

令和元年6月3日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16184

研究課題名(和文)再生不良性貧血を発症させるT細胞シグナルパスウェイの同定

研究課題名(英文)Identification of T cell pathway causing the acquired aplastic anemia

研究代表者

細川 晃平 (Hosokawa, Kohei)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：10786239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：再生不良性貧血の類縁疾患である骨髄不全型PNH(発作性夜間ヘモグロビン尿症)の患者検体と健常人のシーケンスデータを用いて解析を行ったところ、TNFR, IGF1, NOTCH, AP-1, ATF2 pathwayなどのパスウェイに関連した遺伝子群の発現が有意に変化していた。さらにそれらの候補遺伝子群の中から、JUN, TNFAIP3, TOB1, GIMAP4, GIMAP6, TRMT112, NR4A2, CD69, TNFSF8などのT細胞の活性化・制御に関わるような遺伝子の発現がそれぞれのT細胞サブセットにおいて有意に変化していることが、qPCRやフローサイトメトリーにより確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髄不全型PNHにおいてT細胞を正または負に制御するパスウェイや遺伝子が同定されたことから、これらの遺伝子を標的とした治療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：To identify aberrant molecular mechanisms involved in immune targeting of hematopoietic stem cells in bone marrow, we applied RNA-seq to examine the transcriptome of T cell subsets from AA/PNH patients and healthy control subjects. Differentially expressed gene analysis in four different T cell subsets from PNH and healthy control subjects showed distinct transcriptional profiles, depending on the T cell subsets. By pathway analysis, we identified novel signaling pathways in T cell subsets, including increased gene expression involved in TNFR, IGF1, NOTCH, AP-1, and ATF2 pathways. Dysregulation of several candidate genes (JUN, TNFAIP3, TOB1, GIMAP4, GIMAP6, TRMT112, NR4A2, CD69, and TNFSF8) was validated by quantitative real-time RT-PCR and flow cytometry.

研究分野：血液内科学

キーワード：再生不良性貧血 トランスクリプトーム解析 造血不全

1. 研究開始当初の背景

再生不良性貧血は血液中の白血球、赤血球、血小板のすべてが減少する汎血球減少症である。再生不良性貧血では、血液を産生する骨髄組織は多くの場合脂肪に置き換わっており、血球が十分作られなくなっている。大部分は後天性再生不良性貧血で、そのうち 90%以上が原因不明の特発性再生不良性貧血である。特発性再生不良性貧血の約 70%は、抗胸腺細胞グロブリンやシクロスポリンなどの免疫抑制療法によって改善することから、自己免疫的な機序によって造血幹細胞が傷害される結果発症すると考えられている。造血幹細胞移植によって再生不良性貧血が治癒するという事実は、再生不良性貧血が造血支持組織ではなく、造血幹細胞・免疫細胞の異常によって起こる疾患であることを示している。また、再生不良性貧血患者の約半数で認められる GPI アンカー型膜蛋白を欠損した発作性夜間血色素尿症 (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: PNH) 形質の血球 (PNH 型血球) や HLA クラス I アレル欠失血球の存在は、免疫学的な骨髄細胞の破壊から免れた造血幹細胞/前駆細胞が造血を支持していることを示している (Hosokawa, et al, Eur J Haematol, 2015 など)。また、13 番染色体長腕欠失 (del(13q)) を伴う骨髄不全は高率に PNH 型血球が検出され、免疫抑制療法によって改善する良性の骨髄不全であることが分かっている (Hosokawa, et al, Haematologica, 2012)。

免疫細胞の中心的役割を有する T 細胞については、制御性 T 細胞 (regulatory T cells) や Th17 細胞の機能異常、Th1 細胞の機能亢進などがこれまでに報告されてきた。最近応募者らは、シクロスポリン依存性患者において HLA-B*40:02 拘束性に造血前駆細胞を傷害する T 細胞クローンを単離した (Inaguma, et al, Br J Haematol, 2015)。

応募者はこれまで、再生不良性貧血患者の末梢血 T 細胞を対象に、microRNA の発現解析、並びに抗原特異性を有しながらも幹細胞の特徴を維持するメモリー幹細胞 (stem cell memory T cells, TSCM) などに着目し研究を行ってきた (Hosokawa, et al, Haematologica, 2015, Hosokawa, et al, J Immunol, 2016)。しかし、再生不良性貧血における T 細胞特有の遺伝子発現パターン (トランスクリプトーム解析) や、重症度との関連、また免疫抑制療法による加療後の経時的変化などはよく分かっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、RNA シーケンシングを用いて、自己免疫性骨髄不全の再生不良性貧血を発症させる T 細胞の新規シグナルパスウェイを同定することである。具体的には新規発症の重症・非重症の再生不良性貧血患者、並びに健常人の末梢血から T 細胞サブセット (CD4 陽性 (ナイーブ・メモリー) T 細胞、CD8 陽性 (ナイーブ・メモリー) T 細胞) をセルソーターを用いて分離し、RNA を単離した後、RNA シークエンスを行うことによって、再生不良性患者に特徴的な T 細胞サブセットの遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析する。さらにその遺伝子発現プロファイルを重症度別および免疫抑制療法の治療前後で比較することによって、再生不良性貧血の重症度に関連し、さらに発症の起因となる新規のパスウェイ・遺伝子群を同定する。

3. 研究の方法

重症および非重症再生不良性貧血の患者と健常人コントロール (それぞれ 4 名ずつ) から末梢血 20ml を採取し、セルソーターを用いて T 細胞サブセット (CD4 陽性 (ナイーブ・メモリー) T 細胞、CD8 陽性 (ナイーブ・メモリー) T 細胞) を分離し、RNA を抽出後 RNA シーケンシングによるトランスクリプトーム解析を行う。免疫抑制療法による加療を受けた患者は、治療後 6 か月に再度同様の解析を行う。

4. 研究成果

応募者が以前所属していた国立アメリカ国立衛生研究所 (National Institutes of Health, NIH) 国立心肺血液研究所 (NHLBI; National Heart, Lung, and Blood Institute)、血液部門 (Hematology branch) で行っていた研究の延長として、再生不良性貧血の類縁疾患である骨髄不全型 PNH (発作性夜間ヘモグロビン尿症) の患者検体・シークエンスデータを用いて解析を行ったところ、TNFR, IGF1, NOTCH, AP-1, ATF2 pathway などのパスウェイに関連した遺伝子群の発現が有意に変化している事が分かった。さらにそれらの候補遺伝子群の中から、JUN, TNFAIP3, TOB1, GIMAP4, GIMAP6, TRMT112, NR4A2, CD69, TNFSF8 などの T 細胞の活性化・制御に関わるような遺伝子の発現がそれぞれの T 細胞サブセットにおいて有意に変化している事が、qPCR やフローサイトメトリーにより確認された。再生不良性貧血の類縁疾患である骨髄不全型 PNH (発作性夜間ヘモグロビン尿症) の患者検体を用いて解析を行ったのは、実験を行うにあたり通院中の患者検体の入手が比較的容易であり、十分な数の T 細胞のソーティングが行えたためである。一方、発症時の再生不良性貧血の検体は患者検体や細胞数などの問題から、十分な解析を行う事が困難であった。今後は、造血不全研究においては細胞数が少ないことが問題となるため、シングルセル解析などによる少数細胞の解析を検討している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Elbadry MI, Mizumaki H, Hosokawa K, Espinoza JL, Nakagawa N, Chonabayashi K, Yoshida Y, Katagiri T, Hosomichi K, Zaimoku Y, Imi T, Nguyen MAT, Fujii Y, Tajima A, Ogawa S, Takenaka K, Akashi K, Nakao S. Escape hematopoiesis by HLA-B5401-lacking hematopoietic stem progenitor cells in men with acquired aplastic anemia. *Haematologica*, in press. 査読有

DOI: 10.3324/haematol.2018.210856

2. Hosokawa K, Sugimori C, Ishiyama K, Takamatsu H, Noji H, Shichishima T, Obara N, Chiba S, Ninomiya H, Shirasugi Y, Nakamura Y, Ando K, Ueda Y, Yonemura Y, Kawaguchi T, Nishimura JI, Kanakura Y, Nakao S. Establishment of a flow cytometry assay for detecting paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells specific to patients with bone marrow failure. *Ann Hematol*. 2018; Dec 97(12):2289-2297. 査読有

DOI: 10.1007/s00277-018-3443-1

3. Banaszak LG, Giudice V, Zhao X, Wu Z, Gao S, Hosokawa K, Keyvanfar K, Townsley DM, Gutierrez-Rodriguez F, Fernandez Ibanez MDP, Kajigaya S, Young NS. Abnormal RNA splicing and genomic instability after induction of DNMT3A mutations by CRISPR/Cas9 gene editing. *Blood Cells Mol Dis*. 2018; Mar (69):10-22. 査読有

DOI: 10.1016/j.bcmed.2017.12.002

4. Hosokawa K, Kajigaya S, Keyvanfar K, Qiao Wangmin, Xie Yanling, Townsley DM, Feng X, Young NS. T Cell Transcriptomes from Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Patients Reveal Novel Signaling Pathways. *J Immunol*. 2017;199(2):477-488. 査読有

DOI: 10.4049/jimmunol.1601299

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 細川晃平、中尾眞二
免疫性造血不全における変異造血幹細胞によるエスケープ造血
第 80 回 日本血液学会学術集会シンポジウム (招待講演) 2018

2 . Kohei Hosokawa, Mahmoud Ibrahim Elbadry, Hiroki Mizumaki, Luis Espinoza, Noriharu Nakagawa, Kazuhisa Chonabayashi, Yoshinori Yoshida, Takamasa Katagiri, Yoshitaka Zaimoku, Tatsuya Imi, Nguyen Thi Mai Anh, Yoichi Fujii, Seishi Ogawa, Katsuto Takenaka, Koichi Akashi and Shinji Nakao: Hematopoiesis By HLA-B5401-Lacking Hematopoietic Stem Progenitor Cells in Male Patients with Acquired Aplastic Anemia, 2018 ASH annual meeting (国際学会)

3 . Takeshi Yoroidaka, Kohei Hosokawa, Tatsuya Imi, Takamasa Katagiri, Fumihiko Azuma and Shinji Nakao: Bystander Proliferation of Piga-Mutated Hematopoietic Progenitor Cells in Acquired Aplastic Anemia Patients Possessing HLA Class I Allele-Lacking Leukocytes, 2018 ASH annual meeting (国際学会)

4 . Hiroki Mizumaki, Kazuyoshi Hosomichi, Tanabe Mikoto, Takeshi Yoroidaka, Tatsuya Imi,

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

Yoshitaka Zaimoku, Kohei Hosokawa, Takamasa Katagiri, Hiroyuki Takamatsu, Tatsuhiko Ozawa, Fumihiko Azuma, Hiroyuki Kishi, Atsushi Tajima and Shinji Nakao: Loss-of-Function Mutations in HLA-Class I Alleles in Acquire Aplastic Anemia: Evidence for the Involvement of Limited Class I Alleles in the Auto-Antigen Presentation of Aplastic Anemia, 2018 ASH annual meeting (国際学会)

5 . Tanabe Mikoto, Noriharu Nakagawa, Kohei Hosokawa, Luis Espinoza, Kana Maruyama, Takamasa Katagiri, Hirohito Yamazaki and Shinji Nakao: The Depletion of TGF- β Co-Receptor CD109 Induces Erythroid Differentiation of TF-1 Cells: A Model of Preferential Commitment of *PIGA*-Mutated Hematopoietic Stem Cells in Immune-Mediated Bone Marrow Failure, 2018 ASH annual meeting (国際学会)

〔図書〕

Hosokawa, K., Scheinberg, P., and Young, N.S.: Pathophysiology of Acquired Bone Marrow Failure. In “Congenital and Acquired Bone Marrow Failure”

〔産業財産権〕

出願状況
該当なし

取得状況
該当なし

〔その他〕

平成 30 年度 日本血液学会奨励賞

6 . 研究組織

(1)研究分担者
該当なし

(2)研究協力者
研究協力者氏名：細道 一善
ローマ字氏名：Hosomichi Kazuyoshi

研究協力者氏名：Neal .S. Young
ローマ字氏名：Neal . S. Young

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。