

機関番号：83904

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591161

研究課題名 (和文) MYH9 異常症の分子病態解明

研究課題名 (英文) Molecular pathogenesis of MYH9 disorders

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)・
高度診断研究部・室長
國島 伸治 (KUNISHIMA SHINJI)
研究者番号：60373495

研究成果の概要 (和文)：MYH9 異常症は常染色体優性遺伝形式を示す先天性血小板異常症で、巨大血小板、血小板減少、顆粒球封入体を呈する。野生型および MYH9 異常症患者で同定されたエクソン 40 の一塩基欠失変異を含む全長 MYH9 cDNA を強制発現させた COS7 細胞では、MYH9 変異の有無に関わらず NMMHC-IIA 蛋白質は異常凝集を形成せず正常な線維状局在を示した。NMMHC-IIA 発現 COS7 細胞は MYH9 変異の有無に関わらずラメリポディアの伸展抑制、接着斑形成の増加が見られ、機能的 NMMHC-IIA 発現が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：The MYH9 disorders are autosomal dominant congenital platelet disorders, characterized by giant platelets, thrombocytopenia, and granulocyte inclusion bodies. COS7 cells transfected with wild-type full length MYH9 cDNA and that with the single base deletion mutation of Exon 40 identified in patients showed the normal fiber localization of NMMHC-IIA protein without forming inclusion bodies. Inhibition of lamellipodial extension and increase in the number of focal adhesion complex in transfected COS7 cells, with or without MYH9 mutation, suggested functional expression of mutant NMMHC-IIA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：血液内科学・血栓止血学

キーワード：May-Hegglin anomaly、先天性血小板減少症、先天性巨大血小板症

1. 研究開始当初の背景

1909年に初めて報告されたMHAは、特徴的な形態異常を呈するにも関わらず、およそ一世紀に渡り病因は不明であった。我々は、世界で最初に責任遺伝子座を同定後、ポジショナルクローニングに成功し、原因遺伝子MYH9を同定した。また、MHAとは顆粒球封入体の電顕所見が異なる疾患と考えら

れていたSebastian症候群、MHAにAlport症状を合併するFechtner症候群、封入体を認めず巨大血小板性血小板減少症とAlport症状を合併するEpstein症候群もMYH9異常が引き起こす一連の疾患群であることを示し、新たな疾患概念のMYH9異常症を提唱した。我々は、免疫蛍光染色法による鑑別診断法を確立し、顆粒球で観察される封入体は異常

NMMHC-IIA の集積であることを明らかにした。さらに、封入体はリボ核酸/蛋白複合体であること、血小板ではハプロ不全が原因であることも明らかにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*MYH9* 異常症の血液学的異常の分子病態の詳細を解明することである。

3. 研究の方法

(1) 異常 NMMHC-IIA 特異抗体の作成

MYH9 exon 40 の一塩基欠失によるフレームシフト変異により新たに生じる C 末端側の 6 アミノ酸残基 (MAPTKR) を特異的に認識するラット NT629 抗体を作成した。免疫用ペプチドとして、4 アミノ酸残基の野生型配列とリンカーとしてのシステインを配置したペプチド (CKGAGMAPTKR) を合成し、KLH に結合しラットに免疫した。抗血清を得た後、野生型ペプチド (CKGAGDGSDEE) および血小板より精製したミオシンで吸収を行い、免疫用ペプチドカラムにてアフィニティー精製を行なった。

(2) 5779delC 変異が同定された *MYH9* 異常症患者から樹立した B 細胞株より PCR を用いて野生型および 5779delC 変異を有する全長の *MYH9* cDNA を得た後、pcDNA3.1 に組み換え、真核細胞発現ベクターを作成した。

(3) 内因性に *MYH9* を発現する HeLa 細胞および内因性に *MYH9* を発現しない COS7 細胞に *MYH9* を導入し、NT629 抗体と野生型 C 末端の 11 アミノ酸残基を認識する市販 PRB440P 抗体を用いた免疫蛍光染色を行ない、NMMHC-IIA 局在を評価した。

4. 研究成果

(1) NT629 の特性解析

myc 標識した野生型および変異型 5779delC NMMHC-IIA 尾部を 293T 細胞に発現させ、免疫蛍光染色および免疫プロットを施行した所、NT629 は免疫蛍光染色にて変異型 NMMHC-IIA 発現 293T 細胞と反応したが、野生型 NMMHC-IIA 発現 293T 細胞とは反応しなかった。免疫プロットにおいても、NT629 は変異型 NMMHC-IIA 発現 293T 細胞溶解液において予測される組み換え蛋白分子量に相当する特異的バンドを検出したが、野生型由来細胞溶解液とは全く反応しなかった。さらに、NT629 は正常および *MYH9* exon 40 一塩基欠失以外の変異を有する *MYH9* 異常症白血球用いた免疫プロットでの反応性は認められず、*MYH9* exon 40 一塩基欠失変異を有する患者白血球蛋白においては 220kDa の NMMHC-IIA に相当するバンドを検出した。すなわち、NT629 は *MYH9* exon 40 一塩基欠失変異を有する NMMHC-IIA にのみ反応性を持つ事が明らかとなった。

(2) 遺伝子導入 COS7 細胞および HeLa 細胞の解析

NMMHC-IIA 局在

内因性 *MYH9* 発現を有する HeLa 細胞では、野生型 *MYH9* 導入により NMMHC-IIA 発現量が増大するため、PRB440P 抗体を用いた免疫蛍光染色において *MYH9* 非導入細胞と比較して高い染色性を示す繊維状構造が観察された。変異型 *MYH9* 導入後 NT629 抗体を用いた免疫蛍光染色を行なった HeLa 細胞においても NMMHC-IIA 局在は野生型 *MYH9* 導入細胞と同様の繊維状構造に観察された。内因性 *MYH9* 発現を有しない COS7 細胞での解析においても同様に、野生型、変異型の区別なく *MYH9* 導入細胞では NMMHC-IIA の繊維状構造が観察されたため、これら細胞株では *MYH9* 異常症顆粒球において NMMHC-IIA 凝集塊を生じさせる *MYH9* exon 40 一塩基欠失変異を有する NMMHC-IIA は凝集せず、ミオシンフィラメントとして存在することが示唆された (図 1)。

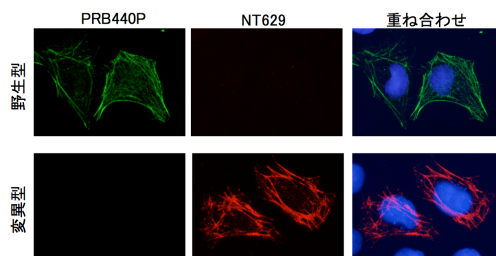


図1 *MYH9*導入COS7細胞におけるNMMHC-IIA局在

接着斑数

COS7 細胞に強制発現した NMMHC-IIA が細胞骨格蛋白として機能するか否かを解析するために、*MYH9* 導入後の接着斑数と細胞面積を計測した。野生型および変異型 *MYH9* を導入した COS7 細胞における細胞あたりの接着斑数 (抗 vinculin 抗体による免疫染色による解析) は、未処理 COS7 細胞に比べて、有意に増加した。しかし、野生型および変異型の間には有意差は認めなかった (図 2)。

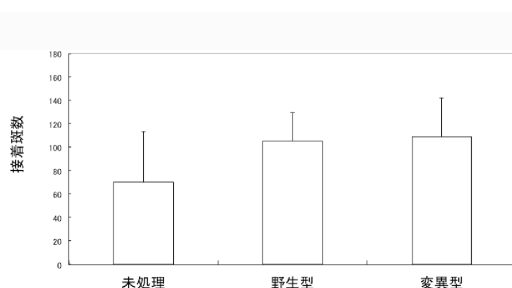


図2 *MYH9*導入COS細胞における接着斑数

細胞面積

未処理 COS7 細胞では経時的に細胞面積の増加が観察されたが、野生型および変異型 *MYH9* を導入した COS7 細胞では面積の増加は有意に小さかった (図 3)。

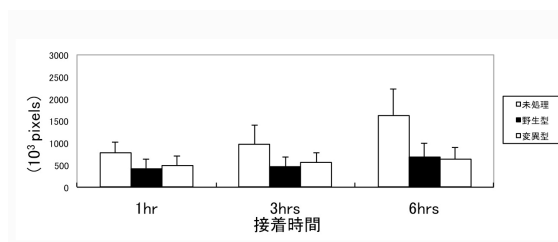


図3 *MYH9*導入COS7細胞の経時的細胞面積変化

COS7 細胞では、導入される *MYH9* の変異に関係なく接着斑形成の増加とラメリポディアの伸展抑制が見られた。ミオシンフィラメントの形成にはミオシン重鎖尾部アミノ酸配列の荷電の周期性とカルボキシル末端に存在する assembly competent domain (ACD) が重要である。5779delC 変異により産生される NMMHC-IIA はフレームシフトにより変異特有の MAPTKR 配列となるが、coiled-coil 領域および ACD は保たれていることから、フィラメント形成を阻害しない可能性が考えられた。

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 16 件)

- ① Kunishima S, Ito-Yamamura Y, Hayakawa A, Yamamoto T, Saito H: *FLNA* p.V528M substitution is neither associated with bilateral periventricular nodular heterotopia nor with macrothrombocytopenia. *J Hum Genet* 55: 844-6, 2010 (査読有) .
- ② Sekine T, Konno M, Sasaki S, Moritani S, Miura T, Wong WS, Nishio H, Nishiguchi T, Yoshinari-Ohuchi M, Tsuchiya S, Matsuyama T, Kanegane H, Ida K, Miura K, Harita Y, Igarashi T, Hattori M, Horita S, Saito H, Kunishima S: Patients with Epstein-Fechtner syndromes owing to *MYH9* R702 mutations develop progressive proteinuric renal disease. *Kidney Int* 78: 207-14, 2010 (査読有) .
- ③ Okada H, Kunishima S, Hamaguchi M, Takagi A, Yamamoto K, Takamatsu J, Matsushita T, Saito H, Kojima T, Yamazaki T: A novel splice site mutation in intron C of *PROS1* leads to markedly reduced mutant mRNA level, absence of thrombin-sensitive region,

and impaired secretion and cofactor activity of mutant protein S. *Thromb Res* 125: e246-50, 2010 (査読有) .

- ④ Kaya Z, Kocak U, Percin F, Kunishima S, Albayrak M, Gursel T, Ozogul C: Paris-Trousseau-type macrothrombocytopenia without 11q deletion. *Pediatr Int* 52: e67-71, 2010 (査読有) .
- ⑤ Ozeki M, Kunishima S, Kasahara K, Funato M, Teramoto T, Kaneko H, Fukao T, Kondo N: A family of type 2B von Willebrand disease with R1306W mutation-severe thrombocytopenia leads to the normalization of high molecular weight multimers-. *Thromb Res* 125: e17-22, 2010 (査読有) .
- ⑥ Kunishima S, Matsunaga T, Ito Y, Saito H: Mutations in *MYH9* exons 1, 16, 26, and 30 are infrequently found in Japanese patients with nonsyndromic deafness. *Genet Test Mol Biomarkers* 13: 705-7, 2009 (査読有) .
- ⑦ Kodama R, Taketani T, Kunishima S, Mishima S, Yoshikawa Y, Kanai R, Suyama T, Yoshino I, Kunishi H, Shibata H, Nagai A, Yamaguchi S, Masuda J: A rare case of *MYH9* disorders presenting with macrothrombocytopenia and deafness caused by *MYH9*-R702C mutation. *Thromb Res* 124: 508-11, 2009 (査読有) .
- ⑧ Imai C, Kunishima S, Takachi T, Iwabuchi H, Nemoto T, Imamura M, Uchiyama M: A novel homozygous 8-base pair deletion mutation in the glycoprotein *Iba* gene in a patient with Bernard-Soulier syndrome. *Blood Coagul Fibrinolysis* 20: 470-4, 2009 (査読有) .
- ⑨ Miyazaki K, Kunishima S, Fujii W, Higashihara M: Identification of three in-frame deletion mutations in *MYH9* disorders suggesting an important hot spot for small rearrangements in *MYH9* exon 24. *Eur J Haematol* 83: 230-4, 2009 (査読有) .
- ⑩ Kunishima S, Takaki K, Ito Y, Saito H: Germinal mosaicism in *MYH9* disorders: a family with two affected siblings of normal parents. *Br J Haematol* 145: 260-2, 2009 (査読有) .
- ⑪ Miyajima Y, Kunishima S: Identification of the first *in cis* mutations in *MYH9* disorder. *Eur J Haematol* 82: 288-91, 2009 (査読有) .
- ⑫ Kunishima S, Kobayashi R, Itoh TJ, Hamaguchi M, Saito H: Mutation of the

β 1-tubulin gene associated with congenital macrothrombocytopenia affecting microtubule assembly. Blood 113:458-61, 2009 (査読有) .

- ⑬ 國島伸治, Hirano K, Hamaguchi M, Saito H: Accumulation of *MYH9* mRNA at leukocyte inclusion bodies in *MYH9* disorders. Eur J Haematol 81: 325-6, 2008 (査読有) .
- ⑭ 國島伸治, Matsushita T, Hamaguchi M, Saito H: Identification and characterization of the first large *MYH9* gene deletion associated with *MYH9* disorders. Eur J Haematol 80: 540-4, 2008 (査読有) .
- ⑮ Kanaji S, Kanaji T, Migita M, 國島伸治 S, Kunicki TJ, Okamura T, Izuhara K: Characterization of a patient with atypical amegakaryocytic thrombocytopenia. Eur J Haematol 80: 361-4, 2008 (査読有) .
- ⑯ 國島伸治, Hamaguchi M, Saito H: Differential expression of wild-type and mutant NMMHC-IIA polypeptides in blood cells suggests cell-specific regulation mechanisms in *MYH9* disorders. Blood 111: 3015-23, 2008 (査読有) .

[学会発表] (計23件)

- ① 國島伸治 May-Hegglin異常の新規鑑別診断法 第9回日本検査血液学会学術集会 平成20年7月26-27 津
- ② 國島伸治 古くて新しい病気 May-Hegglin異常—新しい検査と新しい概念— 第27回日本臨床検査医学会東海北陸支部例会 平成20年8月31日 浜松
- ③ 國島伸治 血小板異常症についての話題 第9回東海KOAG研究会 平成20年9月11日 名古屋
- ④ 國島伸治 Differential diagnosis of macrothrombocytopenias The XXXIInd World Congress of the International Society of Hematology October 19-23, 2008 Bangkok, Thailand
- ⑤ 國島伸治 MYH9遺伝子exon1に2種類の新規遺伝子変異を同時に認めた

May-Hegglin異常の1例 第70回日本血液学会総会 平成20年10月10-12日 京都

- ⑥ 國島伸治 新たな先天性巨大血小板症の原因となるインテグリン α IIb変異 第70回日本血液学会総会 平成20年10月10-12日 京都
- ⑦ 國島伸治 Differential diagnosis of macrothrombocytopenias The XXXIInd World Congress of the International Society of Hematology October 19-23, 2008 Bangkok, Thailand
- ⑧ 國島伸治 Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia 16th Annual Meeting of the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group May 30, 2009 Nagoya
- ⑨ 國島伸治 先天性巨大血小板症の新たな原因GPIIb R995W変異 第10回日本検査血液学会学術集会 平成21年7月4-5日 甲府
- ⑩ 國島伸治 A heterozygous *ITGA2B* R995W mutation causes constitutive activation of the α IIb β 3 receptor and results in congenital macrothrombocytopenia XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis July 11-16, 2009 Boston, MA, USA
- ⑪ 國島伸治 先天性血小板減少症の鑑別診断 第26回北海道小児血液研究会 平成21年10月17日 札幌
- ⑫ 國島伸治 小児の先天性血小板減少症 第23回滋賀小児感染症・血液疾患研究会 平成21年10月31日 大津
- ⑬ 國島伸治 メイ・ヘグリン異常の原因遺伝子の同定、鑑別診断法の確立と新規疾患概念の提唱 愛知県臨床衛生検査技師会遺伝子染色体検査研究班例会 平

成21年11月14日 名古屋

- ⑭ 國島伸治 von Willebrand病type 2Bと巨大血小板症 日本血栓止血学会学術標準化委員会第4回SSCシンポジウム 平成21年11月21日 東京
- ⑮ 國島伸治 GPIb β 点変異と22q11.2欠失との複合ヘテロ型異常によるBernard-Soulier症候群 第51回日本小児血液学会総会 平成21年11月27-29日 千葉
- ⑯ 國島伸治 先天性巨大血小板症の鑑別診断-九州沖縄地域の特徴を含めて- 日本検査血液学会沖縄支部第7回学術集会 平成21年12月5日 那覇
- ⑰ 國島伸治 先天性巨大血小板症における新規GPIIb変異の同定 第11回日本検査血液学会学術集会 平成22年7月24-25日 東京
- ⑱ 國島伸治 先天性巨大血小板症の病因・病態解析と鑑別診断 第8回血液・血管オルビス 平成22年8月22日 東京
- ⑲ 國島伸治 Molecular mechanisms for macrothrombocytopenia 第72回日本血液学会総会 平成22年9月24-26日 横浜
- ⑳ 國島伸治 GPIIb/IIIa異常による新規先天性巨大血小板症 第18回日本小児ITP研究会 平成22年11月20日 東京
- 21 國島伸治 NH0ネットワーク共同研究-先天性血小板減少症の診断ガイドライン作成に関する研究- 第64回国立病院総合医学会 平成22年11月26-27日 福
- 22 國島伸治 先天性巨大血小板性血小板減少症家系において見いだした新規GPIIIa遺伝子変異 第52回日本小児血液学会総会 平成22年12月17-19日 大阪
- 23 國島伸治 先天性巨大血小板性血小板

減少症 先天性造血不全シンポジウム

平成23年2月5日 浦安

〔図書〕(計2件)

- ① 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、東京都 p261, 2009.
- ② 國島伸治 先天性血小板減少症: May-Hegglin 異常. 最新医学別冊 新しい診断・治療のABC シリーズ 63「血小板減少症・増多症」(池田康夫編集)、最新医学社、大阪、p149-57, 2009.

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.nmh.go.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

國島伸治 (KUNISHIMA SHINJI)

研究者番号: 60373495