

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17865

研究課題名(和文)先天性血小板減少症・止血凝固異常症の遺伝的疾患病態の解明

研究課題名(英文)Molecular genetic analysis of congenital thrombocytopenia, hemostatic and coagulation disorder

研究代表者

内山 由理 (UCHIYAMA, Yuri)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：50829794

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)：小児期に発症する血小板減少症は、免疫原性の血小板減少症や造血器悪性腫瘍、骨髄不全症、先天性血小板減少症の鑑別が必須である。全エクソーム解析により血小板減少症及び汎血球減少症を呈する家系から同定された遺伝子A及びBに対して、deep-sequencing, RT-PCRやRNAシーケンスを行うことで、各遺伝子及びその下流における発現への影響が評価された。遺伝子Aのバリエーションは体細胞モザイクであった。このバリエーションは病原性が強く、変異含有細胞を得ることが困難であった。原因不明の先天性止血・凝固異常症42家系に対して全エクソーム解析を行い、計10家系7遺伝子に疾患関連バリエーションを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天性血小板減少症の遺伝的原因を明らかにすることで、疾患の背景を明らかにすることができる。造血の過程のどの段階での異常かを同定することは、先天性造血障害における治療方針を検討する上で大きな指針の一つとなるため、新規疾患の遺伝的原因の解明は非常に重要である。これら先天性疾患の遺伝的疾患原因解明は、後天性疾患である多くの造血不全・造血器腫瘍の理解・治療につながることを期待される。患者抽出方法を含め、本手法を用いた先天性血小板減少症・止血凝固異常症の遺伝的疾患病態の解明は、非常に効率的であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Thrombocytopenia occurring in childhood must be differentiated from immune thrombocytopenia, hematological malignancy, bone marrow failure, and inherited thrombocytopenia. In this study, exome sequencing identified gene A and B in two families with pancytopenia and congenital thrombocytopenia, respectively. The pathogenicity of these two genes and variants were subsequently evaluated by deep-sequencing, RT-PCR, and/or RNA-sequencing. Deep-sequencing results was strongly convinced that this variant was derived from the early-phase somatic mosaicism. However, lymphoblastoid cell lines derived from patient's blood could not include the cells with the variant. The strong toxicity of the variant of gene A induced cell mortality. A total of 42 families of congenital abnormalities of thrombosis and/or hemostasis was performed for exome sequencing. The diagnostic rate was 23.8% (10/42). Exome sequencing is useful technique for the rare disorder associated with congenital thrombocytopenia.

研究分野：先天性止血凝固異常

キーワード：先天性造血器障害 汎血球減少症 血小板減少症 全エクソーム解析

1. 研究開始当初の背景

先天性血小板減少症・止血機能異常症のうち、Glanzmann 血小板無力症や May-Hegglin 異常症のように原因遺伝子が同定され診断手法が確立された疾患もあるが、全体の約 40%程度で免疫原性血小板減少症に拠らない原因不明の血小板減少症が存在する [Johnson et al., 2016]。造血や止血に関わる既知遺伝子[Simeoni et al., 2016]に関連したパスウェイの遺伝子を中心に解析を行うことは、先天性血小板減少症・止血異常症の原因遺伝子探索には非常に効果的である。先天性血小板減少症の遺伝的原因を明らかにすることで、疾患の背景を明らかにすることができる。造血の過程のどの段階での異常かを同定することは、先天性造血障害における治療方針を検討する上で大きな指針の一つとなるため、新規疾患の遺伝的原因の解明は非常に重要である。これら先天性疾患の遺伝的疾患原因解明は、後天性疾患である多くの造血不全・造血器腫瘍の理解・治療につながることを期待される。これまでに申請者らは、先天性血小板減少症や汎血球減少症を呈する異なる 5 家系の全エクソーム解析により、*RUNX1* 異常に伴う先天性血小板減少症(未発表)、*TERT* 異常に伴う家族性再生不良性貧血・肺線維症を呈する先天性角化不全症(未発表)、*MYH9* 異常症による先天性巨大血小板減少症(未発表)、*GFI1B* 異常に伴う巨大血小板減少症 [Uchiyama et al., Br J Hematol., 2018]、*CYCS* の機能喪失に伴う血小板減少症 [Uchiyama et al., Clin Genet. 2018] をそれぞれ同定した。今回、先天性血小板減少症から汎血球減少症を来した 1 家系に造血幹細胞の分化・増殖にかかわる経路を調節する非受容体型チロシンキナーゼの一つである遺伝子 A を、先天性血小板減少症から慢性骨髄単球性白血病、急性骨髄性白血病を来した 1 家系に *JAK/STAT* パスウェイ上の遺伝子 B を同定した。遺伝子 A 及び B は造血幹細胞から末梢血細胞へと分化する際に早期に関与するチロシンキナーゼ及び転写因子であり、本バリエーションの病原性の検証は、先天性造血障害の疾患病態の遺伝的発症機序の理解とともに、罹患者の治療方針決定への大きな寄与へとつながる。

2. 研究の目的

申請者らは、血小板減少症及び汎血球減少症を呈する 2 家系において、全エクソーム解析によりそれぞれ造血幹細胞の分化・増殖にかかわる経路を調節する非受容体型チロシンキナーゼ、*JAK/STAT* パスウェイに新規原因遺伝子が疑われる新規変異を見出した。本研究では、(1)これら変異による、下流遺伝子の発現・リン酸化異常の検証のため、*in vitro* での Western Blot 解析やリン酸化特異的抗体によるイムノプロットング法を用いて変異タンパク質の機能を評価すること、加えて、(2)原因不明の血小板減少症を呈する先天性止血・凝固異常症 42 家系に対し全エクソーム解析を用いて新規原因遺伝子の同定を試みることを目的とする。

3. 研究の方法

遺伝子 A 及び B の機能評価:

患者及び健常人由来リンパ芽球様細胞(lymphoblastoid cell line, LCL)から抽出した RNA、タンパク質を用いて、RT-PCR 及び Western Blot 解析にて遺伝子 A 及び B の mRNA 及びタンパク質発現を評価する。遺伝子 A のタンパク質発現が健常人よりも低下していれば、機能喪失変異であることが確認できる。更にリン酸化特異的抗体によるイムノプロットング法を用いて、遺伝子 A が調節する下流の遺伝子群のリン酸化・脱リン酸化の評価を行う予定であったが、成果に記載するように、変異毒性が強い影響で変異含有細胞を得ることができなかった。LCL 作成を再度試みるなどの対策を行った。また、遺伝子 A のバリエーションは胎生早期の体細胞変異が疑われるため、本遺伝子に対して *Miseq* を用いたディープシーケンシングを行い、各組織における変異含有率を評価する。健常コントロール末梢血単核球由来 DNA と患者の各組織由来の DNA (中胚葉:末梢血単核球、唾液リンパ球、外胚葉:爪、毛根) を使用して、当該変異を含む PCR 産物と *Miseq* を用いてディープシーケンシングによる変異含有率の検証を行う。健常コントロールは塩基配列に依存したアーチファクトの除去のために使用する。外胚葉組織に対して中胚葉組織から抽出した DNA の変異含有率が高い場合、本遺伝子変異が部位・組織特異的に病原性が表出していることを示唆する。

遺伝子 B に対して、患者由来の LCL から抽出した RNA を用いて、RNA シーケンシングを行い、下流の遺伝子の発現変化を検証した。

家族性血小板減少症・止血凝固異常症の遺伝的原因解明:

現在までに横浜市立大学遺伝学教室には先天性止血異常症 42 家系が集積している。2019 年度にこれら家系に対し、患者および両親を組み合わせたトリオの検体を用いて全エクソーム解析を行う。2020 年度には、下記手法で得られた結果を評価、造血や止血機能に関連する新たな関連遺伝子の変異を検出することを試みる。変異の種類(常染色体/X連鎖、優性/劣性変異)、(2-2)本研究の学術的独自性と創造性で示したように、健常人データベースによる検索、変異機能予測プログラムを使用した病原性変異の評価を行う。全エクソーム解析結果より、病的変異である可能性が高いと判断された変異の検証として、Sanger 法による配列確認をする必要がある。解

析は規定プロトコールに従い行う。エクソームシークエンスデータを用いた SNV 解析にて病的変異が検出されなかった場合、遺伝子のコピー数変化(copy number variation, CNV) の可能性を考え、全エクソームデータを用いた XHMM (eXome-Hidden Markov Model) 解析や Nord 解析を行う。また、今回は、CNV の検出感度を向上させる目的で、XHMM 及び jNord の解析手法を申請者らが改良した手法を用いた[Uchiyama et al., Hum Mutat. 2021]。本解析で新たな候補遺伝子変異を検出した場合には、上記遺伝子 A/B 同様に結晶構造解析による病原性評価を行い、更に変異タンパク質の機能評価を行うことで、造血や止血機能に関連する新たな関連遺伝子の変異を検出することを試みる。

4. 研究成果

遺伝子 A・B に対する研究成果:

遺伝子 A の機能評価をするために、患者由来の株化リンパ芽球細胞の変異含有状況を確認したところ、通常のサンガー法を用いた塩基配列解析では変異を検出することができなかった。限界希釈法を用いて可能な限り一細胞分離を行い、バリエントを含有する細胞の分離に努めたが、得られなかった。これは変異毒性が強いことが原因として挙げられた。これに対し、再度患者由来の株化リンパ芽球を作成し、1細胞ごとに単離・培養、サンガー法を用いて変異含有細胞の有無を検証したが、1回目同様に変異含有細胞を確認することはできなかった。変異含有率が担保された状況で株化リンパ芽球の作成を2回行っており、変異含有細胞における本バリエントの病原性が高く、生存が困難なため死滅した可能性を強く示唆し、バリエントを導入した細胞実験も困難であることが強く予想された。

deep-sequencing を用いた体細胞バリエントの検討では、末梢血単核球由来、及び唾液白血球由来の DNA で 20-30% の変異含有率を確認した一方で、毛根由来の DNA では 0.1% と著明な低下がみられた。少なくとも造血系に強く体細胞変異が導入されていることを確認した。

組織	全リード数	変異型リード数	野生型リード数	変異型含有率	野生型含有率
血液	11070	2425	8629	21.91	77.95
唾液	13748	5077	8660	36.93	62.99
毛根	14158	14	14140	0.10	99.87
コントロール	9862	4	9855	0.04	99.93

遺伝子 B の機能評価は、患者由来の株化リンパ芽球から RNA を抽出し、RT-PCR を行うことにより、スプライシング異常を同定した。また、RNA シークエンスにより下流の遺伝子の発現動態に変動があることを確認したが、疾患との関連性の詳細な評価は困難であった。

原因不明の先天性止血異常症 42 家系に対して行った全エクソーム解析:

解析の流れを図 1 に示す。エクソーム解析により、ENG 1 家系、ITGA2B 2 家系、TET2 2 家系、MYH9 1 家系、GPIIB 1 家系にそれぞれ病的と判断されるバリエントを同定した。また、遺伝性血栓性素因が疑われ解析した家系から、TSC1 を同定している。常染色体劣性遺伝形式をとる第 V 因子欠乏症では、

ミスセンス変異と F5 の一部を含む約 420kb の欠失を同定、コンパウンドヘテロ接合性変異であることを確認した。また、GPIIB に常染色体優性遺伝形式の巨大血小板性血小板減少症を同定した。これらのうち、新規バリエントは 6 個であった。

以上より、診断に難渋する先天性血液疾患では、全エクソーム解析による遺伝学的疾患の同定が非常に有用と考えられた。

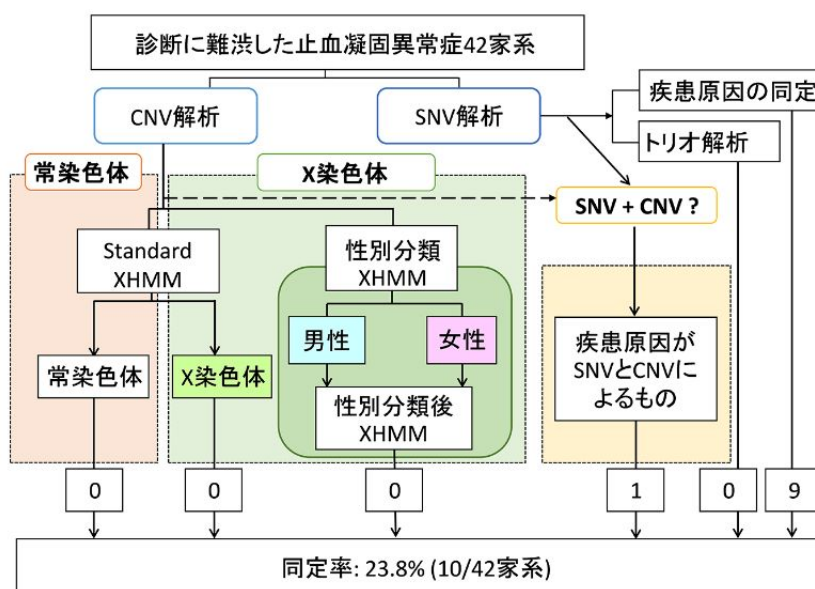


図1. 全エクソーム解析の解析デザインと同定家系数

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 内山由理
2. 発表標題 Molecular genetic analysis of 10 families with chronic thrombocytopenia
3. 学会等名 International Society on Thrombosis and Haemostasis (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内山由理
2. 発表標題 von Willebrand 病の臨床診断における遺伝子解析の有用性
3. 学会等名 第41回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内山由理
2. 発表標題 先天性第V因子欠乏症の遺伝学的診断とコピー数解析
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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