

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10045

研究課題名（和文）血小板減少症を伴う橈尺骨癒合症患者で同定されたEVI1変異体の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of mutants of EVI1 identified in individuals with radioulnar synostosis with amegakaryocytic thrombocytopenia

研究代表者

新堀 哲也 (Niihori, Tetsuya)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：40436134

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：患者サンプルでMECOM、HOXA11、SMAD6、NOG遺伝子の塩基配列決定を行った。その結果、稀なバリエーションを同定したが、その意義はさらなる検討が必要である。臨床情報収集を続け、発表準備中である。ゼブラフィッシュモデルにおいてmorpholinoを用いてmecom遺伝子抑制を用量依存性に表現型の変化が観察された。より詳細な観察のための条件検討を継続している。また、CRISPR/Cas9による遺伝子編集個体でも検討を続けている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果によって、ゼブラフィッシュにおける遺伝子改変モデルの作成と解析が可能となり、遺伝子バリエーションの生体への影響がより容易に解析可能となった。MECOMのミスセンス変異や特定の部位を変異させた機能解析はこれまで他の研究グループでも成果が限られており、本研究の結果はMECOMの関連した病態に対して新たな知見を加えるのみならず、正常なMECOM機能の理解を深めるために重要な情報となる。

研究成果の概要（英文）：We sequenced MECOM, HOXA11, SMAD6, and NOG of DNA from patients with radioulnar synostosis with or without thrombocytopenia and identified several rare variants. The significance of these variants are needed to be determined. We observed phenotypic changes in the mecom knockdown zebrafish by morpholino in a dose-dependent manner. The mecom knockout zebrafish were also generated and analyzed.

研究分野：人類遺伝学

キーワード：血小板減少症 MECOM 橈尺骨癒合症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝性骨髄不全症候群 (IBMFS) は、骨髄不全および何らかの身体的症候を合併する症候群の総称で、Fanconi 貧血、先天性角化症、Diamond-Blackfan 貧血、Thrombocytopenia and Absent Radii (TAR) 症候群などを含む。無巨核球性血小板減少症を伴う橈尺骨癒合症 (RUSAT) は、血小板減少症から汎血球減少に進行する骨髄不全、前腕の回内・回外が困難となる先天性橈尺骨癒合、第五指斜指症などを主徴とする疾患で、IBMFS の一つに分類される。申請時まで約 10 家系ほどの報告のみのまれな疾患で、2000 年に 2 家系において転写因子 *HOXA11* の 1 塩基欠失変異が同定されているものの、*HOXA11* 変異陰性患者の報告が続いており、他の遺伝子の関与が示唆されていた。

申請者らはこれまで先天奇形症候群であるヌーナン症候群及び類縁疾患 (RASopathies) の遺伝子解析を行い、新規原因遺伝子を同定してきた。近年は次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析 (WES) による新規疾患原因遺伝子同定にも成功している (Aoki, Niihori et al. Am J Hum Genet 2013)。これらの経験を活かし、*HOXA11* 変異陰性 RUSAT 患者およびその両親において WES を行なった。その結果、転写調節因子である *MECOM* にミスセンス変異を同定した。*MECOM* は、転写調節因子である MDS1-EVI1 および EVI1 をコードし、造血幹細胞の自己複製に重要な役割を果たすこと、*MECOM* 領域のヘテロ欠失を持つ再生不良性貧血患者 (上肢の異常は記載なし) の症例報告があること、発生期に limb bud に一過性に発現することなどから原因と強く疑われた。そこで RUSAT 症例 2 例を追加し *MECOM* を解析したところ、2 例ともミスセンス変異を同定した。3 例中 2 例では新生突然変異であることが確認された (1 例は父の解析できず)。3 例で同定された変異はいずれも 8 番目の zinc finger (ZF) motif に存在していた。

EVI1 は多彩な機能

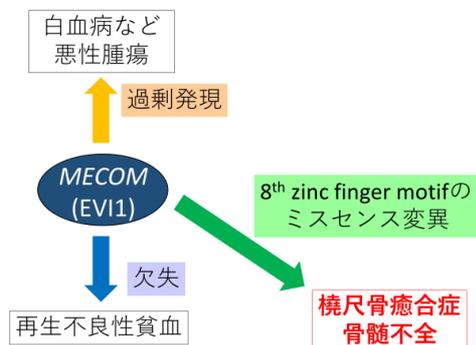
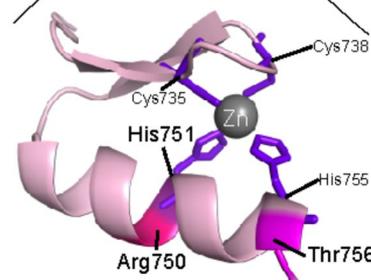
を持つことが知られるが、代表的機能の一つである TGF シグナルの制御と、転写因子複合体である AP-1 (activator protein-1) の活性化に注目し、変異体および各レポーターベクターを NIH3T3 細

胞に導入し、レポーターアッセイを行った。その結果、変異体を発現させた細胞においては TGF シグナルを抑制する効果は野生型と比較して減弱しており (機能喪失型変異)、AP-1 活性は野生型導入細胞で抑制され、変異体導入細胞では更に抑制されていた (機能獲得型変異)。患者で同定された EVI1 変異体は複雑な転写制御調節の異常を引き起こす可能性が示唆された。

以上より、*MECOM* の過剰発現は悪性腫瘍、欠失は再生不良性貧血と関連している一方で、8 番目の ZF motif のミスセンス変異は RUSAT を引き起こすことが明らかとなり、論文発表した (Niihori et al. Am J Hum Genet 2015)。



EVI1 は N 末端側に 7 つ、C 末端側に 3 つの zinc finger motif を持ち、患者で同定された変異 (Arg750Trp、His751Arg、Thr756Ala) は 8 番目に集中しており、立体構造モデルからも 8 番目の zinc finger motif の立体構造維持に影響を与える可能性が考えられた。



2. 研究の目的

本研究の目的は、無巨核球性血小板減少症を伴う橈尺骨癒合症の患者さんの遺伝子解析を行い、同定された遺伝子変異の機能解析を行うことによって、病態の詳細を明らかにし、将来的には治療法の開発につなげることである。本研究によって遺伝子変異が同定された患者さんが集積すれば予後の推定や遺伝カウンセリングに有用である。また、変異体の機能の一端が明らかになれば、原因遺伝子の一つである *MECOM* は白血病などの腫瘍で高発現が知られていることから、病態把握が腫瘍の治療法開発への端緒となる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) 患者での検体収集と遺伝子解析

対象患者は、血小板減少を伴う橈尺骨癒合症、あるいはいずれかのみを持つ患者とその血縁者とした。検体の収集を行う際、基本的に末梢血を収集するが、可能であれば毛髪・爪・口腔粘膜細胞、唾液なども収集する。患者 DNA を抽出し、*MECOM* および *HOXA11* の全エクソンおよび近傍のイントロンの塩基配列決定を行った。さらに最近、*SMAD6* および *NOG* の変異が非症候性橈尺骨癒合症患者で同定され、不完全浸透であると報告された (Yang Y et al. Genet Med 2019)。そのため、これらの遺伝子も解析の対象とした。

(2) 変異体の機能解析

患者で同定された変異を強制発現させた培養細胞で過剰発現させ、*luciferase assay* により転写調節への影響を検討した。

(3) ゼブラフィッシュモデルの作成

患者サンプルでの遺伝子解析で新たに同定されたバリエーションの病的意義の評価法の一つには、バリエーションを導入したモデル生物で症状が再現されるかを確認することが挙げられる。そこで、遺伝子導入が容易なゼブラフィッシュを用いてモデル生物作成を行い、症状（特に血液の異常）が再現されるかを検討した。具体的には *morpholino* を 1-2 細胞期の胚に注入し、*EVI1* のノックダウンを行い、症状が出現した場合には *morpholino* と野生型または変異型の mRNA を同時に注入し、症状がレスキューされるかを観察した。さらに *CRISPR/Cas9* による *mecom* のノックアウト個体の作成も試みた。

4. 研究成果

(1) 14 家系の患者サンプルから DNA を抽出し、*MECOM*、*HOXA11*、*SMAD6*、*NOG* 遺伝子の全エクソンおよび近傍のイントロンの塩基配列決定を行った。その結果、5 人に稀なバリエーションを同定したが、その意義はさらなる検討が必要である。また、患者における臨床症状情報については、頻度の高い症状のみならず、これまで見過ごされていた症状の有無にも注目して臨床情報収集を続け、発表準備中である。

(2) 患者で同定されたバリエーション 2 種類を発現させた細胞を解析したところ、これまでの報告同様、*TGF* シグナルを抑制する効果は野生型と比較して減弱しており、*AP-1* 活性は野生型導入細胞で抑制され、変異体導入細胞では更に抑制されていた。患者で同定された *EVI1* 変異体は転写制御調節の異常を引き起こす可能性が示唆された。これらの成果も発表準備中である。

(3) ゼブラフィッシュをモデルとする解析を行うため、研究代表者は 2016-17 に米国 Duke 大学 Center for Human Disease Modeling に滞在しメンデル遺伝病のモデル作成を学び、その成果を発表した (Niihori et al. Am J Hum Genet 2019)。さらに帰国後、所属機関においてゼブラフィッシュ解析が可能な施設を立ち上げた。*Tg(CD41:GFP)* (*thrombocyte* が蛍光標識されるトラン

スジェニックゼブラフィッシュ)の胚に対して MECOM の野生型および変異型 RNA を注入し、表現型の観察を継続している。また、mecom を対象とした morpholino を設計し、Tg(CD41:GFP)の胚に注入したところ、用量依存性に表現型の変化が観察された。より詳細な観察のための条件検討を継続している。また、CRISPR/Cas9 による mecom のフレームシフト変異を持つ個体の作成も行い、F1, F2 作成を行った。ホモで変異を持つ個体について成魚まで成長できるか検討を続けている。

MECOM のミスセンス変異や特定の部位を変異させた機能解析はこれまでも他の研究グループでも成果が限られており、上記解析の結果は MECOM の関連した病態にたいして新たな知見を加えるのみならず、正常な MECOM 機能の理解を深めるために重要な情報となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Iwasawa Shinya, Yanagi Kumiko, Kikuchi Atsuo, Kobayashi Yasuko, Haginoya Kazuhiro, Matsumoto Hiroshi, Kurosawa Kenji, Ochiai Masayuki, Sakai Yasunari, Fujita Atsushi, Miyake Noriko, Niihori Tetsuya, Shirota Matsuyuki, Funayama Ryo, Nonoyama Shigeaki, Ohga Shouichi et al.	4. 巻 85
2. 論文標題 Recurrent de novo MAPK8IP3 variants cause neurological phenotypes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Neurology	6. 最初と最後の頁 927 ~ 933
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1002/ana.25481	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Oba Daiju, Inoue Shin-ichi, Miyagawa-Tomita Sachiko, Nakashima Yasumi, Niihori Tetsuya, Yamaguchi Seiji, Matsubara Yoichi, Aoki Yoko	4. 巻 27
2. 論文標題 Mice with an Oncogenic HRAS Mutation are Resistant to High-Fat Diet-Induced Obesity and Exhibit Impaired Hepatic Energy Homeostasis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 138 ~ 150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebiom.2017.11.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Inoue Shin-Ichi, Takahara Shingo, Yoshikawa Takeo, Niihori Tetsuya, Yanai Kazuhiko, Matsubara Yoichi, Aoki Yoko	4. 巻 26
2. 論文標題 Activated Braf induces esophageal dilation and gastric epithelial hyperplasia in mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Hum Mol Genet	6. 最初と最後の頁 4715 ~ 4727
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddx354	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okamoto Nobuhiko, Nakao Hideto, Niihori Tetsuya, Aoki Yoko	4. 巻 57
2. 論文標題 Patient with a novel purine-rich element binding protein A mutation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Congenit Anom (Kyoto)	6. 最初と最後の頁 201 ~ 204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cga.12214	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Niihori Tetsuya, Nagai Koki, Fujita Atsushi, Ohashi Hirofumi, Okamoto Nobuhiko, Okada Satoshi, Harada Atsuko, Kihara Hiroataka, Arbogast Thomas, Funayama Ryo, Shirota Matsuyuki, Nakayama Keiko, Abe Taiki, Inoue Shin-ichi, Tsai I-Chun, Matsumoto Naomichi, Davis Erica E., Katsanis Nicholas, Aoki Yoko	4. 巻 104
2. 論文標題 Germline-Activating RRAS2 Mutations Cause Noonan Syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The American Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 1233 ~ 1240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajhg.2019.04.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Niihori T, Nagai K, Fujita A, Ohashi H, Okamoto N, Okada S, Harada A, Kihara H, Arbogast T, Funayama R, Shirota M, Nakayama K, Abe T, Inoue S, Tsai IC, Matsumoto N, Davis EE, Katsanis N, Aoki Y
2. 発表標題 Germline-activating RRAS2 mutations cause Noonan syndrome
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第64回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松原 洋一 (Matsubara Yoichi) (00209602)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・所長室・研究所長 (82612)	
研究分担者	青木 洋子 (Aoki Yoko) (80332500)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	
研究協力者	永井 康貴 (Nagai Koki)	東北大学・医学系研究科・大学院生 (11301)	