

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08709

研究課題名(和文) 骨髄不全症候群のT細胞遺伝子変異像による免疫異常の病態解明と新規治療指標開発

研究課題名(英文) Mutational profiles of T cells in bone marrow failure syndrome as clinical markers

研究代表者

石田 文宏 (Ishida, Fumihito)

信州大学・学術研究院保健学系・教授

研究者番号：80311695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：後天性の造血障害で生ずる骨髄不全症候群の分子病態をよりよく理解し診療に役立てるため、T細胞を含めた血液細胞の遺伝子変異像を調べた。成人赤芽球癆症例を対象に、末梢血細胞の全エクソン解析および標的シーケンス法解析を行った。これまで報告されていたSTAT3遺伝子変異に加え、エピゲノム修飾遺伝子などクローン性造血関連遺伝子を含めた一連の遺伝子に変異を認めた。遺伝子変異の一部は赤芽球癆の病型や臨床像と関連し、また、同じ細胞性免疫異常の関与が明らかな再生不良性貧血と異なる変異像を示した。特徴的な遺伝子群変異に基づく情報は赤芽球癆の診断・鑑別・病型分類および治療法選択に有用である可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髄不全症候群は後天性に造血が障害されて貧血などの血球減少を呈し慢性に経過し、しばしば難治性である。骨髄不全症候群の多くは赤芽球癆を含め厚生労働省の指定難病に指定されている。赤芽球癆には多くの病型があり、初期治療で免疫抑制療法が奏効するものの、再燃や不応例も一定の割合で生じている。今回の研究により、赤芽球癆の遺伝子変異像を特定したことで赤芽球癆の病態のより深い理解につながり、赤芽球癆を含めた骨髄不全症候群の適切な診断や病型分類に役立てることができる。また、赤芽球癆の初期治療およびその後の治療法を選択に有用である可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Bone marrow failure syndrome (BMF) is defined as chronic cytopenia due to acquired impaired hematopoiesis. Cellular immune dysfunction has been a main cause of BMF, especially in aplastic anemia (AA) and pure red cell aplasia (PRCA), although the details are still uncertain.

We performed whole exome sequencing analysis and target sequencing on peripheral blood from patients with PRCA in order to elucidate molecular pathophysiology of BMF including PRCA. In addition to well recognized STAT3 mutations, a set of genes, including clonal hematopoiesis-related genes such as epigenetic modifier genes, were frequently mutated in PRCA, which were with a different pattern from AA. Several gene mutations were associated with specific subtypes of PRCA and/or relapse after immunosuppressive therapies.

Mutational gene analyses in PRCA would be helpful for establishing better classification and diagnostic criteria of BMF including PRCA and also for clinical decision making on PRCA.

研究分野：血液内科学

キーワード：赤芽球癆 遺伝子変異 貧血 クローン性造血

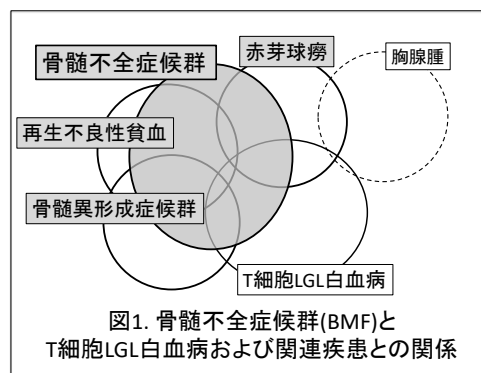
1. 研究開始当初の背景

(1) 骨髄不全症候群と T 細胞による免疫異常

骨髄不全症候群(BMF)は再生不良性貧血(AA)、赤芽球癆、骨髄異形成症候群(MDS)といった疾患を含む骨髄での後天性造血障害を共通の特徴とする難治性血液疾患である(図1)。クローン性造血と T 細胞が関与する免疫異常が BMF の血球減少の原因として重要で、AA と赤芽球癆では免疫抑制療法が標準治療であり、MDS の一部も免疫抑制療法が奏功する。免疫抑制療法を受けた BMF 例の一部は治療抵抗性で二次治療や造血幹細胞移植での治療が必要となり生命予後も不良となるが、治療反応性を予測する因子は十分明らかになったとはいえない。また再燃例も多いが、再燃の予測因子も不明である。

(2) T 細胞 LGL 白血病遺伝子変異と赤芽球癆

BMF に合併しやすい T 細胞大型顆粒リンパ球(LGL)白血病は、CD8 陽性 T 細胞がクローン性に増生する疾患で(図1)、研究代表者らは T 細胞 LGL 白血病的 5 割にシグナル伝達分子の *STAT3* 遺伝子変異を同定し、変異陽性例には赤芽球癆の合併が多かった(Ishida ら、Cancer Sci, 2014)。他の病型も含めて、更に赤芽球癆を調べたところ 43%に *STAT3* 変異陽性で特発性赤芽球癆や胸腺腫関連赤芽球癆にも *STAT3* 変異は陽性であり、*STAT3* 変異は CD8 陽性 T 細胞に認められた(Kawakami ら、Blood Adv, 2018)。一方、AA や MDS では検討症例数は限られるものの *STAT3* 変異陽性例はなかった。



以上より、*STAT3* 変異陽性 CD8 T 細胞は赤芽球癆の背景疾患を問わず認められることがわかり、臨床像の一部と関係していた。BMF では T 細胞の遺伝子変異像が疾患により異なり、T 細胞遺伝子変異が BMF の細胞性免疫異常や造血障害に関係する可能性が考えられた。

(3) 赤芽球癆を含め骨髄不全の T 細胞の遺伝子変異は *STAT3* 以外はわかっていない。

研究代表者らの検討で赤芽球癆の T 細胞に *STAT3* 体細胞変異を認めたが、BMF の T 細胞や他の血液細胞に *STAT3* 以外の遺伝子変異があるのか、は不明である。また、AA や MDS の骨髄系細胞にはエピゲノムやクロマチン修飾関連遺伝子群の変異が同定されている(Yoshizato ら、NEJM 2015)が、T 細胞を含め遺伝子変異像は十分明らかになったとはいえない。以上を背景に、細胞性免疫異常の制御が主たる治療法となっている BMF で、T 細胞の遺伝子変異像を明らかにすることは BMF の病態解明や適切な診断・分類・至適治療指標開発に有用と考えた。

そこで、本研究では細胞性免疫異常が造血障害の重要な原因となる骨髄不全症候群(BMF)の T 細胞遺伝子変異像にはどのような特徴があるか? T 細胞遺伝子変異像と疾患や病像とはどのような関係にあるか?を明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、赤芽球癆を含む骨髄不全症候群(BMF)症例の T 細胞を含む血液細胞の遺伝子変異を網羅的に解析することで遺伝子変異像を同定し、変異像と BMF の臨床病態や治療効果との関係を明らかにする。そして、遺伝子変異像を新規バイオマーカーとする BMF のより適切な個別化医療につなげることを目的とした。

近年、再生不良性貧血や骨髄異形成症候群では骨髄系細胞の特徴的な遺伝子変異像を呈するクローン性造血およびクローン進展との関連が明らかになってきたが、骨髄不全症候群のなかでも、特に赤芽球癆に関しては T 細胞異常との関係も含め不明な点が多い。本研究で BMF の疾患ごとの遺伝子変異像と臨床病態との関係が明らかになる。

BMF の T 細胞を含めた血液細胞の遺伝子変異像が明らかになることで、BMF の免疫異常に関する基礎的情報が得られ、BMF の、より適切な診断・分類および治療法選択のための指標を提供できる。T 細胞の遺伝子変異像がわかれば、T 細胞が関与するさまざまな自己免疫疾患の病態理解に貢献でき、T 細胞異常に対する新規の標的分子候補が同定できる可能性もあると考えている。

本研究では、骨髄不全症候群(BMF)、特に赤芽球癆の遺伝子変異を網羅的に調べ、BMF の T 細胞を含めた血液細胞での遺伝子変異像を明らかにし、遺伝子変異と臨床的特徴との関係を特定する。そして、T

細胞を含めた遺伝子変異像を新指標とする BMF の補助診断・分類法と治療指針を確立し、個別化医療に役立てることを目標とした。

3. 研究の方法

骨髄不全症候群のうち、細胞性免疫異常が関与する後天性赤芽球癆と再生不良性貧血を対象とした。健常者及び関連する疾患として LGL 白血病を対照群とした。末梢血・骨髄血から CD4T 細胞および CD8T 細胞をフローサイトメトリーで分取し、ゲノム DNA を抽出、ライブラリー調製し、Ion ampliSeq Technology で全エクソン解析を行った。設定したパイプラインによるデータ解析および多型の除外後、CD4T 細胞と CD8T 細胞の変異を比較し遺伝子変異部位と変異量を同定した。

同定した変異遺伝子群から遺伝子パネルを作成し、アンプリコン・シークエンス法で標的遺伝子解析して調べた。変異遺伝子候補を Sanger 法など他のプラットフォームで確認した。

一部の症例では末梢血より各血球分画を採取して亜分画ごとに遺伝子変異の有無を検討した。

各症例の遺伝子変異と年齢、性、病型、治療反応性、再燃などの臨床像との関係を統計学的に調べた。

本研究計画は本学遺伝子解析倫理委員会の審査承認を得て実施した。

4. 研究成果

(1) 赤芽球癆の T リンパ球の全エクソン解析

後天性赤芽球癆 9 例で末梢血より CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞分画を分取した。純度を確認後、ゲノム DNA を抽出し、全エクソン解析を行った。カバレッジ深度中央値は 84x であった。変異遺伝子数中央値は CD4 T 細胞, CD8 T 細胞でそれぞれ 37, 31 であった。CD8 T 細胞で 50%以上の症例に変異を認める遺伝子はなかった。CD8 T 細胞で変異し CD4 T 細胞で変異を認めない遺伝子を変異遺伝子候補として選出した。

(2) 骨髄不全症例での標的シークエンス解析

全エクソン解析で選択した変異遺伝子候補、エピゲノム修飾関連遺伝子をはじめとするクローン性造血 (CH) として報告される遺伝子、STAT3 などのシグナル伝達経路関連遺伝子、赤芽球癆や骨髄不全で変異の報告がある遺伝子より 52 遺伝子を選出し遺伝子パネルを作成した。後天性赤芽球癆 53 例と再生不良性貧血症例 10 例で抽出 DNA を用いて標的シークエンス法で遺伝子変異を調べた。カバレッジ深度は中央値 3,368 x で、検出遺伝子変異の偽陽性が高頻度の 2 遺伝子を除外し、残りの 50 遺伝子に関して更に検討した。STAT3, TET2 を含む 5 遺伝子で 20%以上の赤芽球癆症例で変異を認め、変異量の多い一部の変異部位に関しては Sanger 法で確認できた (図 2)。

そのうち、TET2 遺伝子に注目すると、TET2 遺伝子の変異部位は広く分布していたものの、骨髄不全症例に関する既報に比べ、N 末により近い部位の変異を多く認めた (図 3)。また、TET2 の変異部位のうち変異量が 40%を超える箇所に関して、非血液細胞で調べると同一の変異が検出され生殖細胞系列変異と考えられた。変異遺伝子や CH の種類は赤芽球癆の病型や免疫抑制療後の疾患予後と関連していた。また、赤芽球癆症例で高頻度に変異していた遺伝子は再生不良性貧血の一部では変異を認めたものの変異像のパターンとしては異なっており、赤芽球癆の遺伝子変異像は赤芽球癆の病態を特徴づける所見と考えられた。

それぞれの遺伝子及び

その変異との造血障害への影響、臨床的特徴や病型との関係は今後明らかにする必要がある。

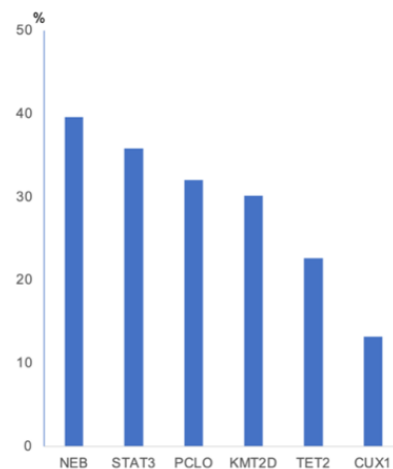


図2. 赤芽球癆での変異遺伝子。標的シークエンス法による。一部、変異や機能が未確定を含む。

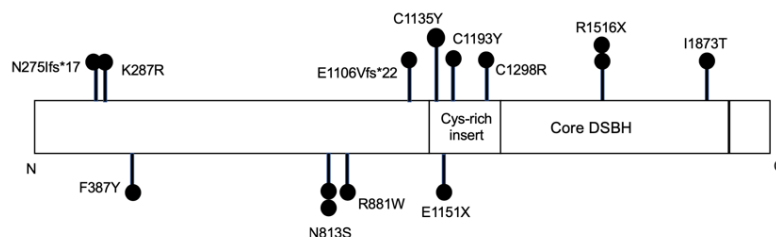


図3. 赤芽球癆症例で認めた TET2 変異部位。

3) LGL 白血病でのケモカイン遺伝子変異

本研究では LGL 白血病関連赤芽球癆が赤芽球癆の主たる 3 病型のひとつであること、また、STAT3 遺伝子変異が LGL 白血病で当初同定されていたことより赤芽球癆では LGL 白血病関連赤芽

球瘍症例を疾患群のひとつとし、また、赤芽球瘍を合併しない LGL 白血病を解析の対照群として調べていた。

ケモカインのひとつである *C-C motif chemokine ligand (CCL)22* に関しての体細胞性変異が NK 細胞型 LGL 白血病で同定 (Bear ら, Nature Genet 2022) されたことより、解析遺伝子パネルに *CCL22* を含めて検討したところ、NK 細胞型 LGL 白血病で *CCL22* 変異例を認めその変異は 45 番目のロイシンのミスセンス変異に集中していた。これは既報と同様の結果であったが、さらに一部の T 細胞 LGL 白血病症例にも *CCL22* 変異が認められて変異部位は異なっていた。また、そのうち一例では血球減少を認めていた。*CCL22* 変異陽性 NK 細胞型 LGL 白血病では血球減少を認める例はなく、*CCL22* 変異陽性 LGL 白血病と造血障害の関係も示唆される知見であり、現在更に検討している。

以上により、本研究で骨髄不全症候群、特に赤芽球瘍に関して STAT3 以外に特徴的な遺伝子変異像を認めることが明らかになり、少なくともその一部は臨床像と関係していた。これらの知見は赤芽球瘍を含めた骨髄不全症候群症例ないしはこれらが疑われる例での診断や病型分類に有用であり、また、骨髄不全の病態の理解および今後の治療法の選択とよりよい治療法開発のために貢献できる。

<引用文献>

Bear C, Kimura S, Rana M ら. CCL22 mutations drive natural killer cell lymphoproliferative diseases by desregulating microenvironmental crosstalk. Nature Genet 2022 54; 636-648.

Ishida F, Matsuda K, Sekiguchi N ら. STAT3 gene mutations and their associations with pure red cell aplasia in large granular lymphocyte leukemia. Cancer Sci 2014 105; 342-6.

Kawakami T, Sekiguchi N, Kobayashi J ら. Frequent STAT3 mutations in CD8+ T cells from patients with pure red cell aplasia. Blood Adv 2018 2; 2704-2712.

Yoshizato T, Dumitriu B, Hosokawa K ら. Somatic mutations and clonal hematopoiesis in aplastic anemia. N Eng J Med 2015 373; 35-47.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kawakami T, Nakzawa H, Ishida F.	4. 巻 59
2. 論文標題 Somatic mutations in acquired pure red cell aplasia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Seminars in Hematology	6. 最初と最後の頁 13136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.seminhematol.2022.07.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakazawa H, Sakai K, Ohta A, Fujishima N, Matsuda A, Hosokawa K, Nakamura F, Nakao S, Mitani K, Ishida F	4. 巻 6
2. 論文標題 Incidence of Acquired Pure Red Cell Aplasia: A Nationwide Epidemiologic Analysis with Two Registry Databases in Japan.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 6282-6290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2021006486.	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 -

1. 著者名 Kelkka T, Tyster M, Lundgren S, Feng X, Kerr C, Hosokawa K, Huuhtanen J, Keranen M, Patel B, Kawakami T, Maeda Y, Nieminen O, Kasanen T, Aronen P, Yadav B, Rajala H, Nakazawa H, Jaatinen T, Hellstrom-Lindberg E, Ogawa S, Ishida F, Nishikawa H, Nakao S, Maciejewski J, Young NS, Mustjoki S.	4. 巻 36
2. 論文標題 Anti-COX-2 Autoantibody is a Novel Biomarker of Immune Aplastic Anemia.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 2317-2327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-022-01654-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kawakami F, Kawakami T, Yamane T, Maruyama M, Kobayashi J, Nishina S, Sakai H, Higuchi Y, Hamanaka K, Hirokawa M, Nakao S, Nakazawa H, Ishida F	4. 巻 115
2. 論文標題 T cell clonal expansion and STAT3 mutations: a characteristic feature of acquired chronic T cell-mediated pure red cell aplasia.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 816-825
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-022-03310-2	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 -

1. 著者名 Bhattacharya D, Teramo A, Gasparini VR, Huuhtanen J, Kim D, Theodoropoulos J, Schiavoni G, Barila G, Vicenzetto C, Calabretto G, Facco M, Kawakami T, Nakazawa H, Falini B, Tiacci E, Ishida F, Semenzato G, Kelkka T, Zambello R, Mustjoki S	4. 巻 12
2. 論文標題 Identification of novel STAT5B mutations and characterization of TCR signatures in CD4+ T-cell large granular lymphocyte leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood Cancer J	6. 最初と最後の頁 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41408-022-00630-8	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 該当する

1. 著者名 Yamane T, Kawakami T, Sekiguchi N, Kobayashi J, Ueki T, Kobayashi H, Kawakami F, Nishina S, Sakai H, Oshimi K, Higuchi Y, Nakazawa H, Ishida F	4. 巻 190
2. 論文標題 High frequency of STAT3 gene mutations in T cell receptor (TCR) type T cell large granular lymphocytic leukaemia: implications for molecular diagnostics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 46 ~ 51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.16820	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujishima N, Kohmaru J, Koyota S, Kuba K, Saga T, Omokawa A, Moritoki Y, Ueki S, Ishida F, Nakao S, Matsuda A, Ohta A, Tohyama K, Yamasaki H, Usuki K, Nakashima Y, Sato S, Miyazaki Y, Nannya Y, Ogawa S, Sawada K, Mitani K, Hirokawa M	4. 巻 11
2. 論文標題 Clonal hematopoiesis in adult pure red cell aplasia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2253 (1~6)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-81890-5	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 -

1. 著者名 石田文宏	4. 巻 61
2. 論文標題 後天性赤芽球癆の病態と治療研究の進歩	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 92 ~ 98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 石田文宏
2. 発表標題 Molecular mechanisms of acquired pure red cell aplasia.
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川上徹、山根拓、川上史裕、丸山正恵、井田夏実、水野裕雅、朝倉亜美、仁科さやか、酒井均、樋口由美子、中澤英之、石田文宏
2. 発表標題 Mutational profiles of STAT3 and clonal hematopoiesis-related genes characteristic of acquired PRCA
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fumihiro Ishida
2. 発表標題 Clinical and pathophysiological features of acquired pure red cell aplasia
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Barila G, Teramo A, Cheson H, Calabretto G, Chahal J, Vienzetto C, Almeida J, Shemo B, Min S, Gasparini VR, Pavan L, Oshimi K, Sokol L, Ishida F, Lamy T, Orfao A, Morice WG, Loughran T, Semenzato G, Zambello R.
2. 発表標題 T-gamma/delta large granular lymphocyte leukemia identified a subset of patients with more symptomatic disease: Analysis of a collaborative international cohort of 130 patients
3. 学会等名 25th Congress of the European Hematology Association（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kawakami F, Kawakami T, Yamane T, Kobayashi J, Nishina S, Sakai H, Higuchi Y, Nakao S, Hirokawa M, Nakazawa H, Ishida F
2. 発表標題 Clonal T cells and STAT3 mutations in acquired pure red cell aplasia
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kawakami T, Yamane T, Kawakami F, Kobayashi J, Sekiguchi N, Nishina S, Sakai H, Higuchi Y, Nakazawa H, Ishida F
2. 発表標題 Specific immunophenotype of CD8+T cells in patients with refractory pure red cell aplasia
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ishida F
2. 発表標題 Recent progress in the diagnosis and management of acquired pure red cell aplasia.
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tanabe M, Hosokawa K, Imi T, Nakagawa N, Kawakami T, Ishida F, Nakazawa H, Nakao S.
2. 発表標題 CD5 down-regulation unique to STAT3-mutated CD8+T cells in PRCA patients associated with T-LGLL.
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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			
フィンランド	UNIVERSITY OF HELSINKI			
イタリア	UNIVERSITY OF PADOVA			