

再生不良性貧血における遺伝子変異の解明

-白血病発症にいたる過程を初めて解明-

概要

急性骨髄性白血病(AML) (注1)は代表的な血液がんの一つで、造血細胞のゲノム(注2)に異常が生ずることによって発症すると考えられています。近年、白血病の細胞の詳細なゲノム解析によって、その発症に関わる遺伝子の変異の全体像が明らかにされつつありますが、白血病の診断以前に血液試料を解析することが一般には大変困難なことから、白血病発症に至るまでにどのようにして遺伝子変異が生じてくるのかについてはほとんどわかっていません。

再生不良性貧血は、免疫学的な異常によって造血幹細胞が破壊される結果、造血不全(注3)を生ずる疾患です。造血細胞の破壊に関わる免疫を抑制することによって造血の改善が得られますが、造血の改善を認めた後数年の経過でしばしば、急性骨髄性白血病や骨髄異形成症候群(注4)といった血液がんを続発することが知られていることから、その経過中に採取された血液を解析することによって、再生不良性貧血の病態の解明のみならず、白血病発症の過程で生ずる遺伝子の変化を明らかにすることができると期待されます。

今回、京都大学大学院医学研究科 腫瘍生物学 小川誠司 教授、米国国立衛生研究所(NIH) Neal Young 博士、東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター 教授 宮野悟 教授、金沢大学 細胞移植学 中尾 眞二 教授、米国クリーブランドクリニック Jaroslaw Maciejewski 博士を中心とする研究チームは、439症例の再生不良性貧血の患者さんから数年間にわたって継時的に採取された668検体の血液試料について、次世代シーケンサー(注5)を用いたゲノム解析を行うことによって、白血病の発症に先だって造血系に遺伝子異常が生じ、数年の経過を経てしばしば白血病などの造血器腫瘍を発症することを明らかにしました。今回の研究の主な成果は以下の点です。

- ① 再生不良性貧血の患者の約1/3では、経過中に白血病その他の血液がんでは認められないような変異をもった細胞が出現する。
- ② これらの変異うち、約75%は *PIGA*・*BCOR*・*BCORL1*・*DNMT3A*・*ASXL1* の5つの遺伝子に生ずる。
- ③ 個々の変異を有する細胞の経時的な挙動はしばしば予測が難しいが、*DNMT3A*、*ASXL1* 変異を有する患者では、これらの変異をもった細胞が継時的に増加して白血病を発症し、予後不良の傾向が認められる一方、*PIGA*、*BCOR*、*BCORL1* 変異を有する患者では、これらの変異をもった細胞が消失する傾向が認められ、予後も良好である。

本解析は、再生不良性貧血について行われたもっとも包括的な遺伝学的解析であり、再生不良性貧血の分子病態の解明に大きな進展をもたらすとともに、がん(白血病)の発症に先立って生じている造血組織の変化を世界で初めて明らかにした研究成果です。本研究の成果は、再生不良性貧血から白血病・骨髄異形成症候群にいたるメカニズムの解明に大きく貢献するとともに、今後、白血病の早期診断、早期治療への応用が期待されます。

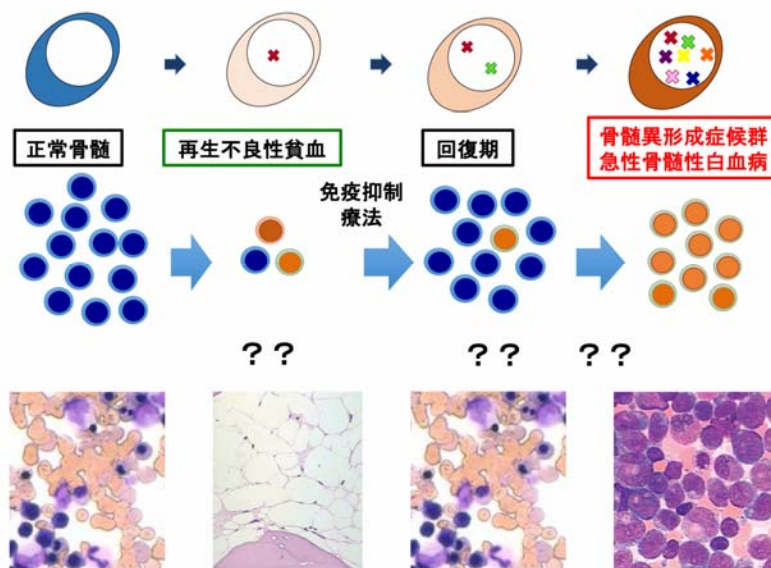
本研究の成果は、米国医学誌「New England Journal of Medicine」電子版にて公開されます。

1. 背景

近年、ゲノム解析の進歩により急性骨髄性白血病では種々の遺伝子に変異が蓄積していることが解明されていますが、これらの血液がんが発症する以前にどのような異常が生じているか、また初期の変化から発症までにどれくらいの時間を要するのかについては、白血病診断以前の試料を得ることが困難なため、ほとんどわかっていませんでした。

一方、再生不良性貧血は、血液の産生を担う造血幹細胞が免疫学的な異常によって破壊されることにより、血液の産生が著しく障害される重篤な疾患です。年間 100 万人あたり約 8 人の発症を認めます。近年、造血幹細胞の破壊を生じている免疫の活性を抑制する免疫抑制療法が開発された結果、その予後は近年大きく改善しましたが、免疫抑制療法によって造血の回復が得られた患者さんの約 10-15%の症例は、経過中に急性骨髄性白血病をはじめとする造血器腫瘍(血液のがん)を発症することが知られています。そこで、経時的に採取・保存された再生不良性貧血の血液検体について、次世代シーケンサーを用いて解析することにより、これらの試料に生じている遺伝子変異を詳細に解析することができると考えられます。

図 1.



2. 研究方法と結果

＜次世代シーケンサーとスーパーコンピュータによる塩基配列の解読＞

再生不良性貧血から白血病を発症する過程で生じている遺伝子変異の挙動を明らかにする目的で、439 症例の再生不良性貧血の患者さんから数年間にわたって継時的に採取された 668 検体の血液試料について、次世代シーケンサーを用いて解析することにより、これらの血液試料に生じている遺伝子変異を解析しました。これらのうち、52 症例 135 検体に対しては全エクソンシーケンス解析により全ての遺伝子領域についての解析を、また、全例について白血病の発症に関わることが知られている候補遺伝子 106 個に関する解析を行い

ました。遺伝子のコピー数異常については、SNP アレイ解析を用いて網羅的な異常の検出を行いました。

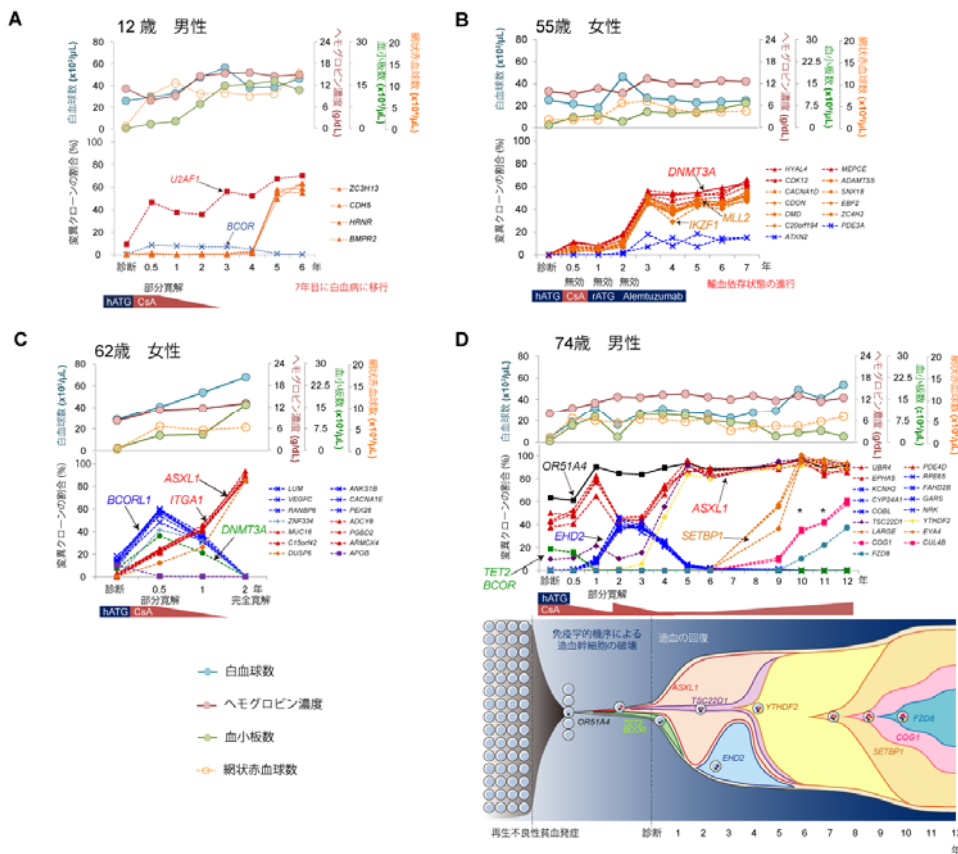
<再生不良性貧血におけるクローン性造血> (注6)

52 症例について行った全エクソンシーケンス解析では、48%の症例で変異を認めました。変異が認められた検体の数、また、一例あたり検出された変異の数は年齢とともに増加する傾向を示し、またこうして検出された変異のパターンの解析からも、こうした変異が加齢に伴って自然に生じる変化によって生じていることが示唆されました。

<変異クローンの継時的挙動>

図2にいくつかの代表的な症例にかおける変異の経時的を示します。

図2.



A の症例では免疫抑制療法によって血球は正常に回復しているにもかかわらず白血病の原因遺伝子の一つである *U2AF1* 変異を有する血球が出現し、6年間の経過を経てこれらの血球成分が新たな変異を獲得しながら増大し、ついには白血病を発症する過程が示されています。この症例では当初は *BCOR* 変異を有する血球も出現していましたが、この血球は経過とともに消失をみとめています。B の症例でも血球は正常に回復しているにもかかわらず、これらの血球はほとんどが白血病で高頻度に認められる *DNMT3A* 変異をもった血球で認められています。この症例では観察期間中の白血病の発症はみとめていません。C の症例では、当初 *BCORL1* 変異と *DNMT3A* 変異をもった血球が出現して拡大していきませんが、これらの血球は2年後にはほぼ消失し、かわりに *ASXL1* 変異を有する血球が多くを占めるよう

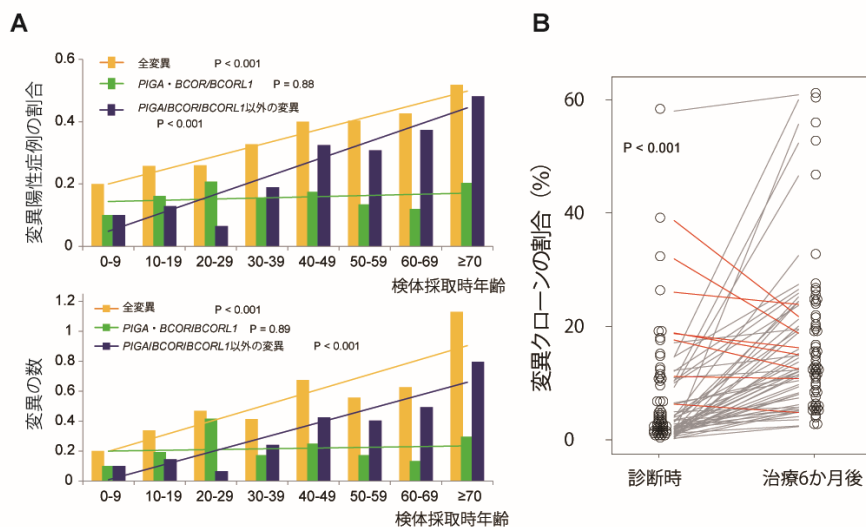
になり、5年後には白血病に類似した造血器腫瘍(骨髄異形成症候群)の発症に至っています。さらに、Dの症例では、12年間のあいだに、様々な変異をもった血球の出現と消失の交代を繰り返しており、観察期間中には白血病の発症は認めていませんが、当初は正常に回復した血球がやがては減少に転じています。これらの結果から、再生不良性貧血の経過中には、数年の経過で、白血病で頻繁に認められる様々な変異をもった血球の出現と消失、交代が認められ、症例によっては白血病へと進展していく経過が明らかになりました。

<再生不良性貧血における変異スペクトラム>

そこで、次に、米国NIH、金沢大学、およびクリーブランドクリニックで集積されたより多数の症例(439例)について、白血病で頻繁にみとめられる原因遺伝子を標的としてこれらの遺伝子に生ずる変異の詳細な解析を行いました。その結果、どの施設の試料についても、約1/3の症例で体細胞変異がみとめられることがわかりました。

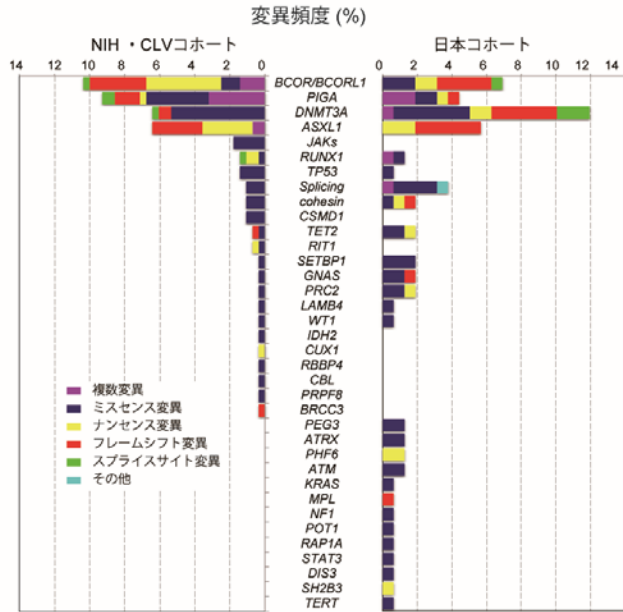
また、SNPアレイを用いた染色体数の異常の解析をあわせると、計47%の症例でゲノム変異をもった血球が認められることが明らかとなりました。変異を有する患者の割合と一症例あたりの変異数は、ここでも年齢とよく相関しており、変異のパターンとあわせて、これらの変異が加齢ともなって生じた変異であることが示唆されました(図3A)。変異をもった血球はほとんどの症例で少ない割合ながら診断時からすでに存在していて、その後増加傾向を示すことがわかりました(図3B)。

図3.



これらの遺伝子は白血病その他の造血器腫瘍で頻繁に変異が認められる遺伝子ですが、再生不良性貧血の経過中に出現する変異陽性細胞の割合(平均20%程度)は、白血病などで認められる変異陽性細胞の割合(60~90%)よりも一般に低い傾向を認めました。さらに、*ASXL1*変異、*DNMT3A*変異は再生不良性貧血でも白血病でもともに高頻度に観察されますが、*BCOR*、*BCORL1*、*PIGA*変異については、白血病と比較して再生不良性貧血で比較的高頻度に認める変異となっていました。一方、*TET2*その他の変異については、白血病その他では高頻度に認められるものの、再生不良性貧血ではまれにしか認められませんでした(図4)。

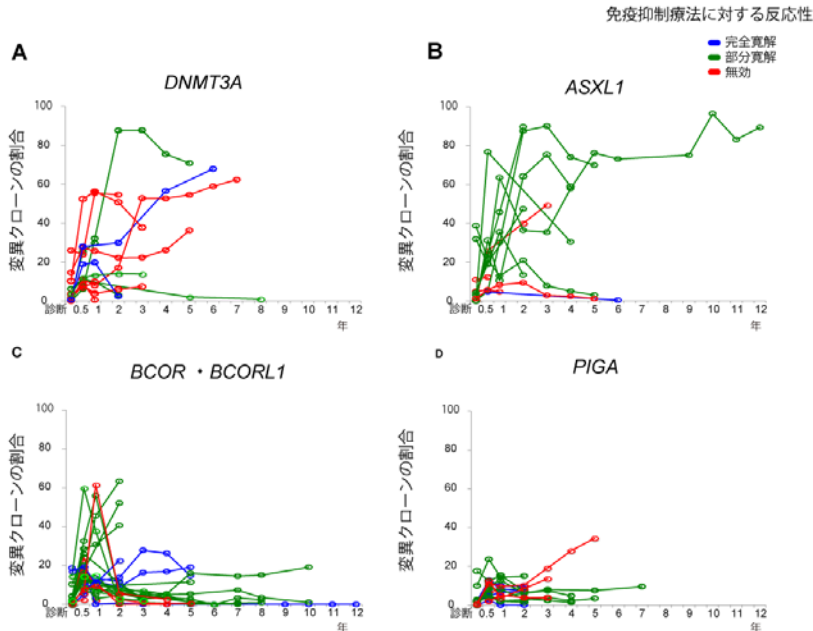
図 4.



<変異の経時的な挙動>

次に、変異が同定された症例について、同定された変異の経時的な挙動について検討を行いました。その結果、*DNMT3A*・*ASXL1*は、時間とともに変異を有する細胞の占める割合が拡大する傾向にありましたが、*BCOR*・*BCORL1*、*PIGA*は横ばいまたは縮小する傾向が認められました(図 5)。このことから、変異によって時間的な変化に大きな違いがあることが明らかとなりました。

図 5.

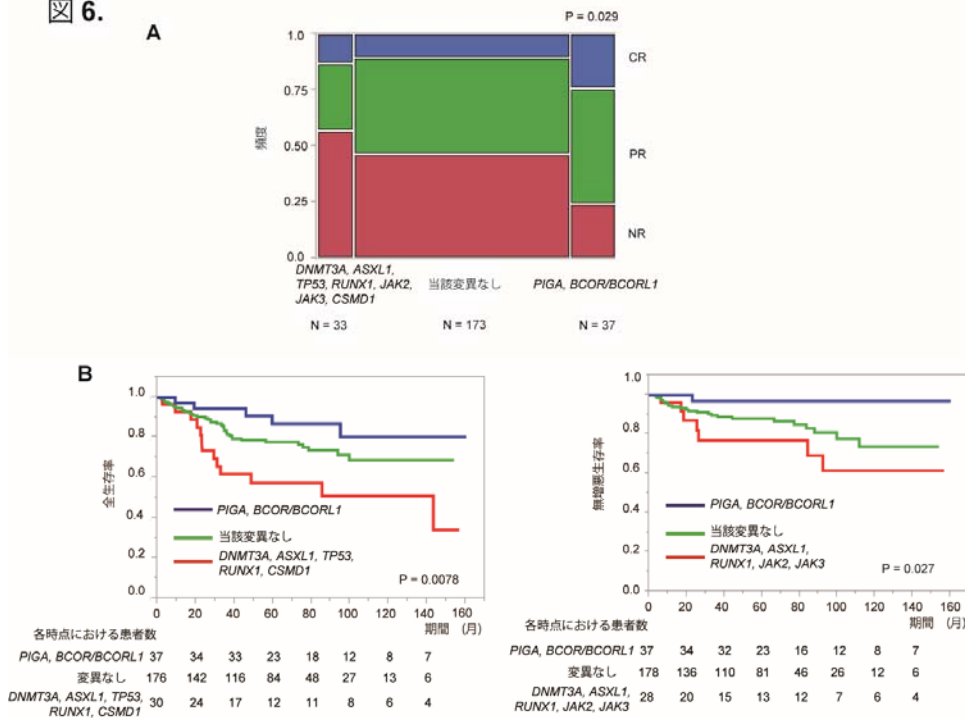


<変異の予後と白血病化への影響>

最後に同定された主要な変異についてそれらの治療効果・予後への影響を均質な時期に検体採取された NIH コホートの症例で観察したところ、変異全体では治療反応性や予後には

影響を認めませんでした。機械学習により予後良好・不良遺伝子を抽出したところ、*BCOR/BCORL1* 変異陽性例では免疫抑制療法への反応が良好なこと(図 6A)、*PIGA*・*BCOR/BCORL1* 変異陽性例では造血器腫瘍への進展がより低頻度で予後も良好なこと、これに反して、*ASXL1*・*DNMT3A*・*TP53*・*RUNX1*・*CSMD1* 遺伝子変異、*ASXL1*・*DNMT3A*・*RUNX1*・*JAK2*・*JAK3* 変異を有する症例の予後は不良で、造血器腫瘍への進展もより高頻度に認められることが明らかとなりました(図 6B)。

図 6.



3. まとめと波及効果

本研究では、再生不良性貧血の年余にわたる経過中に出現する遺伝子変異を、大規模なコホートについて次世代シーケンサーを用いて解析することにより、白血病の発症以前に生ずる遺伝子の変異について、その挙動と予後に及ぼす影響を詳細に明らかにすることに成功しました。再生不良性貧血の分子病態の解明に大きな進展をもたらすとともに、がん(白血病)の発症に先立って生じている造血組織の変化を世界で初めて明らかにした研究成果です。本研究の成果は、再生不良性貧血から白血病・骨髄異形成症候群にいたるメカニズムの解明に大きく貢献するとともに、今後、白血病の早期診断、早期治療への応用が期待されます。

4. 今後の予定

今回の知見により、骨髄異形成症候群・急性骨髄性白血病に移行していない症例にもすでに癌関連遺伝子の変異を高頻度に認め、従来考えられていた以上に骨髄異形成症候群・急性骨髄性白血病と病態が重複していることが判明しました。特定の遺伝子の変異は生存や骨髄異形成症候群・急性骨髄性白血病への移行と相関を認め、再生不良性貧血診断時やその経過中にクローンの検出を試みたり、検出されたクローンを長期に渡って観察したり

することは臨床上重要と考えられます。今後シーケンス技術を臨床の現場に導入することにより、白血病の早期診断、早期治療への応用が期待されます。

<論文タイトルと著者>

<タイトル>

Somatic Mutations and Clonal Hematopoiesis in Aplastic Anemia

<著者>

Tetsuichi Yoshizato ¹, Bogdan Dumitriu ², Kohei Hosokawa ^{2,3}, Hideki Makishima ⁴, Kenichi Yoshida ¹, Danielle Townsley ², Aiko Sato-Otsubo ¹, Yusuke Sato ¹, Delong Liu ², Hiromichi Suzuki ¹, Colin O. Wu ⁵, Yuichi Shiraishi ⁶, Michael J. Clemente ⁴, Keisuke Kataoka ¹, Yusuke Shiozawa ¹, Yusuke Okuno ⁷, Kenichi Chiba ⁶, Hiroko Tanaka ⁸, Yasunobu Nagata ¹, Takamasa Katagiri ³, Ayana Kon ¹, Masashi Sanada ^{1,9}, Phillip Scheinberg ², Satoru Miyano ^{6,8}, Jaroslaw P. Maciejewski ⁴, Shinji Nakao ³, Neal S. Young ², and Seishi Ogawa ¹

¹Department of Pathology and Tumor Biology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan

²Hematology Branch, National Heart, Lung and Blood Institute, Bethesda, United States

³Cellular Transplantation Biology, Division of Cancer Medicine, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa, Japan

⁴Department of Translational Hematology and Oncology Research, Taussig Cancer Institute, Cleveland Clinic, Cleveland, United States

⁵Office of Biostatistics Research, National Heart, Lung and Blood Institute, Bethesda, United States

⁶Laboratory of DNA Information Analysis, Human Genome Center, University of Tokyo, Japan

⁷Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Nagoya University, Japan

⁸Laboratory of Sequence Analysis, Human Genome Center, University of Tokyo, Japan

⁹Department of Advanced Diagnosis, Clinical Research Center, Nagoya Medical Center, Japan

<用語解説>

<注1：急性骨髄性白血病>

造血幹細胞の質的障害により分化に異常を来し、芽球と呼ばれる未分化な細胞が腫瘍性に増殖する疾患。正常な造血が阻害され、また腫瘍性に増殖した白血病細胞が様々な臓器に浸潤することで臓器障害などの症状を引き起こす。

<注2：ゲノム>

ある生物のもつ全ての遺伝情報、あるいはこれを保持する DNA の全塩基配列。タンパク質のアミノ酸配列をコードするコーディング（エクソン）領域とそれ以外のノンコーディング領域に大別される。

<注3：造血不全>

血液中には赤血球・白血球・血小板の3種類の血液細胞が存在するが、これら細胞の1-3系統が減少した状態。血液細胞は骨髄による造血幹細胞により産生される。

<注4：骨髄異形成症候群>

造血幹細胞の質的障害により、単クローン性に血球が産生される疾患であり、血球減少と血球の形態異常を特徴とする。血球細胞は産生される末梢血中に移行する前に細胞死を起こし、末梢血中の血球は減少する。高率に急性骨髄性白血病に移行し、前白血球病的性質を持っている。

<注5：シーケンス>

DNA を構成するヌクレオチドの塩基配列を決定すること。次世代シーケンサーは、従来の蛍光キャピラリーシーケンサーと対比させて用いられる用語。次世代シーケンサーの登場により、大量の塩基配列を短時間で決定することが可能となり、癌おける遺伝子変異の知見が飛躍的に進歩した。

<注6：クローン>

同一の起源由来の均一な遺伝情報を持つ細胞集団。がんは一般的に同一細胞に由来すると考えられ、癌に特徴的な所見と考えられる。