

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390243

研究課題名(和文)再生不良性貧血におけるゲノム異常を利用した造血抑制因子の同定

研究課題名(英文) Identification of myelosuppressive cytokines taking advantage of genomic abnormalities of leukocytes in patients with aplastic anemia

研究代表者

中尾 眞二 (Nakao, Shinji)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：70217660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：再生不良性貧血(再不貧)においてクローン性造血の原因遺伝子を同定するため、多数例の末梢血DNAを次世代シーケンサーで解析した。その結果、全体の40%に何らかのゲノム異常が検出された。頻度の高い変異はDNMT3A、ASXL1などのMDSでしばしば検出される遺伝子変異であった。変異遺伝子のうち、PIGAとBCOR/BCOR1の存在は、免疫抑制療法に対する高反応性と相関していた。一方、第6染色体短腕の片親性二倍体(6pUPD)により、HLA-B*40:02を欠失した血球を持つ再不貧患者のTリンパ球から、HLA-B61拘束性に造血前駆細胞を傷害する細胞傷害性T細胞の分離に成功した。

研究成果の概要(英文)：To determine genomic abnormalities responsible for clonal hematopoiesis in patients with aplastic anemia (AA), we analyzed peripheral blood DNA from 159 patients with aplastic anemia using a next generation sequencer. At least one gene abnormality was detectable in approximately 40% of the patient. Recurrent abnormalities included those of DNMT3 and ASXL1 that were often detected in patients with myelodysplastic syndrome (MDS). However, the presence of PIGA and BCOR/BCOR1 abnormalities were rather associated with good response to immunosuppressive therapy than the risk of evolving into MDS. In another attempt to clarify the immune mechanism of AA, we successfully isolated a cytotoxic T cell clone from an AA patient with uniparental disomy of chromosome 6p, which killed hematopoietic progenitor cells in a resitricted manner by HLA-DRB1*40:02.

研究分野：血液内科学

キーワード：再生不良性貧血 クロナリティ 免疫抑制療法 細胞傷害性T細胞 片親性二倍体

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1) 再生不良性貧血(以下再不貧)における骨髓不全は、造血幹細胞に対する免疫学的攻撃によって起こると想像されているが、実際の造血抑制機序はほとんど分かっていない。われわれは、患者白血球のゲノムコピー数解析によって、特発性再不貧においても、6番染色体短腕 HLA領域の loss of heterozygosity (6pLOH) を始めとする様々な変異を持つ幹細胞が造血を支持しており、その変異(+)幹細胞は抑制できないが、変異(-)幹細胞は抑制する結果、変異(+)幹細胞の増殖を招くという性質の何らかの因子が、再不貧における造血抑制の主役であることを2011年に明らかにした。免疫抑制療法によって改善した患者末梢血白血球のゲノムをさらに詳細に解析することによって、このようなエスケープ造血の原因となる造血幹細胞のゲノム変異を同定できれば、再不貧を引き起こす液性因子を同定できる可能性がある。

2) 再不貧における造血抑制の免疫学的機序としてもっともよく知られているのが、細胞傷害性T細胞(CTL)による造血幹細胞の傷害である。ただし、その実態については全く分かっていない。6pLOH陽性の再不貧患者末梢血には、6pLOHによって欠失したHLAクラスIによって提示される自己抗原に特異的なCTLが存在しているはずである。6pLOH陽性患者においてもっとも欠失頻度が高いHLA-B*40:02を保有している患者を対象とすれば、このHLA-B抗原(B61)拘束性に造血幹細胞を傷害するCTLが単離できる可能性が高い。

2. 研究の目的

1) エスケープ造血の原因となるPIGA変異、6pLOH以外のゲノム変異を同定するため、再不貧患者末梢血由来のDNAを次世代シーケンサーで網羅的に解析する。

2) 6pLOHによりHLA-B*40:02を欠失した白血球を持つ患者のリンパ球を、HLA-B*40:02導入K562細胞で刺激することにより、このHLA-B抗原特異的にK562細胞を傷害するCTLを単離する。

3. 研究の方法

1) 免疫病態の関与が濃厚なPNH型血球陽性再不貧患者12例の末梢血白血球からDNAを抽出し、全エクソームシーケンシングを行った。また、これら10例を含む159症例の末梢血DNAを対象として、骨髓系腫瘍で変異頻度の高い106個の遺伝子を標的とするターゲットシーケンシングを行った。

2) 患者末梢血単核細胞をHLA-B*40:02導入K562細胞で刺激後、限界希釈法によりT細胞クローンを得た。

4. 研究成果

1) 全症例において1-14種類のゲノム変異が検出された。このうち、骨髓異形成症候群(MDS)で検出されるASXL1、BCOR/BCOR1、DNMT3A、PIGA以外には3症例でRUNX1とU2AF1、2症例でTET2、ITGA1及びJAK2が検出された。しかし、これらの既知の変異以外に、エスケープ造血に関与していると思われる新たな変異は同定されなかった。一方、ターゲットシーケンスでは、図1に示す様々な変異が約40%の症例で検出された。

このうち重症例を対象とした解析では、BCOR/BCORL1変異陽性例は陰性例に比べて長

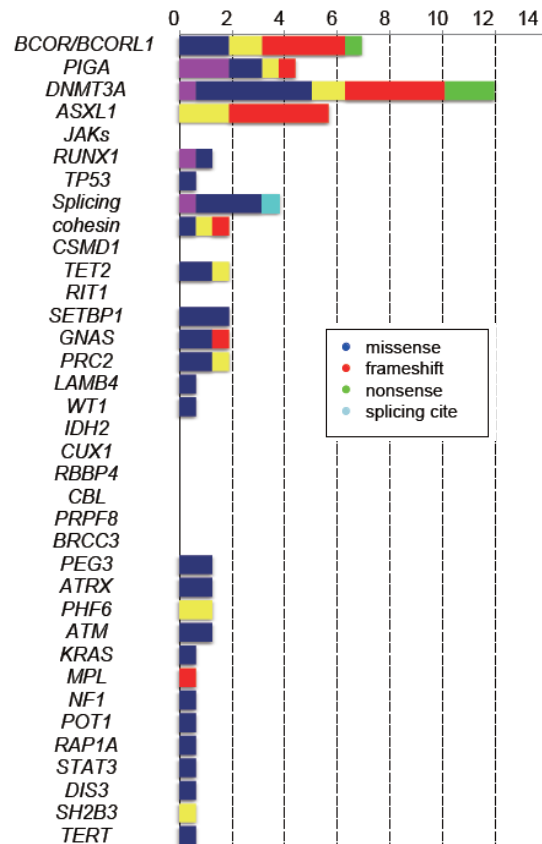


図1 再生不良性貧血症例に検出されたゲノム異常

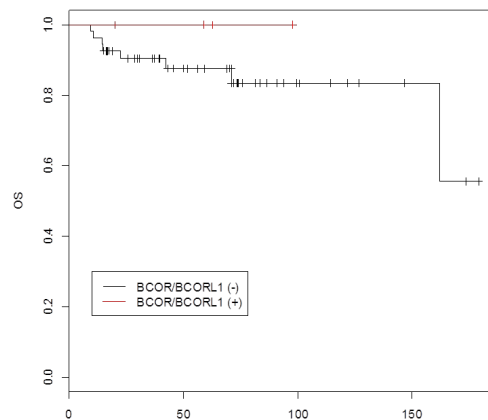


図2 BCOR/BCORL1変異有無別にみた再不貧症例の生存率

期予後が良い傾向がみられた(図2)。ただし、今回の解析対象には、治療前から治療後にかけて経時的に検索し得た例が少数し含まれていなかったため、これらのゲノム変異が再不発の予後に及ぼす影響は不明であった。今後は前向き臨床試験において、ゲノム変異の意義を明らかにする予定である。

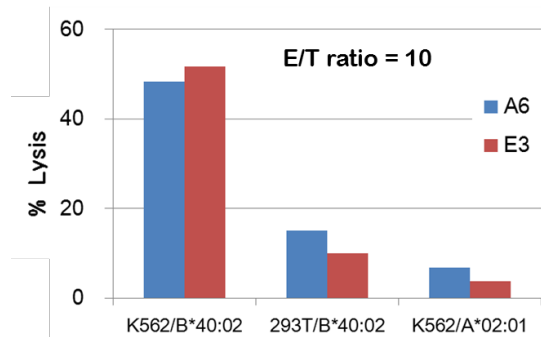


図3. 2種類のCTLクローンA6、E3の細胞傷害性両者ともにHLA-B*40:02導入K562細胞に対しては細胞傷害性を示したが、A*02:01導入K562細胞やHLA-B*40:02導入胎児腎細胞株293Tは傷害しなかった。

2) T細胞レセプター鎖のV領域によって識別される2種類のCTLクローン(A6及びE3)が樹立された。これらはHLA-B*40:02導入K562細胞を用量依存的に傷害したが、A*02:01導入K562細胞やHLA-B*40:02導入胎児腎細胞株293Tに対しては細胞傷害性を示さなかった(図3)。CTLクローンA6は、HLA-B*40:02陽性健常者骨髄由来CD34陽性細胞の液体培養における成熟血液細胞の誘導と、同じCD34陽性細胞による造血前駆細胞コロニー形成を抑制した。A6のT細胞レセプターBV領域のcDNAに特異的なプライマーを設計し、保存血液中のA6の割合を半定量したところ、ATG療法後の寛解期の異なる時期において、0.1~0.01%のA6が存在していることが示された。A6の認識する抗原については、現在K562由来のcDNAライブラリーを用いてスクリーニング中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計3件)

1. Yoshizato T, Dumitriu B, Hosokawa K, Makishima H, Yoshida K, Townsley D, Sato-Otsubo A, Sato Y, Liu D, Suzuki H, Wu C, Shiraishi Y, Clemente MJ, Kataoka K, Shiozawa Y, Okuno Y, Chiba K, Tanaka H, Nagata Y, Katagiri T, Kon A, Sanada M, Scheinberg P, Miyano S, Maciejewski JP, Nakao S, Young NS, Ogawa S. Somatic mutations and clonal hematopoiesis in aplastic anemia, *N Eng J Med*, 査読有, in press.
2. Inaguma Y, Akatsuka Y, Hosokawa K, Maruyama H, Okamoto A, Katagiri T, Shiraishi K, Murayama Y, Tsuzuki-Iba S,

Mizutani Y, Nishii C, Yamamoto N, Demachi-Okamura A, Kuzushima K, Ogawa S, Emi N, Nakao S. Induction of HLA-B*40:02-restricted T cells possessing cytotoxic and suppressive functions against hematopoietic progenitor cells from a patient with severe aplastic anemia. *Br J Haematol*, 査読有, in press.

DOI: 10.1111/bjh.13464

3. Hosokawa K, Sugimori N, Katagiri T, Sasaki Y, Saito C, Seiki Y, Mochizuki K, Yamazaki H, Takami A, Nakao S. Increased glycosylphosphatidylinositol-anchored protein-deficient granulocytes define a benign subset of bone marrow failures in patients with trisomy 8. *Eur J Haematol*, 査読有, in press.
- DOI: 10.1111/ejh.12484.

〔学会発表〕(計2件)

1. Yoshitaka Zaimoku, Hiroyuki Maruyama, Kana Maruyama, Takamasa Katagiri, An T. T. Dao, Hiroyuki Takamatsu, Hirohito Yamazaki, Koichi Kashiwase and Shinji Nakao: Evidence that HLA-B*40:02 and HLA-A*31:01 are strongly involved in the presentation of autoantigens to CTLs responsible for the development of acquired aplastic anemia: Poster Session, #2948: The American Society of Hematology 56th Annual Meeting, December 7, 2014. Moscone Center, San Francisco, California, USA.
2. Tetsuichi Yoshizato, Bogdan Dumitriu, Kohei Hosokawa, Hideki Makishima, Kenichi Yoshida, Yusuke Okuno, Kenichi Chiba, Hiroko Tanaka, Yuichi Shiraishi, Yasunobu Nagata, Takamasa Katagiri, Ayana Kon, Michael Clemente, Masashi Sanada, Satoru Miyano, Shinji Nakao, Jaroslaw Maciejewski, Neal Young, Seishi Ogawa: Complete chronological history of clonal evolution in sMDS from acquired aplastic anemia: Plenary Session, LP-1, 第76回日本血液学会学術集会 2014年11月1日. 大阪国際会議場(大阪府大阪市).

6. 研究組織

(1)研究代表者

中尾 眞二 (NAKAO, Shinji)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号: 70217660

(2)研究分担者

赤塚 美樹 (AKATSUKA, Yoshiki)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号: 70333391

(3)連携研究者

松井 啓隆 (MATSUI, Hirotaka)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・准
教授
研究者番号：60379849

高松 博幸 (TAKAMATSU, Hiroyuki)
金沢大学・医学系・助教
研究者番号：70401932

西内 巧 (NISHIUCHI, Takumi)
金沢大学・学際科学実験センター・准教授
研究者番号：20334790