

再生不良性貧血における7番染色体欠失クローン進化機序の解明

材木義隆

金沢大学附属病院 血液内科

【研究の背景】

再生不良性貧血(AA)に対する免疫抑制療法(IST)の奏効率は、トロンボポエチン受容体作動薬(TPO-RA)の併用によって著しく向上したが、TPO-RAの造血刺激に伴い骨髄異形成症候群(MDS)や急性骨髄性白血病(AML)へのクローン進展増加が懸念されている。IST後に合併するMDS/AMLの多くには、7番染色体の欠失(-7)が関与している。最近、HLAアリル欠失を伴う-7陽性MDSを発症したAA例において、MDS移行前に凍結保存した細胞からHLAアリル欠失分画をソーティングして-7血球比率を経時的に調べたところ、IST後早期から全単核球の1%に満たない微小-7クローンが末梢血中に潜在しており、このクローンが2年以上かけて徐々に拡大した結果、MDSを発症していたことが明らかになった(Zaimoku et al. Blood 2021)。通常の細胞遺伝学的検査は感度が低いため、このような微小-7クローンはこれまで検出することができなかった。

【目的】

AA患者における微小-7クローンの保有率やその自然経過を明らかにし、また二次性MDS/AMLの早期発見と早期治療の有用性を探るために、-7の高感度検出法を開発することを目的とした。

【方法】

7番染色体由来高発現RNAのヘテロ接合性の喪失(LOH)、もしくは7番染色体由来蛋白の発現量低下を利用した2種類の方法を用いて、シングルセルレベルで-7を検出する方法の開発に取り組んだ。

【結果】

末梢血単核球を用いたシングルセルRNAシーケンスデータを利用して、7番染色体上に位置しほとんどすべての単球に均一に高発現している遺伝子を検索したところ、9種類の候補遺伝子が得られた。このうち4遺伝子は日本人において32%以上の確率でヘテロ接合性である一塩基多型(SNP)を有し、それぞれに対するジェノタイプング用のTaqManプローブとプライマーを設計した。このうち7番染色体の短腕と長腕に位置する2種類のSNPでは、RNAを含むシングルセルライセートを用いたone step RT-qPCR法で、明確にLOHを検出することができた。さらに、この2種類のSNPジェノタイプングはマルチプレックス法により同時に判定することができた。次に、7番染色体遺伝子由来の高発現蛋白に結合するモノクローナル抗体を用いて、-7症例と健常人の単球における蛋白発現量をフローサイトメトリーで比較したところ、予想通り-7症例では健常人と比べて蛋白発現量が半減していた。このフローサイトメトリー法のみでは、正常細胞と-7細胞を明確に区別することはできなかったが、蛋白発現量が低い細胞集団をソーティングすることにより-7細胞集団を濃縮し、その他の検査と組み合わせることで検出感度の向上に寄与できると考えられた。

【考 察】

高発現遺伝子のLOHおよび細胞表面蛋白質の発現低下を利用して-7クローンを高感度に検出する方法の開発に成功した。今後、これらの方法および従来のFISH法などを組み合わせて微小-7クローンをより正確に検出する方法を確立し、AA患者におけるマススクリーニングを開始する予定である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

今後患者検体を用いた解析により微小-7クローン検出の臨床的意義が明らかになる見込みである。

【参考・引用文献】

Zaimoku Y, Patel BA, Adams SD et al. HLA associations, somatic loss of HLA expression, and clinical outcomes in immune aplastic anemia. *Blood* 2021 Nov 1 Online ahead of print.