

72. 小児特発性再生不良性貧血における遺伝学的基盤の解明

奥野 友介

名古屋大学 医学部附属病院 先端医療・臨床研究支援センター

Key words : 再生不良性貧血, 次世代シーケンス, 体細胞変異

緒 言

特発性再生不良性貧血は、白血球・赤血球・血小板の汎血球減少を来す疾患である。造血幹細胞に対する自己免疫反応が原因で起こると考えられているが、標的抗原が同定されていないなど、病態の解明は十分ではない。特発性再生不良性貧血の標準治療は HLA 一致血縁ドナーからの骨髄移植であるが、適切なドナーが得られない患者では免疫抑制療法が選択される。造血細胞移植の成績向上に伴い生命予後は改善しているが、約 15% の患者では骨髄異形成症候群並びに急性骨髄性白血病などの血液悪性疾患への進展が認められる。特発性再生不良性貧血の病態解明が十分でないことも相まって、これらの血液悪性疾患が発症する分子学的機構は明らかではない。

最近、成人における特発性再生不良性貧血の遺伝学的基盤を明らかにした報告がなされた¹⁾。約半数例においてクローン造血の証拠となる体細胞遺伝子変異が検出された。高頻度に変異が検出される遺伝子は *PIGA*、*BCOR/BCORL1*、*DNMT3A*、*ASXL1* であった。このうち前 2 者の変異を有する症例は免疫抑制療法の反応性が良好であり、予後良好を予測した。骨髄異形成症候群で高頻度に認められる後 2 者の変異は、予後不良を予測する指標であった。*PIGA* 変異、*BCOR/BCORL1* 変異、または HLA をコードする染色体領域のヘテロ接合性喪失などは、免疫系からの攻撃を回避する機能を獲得し、生体内での増殖におけるアドバンテージを獲得した可能性が考えられる。それとは対照的に、*DNMT3A* 変異や *ASXL1* 変異は、前白血病状態の造血幹細胞を生み出し、自律的増殖の速度が高まった結果、クローン造血に至った可能性が考えられる。

小児の特発性再生不良性貧血の診断においては、先天性造血不全症との鑑別も問題になる²⁾。正確な診断が適切な治療方針を決定するために重要である。しかし、ファンconi 貧血・先天性角化不全症・ダイヤモンドブラックファン貧血などの先天性造血不全症も血球減少症として発症するうえ、一部の症例は身体異常を伴わないため、臨床診断はしばしば困難である。遺伝子変異解析が確定診断には必要であるが、これらの疾患に関連する遺伝子は 100 近くに及び、従来のサングァー法による遺伝子診断は極めて困難である。小規模な症例報告として、特発性再生不良性貧血と診断された患者に、先天性造血不全症の診断的な遺伝子変異が検出されることが報告されている。しかしながら、臨床的に診断される小児特発性再生不良性貧血の患者における先天性造血不全症の関与を体系的に明らかにした研究はない。

小児の特発性再生不良性貧血をさらに複雑にするのは、2008 年の WHO 分類で提唱された小児不応性貧血 (refractory cytopenia of childhood) という概念である。組織病理学的な造血細胞の異形性を有する小児不応性貧血と有さない小児特発性再生不良性貧血を区別する概念であるが、病態生理学的な裏付けがないままに、従来は再生不良性貧血と診断されていたと思われる症例が骨髄異形成症候群の一群に分類されてしまう懸念がある。事実、専門の小児血液、病理医による中央診断においてもその診断一致率は 8 割程度である。組織病理学よりも客観的な、遺伝子解析に基づいて、この分類の意義を検討する必要が生じている。

名古屋大学小児科は継続して小児特発性再生不良性貧血の診療を行っており、世界でも他に類を見ない、大規模かつフォローアップ期間の長い小児特発性再生不良性貧血患者のコホートと臨床検体を蓄積している。これを利用して、成人症例の解析で明らかになった知見をさらに深めるのみならず、成人と小児における遺伝子変異の相違や、先天性造血不全症・小児不応性貧血等の小児特有の問題も明らかにして、特発性再生不良性貧血の病態を解明することが本研究の目的である。

方 法

1. 検体の収集・臨床情報の収集

本研究について、名古屋大学医学部の倫理委員会で承認を得た。名古屋大学医学部附属病院及び名古屋第一赤十字病院に蓄積された検体と臨床情報を照合し、検体を整理・収集した。QIAamp DNA Blood Mini Kit、あるいは QIAamp DNA Investigator Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。

2. 病理組織学的分類

2008 年の WHO 分類を用いて、細胞の異形成などに基づく病理組織学的な分類を行い、収集された症例を、再生不良性貧血 (aplastic anemia: A)、小児不応性貧血 (RCC) と、refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD) の 3 群に分類した。

3. ターゲットシーケンス解析・全エクソーム解析

先天性造血不全症並びに血液悪性疾患の標的 184 遺伝子を含む独自設計のベイト (Agilent) を用いたターゲットシーケンス解析を行った。並行して、20 例について、SureSelect XT Clinical Research Exome ベイト (Agilent) を用いた全エクソーム解析を行った。次世代シーケンサーは、HiSeq2500 (Illumina) を用いた。

4. 遺伝子変異の検出

データ解析は、構築済みの解析パイプラインを用いて行った³⁾。Burrows-Wheeler aligner と Novoalign (Novocraft) を併用したアラインメント後に、VarScan を用いてバリエーションコールを行い、ANNOVAR を用いてアノテーションを行った。各バリエーションを SNP データベース (in house SNP データベース、HGVD、ESP6500、並びに ExAC) と照合して common SNPs を除去し、病的変異データベース (HGMD、NCBI ClinVar) と照合して、既報の病的変異を抽出した。アリル頻度とリファレンスサンプルに基づいて体細胞変異・germline 変異を区別した。

5. 遺伝子診断の検討

American College of Medical Genetics (ACMG) のガイドラインに従いバリエーションを分類した⁴⁾。本ガイドラインにおいて class 1 (病的意義が報告されているバリエーション)、ならびに class 2 (遺伝子を不活化するバリエーション) の、病的意義が確実であるといえるバリエーションに基づいて遺伝子診断を検討した。常染色体劣性遺伝の形式を取る疾患については、両アリルに病的変異が証明されるもののみを診断的と考えた。

6. 6 番染色体短腕ヘテロ接合性消失 (6pLOH) の検出

6 番染色体短腕に存在するヘテロ SNP について、アリル頻度を測定した。6pLOH によって、SNP のアリル頻度が 50% にならず、偏りが生じることを利用して、HLA 領域のヘテロ接合性喪失を検出した。

7. 統計解析

検出された遺伝子変異について、全生存、免疫抑制療法への反応性、造血細胞移植の成績、clonal evolution の頻度等、各臨床パラメータとの相関を解析した。

結 果

1. 胚細胞変異の網羅的検出と遺伝子診断の検討

116 例の小児特発性再生不良性貧血症例について、ターゲットシーケンス解析を行った。その結果、胚細胞変異については、小児不応性貧血に分類される 1 例 (0.8%) について、先天性角化不全症の診断を支持する変異 (*RTEL1* c.686 + 1G > A、エクソン 7 のスプライスサイト変異) が検出された。本症例は、造血細胞移植後に、爪の変形とテロメア長の短縮といった症状が現れており、遺伝型と表現型は関連すると考えられた。これ以外には、Fanconi 貧血や Diamond-Blackfan 貧血を含めて、他の先天性造血不全症に関連する診断的な変異は検出されなかった。

2. 体細胞変異の網羅的検出

体細胞変異については、116 例中 11 例 (9.5%) について、1 つ以上の体細胞変異が検出された。遺伝子ごとにみると、*BCOR* 遺伝子変異が 6 例 (5.1%)、*PIGA* 遺伝子変異が 2 例 (1.7%)、*DNMT3A* 遺伝子変異と *TP53* 遺伝子変異と *U2AF1* 遺伝子変異が各 1 例 (0.8%) に認められた。成人では高頻度で検出される *DNMT3A* 遺伝子変異が 1 例でしか検出されなかった一方、*BCOR* 変異は成人に近い頻度で検出されており、成人とは大きく体細胞変異の分布が異なる可能性が考えられた。

3. 体細胞変異と病理組織学的分類の相関

小児特有の問題として、病理組織学的な分類と、体細胞変異との相関を検討した。病理組織学的な再生不良性貧血 (AA、62 例)、小児不応性貧血 (RCC、40 例) と refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD、14 例) の間で、体細胞変異の頻度に違いは見られなかった (図 1、 $p = 0.49$)。

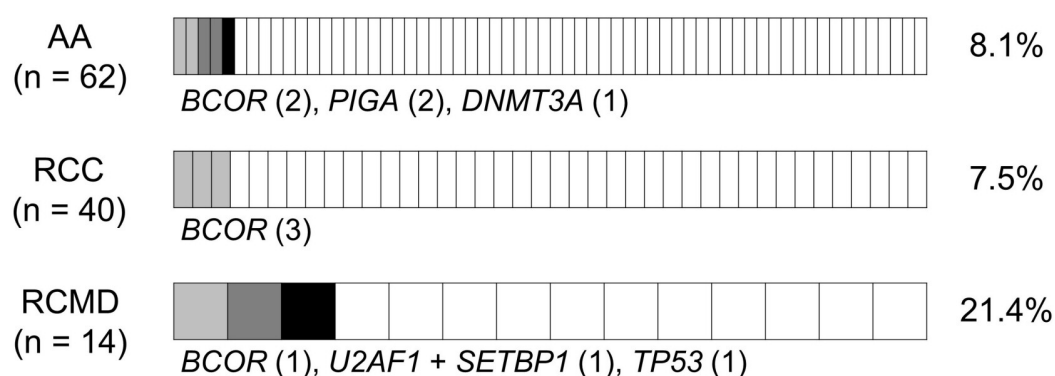


図 1. 体細胞変異と病理組織学的分類

小児特発性再生不良性貧血の各組織型 (AA：再生不良性貧血、RCC：小児不応性貧血、RCMD：Refractory cytopenia with multilineage dysplasia) における体細胞変異の検出頻度。色付けされた部分が体細胞変異が検出された症例を意味する。組織型ごとに、体細胞変異が検出された遺伝子と症例数を示す。

体細胞変異の頻度に統計学的な差異は検出されなかったが、変異する遺伝子について、病理組織学的な分類と関連がある可能性が考えられた。すなわち、RCMD 症例に、小児例として初めての *U2AF1* 変異例が見つかった。この遺伝子変異は成人では骨髓異形成症候群の表現型と関連するが、小児では特発性再生不良性貧血の一型と診断されている可能性が考えられた。もう 1 例の RCMD 症例では、*TP53* 変異が検出されており、これも骨髓異形成症候群と関連する変異である。

4. 6 番染色体短腕ヘテロ接合性消失 (6pLOH) の検出

6 番染色体短腕には、ヒト白血球抗原 (HLA) が存在する。腫瘍免疫、あるいは移植片対宿主病において、HLA の片アリルが消失することで、免疫学的な攻撃を回避するという機構が存在する。成人の特発性再生不良性貧血においても、造血幹細胞への自己免疫を回避するため、6pLOH が生じることが知られている。

今回ターゲットシーケンス解析を行った 116 例のうち、11 例 (9.4%) において 6pLOH が検出された (図 2)。この頻度は、他の遺伝子の体細胞変異の頻度よりも高く、6pLOH は小児特発性再生不良性貧血において高頻度に見られる変異であると考えられた。また、体細胞変異の解析においても、*BCOR* 遺伝子と *PIGA* 遺伝子の変異の頻度が高かったが、これらは免疫学的な攻撃の回避に関わっている可能性が示唆されている。6pLOH が高頻度であることも、これと併せて、小児特発性再生不良性貧血における遺伝子変異が、免疫学的な攻撃による圧力を受けて生じている可能性が示唆された。

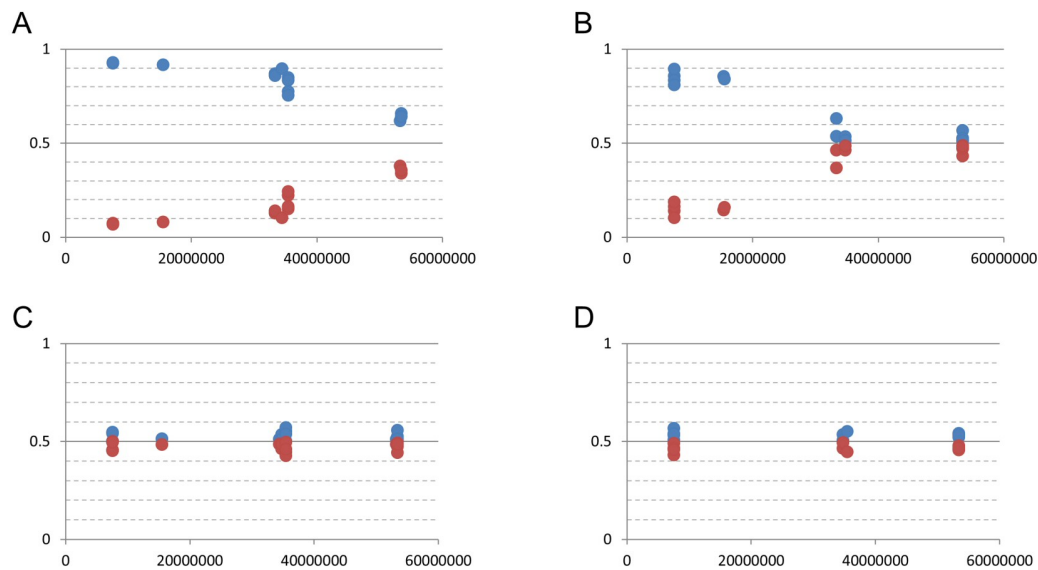


図2. 6番染色体短腕ヘテロ接合性消失 (6pLOH) の検出

X 軸はゲノム座標（およそ 30,000,000 の位置が HLA に相当する）を示し、Y 軸はアリル頻度を示す。1 対の点（赤と青）が 1 つのヘテロ SNP を示す。通常ヘテロ SNP においては 2 つのアリルが等頻度で観察されるため、アリル頻度は 0.5 である。A と B に示す症例では、ヘテロ SNP のアリル頻度が 0.5 から大きく離れており、6pLOH の存在が示唆される。C と D は 6pLOH が検出されなかった症例の例である。

5. 体細胞変異と臨床的指標との相関

体細胞変異の存在と、様々な臨床的な指標との相関を、統計学的に解析した。しかしながら、免疫抑制療法への反応性、5 年間のクローン進化（新たな染色体異常の獲得）の頻度、5 年全生存率のいずれについても、体細胞変異の有無との有意な関連を認めなかった。

考 察

次世代シーケンスを用いた網羅的解析により、断片的にしか明らかにされていなかった小児の特発性再生不良性貧血の遺伝学的基盤が明らかになった。すなわち、染色体脆弱性試験やテロメア長測定等、先天性造血不全症を除外するための臨床検査が行われた症例については、遺伝学的に先天性造血不全症が診断されることは稀であり、現在行われている臨床検査の有用性が示されたものと考えられる。次世代シーケンスによる先天性造血不全症の遺伝子診断効率率は約 40% であり、遺伝子診断が得られないことが先天性造血不全症の関与を否定するものではないが、少なくともその頻度が高くないことは明らかとなった。

体細胞変異についても、小児と成人における遺伝学的基盤の違いが明らかとなった。すなわち、成人において高頻度に観察され、骨髓異形成症候群と関連する *DNMT3A* 変異や *ASXL1* 変異の頻度は小児では非常に低く、獲得される変異は異なることが明らかとなった。免疫学的な攻撃の回避に関わると考えられる *BCOR* 変異や *PIGA* 変異の頻度には大きな差は認められなかった。近年、健常な成人においても、稀に *TET2* 変異をはじめとした体細胞変異を獲得した造血幹細胞が造血を行っていること（クローン造血）が報告されている。ここから推定されることは、正常な骨髓においても、少数の造血幹細胞は年齢とともにクローン造血をきたす体細胞変異を獲得するということである。成人では免疫学的な攻撃の結果、変異を獲得していた造血幹細胞が骨髓において優位になるが、小児では造血幹細胞が変異を獲得していないため、そういった細胞が優位とならない、という仮説が考えられる。

小児 RCMD 例において、*U2AF1* 変異が同定された。この症例は、後に骨髓異形成症候群を発症していた。*U2AF1* 遺伝子を含む血液悪性疾患に関連する遺伝子の変異を定期的に探索することで、骨髓異形成症候群・急性骨髄性白血病への clonal evolution を早期に検出し、造血細胞移植を含めた早期の治療を行える可能性が考えられる。

本研究により、小児特発性再生不良性貧血の遺伝学的な基盤が明らかになった。先天性造血不全症の関与は稀であり、体細胞変異は成人のそれとは大きく異なっていた。これらの知見を基に、診断時とその後の定期的な遺伝子解析など、よりよい診療に貢献できる臨床検査の構築が期待される。

共同研究者

本研究の共同研究者は、名古屋大学医学部附属病院小児科の成田敦、村松秀城および小島勢二である。

文 献

- 1) Yoshizato T, Dumitriu B, Hosokawa K, Makishima H, Yoshida K, Townsley D, Sato-Otsubo A, Sato Y, Liu D, Suzuki H, Wu CO, 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 Engl J Med*. 2015 Jul 2;373(1):35-47. doi: 10.1056/NEJMoal414799. PubMed PMID: 26132940.
- 2) Hama A, Takahashi Y, Muramatsu H, Ito M, Narita A, Kosaka Y, Tsuchida M, Kobayashi R, Ito E, Yabe H, Ohga S, Ohara A, Kojima S. Comparison of long-term outcomes between children with aplastic anemia and refractory cytopenia of childhood who received immunosuppressive therapy with antithymocyte globulin and cyclosporine. *Haematologica*. 2015 Nov;100(11):1426-33. doi: 10.3324/haematol.2015.128553. Epub 2015 Aug 13. PMID: 26273061
- 3) Suzuki K, Okuno Y, Kawashima N, Muramatsu H, Okuno T, Wang X, Kataoka S, Sekiya Y, Hamada M, Murakami N, Kojima D, Narita K, Narita A, Sakaguchi H, Sakaguchi K, Yoshida N, Nishio N, Hama A, Takahashi Y, Kudo K, Kato K, Kojima S. MEF2D-BCL9 Fusion Gene Is Associated With High-Risk Acute B-Cell Precursor Lymphoblastic Leukemia in Adolescents. *J Clin Oncol*. 2016 Oct 1;34(28):3451-9. doi: 10.1200/JCO.2016.66.5547. Epub 2016 Aug 9. PubMed PMID: 27507882.
- 4) Richards CS, Bale S, Bellissimo DB, Das S, Grody WW, Hegde MR, Lyon E, Ward BE; Molecular Subcommittee of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee.. ACMG recommendations for standards for interpretation and reporting of sequence variations: Revisions 2007. *Genet Med*. 2008 Apr; 10(4):294-300. doi: 10.1097/GIM.0b013e31816b5cae. PMID: 18414213