

**Genomics in Thrombosis and Hemostasis**

報告者 宮田敏行

2024 年 6 月 23 日 16:30-18:30

Chairman

Andrew Johnson, USA

Co-Chairman

Juliana Perez-Botero, USA, Sven Danckwardt, Germany, Jill Johnsen, USA,

Suthesh Sivapalaratnam, UK, Marie-Christine Morel-Kopp, Australia,

Tessa Barrett, USA, Raizl Gruda Sussman, Canada,

Paula Heller, Argentina

SSC の Genomics in Thrombosis and Hemostasis は Ballroom B2 で行われた。

1. Session Welcome, SSC overview, GOLD variants update, 16:30 – 16:33

Andrew D. Johnson, USA

このSSCセッションの略号を、大文字を用いてオミックス解析を強調する GenOMICS in Thrombosis and Hemostasis (GenOMICS T&H SSC)に変更した。積極的にこのセッションに参加してほしいと述べた。現在、Co-Chairの空席はない。セッションで扱いたい研究があればChairもしくはCo-Chairsに知らせて欲しい。

本セッションの活動の紹介を行った。

1. 血栓止血領域のGenOMICS T&Hの標準化に関する研究費の申請は2024年9月15日締め切り。標準化の研究を申請して欲しい。
2. 血小板RNA-seqのハーモナイズを目指したSTRIDE projectは今週JTH誌に論文が受理された。 [https://www.jthjournal.org/article/S1538-7836\(24\)00376-3/pdf](https://www.jthjournal.org/article/S1538-7836(24)00376-3/pdf)
3. 遺伝性出血性疾患である血小板疾患の ISTH-SSC survey は進行中。  
<https://forms.gle/udFLf7G7L8wybS75A>
4. 血栓止血の機能バリエーション検査とそのリソース。
5. ISTH Gold Variants Tier1/Tier2のcurationを進めている。Tier1/Tier2遺伝子の本年のアップデートでは、Tier1に*ERG*が入った。*ERG*遺伝子のミスセンスバリエーションと機能喪失バリエーションは血小板減少症、骨髄不全症候群、白血病（3家系以上）を呈し、Abstract ASH (2023, 142) で発表された。Tier2には*MASTL*（2家系、血小板減少症）と*SERPINA1* (a1-AT) (VTEリスク、Pittsburghバリエーションは出血する)が入った。ISTHはこれまでに200個以上の遺伝子をClinVarデータベースに登録している。下記のISTHのGold Variantsサイトに入ってほしい。 [https://www.isth.org/page/GinTh\\_GeneLists](https://www.isth.org/page/GinTh_GeneLists)

それではセッションに入る。

2. Unique laboratory profiles in hemostatic disorders allow for upgraded strength of phenotype evidence in the classification of genetic variants: experience from ClinGen Hemostasis and Thrombosis Variant Curation Expert Panels, 16:33 – 16:45

Juliana Perez-Botero, USA

本講演では、ClinGen Hemostasis and Thrombosis Variant Curation Expert Panels の経験から、血小板異常症での止血障害の検査は遺伝子バリエーションの分類を向上させることを述べた。これまでに、American College of Medical Genetics (ACMG) と Association for Molecular Pathology (AMP) はメンデル遺伝性疾患の臨床遺伝子診断ガイドライン (ACMGガイドライン) を発表している (Richards et al, Genet Med 17(5):405-424, 2015)。このACMGガイドラインではバリエーションをpathogenicバリエーションとbenignバリエーションに分類している。pathogenicバリエーションはさらにVery Strong (PVS), Strong (PS), Moderate (PM), Supporting (PP)に分けている。本発表はPathogenic Supportingバリエーションの中のPP4についての発表であり、以下の3つについて述べた。

- ・ACMG/AMPガイドラインを用いた遺伝子バリエーションの分類において、PP4に分類された患者の臨床と検査レベルでの表現型の重要性
- ・特徴のある検査室の表現型をもつ疾患に対する改良型PP4の評価
- ・Clinical Genome Resource (ClinGen) Platelet Disorder Variant Curation Expert Panelによる血小板無力症 (Glanzmann thrombasthenia) に対する改良型PP4診断基準に使われたベイズ解析

2015年のACMG/AMPガイドラインで、PP4は「患者の表現型や家族歴は単一の遺伝的病因を持つ疾患に対して極めて特異的である」と規定されている。しかし、このガイドラインは心筋症のような疾患も対象にしているため、この定義は少し曖昧なところがある。PP4について、止血異常症である血小板無力症、Bernard-Soulier症候群、血友病、フォンビルブランド病 (2型、3型)、MYH9-RD (May-Hegglin異常症) で考えて見る。これらの疾患は検査室で測定できるパラメータがある。

血小板無力症の臨床と検査室での表現型はPP4の疾患特異的な基準に入る。血小板無力症患者はGPIIb/IIIaの質的・量的欠損症で、フィブリノーゲン結合能はフローサイトメーターで測定できる。血小板無力症は出血を呈し、生理的なアゴニストによる血小板凝集能は大きく低下し、質的もしくは量的なGPIIb/IIIaの欠乏を示す。血小板無力症患者を用いて、PP4の基準の評価を試みた。血小板無力症患者64名の血小板GPIIb/IIIaの遺伝子であるITGA2BとITGB3をシークエンスした。PP4の基準を満たす59症例のうち4症例は、病的バリエーションが同定されず陰性例だった。また、PP4の基準を満たさない59症例のうち5症例には2つの病的バリエーションが同定されたので偽陰性例だった。このように、

PP4の定義から外れる症例が見いだされたものの、表現型が陽性である患者のITGA2BもしくはITGB3遺伝子の病的バリエント保有特異性は高かった(Ross et al, Blood Adv, 5(2), 414-431, 2021)。

まとめ：止血異常症の多くの検査データはPP4の改良に役立つ。検査データの収集は大きな労力を伴うが極めて重要な情報を与える。Bernard-Soulier症候群、血友病A、フォンビルブランド病の基準に関しては、ClinGen Variant Curation Expert Panel (VCEP)を見てほしい。

### 3. Application of multi-OMICs profiling to study RUNX1-FPD patients, 16:45 – 16:57 Ana Catarina Menezes, USA

Familial platelet disorder (FPD, 家族性血小板異常症)は常染色体優性遺伝形式をとる血小板異常症であり、血小板減少に伴う出血が見られ、白血病や骨髄異形成症候群を発症する。RUNX1は転写因子で造血のmaster regulatorであり、RUNX1-FPDは血小板減少症、血小板機能異常、骨髄異形成症候群/急性骨髄性白血病の高リスクである。

2019年に単施設の縦断研究であるNIH RUNX1-FPD Natural History Studyを開始した。2024年2月までに388名を登録し、202名(94家系)にRUNX1にPathogenic/Likely Pathogenicバリエントを同定した。RUNX1遺伝子バリエントを有する多数の患者は新規の患者なので、同定されたバリエントの多くはvariants of unknown significance (VUS)であり解釈が難しい。これらのVUSが病的であるか良性であるかを定めることは、患者の診断と臨床上の管理に影響を与える。そこで、RUNX1遺伝子バリエントをtransactivation assayで評価した(Cunningham et al, Blood, 2023)。5種の良性バリエントと6種の病的バリエントをコントロールにして、今回同定したRUNX1バリエントを評価し有意に低い活性を示すバリエントを同定した。このようにtransactivation assayはRUNX1バリエントの評価に重要であった。発現実験なので興味のあるバリエントに絞ってassayしており、全てのバリエントを評価の対象にしているのではない。

患者血小板のMulti-OMICs解析としてトランスクリプトーム解析を行った。RUNX1-FPDの血小板のtranscriptomeはコントロールと異なり、1,057個のmRNAのうち90%のmRNAが発現低下していた。発現が低下している遺伝子には、ミトコンドリア機能不全に関わる因子、インテグリンに関わる因子、細胞分裂制御に関わる因子があった。

患者血小板のタンパク質の発現量の解析を行った。患者血小板で発現量が変化しているタンパク質のうち、全体の62%にあたる148個は発現量が低下していた。発現が低下しているタンパク質には、好中球の脱顆粒に関わる因子、血小板の細胞質Ca<sup>2+</sup>の上昇に関わる因子、フィブリン形成に関わる因子が含まれていた。

まとめとして、RUNX1のtransactivation assayはRUNX1バリエントの解釈に重要な情報を与えるが、新しい別の測定法の開発が期待される。RUNX1-FPDの血小板の

transcriptomeは低下していた。患者の血小板では、ミトコンドリアの機能不全、シグナル伝達経路、細胞接着、細胞周期に関わる因子の低下が観察された。RUNX1-FPDの血小板のMulti-OMICS解析は62%のタンパク質の発現量低下が観察された。RUNX1-FPDの血小板では、血小板活性化や細胞表面の相互作用などが大きく影響を受けることが判明した。これらの量的に変化するタンパク質はバイオマーカーや治療標的分子になるかもしれない。本研究をNIH RUNX1-FPD Clinical Research Studyと呼んでいる。

#### 4. Operational challenges of National Health Service genomics for improving Platelet and Bleeding disorder diagnosis, 16:57 – 17:09

Suthesh Sivapalaratnam, UK

ロンドンのNational Institute for Health Research (NIHR)が行っている遺伝子解析を用いた血小板と出血性疾患の診断システムであるGenomic serviceを紹介した。

<https://www.england.nhs.uk/genomics/nhs-genomic-med-service/>

UKのNational Health Service (NHS)では血小板・出血性疾患の診断にゲノミクスを活用している。NHSのゲノミクスは、初期の地域医療から専門家による三次診療にまで革新的なサービスのモデルとして世界をリードしている。がん、稀少疾患、遺伝性疾患、ありふれた疾患の改善された転帰、および精密医療の推進と薬物有害反応の低減に対して公平な遺伝子検査を提供する。主治医が患者から遺伝子検査の同意を取得したのち、7つのNHS Genomic Laboratory Hubsが幾つかの専門分野からなるチームと共同で遺伝子解析とその結果の解釈をおこない、結果を主治医に返却する。

遺伝子解析はいろいろな方法で行っている。Targeted Testing (ハンチントン病のような既知の遺伝病)、Panels (次世代シークエンサーによる数10-数100個の候補遺伝子)、Exome Sequencing (標準化された迅速NICU/PICU 検査、胎児エクソーム検査、全ゲノムシークエンス(WGS) が確立するまでの暫定検査)、Whole Genome Sequencing (WGS: 診断・治療・予測の情報のための全ゲノムシークエンス)がある。現在、NHSの遺伝子検査は90%が前3者であり、10%がWGSである。

出血性疾患と血小板疾患(version 3.0)を示した。これにはReceptors, Intracellular, Granule defects, Transcription factors, Membrane phospholipids, Cytoskeletal signaling, Thrombotic, Coagulation factors, Thrombopoietin, Undefinedが含まれている。現在70遺伝子を対象にしている。解析結果は84日での返却が望まれているが近々42日にしたい。現在は平均55日で返却している。

Pan London のGenomics Multidisciplinary teams (MDTs, 幾つかの専門分野を結集したチーム)の疾患別の結果を示した。たとえば、血小板数の異常では、283例中163例で遺伝子バリエーション (pathogenicもしくはlikely pathogenic) の結果を得た。血小板機能異常では152例中52例で、血栓性疾患では183例中86例、出血異常症では169例中31例で、凝固異常症では341例中237例で、それぞれ遺伝子バリエーションを得た。

最後に今後の課題を示した。出血性疾患と血小板疾患のゲノミクス検査を開始し、South East Englandの2つの地域で専門分野を結集したチームであるMDTを整えた。今後イギリス全土でMDTを整えたい。臨床や運用上で、次のような克服すべき点がある。カウンセリングの訓練、意義不明バリエーションの報告と分類、臨床目的のWESとWGSへのアクセス、データ返却までの時間の短縮、再解析への流れ、ClinVar/UKHCDOへの報告、である。

#### 5. Q&A/Discussion (Session 1), 17:09 – 17:24

Moderator: Justyne Ross, USA

- RUNX1への質問: MYH10を調べているかとの質問で、答えはMYH9を調べているがMYH10は調べていないとのこと。
- RUNX1で体細胞変異を調べているかについては、グループのコホート研究で行っているとの回答。
- RUNX1でMYH10に関して: WesternでMYH10が低下したとの報告があるが、低下を検出できなかったとのコメントがあった。
- より多くのRUNX1患者を解析し臨床像を分類したいが患者が集まらないとのこと。
- ある国では地域の病院が遺伝子解析を進めており国全体で知識が蓄積しない。ISTHが圧力をかけて欲しい。
- RUNX1への質問: 血小板トランスクリプトームには意義がある。他の細胞系でやってみる計画があるか。(回答) CD34+細胞で血小板トランスクリプトーム解析を行っている。
- ClinGen PP4に関して、血小板疾患は表現型の検査情報が多い。表現型情報が少ない疾患のPP4ではどうだろうか。

#### 6. Introduction of Focused Discussion on Increasing Access for All to Genetics & Genomic testing in IPBD, 17:24 – 17:26

Moderators: Jill M. Johnsen, USA

Inherited Platelet Bleeding Disorders (IPBD, 遺伝性血小板出血性疾患)の患者全員が遺伝学・ゲノム検査を受けることに焦点を絞った討論。遺伝子検査とgenomics試験はIPBDに貢献する。しかし、どのようにそれらを進めるのか、表現型と遺伝子バリエーションをどのように解釈するのか、など多くの問題がまだ残っていると述べた。

#### 7. Focused Discussion: Challenges in Increasing Access for All to Genetic & Genomic testing in IPBD, 17:26 – 17:39

Moderator: Justyne Ross, USA

- どのようにしたら遺伝子検査へのアクセスが増えるだろうか (特に小児の場合)

に)。例えば、英国のNHSでは遺伝子検査は無料（保険でカバーされている）だが、医院では有料3000-4000ポンド（60万円くらい）がかかる場合がある。米国は無料ではない。

➤ 遺伝子検査は検査だけではなく遺伝子結果の説明やカウンセリングも必要になる。米国では血液学の一般医師が診療する、その多くは血液がんが専門である。遺伝子バリエーションの解釈を中央化することが重要。遺伝子とgenomics試験へ遺伝学とゲノム検査が増加している。アクセスに関する議論があった。

## 8. Multiplex assays of variant effects (MAVEs): application to FIX variants, 17:39 – 17:51

Jill Johnsen, USA

ヒト遺伝子のバリエーションの数は急速に増えているが、大部分の遺伝子バリエーションの機能は不明であり、variants of uncertain significance (VUS) と呼ばれている。Johnsenらは第IX因子(FIX)を対象に、FIXのミスセンスバリエーションがFIXの分泌と翻訳後修飾ほどの程度影響するかを調べる新しい手法 Multiplexed Surface Tethering of Extracellular Proteins (MultiSTEP, 分泌タンパク質多重化ヒト細胞表面発現法)を開発した。

MultiSTEPは、発現ベクターに標的とする分泌タンパク質、表面検出用Strep IIエピトープタグ、一回膜貫通領域をつなぎ、分泌タンパク質を膜結合タンパク質として培養細胞の表面に発現させ、その発現量を単クローン抗体やStrep II抗体を用いたフローサイトメーターで定量する手法である。この実験系を用いて、タンパク質のミスセンスバリエーションの影響を調べるため、タンパク質のすべてのアミノ酸残基に20種のアミノ酸置換を導入した。この際、1個の細胞に1種のタンパク質バリエーションを発現するようにしている。

JohnsenらはこのMultiSTEPを血友病B遺伝子であるFIXに応用し、プレプロFIXの全てのアミノ酸残基にバリエーションを導入し、バリエーションタンパク質の分泌と翻訳後のγ-カルボキシル化を大規模に調べた (Popp et al, bioRxiv 2024.04.01.587474)。その結果、FIXミスセンスバリエーションの39.5%が分泌に、10.1%がγ-カルボキシル化に影響を与え、両者を合わせると49.6% (n = 4,234/8,528) がFIXの機能を消失させることを明らかにした。ほぼ全てのCys残基のバリエーションはFIXの分泌を抑制し、最も有害な置換であった。分泌スコアは血友病B患者のFIXレベルに強く相関し、分泌できない変異体は特に重症化を引き起こしやすいことが明らかになった。分泌スコアと翻訳後修飾スコアを統合すると、「My Life, Our Future 血友病遺伝子型決定プロジェクト」におけるF9 VUSの63%を再分類することができた。最後に、MultiSTEPは、FVII、FVIII、FX、α1-アンチトリプシン、C1インヒビター、インスリンという重要な分泌タンパク質にも適用できることを示した。

9. Blood DNA Methylation profiles associated with platelet function responses,  
17:51 – 18:03

Jillian Teichman, USA

タイトルを次のように変更して講演を開始した。DNA methylation variation in hematopoietic stem cells and other blood cells may impact platelet function. 発表者はChair である Johnson 博士の研究室の Post-baccalaureate である。

まずDNAメチル化をレビューした。DNAメチル化はDNA合成後の修飾でCpGのシトシンに起こり、組織依存性の遺伝子発現に影響を与え、メチル化レベルと疾患に関連が見られる。血小板は骨髄系の無核の細胞で巨核球から産生される。血小板はADPやコラーゲンなどのアゴニスト刺激により受容体(P2Y12, GPVI,  $\alpha$ IIb $\beta$ 3)が活性化され形態が大きく変化し、免疫の制御を含めた多機能を発揮する。

Framingham Heart Study (FHS, フラミンガム心臓研究)の研究を紹介した。FHSの参加者は約1200人で、DNAメチル化をIllumina 450Kアレイで測定し(対象はGeneration 3 とOmni cohort, Exam 2: 2008-2011年)、5つの血小板の機能(透過光血小板凝集能, Optimul aggregometry, multiplate whole blood impedance aggregometry, Flow cytometry, Total-Thrombus Formation Assay System (T-TAS)、対象はGeneration 3 とOmni cohort, Exam 3: 2016-2019)を測定した。透過光血小板凝集能では5種のアゴニスト(ADP、アラキドン酸、TRAP-6、コラーゲン、エピネフリン)を用いた。Optimul aggregometry assayでは6種のアゴニスト(上記の5つに加えてU46619)を用いた。multiplateでは3種のアゴニスト(ADP、アラキドン酸、TRAP-6)を用いた。T-TASではコラーゲンを用いた。共変量として年齢、性別、BMI、アスピリン使用などを用いた。結果としてCpGと血小板形質の関連を求めた。その後replicationもしくは二次解析を行った。

約1200人もしくは1305人のFHS参加者で、得られた121種の血小板の形質と445,000個のCpGのメチル化量との関連を調べた。また、メチル化量と血小板数(PLT)および血小板量(MPV)との関連を調べた。

結果を横軸がCpGの位置を示す染色体、縦軸がp値 (multiple-test adjusted p value)を示すマンハッタンプロットで示した。False Discovery Rate (FDR)が0.05以上では、血小板機能に有意な47個の関連が見られCpGの数では36個であった。なかでも、遺伝子ABOのCpGが最も強い相関を示し、CAPRIN2, SYT5, B4GALNT3, TLE6なども関連を示した。ABOはリストセチン血小板凝集能に関連を示し、CAPRIN2, SYT5, B4GALNT3, TLE6はADP凝集能に関連を示した。これらの遺伝子の制御領域のCpGのメチル化がpost-translationalに影響を与えたと考えられた。ABOはVWFのリストセチン血小板凝集能、CAPRIN2は転写後のRNAの制御、SYT5は顆粒の放出、B4GALNT3は血小板ターンオーバー、TLE6はアクチンdynamicsに関与することが知られている。DNAメチル化のデータは有核細胞の白血球から得た。機能解析は血小板で行った。したがって、白血

球細胞と血小板の間の関係を考える必要がある。

今後の展開を紹介した。本研究により36個のCpG部位に47の有意な関連を得た。約200人を対象に血小板RNAseqとメチル化の関連を解析中である。これら2つの研究の重なっているメチル化遺伝子が重要ではないかと考えている。予備的な検討ではBonferroni法の閾値を $7.3 \times 10^{-5}$ とすると、5つのCpG（そのうち4つはABO遺伝子）が重なっていることが分かった。血小板のプロテオミクスのデータとの重複も視野に入れている。

## 10. Large-scale GWAS of VTE and thrombosis prediction scores, 18:03 – 18:15

David-Alexandre Tregouet, France

Genome wide association studies (GWAS)は多くの一塩基多型(single nucleotide polymorphisms, SNP)と興味を持つ形質(すなわち疾患)との関連を調べる手法である。これまでに、血栓症に関しては、次のような研究が報告されている。

- Blood, 2009: 453症例とコントロール1,327例、関連を示した遺伝子ABOとFV
- PLoS One, 2011: 1,542症例とコントロール1,110例、新規にF11とFGG
- Am J Hum Genet, 2015: 約8,000症例とコントロール約5,300例、新規2個の遺伝子座
- Blood, 2019: 約30,000症例とコントロール約172,000例、新規16個の遺伝子座
- Circulation, 2022: 約82,000症例とコントロール約1,400,000例、新規80個の遺伝子座

これらのGWASの研究から、対象の症例数が増えると多くの疾患関連遺伝子座が同定される。しかし、そのオッズ比はだんだん小さくなり2022年の報告では1.1の遺伝子座もあった。

Lindstrom et al, Blood 2019では、静脈血栓塞栓症 (VTE) 6,573症例とUK Biobankのコントロール20,515例のGWAS解析を行い、遺伝的リスクスコア(Genetic risk score, GRS)は37個のバリエーションを含むと報告された。VTE症例群とコントロール群では、37個のバリエーションの遺伝的リスクスコアが25~75パーセンタイルではVTEに差が見られなかったが、遺伝的リスクスコアが最下位5%パーセンタイル以下ではVTEが50%低く(オッズ比: 0.51)、最上位5%パーセンタイル以上ではVTEが3.2倍高かった(オッズ比: 3.19)。VTEのGWAS解析で同定された遺伝子座は、新規の遺伝子座もあるが、動脈疾患の遺伝子座と重複する場合もあった。

Cross-ancestry/ Multi-ancestry scoresに関して、Multi-ancestry polygenic risk scores for venous thromboembolismという論文が発表された(Jee et al, Hum Mol Genet, 2024, 1-8)。これまでのGWASはEuropean ancestryが90%以上を占めておりアフリカ系やアジア系は少ない。祖先が違くとVTE発症率は違うのか、違うのだったら共通の祖先のデータを使う必要がある。

遺伝的リスクスコアは稀な疾患の原因バリエーションを同定するツールである。すなわち、極端に低い遺伝的リスクスコアを持つ患者の疾患はありふれたSNPsで起こるのでは

なく、稀なバリエーションによる可能性がある、という仮説を提案した。この方法として次の戦略を示した。

1) Thiboard et al, *Circulation* 2022 の研究から経口避妊薬でVTEを起こした女性800人から遺伝的リスクスコアを誘導し、2) Top 10% 遺伝的リスクスコアとlowest 10% 遺伝的リスクスコア(約100人ずつ)の患者を同定し、3) これらの女性の全ゲノム配列解析を施行し、4) 低い遺伝的リスクスコア集団だけにみられる極めてまれなバリエーションを探し出す。この方法を使って、*F11*のアミノ酸が変化しないバリエーションと*ESRRG*の機能喪失バリエーションに関する予備的な結果を示した。このように遺伝的リスクスコアを使うと新しい疾患遺伝子バリエーションを同定できる可能性を示した。

## 11. Discussion (Session 2) and Conclusion, 18:15 – 18:30

Moderator: Suthesh Sivapalaratnam, UK

・Dr. Johnsenへの質問: あなたのMultiSTEP法の結果は、ミスセンスバリエーションの機能を予測する方法 (machine learningなどの方法) とどれくらい一致するでしょうか。AIモデルとは比べていない。抗体で発現量を定量しているが、それでよいのだろうか。FXIは2量体でありdominant negativeになる可能性があるため、抗体で正しい発現量を測定できるのだろうか。FIXのGla化だが、抗体でコンフォメーションを見るだけで、正しくGlaに翻訳後修飾されたものを検出できるのだろうか。

・遺伝的リスクスコア(GRS): 同じ変異を持っている家系構成員はどうだろうか。

・フラミンガム研究での血小板凝集機能: スタチンや抗血小板薬などを服用している参加者がいる。これらの薬剤が血小板凝集能に影響しているのではないか。(回答) トランスクリプトーム解析をしており、抗血小板薬の影響が観察されているので、血小板凝集能に影響を与えている可能性がある。

最後に司会のSuthesh Sivapalaratnamが参加者に謝辞を述べ、2時間にわたるセッションを終了した。