

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16302

研究課題名（和文）胸腺腫および関連自己免疫疾患におけるT細胞の網羅的遺伝子解析による免疫異常の解明

研究課題名（英文）Elucidation of immune abnormalities in thymoma and related autoimmune diseases through comprehensive genetic analysis of T cells

研究代表者

川上 徹（Kawakami, Toru）

信州大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50867041

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：以前の我々の研究結果をもとにして解析する遺伝子を絞りこみ、最終的に52遺伝子を対象とした遺伝子変異解析を行った。胸腺腫や関連する自己免疫疾患患者、のべ132人の血液から抽出したDNAを用いた。結果、クローン性造血（血液がんに関わる遺伝子変異が健常人にもみられる現象）に関わる遺伝子の変異が高頻度に認められた。クローン性造血関連遺伝子の変異をもつ患者では治療後に再発しやすい傾向がみられた。また、それらの変異遺伝子の中には、時間経過とともに変異が消失したり、逆に新たな変異を獲得するものがあり、難治化に関連していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、我々は胸腺腫と、合併する自己免疫疾患、主に赤芽球癆における遺伝子変異の詳細を明らかにした。クローン性造血は血液がんのみならず、心血管疾患、再生不良性貧血などとも関連があるとされるが、胸腺腫や赤芽球癆でも関連があることが示唆された。また、一部のクローン性造血関連遺伝子の変異は患者の治療抵抗性に関連していたが、これらの遺伝子が胸腺腫や、関連する自己免疫疾患の新たな治療標的の候補となる可能性も考えられた。

研究成果の概要（英文）：We selected 52 genes to be analyzed based on our previous research. We used DNA extracted from the blood of a total of 132 patients with thymoma and related autoimmune diseases. As a result, mutations in genes related to clonal hematopoiesis (a phenomenon in which genetic mutations related to blood cancer are also observed in healthy people) were observed at a high frequency. Patients with mutations in clonal hematopoiesis-related genes were more likely to relapse after treatment. Additionally, some of these mutated genes lose their mutations over time, or conversely acquire new mutations, which are thought to be related to refractoriness.

研究分野：血液学

キーワード：クローン性造血 胸腺腫 赤芽球癆

1. 研究開始当初の背景

【胸腺腫には自己免疫疾患がしばしば合併する】

胸腺腫は胸腺の上皮に由来する腫瘍で、本邦では1年間に約1300人が発症する。重症筋無力症、多発性筋炎、全身性エリテマトーデス、橋本病、赤芽球癆といった種々の自己免疫疾患を約50%に合併し、自己免疫疾患発症が契機となって胸腺腫が発見されることも多く、合併する自己免疫疾患は治療を要し、しばしば難治性である。

胸腺腫に合併した自己免疫疾患は胸腺腫切除により改善することがある一方で、胸腺腫切除後に年余を経てから自己免疫疾患を発症することもある。胸腺はT細胞の分化と機能獲得に必須の器官であり、胸腺腫および合併する自己免疫疾患の背景として、胸腺髄質上皮細胞の autoimmue regulator (AIRE) 遺伝子発現異常に基づくT細胞の免疫寛容機構破綻によって生ずる免疫異常が想定されているが (Weksler B Lu B. J Thorac Oncol. 2014)、胸腺腫に伴う免疫異常にはいまだ不明な点が多い。

【赤芽球癆を合併した胸腺腫にはT細胞異常がある】

後天性赤芽球癆は赤血球造血が選択的に障害され、重篤な貧血を呈する難治性血液疾患である。細胞性免疫異常が主に関与し、免疫抑制療法が標準治療法である。

研究代表者は赤芽球癆の病態を知るためにT細胞の異常に着目して研究した。赤芽球癆42例中の43%でT細胞にシグナル伝達分子の *STAT3* の体細胞活性化型遺伝子変異を認め、CD8陽性T細胞のみが *STAT3* 変異陽性であった。赤芽球癆には特発性、大顆粒リンパ球白血病(LGLL)、胸腺腫、自己免疫疾患などさまざまな背景疾患があるが、*STAT3* 変異陽性T細胞はLGLLだけでなく、特発性や胸腺腫関連の赤芽球癆にも認めた(Kawakami T, et al. Blood Adv. 2018)。さらに、*STAT3* 変異陽性例は免疫抑制療法に抵抗性であった。また、*STAT3* 変異陽性T細胞を有する赤芽球癆合併胸腺腫症例のCD8陽性T細胞にT細胞受容体レパトアの偏りを認めた。以上より、胸腺腫関連赤芽球癆には *STAT3* 変異を伴うクローン性T細胞が存在し病態に関与する可能性があることを初めて示した。

【胸腺腫におけるT細胞遺伝子変異】

赤芽球癆を伴う胸腺腫でT細胞に *STAT3* 変異があり、T細胞受容体レパトアに偏りを認めたため、自己免疫疾患を伴う胸腺腫では体細胞遺伝子変異を持つクローン性T細胞が存在する可能性を考えた。胸腺腫症例3例を追加して調べたところ、1例のT細胞に *STAT3* 変異を認めた(未発表データ)。この結果より胸腺腫に伴う自己免疫疾患の病態に、*STAT3* を含めた体細胞遺伝子変異をもつT細胞が関与する可能性が示唆された。

そこで、赤芽球癆を合併した胸腺腫症例5例で末梢血のCD4陽性T細胞とCD8陽性T細胞を分取し、全エクソン解析を行った。CD8陽性T細胞にはシグナル伝達、細胞周期などに関連するタンパクにアミノ酸置換を伴う、平均して症例あたり9つの遺伝子変異が同定された。CD4陽性T細胞にも遺伝子変異はあり、CD8陽性細胞とは異なるプロファイルを示していた。

以上より、赤芽球癆をはじめとする胸腺腫に伴う自己免疫疾患の病態を明らかにするための網羅的遺伝子解析の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、胸腺腫症例を対象にT細胞の網羅的遺伝子解析を行い、その遺伝子変異プロファイルを明らかにする。抽出した変異プロファイルと胸腺腫の臨床像との関連を明らかにし、胸腺腫および合併する自己免疫疾患の診断および治療の新規指標を確立して、胸腺腫と関連する自己免疫疾患のより適切な診療につなげることを目指す。

3. 研究の方法

先行研究の全エクソン解析で同定した、細胞シグナル伝達、細胞増殖、細胞周期関連といった変異遺伝子群を含む、遺伝子解析パネルを作成する。胸腺腫症例の末梢血単核球からDNAを抽出し、ライブラリ化し、ターゲットシーケンスを行う。リファレンス配列へのマッピング、変異検出の後、エラーと考えられる変異を慎重に除外することで、体細胞遺伝子変異を検出する。変異アリル頻度が高い変異については、ダイレクトシーケンス法などで確認する。

経時的に検体が得られる症例では変異プロファイルの変化を比較する。

変異検出率・変異量と合併する自己免疫疾患や治療の有無を調べる。遺伝子変異プロファイルと臨床像を照合し、各種自己免疫疾患、治療法と有効性との関連を統計学的に検定する。比較対照として、健常人数例を解析に含める。

以上により、遺伝子変異プロファイルを解析して胸腺腫に伴う自己免疫異常の病態を明らかにする。そして、胸腺腫と関連自己免疫疾患の診療に有用な新規指標を確立する。

4 . 研究成果

先行研究において CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞に分けて全エクソン解析を行い、結果を比較することで CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞それぞれに特徴的な遺伝子群を同定していたが、それに細胞シグナル伝達、細胞増殖、細胞周期といった機能に関連する遺伝子や T 細胞性リンパ腫、クローン性造血などに重要な影響をもつと考えられる遺伝子等を加え、52 遺伝子からなる遺伝子解析パネルを作成した。

続いて、胸腺腫を含む、のべ 132 症例の末梢血単核球から DNA を抽出し、作成したパネルを用いてライブラリ化し、ターゲットシーケンスを行った。変異アリル頻度が高い遺伝子についてはダイレクトシーケンスで確認を行った。以前の研究と結果を比較し、解析方法の妥当性を確認した。遺伝子多型やエラーと考えられる変異の除去を行った結果、各症例ごとに中央値で 3 個の体細胞遺伝子変異を同定した。STAT3 遺伝子を含む 41 遺伝子が複数症例で変異していた。注目すべき点として、クローン性造血に関わる複数の遺伝子の変異が高頻度に認められた。赤芽球を合併した胸腺腫では他の病型と比較し、変異遺伝子数が少ない傾向があった。一部のクローン性造血関連遺伝子の変異陽性例では免疫抑制療法後に再発しやすい傾向がみられた。また、クローン性造血関連遺伝子の中には経過とともに変異が消失したり、逆に新たな変異を獲得したりするものがあつた。STAT3 遺伝子だけでなく、クローン性造血関連遺伝子の変異が胸腺腫、特に赤芽球癆合併例の難治化に関連していると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kawakami Toru, Nakazawa Hideyuki, Ishida Fumihiro	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 131 ~ 136
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 Hideyuki, Sakai Kaoko, Sudo Yuriko, Iwabuchi Ryohei, Sakai Hitoshi, Nishina Sayaka, Kawakami Toru, Kawakami Fumihiro, Matsuzawa Shuji, Ito Toshiro, Kitahara Mari, Kamiyo Yuji, Umemura Takeji, Ushiki Atsuhito, Kanai Shinichiro, Tsuchiya Hiroyuki, Ishida Fumihiro	4. 巻 75
2. 論文標題 Comparative analysis of humoral responses to BNT162b2 vaccine among patients with hematologic disorders and organ transplant recipients.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Transplant Immunology	6. 最初と最後の頁 101713 ~ 101713
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.trim.2022.101713	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 Kelkka Tiina, Tyster Mikko, Lundgren Sofie, Feng Xingmin, Kerr Cassandra, Hosokawa Kohei, Huuhtanen Jani, Keranen Mikko, Patel Bhavisha, Kawakami Toru	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 Fumihiro, Kawakami Toru, Yamane Taku, Maruyama Masae, Kobayashi Jun, Nishina Sayaka, Sakai Hitoshi, Higuchi Yumiko, Hamanaka Kazutoshi, Hirokawa Makoto, Nakao Shinji, Nakazawa Hideyuki, Ishida Fumihiro	4. 巻 -
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 -
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 Hideyuki, Yamaguchi Tomomi, Sakai Hitoshi, Maruyama Masae, Kawakami Toru, Kawakami Fumihiro, Nishina Sayaka, Ishikawa Masumi, Kosho Tomoki, Ishida Fumihiro	4. 巻 114
2. 論文標題 A novel germline GATA2 frameshift mutation with a premature stop codon in a family with congenital sensory hearing loss and myelodysplastic syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 286 ~ 291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-021-03130-w	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 Bhattacharya Dipabarna, Teramo Antonella, Gasparini Vanessa Rebecca, Huuhtanen Jani, Kim Daehong, Theodoropoulos Jason, Schiavoni Gianluca, Baril, Gregorio, Vicenzetto Cristina, Calabretto Giulia, Facco Monica, Kawakami Toru, Nakazawa Hideyuki, Falini Brunangelo, Ishida Fumihiro, Satu Mustjoki ら	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 Journal	6. 最初と最後の頁 -
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 Huuhtanen Jani, Bhattacharya Dipabarna, Lonnberg Tapio, Kankainen Matti, Kerr Cassandra, Theodoropoulos Jason, Rajala Hanna, Gurnari Carmelo, Kasanen Tiina, Braun Till, Ishida Fumihiro, Kawakami Toru, Salmi Marko, Loughran Thomas, Maciejewski Jaroslaw P., Lahdesmaki Harri, Kelkka Tiina, Mustjoki Satu ら	4. 巻 13
2. 論文標題 Single-cell characterization of leukemic and non-leukemic immune repertoires in CD8+ T-cell large granular lymphocytic leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-29173-z	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

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Toru Kawakami, Taku Yamane, Fumihiro Kawakami, Masae Maruyama, Natsumi Ida, Yuga Mizuno, Ami Asakura, Sayaka Nishina, Hitoshi Sakai, Yumiko Higuchi, Hideyuki Nakazawa, Fumihiro Ishida
2. 発表標題 Characteristic mutational profiles of STAT3 and clonal hematopoiesis-related genes in 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 ~ 2023年

1. 発表者名 Fumihiro Kawakami, Toru Kawakami, Taku Yamane, Jun Kobayashi, Sayaka Nishina, Hitoshi Sakai, Yumiko Higuchi, Makoto Hirokawa, Shinji Nakao, Hideyuki Nakazawa, Fumihiro Ishida
2. 発表標題 Clonal T-cell expansion and STAT3 mutations in T-cell mediated acquired pure red cell aplasia
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------