

令和 4 年 5 月 9 日現在

機関番号：33708

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07809

研究課題名（和文）ACTN1異常症の分子機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of ACTN1-macrothrombocytopenia

研究代表者

國島 伸治（Kunishima, Shinji）

岐阜医療科学大学・保健科学部・教授

研究者番号：60373495

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）：先天性巨大血小板症解析において同定された7種類のACTN1バリエーションをCHO細胞に遺伝子導入し、アクチニン発現およびその局在とアクチン線維再構成を評価した。野生型ACTN1導入細胞では非導入細胞と同様な細胞形態と細胞進展を認めた。また、進展細胞で観察される正常なFアクチン構成を認めた。バリエーションを導入した全てのCHO細胞では、フィロポディアおよびラメリポディア形成は不良で、正常な細胞進展は観察されず、太く長いアクチン線維を認めた。解析したACTN1バリエーションはスペーサー領域にあり、アクチニンの逆平行配位形成を強固にし、Fアクチンの異常構成に関連することが考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天性巨大血小板症の原因となるACTN1異常症の遺伝子異常の多くはアクチン結合部位およびカルモジュリン結合部位に同定されていたが、アクチニン二量体形成に関わるスペーサー領域異常はアクチニンの逆平行配位形成を強固にすることでFアクチンの異常構成に関連することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In vitro expression analysis of the novel seven ACTN1 variants identified in the genetic analysis of inherited macrothrombocytopenia was performed in CHO cells. Cells transfected with all of the ACTN1 variants showed abnormal formation of filopodia and lamellipodia and induced actin network disorganization and increased thickness of actin fibers. The rod domain variants may cause strong antiparallel dimerization of actinin-1 and result in the abnormal reorganization of platelet cytoskeleton.

研究分野：血栓止血学

キーワード：先天性血小板減少症

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ACTN1 異常症は高頻度で代表的な先天性巨大血小板症であり、巨核球でのアクチン骨格構成を阻害することにより大型で減少した血小板産生に至る。本症において同定される ACTN1 変異は主としてアクチン結合部位あるいはカルモジュリン結合部位にあるが、アクチニンの二量体形成に関わるスペーサー領域にも同定されることが判明した。

2. 研究の目的

アクチニン機能に直接関わるアクチン結合部位あるいはカルモジュリン結合部位以外の、アクチニン構造に関わるスペーサー領域に同定される変異の機能解析を行い、ACTN1 変異部位の違いによるアクチン細胞骨格異常をきたす分子機構と疾患の表現型相違を明らかにする。

3. 研究の方法

フランスとの国際共同研究における先天性血小板減少症の系統解析にて同定した 7 種類のスペーサー領域の ACTN1 バリエントについて機能解析を行った (図 1)。

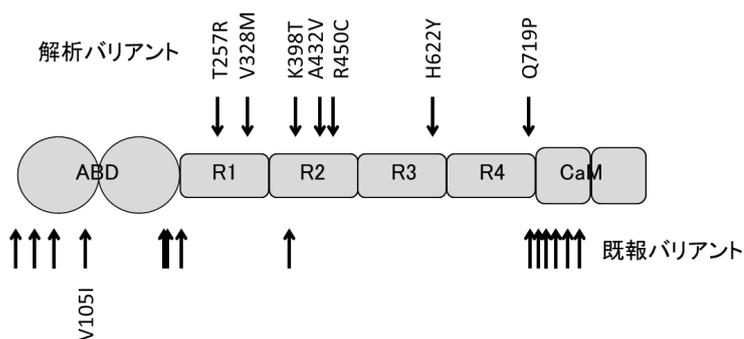


図 1 アクチニン 1 構造と既報および本研究で解析した ACTN1 バリエント

ABD: アクチン結合領域、CaM:カルモジュリン結合領域、R1~R4:スペーサー領域

T257R、V328M、K398T、A432V、R450C、H622Y、Q719P および陽性コントロールとして既報のアクチン結合部位バリエント (V105I) を含む ACTN1 cDNA を哺乳類細胞発現ベクター pcDNA3.1neo に N 末 myc 配列と共に作製し、FuGENE Transfection Reagent (Promega) を用いて CHO 細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入 24 時間後にフィブロネクチン固相した 8 ウェルチャンバースライド (Millicell, Millipore) に播種し、1 時間後にパラフォルムアルデヒド固定と 0.1% Triton X-100 透過処理を行い、抗 myc 抗体 (二次抗体は Alexa fluor 488 (Thermo Fisher)) と Alexa fluor 555 標識 Phalloidin (Thermo Fisher) と反応させ、BX51 蛍光顕微鏡 (Olympus) にて観察した。

4. 研究成果

野生型、既報のアクチン結合部位バリエントおよび 7 種類のスペーサー領域バリエントを CHO 細胞に遺伝子導入し、細胞形態、アクチニン 1 局在および F アクチン構成を解析した。

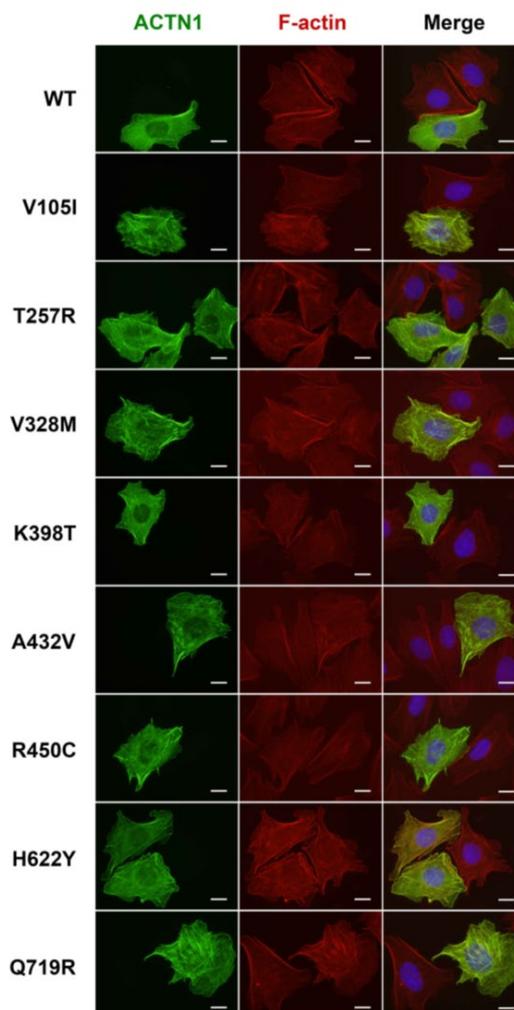


図 2 CHO 細胞を用いた ACTN1 発現解析

野生型 ACTN1 導入細胞では非導入細胞と同様な細胞形態と細胞進展を認めた。また、マトリックス上への進展細胞で観察される正常な F アクチン構成を認めた。陽性コントロールとして用いた既報のアクチン結合部位バリエーション (V105I) を導入した CHO 細胞では、正常な細胞進展は観察されず、フィロポディアおよびラメリポディア形成は不良で、太く長い F アクチン構成を認めた。今回解析した全てのスペーサー領域バリエーションは V105I と同様に細胞進展不良で、太く長い F アクチン構成を認めた。ImageJ を用いた画像解析で、バリエーション導入細胞でのアクチン線維は野生型と比較して平均 1.8 倍 (1.4~2.4 倍) であった (図 2)。

本研究において同定し解析した ACTN1 バリエーションは従来報告されていたアクチニン蛋白のアクチン結合あるいはカルモジュリン結合領域外のスペーサー領域にあり、アクチニンの逆平行配位形成を強固にし、F アクチンの異常構成に関連することが考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Vincenot Anne, Saultier Paul, Kunishima Shinji, Poggi Marjorie, Hurtaud Roux Marie Françoise, Rousset Alain, ACTN1 study coinvestigators, Schlegel Nicole, Alessi Marie Christine	4. 巻 40
2. 論文標題 Novel ACTN1 variants in cases of thrombocytopenia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Human Mutation	6. 最初と最後の頁 2258 ~ 2269
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/humu.23840	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 該当する
1. 著者名 van Dijk J, Bompard G, Cau J, Kunishima S, Rabeharivelo G, Mateos-Langerak J, Cazevieville C, Cavellier P, Boizet-Bonhoure B, Delsert C, Morin N	4. 巻 16
2. 論文標題 Microtubule polyglutamylation and acetylation drive microtubule dynamics critical for platelet formation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Biol	6. 最初と最後の頁 116
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12915-018-0584-6.	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 該当する
1. 著者名 Uchiyama Y, Yanagisawa K, Kunishima S, Shiina M, Ogawa Y, Nakashima M, Hirato J, Imagawa E, Fujita A, Hamanaka K, Miyatake S, Mitsuhashi S, Takata A, Miyake N, Ogata K, Handa H, Matsumoto N, Mizuguchi T	4. 巻 94
2. 論文標題 A novel CYCS mutation in the α -helix of the CYCS C-terminal domain causes non-syndromic thrombocytopenia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clin Genet	6. 最初と最後の頁 548-553
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cge.13423. Epub 2018 Sep 3.	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 該当する
1. 著者名 國島伸治	4. 巻 59
2. 論文標題 先天性血小板減少症	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 764-773
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11406/rinketsu.59.764.	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 Palma-Barqueros V, Bury L, Kunishima S, Lozano ML, Rodriguez-Alen A, Revilla N, Bohdan N, Padilla J, Fernandez-Perez MP, de la Morena-Barrio ME, Marin-Quiles A, Benito R, Lopez-Fernandez MF, Marcellini S, Zamora-Canovas A, Vicente V, Martinez C, Gresele P, Bastida JM, Rivera J.	4. 巻 5
2. 論文標題 Expanding the genetic spectrum of TUBB1-related thrombocytopenia.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood Adv	6. 最初と最後の頁 5453-5467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2020004057.	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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yuri Uchiyama ^{1,2} , Yoshiyuki Ogawa ³ , Kunio Yanagisawa ³ , Shinji Kunishima ⁴ , Takeshi Mizuguchi ¹ , Hideki Uchiyama ³ , Hiroshi Handa ³ and Naomichi Matsumoto
2. 発表標題 Molecular genetic analysis of 10 families with chronic thrombocytopenia
3. 学会等名 XXVII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Natesirinikul R, Sosothikul D, Komiwilaisak P, Pongtanakul B, Mekjarusgul P, Kunishima S, Sirachainan N
2. 発表標題 MYH9 Disorders in Thailand: Pediatric Case Series from Thai Macrothrombocytopenia Study Group
3. 学会等名 XXVII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 國島伸治	4. 発行年 2018年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 687
3. 書名 臨床に直結する血栓止血学	

〔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
---------	---------