoS Genet. 2017 Jun;13 卷(6号):e1006853. doi: 10.1371/journal.pgen.1006853, 査読あり

Fukumura K, Kawazu M, Kojima S, Ueno T, Sai E, Soda M, Ueda H, Yasuda T, Yamaguchi H, Lee J, Shishido-Hara Y, Sasaki A, Shirahata M, Mishima K, Ichimura K, Mukasa A, Narita Y, Saito N, Aburatani H, Nishikawa R, Nagane M, Mano H. Genomic characterization of primary central nervous system lymphoma. Acta Neuropathol. 2016, 131 卷, 865-75. doi: 10.1007/s00401-016-1536-2, 査読あり

Inagaki Y, Hayakawa F, Hirano D, Kojima Y, Morishita T, Yasuda T, Naoe T, Kiyoi H. PAX5 tyrosine phosphorylation by SYK co-operatively functions with its

serine phosphorylation to cancel the PAX5-dependent repression of BLIMP1: A mechanism for antigen-triggered plasma cell differentiation. Biochem Biophys Res Commun. 2016, 475 卷, 176-81. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.05.067, 査読あり

Yasuda T, Tsuzuki S, Kawazu M, Hayakawa F, Kojima S, Ueno T, Imoto N, Kohsaka S, Kunita A, Doi K, Sakura T, Yujiri T, Kondo E, Fujimaki K, Ueda Y, Aoyama Y, Ohtake S, Takita J, Sai E, Taniwaki M, Kurokawa M, Morishita S, Fukayama M, Kiyoi H, Miyazaki Y, Naoe T, Mano H. Recurrent DUX4 fusions in B cell acute lymphoblastic leukemia of adolescents and young adults. Nat Genet. 2016, 48 卷, 569-74. doi: 10.1038/ng.3535, 査読あり

Ando M, Kawazu M, Ueno T, Koinuma D, Ando K, Koya J, Kataoka K, Yasuda T, Yamaguchi H, Fukumura K, Yamato A, Soda M, Sai E, Yamashita Y, Asakage T, Miyazaki Y, Kurokawa M, Miyazono K, Nimer SD, Yamasoba T, Mano H. Mutational landscape and antiproliferative functions of ELF transcription factors in human cancer. Cancer Res. 2016, 76 卷 (第7号), 1814-24, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3816. 査読あり

Katsura A, Suzuki HI, Ueno T, Mihira H, Yamazaki T, Yasuda T, Watabe T, Mano H, Yamada Y, Miyazono K. MicroRNA-31 is a

positive modulator of endothelial-mesenchymal transition and associated secretory phenotype induced by TGF- β . Genes Cells. 2016, 21 巻, 99-116, doi: 10.1111/gtc.12323.査読あり

〔学会発表〕(計 8 件)

High Expression of MEF2D-Fusion Protein Is Caused By Escaping from the Suppression By miRNA and Leads to Suppress Transcriptional Activity of PAX5. Hirano D, Hayakawa F, Yasuda T, Tange N, Yamamoto H, Kojima Y, Morishita T, Imoto N, Tsuzuki S, Mano H, Naoe T, Kiyoi H. The 59th Annual Meeting of the American Society of Hematology. 2017/12/2
The attempt to identify suitable MRD markers in acute lymphoblastic leukemia by next generation sequencing for practical use (Next generation sequencing による急性リンパ性白血病での Minimal residual disease 測定マーカーの同定)Mitsuko Akaihata, Yuka Iijima, Dai Nishijima, Tomomi Ishida, Mika Fuyama, Masaya Koganesawa, Takahiko Yasuda, Masashi Sanada, 59th Annual meeting of the Japanese Society of Pediatric Hematology and Oncology (第 59 回小児血液がん学会学術集会) , 2017/11/9, 国内
High expression of MEF2D-fusion protein by escaping from the regulation by microRNA. 平野大希, 早川文彦, 安田貴彦, 山本秀行, 小島勇貴, 森下喬允, 井本直人, 都築忍、

間野博行, 直江知樹, 清井仁, 第 79 回日本血液学会学術集会.

2017/10/20, 国内

Novel fusion genes in acute lymphoblastic leukemia of adolescents and young adults, 口頭, 安田貴彦, 都築忍, 河津正人, 早川文彦, 小島進也, 上野敏秀, 清井仁, 直江知樹, 間野博行, 第 78 回日本血液学会学術集会, 2016/10/13, 国内
New molecular targets of B-cell acute lymphoblastic leukemia. 口頭, 早川文彦, 安田貴彦, 間野博行, 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/8, 国内

AYA 世代急性リンパ性白血病における網羅的融合遺伝子解析, 口頭, 安田貴彦, 都築忍, 河津正人, 早川文彦, 小島進也, 上野敏秀, 清井仁, 直江知樹, 間野博行, 第 75 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016/10/8, 国内

Comprehensive fusion gene analysis of acute lymphoblastic leukemia of adolescents and young adults, 腫瘍別シンポジウム 6、口頭 安田貴彦、都築忍、河津正人、早川文彦、小島進也、上野敏秀、清井仁、直江知樹、間野博行、第 75 回日本癌学会学術総会、2016/10/8, 国内
Identification of DUX4-IGH fusion gene in acute lymphoblastic leukemia of adolescents and young adults、奨励賞受賞講演、口頭、安田貴彦、都築忍、河津正人、早川文彦、小島進也、上野敏秀、清井仁、直江知樹、間野博行、第 75 回日本癌学会学術総会、2016/10/8, 国内

〔図書〕(計 1 件)

安田貴彦, AYA 世代のゲノム異常、
「腫瘍内科」(科学評論社), 2016, 18
巻 (第 6 号), 635-641,

()

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 悪性リンパ腫または白血病罹患の有
無の判別方法並びに白血病の治療および/
又は予防のための薬剤

発明者: 間野博行、上野俊秀、**安田貴彦**、
河津正人、清井仁、早川文彦、都築忍、直
江知樹

権利者: 国立大学法人東京大学、国立大学
法人名古屋大学、愛知県がんセンター、独
立行政法人国立病院機構名古屋医療センタ
ー

種類:

番号: 特願 2015-210226

出願年月日: 2016 年 10 月 26 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 貴彦 (Takahiko Yasuda)

独立行政法人国立病院機構 (名古屋医療セ
ンター臨床研究センター)

研究者番号: 20723977

()

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者