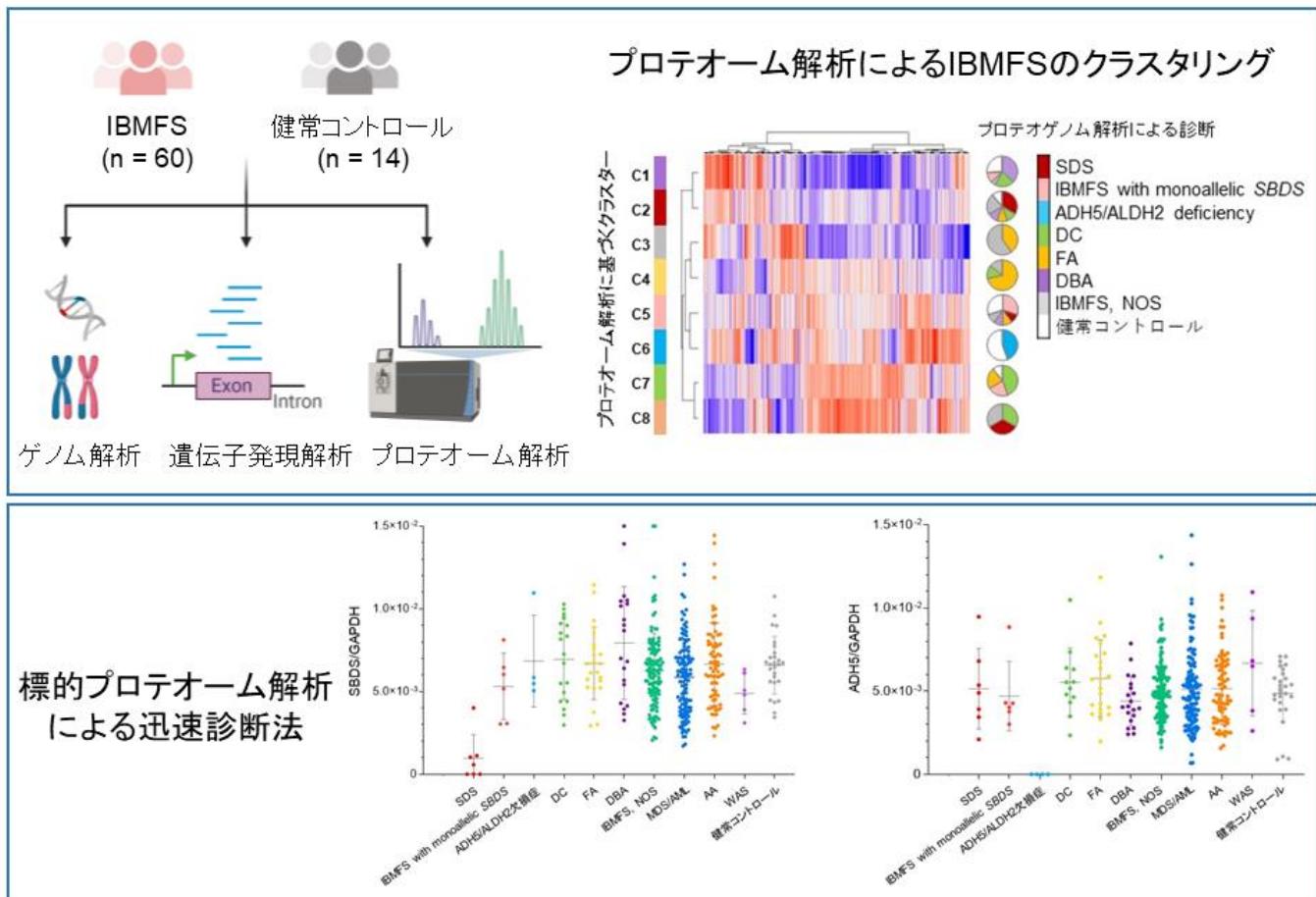


遺伝性骨髓不全症候群に対する新たな診断システムを構築 ～タンパク質発現に基づく「高深度プロテオーム解析」が 診断率の向上に寄与～

【ポイント】

- ・遺伝性骨髓不全症候群(IBMFS)は、先天的な遺伝子変異が原因で、貧血、血小板減少、好中球減少などの正常な血液細胞を造ることができない病気です。
- ・高深度プロテオーム解析とゲノム解析を組み合わせた「プロテオゲノム解析」は、IBMFS の早期の診断・治療介入につながることが期待されます。
- ・高深度プロテオーム解析結果に基づく「標的プロテオーム解析」は、シュワッハマン・ダイアモンド症候群や ADH5/ALDH2 欠損症などの IBMFS に対する有用な診断検査となる可能性があります。

プロテオーム解析に基づく遺伝性骨髓不全症候群の診断検査システム



【要旨】

名古屋大学大学院医学系研究科 小児科学の高橋 義行 教授、村松 秀城 講師、若松 学 助教、公益財団法人かずさDNA研究所 小原 收 副所長、川島 祐介 応用プロテオミクスグループ長らの研究グループは、遺伝性骨髓不全症候群(Inherited bone marrow failure syndrome; IBMFS)(※1)に対する高深度プロテオーム(※2)解析を行い、シユワツハマン・ダイアモンド症候群(SDS)や ADH5/ALDH2 欠損症に対して、タンパク質発現に基づいた迅速かつ簡便なスクリーニングシステムを構築することに成功しました。

IBMFS は、先天的な遺伝子変異が原因で、正常な血液細胞が造れなくなり、貧血、血小板減少、顆粒球減少を呈する病気です。IBMFS には、SDS、ファンコニ貧血(FA)、ダイアモンド・ブラックファン貧血(DBA)、先天性角化不全症(DC)、ADH5/ALDH2 欠損症などの病気が含まれます。これらの病気は、全身の合併症や発がん素因が関連しているために、正確な診断を行い、適切な治療とフォローアップを受ける必要があります。次世代シーケンサー(※3)による遺伝子解析(Next-generation sequencing; NGS)の導入により、各段に遺伝子診断が容易になりましたが、技術的な問題から正しい診断がなされず、見逃される症例が存在します。このような背景から、NGS による遺伝子解析以外の新しいアプローチによる診断検査法の確立が望まれていました。

プロテオーム解析は、高性能な質量分析装置(※5)を用いて、生物学的サンプルからタンパク質を同定・定量し、網羅的なタンパク質の発現解析を行うことができます。従来のプロテオーム解析では、技術的な限界のために約 3,000 種類のタンパク質の解析しか一度に測定できませんでしたが、最新の質量分析器を用いた高深度プロテオーム解析では、検出が難しいキナーゼや転写因子などの微量なタンパク質も対象に含めたタンパク質の発現解析が可能であり、約 10,000 種類のタンパク質を解析することができます。

本研究では、IBMFS 患者に対してプロテオーム解析を行い、それぞれの病気に特徴的なタンパク質発現プロファイリングを持つ 8 グループに分類しました。特に、SDS 患者と ADH5/ALDH2 欠損症患者は、それぞれ SBDS と ADH5 タンパク質の有意な発現低下を認めたため、確定診断に非常に有用でした。次に、調べるタンパク質の数を絞り、簡便かつ迅速な「標的プロテオーム解析」を 400 例以上のサンプルで実施し、IBMFS の診断検査法として臨床応用可能な十分な性能を有することを確認しました。

本研究では、世界で初めて IBMFS に対する高深度プロテオーム解析と NGS 解析を組み合わせた「プロテオゲノム解析」を実施しました。適切なスクリーニング検査が存在しない IBMFS 患者に対して、より正確な診断をもたらし、早期診断と治療介入へつながることが期待されます。

本研究成果は「*Leukemia*」(2024 年 5 月 13 日付電子版)に掲載されました。

1. 背景

遺伝性骨髓不全症候群(Inherited Bone Marrow Failure Syndrome; IBMFS)は、先天的な遺伝子変異が原因で、貧血、血小板減少、顆粒球減少などの正常な血液細胞を造ることができない病気です。この病気には、シュワッハマン・ダイアモンド症候群(Shwachman-Diamond syndrome; SDS)、ファンコニ貧血(Fanconi anemia; FA)、ダイアモンド・ブラックファン貧血(Diamond-Blackfan anemia ; DBA)、先天性角化不全症(Dyskeratosis congenita: DC)、ADH5/ALDH2 欠損症などがあります。本邦では、年間 10 例程度が新しく診断される極めて稀な病気ですが、様々な合併症や若年で悪性腫瘍を発症する場合があり、適切な治療とフォローアップを提供する必要があります。これまで、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析(next-generation sequencing; NGS)が、IBMFS の診断に役立つことが報告されています。しかし、未だ IBMFS 患者の半数以上が NGS による遺伝子解析のみでは原因遺伝子を同定することができず、NGS 解析以外の新たな診断検査システムの構築が望まれていました。

SDS は、常染色体潜性遺伝形式をとる代表的な IBMFS であり、臍外分泌異常、血球減少、骨格異常を認めます。全体の 15~30% の SDS 患者が、骨髓異形成症候群(myelodysplastic syndromes; MDS)や急性骨髓性白血病(acute myeloid leukemia; AML)へ進展します。若年成人(18~40 歳)MDS 患者のうち、約 4% は小児期に見逃された SDS を背景に発症しており、非常に治療成績が悪いことが報告されています。

ADH5/ALDH2 欠損症は、ADH5 と ALDH2 遺伝子の二つの遺伝子変異が原因で、内因性ホルムアルデヒドの分解が進まず、低身長、精神遅滞、汎血球減少、MDS などの FA 患者と類似する症状を認めます。この ALDH2 遺伝子変異は、東アジア人の 4 人に 1 人が持っている一塩基多型のために、アジア諸国では ADH5/ALDH2 欠損症の罹患率が高いことが予測されており、本邦でも IBMFS を疑う患者にはこの病気を鑑別する必要があります。

近年のタンパク質測定系における飛躍的な技術革新により、最新の質量分析器を用いた高深度プロテオーム解析では、キナーゼや転写因子などの従来、検出が難しいとされていた微量なタンパク質も対象に含めて、約 10,000 種類のタンパク質の網羅的な同定と定量を行うことができるようになりました。本研究では、IBMFS 患者に対して高深度プロテオーム解析を実施し、それぞれの IBMFS に特徴的な生物学的な性質を明らかにし、病気のマーカーとなるタンパク質を利用した新たな診断検査システムの構築を目指しました。

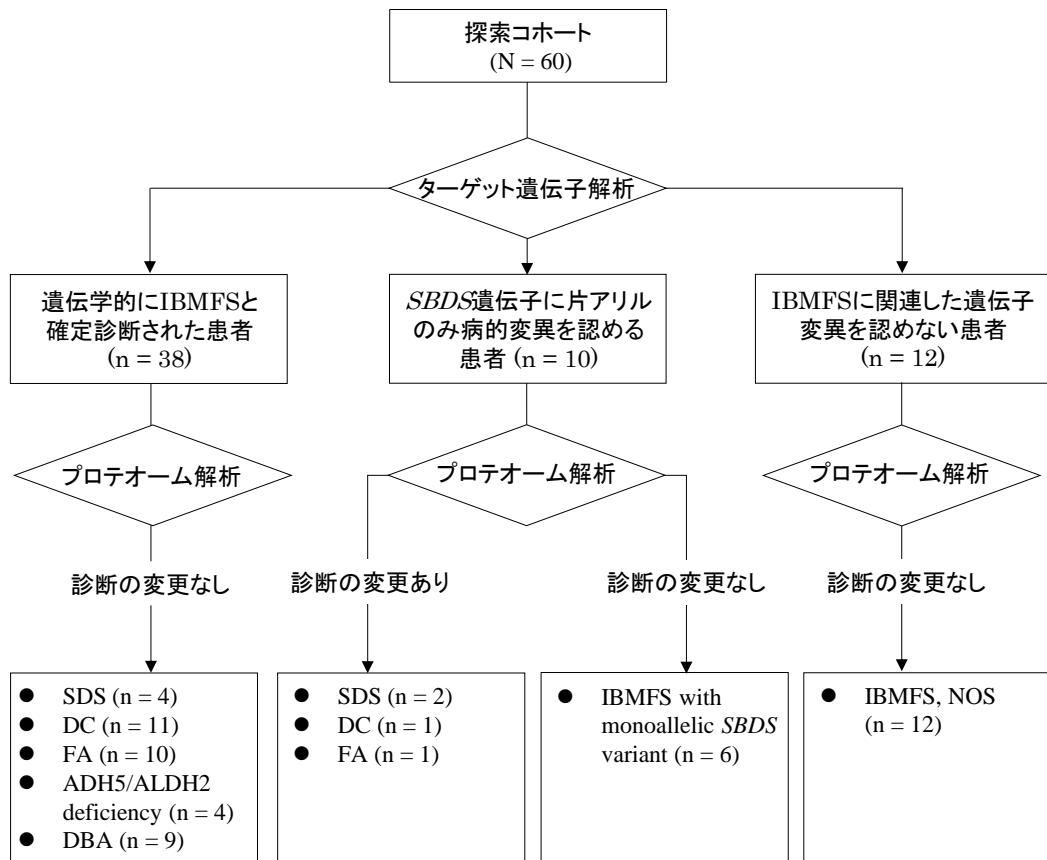
2. 研究成果

IBMFS に対するプロテオゲノム解析

探索コホートとして、臨床的に IBMFS と診断された患者 60 例を解析しました。探索コホートの全例に、IBMFS に関連したターゲット遺伝子解析と高深度プロテオーム解析を実施しました。高深度プロテオーム解析は、研究開始時点の最新の質量分析計(Q-Exactive HF-X [Thermo Fisher Scientific 社])を用いて、タンパク質の同定と定量を行いました。ターゲット遺伝子解析の結果、遺伝学的に IBMFS と確定診断された患者 38 例、*SBDS* 遺伝子に片アリルのみ病的変異を認める患者 10 例、IBMFS に関連した遺伝子変異を認めない患者 12 例を同定しました。*SBDS* 遺伝子に片アリルのみ病的変異を認める患者 10 例中 2 例が、高深度プロテオーム解析で *SBDS* タン

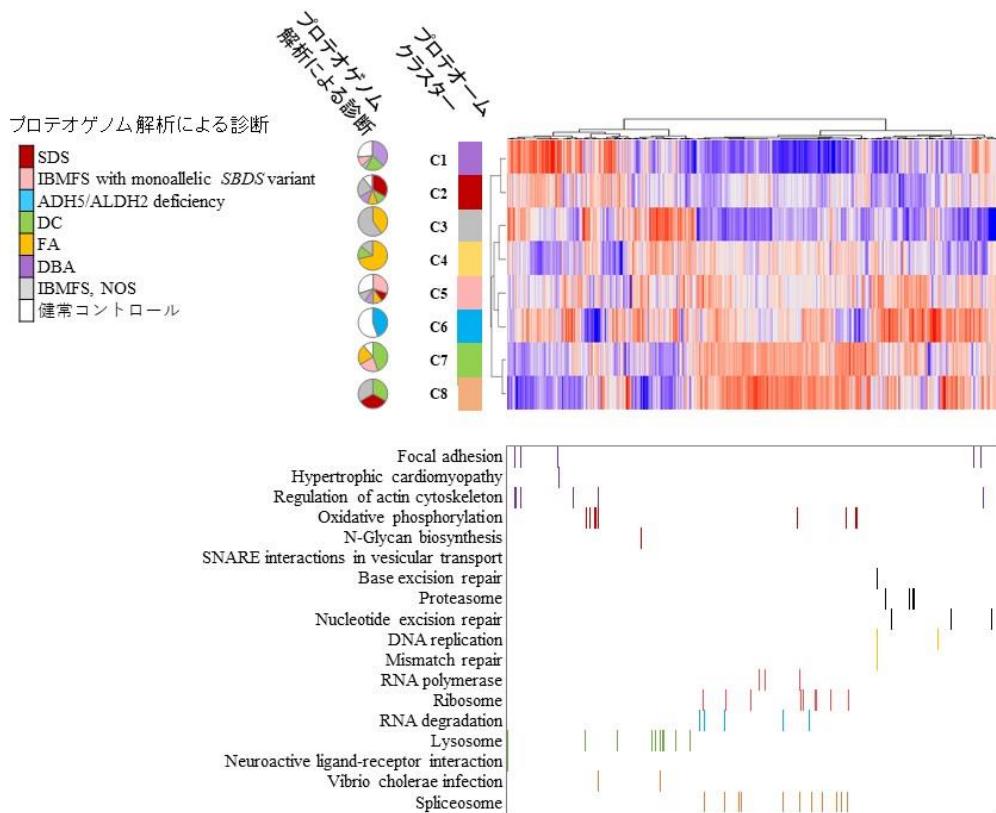
パク質の有意な発現低下を示し、2例とも RNA シーケンスのリード配列から複合ヘテロ接合性に *SBDS* 遺伝子の病的変異が検出され、最終的に SDS と診断しました(図 1)。

図1.プロテオゲノム解析に基づく診断フローチャート



探索コホートに健常コントロール 14 例を合わせた 74 検体のプロテオーム解析データで、教師なしクラスタリング解析(※4)を行った結果、8 つの独立したプロテオームクラスター(C1~C8)に分類されることが分かりました。DBA は C1 クラスター、SDS は C2 と C8 クラスター、FA は C3 と C4 クラスター、ADH5/ALDH2 欠損症は C6 クラスター、DC は C7 クラスターにそれぞれ濃縮されました。特に C1 や C2 クラスターで、リボソームに関連するタンパク質の有意な発現低下を認め、リボソームの機能不全が原因で発症する DBA や SDS の病態に一致した結果でした(図 2)。

図2. 高深度プロテオーム解析に基づくIBMFSのサブタイプ

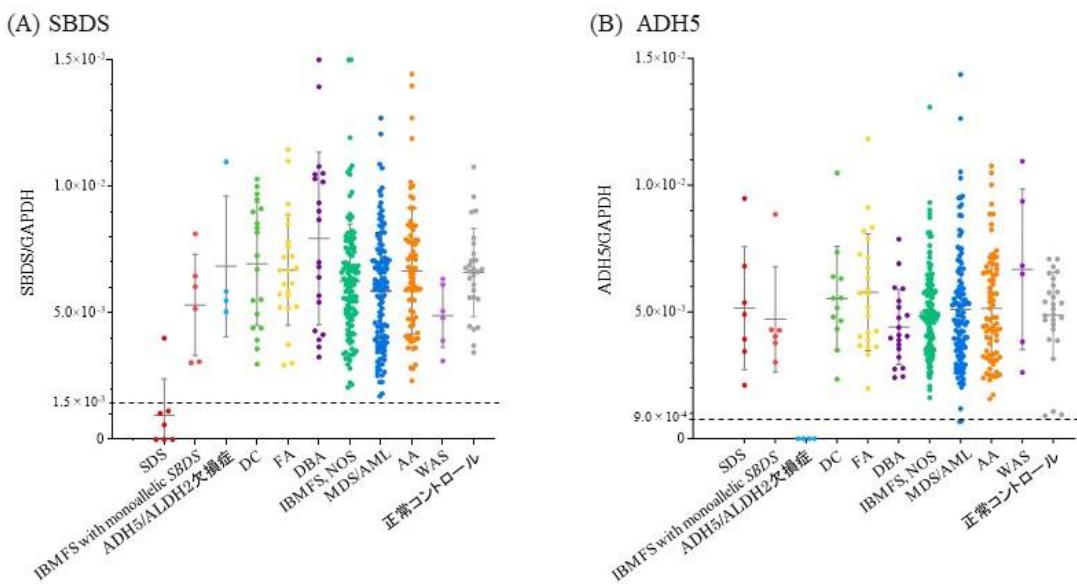


標的プロテオーム解析による迅速かつ簡便な診断検査法の構築

それぞれの IBMFS で有意に発現差を認めるタンパク質に注目しました。探索コホートで、IBMFS 患者 60 例中 6 例に、SBDS タンパク質の有意な発現低下を認めました。同様に、ADH5/ALDH2 欠損症の患者 4 例は、ADH5 タンパク質発現の有意な低下を認め、両者は遺伝学的診断と一致し、臨床的に有用なマーカーと考えられました。

そこで、IBMFS に対する迅速かつ簡便なスクリーニングシステムを臨床現場で応用するため、ADH5 と SBDS タンパク質を検出する小パネルを作製し、標的プロテオーム解析を実施しました。当時最新の質量分析計(Orbitrap Exploris 480 [Thermo Fisher Scientific 社])を用いて、IBMFS 関連の血液腫瘍患者 390 例と健常コントロール 27 例を含む 417 サンプルの拡大コホートに対して、それぞれのタンパク質発現を評価しました。結果、SDS 患者サンプルでは SBDS タンパク質が、ADH5/ALDH2 欠損症の患者サンプルでは ADH5 タンパク質が特異的に発現低下していることが確認されました。各疾患に対する診断検査の感度および特異度は、SDS で 85.7% および 93.4%、ADH5/ALDH2 欠損症 100.0% および 97.5% と計算され、早期の診断および治療介入が必要な患者を同定するために、十分な性能を有する診断検査法と考えられました(図 3)。

図3. 標的プロテオーム解析に基づくSBDSとADH5タンパク質の診断検査システム



3. 今後の展開

本研究は、世界で初めて IBMFS に対する高深度プロテオーム解析を行い、臨床診断に応用できるシステムの構築に成功しました。IBMFS の診断に、NGS 解析が有用であることは以前から示されていましたが、未だ半数以上の IBMFS 患者で原因遺伝子が同定されません。さらに、小児期に見逃がされ、適切なフォローアップを受けられず、若年成人期に悪性腫瘍を発症後に診断される場合もあります。本研究で開発したプロテオーム解析に基づく診断検査法は、IBMFS の正確な診断をもたらし、従来の遺伝学的検査を補完する臨床検査となる可能性があります。将来的には、造血不全を呈した小児患者や、若年成人で発症する MDS/AML 患者に対するスクリーニング検査として、臨床現場で活用されることが期待されます。

4. 用語説明

- ※1 遺伝性骨髓不全症候群(IBMFS);先天的な遺伝子変異が原因で正常な血液細胞を造ることができない病気。
- ※2 プロテオーム;生体中に存在するすべてのタンパク質。
- ※3 次世代シーケンサー(NGS);数千から数百万もの DNA 分子を同時に配列決定できる技術。
- ※4 クラスタリング解析;集団の中から互いに似たものを集めてクラスターを作り、分類する解析手法。
- ※5 質量分析装置;試料に含まれている物質の定性・定量を行う装置。

【論文情報】

雑誌名:Leukemia

論文タイトル:Integrated Proteogenomic Analysis for Inherited Bone Marrow Failure Syndrome

著者名・所属名:

Manabu Wakamatsu ¹, Hideki Muramatsu ^{1†}, Hironori Sato ^{2,3},
Masaki Ishikawa ², Ryo Konno ², Daisuke Nakajima ², Motoharu Hamada ^{1,4},
Yusuke Okuno ⁴, Yusuke Kawashima ^{2†}, Asahito Hama ⁵, Masafumi Ito ⁶,
Hideto Iwafuchi ⁷, Yoshiyuki Takahashi ¹, and Osamu Ohara ²

¹ Department of Pediatrics, Nagoya University Graduate School of Medicine; Showa-ku, Nagoya, 466-8560, Japan.

² Department of Applied Genomics, Kazusa DNA Research Institute; Kisarazu, Chiba, 292-0818, Japan.

³ Department of Pediatrics, Chiba University Graduate School of Medicine; Chuo-ku, Chiba, 260-8670, Japan.

⁴ Department of Virology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences; Mizuho-ku, Nagoya, 464-0083, Japan.

⁵ Department of Hematology and Oncology, Children's Medical Center, Japanese Red Cross Aichi Medical Center Nagoya First Hospital; Nakamura-ku, Nagoya, 453-8511, Japan.

⁶ Department of Pathology, Japanese Red Cross Aichi Medical Center Nagoya First Hospital; Nakamura-ku, Nagoya, 453-8511, Japan.

⁷ Department of Pathology, Shizuoka Children's Hospital; Aoi-ku, Shizuoka, 420-095, Japan.

DOI: [10.1038/s41375-024-02263-1](https://doi.org/10.1038/s41375-024-02263-1)

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Leu_240611en.pdf