

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08855

研究課題名（和文）遺伝性血小板減少症の網羅的遺伝子診断系の確立および病態解析を含む新規疾患群の提唱

研究課題名（英文）Establishment of comprehensive genetic analysis and proposal of novel disease entities in inherited thrombocytopenias.

研究代表者

笹原 洋二（Sasahara, Yoji）

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：60372314

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：小児期の血小板減少症には、免疫性血小板減少性紫斑病の他に責任遺伝子群の変異を病因とする遺伝性血小板減少症がある。本研究では、研究代表者のWiskott-Aldrich症候群の分子病態および遺伝性血小板減少症における新規原因遺伝子解析の研究基盤を発展させるため、以下の研究を行った。(1)遺伝性血小板減少症の既知原因遺伝子の網羅的遺伝子診断系の確立と臨床への還元 (2)既知遺伝子が正常である臨床検体を用いた新規原因遺伝子の探索 (3)新規原因遺伝子MECOMの異常による疾患概念の確立とマウスモデルの病態解析 (4)新規原因遺伝子CDC42の異常による疾患概念の確立と細胞レベルの病態解析

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまでの研究代表者の研究業績を基盤として、免疫性血小板減少性紫斑病（ITP）との鑑別診断に必要な遺伝性血小板減少症全体の系統的かつ網羅的遺伝子診断系を確立して臨床に還元したこと、未知原因遺伝子の多い本疾患群において新規原因遺伝子を探索し候補遺伝子を同定したこと、かつ世界に先駆けて提唱する2つの新規疾患概念として、MECOM異常症およびCDC42異常症の確立と分子病態の解明に発展させた。以上の成果は、小に血液・腫瘍学における造血や巨核球・血小板産生機構の研究分野において、臨床的還元を行ったことに加えて、新規2疾患の提唱を行ったことに学術的意義と社会的意義があった。

研究成果の概要（英文）：Childhood thrombocytopenias include inherited thrombocytopenias caused by mutations in responsible genes that control platelet production, besides immune thrombocytopenia. In this research project, I performed four projects described below to promote basic research and clinical applications on Wiskott-Aldrich syndrome and its related disorders. (1) Establishment of comprehensive genetic analysis for inherited thrombocytopenias and its clinical application. (2) Search for novel responsible genes for inherited thrombocytopenias in clinical samples. (3) Establishment of novel disease entity of MECOM-associated syndrome and analysis of mice model of the disease. (4) Establishment of novel disease entity of CDC42 C-term disease and molecular and cellular analysis of the disease.

研究分野：小児血液・腫瘍学

キーワード：遺伝性血小板減少症 網羅的遺伝子解析 MECOM CDC42

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小児期の血小板減少症として最も頻度が高いのは免疫性血小板減少性紫斑病 (以下 ITP) であるが、他に先天的な遺伝子変異を原因とする遺伝性血小板減少症が存在する。ITP の診断は基本的には除外診断であり、臨床所見のみでは困難な場合が多く、慢性・難治性 ITP 症例あるいは家族歴のある症例の中に、遺伝性血小板減少症症例が含まれ未診断のまま不要な ITP の治療を受けている症例もある可能性が高い。そのため、ITP との鑑別診断と適切な治療方針選択には包括的な遺伝子診断法の確立が必要であった。

遺伝性血小板減少症は近年新規原因遺伝子同定の報告が相次いでなされ、未知の原因遺伝子が存在する可能性の高い疾患群である。巨核球は造血幹細胞から極めて近い分化段階にあるため、造血幹細胞の維持に重要な遺伝子群も含まれ、正常血球分化を理解する上でも重要な知見となる。Wiskott-Aldrich 症候群 (以下 WAS) は小型血小板を伴う血小板減少、易感染性と湿疹を主徴とする原発性免疫不全症である。研究代表者は、これまで約 25 年間に渡り WAS および X 連鎖血小板減少症の研究基盤がある。特に WAS 異常症 (Type 1 WAS、X 連鎖) の分子病態と WASP 結合蛋白質 (WASP-Interacting Protein: 以下 WIP) の研究では世界的な成果として、WIP が WASP 蛋白質の安定性や免疫学的シナプスへのリクルートを制御することにより Type 1 WAS の病態に重要な役割を果たしていることを報告した (Mol Cell, 2002; Proc Natl Acad Sci USA, 2007; J Allergy Clin Immunol, 2013; 他)。

このような背景の中で、我々は、2015 年に国内における小型・正常大の血小板を有する遺伝性血小板減少症 35 例を解析し、WAS の他に、急性白血病へ転化する可能性のある RUNX1 異常症や ANKRD26 異常症などの遺伝子解析と臨床所見との相関を報告している (Pediatr Blood Cancer, 2015)。更に新規原因遺伝子変異として既知の HOXA11 遺伝子に異常のない撓骨尺骨癒合を伴う遺伝性血小板減少症 3 症例において、新たに MECOM 異常症 (EVI-1 異常症) を報告した (Am J Hum Genet, 2015)。更に、これらの既知遺伝子が正常な新生児 2 症例において、WASP 蛋白質に結合して活性化する CDC42 遺伝子の C 末に同一のヘテロ変異を同定した。

2. 研究の目的

本研究計画では、研究代表者の Wiskott-Aldrich 症候群 (以下 WAS) および遺伝性血小板減少症の研究基盤を発展させるため、以下を研究目的とする。

- (1) 遺伝性血小板減少症の既知原因遺伝子の網羅的遺伝子診断系の確立と臨床への還元
- (2) 既知遺伝子が正常である臨床検体を用いた新規原因遺伝子の探索
- (3) 新規原因遺伝子 MECOM の異常による疾患概念の確立とマウスモデルの病態解析
- (4) 新規原因遺伝子 CDC42 の異常による疾患概念の確立と細胞レベルの病態解析

3. 研究の方法

- (1) 遺伝性血小板減少症の既知原因遺伝子の網羅的遺伝子診断系の確立と臨床への還元

研究代表者は日本小児血液・がん学会血小板委員会委員として、小型・正常大の血小板を有する遺伝性血小板減少症の推奨コンサルト先として指定されている。研究期間内に、約 50 遺伝子を含む既知原因遺伝子の網羅的遺伝子解析パネルを作成する。難治性・慢性 ITP あるいは家族歴のある未診断例および今後の解析依頼症例を対象に、網羅的遺伝子パネル解析を確立して主治医に還元するとともに、本邦における本疾患群の全体像を明らかにする。

- (2) 既知遺伝子が正常である臨床検体を用いた新規原因遺伝子の探索

網羅的標的遺伝子パネル解析を行っても、一定の割合で有意な変異が同定できない症例が存

在する。これまで未診断例の臨床検体を約 65 家系蓄積しているため、トリオ検体が入手可能であった症例を対象として、当研究科にて実施可能な HiSeq2000 によるエクソーム解析および当研究室にて既に解析可能なアレイ CGH 法を用いて、新規遺伝子変異の探索を行う。

(3) 新規原因遺伝子 MECOM の異常による疾患概念の確立とマウスモデルの病態解析

(2)の手法により、研究代表者は、橈骨尺骨癒合異常を伴う血 小板減少症の本邦 3 症例において、MECOM 遺伝子の Zinc finger domain に集中するミスセンスのヘテロ変異であることを発見し、細胞レベルの機能解析と併せて論文報告した。本研究計画では、研究協力者との共同研究により、症例にて同定された MECOM 遺伝子のミスセンス変異を導入したマウスモデルを作成し、変異導入マウス骨髄において、造血幹細胞レベルから巨核球分化・血小板産生の造血異常をフローサイトメトリー法や造血能評価により明らかにし、また個体レベルにおいて造血以外の橈骨尺骨癒合異常などの発生異常の解析を行うことにより、病態解析と疾患概念の確立を行う。

(4) 新規原因遺伝子 CDC42 の異常による疾患概念の確立と細胞レベルの病態解析

最近の国内症例において、WAS 類似の臨床所見がありながら既知の WAS および WIPF1 遺伝子変異を認めない新生児 2 症例を発見した。2 症例ともに新生児期より血小板減少、特徴的な湿疹、全身性自己炎症性疾患を伴い、WAS 類似の経過を辿った症例である。その原因が WAS と結合し活性化する CDC42 遺伝子の C 末端の同一の機能喪失型変異によることを発見した。2 症例の臨床像と血液・免疫学的所見をまとめ、WAS の重症型と同様の臨床経過であることを示す。2 症例の臨床検体として末梢血と血清および線維芽細胞株を用いて、巨核球・血小板系へ分化する系での血小板産生機構の異常、自己炎症に関連する単球・マクロファージの分化異常の有無を解析することにより、細胞レベルの病態解析を行う。

4. 研究成果

(1) 遺伝性血小板減少症の既知原因遺伝子の網羅的遺伝子診断系の確立と臨床への還元

約 60 遺伝子を含む既知原因遺伝子の網羅的遺伝子解析パネルを最新の内容に改訂した。難治性・慢性 ITP あるいは家族歴のある未診断例を対象に網羅的遺伝子解析を行い、変異を同定できた症例において、その解析結果を主治医に報告書として還元した。現在、本邦における本疾患群の全体像を報告するために論文作成中である。

(2) 既知遺伝子が正常である臨床検体を用いた新規原因遺伝子の探索

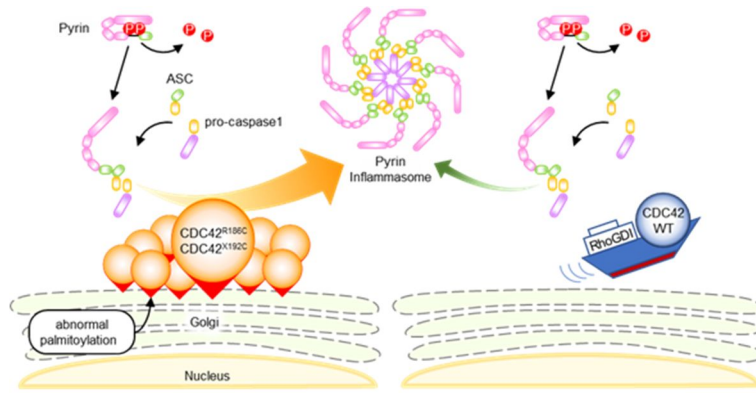
これまで未診断例の臨床検体を約 65 家系蓄積しているため、当研究科にて実施可能な HiSeq2000 によるエクソーム解析を行い、病的変異を同定した症例については主治医に報告書として還元した。また、新規責任遺伝子を同定しており、現在マウスモデルおよび細胞レベルにおいて機能解析を進めている。

(3) 新規原因遺伝子 MECOM の異常による疾患概念の確立とマウスモデルの病態解析

研究協力者との共同研究により、新規国内 2 家系の詳細な遺伝子解析を行い、Blood Adv に論文報告した。臨床症例にて同定された MECOM 遺伝子のミスセンス変異を導入したマウスモデルを作成し、変異導入マウス骨髄において、造血幹細胞レベルから巨核球分化・血小板産生の造血異常をフローサイトメトリー法や造血能評価により解析を行っている。

(4) 新規原因遺伝子 CDC42 の異常による疾患概念の確立と細胞レベルの病態解析

CDC42 C 末端に同じ変異を有する国内 2 症例の臨床検体として末梢血と血清および線維芽細胞株と iPS 細胞を用いて、自己炎症に関連する単球・マクロファージの分化異常の有無を解析し、J Exp Med に論文報告した(図 1)。2 症例とも血小板減少を伴っているため、今後、巨核球・血小板系の分化異常についての機能解析を予定している。



CDC42 C-term病

正常

図1: CDC42 C末端に変異を有する症例の病態解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sasahara Y, Wada T, Morio T.	4. 巻 242
2. 論文標題 Impairment of cytokine production following immunological synapse formation in patients with Wiskott-Aldrich syndrome and leukocyte adhesion deficiency type 1.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clin Immunol	6. 最初と最後の頁 109098
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clim.2022.109098.	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 Irie M, Niihira T, Nakano T, Suzuki T, Katayama S, Moriya K, Niizuma H, Suzuki N, Saitoh-Nanjyo Y, Onuma M, Rikiishi T, Sato A, Hangai M, Hiwatari M, Ikeda J, Tanoshima R, Shiba N, Yuza Y, Yamamoto N, Hashii Y, Takita J, Maeda M, Aoki Y, Imaizumi M, Sasahara Y.	4. 巻 117
2. 論文標題 Reduced-intensity conditioning is effective for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in infants with MECOM-associated syndrome.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Int J Hematol	6. 最初と最後の頁 598-606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-022-03505-7.	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 石黒 精、森麻希子、宮川義隆、今泉益栄、小林尚明、笹原洋二、内山 徹、野村 理、堀内清華、高橋幸博、東川正宗、日本小児血液・がん学会血小板委員会	4. 巻 159(1)
2. 論文標題 小児免疫性血小板減少症診療ガイドライン	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本小児血液・がん学会雑誌	6. 最初と最後の頁 50-57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Nishitani-Isa M, Mukai K, Honda Y, Nihira H, Tanaka T, Shibata H, Miyamoto T, Komada K, Hiejima E, Izawa K, Kawasaki Y, Osawa M, Katata Y, Onodera S, Watanabe T, Kure S, Takita J, Ohara O, Saito M, Nishikomori R, Taguchi T, Sasahara Y#, Yasuki T#. (# Equal corresponding author)	4. 巻 219(6)
2. 論文標題 Trapping of CDC42 C-terminal variants in the Golgi drives pyrin inflammasome hyperactivation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Exp Med	6. 最初と最後の頁 e20211889
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20211889	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 Niihori T, Tanoshima R, Sasahara Y, Sato A, Irie M, Saito-Nanjo Y, Funayama R, Shirota M, Abe T, Okuyama Y, Ishii N, Nakayama K, Kure S, Imaizumi M, Aoki Y.	4. 巻 6(18)
2. 論文標題 Phenotypic heterogeneity in individuals with MECOM variants in 2 families.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood Adv	6. 最初と最後の頁 5257-5261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2020003812	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 笹原洋二、國島伸治、石黒精、日本小児血液・がん学会血小板委員会	4. 巻 58(3)
2. 論文標題 総説 先天性血小板減少症・異常症の診療ガイド	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本小児血液・がん学会雑誌	6. 最初と最後の頁 253-262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 笹原洋二	4. 巻 62(8)
2. 論文標題 総説 先天性血小板減少症・異常症	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床血液 日本血液学会雑誌	6. 最初と最後の頁 1319-1326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 笹原洋二	4. 巻 -
2. 論文標題 Wiskott-Aldrich症候群	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 新臨床内科学	6. 最初と最後の頁 1806-1807
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 笹原洋二	4. 巻 -
2. 論文標題 Wiskott-Aldrich (ウィスコット・オールドリッチ) 症候群	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 小児感染免疫学	6. 最初と最後の頁 628-632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 笹原洋二	4. 巻 -
2. 論文標題 免疫性血小板減少性紫斑病	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 今日の小児治療指針	6. 最初と最後の頁 550-551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 笹原洋二	4. 巻 -
2. 論文標題 免疫系以外の症状を呈する、あるいは症候群を呈する複合免疫不全症 概念及びトピックス	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 原発性免疫不全症候群 最新の疾患分類と新規疾患を中心にー	6. 最初と最後の頁 87-92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 笹原洋二	4. 巻 -
2. 論文標題 ARPC1B欠損症	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 原発性免疫不全症候群 最新の疾患分類と新規疾患を中心にー	6. 最初と最後の頁 93-95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 中野 智太、新妻 秀剛、片山 紗乙莉、渡辺 祐子、入江 正寛、力石 健、笹原 洋二、呉 繁夫	4. 巻 56
2. 論文標題 Wiskott-Aldrich症候群に合併した全身性自己免疫性炎症にRituximabが奏効した一例	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本小児血液・がん学会雑誌	6. 最初と最後の頁 221-224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 笹原洋二	4. 巻 83
2. 論文標題 免疫不全症にみられる悪性腫瘍の特徴	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 小児科診療	6. 最初と最後の頁 341-344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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4件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 笹原洋二
2. 発表標題 特別講演：先天性血小板減少症の診断と治療における最近の知見
3. 学会等名 第90回東海小児血液懇話会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 笹原洋二
2. 発表標題 教育講演 先天性血小板減少症・異常症
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笹原洋二
2. 発表標題 腸管合併症を呈するPID
3. 学会等名 第4回日本免疫不全・自己炎症学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笹原洋二
2. 発表標題 東北地区における原発性免疫不全症治療について
3. 学会等名 第10回東北免疫不全症研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 石黒 精、森麻希子、宮川義隆、今泉益栄、小林尚明、笹原洋二、内山 徹、高橋幸博、東川正宗、日本小児血液・がん学会血小板委員会	4. 発行年 2022年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 91
3. 書名 小児免疫性血小板減少症診療ガイドライン2022年度版	

1. 著者名 笹原洋二	4. 発行年 2022年
2. 出版社 総合医学社	5. 総ページ数 5
3. 書名 ITP 小児科診療ガイドライン-最新の診療指針-第5版	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------