

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：83904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860840

研究課題名(和文) 巨核球・赤芽球特異的転写因子による新規な先天性血小板減少症の病因・病態解明

研究課題名(英文) Functional characterization of a novel GFI1B mutation causing congenital macrothrombocytopenia.

研究代表者

北村 勝誠 (Kitamura, Katsumasa)

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・客員研究員

研究者番号：40724381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：既知の変異を認めない原因不明の先天性巨大血小板症の親子例について、次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析を行い、赤芽球系及び巨核球系に特異的な転写因子GFI1Bに新規遺伝子変異を同定した。マウスの胎仔肝細胞を用いた変異発現実験を行い、変異型は野生型と比較し一つの巨核球から形成される胞体突起の数が少なく、胞体突起径が大きいことを確認した。また、末梢血塗抹標本を用いた血小板の蛍光免疫染色にてCD34の異常発現及びトロンボスポンジンの染色性低下を確認し、蛍光免疫染色が本疾患の診断スクリーニング方法として有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：GFI1B is an essential transcription factor for megakaryocyte and erythrocyte development. We performed whole exome sequencing and identified a novel GFI1B mutation in a family with congenital macrothrombocytopenia, and a decreased number of platelet  $\alpha$ -granules and abnormally shaped red blood cells. An immunofluorescence analysis revealed decreased thrombospondin-1 and increased CD34 expression in platelets from the patient. The mutant was unable to repress the expression of the reporter gene and had a dominant-negative effect over wild-type GFI1B. In addition, the mutation abolished recognition of a consensus-binding site in gel shift assays. Furthermore, transduction of mouse fetal liver-derived megakaryocytes with the mutant resulted in the production of abnormally large proplatelet tips, which were reduced in number. Our study provides further proof of concept that GFI1B is an essential protein for the normal development of the megakaryocyte lineage.

研究分野：小児科学

キーワード：先天性血小板減少症 巨大血小板 転写因子 巨核球分化 赤芽球分化

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 先天性血小板減少症は、生下時からの血小板数減少により様々な出血症状を呈する疾患群であり、粘膜出血や外科的処置に際して止血困難を呈することがある。中には特発性血小板減少性紫斑病などと診断され不必要な治療を受ける症例も少なくない。新規病因の探索や正確な診断法の確立は、臨床面からも非常に重要である。

(2) 先天性血小板減少症の中でも、特に先天性巨大血小板性血小板減少症(以下、先天性巨大血小板症)は、巨大血小板及び血小板減少を特徴とし、現在その約三分の一が原因不明とされている。われわれは既知の変異を認めない原因不明の先天性巨大血小板症の親子例について、次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析を行い、赤芽球系及び巨核球系に特異的な転写因子 GF11B に新規遺伝子変異を同定した。その後、GF11B 変異に伴って貧血および巨大血小板性血小板減少を呈した一家系が報告され、次いで原因不明とされていた常染色体優性遺伝型の Gray Platelet 症候群の原因遺伝子として報告された(引用文献、 )。

### 2. 研究の目的

GF11B は、巨核球系及び赤芽球系の分化と細胞増殖に抑制的に働くことが知られている。変異により DNA のプロモーター領域への結合能が低下し、転写抑制作用が阻害され、巨核球・赤芽球の分化・成熟が障害されると考えられる。本研究の目的は GF11B 変異による新規な先天性巨大血小板症の病態を明らかにし、巨大血小板産生機序を解明し、先天性血小板減少症の分類と鑑別診断法を発展させることである。

### 3. 研究の方法

(1) ルシフェラーゼアッセイによって GF11B 変異が、実際に遺伝子発現制御機能に影響を及ぼすかを検討した。ターゲット遺伝子として、GF11B 自身のプロモーター配列を pGL4-luc2 レポーターベクターに組み込み、GF11B 野生型及び変異型を挿入した pcDNA3.1 発現ベクター、pGL4-hRLuc/TK コントロールベクターと共に HEK293T 細胞へ共導入し解析を行った。

(2) GF11b 変異による DNA 結合能の変化を検証するためゲルシフトアッセイを施行した。TnT Coupled Transcription/Translation system を用いて合成した野生型及び変異型 GF11B と、5' 末端をビオチン標識した DNA プロンプ(target region として GF11b 自身のプロモーター配列を含む)をインキュベートし、結合度の変化を解析した。

### (3) 培養巨核球実験

妊娠 13.5 日マウスの胎仔肝細胞に、レトロ

ウイルスを用いて野生型及び変異型 GF11b を発現させ、巨核球の分化・成熟、血小板の形態や数への影響を検討した。トロンボポエチン存在下に胎仔肝細胞を 3-5 日間培養し、経時的に巨核球が数珠状の胞体突起を形成しながら血小板を産生する様子を観察した。

### (4) 蛍光免疫染色

患者末梢血メイギムザ染色において血小板顆粒の染色性低下を確認しており、顆粒染色性低下をさらに確認するため、血小板顆粒に豊富に含まれる TSP1 (トロンボスポンジン) の蛍光免疫染色を行った。また GF11b 変異患者血小板において、健常者血小板にはみられない CD34 の高発現がフローサイトメトリー法を用いて報告されており、末梢血塗抹標本を用いた CD34 の蛍光免疫染色を行い、本疾患の診断スクリーニング方法としての有用性を検討した。

### 4. 研究成果

(1) ルシフェラーゼアッセイでは、野生型は empty vector と比較してルシフェラーゼ活性を約 60%に抑制したが、変異型では抑制はみられなかった。また変異型は量依存的に野生型の抑制作用を阻害したことから、dominant-negative に作用していることが示唆された。

(2) ゲルシフトアッセイでは、野生型 GF11B タンパクは GF11B のコンセンサス配列を含むオリゴと結合を示したが、変異型は結合を示さなかった。ルシフェラーゼアッセイとゲルシフトアッセイの結果より、変異型は DNA 結合能を失うが、転写因子複合体を形成することにより、野生型に対してドミナントネガティブに作用すると推測された。

(3) 培養巨核球実験では、変異型は野生型と比較し、一つの巨核球から形成される胞体突起の数が少なく、また胞体突起径が大きいことが確認された(図1)。このことは GF11B 変異により巨大血小板および血小板減少症を呈する臨床像と矛盾しないと考えられた。

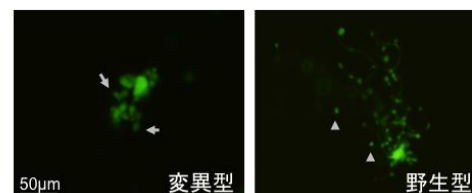


図1 培養巨核球実験における巨核球の胞体突起産生

(4) 血小板蛍光免疫染色では、変異患者において血小板の顆粒に含まれるトロンボスポンジンの染色性が健常人と比較し低下していた(図2)。また変異患者のみで CD34 の

異常発現を認めた(図3)。  
 蛍光免疫染色は末梢血塗抹標本のみで行うことができるため、フローサイトメトリー法と比べてより簡便なスクリーニング法として有用である可能性が示唆された。

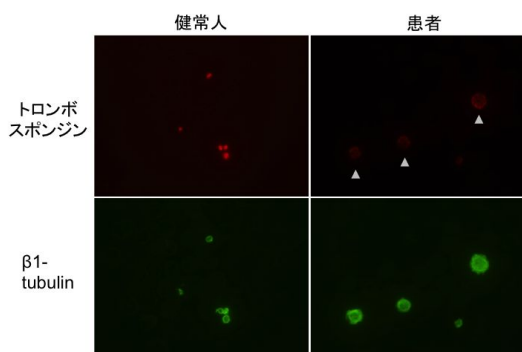


図2 末梢血塗抹標本を用いた血小板の蛍光免疫染色(トロンボスポンジン)

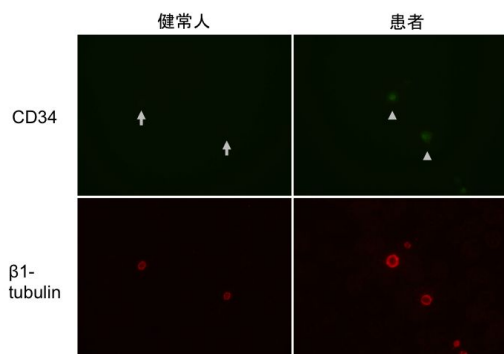


図3 末梢血塗抹標本を用いた血小板の蛍光免疫染色(CD34)

#### < 引用文献 >

Stevenson WS, Morel-Kopp MC, Chen Q, Liang HP, Bromhead CJ, Wright S, Turakulov R, Ng AP, Roberts AW, Bahlo M, Ward CM. GF11B mutation causes a bleeding disorder with abnormal platelet function. *J Thromb Haemost.* 11(11), 2013, 2039-47. doi:10.1111/jth.12368.

Monteferrario D, Bolar NA, Marneth AE, Habeda KM, Bergevoet SM, Veenstra H, Laros-van Gorkom BA, MacKenzie MA, Khandanpour C, Botezatu L, Franssen E, Van Camp G, Duijnhouwer AL, Salemink S, Willemsen B, Huls G, Preijers F, Van Heerde W, Jansen JH, Kempers MJ, Loeys BL, Van Laer L, Van der Reijden BA. A dominant-negative GF11B mutation in the gray platelet syndrome. *N Engl J Med.* 370(3), 2014:245-53. doi:10.1056/NEJMoa1308130.

#### 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4件)

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 GF11B mutation causing congenital macrothrombocytopenia. *J Thromb Haemost.* 査読有, 14(7), 2016: 1462-9. doi:10.1111/jth.13350.

Kunishima S, Kitamura K, Yasutomi M, Kobayashi R. Diagnostic biomarker of ACTN1 macrothrombocytopenia. *Blood.* 査読有, 126(22), 2015, 2525-6. doi:10.1182/blood-2015-08-666180.

Sirachainan N, Komwilaisak P, Kitamura K, Hongeng S, Sekine T, Kunishima S. The first two cases of MYH9 disorders in Thailand: an international collaborative study. *Ann Hematol.* 査読有, 94(4), 2015, 707-9. doi:10.1007/s00277-014-2234-6.

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.* 査読有, 165(6), 2014, 885-7. doi:10.1111/bjh.12797.

#### [学会発表](計3件)

Katsumasa Kitamura, Yusuke Okuno, Kenichi Yoshida, Masashi Sanada, Yuichi Shiraishi, Hideki Muramatsu, Ryoji Kobayashi, Satoru Miyano, Seiji Kojima, Seishi Ogawa, Shinji Kunishima. Functional Characterization of a Novel GF11B Mutation Causing Congenital Macrothrombocytopenia, 第57回米国血液学会、2015年12月5日~8日、オーランド(米国)

國島伸治、北村勝誠、西村智、鈴木英紀、今泉益栄、齋藤英彦、巨核球特異的1-tubulin異常は微小管構成阻害により胞体突起形成不全を来す、第36回日本血栓止血学会学術集会、2014年5月29日~31日、大阪国際交流センター(大阪府・大阪市)

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、2014年7月20日~21日、仙台国際センター(宮城県・仙台市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北村 勝誠 (KITAMURA, Katsumasa)  
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・客員研究員  
研究者番号：40724381