

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：84408

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08314

研究課題名（和文）CDC42異常症発症メカニズムの解明と治療薬の探索

研究課題名（英文）pathological mechanism of Takenouchi-Kosaki syndrome

研究代表者

渋川 幸直（Shibukawa, Yukinao）

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪母子医療センター（研究所）・分子遺伝病研究部門・主任研究員

研究者番号：90393264

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：CDC42異常症の1つである武内・小崎症候群は多彩な症状をもつ希少疾患である。我々は病態発症の原因となるCDC42活性が異常となるメカニズムを明らかにし、さらには巨大血小板性血小板減少症に着目した解析ではモデル細胞を樹立し、低下した血小板産生レベルを健常レベルにまで回復させることに成功した。この研究で回復効果が認められた薬剤はCDC42阻害剤であるML141やR-ketrolacだけでなく、脂質修飾阻害剤であるGGTI293やスタチン、ビスフォスフォネート製剤など多数認められており将来的な臨床応用に貢献する研究であると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

希少疾患であるTKSの原因となるCDC42の異常な活性化メカニズムを明らかにしたことはCDC42の活性化を制御する研究において学術的意義が高いと考えられる。また巨大血小板性血小板減少症に着目した解析ではMEG01細胞を用いて臨床症状を細胞レベルで再現し薬剤のスクリーニング系を確立したこと、さらに低下した血小板産生能を回復させる効果的な薬剤を複数提示したことは将来的な治療や症状の緩和法に繋がると考えられ社会的意義は非常に高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Takenouchi-Kosaki syndrome (TKS) exhibits a variety of clinical manifestations, including immunological and hematological anomalies. In the present study, we investigated the functional abnormalities of the TKS mutant in HEK293 cells and elucidated the mechanism of macrothrombocytopenia, one of the symptoms of TKS patients, by monitoring the production of platelet-like particles (PLP) using MEG-01 cells. We found that the TKS mutant was concentrated at the membrane compartment due to impaired binding to Rho-GDI and more active than the wild-type. Y64C mutant-expressing MEG-01 cells demonstrated short cytoplasmic protrusions with aberrant F-actin and microtubules, and reduced PLP production. Furthermore, such dysfunction was ameliorated by either suppression of Cdc42 activity or prenylation using chemical inhibitors. Our study may lead to pharmacological treatments for TKS patients.

研究分野：細胞生物学

キーワード：CDC42 CDC42異常症 武内・小崎症候群 巨大血小板性血小板減少症

1. 研究開始当初の背景

Takenouchi -Kosaki 症候群は重度知的障害や巨大血小板性血小板減少症、リンパ浮腫をはじめ屈指症や小頭症、眼瞼下垂など多彩な症状を持つ希少疾患で日本では当時三例が報告されている（現在は世界で30名を超える患者が報告されている）。3名の患者は同じ部位に変異を持っておりエフェクターやレギュレーターとの結合領域であるスイッチドメインのチロシンがシステインに置換されている。この変異体が細胞内シグナルにどのような影響を及ぼし前述した主たる症状を発症するのかを巨核球や血小板分化モデルである細胞株や疾患特異的iPS細胞を用いた血小板分化過程でどのステップに障害が生じているのかを細胞レベルで特定し、将来的な治療法や症状の緩和法の開発を目指した。

2. 研究の目的

CDC42異常症の1つであるTakenouchi -Kosaki 症候群(TKS)の臨床所見から本研究では巨大血小板性血小板減少症に着目し、巨核球・血小板分化過程における異常ポイントの発見とその緩和法を探索する事を主な目的とした。

アプローチとしては原因遺伝子の変異体を作成し293細胞内に導入後、病態発症に結びつくシグナル経路の絞り込みを行い薬剤による正常化を試みた。また巨核球や血小板分化モデル細胞のK562およびMEG-01細胞を用いてそれぞれの分化経路でどのステップに異常があるかを探索、血小板減少が緩和される薬剤の探索を行った。最後に樹立した疾患特異的iPS細胞から血小板への分化誘導を行い巨核球への分化と成熟化の指標である胞体突起形成を経て産生される血小板までの分化過程でどのポイントで障害を受けているかを特定し、選定した薬剤の適正濃度と処理の時期や期間を決定し将来的な動物実験や臨床応用を目指した。

3. 研究の方法

CDC42は活性化ステップで脂質修飾を受け抑制因子からの解離、細胞膜への移行が必須であるので変異型CDC42が細胞内局在で差が認められるか細胞分画法によって解析をすすめた。続いて野生型に較べてGTP / GDP結合型のどちらが細胞内で増加しているのかをプルダウン法により解析し、血小板産生過程において異常な下流シグナルの特定を試みた。FlagタグあるいはGFPタグを付加し細胞内に導入、EGFやPMA処理により活性化を誘導した後に細胞内局在の変化について共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。また細胞分画により細胞膜と細胞質の局在レベルに差が認められるか追試も行った。Flag-CDC42を導入した細胞からは抗Flag抗体カラムを用いてFlagCDC42会合分子を精製し、ペプチドマスフィンガープリント法により蛋白同定を進め変異型の異常シグナルと病態発症に関連性があるか更なる解析を進めた。

変異型CDC42が巨核球・血小板分化過程に影響を及ぼしているかどうかについてはそれぞれの分化モデル細胞であるK562とMEG-01細胞を用いて解析を進めた。分化プロセスは核染色による多核化のモニターと巨核球や血小板のマーカー遺伝子の表面抗原の発現レベルを細胞染色やFACS、ウエスタンブロットにより判定する。巨核球分化や血小板分化過程において異常が認められたステップに対して各種阻害剤の添加による正常化を試みた。

疾患特異的iPS細胞を用いた解析に関してはVEGF存在下で15日間培養しSac様細胞を形成させ、このiPS-Sacに対してSCF, TPO, Heparin存在下で7日間培養し巨核球への分化誘導を行う。分化した巨核球を分離し、更に分化誘導を行う事によって放出された血小板数に差違が認められるか解析を行った。また別法として胚様体を経由させて巨核球へと分化させた後に巨核球および血小板前駆細胞と血小板数に関しても同様に比較解析を行う。最後に選定した薬剤によって巨核球分化と血小板前駆細胞および血小板産生に対する効果の検討を進める。

4. 研究成果

293細胞を用いた解析からTKS変異型は膜移行が促進しており細胞内でのGTP結合型が増加していた。これらの事よりこの変異体は高活性型であると考えられる。次にその原因を探索する為にFlagタグを付加したCDC42を細胞内に導入し、抗体カラムを用いて会合分子群の回収とSDS-PAGE・銀染色による分離・可視化、蛋白同定を試みたところ抑制因子であるRhoGDIとの会合が顕著に抑制されていた。このことよりTKS変異体の膜移行の促進と高活性化の原因はRhoGDIとの会合が阻害されていると考えられた。

次に巨大血小板性血小板減少症に着目した解析では血小板分化のモデル細胞であるMEG01細胞にTKS変異体を発現させ分化誘導を行うと臨床症状と同様に血小板の産生量が低下していたことが明らかとなった。このことよりMEG01細胞は低下した血小板産生量を回復させる薬剤の探索を行うモデル細胞として有用であると考えられた。TKS変異が高活性である事からCDC42の活性を阻害するタイプの薬剤の検討を行ったところ、ML141やR-ketorolacだけでなく脂質修飾阻害剤であるGGTI-298、スタチンなどの添加により低下した血小板産生量を野生型レベルまで回復させる事が確認された。これらの結果はScience Reportsに投稿している。

次に疾患特異的iPS細胞においてMEG-01細胞で確認した血小板産生量の減少が再現できるか、また選定した薬剤でその回復効果が認められるかという事について解析を進めた。従来ではEBを経由した分化法が主流であるがTKS由来iPSCではEB形成の初期段階で障害が生じていたため、別法としてHPCへの分化誘導を経由して巨核球(MK)へと分化させる方法から血小板を産生させることが出来ないか検討を行った。従来ではMKの分化までで血小板の産生までは成功していないが、培地やサイトカイン濃度を検討する事で血小板を産生させる新たな分化法を樹立した。これらの結果は現在投稿準備中である。

この分化法では分化14日目にearly HPCとHPCが最も多くなり17日目になるとmature MKへの分化が最大になることを確認した。TKS由来iPSCではHPC細胞、mature MK細胞ともに健常型よりも少なくなっていた。分化21日目のTKS由来iPSCにおいては産生する血小板数も減少していることが明らかとなった。mature MK細胞が最も多く回収出来る分化17日目からML-141およびR-ketorolacの添加を行い低下した血小板産生が回復するか検討を行ったが現在の所有意な回復条件は見いだせていない。今後はHPCへの分化効率が低下する原因の解明とproplatelet形成、特に細胞骨格系の異常がどのようにして血小板産生の減少を引き起こすのかとその解消法について解析を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Daimon, E., Shibukawa, Y., Thanasegaran, S., Yamazaki, N., and Okamoto, N.	4. 巻 11
2. 論文標題 Macrothrombocytopenia of Takenouchi-Kosaki syndrome is ameliorated by CDC42 specific- and lipidation inhibitors in MEG-01 cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 17990
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-97478-y.	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 Hamada, N., Ito, H., Shibukawa, Y., Morishita, R., Iwamoto, I., Okamoto, N., and Nagata, K. I.	4. 巻 529
2. 論文標題 Neuropathophysiological significance of the c.1449T>C/p.(Tyr64Cys) mutation in the CDC42 gene responsible for Takenouchi-Kosaki syndrome.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 1033-1037
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.06.104.	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 渋川幸直、大門江津子、山崎奈津子、Suganya Thanasegaran、岡本伸彦
2. 発表標題 CDC42異常症の病態解析
3. 学会等名 生化学会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 血小板分化モデル細胞MEG-01を用いたCDC42異常症(TKS)の解析 (I)
2. 発表標題 大門江津子、渋川幸直、山崎奈津子、Suganya Thanasegaran、岡本伸彦
3. 学会等名 人類遺伝学会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渋川幸直、大門江津子、山崎奈津子、Suganya Thanasegaran、岡本伸彦、長崎
2. 発表標題 血小板分化モデル細胞MEG-01を用いたCDC42異常症(TKS)の解析 (11)
3. 学会等名 人類遺伝学会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪母子医療センター研究所
<https://www.wch.opho.jp/research/index.html>

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関