

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08708

研究課題名(和文) トロンボポエチン受容体作動薬ロミプロスチムの造血への影響とDNA修復効果の検証

研究課題名(英文) Effects of romiplostim, a thrombopoietin receptor agonist, on hematopoiesis and DNA repair

研究代表者

石山 謙 (Ishiyama, Ken)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：60377380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：トロンボポエチン受容体作動薬(TPO-RA)であるエルトロンボパク(EPAG)またはロミプロスチム(ROMI)が奏効した再生不良性貧血(AA)患者において、体細胞変異クローンの出現や既知変異クローンの拡大の有無を検討した。TPO-RAを2年以上投与された41例中9例(21.4%)でASXL1、RUNX1変異を含む体細胞変異と染色体の構造異常が認められ、複数の体細胞変異を認めた2例と、ASXL1のフレームシフト変異を認めた1例の計3例は骨髄異形成症候群に移行した。体細胞変異の検出頻度は既報と比べてほぼ同等であることから、体細胞変異クローンがTPO-RAによって拡大する可能性は低いと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軽症AAに対する一次治療はシクロスポリンであるが、効果が不十分な症例に対してはTPO-RAの追加がガイドラインで推奨されている。また、重症AAに対する一次治療では、従来行われてきた免疫抑制療法にTPO-RAを併用することによって治療成績が向上することが報告されている。しかし、TPO-RAによって体細胞変異を起こした造血幹細胞が増殖する可能性があるため、若年者に対するTPO-RA使用は躊躇される傾向があった。本研究結果により、軽症AA症例においてもTPO-RA療法が積極的に使用されるだけでなく、若年の重症AA症例に対する免疫抑制療法にもTPO-RAが躊躇なく使用されるようになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether the appearance of new somatic mutant clones or expansion of preexisting mutated clones occur in patients with acquired aplastic anemia (AA) who showed a response to thrombopoietin receptor agonists (TPO-RA) such as eltrombopag (EPAG) and romiplostim (ROMI). Among 41 patients who received TPO-RA for more than 2 years, somatic mutations, including ASXL1 and RUNX1 mutations, or chromosomal structural abnormalities occurred in 9 patients (21.4%). Of these, 3 patients (7.1%), including 2 cases with multiple somatic mutations and 1 case with a frameshift mutation in ASXL1, progressed to myelodysplastic syndrome. The incidence of these somatic mutations was nearly equivalent to that of a historical control, suggesting a low possibility of expansion of somatic gene mutated clones induced by TPO-RA.

研究分野：血液内科学

キーワード：再生不良性貧血 トロンボポエチン受容体作動薬(TPO-RA) ロミプロスチム 体細胞遺伝子変異 クローン性造血 miniscule PNH顆粒球

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

再生不良性貧血 (AA) は約 7 割がシクロスポリンや抗胸腺細胞グロブリンなどの免疫抑制療法によって改善することから、造血幹前駆細胞 (HSPC) が T 細胞によって攻撃される結果、発症すると考えられている。一方、トロンボポエチン受容体作動薬 (thrombopoietin-receptor agonist: TPO-RA) のエルトロンボパグ (eltrombopag: EPAG) やロミプロスチム (romiplostim: ROMI) は HSPC を直接刺激することによって、免疫抑制療法が無効であった AA 患者の約 40~50% に造血回復をもたらす。AA の中には、免疫抑制療法の併用なしに EPAG や ROMI のみで造血が改善する症例があることから、TPO-RA によって造血が改善する AA 例では、体細胞変異によって免疫学的な抑制を免れた HSPCs が造血を支持している可能性がある。一方、ROMI 治療を受けた AA 症例では、種々の体細胞変異を有しながら、骨髄異形成症候群 (MDS) へ移行する頻度は TPO-RA 投与を受けない例と変わらないことが知られている。これは、トロンボポエチンや EPAG で報告されている「DNA 修復の増強作用」が ROMI にもある可能性を示唆している。

2. 研究の目的

TPO-RA によって刺激を受ける HSPCs は、免疫学的攻撃に対する耐性を獲得したクローンである」という仮説を検証するため、TPO-RA で造血回復が得られた AA 患者を対象として、第 6 染色体短腕の片親性ダイソミーによる loss of heterozygosity (6pLOH) および機能喪失型変異による HLA クラス I アレル欠失や、インターフェロン (IFN) レセプターのシグナルに関わる体細胞遺伝子変異の有無を明らかにする。体細胞変異クローンの出現や増長に及ぼす TPO-RA の影響を明らかにする。

3. 研究の方法

観察研究「骨髄不全症患者を対象とした HLA アレル欠失血球の検出」に登録された AA 患者を対象として、HLA-A または B アレルに特異的なモノクローナル抗体を用いた HLA クラス I アレル欠失血球を検出した。また、当科を受診した TPO-RA 療法中の難治性 AA 患者末梢血を対象として、MDS との関係が報告されている 377 遺伝子の標的シーケンスを行い、体細胞遺伝子変異によるクロナリティの検出頻度を検討した。さらに、AA の非免疫病態を反映する「0.003%未満の発作性夜間ヘモグロビン尿症 (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: PNH) 形質の顆粒球 (miniscule PNH 型顆粒球 [miniPNH 顆粒球]) の存在と TPO-RA に対する反応性との関係を検討した。

4 . 研究成果

2020年2月から2023年1月にかけて40例が登録され、13例(33%)で0.1%以上のHLAクラスIアレル欠失血球が認められた。また、2019年8月から2020年3月までの間に当院通院歴のある治療抵抗性のAA患者22症例において18%(4/22)で遺伝子変異が認められ、9%(2/22)に構造異常が認められた。EPAG投与後に*KIT* 遺伝子変異が認められた1例においてはクローン性造血障害への進展の可能性が考えられたが、ROMI投与後にMDS関連の体細胞遺伝子変異が検出された症例は1例もなく、MDSへの進展もみられなかった。*KIT* 変異が検出された症例のWT1 mRNAはTPO-RA投与前から比較的高値であり、TPO-RA投与後に軽度上昇していた。

これら症例の観察期間を延長し、TPO-RAを2年以上投与された41例の末梢白血球を検討したところ、9例(21.4%)に、*ASXL1*、*RUNX1* 変異を含む体細胞変異と染色体の構造異常が認められた。このうち、複数の体細胞変異を認めた2例と、*ASXL1* のフレームシフト変異を認めた1例の計3例(7.1%)はMDSに移行したが、その他の症例では明らかなクローン進展は見られなかった。この体細胞変異の検出頻度は、ヒストリカルコントロールと比べてほぼ同等であることから、体細胞変異クローンがTPO-RAの投与により拡大する可能性は低いと考えられた。一方、ROMIに対して二次不応となった3症例において*RUNX1* 変異が検出されたことから、*RUNX1* 変異に関連した幹細胞の変異が、ROMIに対する感受性低下に関与している可能性が示唆された。

また、miniPNH顆粒球の存在と、TPO-RAに対する反応性との関係を調べたところ、ROMIまたはEPAGを投与されたPNH型顆粒球陰性例21例のうち、mimiPNH型顆粒球陽性の7例は全例(100%)がTPO-RAによって改善したが、mimiPNH型顆粒球陰性の14例におけるTPO-RAの奏効率は57%にすぎなかった。mimiPNH型顆粒球陽性例では、免疫抑制療法に対する反応性は不良であるものの、TPO-RAに反応する健康な造血幹細胞が残存していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishiyama Ken, Sato Keijiro, Imi Tatsuya, Hosokawa Kohei, Kondo Yukio, Sugimori Naomi, Yamazaki Hirohito, Nakao Shinji	4. 巻 1
2. 論文標題 Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria phenotype cells predict a good response to eltrombopag in patients with refractory aplastic anemia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eJHaem	6. 最初と最後の頁 243 ~ 248
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jha2.51	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 10.Tatsuya Imi , Ryota Urushihara , Noriaki Tsuji , Mikoto Tanabe , Hiroki Mizumaki , Yoshitaka Zaimoku , Kohei Hosokawa , Hiroyuki Takamatsu , Ken Ishiyama , Hirohito Yamazaki , Shinji Nakao.
2. 発表標題 Markedly high prevalence of HLA-lacking leukocytes in patients with very severe aplastic anemia.
3. 学会等名 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井美達也、南谷泰仁、細川晃平、岩城憲子、高松博幸、石山謙、山崎宏人、小川誠司、中尾眞二
2. 発表標題 TPO-RA長期投与中の難治性再生不良性貧血患者では体細胞変異が検出されることは稀である
3. 学会等名 日本血液学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	細道 一善 (Hosomichi Kazuyoshi) (50420948)	金沢大学・医学系・准教授 (13301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	中尾 眞二 (Nakao Shinji) (70217660)	金沢大学・医学系・協力研究員 (13301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関