

No.	22-2085	
研究課題名	発作性夜間血色素尿症におけるクローン拡大履歴の推定	
研究代表者	保仙 直毅（大阪大学・教授）	
研究組織	受入教員	南谷 泰仁（東京大学医科学研究所・教授）
	分担者	西村純一（大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科・招聘教授）
	分担者	植田康敬（大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科・助教）
	分担者	高森弘之（造血病態制御学分野・特任研究員）
	分担者	小川誠司（京都大学腫瘍生物学講座・教授）

東京大学医科学研究所国際共同利用・共同研究拠点事業
共同研究報告書 (年次終了・研究完了)【国内】

共同研究報告 (年次終了)

本研究では、PNH 症例 2 例を用いて、単細胞レベルの全ゲノム情報から遺伝学的系統樹解析を行った。その結果、任意の遺伝子変異が生じた時期、クローンの進化、遺伝子変異獲得率、クローン拡大の軌跡を解析することができた。準備段階では、コロニーから DNA を抽出し、全ゲノム解析 (WGS) を行い、*HMGA2* 遺伝子変異陽性の PNH 症例 (症例 1) の系統樹作成を完了していた。その後、2022 年 4 月 1 日から複数の *PIGA* 遺伝子変異による PNH クローンを有する症例 (症例 2) の系統樹作成に取り組んだ。本研究では、患者の骨髄細胞をコロニー形成細胞アッセイを用いて増殖させ、単細胞由来の DNA を抽出し、全ゲノム解析を行う。理論的には単細胞由来の DNA が抽出されるはずであるが、隣接するコロニーからのコンタミネーションやシーケンスエラーが問題となる。症例 2 の遺伝子変異情報を確認した結果、症例 1 と比較してコンタミネーションやシーケンスエラーを疑う変異が見られた。そこで、統計学的手法を利用してデータのクリーニングを行った。次に、全ゲノム解析から得られた一塩基置換情報を用いて、最大節約法に基づくアルゴリズムで遺伝学的系統樹を作成した。その後、最尤法に基づくアルゴリズムを用いて、各遺伝子変異を系統樹の枝に割り振った。症例 1 では、*PIGA* 変異陽性コロニーはすべて *HMGA2* 遺伝子変異を有しており、*PIGA* 遺伝子変異と *HMGA2* 遺伝子変異の発生順序を明らかにすることはできなかった。一方、症例 2 では複数の *PIGA* 遺伝子変異が確認され、これらの変異が互いに独立して存在することが明らかになった。またどちらの症例においても *PIGA* 遺伝子変異陽性コロニーの方が遺伝子変異獲得率が高い傾向にあった。血液細胞に生じる遺伝子変異 (同義置換を含む) は出生後から一定の速度で生じ、これを分子時計として利用することができる。この性質を利用して遺伝子変異が生じた年齢を推定した (下図)。その結果、PNH の原因となる *PIGA* 遺伝子変異が PNH の発症・診断時の 10 年以上前から存在していたことが示唆された。系統樹の樹形の観察からは、PNH クローンが比較的緩やかにクローン拡大していることが推測された。また、合祖理論に基づく系統動態学のアルゴリズムを用いて、PNH クローンの有効細胞集団数の軌跡を推測した。その結果、*PIGA* 遺伝子変異が生じてから診断までの期間、PNH クローンが緩やかに増殖していることが明らかになった。今後は、変異シグネチャー解析などの追加の解析と議論を重ね、本研究を論文としてまとめることを目指している。

症例 1 (単独の PNH クローンを認める症例)

症例 2 (複数の PNH クローンを認める症例)

