

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03637

研究課題名(和文) 無巨核球形血小板減少症を伴うあるいは伴わない橈尺骨癒合症の病態解析

研究課題名(英文) Pathophysiological analysis of radioulnar synostosis with or without amegakaryocytic thrombocytopenia

研究代表者

新堀 哲也(Niihori, Tetsuya)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：40436134

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：(1)骨髄不全患者およびその家族の2家系において、MECOM遺伝子解析を行いバリエーションを同定した。橈尺骨癒合症を持たない骨髄不全患者と橈尺骨癒合症と軽度血球減少を持つ母において、MECOMにスプライシング変異を同定したが母の白血球由来DNAでは認めなかった。SNPアレイを行ったところ、MECOMを含む領域にコピー数不変loss of heterozygosity (CNLOH)を認め、変異アレルが消失していた。(2)RUSAT患者で同定されたMECOMのZF8に存在するミスセンス変異と相同のMecom変異をKnock inしたマウスを作成した。骨格の異常はないが造血幹細胞数減少を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

(1)MECOM関連疾患の患者において初めてspontaneous reversionが起こりうることを示した。これはMECOM関連疾患患者における血球減少について、経過観察および治療を考えていく上で重要な知見である。また、同一家系内においても表現度が異なることが示され、遺伝カウンセリングを行う上でも参考にすべき結果である。(2)モデルマウスでの解析によって、特定の領域におけるミスセンス変異によっても既報のノックアウトマウスと類似の造血への影響を認めており、ミスセンス変異を導入した部位が造血に重要な役割を果たしていることを示した。治療法開発を考える上で重要な知見を得た。

研究成果の概要(英文)：(1) Genetic analysis identified MECOM variants in two families of patients with bone marrow failure. In one family, the proband had a splicing variant but her mother did not have the variant in her leukocytes. SNP arrays using DNA from the mother's leukocyte revealed a copy number neutral loss of heterozygosity (CNLOH) in the region containing MECOM, and the mutant allele was lost. (2) We generated a Mecom knock-in mice. The Mecom mutation is homologous to a missense mutation in ZF8 of MECOM, which was identified in a RUSAT patient. No skeletal abnormalities were observed, but a decreased number of hematopoietic stem cells was observed.

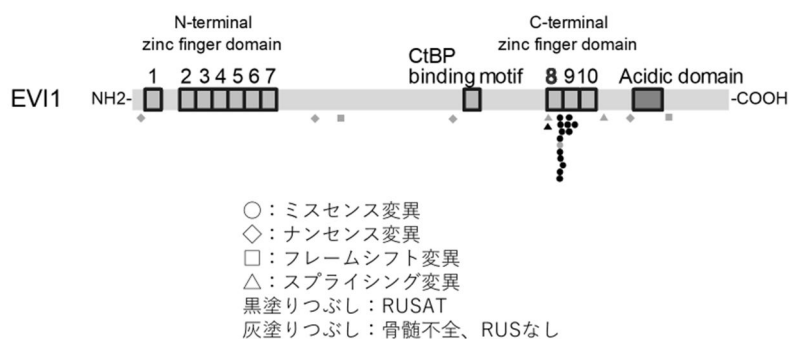
研究分野：臨床遺伝学

キーワード：EV11 MECOM 橈尺骨癒合症 骨髄不全

1. 研究開始当初の背景

無巨核球性血小板減少症を伴う橈尺骨癒合症(Radioulnar synostosis with amegakaryocytic thrombocytopenia, RUSAT)は、血小板減少症から汎血球減少に進行する骨髄不全、前腕の回内・回外が困難となる先天性橈尺骨癒合、第五指斜指症などを主徴とするまれな疾患で、遺伝性骨髄不全症候群の一つに分類される。これまで2家系のみで転写因子 *HOXA11* の1塩基欠失変異が報告されているものの、*HOXA11* 変異陰性患者の報告が続いており、他の遺伝子の関与が示唆されていた。応募者らは *HOXA11* 変異陰性 RUSAT 患者およびその両親において全エクソーム解析を行ない、転写調節因子 *MECOM* にミスセンス変異を同定し、新規原因遺伝子として報告した (Niihori et al. Am J Hum Genet 2015)。患者3例で同定された変異はいずれも8番目の zinc finger motif (ZF8) に存在していた。*MECOM* は、MDS1-EVI1 および EVI1 をコードし、造血幹細胞の自己複製に重要な役割を果たすこと、発生期に limb bud に一過性に発現することが知られている。我々の発見の後、骨髄不全を持つ *MECOM* 変異症例の論文が5つ報告されたが、それらの血縁者には骨髄不全を持たない橈尺骨癒合症 (RUS) 患者の存在も記載されているなど、*MECOM* 変異を持つ患者の取りうる症状についてはさらなる報告の蓄積が必要である。

既報の遺伝子変異分布



2019年時点までの報告における遺伝子変異分布を左図に示すが、骨髄不全を持つがRUSを持たない症例の変異は遺伝子全体に分布しており、変異の種類も機能喪失変異を中心に様々である一方、RUSAT症例で同定される変異のほとんどはミスセンス変異で8又は9番目のZF motif に集中していた(ZF8に存在するスプライシング変異の1例はインフレームのZF8を含む

エクソン欠失が予想される)。以上より、ZF8 または 9 は RUS の発症に重要であり、そのミスセンス変異は単純な機能喪失変異ではない可能性が示唆される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、1) RUSAT あるいは RUS の原因遺伝子変異を持つ個人の症状の幅は？ 2) RUSAT で同定される *MECOM* の ZF8,9 の変異の機能が、どのように骨髄不全および橈尺骨癒合症の発症に関わっているのか？ 3) 既知遺伝子に変異を持たない RUSAT および RUS の原因は？ といった学術的「問い」の答えを明らかにすることで、正常な造血や前腕発生に必要な *MECOM* の機能を明らかにすることや骨髄不全の治療法開発へつなげること、および遺伝カウンセリングに役立つ情報を見出すことである。

3. 研究の方法

(1) RUSAT および RUS 患者のサンプルおよび臨床症状を収集し、*HOXA11*, *MECOM*, *SMAD6*, *NOG* の遺伝子解析を行う。臨床症状については血球減少および RUS のみではなく、その他の症状(難聴、心疾患、他の骨格異常等)にも注目して収集を行う。これらの結果、新たな遺伝子変異の同定や、より正確な表現型の情報が得られる可能性がある。変異が同定されないサンプルについては、全エクソーム解析を行い、TGF /BMP シグナルに関連の遺伝子に注目して新規原因遺伝子同定を目指す。

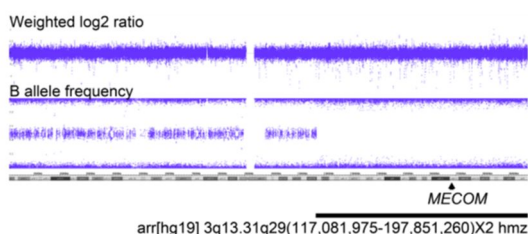
(2) 患者で同定された *MECOM* 変異と相同の *Mecom* 変異を導入したモデルマウス (C57BL/6) はすでに作成した。そこでホモマウスおよびヘテロマウス個体での表現型は、ヒト患者での症状に着目して解析する。具体的には野生型あるいは変異型 8 週マウスの骨髄細胞を用いて FACS で progenitor 細胞を分画分離することで血球分化を評価する。あるいは出生直後の野生型あるいは変異型マウスについて、Alcian blue および Alizarin red 染色による全身の骨格標本を作成し、形態異常の有無を評価する。

4. 研究成果

- (1) MECOM 遺伝子解析の結果、2 家系において MECOM 遺伝子のバリエントを同定した。家系 1 の発端者は出生直後より紫斑が見られ、Hb 7.3 g/dL、血小板数 4,000/μL と貧血、血小板減少を認め、骨髓有核細胞数の減少も認めた。発端者には橈尺骨癒合症はないが、軽度の第五指斜指症を認めた。家族歴として、父に両側橈尺骨癒合症を認めていた。また、兄には橈尺骨癒合症はないが第五指斜指症を認めた。父、兄ともに血球数は正常であった。発端者、両親、兄について MECOM 遺伝子解析を行ったところ、c.2208-4A>G を認め、RNA の解析により 8 番目の ZF に 1 アミノ酸挿入が予測されるスプライシング異常を生じることが示された。家系 2 の発端者は出生直後より点状出血、紫斑を認め、Hb 6.3 g/dL、血小板数 7,000/μL と貧血、血小板減少を認め、骨髓有核細胞数の減少も認めた。家族歴として、母に両側橈尺骨癒合症と軽度血球減少が指摘されていた。発端者および

SNPアレイ解析

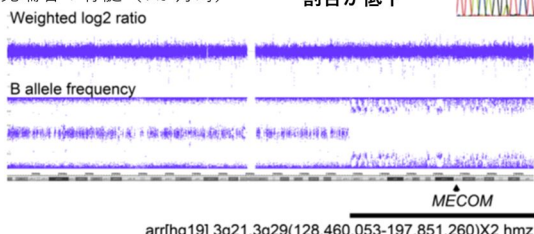
母の末梢血



MECOMを含む領域にコピー数不変の loss of heterozygosity (CNLOH) を認めた

SNPアレイ解析

家系2発端者の骨髓 (7か月時)



MECOMを含む領域に母とは異なる断端のCNLOHを認めた

両親の末梢血において MECOM 遺伝子解析を行ったところ、発端者のみに c.2285+1G>A を認め、RNA の解析によりこの変異がインフレームのエクソンスキップを起こし ZF8 のほとんどを欠失させることが示された。母において爪、毛髪、頬粘膜細胞由来の DNA で確認したところ、発端者と同じバリエントが同定された。さらに母の末梢血において SNP アレイを行ったところ、MECOM を含む領域にコピー数不変のヘテロ接合性喪失 (CNLOH) を認め、MECOM では野生型が 2 コピーとなっていたことが明らかとなった(左上図)。発端者においては輸血の間隔が開いたことから再度骨髓細胞で遺伝子解析を行ったところ、バリエントアレルに低下が認められたため SNP アレイを追加したところ、母とは断端の異なる CNLOH を認めた(左下図)。しかしその後は輸血依存を脱せず幹細胞移植が行われた。家系 1 のように同じバリエントを持ちながら個人によって幅広い症状をもつ場合があることが明らかになった一方、その原因は明らかでない。家系 2 においては血液での症状に影響を与える因子として genetic reversion が存在する可能性が示された。これらの成果をま

め Blood Advances 誌で発表した。(参考文献 1)

- (2) RUSAT 患者で同定された MECOM の ZF8 に存在するミスセンス変異と相同の Mecom 変異 (His752Arg) を Knock in したマウス (C57BL/6) を作成した。ヘテロマウスは出生可能で、大きな形態異常は明らかでなかったが雄マウスで体重が軽い傾向が見られた。ヘテロマウス同士を掛け合わせたがホモマウスは出生せず、胎生致死であった。ヘテロマウスにおいて四肢の観察を詳細に行ったが多指や前腕骨の異常は認めなかった。胎児において骨格を比較したところ、軽度の骨化遅延が認められた。次に血液について注目し解析したところ、16 週齢以降において、末梢血での血小板数が減少した。8 週から 12 週齢のマウスの骨髓細胞においては造血幹細胞数が減少していた。さらに 5-FU を用いて骨髓抑制を行ったところ、ヘテロマウスでは白血球数、血小板数の回復の遅れが認められた。これまでに MECOM のノックアウトマウスにおいて造血幹細胞数の減少等は示されていたが、ZF8 のミスセンス変異においても類似の造血への影響が認められた。一方で四肢の異常は明らかでなく、動物種により異なるメカニズムが存在すると考えられた。以上の成果を Blood Advances 誌に発表した(参考文献 2)。

<参考文献>

1. Phenotypic heterogeneity in individuals with MECOM variants in 2 families. Niihori T, Tanoshima R, Sasahara Y, Sato A, Irie M, Saito-Nanjo Y, Funayama R, Shirota M, Abe T, Okuyama Y, Ishii N, Nakayama K, Kure S, Imaizumi M, Aoki Y. Blood Adv. 2022 Sep 27;6(18):5257-5261. doi: 10.1182/bloodadvances.2020003812.
2. Mecom mutation related to radioulnar synostosis with amegakaryocytic thrombocytopenia reduces HSPCs in mice. Nagai K, Niihori T, Muto A, Hayashi Y, Abe T, Igarashi K, Aoki Y. Blood Adv. 2023 Apr 26:bloodadvances.2022008462. doi: 10.1182/bloodadvances.2022008462. Online ahead of print.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Niihori Tetsuya, Tanoshima Reo, Sasahara Yoji, Sato Atsushi, Irie Masahiro, Saito-Nanjo Yuka, Funayama Ryo, Shirota Matsuyuki, Abe Taiki, Okuyama Yuko, Ishii Naoto, Nakayama Keiko, Kure Shigeo, Imaizumi Masue, Aoki Yoko	4. 巻 6
2. 論文標題 Phenotypic heterogeneity in individuals with MECOM variants in 2 families	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 5257 ~ 5261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2020003812	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 -

1. 著者名 Irie M, Niihori T, Nakano T, Suzuki T, Katayama S, Moriya K, Niizuma H, Suzuki N, Saito-Nanjo Y, Onuma M, Rikiishi T, Sato A, Hangai M, Hiwatari M, Ikeda J, Tanoshima R, Shiba N, Yuza Y, Yamamoto N, Hashii Y, Kato M, Takita J, Maeda M, Aoki Y, Imaizumi M, Sasahara Y	4. 巻 117
2. 論文標題 Reduced-intensity conditioning is effective for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in infants with MECOM-associated syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 598 ~ 606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-022-03505-7	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 -

1. 著者名 Nagai Koki, Niihori Tetsuya, Muto Akihiko, Hayashi Yoshikazu, Abe Taiki, Igarashi Kazuhiko, Aoki Yoko	4. 巻 -
2. 論文標題 Mecom mutation related to radioulnar synostosis with amegakaryocytic thrombocytopenia reduces HSPCs in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2022008462	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 新堀哲也、田野島玲大、笹原洋二、佐藤篤、入江正寛、南條由佳、舟山亮、城田松之、阿部太紀、奥山祐子、石井直人、中山啓子、呉繁夫、今泉益栄、青木洋子
2. 発表標題 幅広い臨床症状を呈したMECOM遺伝子変異を持つ2家系
3. 学会等名 第29回日本遺伝子診療学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新堀 哲也, 田野島 玲大, 笹原 洋二, 佐藤 篤, 入江 正寛, 南條 由佳, 舟山 亮, 城田 松之, 阿部 太紀, 奥山 祐子, 石井 直人, 中山 啓子, 呉 繁夫, 今泉 益栄, 青木 洋子
2. 発表標題 幅広い臨床症状を呈したMECOM遺伝子変異を同定した2家系
3. 学会等名 第125回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新堀哲也、永井康貴、阿部太紀、青木洋子
2. 発表標題 骨髄不全や四肢の先天異常を呈するMECOM異常症での表現型に関連しうるメカニズム
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第67回大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	阿部 太紀 (Abe Taiki) (40810594)	東北大学・医学系研究科・助教 (11301)	
研究分担者	青木 洋子 (Aoki Yoko) (80332500)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	

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
---------	---------