

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 7日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2011

課題番号：20591243

研究課題名（和文）先天性好中球減少症におけるG-CSF受容体遺伝子異常の臨床的・生物学的意義

研究課題名（英文）Clinical and biological significance of granulocyte colony stimulating factor receptor gene abnormalities those found in severe congenital neutropenia.

研究代表者

三井 哲夫（MITSUI TETSUO）

山形大学・医学部・講師

研究者番号：30270846

研究成果の概要（和文）：先天性好中球減少症の患者白血球のG-CSF(CSF3)受容体切断型遺伝子異常の経時的変異解析を行うなかで、G-CSF投与中の1例に、CSF3受容体膜貫通部直上にヘテロの後天的遺伝子変異を特定した(c.1947C>T:Ala569Val)。患者さんは症状に変化なく、6か月後の骨髄からこの変異は消失した。こうしたゲノム不安定性ともいべき現象は同症の白血病化への関連を考える上で興味深い。

研究成果の概要（英文）：We conducted sequential G-CSF receptor (CSF3) gene analysis of patients with severe congenital neutropenia, and found a heterogeneous mutation (c.1947C>T:Ala569Val) in the receptor gene that coded right above cell membrane. This mutation is confirmed as the acquired gene mutation. The patient did not show any change in her clinical course and this mutation disappeared from her marrow six months later. Genome instability like this is interesting in relation to leukemic change of severe congenital neutropenia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	600,000	180,000	780,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：CSF3R、先天性好中球減少症、白血病化、ゲノム不安定性

1. 研究開始当初の背景

先天性好中球減少症は好中球絶対数の減少($<200/\mu\text{l}$)と易感染性を特徴としている。この疾患でG-CSF投与後に骨髄異形性症候群や急性白血病(MDS/AML)に移行する症例が10%程度みられている。先天性好中球減少症から移行したMDS/AMLにおいてはその80%にG-CSF受容体(CSF3R)の後天的切断型変異が見出されている。いくつかの症例報

告で、病初期認められなかったこの切断型異常がG-CSF投与後に出現し、前後して白血病化を来したとの報告が為された。また、G-CSFは末梢血同種幹細胞移植を行う際、健康ドナーにも投与されているが、米国でのG-CSF投与後長期観察研究において、この健康ドナーの200人中2人に投与後4~5年でAMLの発症を観た事が報告され(Br J Haematol 135,642-, 2006)、G-CSF投与の

AML 発症における何らかの役割が示唆されている。

2. 研究の目的

我々は平成 14 年以降、先天性好中球減少症においてサイトカインシグナル伝達系の異常の介在を想定し、CSF3R 遺伝子異常の解析を行ってきた。その結果、重症先天性好中球減少症を含む G-CSF 投与の関連性が示唆される先天性血液異常症の白血球化には、CSF3R の変異に加え、他の要因が必要であると考えられた。そこで CSF3R 以外に考えられる伝達系蛋白の遺伝子解析を含め、特に G-CSF 投与中の患者さんの白血球における遺伝子変化を経時的に観察することで、白血球化への変化の過程を明らかにしていく。

3. 研究の方法

先天性好中球減少症患者さんの臨床検体を得、血液細胞から DNA、RNA を抽出、G-CSF 受容体遺伝子 (CSF3R) とその受容体刺激伝達系を含む、関連蛋白遺伝子 (SHP2、Gab1、Gab2、Grb2、SOCS 3、STAT3、STAT5、NRAS、KRAS2) 変異解析を経時的に継続検索する。

4. 研究成果

研究協力施設から骨髓、末梢血検体を送付いただき、先天性好中球減少症と診断された G-CSF (CSF3) 受容体切断型遺伝子異常の出現の有無の経時的解析をおこなった。期間中、ほとんどの検体に変異は認められなかったが、そのなかで、G-CSF 投与中の 1 例に経過中、それまでの解析では存在しなかった CSF3 受容体膜貫通部直上のヘテロの遺伝子変異を特定した (c.1947C>T:Ala569Val)。この変異はこの患者さんの口腔粘膜細胞由来のゲノム DNA からは検出されなかったことも合わせ、切断型異常と同様に後天的変異と考えられた。患者さんは臨床経過では症状に変化なく、驚いたことに、6 か月後の骨髓からこの変異は消失した。この変異の変化の意義を詳細に検討するために、異常の出た骨髓における異常遺伝子の全体アレルに対する割合の解析を試みたが、試料の少なさもあって、再現性のある結果を出すには至らなかった。しかしながら、このようなゲノム不安定性ともいべき兆候は白血球化への多段階の変化を考えて行く上で非常に興味深く、この患者さんの今後の継続的な解析が重要である。

G-CSF 受容体刺激伝達系関連蛋白の SHP2、Gab1、Gab2、Grb2、SOCS 3、STAT3、STAT5、NRAS、KRAS2 について、それぞれに解析条件を整え、得られる臨床検体において mRNA の配列決定を行っているが、一通り行なうにはかなりの量の検体を要する為に、限定された臨床検体から十分な解析を行なうことはできなかった。

本研究の実施する中で得られた研究協力者とのネットワークを通じて、Shwachman-Diamond 症候群のような先天性好中球減少を示し、白血球化が高頻度に起こってくる先天性血液疾患を中心に同様の解析を行っているが、現時点で有意な結果は得ていない。その他、関連疾患について、一定の成果を得て、下記の様なかたちで公表した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 20 件)

- ① Treatment with lactose (galactose)-restricted and medium-chain triglyceride-supplemented formula for neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency. Hayasaka K et al. 4 人中 1 番目, J Inher Meta Dis. 査読有り, 2:37-44, 2012. DOI:10.1007/8904_2011_42
- ② Congenital dysplastic microcephaly and hypoplasia of the brainstem and cerebellum with diffuse intracranial calcification. Nakamura K, Hayasaka K et al. 5 人中 5 番目, J Child Neurol. 査読有り, 27:218-221, 2012. DOI:10.1177/0883073811416239
- ③ 川上貴子, 簡野美弥子, 高橋憲幸, 目黒亨, 仙道大, 三井哲夫, 樋口智佳子, 土屋登嗣, 勝浦理彦, 清水行敏, 小山内俊久, 早坂清: 当院において Rosen T20 プロトコルで治療した若年骨肉腫 12 例. 小児がん. 査読有り, 48, 276-283, 2011.
- ④ Paternal mosaicism of an STXBP1 mutation in OS. Saitu H, Hayasaka K et al. 12 人中 11 番目, Clin Genet. 査読有り, 80:484-488, 2011. DOI: 10.1111/j.1399-0004.2010.01575.x
- ⑤ Molecular diagnosis and clinical onset of Charcot-Marie-Tooth disease in Japan. Abe A, Hayasaka K et al. 6 人中 6 番目, J Hum Genet. 査読有り, 56:364-368, 2011. DOI:10.1038/jhg.2011.20
- ⑥ 要藤裕孝, 三井哲夫, 佐藤晶論, 西村直子, 一見良司, 田邊卓也: 基礎疾患を有する者に対するワクチン接種. 査読無し, 小児科臨床 64: 508-510, 2011.
- ⑦ 三井哲夫: 再発・難治性非ホジキンリンパ腫の治療. 査読無し, 日小血会誌. 2010;24:250-254.
- ⑧ Retrospective analysis of non-anaplastic peripheral T-cell lymphoma in pediatric patients in Japan. Kobayashi R, Mitsui T 他 12 名, 12 番目: Pediatr Blood Cancer. 査読有り, 54:212-5, 2010. DOI: 10.1002/pbc.22329
- ⑨ Polyalanine expansion of PHOX2B in

congenital central hypoventilation syndrome: rs17884724:A>C is associated with seven-alanine expansion. Arai H, Hayasaka K ら他 5 名, 7 番目, J Hum Genet. 査読有り, 55:4-7, 2010.

DOI:10.1038/jhg.2009.109

⑩ Supernumerary impacted teeth in a patient with SOX2 anophthalmia syndrome. Numakura C, Hayasaka K ら他 5 名, 7 番目, Am J Med Genet. 査読有り, 152A:2355-2359, 2010. DOI: 10.1002/ajmg.a.33556

⑪ Frameshift mutations of the ARX gene in familial Ohtahara syndrome. Kato M, Hayasaka K ら他 3 名, 5 番目, 査読有り, Epilepsia. 51:1679-84, 2010.

DOI: 10.1111/j.1528-1167.2010.02559.x.

⑫ Phenotypic variability in a family with Townes-Brocks syndrome. Sudo Y, Hayasaka K ら他 4 名, 6 番目, 査読有り, J Hum Genet. 55:550-551, 2010.

DOI:10.1038/jhg.2010.64

⑬ Non-obese early onset diabetes mellitus in mutant cryptochrome 1 transgenic mice. Okano S, Hayasaka K ら他 4 名, 2 番目, 査読有り, Eur J Clin Invest. 40:1011-1017, 2010.

DOI: 10.1111/j.1365-2362.2010.02359.x.

⑭ Compound heterozygous PMP22 deletion mutations causing severe Charcot-Marie-Tooth disease type 1. Abe A, Hayasaka K ら他 7 人, 9 番目, J Hum Genet. 査読有り, 55:771-773, 2010.

DOI:10.1038/jhg.2010.106

⑮ STXB1 mutations in early infantile epileptic encephalopathy with suppression-burst pattern. Saito H, Hayasaka K ら他 20 人, 21 番目, Epilepsia. 査読有り, 51:2397-2405, 2010.

DOI: 10.1111/j.1528-1167.2010.02728.x.

⑯ Shimokaze T, Mitsui T, Takeda H, Kawakami T, Arai T, Ito M, Iwaba A, Izumino H, Takahashi N, Kanno M, Sendo D, Hayasaka K. : Severe hemorrhagic colitis caused by dasatinib in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. Pediatr Hematol Oncol. 査読有り, 26, 448-53. 2009.

⑰ Mitsui T, Mori T, Fujita N, Inada H, Horibe K, Tsurusawa M; Lymphoma Committee, Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group: Retrospective analysis of relapsed or primary refractory childhood lymphoblastic lymphoma in Japan. Pediatr Blood Cancer. 査読有り, 52, 591-595. 2009. DOI: 10.1002/pbc.21941

⑱ 本邦における Charcot-Marie-Tooth 病の特徴. 早坂清, 阿部暁子, 査読無し, Annual

review 2009 神経:218-225

⑲ Fujita N, Mori T, Mitsui T, Inada H, Horibe K, Tsurusawa M; Lymphoma Committee of the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. The role of hematopoietic stem cell transplantation with relapsed or primary refractory childhood B-cell non-Hodgkin lymphoma and mature B-cell leukemia: a retrospective analysis of enrolled cases in Japan. 査読有り, Pediatr Blood Cancer 51, 88-92. 2008. DOI:10.1002/pbc.21585

⑳ 小沼正栄, 久間木悟, 吉成みやこ, 佐藤篤, 照井君典, 神尾卓哉, 平山雅士, 簡野美弥子, 川上貴子, 望月一弘, 伊藤正樹, 渡辺新, 遠藤幹也, 三井哲夫, 今泉益栄, 菊田敦, 伊藤悦朗, 土屋滋: 血液・腫瘍性疾患患児における抗真菌薬ミカファンギンの有効性に関する検討. 査読有り, 日小血会誌 22, 226-232, 2008.

〔学会発表〕(計 3 件)

① G-CSFR の細胞外ドメインに変異を認めた先天性好中球減少症、黒澤秀光, 三井哲夫 ら他 8 名 2 番目: 第 51 回日本小児血液学会総会、2009 年 11 月 29 日、浦安市 東京ベイホテル東急

② 三井哲夫, 川上貴子, 高橋憲幸、金井雅代、本間信夫、仙道大、簡野美弥子, 早坂清、山際岩男、江村隆起、太田寛: INSS 分類 Stage1 で腫瘍全摘後無治療経過観察中、Stage4 で再発した神経芽腫 4 歳女児。第 24 回日本小児がん学会、2008 年 11 月 16 日、千葉市 幕張メッセ国際会議場

③ Mitsui T, Mori T, Fujita N, Inada T, Horibe K, and Tsurusawa M: Refractory childhood lymphoblastic lymphoma: A retrospective analysis of relapsed or primary refractory cases in Japan. 19th annual meeting of the International BFM study group. Glasgow, April 5. 2008.

〔図書〕(計 3 件)

① 三井哲夫: 小児白血病・リンパ腫の診療ガイドライン(日本小児血液学会 編) pp86-89, 金原出版, 東京, 2011.

② 三井哲夫: 小児感染症診療の落とし穴(尾内一信 編) pp119-123, 南江堂, 東京, 2011. 3.

③ 三井哲夫: 抗菌薬・抗ウイルス薬の使い方(五十嵐隆 編) pp196-199, 中山書店, 東京, 2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三井 哲夫 (MITSUI TETSUO)

研究者番号: 30270846

山形大学・医学部・講師

(2)研究分担者

川上 貴子 (KAWAKAMI TAKAKO)

研究者番号：90312743

山形大学・医学部・助教

早坂 清 (HAYASAKA KIYOSHI)

研究者番号：20142961

山形大学・医学部・教授