

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 718 号	学位申請者	新居 亮彦
審査委員	主査	岡本 康裕	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	橋口 照人	副査 西川 拓朗
	副査	原 博満	副査 窪田 琢郎

主査および副査の5名は、令和5年11月30日、学位申請者 新居 亮彦 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 本態性血小板血症 (以下 ET) では血小板数が血栓症発症に影響か。形態や機能的変化が影響するのか。

(回答) ETにおいて血小板数150万以上は血栓症のリスク因子として抽出されている。ETにおける血小板は比較的大型であることが知られている。巨核球も大型で広い細胞質を持ち多分葉核となっている。二次性血小板増多症と比較し、ETでは血小板凝集能が低下しているという報告がある。

質問2) 骨髄増殖性腫瘍 (以下 MPN) では共通する *JAK2* V617F 遺伝子変異があるのに表現型が異なるのはなぜか。

(回答) *JAK2* V617F 変異に関して、真性多血症 (以下 PV) と ET を比較すると PV の方が homozygous 変異を有する例の割合が多い (25-30% VS 2-4%)。さらに Variant allele frequency (以下 VAF) が高い程、ET においても PV への移行が多い傾向があることが報告されている。またエピジェネティック修飾因子である *TET2* 遺伝子の変異も PV では 9.8-16% に対して、ET では ~4% 程度とされる。健常人においても疾患表現型を示さずに *JAK2* V617F 変異を有していることも示されており、*JAK2* V617F が MPN の表現型を決定する唯一の要因ではないことが示唆されている。

質問3) Table2 について、単変量解析では有意差がでない因子が、多変量抽出されているのはどうしてか。

(回答) 今回解析に投入した変数は既報でリスク因子として同定されたものを投入した。症例数が少ないことによる外れ値の影響や同定できていない交絡因子の影響があったと考える。

質問4) 20 症例の TN-ET で白血球数や LDH は低値であることが示されていたが *JAK2* 症例と比較して血栓予後はどうであったか。既報と比較してどうか。

(回答) 大規模なコホート研究では *JAK2* 変異、*CALR* 変異、*MPL* 変異、TN-ET それぞれの群間で生命予後や血栓症合併リスクについて結論がでていない。既報でも白血球数や LDH の上昇が比較的限定的であることが報告されており、本報告とは矛盾しなかった。

質問5) TN-ET の症例でも 60 歳になったらハイリスクとして抗血小板剤を開始するのか。

(回答) ET と診断されれば 60 歳以上となった時点で抗血小板剤投与と細胞減少療法を考慮する。ただし TN-ET での適切なマネジメント法については未知である。特に今回 4 例の家族性血小板血症例が明らかとなり、ET と同様な対応が妥当か今後のマネジメントについてはさらに注意が必要と考えられた。

質問6) *THPO* スプライシング異常例ではその家族に小児で急性骨髄性白血病 (AML) を児で認めている。今回の遺伝子変異が AML に関与しているのか。また通常 ET から AML への転化は通常 10 年程度と言われているが、今回児では非常に若年で発症しているのはなぜか。

(回答) *THPO* スプライシング異常による報告で急性白血病の報告は 60 歳で発症した急性骨髄性白血病 1 例にとどまる (Posthuma H et al. Blood 2010;116:3375-6)。本変異が AML 発症に関与しているかどうか不明である。ET の場合は造血幹細胞に異常があり、他の変異の蓄積で AML を発症することが推察されるため、その発症に一定の期間が必要である。本変異は造血幹細胞への異常ではなく、高トロンボポエチン血症による血小板増多である。白血病化の機序は異なると思われる。

質問7) 同症例で児も母親と同様に TN-ET と診断されるのか。

(回答) 児は血小板増多症をきたしており、母親と同じ *THPO* スプライシング変異を有していた。トロンボポエチン (以下 TPO) 濃度上昇による血小板増多症であり、家族性血小板増多症と診断され、TN-ET ではない。

質問8) *MPL* #636Wex1+12 変異と *MPL* E237K 変異はともに野生型より増殖能の上昇が示されているが、典型的なホットスポット変異である *MPL* W515K より増殖能は低い結果となっている。これは症例における血球増多の程度や LDH の上昇の程度と相関するか。

(回答) *MPL* #636Wex1+12 変異症例と *MPL* E237K 変異症例ともに血小板数 100 万程度と低い値ではなかった。*MPL* W515K を有している症例でも血小板数にはばらつきがあり、血小板数を規定するには他の因子が関与している可能性がある。LDH の値は骨髄線維化をきたしている症例で高い傾向があることが知られており、血小板数と同様に増殖能以外の因子が関与している可能性がある。

質問9) TN-ET が若年発症する原因は何か。

(回答) 今回の検討で TN-ET には家族性血小板増多症が 20% 含まれていることが判明した。生殖細胞系列変異を有する症例では初回の血算測定時に血小板増多が判明しており、診断が比較的若年となる。家族性血小板増多症を除いた TN-ET では *JAK2* 変異や *CALR* 変異を有する例と比較して有意に低年齢ではなかった。これまでの TN-ET は若年とする報告では家族性血小板増多症が含まれていた可能性がある。

最終試験の結果の要旨

質問 10) TN-ET と診断され新規ドライバー変異を同定できなかった症例に対して、どのようなアプローチが可能か。

(回答) TN-ET 症例において融合遺伝子がドライバー変異として同定された報告がある。Non-coding region の変化が血小板増多の原因となったという報告はないが、ゲノム構造異常が血小板増多の原因となる可能性はある。従って RNA-seq や全ゲノム解析により新規ドライバー変異を検出できる可能性がある。

質問 11) *MPL**636Wext*12 変異で *STAT5* のプロモーター活性化の変化が認められなかったのは本変異の特徴か。

(回答) 本変異により *MPL* Y626 のリン酸化亢進をきたすが *MPL* Y626 のリン酸化は *GAB1/2*, *SHIP1*, *SHC* 及び *STAT3* を含む下流シグナル伝達タンパク質の活性化に必要であり、その結果 *ERK1/2*, *AKT* 経路の活性化をもたらす。*MPL* では変異によりチロシンリン酸化プロファイルが異なっており、*STAT5* を含めた下流シグナル伝達タンパク質の活性化の多様性の一因と考える。

質問 12) *MPL**636Wext*12 ストップコドンの変異により具体的に何が起きているのか。

(回答) non-stop decay は、ストップコドンを欠く mRNA 分子を検出し、これらの mRNA が翻訳されないようにするための、mRNA 監視の細胞機構である。従って今回検出した *MPL**636Wext*12 も生体内で発現するか不明であった。今回の検討では *MPL**636Wext*12 は *in vitro* において安定して強制発現できること、*MPL* Y626 の恒常的なリン酸化をきたすことを確認した。*MPL* Y626 はトロンボポエチン刺激によりリン酸化され、TPO を介した増殖に必須とされている。本変異による細胞増殖能獲得の本態である可能性があるが、*MPL* Y626 のリン酸化機序は明らかにできていない。

質問 13) *MPL* E237K について TPO との結合について具体的な構造的変異は判明しているか。

(回答) これまで TPO と *MPL* 結合の立体構造解析は不明であったが、Tsutsumi らがクライオ電子顕微鏡を用いた立体構造解析で、*MPL* や *THPO* 変異による TPO の結合能の変化と細胞内シグナルの変化について報告した (Tsutsumi et al. 2023, Cell 186, 4189-4203)。*MPL* E237K 変異による変化も本モデルを用いて明らかにできる可能性がある。

質問 14) *THPO* exon3 スプライシング変異について、本症例でエクソン 3 がスキップされることは確認したか。肝臓組織での評価は行ったか。

(回答) 患者由来リンパ球で検討したが、*THPO* の mRNA の発現は検出できなかった。*THPO* の発現は主に肝細胞で行われており、肝細胞を用いた検討が必要だが検体採取の問題で困難である。本報告以降同じ変異が日本から報告された (Kimura H et al. Ann Hematol. 2023 Nov 14)。その報告では *THPO* exon1~exon 3 までのゲノム配列に exon 4 以降の cDNA を有する組み換えプラスミドを作成し、本スプライシング異常による exon 3 スキップが確認されている。

質問 15) *CALR* は小胞体に存在するとのことだが細胞膜外にある *MPL* 結合部位にどのように結合するのか。

(回答) 変異 *CALR* は二量体を形成し、小胞体内で *MPL* と結合し、その複合体が細胞膜上に移動する。

質問 16) 生殖細胞での変異症例についてアリル頻度はどうであったか。

(回答) アリル頻度は 0.5 付近であった。尚今回の研究ではアリル頻度が 0.5 に近いものを生殖細胞系列変異疑いとして、リンパ球や口腔粘膜由来 DNA からの解析を行っている。

質問 17) エクソーム解析、遺伝子パネル検査でどのように新規ドライバー変異を抽出したか。

(回答) エクソーム解析では最低シーケンス深度 (read depth) 40 をカットオフ VAF 10%以上を抽出し、common SNP の除外には 1000 ゲノムプロジェクトにおいて 1%以上の変異頻度は除外した。遺伝子パネル検査では最低 read depth 5000 をカットオフとし、VAF 0.1%以上を抽出した。common SNP の除外には 1000 ゲノムプロジェクトにおいて 1%以上の変異頻度は除外した。

質問 18) MPN 造血幹細胞に生じた遺伝子変異がどのように末梢血におけるアリルバーデンの違いを生じさせるのか。

(回答) *JAK2* V671F 変異は造血幹細胞の時点で変異が導入されていることが知られている。造血幹細胞が特定の lineage に分化するのは、確率論的なモデル (stochastic model) で説明されており、赤芽球系へ分化が多い場合には赤芽球系の増加が起きる。*JAK2* V671F のアリルバーデンは末梢血白血球由来 DNA を用いた解析であり、造血幹細胞からの分化のゆがみの差によってアリルバーデンに幅が出ると考えられる。

質問 19) なぜリンパ系細胞である BaF/3 細胞を選択したのか。

(回答) BaF/3 細胞株は C3H 系統マウス由来の IL-3 依存性マウス pro-B 細胞株である。これまで MPN における機能獲得型 *JAK2* 変異や *MPL* 変異の *in vitro* の機能評価に広く用いられていたため、本研究でも選択した。培養と遺伝子導入が容易で、継代培養も低コストである。尚ヒトトロンボポエチン依存性細胞株 UT-7 を細胞株候補として挙げたが、入手することができなかった。

質問 20) 今回の症例数では、TN-ET 集団の臨床像を明らかにするには不十分であった。どのように解決すべきか。

(回答) 症例数を増やすことと観察期間を延ばすことに加えて、鹿児島県のみではなく、全国レベルでのレジストリー研究へアップグレードなどが必要であると考えられる。

質問 21) *MPL* L265F が ET のドライバー変異とするならば、日本人で 0.31%に認める SNP であることは非常に多く感じる。*MPL* L265F は全て TN-ET を発症するか。

(回答) *MPL* L265F は日本人では 0.31%と頻度が高く、ET の病的バリエーションかどうか不明であった。*In silico* 解析でも病的バリエーションとは判断されていなかった。近年血液学的形質に関するエクソームワイド関連研究により、*MPL* L265F はアジア人集団における血小板数の増加と関連することが明らかになった。我々の症例では血小板数の増加は限定的であった (52.8 万)。この変異が単独で血小板増多のドライバー変異であるかどうかは不明であるが、血小板増多に影響を及ぼしている可能性はある。この変異を有する患者における血栓症のリスクを決定するためには、さらなる研究が必要である。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。