

201024062A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

不応性貧血の治癒率向上を目指した分子・免疫病態研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小川 誠司

平成 23(2011) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

不応性貧血の治癒率向上を目指した分子・免疫病態研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小川 誠司

平成 23(2011)年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	
不応性貧血の治癒率向上を目指した分子・免疫病態研究に関する研究 東京大学医学部附属病院がんゲノミクスプロジェクト 小川誠司	1
II. 分担研究報告	
1. 次世代シーケンス技術を活用したMDSの新規原因遺伝子の同定 東京大学医学部附属病院がんゲノミクスプロジェクト小川誠司	12
2. 「MDSにおける末梢遊離DNAを用いた遺伝子変異及びエピジェネティクス異常解析」に関する研究 名古屋大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科学 直江知樹	14
3. 6番染色体短腕のuniparental disomyによるHLA欠失血球の出現：骨髄不全の免疫病態との関係 金沢大学医薬保健研究域医学系細胞移植学 中尾眞二	16
4. TAMRA-MBD2を用いた脱メチル化剤効果予測法の開発 東京医科大学 血液内科・呼吸器内科学講座 大屋敷一馬	18
5. 骨髄異形成症候群の遺伝子解析を目的とした検体集積に関する研究 京都大学医学研究科血液・腫瘍内科学 石川 隆之 高折 晃史	20
6. 不応性貧血の治癒率向上を目指した分子・免疫病態研究 広島大学原爆放射線医科学研究所 稲葉俊哉	23
7. 骨髄異形成症候群における20q欠失領域の解析 東京女子医科大学血液内科 泉二登志子	25
8. MDSの原因候補miR-9の赤芽球分化に果たす役割 獨協医科大学 内科学（血液・腫瘍） 三谷絹子	27
9. 骨髄異形成症候群におけるDNA修飾に関する研究 筑波大学大学院 人間総合科学研究科 千葉滋	29
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	33
IV. 研究成果の刊行物・別刷	39

I . 総括研究報告

不応性貧血の治癒率向上を目指した分子・免疫病態研究

研究代表者 小川誠司 東京大学 キャンサーボード がんゲノミクスプロジェクト

研究要旨

不応性貧血（骨髄異形成症候群、MDS）は高齢者に好発する難治性造血器疾患であるが、形態異常を伴う血球産生異常が共通に認められる一方、一部には免疫抑制療法が有効な自己免疫機序が主体となる病態も存在する。治療成績の向上の観点からは、この多様な病態を明らかにした上で、個々の病態に即した分子標的療法を含む治療戦略を構築することが重要である。本研究班は、MDSの多様な分子病態を明らかとすることを目的に、1) MDS 検体集積事業、2) MDS におけるエピゲノム異常の解析、3) miRNA の発現異常の解析、4) 次世代シーケンス技術を活用した網羅的な変異遺伝子探索、5) 骨髄不全における免疫病態研究を推進している。1) においては、2005年8月より「骨髄異形成症候群に対する病態解明・治療法の開発に関する研究班」によって行われてきた検体集積事業を発展的に継続するものであり、今年度は研究計画書の改訂と倫理委員会への申請・承認手続きと、承認後の検体集積のための体制作りが進められた。前班より引き継いで集積された検体数は計125例を超えている。2) においては、脱メチル化剤の導入によりMDS治療が大きく変貌しつつある中、脱メチル化剤の効果判定・予測に有用な解析法の開発が望まれ、全ゲノムDNAメチル化解析が可能なSingle molecule methylation assay (SMMA)法を開発した。また、検体の採取が簡便である末梢血の血漿・血清より遊離DNAを採取し、特定遺伝子プロモーターのメチル化状態を半定量的に検出することで、経時的な解析も容易とした。さらには脱メチル化剤である5-azaの標的因子の同定を次世代シーケンサにより試みた。5-aza投与によりK562細胞のヘモグロビンの生産量が増加するが、脱メチル化によりelongation factorのひとつが転写増加することが、ヘモグロビンの翻訳効率を増加させていることを見いだした。TET2変異の同定により、ヒドロキシメチル化のMDS病態への関与が推察されているが、MDS患者の骨髄単核球でヒドロキシメチルシトシン (5hmC) 量は、健常人と比べ有意に少ないことを明らかとした。また白血病細胞株に変異TET2を導入すると、5hmC量は減少し、細胞増殖能が亢進することが確認された。3) においては、MDSの重要な標的分子である*RUNX1*のmRNAに結合配列を有するmiR-9の発現が約1割の症例で亢進しており、miR-9安定発現細胞株では赤芽球分化能が抑制されていることを明らかとした。4) においては、網羅的な新規変異遺伝子の探索を目的に、次世代シーケンサによる20例のMDSの全エクソン・シーケンスを行い、約200個のMDSクローン特異的（体細胞）変異を同定した。また20番長腕の共通欠失領域の標的遺伝子の探索により標的候補遺伝子が見出されている。5) においては、再生不良性貧血患者306例をSNPアレイで解析したところ、6番染色体短腕(6p)のHLA遺伝子領域を含むuniparental disomy (UPD)が13%の症例に認められ、造血幹細胞上の特定のHLAによって提示されるCTLが骨髄不全の発症に関与し、一部の例では、HLA欠失のためCTLの攻撃を免れた6pUPD陽性造血幹細胞がクローン性に造血を支持していると考えられた。

研究分担者

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">・直江 知樹
名古屋大学大学院医学系研究科
血液・腫瘍内科学 教授・中尾眞二
金沢大学医薬保健研究域医学系
細胞移植学 教授・大屋敷一馬
東京医科大学
血液内科・呼吸器内科学講座 教授・高折 晃史
京都大学医学研究科
血液・腫瘍内科学 教授 | <ul style="list-style-type: none">・稲葉 俊哉
広島大学
原爆放射線医科学研究所 教授・泉二 登志子
東京女子医科大学
血液内科 教授・三谷 絹子
獨協医科大学
内科学（血液・腫瘍） 教授・千葉 滋
筑波大学大学院
人間総合科学研究科 教授 |
|---|--|

A. 研究目的

不応性貧血（骨髄異形成症候群 MDS）は高齢者に好発する難治性造血器疾患であるが、高齢者に適した根治的治療がなく、急速な少子高齢化による患者数の増加も危惧される。MDS では形態異常を伴う血球産生異常が共通に認められる一方、一部には免疫抑制療法が有効な自己免疫機序が主体となる病態も存在する。治療成績の向上の観点からは、この多様な病態を明らかにした上で、個々の病態に即した分子標的療法を含む治療戦略を構築することが重要である。

そこで本研究班では、MDS 研究の基盤となるリソースバンクの一相の拡充と、これを用いた先端的なゲノム・エピゲノム解析、免疫病態解析を通じ、MDS の多様な病態とその責任となる分子病態を明らかにすることにより、新規治療薬剤・診断技術の開発の基盤を構築し、現時点における合理的な治療法選択のための指標を作成することにより、MDS の治療成績の向上に資することを目的とする。

B. 研究方法

1) 検体集積事業（高折・三谷）

「特発性造血障害に関する調査研究班」および「不応性貧血の治療率向上を目指した分子・

免疫病態研究班」参加施設より、東日本バンク（獨協医科大学血液内科）および西日本バンク（京都大学血液腫瘍内科）に骨髄異形成症候群患者の骨髄液が提供された。これらの検体は単核球分離後、一部の細胞から DNA を抽出し、残りの細胞は凍結保存された。これらの一部は、前研究から開始されている高密度 SNP アレイによるゲノム解析に用いられた。また、本年度は研究計画書の改訂作業と、研究参加各施設の倫理委員会への申請・承認といった手続き、および、承認後の大規模な検体集積のためのバンクの体制作りが進められた。

2) MDS におけるエピゲノム異常の解析研究

A. TAMRA-MBD2 を用いた脱メチル化剤効果予測法の開発（大屋敷）

メチル化 DNA と結合する methylation binding domain-1 (MBD2) を蛍光色素 TAMRA で標識し、1分子蛍光分析システム(MF20)を用いて、拡散分光を測定することにより DNA メチル化状態を半定量的に検出した。Single molecule methylation assay (SMMA)法として人工的にメチル化した DNA と TAMRA 標識 MBD-2 を反応させ、拡散時間よりメチル化状態を計測した。さらに、SMMA 法による脱メチル化剤(5'-azacytidine および decitabine)

添加による白血病細胞株の全ゲノム脱メチル化状態を解析した。

B. MDS における末梢遊離 DNA を用いた遺伝子変異及びエピジェネティクス異常解析(直江)
MDS患者の骨髓細胞を用いたSNPアレイ解析にて異常を認められた症例からTET2遺伝子変異を同定した。骨髓細胞を抗CD34, 抗CD38抗体を用いて各分画にソーティングし、それぞれの分画に存在するTET2遺伝子変異の割合を解析した。また経時的に採取された骨髓検体を用いて、同様の検討を行った。また、血漿・血清遊離DNAを用いてTET2遺伝子変異をパイロシーケンス法にて検討した。さらに、*p15*遺伝子プロモータを用いたメチル化解析を、骨髓細胞と血漿・血清遊離DNAを用いて行い、比較検討をした。

C. 骨髓異形成症候群におけるDNA修飾に関する研究(千葉)

5名のMDS患者骨髓細胞におけるDot-Blot法によりヒドロキシメチルシトシン(5hmC)量を測定し、正常コントロールやMDS以外の造血器腫瘍細胞などにおける5hmC量と比較した。また、*TET2* 遺伝子のノックダウンマウスおよびコントロールマウス骨髓よりLin⁻細胞をMACSにより分取後、同様に5hmCを定量した。さらに、AML細胞株に*TET2*変異体を導入した安定細胞株を作製し、hmCの定量および細胞増殖をMTT法により測定した。

D. 次世代シーケンサを用いたエピゲノム異常解析(稲葉)

K562細胞を脱メチル化剤である5-aza存在下に培養すると、赤血球系への分化が観察されるが、5-aza処理に伴うメチル化および遺伝子発現の変化の解析を、次世代シーケンサを用いて行った。解析細胞から抽出したゲノムDNAを破碎後、GST-MBP(メチル化シトシン結合蛋白質)によりメチル化DNAを単離した。同時にmRNAを分離してcDNAを合成し、いずれもイルミナ社の高速並列シーケンサにより配列を決定し、ゲノムシーケンサ上に貼付けて、網羅的DNAメチル化解析とトランスクリプトーム解析を行った。

3)miRNAの発現異常の解析(三谷)

Green fluorescent protein (GFP) 遺伝子の下流にmiR-9遺伝子を組み込んだ発現ベクター(pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-9)をUT-7/GM細胞に遺伝子導入し、miR-9安定発現株を樹立した。コントロール細胞とmiR-9安定発現株をエリスロポエチン存在下で培養し、ヘモグロビン合成の指標であるベンチジン陽性細胞の出現率を比較検討した。さらにヘモグロビン合成に必須な*ALAS-E*およびβ-グロビン遺伝子の発現レベルを定量PCRで解析した。

4)次世代シーケンサ技術を活用した網羅的な変異遺伝子探索

A. 全エクソン・シーケンスによる新規変異遺伝子の探索(小川)

骨髓単核球および末梢血より純化したTリンパ球を正常細胞として解析を行った。全ゲノムよりエクソン領域をアジレント社SureSelectキットにより濃縮し、イルミナ社のGenome Analyzerを用いて配列決定を行った。得られた配列情報をヒトゲノムの標準配列に合わせてゲノム上の位置を決定した後に、標準配列と異なる塩基もしくは配列を変異候補として抽出した。抽出された変異候補のうち、SNPデータベースに登録がなく、Tリンパ球においては存在しない配列をMDS細胞特異的(後天的)変異候補とし、サンガーシーケンスにより変異の確認を行った。

B. 20番長腕欠失の標的遺伝子の探索(泉二)
アレイCGH法を用いて、9例の20番染色体に欠失を有する症例の共通欠失領域を同定したのち、同領域内に存在する約200の遺伝子のうち、がん抑制(候補)遺伝子ならびに腫瘍細胞の増殖、分化との関連が示されている32の遺伝子について、次世代シーケンサー(ABI社SOLiD)を使用してシーケンスを行い、変異の有無を検討した。

5)骨髓不全における免疫病態研究(中尾・小川)
「免疫病態の関与が濃厚な」再生不良性貧血症例の高密度SNPアレイによるゲノムコピー数・LOH解析を行い、共通して観察されたHLA領域を

含む6番染色体短腕UPDと免疫病態との関連を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究で実施される患者検体を用いた遺伝子解析研究は、原則としてMDS細胞の体細胞突然変異を扱うものであるが、平成16年文部科学省、厚生労働省および経済産業省告示第1号「ヒトゲノム・遺伝子に関する倫理指針」を遵守し、事前に各参加施設の倫理委員会の承認を得た。また、研究対象者からは文書による同意を得た。動物実験に関しては、動物愛護の観点から、平成18年文部科学省告示第71号「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」及び各機関の定める動物実験倫理規定を遵守し、予め各機関に届け、機関長の承認を得た。

C. 研究結果

1) 検体集積事業 (高折)

研究計画書の改訂と倫理委員会への申請・承認手続きと、承認後の検体集積のための体制作りが進められた。検体の集積に関しても、引き継いだ前研究の計画書に基づいて継続された。平成22年4月から平成23年3月15日現在までに、前研究の計画書に基づく包括的な同意の得られた新たな31検体の送付があった。これを含めて、これまでに集積された検体数は合計125となっている。送付された検体の一部は、前研究から開始されている高密度SNPアレイ解析に用いられ、結果は各検体提供施設に還元された。

2) MDSにおけるエピゲノム異常の解析研究

A. TAMRA-MBD2を用いた脱メチル化剤効果予測法の開発 (大屋敷)

人工的なメチル化DNAのメチル化比率とSMMA法による拡散時間は正比例し、検量曲線より全DNAのメチル化状態を半定量的に算出することが可能であった。またMstI処理ヒトDNAでは200-1,000 kbでも拡散時間によりDNAメチル化状態の検出が可能であった。実際に、SMMA法による脱メチル化剤(5'-azacytidineおよびdecitabine)添加

による白血病細胞株の全ゲノム脱メチル化状態を測定することが可能であった。

B. MDSにおける末梢遊離DNAを用いた遺伝子変異及びエピジェネティクス異常解析(直江) 血漿・血清遊離DNAを用いてTET2遺伝子変異をパイロシーケンス法にて検討したところ同様の変異が検出され、その存在割合は骨髓細胞を用いた解析と同様の傾向であることが確認された。また、p15遺伝子プロモータを用いたメチル化解析では、血漿・血清遊離DNAを用いた際のメチル化存在割合の結果は骨髓細胞より得られた結果と同様の傾向を示した。これらのことから、末梢血遊離DNAにおける変異やメチル化の傾向は、骨髓細胞の状態をある程度反映することが示唆され、経時的観察において骨髓細胞の代用となりうる可能性が示唆された。

C. 骨髓異形成症候群におけるDNA修飾に関する研究 (千葉)

少数例のMDS患者骨髓単核球でヒドロキシメチルシトシン(5hmC)量を測定したところ、患者間で顕著な差が認められた。いずれの患者でも5hmC量は正常人末梢血単核球のそれと比べ有意に少なかった。一方、急性骨髓性白血病細胞(AML)株における5hmC量は、MDS患者骨髓単核球に比べさらに少なかった。骨髓性白血病細胞株にTET2変異体を導入した細胞株では、5hmC量が減少し、またこの細胞ではベクターのみを導入した細胞に比較して、増殖能は亢進していることが確認された。また、TET2遺伝子のノックアウトマウス骨髓Lin⁻細胞における5hmCは、野生型コントロールに比べ少なかった。

D. 次世代シーケンサを用いたエピゲノム異常解析 (稲葉)

K562細胞は5-azaによりヘモグロビンの生産量が5倍以上増加したが、シーケンス解析の結果から、ヘモグロビン遺伝子やヘム合成蛋白質遺伝子の転写量の増加によるものではなく、ヘモグロビンmRNAの翻訳効率の増加に由来すると考えられた。翻訳効率を増加させる蛋白質として、elongation factorのうち一つが脱メチル

化により転写量が著しく増加していることを見いだした。

3) miRNAの発現異常の解析(三谷)

正常骨髄では発現していない miR-9 の発現が約 1 割の症例で亢進していることが明らかになった。miR-9 安定発現株では、コントロール細胞に比較して、赤芽球分化能が抑制されていることが明らかになった。miR-9 過剰発現例では、この抑制効果が MDS の分子病態形成に関与している可能性が示唆された。

4) 次世代シーケンス技術を活用した網羅的な変異遺伝子探索

A. 全エクソン・シーケンスによる新規変異遺伝子の探索 (小川)

次世代シーケンサーにより配列決定された塩基配列の60%はエクソン領域にマップされ、エクソン領域の濃縮は有効に行われていた。

MDS20例の全エクソン・シーケンスにより、MDS細胞特異的な変異候補が同定され、サンガーシーケンスにより201個(0-56個/例・平均10個)のアミノ酸置換を伴う1塩基置換変異、計9個の挿入欠失変異が確認された。MDSにおいて既に報告のあるIDH1やEZH2の1塩基変異やTET2の1塩基欠失変異などの他に、これまで報告のない新規の変異遺伝子が多数同定された。

B. 20番長腕欠失の標的遺伝子の探索(泉二)

9症例の臨床検体を用いたArray-CGHによる解析の結果、20番染色体長腕欠失における共通欠失領域は約7.2MBであることが判明した。共通欠失領域内に存在する約200の遺伝子のうち、がん抑制(候補)遺伝子ならびに腫瘍細胞の増殖、分化との関連が示されている32の遺伝子について、次世代シーケンサー(SOLiD)により変異の有無を解析した。20qを伴うMDS症例5症例を解析したところ、合計2812か所の1塩基置換と340か所の塩基挿入/欠失が検出され、うち17か所の1塩基置換は、エクソン内に存在しアミノ酸置換を伴うと推測された。

5) 骨髄不全における免疫病態研究(中尾・小川)

再生不良性貧血患者306例の末梢血をSNPア

レイで解析したところ、6番染色体短腕のHLA遺伝子領域を含む uniparental disomy (6pUPD) が全体の13%に認められた。6pUPD陽性例のうち、末梢血白血球が入手できたHLA-Aヘテロ接合体19例について、HLA-A抗原の発現を調べたところ、片方のアレルを欠失した細胞が全例で、且つ全ての白血球系統に検出された。6pUPD陽性女性3例の顆粒球をヒトアンドロジェンレセプターアッセイで調べたところ、全例でクローンであった。6pUPD陽性症例において高頻度に欠失しているHLAアレルはHLA-A*02:01、A*02:06、A*31:01、B*40:02であり、骨髄バンクに登録された407例のAA例におけるこれら4アレル頻度は、その他の血液疾患6206例における頻度に比べて、有意に高値であった。

D. 考察

1) 検体集積事業

改訂された研究計画書での研究参加施設での倫理審査が開始しており、今後、集積検体数が増加することが期待される。既に集積された骨髄検体は125例にのぼり、これらはDNAおよび細胞のペレット、あるいはRNAの状態では保管されている。これらのほとんどの検体では遺伝子解析の施行に関する包括的な同意が得られており、今後本班で行う遺伝子解析研究に使用可能である。また、詳細な臨床情報を付帯しており、遺伝子解析結果と対比する上で有用性が高い。今年度の集積検体の提供は前研究から継続されている研究に限定されていたが、来年度以降には倫理委員会審査を終えたそれぞれの新規個別研究への提供を予定している。

2) MDSにおけるエピゲノム異常の解析研究
今春より、MDSにおける脱メチル化剤の臨床応用が開始されており、投与に際して、投与患者の選別および脱メチル化剤投与の有効性を確認することは、今後の重要な検討課題となることが予想される。SMMA法(single molecular methylation assay)による全ゲノ

ムのDNAメチル化状態の検証、末梢血遊離DNAを用いた遺伝子解析技術は、極めて有用な技術となると期待される。

メチル化阻害剤がどのような機序で異常クローンの減少や正常造血の回復が図られるかは明らかになっていない。このような中で、次世代シーケンス技術を活用したゲノムメチル化およびトランスクリプトーム解析やメチル化DNAの修飾であるヒドロキシ化の意義が解明されていくことは、MDSの病態解明に貢献し、また個々の患者の治療法選択において重要な情報を与える可能性がある。

3) miRNAの発現異常の解析

MDSではその発症の原因となる様々な遺伝子異常が同定されているが、miRNAの発現異常に関する知見は多くない。MDSの約10%で観察されるmiR-9の過剰発現は、赤芽球分化に抑制的に作用するのみならず、造血幹細胞レベルで作用して、MDSの発症・進展に関与する可能性がある。miR-9の過剰発現の有無を多数のバンク検体を用いて解析し、臨床情報との相関を検討することにより、予後予測・治療層別化のモデルが構築出来る可能性がある。さらに治療面でも、miR-9に対するantagomirの有効性は検討に値すると考えられ、内因性miR-9の発現を抑制する化合物のスクリーニングも治療開発に直結することが期待される。

4) 次世代シーケンス技術を活用した網羅的な変異遺伝子探索

次世代シーケンス技術の開発により、限られた時間内に膨大な塩基配列決定を行うことが可能となり、腫瘍性疾患や遺伝性疾患などの原因遺伝子の探索研究に応用されつつある。MDSにおける新規変異遺伝子探索においても有用であり、現在、見出された変異の多数例における頻度や臨床像との関連を解析するとともに、共通して観察された変異遺伝子の機能解析を進めている。今後、症例数を重ねて解析することにより、MDSの分子病態が明らかとなり、治療標的となり得る分子や臨床的に有用なマーカー分子が同定されることが期待される。

5) 骨髄不全における免疫病態研究

本年度の研究によって、診断時に、患者末梢血中におけるHLAアレル欠失血球や6pUPDなどを検出することにより、ある骨髄不全におけるCTLの関与を証明できる可能性が示唆された。したがって、再生不良性貧血かMDSかの診断に迷う症例に対してHLAアレルを決定し、HLA-Aアレルヘテロ接合体であった場合には、それぞれのアレル発現をフローサイトメトリーで検出することにより、MDSと診断される例における免疫病態を迅速に診断できる可能性がある。また、自己免疫性の骨髄不全において、造血幹細胞由来の自己抗原提示に強く関与しているHLAクラスIアレルが同定されたことから、このアレルを導入した白血病細胞株を認識するCTLのスクリーニング、患者血清中のHLAペプチドームの質量分析、同じアレルを持つ健常者を対象としたGWASなどにより、自己免疫性骨髄不全の自己抗原を同定できる可能性がある。さらに、今回の検討によって明らかとなった6pUPD陽性造血幹細胞クローンによるクローン性造血は、ヒト造血が単一の造血幹細胞によって長期間維持されることを証明した初めてのモデルであることから、クローン性造血における血球の老化や分化のメカニズムを検討するための絶好の材料と考えられる。

E. 結論

不応性貧血MDSの治療率向上につながる分子病態の解明を目的に、様々な解析技術を駆使した研究を推進させた。MDSの治療薬として脱メチル化剤の臨床応用が国内でも開始され、有効性の評価・予測が重要な焦点となっているが、本班研究で開発されたメチル化の検出法が有用であると期待される。また脱メチル化剤の作用機序の研究、ヒドロキシメチル化の解析を通じて、MDSにおけるエピゲノム修飾異常の分子病態が明らかとすることは、新しい治療薬剤の開発へ向けて重要な知見となり得る。miR9の発現異常のMDS病態への関与

が明らかとなりつつあり、臨床的意義の評価を行う。次世代シーケンサを活用した網羅的な標的分子の探索は、新規変異遺伝子の同定に有用であることが明らかとなった。本アプローチは新規分子標的治療開発に直結することが期待され、次年度以降も継続して解析研究を進める。再生不良性貧血とMDSは病態が一部重複する疾患であるが、再生不良性貧血におけるゲノム変化を介した免疫病態が明らかとなりつつある。本研究を通じて、MDSにおける自己免疫機序が明らかとなると思われる。MDSは様々な分子病態を含む疾患群であると考えられており、分子病態の解明には、多数の臨床検体を使用した解析が重要である。本班で行っている検体集積事業は、本研究班の研究目的の達成において重要な事業であり、来年度以降、検体集積の充実ともに、各分担研究がより一層推進することが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Yoshida K, Sanada M, Kato M, Kawahata R, Matsubara A, Takita J, Shih LY, Mori H, Koefler HP, Ogawa S. A nonsense mutation of IDH1 in myelodysplastic syndromes and related disorders. *Leukemia*. 2011 Jan;25(1):184-6.
2. Oki K, Takita J, Hiwatari M, Nishimura R, Sanada M, Okubo J, Adachi M, Sotomatsu M, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. IDH1 and IDH2 mutations are rare in pediatric myeloid malignancies. *Leukemia*. 2011 Feb;25(2):382-4.
3. Ogawa S, Shih LY, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, Koefler HP, Sanada M. Deregulated intracellular signaling by mutated c-CBL in myeloid neoplasms. *Clin Cancer Res*. 2010 Aug 1;16(15):3825-31.
4. Ogawa S, Sanada M, Shih LY, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, Koefler HP. Gain-of-function c-CBL mutations associated with uniparental disomy of 11q in myeloid neoplasms *Cell Cycle*. 2010 Mar 23;9(6).
5. Ishikawa Y, Kiyoi H, Naoe T. Prevalence and clinical characteristics of N-terminally truncated WT1 expression in acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2011. [Epub ahead of print]
6. Miyawaki S, Hatsumi N, Tamaki T, Naoe T, Ozawa K, Kitamura K, Karasuno T, Mitani K, Kodera Y, Yamagami T, Koga D. Prognostic potential of detection of WT1 mRNA level in peripheral blood in adult acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 51:1855-61, 2010.
7. Iio A, Nakagawa Y, Hirata I, Naoe T, Akao Y. Identification of non-coding RNAs embracing microRNA-143/145 cluster. *Mol Cancer*. 9:136, 2010.
8. Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, Suzuki H, Ishikawa Y, Choi YL, Ueno T, Soda M, Hamada T, Haruta H, Takada S, Miyazaki Y, Kiyoi H, Ito E, Naoe T, Tomonaga M, Toyota M, Tajima S, Iwama A, Mano H. Array-based genomic resequencing of human leukemia. *Oncogene*. 29:3723-31, 2010.
9. Morita Y, Kanamaru A, Miyazaki Y, Imanishi D, Yagasaki F, Tanimoto M, Kuriyama K, Kobayashi T, Imoto S, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R. Comparative analysis of remission induction therapy for high-risk MDS and AML progressed from MDS in the MDS200 study of Japan Adult Leukemia Study Group. *Int J Hematol*. 91:97-103, 2010.
10. Qi Z, Takamatsu H, Espinoza JL, Lu X, Sugimori N, Yamazaki H, Okawa K, Nakao S. Autoantibodies specific to hnRNP K: a new diagnostic marker for immune pathophysiology in aplastic anemia. *Ann Hematol*, 89:1255-1263, 2010
11. Katagiri T, Qi Z, Ohtake S, Nakao S. GPI-anchored protein-deficient T cells in patients with aplastic anemia and low-risk myelodysplastic syndrome: implications for the immunopathophysiology of bone

- marrow failure. *Eur J Haematol*, 86:226-236
2011
12. Umezu T, Ohyashiki K, Ohyashiki JH: Single molecular methylation assay: A new technology for quantifying global DNA methylation by fluorescence correlation spectroscopy, 2011, submitted.
13. Kanda J, Mizumoto C, Kawabata H, Ichinohe T, Tsuchida H, Tomosugi N, Matsuo K, Yamashita K, Kondo T, Ishikawa T, Uchiyama T.; Clinical significance of serum hepcidin levels on early infectious complications in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009 Aug;15(8):956-962.
14. Kitawaki T, Kadowaki N, Fukunaga K, Kasai Y, Maekawa T, Ohmori K, Itoh T, Shimizu A, Kuzushima K, Kondo T, Ishikawa T, Uchiyama T.; Cross-priming of CD8(+) T cells in vivo by dendritic cells pulsed with autologous apoptotic leukemic cells in immunotherapy for elderly patients with acute myeloid leukemia. *Exp Hematol*. 2011 Apr;39(4):424-433.
15. 石川隆之. 骨髓異形成症候群 MDS の診断と分類 FAB 分類から WHO 分類へ. 臨床血液. 2010;51(10):1470-9.
16. Okuya M, Kurosawa H, Kikuchi J, Furukawa Y, Matsui H, Aki D, Matsunaga T, Inukai T, Goto H, Altura RA, Sugita K, Arisaka O, Look AT, Inaba T. Upregulation of survivin by the E2A-HLF chimera is indispensable for the survival of t(17;19)-positive leukemia cells. *J. Biol. Chem*. 285: 1850-1860, 2010
17. Yamasaki N, Miyazaki K, Nagamachi A, Koller R, Oda H, Miyazaki M, Sasaki T, Honda Z, Wolff L, Inaba T, Honda H. Identification of *Zfp521/ZNF521* as a cooperative gene for *E2A-HLF* to develop acute B-lineage leukemia. *Oncogene* 29: 1963-1975, 2010
18. Akahane K, Inukai T, Inaba T, Kurosawa H, Look AT, Kiyokawa N, Fujimoto J, Goto H, Endo M, Zhang X, Hirose K, Kuroda I, Honna H, Kagami J, Goi K, Nakazawa S, and Sugita K. Specific induction of CD33 expression by E2A-HLF: the first evidence for aberrant myeloid antigen expression in ALL by a fusion transcription factor. *Leukemia* 24:865-869, 2010
19. Hirose K, Inukai T, Kikuchi J, Furukawa Y, Ikawa T, Kawamoto H, Oram SH, Göttgens B, Kiyokawa N, Miyagawa Y, Okita H, Akahane K, Zhang X, Kuroda I, Honna H, Kagami K, Goi K, Kurosawa H, Look AT, Matsui H, Inaba T, Sugita K. Aberrant induction of LMO2 by the E2A-HLF chimeric transcription factor and its implication in leukemogenesis of B-precursor ALL with t(17;19). *Blood* 116: 962-970, 2010
20. Nagamachi A, Htun PW, Ma F, Miyazaki K, Yamasaki N, Kanno M, Inaba T, Honda I, Okuda T, Oda H, Tsuji K, Honda H. A 5' untranslated region containing the IRES element in the *Runx1* gene is required for angiogenesis, hematopoiesis and leukemogenesis in a knock-in mouse model. *Dev Biol*. 345: 226-236, 2010
21. Jin L, Tabe Y, Kimura S, Zhou Y, Kuroda J, Asou H, Inaba T, Konopleva M, Andreeff M, Miida T. Antiproliferative and proapoptotic activity of GUT-70 mediated through potent inhibition of Hsp90 in mantle cell lymphoma. *Br. J. Cancer* 104: 91-100, 2011
22. Ozaki Y, Matsui H, Nagamachi A, Asou H, Aki D, Inaba T. The dynactin complex maintains the integrity of metaphasic centrosomes to ensure transition to anaphase. *J. Biol. Chem* 286: 5589-5598, 2011
23. Mori N, Yoshinaga K, Tomita K, Ohwashi M, Kondoh T, Shimura H, Wang YH, Shiseki M, Okada M, Motoji T. Aberrant methylation of the *RIZ1* gene in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 35(4):516-21, 2011.
24. Nagai T, Takeuchi J, Dobashi N, Kanakura Y, Taniguchi S, Ezaki K, Nakaseko C, Hiraoka A, Okada M, Miyazaki Y, Motoji T, Higashihara M, Tsukamoto N, Kiyoi H, Nakao S, Shinagawa K, Ohno R, Naoe T, Ohnishi K, Usui N. Imatinib for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid

- leukemia: results of a prospective study in Japan. *Int J Hematol.* 92(1):111-7, 2010.
25. Akiyama N, Miyazawa K, Kanda Y, Tohyama K, Omine M, Mitani K, Ohyashiki K. Multicenter phase II trial of vitamin K2 plus 1 α -hydroxyvitamin D3 combination therapy for low-risk myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 34:1151-1157, 2010.
26. Miyawaki S, Hatsumi N, Tamaki T, Naoe T, Ozawa K, Kitamura K, Karasuno T, Mitani K, Koderu Y, Yamagami T, Koga D. Prognostic potential of detection of WT1 mRNA level in peripheral blood in adult acute myeloid leukemia. *Leuk & Lymph* 51:1855-1861, 2010.
27. Sakata-Yanagimoto M, Sakai T, Miyake Y, Saito T, Maruyama H, Morishita Y, Nakagami-Yamaguchi E, Kumano K, Yagita H, Fukayama M, Ogawa S, Kurokawa M, Yasutomo K, Chiba S. Notch2 signaling is required for proper mast cell distribution and mucosal immunity in the intestine. *Blood* 117(1):128-134, Jan 6, 2011
28. Nakahara F, Sakata-Yanagimoto M, Komeno Y, Kato N, Uchida T, Haraguchi K, Kumano K, Harada Y, Harada H, Kitaura J, Ogawa S, Kurokawa M, Kitamura T, Chiba S. Hes1 immortalizes committed progenitors and plays a role in blast crisis transition in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 115(14):2872-2881, Apr 8, 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願中
特願 2010-167412 (大屋敷)
特願 2010-275878 (中尾)
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

II. 分担研究報告

次世代シーケンス技術を活用した MDS の新規原因遺伝子の同定

主任研究者 小川 誠司 東京大学医学部附属病院がんゲノミクスプロジェクト特任准教授

研究要旨

次世代シーケンス技術を活用した全エクソン・シーケンス解析を MDS 20 症例に対して行い、網羅的な変異解析による新規変異遺伝子の探索を行った。解析の結果、1 検体につき 10 個程度の MDS 細胞に特異的な遺伝子変異が同定された。同定された変異遺伝子には既知の遺伝子変異の他に、機能上から MDS 病態への関与が示唆される遺伝子も含まれ、本解析方法は、MDS の新規原因遺伝子の探索に有用であった。

A. 研究目的

骨髄異形成症候群 (MDS) は高齢者に好発する難治性造血器疾患であるが、現在、根治的治療は造血幹細胞移植のみであり、副作用の観点などから適応となる症例は僅かである。MDS の治療成績の向上の観点からは、MDS に含まれる多様な分子病態を明らかにした上で、個々の病態に即した分子標的療法を含む治療戦略を構築することが重要である。我々は、次世代リシーケンサーを用いた全エクソン領域の配列決定による網羅的な変異遺伝子の探索を通じて、MDS の治療標的分子となり得る新規原因遺伝子の同定を目指した。

B. 研究方法

本研究目的に新規に収集された MDS 例 20 症例を解析対象とした。骨髄単核球および末梢血より純化した T リンパ球を正常細胞として解析を行った。全ゲノムよりエクソン領域をアジレント社 SureSelect キットにより濃縮し、イルミナ社の Genome Analyzer を用いて配列決定を行った。得られた配列情報をヒトゲノムの標準配列に合わせてゲノム上の位置を決定した後に、標準配列と異なる塩基もしくは配列を変異候補として抽出した。抽出された変異候補のうち、SNP データベースに登録がなく、同時に解析を行った正常細胞においても存在しない配列を MDS 細胞特異的 (後天的) 変異候補とし、サンガーシーケンスにより変異の確認を行った。

(倫理面への配慮)

検討に用いた検体は、当該患者からインフォームドコンセントを得たのちに連結可能匿名化を施して検討に用いた。当院の倫理委員会の承認済みである。

C. 結果

次世代シーケンサーにより配列決定された

塩基配列の 60% はエクソン領域にマップされ、エクソン領域の濃縮は有効に行われていた。濃縮後に、シーケンスすることにより、限られた解析ラン数で解析に十分な深度とカバー率を得ることが可能であった。

MDS 20 例の全エクソン・シーケンスにより、MDS 細胞特異的な変異候補が同定され、サンガーシーケンスにより 201 個 (0-56 個/例・平均 10 個) のアミノ酸置換を伴う 1 塩基置換変異、計 9 個の挿入欠失変異が確認された。MDS において既に報告のある IDH 1 や EZH2 の 1 塩基変異や TET2 の 1 塩基欠失変異などの他に、これまで報告のない新規の変異遺伝子が多数同定された。

D. 考察

次世代シーケンス技術の開発は、研究室レベルでヒトの全ゲノムに対する塩基配列決定を可能とした。しかし、全ゲノム領域のシーケンスを行うには、現状では多大なる費用を要するとともに、情報量も膨大となり、高度かつ大きな計算リソースが必要である。そこで、変異の意義の推測が比較的容易と考えられる遺伝子の翻訳領域すなわちエクソン領域のみを対象とした網羅的な変異解析を行った。その結果、効率良く、病的意義が高いと推測される変異を同定することが可能であった。今後、更に解析症例数を追加し、複数の症例で認められる遺伝子変異を中心に解析を進めていく予定である。

また、本解析では、非常に多数の未知の SNP などの多型も同時に同定され、MDS 細胞特異的な変化との鑑別が困難であり、自己正常細胞の同時解析が必須である。MDS においては、寛解状態を得ることは困難であり、正常細胞の入手は一般に難しい。末梢血 T 細胞は、低侵襲で採取可能であり、一部の症例を除いて、正常対照として解析に使用可能であった。今

後の検体収集においては、自己正常細胞も合わせて収集することが必要と考えられる。

E. 結論

次世代シーケンス技術を活用した全エクソーム・シーケンスは網羅的な新規変異遺伝子の探索に有用であった。本解析を通じ、MDSの病態解明が進み、今後、分子病態に即した有効な治療法の開発が進むことが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yoshida K, Sanada M, Kato M, Kawahata R, Matsubara A, Takita J, Shih LY, Mori H, Koeffler HP, Ogawa S. A nonsense mutation of IDH1 in myelodysplastic syndromes and related disorders. *Leukemia*. 2011 Jan;25(1):184-6.

Oki K, Takita J, Hiwatari M, Nishimura R, Sanada M, Okubo J, Adachi M, Sotomatsu M, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. IDH1 and IDH2 mutations are rare in pediatric myeloid malignancies. *Leukemia*. 2011 Feb;25(2):382-4.

Ogawa S, Shih LY, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, Koeffler HP, Sanada M. Deregulated intracellular signaling by mutated c-CBL in myeloid neoplasms. *Clin Cancer Res*. 2010 Aug 1;16(15):3825-31.

Ogawa S, Sanada M, Shih LY, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, Koeffler HP. Gain-of-function c-CBL mutations associated with uniparental disomy of 11q in myeloid neoplasms. *Cell Cycle*. 2010 Mar 23;9(6).

2 学会発表

Yoshida K, Sanada M, Nagata Y, Kawahata R, Kato M, Matsubara A, Takita J, Mori H, Ishiyama K, Ishikawa T, Miyawaki S, Obara N, Chiba S, Ogawa S. Whole Exome Analysis of Myelodysplastic Syndromes Using Next-Generation Resequencing Technology. 52nd Annual Meeting of American Society of Hematology, 2010

Nagata Y, Sanada M, Yoshida K, Nakaya T, Matsubara A, Obara N, Ishiyama K, Miyawaki S, Takita J, Chiba S, Lee Yung S, Koeffler HP, Ogawa S. Profiling of Multiple Gene Mutations in Myelodysplastic Syndromes Using High-Throughput Resequencing Combined with Barcode Labeling. 52th Annual Meeting of American Society of Hematology, 2010

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特になし

「MDSにおける末梢遊離DNAを用いた遺伝子変異及びエピジェネティクス異常解析」 に関する研究

分担研究者 直江 知樹 名古屋大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科学 教授

研究要旨

MDSにおける遺伝子の変異やエピジェネティックな変化に関する報告が蓄積し、病態との関連に興味もたれているが、その経時的な変化に関する情報は未だ不十分である。これらの変化を検出するために骨髄検査は必須の検査とされているが、患者の負担を考慮し臨床の場においては極力回数を減らすことが求められる。そこで我々は、検体の採取が簡便で、また長期保存も比較的容易である末梢血の血漿・血清より遊離DNAを採取し、遺伝子変異解析及びプロモーターメチル化解析を行う系を検討した。パイロシークエンス法及びバイサルファイトシークエンス法を用いた検討では、MDSに認められる特異な遺伝子変異や特定遺伝子プロモーターのメチル化状態を、半定量的に検出することが可能であった。この変異やメチル化の存在割合は、骨髄細胞を用いた検討と似通った傾向を示し、骨髄細胞を用いた遺伝子解析に変わる、より低侵襲で簡便な方法となりうる可能性が示唆された。

A. 研究目的

MDSにおける遺伝子変異やエピジェネティックな変化を、簡便かつ低侵襲に経時的に観察することを可能とするため、末梢血血漿・血清中に存在する遊離DNAに着目し遺伝子解析法を確立する。

B. 研究方法

MDS患者より採取された血漿及び血清より遊離DNAを抽出し、目的とする遺伝子部位をPCR法にて増幅した後、パイロシークエンス法を用いて変異解析を行う。また、遺伝子をバイサルファイト処理した後にパイロシークエンス法を施行し、プロモーター部位のCpGメチル化の割合を定量化する。

（倫理面への配慮）

検体採取とその保存、研究目的使用に関する同意を文書により取得した後に検討を行った。遺伝子解析を含む本研究内容は、当院倫理委員会にて承認を得ている。

探索は、種々の遺伝子変異の報告が蓄積して来た背景を踏まえると、今後の極めて重要な検討課題となることが予想される。末梢血遊離DNAを用いた遺伝子解析技術は、骨髄細胞を用いた解析に比べて経時的な検体の収集を圧倒的に容易とし、また検体の郵送や保存など、その取り扱いがより簡便なものとなる。今後、アザシチジンなどMDSに対する新たな臨床研究を施行するにあたり、治療効果の経時的フォローアップや薬剤感受性を決定づける遺伝子変異の確認など、経時的に採取された検体の解析の重要性が更に増してくることが予想される。このような状況において末梢血遊

離DNAの解析は、各施設から治療経過とともに採取された経時的検体をより簡便に効率よく集積させるために、極めて有用な技術の一つとなる可能性がある。

C. 研究結果

MDS患者の骨髄細胞を用いたSNPアレイ解析にて異常を認めた症例から *TET2* 遺伝子変異を同定した。骨髄細胞を抗CD34、抗CD38抗体を用いてCD34(+)/38(-)、CD34(-)/CD38(+), CD34(-)/CD38(-)の各分画にソーティングし、それぞれの分画に存在する *TET2* 遺伝子変異の割合を解析した。また経時的に採取された骨髄検体を用いて、同様の検討を行った。血漿・血清遊離DNAを用いて *TET2* 遺伝子変異をパイロシークエンス法にて検討したところ同一の変異が検出され、その存在割合は骨髄細胞を用いた解析と同様の傾向であることが確認された。また、*p15* 遺伝子プロモーターを用いたメチル化解析では、血漿・血清遊離DNAを用いた際のメチル化存在割合の結果は骨髄細胞より得られた結果と同様の傾向を示した。これらのことから、末梢血遊離DNAにおける変異やメチル化の傾向は、骨髄細胞の状態をある程度反映することが示唆され、経時的観察において骨髄細胞の代用となりうる可能性が示唆された。

D. 考察

MDS の発症のみならず、病勢進行や薬剤に対する感受性を決定づける変異の探索は、種々の遺伝子変異の報告が蓄積して来た背景を踏まえると、今後の極めて重要な検討課題となることが予想される。末梢血遊離 DNA を用いた遺伝子解析技術は、骨髄細胞を用いた解析に比べて経時的な検体の収集を圧倒的に容易とし、また検体の郵送や保存など、その取り扱いがより簡便なものとなる。今後、アザシチジンなど MDS に対する新たな臨床研究を施行するにあたり、治療効果の経時的フォローアップや薬剤感受性を決定づける遺伝子変異の確認など、経時的に採取された検体の解析の重要性が更に増してくることが予想される。このような状況において末梢血遊離 DNA の解析は、各施設から治療経過とともに採取された経時的検体をより簡便に効率よく集積させるために、極めて有用な技術の一つとなる可能性がある。

E. 結論

血漿・血清遊離 DNA を用いた MDS の遺伝子解析は、骨髄細胞における遺伝子異常の背景をある程度反映し、低侵襲で簡便な検体集積、解析法となり得る。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

1. Ishikawa Y, Kiyoi H, Naoe T. Prevalence and clinical characteristics of N-terminally truncated WT1 expression in acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2011. [Epub ahead of print]
2. Miyawaki S, Hatsumi N, Tamaki T, Naoe T, Ozawa K, Kitamura K, Karasuno T, Mitani K, Kodera Y, Yamagami T, Koga D. Prognostic potential of detection of WT1 mRNA level in peripheral blood in adult acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 51:1855-61, 2010.
3. Iio A, Nakagawa Y, Hirata I, Naoe T, Akao Y. Identification of non-coding RNAs embracing microRNA-143/145 cluster. *Mol Cancer*. 9:136, 2010.

4. Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, Suzuki H, Ishikawa Y, Choi YL, Ueno T, Soda M, Hamada T, Haruta H, Takada S, Miyazaki Y, Kiyoi H, Ito E, Naoe T, Tomonaga M, Toyota M, Tajima S, Iwama A, Mano H. Array-based genomic resequencing of human leukemia. *Oncogene*. 29:3723-31, 2010.
5. Morita Y, Kanamaru A, Miyazaki Y, Imanishi D, Yagasaki F, Tanimoto M, Kuriyama K, Kobayashi T, Imoto S, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R. Comparative analysis of remission induction therapy for high-risk MDS and AML progressed from MDS in the MDS200 study of Japan Adult Leukemia Study Group. *Int J Hematol*. 91:97-103, 2010.

2. 学会発表

1. Akihiro Tomita, Tomoki Naoe Utilization of DNA methyltransferase inhibitors for hematological malignancies. 第69回 日本癌学会学術総会、(International Sessions ; シンポジウム英語口演)、2010年9月、大阪
2. 後藤絵美、富田章裕、早川文彦、渥美晃秀、清井仁、直江知樹、亜ヒ酸耐性耐性に重要な PML-RARA のミスセンス変異、第70回 日本血液学会総会、(口演)、2010年9月、横浜
3. 入山智沙子、富田章裕、星野秀明、清井仁、日比陽子、千崎康司、山田清文、真田昌、小川誠司、直江知樹、パイロシーケンス法を用いた骨髄、末梢血、血清血漿遊離DNAにおける TET2 遺伝子変異の解析、第70回 日本血液学会総会、(口演)、2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
該当無し。
2. 実用新案登録
該当無し。
3. その他
なし。

6 番染色体短腕の uniparental disomy による HLA 欠失血球の出現： 骨髄不全の免疫病態との関係

研究分担者 中尾眞二 金沢大学医薬保健研究域医学系細胞移植学 教授

研究要旨

再生不良性貧血（AA）における造血の質を明らかにするため、AA患者306例の末梢血をSNPアレイで解析したところ、6番染色体短腕のHLA遺伝子領域を含むuniparental disomy (6pUPD)が全体の13%に認められた。6pUPD陽性例のうち、末梢血白血球が入手できたHLA-Aヘテロ接合体19例について、HLA-A抗原の発現を調べたところ、片方のアレルを欠失した細胞が全例で、且つ全ての白血球系統に検出された。6pUPD陽性女性3例の顆粒球をヒトアンドロジェンレセプターアッセイで調べたところ、全例でクローンであった。6pUPD陽性症例において高頻度に欠失しているHLAアレルはHLA-A*02:01、A*02:06、A*31:01、B*40:02であり、骨髄バンクに登録された407例のAA例におけるこれら4アレルの頻度は、その他の血液疾患6206例における頻度に比べて、有意に高値であった。以上の所見から、AAでは、造血幹細胞上の特定のHLAによって提示されるCTLが骨髄不全の発症に関与しており、一部の例では、HLA欠失のためCTLの攻撃を免れた6pUPD陽性造血幹細胞がクローン性に造血を支持していると考えられた。

A. 研究目的

再生不良性貧血 (aplastic anemia AA) は、造血幹細胞に対する免疫学的攻撃によって起こる良性の骨髄不全と考えられているが、20-30%の患者においては顆粒球造血がクローン性であり、また10-15%がMDSに移行することが知られている。このようにAAにおいてクローン性造血がみられる機序として、①免疫学的攻撃を受けたために造血幹細胞が減少し、その結果少数の幹細胞によって造血が支持されるようになった、②免疫学的攻撃を受けた骨髄において造血幹細胞に獲得性のゲノム異常が生じ、その異常幹細胞がクローン性に増殖・分化した、③元々骨髄に自然発生した異常幹細胞クローンの免疫学的攻撃に対する感受性が、正常クローンに比べて低いため、その異常クローンが生き残って造血を支持するようになった、などの可能性が考えられる。実際に起こっているクローン性メカニズムの機序を明らかにするため、多数のAA症例を対象として、末梢血白血球におけるゲノムコピー数の異常をスクリーニングした。

B. 研究方法

306例のAA症例の末梢血由来DNAをAffymetrixのGeneChip® 500K arraysで解析した。6番染色体短腕のHLA遺伝子領域を含むuniparental disomy (6pUPD)陽性例のうち、末梢血白血球が入手できたHLA-Aヘテロ接合体19例について、HLA-A抗原の発現をフローサイトメトリーで検索した。さらに、6pUPD陽性の女性症例3例について末梢血のクロナリティをヒトアンドロジェンレセプターアッセイ (HUMARA) で解析した。また、6pUPD陽性全症例のHLAアレルを決定した上で、各アレル近傍のSNPのパターンからハプロタイプを推測した。

C. 研究結果

SNPアレイ解析の結果、306例の検体中46例(15%)において50種類のゲノム異常が検出された。その中で、6pUPDが13%と特に高頻度であった。末梢血白血球が入手できたHLA-Aヘテロ接合体の6pUPD陽性19例の全例で、片方のアレルを欠失した細胞が全ての白血球系統に検出された。6pUPD陽性女性3例の顆粒球をHUMARAで調べたところ、全例でクローンであった。

6pUPD 陽性症例において高頻度に欠失している HLA アレルは HLA-A*02:01、A*02:06、A*31:01、B*40:02 であり、骨髄バンクに登録された 407 例の AA 例におけるこれら 4 アレル頻度は、その他の血液疾患 6206 例における頻度に比べて、有意に高値であった。

D. 考察

本研究によって、AA 患者で検出されるクローン性造血の一部は、6pUPD を起こした造血幹細胞由来であることが明らかになった。6pUPD 陽性例で高頻度に検出された 4 つの HLA クラス I アレルは、AA 症例全体においても高頻度に認められることから、これらの HLA は、AA 発症の引き金となる自己抗原を提示している可能性が高い。これらの高頻度アレルを有する 6pUPD 陽性症例を対象として、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の標的抗原や、全ゲノムワイド関連解析による体細胞遺伝子の多型などを解析することによって、自己免疫性骨髄不全の自己抗原を同定できる可能性がある。

E. 結論

AA では、造血幹細胞上の特定の HLA によって提示される自己抗原特異的 CTL が骨髄不全の発症に関与しており、一部の例では、HLA 欠失の結果 CTL の攻撃を免れた 6pUPD 陽性造血幹細胞がクローン性に造血を支持していると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Qi Z, Takamatsu H, Espinoza JL, Lu X, Sugimori N, Yamazaki H, Okawa K, Nakao S. Autoantibodies specific to hnRNP K: a new diagnostic marker for immune

pathophysiology in aplastic anemia. *Ann Hematol*, 89:1255-1263, 2010

- 2) Katagiri T, Qi Z, Ohtake S, Nakao S. GPI-anchored protein-deficient T cells in patients with aplastic anemia and low-risk myelodysplastic syndrome: implications for the immunopathophysiology of bone marrow failure. *Eur J Haematol*, 86:226-236 2011

2. 学会発表

Katagiri, T., Matsubara, A., Kashiwase, K., Kato, M., Morishima, Y., Hosokawa, K., Ohtake, S., Ogawa, S., Nakao, S.: Immunologically-selected hematopoiesis caused by HLA allelic loss in patients with aplastic anemia. Session Type: Oral Session, #198: The American Society of Hematology 52th Annual Meeting, December 4-7, 2010. Orlando, Florida, USA.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

特願 2010-275878 : PNH 型白血球の検出方法平成 22 年 12 月 10 日出願

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし