

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）

「特発性造血障害に関する調査研究」

分担研究報告書

PNH 責任遺伝子解析スクリーニングシステムの構築

研究分担者 金倉 譲 一般社団法人 住友病院・院長

研究要旨

発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）の責任遺伝子として *phosphatidylinositol glycan class A (PIGA)* 遺伝子を同定してきたが、GPI アンカー型タンパク質（GPI-AP）の生合成に關与する他の遺伝子（*PIGT*、*PIGB*）の変異によって発症した PNH 症例が報告された。PNH の診断に遺伝子解析は必須ではないが、示唆に富む特徴的な症例においては、詳細な遺伝子解析が必要となる。そこで我々は、遺伝子解析が必要と判断された PNH 症例においては、責任遺伝子として圧倒的に多い *PIGA* 遺伝子をまず大阪大学血液・腫瘍内科において解析し、*PIGA* 遺伝子異常が同定できない場合においてのみ、大阪大学微生物病研究所（木下タロウ博士）に、他の GPI-AP 生合成関連遺伝子の網羅的変異解析を依頼する、PNH 責任遺伝子解析スクリーニングシステムを構築した。

A. 研究目的

PNH は長年、“*PIGA* 遺伝子に後天的変異を持った造血幹細胞がクローン性に拡大した結果、補体介在性の血管内容血を主徴とする造血幹細胞疾患である（*PIGA*-PNH）”と定義されてきたが、*PIGT* 変異（*PIGT*-PNH）や *PIGB* 変異（*PIGB*-PNH）による PNH 症例の報告がなされ、定義も見直された。*PIGT*-PNH や *PIGB*-PNH では、自己炎症症状を特徴とする。GPI-AP 生合成に關連する遺伝子はこれまで27個同定されており、今後も様々な遺伝子変異に起因する PNH 症例が見出されることが期待され、大阪大学において系統的な解析システムを構築した。

B. 研究方法

PIGA 遺伝子以外の遺伝子変異に起因する PNH が報告されているが、*PIGA* 遺伝子変異の頻度が極めて高いので、まず、*PIGA* 遺伝子に対してターゲットディープシーケンスを行う。患者の末梢血液細胞からカラム法（QIAmp DNA Blood Mini Kit®）を用いて、DNA を抽出する。抽出した DNA を酵素的断片化する（SureSelect XT-HS Fragmentation Kit®）。

次に、アダプター付き DNA ライブラリーを調整する（SureSelect XT HS Reagents Kit®）。*PIGA* 遺伝子のエンリッチメントはキャプチャー法を用いる（SureSelect XT カスタムキャプチャライブラリー®）。ベイトの作成には、Sure Design を用い、*PIGA* 遺伝子のエクソン領域およびスプライシングサイトを含むようにデザインした。シーケンサーは Illumina の MiSeq®を使用する（シーケンスモード 151bp×2，データ量 100Mb/Sample）。アライメントおよび変異のコールは Sure Call を用いて行い、IGV 等を用いた可視化および確認も行う。*PIGA* 遺伝子変異を認めない場合は、GPI-AP 生合成関連遺伝子を対象とした網羅的なシーケンスやエクソーム解析を行い、その他の変異を同定する。

（倫理面への配慮）

本研究については、大阪大学において倫理審査委員会の承認を経て、すべての患者から解析前に書面によるインフォームドコンセントを取得している。

C. 研究結果

システム構築に先立って、当院通院中の症例に対して検証を行った。現在までに5例の解析を行い、全例に *PIGA* 遺伝子変異を認めた。また5例中2例に対しては、それぞれの *PIGA* 遺伝子変異に対してサンガー法による確認を行った。ターゲットディープシーケンスで同定された変異を、サンガー法でも確認することができた。サンガー法にて確認した2例について具体的な遺伝子変異を表に示す(表1)。*PIGA* 遺伝子変異を複数認め、オリゴクローナルに存在している症例を確認した。

Case 1	<i>PIGA</i>	c.715G>A
Case 2	<i>PIGA</i>	c.207dupT
	<i>PIGA</i>	c.464C>A
	<i>PIGA</i>	c.491C>T
	<i>PIGA</i>	c.548G>A
	<i>PIGA</i>	c.1302delC
	<i>PIGA</i>	c.1302-1347dup

表1. シークエンス結果の一部を示す。既報と同様にオリゴクローナルな症例も認めた。

D. 考察

非典型PNH症例など示唆に富む症例では、大阪大学に相談が寄せられることが多い。まず、医学部において *PIGA* 遺伝子のスクリーニングを行い、変異を見出せない場合においてのみ、微生物病研究所で、GPI-AP 生合成関連遺伝子の網羅的解析を行う、PNH 責任遺伝子解析スクリーニングシステムを構築した(図1)。

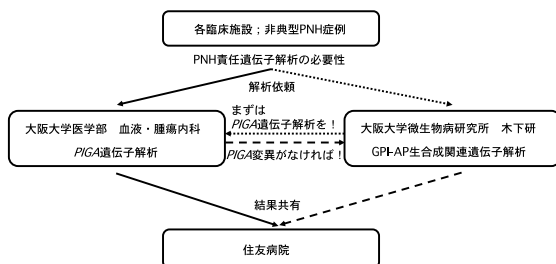


図1. PNH責任遺伝子解析スクリーニングシステム

E. 結論

今回我々はPNH責任遺伝子解析スクリーニングシステムを構築した。引き続き症例を蓄積し、新規遺伝子変異の関与の解析とPNHの病態解明に努める。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Schols S, Nunn MA, Mackie I, Weston-Davies W, Nishimura JI, Kanakura Y, Blijlevens N, Muus P, Langemeijer S. Successful treatment of a PNH patient non-responsive to eculizumab with the novel complement C5 inhibitor coversin (nomacopan). *Br J Haematol* 188:334-337,2020.
- Röth A, Araten DJ, Larratt L, Kulasekararaj AG, Maciejewski JP, Wilson A, Gustovic P, Kanakura Y. Beneficial effects of eculizumab regardless of prior transfusions or bone marrow disease: Results of the International PNH Registry. *Eur J Haematol* 105:561-570,2020
- Schrezenmeier H, Röth A, Araten DJ, Kanakura Y, Larratt L, Shammo JM, Wilson A, Shayan G, Maciejewski JP. Baseline clinical characteristics and disease burden in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): updated analysis from the International PNH Registry. *Ann Hematol* 99:1505-1514,2020.

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

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