

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591539

研究課題名(和文)先天性好中球減少症のG-CSF受容体関連遺伝子異常の臨床的・生物学的意義

研究課題名(英文)Clinical and biological significance of granulocyte colony stimulating factor receptor gene abnormalities those found in severe congenital neutropenia.

研究代表者

三井 哲夫(Mitsui, Tetsuo)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：30270846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：重症型先天性好中球減少例で好中球コロニー刺激因子(CSF3)受容体切断型遺伝子異常出現の前方視的解析を行った。研究期間中、新規症例及び以前からの解析継続症例にCSF3受容体遺伝子変異は観られていない。G-CSF受容体刺激伝達系関連蛋白についても一部遺伝子解析を行ったが、有意な変化は検出できなかった。解析患者さんに骨髄異形成症候群や白血病への進展といった臨床症状の変化も無かった。

症例を前方視的に解析する進め方は、症例のリクルート数に限界があること、また追跡症例が白血病化前に造血細胞移植を施行され、解析症例から外れる場合が多いことから方法自体に限界がある。

研究成果の概要(英文)：We conducted sequential granulocyte colony stimulating factor (CSF3) receptor gene analysis of patients with severe congenital neutropenia. No mutation was found in CSF3R gene during study period. Some genes for proteins of signal transduction of CSF3R were also analyzed and also found no abnormality. During study period no patient progressed to myelodysplasia or myeloid leukemia.

Prospective analysis toward severe congenital neutropenia is seemed to be difficult. It is rare disease and the patients tend to receive blood cell transplant in their clinical course before progression to leukemia. New approach should be arranged to define the mechanism of leukemogenesis of this disease.

研究分野：小児血液、小児がん

キーワード：先天性好中球減少症 CSF3R G-CSF受容体 切断型遺伝子変異 白血病化

1. 研究開始当初の背景

重症型先天性好中球減少症は好中球絶対数の減少(<200/ μ l)と易感染性を特徴としている。近年の治療の進歩でリコンビナント G-CSF 投与により、好中球数が増加し、致命的な感染症を回避出来るようになったが、G-CSF 投与後に骨髄異型性症候群や急性白血病(MDS/AML)に移行する症例が10%程度観られている。

この疾患の主な先天的遺伝子異常には、好中球 elastase 2 (*ELA2*)と細胞骨格形成やアポトーシスに關与する *HAX1* があり、それぞれ約 60%と 30%に観られる。当初この疾患の先天的遺伝子異常として報告された G-CSF 受容体(*CSF3R*)細胞質内領域のアミノ酸配列 716-731 の間に停止コドンが出現する(切断型)遺伝子異常も報告されていた。我々も平成 9 年以来、継続的に解析を行う中で、白血病化を来した 2 例中 1 例について *CSF3R* 遺伝子に停止コドンが出現するタイプを検出した。この症例においては白血球 mRNA にはこの異常がヘテロ接合体で観られたが、爪、髪の毛の gDNA にはみられなかった。これは *CSF3R* 遺伝子異常が、後天的なものであることを示している。実際、切断型異常については、当初の報告以来、成因遺伝子ではなく、後天的異常であるということが明らかになってきた。この切断型変異は、欧米では、先天性好中球減少症全体の 14-20%に認められ、同症から移行した MDS/AML においてはその 80%に切断型変異が見出されている。切断型の *CSF3* 受容体は、in vitro で細胞の未分化性の保持と増殖に働くことが示されており、白血病化に關連する重要な後天的遺伝子異常である可能性が高い。

G-CSF 受容体切断型遺伝子異常の病態意義を明らかにするために、我々は切断型 G-CSF 受容体トランスジェニックマウスを作成し、同マウスで実際に病態をある程度再現する事に成功した(Blood 101; 2990-, 2003)。このマウスに対して G-CSF 単独長期投与が及ぼす影響についても解析したが、通常量の G-CSF 投与 250 日前後では白血病発症には至っていない(Jpn J Clin Hematol 44;275, 2003)。

2. 研究の目的

我々は平成 14 年以降、先天性好中球減少症においてサイトカインシグナル伝達系の異常の介在を想定し、*CSF3R* 遺伝子異常の解析を行ってきた。その結果、重症先天性好中球減少症を含む G-CSF 投与の關連性が示唆される先天性血液異常症の白血病化には、*CSF3R* の変異に加え、他の要因が必要であると考えられた。そこで *CSF3R* 以外に考えられる伝達系蛋白の遺伝子解析を含め、特に G-CSF 投与中の患者さんの白血球における遺伝子変化を前方視的に觀察することで、白血病化への変化の過程を明らかにしていくことを目的とした。

3. 研究の方法

先天性好中球減少症患者さんの臨床検体を得、血液細胞から DNA、RNA を抽出、G-CSF 受容体遺伝子(*CSF3R*)とその受容体刺激伝達系を含む、關連蛋白遺伝子(*SHP2*, *Gab1*, *Gab2*, *Grb2*, *SOCS3*, *STAT3*, *STAT5*, *NRAS*, *KRAS2*)変異解析を経時的に継続検索する。

4. 研究成果

研究協力施設から骨髄、末梢血検体を送付いただき、先天性好中球減少症と診断された G-CSF(*CSF3*)受容体切断型遺伝子異常の出現の有無の経時的解析をおこなった。現在も解析を続けているが、残念ながら、経過中、変異を継続して検出した症例はなかった。

研究期間中、G-CSF 投与中の 1 例に、一過性の *CSF3* 受容体膜貫通部直上のヘテロの遺伝子変異を特定した(c.1947C>T:Ala569Val)。この変異は骨髄細胞由来の mRNA からヘテロに同定され、口腔粘膜細胞由来ゲノム DNA からは検出されず、切断型異常と同様に後天的変異と考えられた。この患者さんは臨床経過上、症状は変化ないまま、その 6 か月後の骨髄からこの変異は消失した。このようなゲノム不安定性ともいべき兆候は白血病化への多段階の変化を考えて行く上で非常に興味深く、この患者さんの継続的な解析を行ったが、その後は骨髄や臨床症状含め変化は来していない。

こうした変異が必ずしも検出不能である要因だが、そもそも希少疾患であり症例数を多く得るのが困難であるという事と共に、解析中の症例が、変異が検出されなくても適切なドナーが得られた時点で造血細胞移植を行なうことが多く、結果的に前方視的遺伝子解析症例数が減少していることがある。

G-CSF 受容体刺激伝達系關連蛋白の *SHP2*, *Gab1*, *Gab2*, *Grb2*, *SOCS3*, *STAT3*, *STAT5*, *NRAS*, *KRAS2* についても、それぞれに可能な物について解析条件を整え、得られる臨床検体において mRNA の配列決定を行ったが、一通り行なうにはかなりの量の検体を要する為に、限定された臨床検体から十分な解析を行なうことはできなかった。

解析症例のうち *HAX1* 変異を有する女兒は、*HAX1* 遺伝子変異に合併する先天性の神経障害は観られず、5 歳時の急性脳症発症を契機に退行を認め神経発達障害が顕在化した。従来神経障害は先天性とされており、*HAX1* の神経異常の機序を考える上で興味深い。我々の症例と同様 *HAX1* 変異を持っているものの神経症状の無い症例が、2016 年報告された (Asian Pac J Allergy Immunol 2016;34:73-6)。神経障害発症との關連性についてその機序を考えるに重要な知見である。

本研究の実施する中で得られた研究協力者とのネットワークを通じて、Shwachman-Diamond 症候群のような先天性好

中球減少を示し、白血球化が高頻度に起こってくる先天性血液疾患を中心に同様の解析を行っているが、現時点で有意な結果は得ていない。

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 21 件)

Ogino D, Hashimoto T Hattori M, Tamiya G, Mitsui T, Hayasaka K 他 Analysis of the genes responsible for steroid-resistant nephrotic syndrome and/or focal segmental glomerulosclerosis in Japanese patients by whole exome sequencing analysis. J Hum Genet, 61:137-141, 2015, 査読あり

Sekimizu M, Mori T, Kikuchi A, Mitsui T, Sunami S, Kobayashi R, Fujita N, Inada H, Takimoto T, Saito AM, Watanabe T, Fujimoto J, Nakazawa A, Ohshima K, Horibe K, Tsurusawa M; Lymphoma Committee of the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. Prognostic impact of cytogenetic abnormalities in children and adolescents with mature B-cell non-Hodgkin lymphoma: A report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG). Pediatr Blood Cancer. 2015 Jul;62(7):1294-6. 査読有り

Fukano R, Mori T, Kobayashi R, Mitsui T, 他 Haematopoietic stem cell transplantation for relapsed or refractory anaplastic large cell lymphoma: a study of children and adolescents in Japan. British Journal of Haematology 168: 557-563, 2015, 査読有

Tsurusawa M, Goshō M, Mori T, Mitsui T, Sunami S, Kobayashi R 他, Statistical Analysis of Relation Between Plasma Methotrexate Concentration and Toxicity in High-Dose Methotrexate Therapy of Childhood NonHodgkin Lymphoma. Pediatr Blood Cancer 2015;62:279-284, 査読有

Kobayashi R, Sunami S, Mitsui T, Nakazawa A, Koga Y, Mori T, Tanaka T, Ueyama J, Osumi T, Fukano R, Ohki K, Sekimizu M, Mori T, Lymphoma Committee and Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group: Treatment of pediatric lymphoma in Japan: Current status and plans for the future. Pediatrics International 2015;57:523-534

Onoda T, Kanno M, Sato H, Hayasaka K, Mitsui T 他 Identification of Novel ALK Rearrangement A2M-ALK in a Neonate with Fetal Lung Interstitial Tumor. Genes Chromosomes Cancer 53:865-874, 2014, 査読有

Hanada I, Terui K, Ikeda F, Toki T,

Mitsui T, Gene alterations involving the CRLF2-JAK pathway and recurrent gene deletions in Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia in Japan., Genes Chromosomes Cancer 53: 902-910, 2014, 査読有

Onoda T, Kanno M, Meguro T, Sato H, Takahashi N, Kawakami T, Mitsui T, Hayasaka K. Successful treatment of acute myeloid leukaemia in a patient with ataxia telangiectasia. European J Haematol 91: 557-560, 2013, 査読有

[学会発表](計 10 件)

佐藤裕子、川崎直未、川崎基、安孫子優、目黒亨、高橋憲幸、簡野美弥子、滝智彦、今村俊彦、三井哲夫：PRF1 遺伝子領域の片親性ダイソミーが原因であった家族性血球貪食症候群の 2 か月女児 第 57 回日本小児血液学会総会、甲府富士屋ホテル(山梨県甲府市)；2015 年 11 月 27 日

三井 哲夫, 川上 貴子, 簡野 美弥子, 高橋 憲幸, 小野田 正志, 目黒 亨, 佐藤 裕子, 早坂 清：小児がん治療後の口腔内がん 3 例. 第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会, 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市); 2014 年 11 月

本間信夫、橋本敏夫、角田力彌、三井哲夫、早坂清：2013 年山形県南部で発症した甲状腺がん 18 歳男児の 1 例：第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会，ヒルトン福岡シーホーク(福岡県福岡市)；2013 年 12 月

目黒亨、中村和幸、佐藤裕子、簡野美弥子、小野田正志、高橋憲幸、川上貴子、三井哲夫、加藤光広、早坂清：重症先天性好中球減少症の経過中、5 歳時急性脳症を契機に退行を認め神経発達障害が顕在化した HAX1 変異を有する女児．第 55 回日本小児血液・がん学会，ヒルトン福岡シーホーク(福岡県福岡市)；2013 年 12 月

[図書](計 1 件)

三井哲夫: 小児白血病・リンパ腫の診療ガイドライン(日本小児血液学会 編) pp105-109, 金原出版, 東京, 2016.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三井 哲夫 (MITSUI TETSUO)
研究者番号：30270846
山形大学・医学部・教授

(2) 研究分担者

川上 貴子 (KAWAKAMI TAKAKO)
研究者番号：90312743
山形大学・医学部・助教

早坂 清 (HAYASAKA KIYOSHI)

研究者番号：20142961
山形大学・医学部・教授

(3)連携研究者
()

研究者番号：