

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591550

研究課題名(和文) JAK2 遺伝子スプライシング異常をもつ新規症候群の発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Genetic analysis of a new syndrome with aberrant JAK2 splicing

研究代表者

大西 宏明(Ohnishi, Hiroaki)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号：80291326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、骨髄増殖性腫瘍および外性器奇形を持つ先天性症候群の兄弟につき、JAK2遺伝子の解析を行ったところ、スプライシング異常を認めた。この異常スプライシングJAK2を導入した細胞では下流シグナル分子のリン酸化の明確な亢進は認めず、本異常を持つトランスジェニックマウスにも明らかな造血器異常や先天奇形は見られなかった。本症候群の原因遺伝子の検索のため、患者およびその家族を含めて全ゲノムの解析を施行したところ、X染色体上のGATA1遺伝子およびDGKK遺伝子の異常を認めた。前者は本症候群の造血器異常に、後者は本症候群の外性器異常に、それぞれ関連すると思われた。

研究成果の概要(英文)：We found a JAK2 splicing mutation in an infant and a fetus presenting with myeloproliferative neoplasm and genital anomalies. No enhancement of phosphorylation of downstream signal molecules was observed in cell lines with this JAK2 mutation. Transgenic mice with this aberrant JAK2 did not develop hematopoietic abnormalities or genital anomalies. To explore the underlying mechanism causing these clinical features and aberrant JAK2 splicing, we performed exome analysis for these patients and their parents and siblings. We identified G221D mutation of GATA1 gene located on X chromosome in these patients and their mother, suggesting that GATA1 mutation is associated with the hematopoietic abnormalities in these patients. In addition, we found mutations in DGKK gene, which is reported to be related to hypospadias, suggesting that DGKK mutation is associated with the genital anomalies in these patients.

研究分野：小児血液腫瘍学

キーワード：JAK2 スプライシング異常 骨髄増殖性腫瘍 GATA1

1. 研究開始当初の背景

JAK2 分子は、JAK-Stat 系の細胞内シグナル伝達に重要な役割を果たしている分子である。近年真性多血症をはじめとする骨髄増殖性腫瘍(MPN)において JAK2 遺伝子変異が高頻度に見られることが報告され、本遺伝子と造血系腫瘍疾患との関係が注目されている。現在、MPN における JAK2 変異は V617F 変異以外にも多くの種類が知られているが、いずれも JAK2 分子の pseudo-kinase domain (PKD) と呼ばれる部分の変異である。この部位は、JAK2 のキナーゼ活性を自己抑制することが知られ、キナーゼ活性の調節に関与すると考えられている。この部位に生じた変異により PKD の自己抑制的機能が失われ、JAK2 の恒常的活性化が生じ、下流分子である Stat 等の活性化を通じて、細胞の異常増殖に関わることが想定されている。実際、V617F 変異をもつ JAK2 分子では、そのキナーゼ活性が正常よりも大幅に亢進しており、これが直接細胞増殖に関与していることが証明されている。

我々は、主に成人の MPN における JAK2 変異を、さまざまな検査材料や方法を用いることにより、迅速かつ高感度に検出する手法について比較検討してきた。その過程で、MPN に閉塞性黄疸と生殖器異常、心肥大の先天異常を伴い、早期に死亡した新生児について検討する機会を得た。本児の末梢血液および骨髄細胞において JAK2 遺伝子の RT-PCR を行ったところ、異常バンドが検出され、その本態はスプライシング異常による JAK2 PKD 内の 267bp の欠損であることが判明し、結果について報告を行った¹⁾。興味深いことに、その後胎内死亡したその弟にあたる胎児において全く同じフェノタイプが認められ、かつ種々の臓器において兄と全く同一の JAK2 遺伝子異常が認められた。このような症例の報告は過去に見られず、家族内発症から新規の遺伝性症候群である可能性

が考えられた。両例に見られた JAK2 スプライシング変異は、これまで健常人も含めて報告がないものであるが、PKD 部位の欠失であり、本症候群に関与している可能性が高いと考えられた。

2. 研究の目的

以上の背景およびこれまでの結果を受け、本児で見られた様々な異常が生じたメカニズムについて明らかにするため、以下のような目的で研究を行った。

- (1) 異常 JAK2 分子の機能について：この異常 JAK2 遺伝子が他の JAK2 変異と同様、JAK2 キナーゼ活性の亢進の原因となっていることを明らかにする。
- (2) 造血細胞の増殖効果について：造血器細胞の増殖に対する本異常 JAK2 分子の関与について明らかにする。
- (3) 先天異常への関与について：本異常 JAK2 分子により、本症例で見られたような骨髄異常および性腺・肝胆系異常・心肺系異常が生ずるかどうかを明らかにする。
- (4) 患者および家族の遺伝子解析：患者およびその家族の DNA・RNA について解析し、このスプライシング異常が形成される機序および MPN・先天異常の発症機序について解明する。

3. 研究の方法

- (1) 異常 JAK2 遺伝子のリン酸化活性についての検討

異常 JAK2 遺伝子のクローニング

患者で認められた異常 JAK2 遺伝子を PCR 法により増幅し、TA クローニングにより増幅用ベクター(pCR2.1-TOPO)に組み入れ、大腸菌により増幅した後、ベクターを精製した。

異常 JAK2 分子の細胞株内への導入制限酵素を用いて、異常 JAK2 遺伝子を増幅用ベクターから発現ベクター pCMV-JAK2 にトランスファーし、BaF3

細胞に導入した。

免疫沈降法およびフローサイトメトリーによる JAK2 分子活性の測定

IL-3 およびエリスロポイエチンを用いて、正常 JAK2 を導入した BaF3 細胞および変異 JAK2 細胞を導入した BaF3 細胞を短時間刺激し、免疫沈降法およびフローサイトメトリーにより JAK2 の下流にあるシグナル伝達分子のリン酸化の程度を比較した。

(2) 異常 JAK2 遺伝子が造血細胞に与える影響の検討

マウス受精卵に異常 JAK2 遺伝子を導入した。

新生仔マウスに骨髄異常が見られるかどうかを病理学的に検討した。

その後マウスに造血器腫瘍が発生するかどうかについて検討した。

(3) マウス受精卵への異常 JAK2 遺伝子導入による先天異常発生の検討

上記のマウスを交配させ、JAK2 異常遺伝子をより多量に発現するマウスを作成し、生殖器・肝胆系・心肺系その他に異常が見られるかどうかを病理学的に検討した。

(4) 患者家族における遺伝子解析による、本患者に見られた異常の原因となる遺伝子変異の解明

患者家族から、同意の上血液を採取し、血液細胞から DNA および RNA を抽出した。

DNA の直接シーケンスにより、患者家族の JAK2 遺伝子異常について検討した。近縁遺伝子である JAK1 遺伝子のスプライシング異常の有無について、RT-PCR により検討した。

患者および家族の DNA について、エクソン部分の全ゲノム解析 (エクソーム解析) を行い、患者で認められた種々の異常に關与する可能性のある遺伝子変異について探索した。

4 . 研究成果

(1) 異常 JAK2 遺伝子のリン酸化活性についての検討

異常 JAK2 遺伝子が導入された発現ベクター - pCMV-JAK2M および正常ベクター pCMV-JAK2 を BaF3 細胞に導入し、RT-PCR により異常・正常 JAK2 遺伝子が発現していることを確認できた。これらの pCMV-JAK2M 導入 BaF3 細胞および pCMV-JAK2 導入 BaF3 細胞について、Akt および STAT3 のリン酸化の程度を比較した。結果は、IL-3 刺激では変異 JAK2 導入 BaF3 細胞で Akt のリン酸化は正常 JAK2 遺伝子導入細胞に比べ若干亢進していたが、Stat3 のリン酸化に明らかな差はなく、エリスロポイエチン刺激後 15 分では有意な差は見られなかった。

(2) 異常 JAK2 遺伝子が造血細胞に与える影響の検討

変異 JAK2 遺伝子をマウス胚に導入してトランスジェニックマウスを作成した結果、9 匹の変異 JAK2 遺伝子をもつマウスが得られた。これらについて、継続的に血液中の赤血球・白血球・血小板数について確認したところ、一部で多血や血小板増加を示すマウスが見られたが、全体的には平均すると明らかな造血器細胞の異常は認められなかった。また、1 匹のマウスに肝臓の多発腫瘍が見られたが、病理学的検討では造血器細胞腫瘍とは認められなかった。

(3) マウス受精卵への異常 JAK2 遺伝子導入による先天異常発生の検討

上記で得た 9 匹のトランスジェニックマウスを交配させ、さらに 7 匹の JAK2 異常遺伝子発現マウスを得た。これらの計 16 匹の JAK2 変異マウスについては、特に早期死亡の傾向はなく、死後の解剖においても生殖器・肝胆系・心肺系について明らかな奇形は認められなかった。

(4) 患者および家族の DNA ・ RNA 解析

患者および家族について JAK2 遺伝子の

周辺の DNA の解析を行ったが、スプライシング異常の原因となるような明らかな異常は見られなかった。一方、両患者では近縁遺伝子である JAK1 のスプライシング異常も同時に認められており、本疾患ではスプライシング機構そのものに異常が生じている可能性も考えられた。

患者および家族の血液細胞についてエクソーム解析を行ったところ、原因となる遺伝子異常の候補が複数認められた。具体的には、常染色体上に座位する遺伝子 8 個 (DTHD1、EGFLAM、EPX、MZF1、NBPF1、NRAP、RANBP17、RTL1) および X 染色体上に座位する遺伝子 4 個 (GATA1、DGKK、KIAA1210、MORC4) に変異が認められた。このうち、GATA1 遺伝子は過去の報告において先天性の貧血で変異が認められており、本疾患の造血器異常に関与している可能性が考えられた。一方、DGKK 遺伝子は尿道下裂の患者で変異が認められることが報告されており、本患者の外性器異常に関与している可能性が示唆された。そのほかの遺伝子については、機能が不明なものや本患者で異常が認められた臓器で発現していないものであり、本疾患への関与は不明であった。スプライシング機構に関与する遺伝子の変異は認められず、本疾患で JAK2 その他の遺伝子にスプライシング異常が認められた原因については現状では明らかとならなかった。現在、本患者で認められた G221D 異常を持つ GATA1 遺伝子を細胞株に導入し、スプライシングの異常が見られるか否かについて検討中である。

<引用文献>

- 1) Ohnishi H, Hosoi K, Yoshino H, Sugiura M, Matsushima S, Watanabe T, Bessho F. A novel *JAK2* splicing mutation in neonatal myeloproliferative disorder accompanying congenital anomalies. *British Journal of*

Haematology 145:676-678, 2009

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

1. 大西 宏明、滝田順子、大塚弘毅、松島早月、岸野智則、細井健一郎、大倉康夫、渡邊 卓、遺伝性骨髄増殖性腫瘍の家族例における網羅的遺伝子解析、第 61 回日本臨床検査医学会総会、平成 26 年 11 月 23 日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
2. Ohnishi H, Hosoi K, Yoshino H, Gemma Y, Ohtsuka K, Matsushima K, Bessho F, Watanabe T, Fujino T. *JAK2 Splicing Mutation in Siblings presenting with Myeloproliferative Neoplasms, Cardiomyopathy and Hypogonadism*. 43th Congress of International Society of Paediatric Oncology, 2011.10.29, Auckland (New Zealand)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

大西宏明 (OHNISHI, Hiroaki)

杏林大学医学部・准教授

研究者番号：80291326

(2)研究分担者

渡邊 卓 (WATANABE, Takashi)

杏林大学医学部・教授

研究者番号： 00191768

大塚弘毅 (OHTSUKA, Kouki)

杏林大学医学部・助教

研究者番号：70439165

(3)連携研究者

なし