

平成 29 年 4 月 14 日現在

機関番号：83904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461413

研究課題名(和文) 1-tubulin異常症の分子病態解明

研究課題名(英文) Molecular pathogenesis of beta1 tubulin disorders

研究代表者

國島 伸治 (Kunishima, Shinji)

独立行政法人国立病院機構(名古屋医療センター臨床研究センター)・その他部局等・室長

研究者番号：60373495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトおよび犬・大型猫類の先天性巨大血小板症において同定されるTUBB1/Tubb1変異は、1)異常凝集により微小管構造異常を示す、2)発現量に依存した微小管構造異常を示す、3)正常な微小管構造を示す(機能性多型)、に分類された。1の変異では変異型1チューブリン発現により チューブリン発現の低下と1チューブリン凝集を呈し、G1 arrestにより細胞増殖を抑制した。

研究成果の概要(英文)：TUBB1/Tubb1 mutations identified in congenital macrothrombocytopenia of human, dog and big cats were functionally analyzed and classified in 1) abnormal oligomeric aggregation and the disruption of microtubule structure, 2) expression-level dependent abnormal microtubule structure and 3) normal microtubule structure (functional polymorphisms). The former type of mutation resulted in the decreased expression of tubulin and G1 arrest leading to the inhibition of cellular proliferation.

研究分野：血栓止血

キーワード：巨核球 血小板 微小管 チューブリン

1. 研究開始当初の背景

先天性巨大血小板症は、生来より血小板減少と大型血小板を呈する遺伝的異質性の高い疾患群である。近年、およそ半数の症例において確定診断が可能になったが、特異性血小板減少性紫斑病と診断され不必要な治療を受ける症例もまれでない。原因不明の先天性巨大血小板症の病因と分子病態を明らかにし、先天性巨大血小板症の系統的鑑別診断法を確立することが求められている。

2. 研究の目的

微小管は $\alpha\beta$ -チューブリンヘテロ二量体で構成され、血小板産生に必要な巨核球の胞体突起形成と正常な血小板形態の保持に働く。私達は、先天性巨大血小板症において TUBB1 変異を同定した。また、犬及び大型猫類の先天性巨大血小板症においても Tubb1 変異が同定されている。本研究は異常 $\beta 1$ -チューブリンが微小管構成異常をきたす機序と巨大血小板を産生する機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 患者血小板における $\beta 1$ -チューブリン発現様式、微小管構成、超微形態を解析した。

(2) CHO細胞に $\beta 1$ -チューブリンを強制発現させ、微小管構成に及ぼす影響を解析した。テトラサイクリン発現誘導応答性の安定発現 CHO細胞を樹立し、微小管構成、細胞増殖、細胞周期、細胞形態の変化を解析した。

(3) マウス胎児肝細胞由来巨核球に $\beta 1$ -チューブリンを発現させ、血小板産生様式と微小管構成を解析した。

(4) 先天性巨大血小板症の系統的解析において $\beta 1$ -チューブリン免疫染色解析を行った。

4. 研究成果

(1) 先天性巨大血小板症の解析において同定した 1 チューブリン異常症の病因病態解析を行った。正常血小板では 1 / チューブリンから構成される環状の微小管構造が正常な円盤状形態を保つが、患者血小板では チューブリン発現は極めて低下し、1 チューブリンはオリゴマーとして解れた縄状の構造を示した。電子顕微鏡解析においても環状の微小管構造は観察されず、免疫染色解析と同様の解れた縄状の繊維構造が観察された。患者は TUBB1 p.F260S 変異のヘテロ接合体であり、家系内で血小板減少を呈する患者は全て本変異のヘテロ接合体であった。

(2) CHO細胞を用いた強制発現実験では、p.F260S 1 チューブリンは内因性 チューブリンと微小管を構成することなくオリゴマーとして凝集した。また、発現する 1 チューブリンが多くなるにつれて内因性 チューブリン発現が低下した。犬及び大型猫類の先天性巨大血小板症において報告された Tubb1 変異は、1) ヒト変異と同様の異常凝集を示す、2) 弱い発現量では微小管構造をとるが強い発現量では凝集する、3) 正常な微小管構造を示す、に分類され、いくつかの変異は機能的多型であることが示唆された。

p.F260S 変異をテトラサイクリン発現誘導プラスミド (Tet-on) に組み込み、テトラサイクリン発現誘導応答性の安定発現 CHO細胞を樹立した。Tet-on 誘導により、野生型 1 チューブリンの発現は微小管構成、細胞増殖、細胞周期、細胞形態に影響を与えなかったが、変異型 1 チューブリン発現により チューブリン発現の低下と 1 チューブリン凝集を呈し、G1 arrest により細胞増殖が抑制された。

(3) 変異型 1 チューブリンを発現させた培養巨核球では、胞体突起形成を介した血小板産生は観察されず、細胞質破裂による大型血小板産生を示した。放出された血小板様粒子では、患者血小板と同様に 1 チューブリンの異常構造が観察された。

(4) 研究期間内での先天性巨大血小板症の系統的解析では新たな $\beta 1$ -チューブリン異常症は同定されなかった。

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 12 件)

1. Kunishima S, Nishimura S, Suzuki H, Imaizumi M, Saito H: *TUBB1* mutation disrupting microtubule assembly impairs proplatelet formation and results in congenital macrothrombocytopenia. *Eur J Haematol* 92:276-82, 2014. 査読有 doi: 10.1111/ejh.12252.

2. Kunishima S, Kitamura K, Matsumoto T, Sekine T, Saito H: Somatic mosaicism in *MYH9* disorders: the need to carefully evaluate apparently healthy parents. *Br J Haematol* 165:885-7, 2014. 査読有 doi: 10.1111/bjh.12797.

3. Noris P, Biino G, Pecci A, Civaschi E, Savoia A, Seri M, Melazzini F, Loffredo G, Russo G, Bozzi V, Notarangelo LD, Gresele P, Heller P, Pujol-Moix N, Kunishima S, Cattaneo M, Bussel J, De Candia E, Cagioni C, Ramenghi U, Cagioni C, Fabris F, Balduini CL: Platelet diameters in inherited thrombocytopenias: Analysis of 376 patients with all known disorders.

Blood 124:e4-e10, 2014. 査読有
doi: 10.1182/blood-2014-03-564328.

4. Savoia A, Kunishima S, De Rocco D, Zieger B, Rand ML, Pujol-Moix N, Caliskan U, Pecci A, Noris P, Srivastava A, Ward C, Kopp MC, Alessi MC, Bellucci S, Beurrier P, de Maistre E, Favier R, Hezard N, Hurtaud-Roux MF, Latger-Cannard V, Lavenu-Bombled C, Meunier S, Negrier C, Nurden A, Proulle V, Randrianaivo H, Fabris F, Platokouki H, Rosenberg H, Gargouri AF, Heller P, Karimi M, Balduini CL, Pastore A, Lanza F: Spectrum of the mutations in Bernard-Soulier syndrome. **Hum Mut** 35:1033-45, 2014. 査読有
doi: 10.1002/humu.22607.

5. Bottega R, Marconi C, Faleschini M, Baj G, Cagioni C, Pecci A, Pippucci T, Ramenghi, U, Pardini S, Ngu L, Baronci C, Kunishima S, Balduini CL, Seri M, Savoia A, Noris P: *ACTN1*-related thrombocytopenia: identification of novel families for phenotypic characterization. **Blood** 125:869-72, 2015. 査読有
doi: 10.1182/blood-2014-08-594531.

6. Nishimura S, Nagasaki M, Kunishima S, Sawaguchi A, Sakata A, Sakaguchi H, Ohmori T, Manabe I, Italiano JJ, Ryu T, Takayama N, Komuro I, Kadowaki T, Eto K, Nagai R: IL-1 α induces thrombopoiesis is through megakaryocyte rupture in response to acute platelet needs. **J Cell Biol** 209:453-66, 2015. 査読有
doi: 10.1083/jcb.201410052.

7. Buitrago L, Rendon A, Liang Y, Simeoni I, Negri A, Alessi MC, Ballmaier M, Bariana T, Bellissimo D, Bertoli M, Bray P, Bury L, Carrell R, Cattaneo M, Collins P, French D, Favier R, Freson K, Furie B, Germeshausen M, Ghevaert C, Gomez K, Goodeve A, Gresele P, Guerrero J, Hampshire DJ, Hadinnapola C, Heemskerk J, Henskens Y, Hill M, Hogg N, Johnsen J, Kahr W, Kerr R, Kunishima S, Laffan M, Langdown J, Lench N, Lentaigne C, Liesner R, Lillicrap D, Lopez J, Megy K, Millar C, Morrell N, Mumford A, Natwani A, Neerman-Arbez M, Nurden P, Nurden A, Ormiston M, Othman M, Ouwehand W, Perry D, Viik SR, Reitsma P, Rondina M, Simeoni I, Smethurst P, Stephens J, Stevenson W, Szkotak A, Turro E, Van Geet C, Vries M, Ward J, Waye J, Westbury S, Whiteheart S, Wilcox D, Zhang B, Filizola M, Ouwehand WH, Collier BS: IIb 3 variants defined by next-generation sequencing: predicting

variants likely to cause Glanzmann thrombasthenia. **Proc Natl Acad Sci USA** 112: E1898-907, 2015. 査読有
doi: 10.1073/pnas.1422238112.

8. Kunishima S, Kitamura K, Yasutomi M, Kobayashi R: Diagnostic biomarker for *ACTN1* macrothrombocytopenia. **Blood** 126:2525-6, 2015. 査読有
doi: 10.1182/blood-2015-08-666180.

9. Eto K, Kunishima S: Linkage between the mechanisms of thrombocytopenia and thrombopoiesis. **Blood** 127:1234-41, 2016. 査読有
doi: 10.1182/blood-2015-07-607903.

10. Simeoni I, Stephens JC, Hu F, Deevi S, Megy K, Bariana TK, Lentaigne C, Schulman S, Sivapalaratnam S, Vries MJA, Westbury SK, Greene D, Papadia S, Alessi MC, Attwood A, Ballmaier M, Baynam G, Bermejo E, Bertoli M, Bray P, Bury L, Cattaneo M, Collins P, Daugherty L, Favier R, French D, Furie B, Gattens M, Germeshausen M, Ghevaert C, Goodeve A, Guerrero J, Hampshire DJ, Hart D, Heemskerk J, Henskens Y, Hill M, Hogg N, Jolley JD, Kahr W, Kelly AM, Kerr R, Kostadima M, Kunishima S, Lambert MP, Liesner R, Lopez J, Mapeta R, Mathias M, Millar CM, Neerman-Arbez M, Nurden AT, Nurden P, Othman M, Peerlinck K, Perry DJ, Poudel P, Reitsma P, Rondina M, Smethurst P, Stevenson W, Szkotak A, van Geet C, Whitehorn D, Wilcox D, Zhang BI, Viik SR, Gresele P, Bellissimo D, Penkett CJ, Laffan MA, Mumford AD, Rendon A, Gomez K, Freson K, Ouwehand WH, Turro E: A comprehensive high-throughput sequencing test for the diagnosis of inherited bleeding, thrombotic and platelet disorders. **Blood** 127:2791-2803, 2016. 査読有
doi: 10.1182/blood-2015-12-688267.

11. Kitamura K, Okuno Y, Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Muramatsu H, Kobayashi R, Furukawa K, Miyano S, Kojima S, Ogawa S, Kunishima S: Functional characterization of a novel *GF1B* mutation causing congenital macrothrombocytopenia. **J Thromb Haemost** 14:1462-9, 2016. 査読有
doi: 10.1111/jth.13350.

12. Sivapalaratnam S, Westbury SK, Stephens JC, Greene D, Downes K, Kelly AM, Lentaigne CE, Astle W, Huizinga EG, Nurden P, Papadia S, Peerlinck K, Penkett CJ, Perry DJ, Rougley C, Simeoni I, Stirrups K, Hart DP, Tait RC, Mumford AD, NIHR

BioResources, Laffan MA, Freson K, Ouwehand WH, Kunishima S, Turro E: Rare variants in *GP1BB* are responsible for autosomal dominant macrothrombocytopenia. **Blood** 129:520-4, 2017. 査読有
doi: 10.1182/blood-2016-08-732248.

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 國島伸治 学術推進委員会(SPC)シンポジウム 1 血小板減少の病態と分子メカニズム～最新の知見 Molecular mechanisms for congenital macrothrombocytopenia 第 36 回日本血栓止血学会学術集会 平成 26 年 5 月 29 日-31 日 大阪

2. 巨核球特異的 1-tubulin 異常は微小管構成障害により胞体突起形成不全を来す 國島伸治 北村勝誠 西村智 鈴木英紀 今泉益栄 齋藤英彦 第 36 回日本血栓止血学会学術集会 平成 26 年 5 月 29 日-31 日 大阪

3. 國島伸治 北村勝誠 松本多絵 関根孝司 MYH9 異常症の体細胞モザイク 第 15 回日本検査血液学会学術集会 平成 26 年 7 月 20-1 日 仙台

4. 國島伸治 シンポジウム 「先端技術と検査医学研究」幹細胞技術の検査医学研究への応用 第 33 回日本臨床検査医学会東海北陸支部例会 平成 26 年 8 月 2 日 名古屋

5. 國島伸治 巨核球特異的チューブリン変異による血小板産生異常 血小板・巨核球学術講演会 平成 26 年 9 月 20 日 東京

6. 國島伸治 北村勝誠 八田京子 原因不明の血小板減少症と診断されていた 2B 型 von Willebrand 病の親子例 第 16 回日本検査血液学会学術集会 平成 27 年 7 月 11-12 日 名古屋

7. 國島伸治 診断の迷宮-判断に迷う疾患へのアプローチ-(ワークショップ) 第 16 回日本検査血液学会学術集会 平成 27 年 7 月 11-12 日 名古屋

8. Kunishima S, Kada A, Hao J Further classification of neutrophil non-muscle myosin heavy chain IIA localization for efficient genetic diagnosis of *MYH9* disorders XXIX International Symposium on Technical Innovations in Laboratory Hematology Milano, Italy May 12-14, 2016

9. 國島伸治 嘉田晃子 Hao Jihong 北村勝誠 *MYH9* 異常症遺伝子診断のための好中球ミオシン局在解析の細分類 第 38 回日本血

栓止血学会学術集会 平成 28 年 6 月 16 日-18 日 奈良

10. Kunishima S, Saito H Differential diagnosis of congenital macrothrombocytopenia -12-year experience in Nagoya- Platelets2016: 9th International Symposium, Wellesley, Massachusetts, USA, September 16-20, 2016

11. 國島伸治 北村勝誠 山村喜美 新規検査法により診断された先天性巨大血小板症 第 70 回国立病院総合医学会 平成 28 年 11 月 11 日-12 日 那覇

〔図書〕(計 9 件)

1. 國島伸治: 血球の形態・機能 血小板小児血液・腫瘍学 日本小児血液・がん学会編集 診断と治療社、東京 p20-2, 2015 年 11 月

2. 國島伸治: 血液・造血器疾患におけるおもな検査 血小板機能検査 小児血液・腫瘍学 日本小児血液・がん学会編集 診断と治療社、東京 p48-9, 2015 年 11 月

3. 國島伸治: 血小板と止血・血栓の異常 血小板機能異常症 小児血液・腫瘍学 日本小児血液・がん学会編集 診断と治療社、東京 p440-2, 2015 年 11 月

4. 國島伸治: 血液疾患:メイ・ヘグリン異常症.国立成育医療研究センター小児慢性特定疾病情報室 編.小児慢性特定疾病-診断の手引き.東京 診断と治療社,2016 年 1 月:p709-710

5. 國島伸治: 血液疾患:ベルナルル・スーリエ症候群.国立成育医療研究センター小児慢性特定疾病情報室 編.小児慢性特定疾病-診断の手引き.東京 診断と治療社,2016 年 1 月:p712-713

6. 國島伸治: 血液疾患:血小板無力症.国立成育医療研究センター小児慢性特定疾病情報室 編.小児慢性特定疾病-診断の手引き.東京 診断と治療社,2016 年 1 月:p71

7. 國島伸治: 血液疾患: 33 から 35 までに掲げるもののほか、血小板機能異常症.国立成育医療研究センター小児慢性特定疾病情報室 編.小児慢性特定疾病-診断の手引き.東京 診断と治療社,2016 年 1 月:p714-715

8. 國島伸治: Gray platelet 症候群.小児科診療増刊号 小児の症候群、診断と治療社、東京 p185, 2016 年 4 月

9. 國島伸治: 先天性血小板減少症・機能異

常症 血液科研修ノート (神田善伸編集)
診断と治療社 東京 p.382-6 2016年5月

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nnh.go.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

独立行政法人国立病院機構(名古屋医療センター臨床研究センター)・その他部局・室長
國島 伸治 (Shinji Kunishima)

研究者番号 : 60373495