

令和元年5月20日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16248

研究課題名(和文)小児再生不良性貧血におけるクローン性造血の網羅的遺伝子解析

研究課題名(英文)Comprehensive gene analysis of clonal hematopoiesis in childhood aplastic anemia

研究代表者

成田 敦(Atsushi, Narita)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20625149

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：小児再生不良性貧血(AA)の57症例を後方視的に解析した。観察期間中に5例がPNHを発症し、10年累積発症率は10.2% (95% CI, 3.6%-20.7%)であった。AA診断時とPNH発症時の検体をターゲットシーケンス解析した結果、AA診断時には遺伝子変異を認めなかったが、PNH発症後にPIGA遺伝子変異を全例で検出した。

小児AA患者41症例について全エクソーム解析を実施した。複数例に同定された変異遺伝子の中に新規遺伝子X(2例)を認めた。追加検討で小児AA140症例のうち8症例(6%)に遺伝子X変異を同定した。遺伝子Xの変異部位は同一であることから、機能獲得型変異であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児再生不良性貧血(AA)に発作性夜間血色素尿症(PNH)が合併することが知られている。我々は小児AA患者57例をの長期予後を調査したところ、観察期間中に5例がPNHを発症しており、10年累積発症率は10.2% (95% CI, 3.6%-20.7%)であった。また、AAからPNHを発症した5例では、AA診断時のフローサイトメトリーで微小PNH血球が全例で陽性であった。AA診断時とPNH発症時の検体をターゲットシーケンス解析した結果、AA診断時にはPIGA遺伝子変異を認めなかったが、PNH発症後にPIGA遺伝子変異を全例で検出した。

研究成果の概要(英文)：We retrospectively studied 57 children with Aplastic anemia (AA) between 1992 and 2010. During the follow up, five patients developed clinical PNH, in whom somatic PIGA mutations were detected by targeted sequencing. The 10 year probability of clinical PNH development was 10.2% (95% CI, 3.6%-20.7%). Furthermore, the detection of minor PNH clones by flow cytometry at AA diagnosis was a risk factor for the subsequent development of clinical PNH. We performed whole-exome sequencing (WES) of paired bone marrow-germline reference samples in 41 patients. WES detected recurrent gene X mutations as a novel mutational target. Gene X mutation may be associated the pathophysiology of AA.

研究分野：小児血液腫瘍学

キーワード：再生不良性貧血 発作性夜間血色素尿症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

再生不良性貧血 (AA) は骨髄低形成および汎血球減少を特徴とする稀な血液疾患である。造血幹細胞に対する自己免疫反応が原因で起こると考えられているが、標的抗原が同定されていないなど、病態の解明は十分ではない。AA 患者に対する標準治療は HLA 一致血縁ドナーからの骨髄移植であるが、適切なドナーが得られない患者では抗胸腺細胞グロブリンとシクロスポリンによる免疫抑制療法 (Immunosuppressive therapy; IST) が標準的治療法となっている。骨髄移植が実施できなかった症例においても IST により 90%以上の長期生存が期待されるが、数年の経過中に約 15%の症例ではクローン性造血が生じるとされる。クローン性造血には夜間発作性血色素尿症 (Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; PNH) を代表とする血液良性疾患の他に、骨髄異形成症候群 (Myelodysplastic syndrome; MDS) および急性骨髄性白血病 (Acute myeloid leukemia; AML) などの血液悪性疾患が含まれる。

PNH は X 染色体短腕 (Xp22.1) に存在する PIGA 遺伝子に後天的変異を持った造血幹細胞がクローン性に拡大することで生じる。高感度フローサイトメトリーによる解析では、AA と診断された 20-70%の症例では診断時から微小 PNH 血球が認められる。AA における微小 PNH 血球の存在は、造血細胞に対する免疫学的機序による造血幹細胞の障害から PNH 血球が免れていることを示唆している。この仮説を補強する根拠として、我々は小児 AA 診断時の PNH 血球陽性群は陰性群よりも IST に対する反応が良好であることを報告した (Haematologica 2015;100 成田)。しかし、PIGA 変異だけではクローン拡大には不十分であり、PNH の発症につながらないことがモデルマウスを用いた研究で明らかになっている。現在考えられている PNH クローンの拡大機序としては、PNH 幹細胞が増殖を繰り返す過程で、良性腫瘍性増殖をきたすような遺伝子の変異が PNH クローンに起こると考えられている。研究開始当初、AA の診断時から PNH を発症するまでの継時的な検体を用いたクローン性造血の発現状況を明らかにした研究はなかった。

細胞形態に異常を認めない典型的な AA であっても、全体の 4~11%に染色体異常が認められる。頻度の高い染色体異常は 7 番染色体モノソミー、8 番染色体トリソミー、13 番染色体長腕欠損、6 番染色体の異常などである。このうち 7 番染色体モノソミーは難治性の AML に移行するリスクが高いため、異常クローンが少ないうちにできるだけ早く同種造血幹細胞移植を行う必要があるとされる。ゲノム解析の進歩により MDS や AML の発症に関わる遺伝子の同定が進み、種々の遺伝子に変異が蓄積することが明らかになっているが、血液悪性腫瘍が発症する以前にどのような異常が生じているか、また発症までにどれくらいの時間を要するのかについては不明な点が多い。成人では、大規模な再生不良性貧血コホートについて、全エクソームシーケンスおよび MDS における既知の変異遺伝子ないし候補遺伝子のターゲットシーケンスが実施され、検出された遺伝子変異と予後との関連や、クローン性造血における役割についての報告がされている。しかしながら、小児再生不良性貧血における血液悪性疾患へのクローン造血についての遺伝学的機構については明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

研究代表者の所属する名古屋大学小児科は継続して小児特発性 AA の診療を行っており、世界でも他に類をみない、大規模かつフォローアップ期間の長い小児特発性 AA 患者のコホートと臨床検体を蓄積している。本研究の目的は、これらの症例を対象として複数時点での解析を行い、造血幹細胞のクローン性造血を追跡する。血液悪性疾患に関連する標的遺伝子の網羅的解析または全エクソーム解析を行い、体細胞変異を検出し変異遺伝子の分布を明らかにする。また、変異遺伝子と臨床的なイベントとの関連を解析する。特徴的な遺伝子変異が検出されればその機能解析を行い、病態の解明をさらに進める。

3. 研究の方法

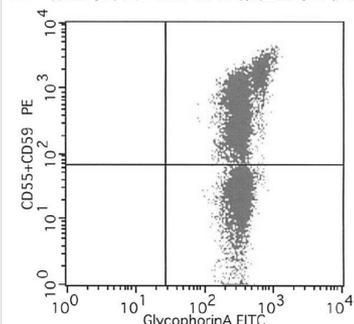
(1) 患者検体・臨床情報の収集

名古屋大学医学部附属病院に蓄積された経過中にクローン性造血を来した 12 例 (PNH 5 例、7 番染色体モノソミー 7 例) の検体と臨床情報を照合し、検体を整理・収集する。AA 診断時からクローン性造血を発症するまでの検体を継時的に解析する。QIAamp DNA Blood Mini Kit、あるいは QIAamp DNA Investigator Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出する。

(2) 微小 PNH 型血球の測定

当院にてフォローされている AA 症例に対して、FACSCaliber (Becton Dickinson Biosciences, Mississauga, Canada) を用いて、患者末梢血中の CD13 陽性好中球 ($\geq 5.0 \times 10^4$) および GlycophorinA 陽性赤血球 ($\geq 2.5 \times 10^5$) における微小 PNH 型血球の検出を定期的に行う。正常人 30 例の検討から、好中球のうち CD13+CD55-CD59- が 0.007%以上、あるいは赤血球のうち GlycophorinA+CD55-CD59- が 0.009%以上である時、微小 PNH 型血球陽性と判定する (図 1)。

図1 赤血球分画におけるPNH陽性血球の検出



(3) 全エクソーム解析・ターゲットシーケンス解析

全く未知の遺伝的背景を探る目的で、SureSelect XT Clinical Research Exome ベイト (Agilent)を用いた全エクソーム解析を行う。Germline controlとして、保存検体よりCD3+細胞を培養し、DNAを抽出する。HiSeq 2500 (Illumina)を用いて、1人あたり8GBのシーケンスを行う。全エクソームシーケンスにより得られた遺伝子変異をリスト化し、先天性造血不全症並びに血液悪性疾患の標的遺伝子を含む独自設計のベイト(Agilent)を作成する。

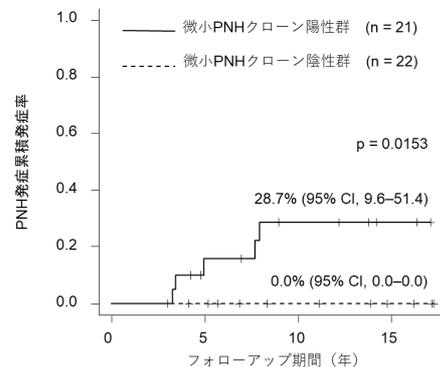
(4) 遺伝子変異の検出

データ解析は、名古屋大学のスーパーコンピュータに構築済みの解析パイプラインで行う。Burrows-Wheeler alignerとNovoalign (Novocraft)を併用したアラインメント後に、VarScanを用いてバリエーションコールを行う。ANNOVARを用いてアノテーションを行う。各バリエーションをSNPデータベース(in house SNPデータベース、HGVD、ESP6500、並びにExAC)と照合してcommon SNPsを除去し、病的変異データベース(HGMD、NCBI ClinVar)と照合して、既報の病的変異を抽出する。アリル頻度とリファレンスサンプルに基づいて体細胞変異・germline変異を区別する。American College of Medical Genetics (ACMG)のガイドラインに従いバリエーションを分類し、病的意義が確実であるもの(class 1/2)に基づいて遺伝子診断を検討する。各エクソンのリード数から染色体コピー数変化を検出する。

4. 研究成果

我々は小児AAの57症例を後方視的に解析した。観察期間中に5例がPNHを発症し、PNH発症時の年齢は15-22歳と全例が思春期以降の発症であった。AA診断からPNH発症までの中央期間は4.9年(範囲:3.3-7.9年)であり、10年累積発症率は10.2%(95% CI, 3.6%-20.7%)であった。また、AAからPNHを発症した5例についてAA診断時とPNH発症時の検体を用いてターゲットシーケンス解析を実施した結果、AA診断時にはPIGA遺伝子変異を認めなかったが、PNH発症後にPIGA遺伝子変異を全例で検出した。さらに、AA診断時のフローサイトメトリーによる微小PNHクローン陽性群は、その後の臨床症状を有するPNHの発症リスクが有意に高いことが示された(図2)(Narita A, et al., Br J Haematol 2017)。

図2 小児再生不良性貧血患者における経過中のPNH発症率



小児AA患者41症例から60検体の血液試料について全エクソーム解析を実施し、19症例(46%)に何らかの体細胞変異を同定した。複数例に同定された変異遺伝子はBCOR(3例)新規遺伝子X(2例)であった(未発表データ)。遺伝子Xは、がん悪性化にも関与する遺伝子の制御因子として知られているが、血液疾患との関連性についてはこれまでに報告がない。我々は追加で小児AA140症例について、Pyro sequencing法を実施し、8症例(6%)に遺伝子X変異を同定した。また、8例の遺伝子Xの変異部位は同一であることから、機能獲得型変異であることが推測された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

1. Hamada M, Doisaki S, Okuno Y, Muramatsu H, Hama A, Kawashima N, Narita A, Nishio N, Yoshida K, Kanno H, Manabe A, Taga T, Takahashi Y, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Whole-exome analysis to detect congenital hemolytic anemia mimicking congenital dyserythropoietic anemia. Int J Hematol.2018;108:306-311 (査読あり)。
2. Su Z, Kishida S, Tsubota S, Sakamoto K, Cao D, Kiyonari S, Ohira M, Kamijo T, Narita A, Xu Y, Takahashi Y, Kadomatsu K. Neurocan, an extracellular chondroitin sulfate proteoglycan, stimulates neuroblastoma cells to promote malignant phenotypes. Oncotarget.2017;8:106296-106310 (査読あり)。
3. Kato K, Sakaguchi H, Muramatsu H, Sekiya Y, Kawashima N, Narita A, Doisaki S, Watanabe N, Yoshida N, Matsumoto K. Danaparoid reduces transplant-related mortality in stem cell transplantation for children. Pediatr Transplant.2018;22 (査読あり)。
4. Kudo K, Muramatsu H, Narita A, Yoshida N, Kobayashi R, Yabe H, Endo M, Inoue M, Hara J, Kounami S, Inagaki J, Hashii Y, Kato K, Tabuchi K, Kojima S. Unrelated cord blood transplantation in aplastic anemia: is anti-thymocyte globulin indispensable for

conditioning? Bone Marrow Transplant.2017;52:1659-1661 (査読あり) .

5. Narita A, Muramatsu H, Okuno Y, Sekiya Y, Suzuki K, Hamada M, Kataoka S, Ichikawa D, Taniguchi R, Murakami N, Kojima D, Nishikawa E, Kawashima N, Nishio N, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Development of clinical paroxysmal nocturnal haemoglobinuria in children with aplastic anaemia. Br J Haematol.2017;178:954-958 (査読あり) .

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Relationship between plasma rabbit anti-thymocyte globulin level and response to immunosuppressive therapy in patients with severe aplastic anemia: Results of a multicenter, prospective, randomized study. Atsushi Narita, Hideki Muramatsu, Yinyan Xu, Eri Nishikawa, Nozomu Kawashima, Yusuke Okuno, Nobuhiro Nishio, Asahito Hama, Hirohito Yamazaki, Shinji Nakao, Seiji Kojima, and Yoshiyuki Takahashi. 45th Annual Meeting of the European Society for Blood and Marrow Transplantation, Frankfurt, German, March 24-27, 2019
2. A Randomized Trial of Two Dosages of Rabbit Antithymocyte Globulin in Patients with Aplastic Anemia. Atsushi Narita, Xiaofan Zhu, Hideki Muramatsu, Xiaojuan Chen, Ye Guo, Wenyu Yang, Liao Jing, Fang Liu, Jun Ho Jang, Hoon Kook, Hawk Kim, Kensuke Usuki, Hirohito Yamazaki, Yoshiyuki Takahashi, Shinji Nakao, Jong Wook Lee, and Seiji Kojima, on behalf of Aplastic anemia working party of the Asia-Pacific Blood and Marrow Transplantation Group. 60th American Society of Hematology Annual Meeting & Exposition. San Diego, USA, December 1-4, 2018
3. Diagnosis of Inherited Bone Marrow Failure Syndromes Using Sequencing Approaches. Atsushi Narita, Hideki Muramatsu, Yusuke Okuno, Kenichi Yoshida, Yuichi Shiraishi, Hirotohi Sakaguchi, Nozomu Kawashima, Xinan Wang, Yinyan Xu, Kenichi Chiba, Hiroko Tanaka, Asahito Hama, Masashi Sanada, Hitoshi Kanno, Hiroki Yamaguchi, Shouichi Ohga, Atsushi Manabe, Hideo Harigae, Shinji Kunishima, Eiichi Ishii, Masao Kobayashi, Kenichi Koike, Kenichiro Watanabe, Etsuro Ito, Minoru Takata, Miharuru Yabe, Seishi Ogawa, Satoru Miyano, Seiji Kojima, and Yoshiyuki Takahashi. 第 60 回日本小児血液・がん学会学術集会 (京都府京都市) 2018 年 11 月 16 日 ~ 19 日
4. Immune reconstitution following rabbit ATG therapy in patients with severe aplastic anemia, Atsushi Narita, Hideki Muramatsu, Yinyan Xu, Eri Nishikawa, Nozomu Kawashima, Yusuke Okuno, Nobuhiro Nishio, Asahito Hama, Hirohito Yamazaki, Shinji Nakao, Seiji Kojima, and Yoshiyuki Takahashi. 第 80 回日本血液学会学術集会(大阪府大阪市) 2018 年 10 月 12 日-14 日
5. 小児再生不良性貧血に対するハプロ一致造血幹細胞移植の成績. 成田 敦, 高橋義行, 村松秀城, 佐藤真穂, 矢部 普正, 橋井 佳子, 田淵 健, 小島勢二, 吉田奈央. 第 40 回日本造血細胞移植学会(北海道札幌市) 2018 年 2 月 1 日 ~ 3 日
6. Germline mutation in pediatric patients with aplastic anemia. Atsushi Narita, Hideki Muramatsu, Yusuke Okuno, Xinan Wang, Yinyan Xu, Nozomu Kawashima, Nobuhiro Nishio, Asahito Hama, Hirotohi Sakaguchi, Nao Yoshida, Koji Kato, Seiji Kojima, and Yoshiyuki Takahashi. 第 59 回日本小児血液・がん学会(愛媛県松山市) 2017 年 11 月 9 日-11 日
7. Genetic background of idiopathic bone marrow failure syndromes in children. Atsushi Narita, Hideki Muramatsu, Yusuke Okuno, Kenichi Yoshida, Yuichi Shiraishi, Kenichi Chiba, Hiroko Tanaka, Xinan Wang, Daiei Kojima, Yinyan Xu, Nozomu Kawashima, Nobuhiro Nishio, Asahito Hama, Yoshiyuki Takahashi, Daisuke Hasegawa, Atsushi Manabe, Hirotohi Sakaguchi, Nao Yoshida, Koji Kato, Satoru Miyano, Masafumi Ito, Seishi Ogawa, and Seiji Kojima. 8th International Symposium on JMML, MDS, and bone marrow failure. Rome, Italy, Sep 28-30, 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：高橋 義行
ローマ字氏名：(TAKAHASHI, Yoshiyuki)

研究協力者氏名：村松 秀城
ローマ字氏名：(MURAMATSU, Hideki)

研究協力者氏名：奥野 友介
ローマ字氏名：(OKUNO, Yusuke)

研究協力者氏名：中枿 昌弘
ローマ字氏名：(NAKATOCHI, Masahiro)

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。