

平成 30 年 9 月 12 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2017

課題番号：24790979

研究課題名(和文)血小板造血および血小板機能シグナルにおけるRUNX1の役割の解明

研究課題名(英文)The role of RUNX1 in platelet production and function

研究代表者

下田 晴子(Shimoda, Haruko)

宮崎大学・医学部・医員

研究者番号：10452921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：常染色体優性遺伝疾患であるFamilial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy (FPD/MM)は、原因としてRUNX1変異が同定されていた。この研究では、FPD/MM患者らのゲノムDNAを用いてRUNX1の遺伝子解析を行った。RUNX1の遺伝子配列には変異はなかったが、マイクロサテライト解析では患者に共通してexon1近傍の片アリルの欠失が疑われ、SNPマーカーを用いたコピー数解析によりexon1の欠失を明らかにした。FPD/MM発症の機序としてRUNX1の半数体不全が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy (FPD/MM) is an autosomal dominant disorder characterized by quantitative and functional platelet abnormalities and propensity to develop myelodysplastic syndrome (MDS) or acute myeloid leukemia (AML). Causal mutations have been identified in the RUNX1 gene. In this research, the genetic analysis was performed to identify the cause of FPD/MM. The Sequencing analysis of the exons 1-8 of Runx1 gene revealed no mutations. The microsatellite analysis using seven markers localized in the RUNX1 gene suggested hemi-allele deletion of the exon1 region. The copy number analysis revealed the deletion of the exon1. Although the mechanism of FPD/MM has been considered dominant-negative effect of the abnormal RUNX1 protein, these results suggest that haploinsufficiency of RUNX1 is rather responsible of the disease.

研究分野：血液腫瘍内科学

キーワード：家族性血小板減少症 RUNX1

1. 研究開始当初の背景

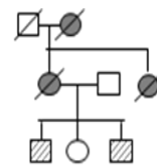
- ・ Familial platelet disorder with propensity to develop myeloid malignancy (FPD/MM) は 1985 年に Downton らによって初めて報告された、①血小板減少②血小板機能異常③骨髄系腫瘍(白血病・骨髄異形成症候群)への進展を特徴とする常染色体優性遺伝の家族性疾患である。
- ・ FPD/MM の原因として第 21 番染色体上の *RUNX1* 遺伝子のヘテロ接合性変異が同定されていた。

研究開始当初、FPD/MM の家系は欧米を中心に 29 家系、本邦では 2 家系の報告があった。共通する異常として転写因子 *RUNX1* の遺伝子変異がそれぞれの症例にて同定され、疾患の原因と考えられていた (Song et al. *Nat Genet* 1999)。*RUNX1* は正常造血を制御する代表的な転写因子であり、*RUNX1* の機能不全は造血細胞の腫瘍化を引き起こすことがすでに明らかにされていたため、FPD/MM の患者が高率に急性骨髄性白血病 (AML) または骨髄異形成症候群 (MDS) を発症することは矛盾なく説明できた。しかし、*RUNX1* の異常と腫瘍化のメカニズムが明らかにされつつあった一方、*RUNX1* が血小板産生や血小板機能に果たす役割を検討した報告は当時まだ数少なく、未解明であった。

私は臨床の場で FPD/MM と考えられる家系 A に遭遇し (図 1)、この家系 A の患者 (母、長男、次男) らのリンパ球由来ゲノム DNA を用いて *RUNX1* の遺伝子解析を行った。シーケンス解析では *RUNX1* エクソン内に異常はなかったため、次に *RUNX1* 遺伝子領域の 7 loci についてマイクロサテライト解析を行ったところ、患者らでは片アレルにおいて *RUNX1* のエクソン 1 領域が欠失している (loss of heterozygosity: LOH) 可能性が示唆された (図 2)。すなわち、先天的な *RUNX1* の半数体不全 (haploinsufficiency) が、この患者らの

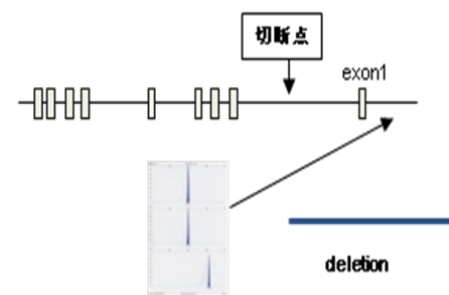
血小板減少症および血小板機能異常症の原因となっている可能性を考えた。

(図 1) 家系 A



■ 血小板減少および白血病
▨ 血小板減少のみ

(図 2) マイクロサテライト解析



2. 研究の目的

この研究の目的は、*RUNX1* の異常 (haploinsufficiency) が同定された FPD/MM 患者らのサンプルを用いて、以下の 2 つを生体レベルで明らかにすることである。

テーマ 1 : *RUNX1* が造血細胞の分化段階別に巨核球・血小板造血シグナルである TPO-cMPL 経路を制御している可能性

テーマ 2 : *RUNX1* が血小板凝集を司る GP IIb-IIIa 複合体の活性化経路を制御している可能性

3. 研究の方法

まず、研究基盤となる FPD/MM 家系 A の家系内調査をさらにすすめ、患者の存在と *RUNX1* の変異の有無を明らかにしていく。

- (1) インフォームドコンセントを得たうえで、家系 A で血小板減少を呈する者を抽出し、FPD/MM 患者候補とする。
- (2) インフォームドコンセントに基づいたサンプリング (患者では骨髄、末梢血、及び毛髪・爪、健常人では末梢血と毛髪・爪) を行う。サンプルより DNA を抽出し、*RUNX1* 遺伝子 (exon1-8) の塩基配列シーケンスおよび *RUNX1* 遺伝子領域に存在するサテライトマーカー (7 loci) について解析する。共通する exon1 近傍の片アレルの欠失 (LOH) の有無を明らかにする (図 1 および 2)。

(3) SNP マーカーを用いたコピー数解析を行い、exon1 の欠失が明らかとなった者を患者として同定する。

上記(1)～(3)で同定した患者の検体を用いて、以下2つのテーマについて検討する。

テーマ 1：RUNX1 が造血細胞の分化段階に応じて TPO-cMPL 経路を制御している可能性

- 巨核球・血小板造血経路にしたがい、骨髄の造血幹細胞、骨髄球系共通前駆細胞、巨核球・赤芽球共通前駆細胞、巨核球、及び末梢血の血小板の、それぞれの分化段階での cMPL 発現量について、患者と健常人とで差異があるかどうか明らかにする。
- 各分化段階の細胞において TPO 刺激時の細胞内 STAT5 のリン酸化の程度、及び TPO 依存性コロニー形成能について、患者と健常人とで差異があるかどうか明らかにする。
- 患者由来の各分化段階の細胞に正常 RUNX1 を遺伝子導入した場合に、cMPL の発現量および TPO 刺激時の STAT5 のリン酸化に変化が生じるかどうか明らかにする。

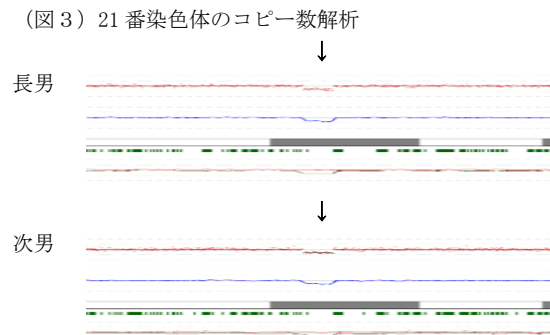
テーマ 2：RUNX1 が血小板凝集を司る GP II b-III a 複合体の活性化経路を制御している可能性

- 血小板の遺伝子発現プロファイリングを行い、FPD/MM 患者らと健常人とで発現に差異のある遺伝子を同定する。
- 上記のうち、今までの報告から GP II b-III a の活性化に関与するような候補を絞り込み、RUNX1 の転写標的となっている可能性を明らかにする。

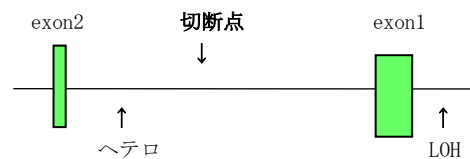
4. 研究成果

家系 A (図 1) で FPD/MM 患者と考えられた長男と次男について、21 番染色体の SNP マーカーを用いたコピー数解析を行った。コピー数解析の結果、両者に共通して RUNX1 頭側での片アレル欠失が明らかにできた (図 3)。

また、切断点は RUNX1 exon1-2 間と同定できた (図 4)。これらの結果は先に得られていたマイクロサテライト解析の結果 (図 2) と矛盾しないものであった。以上の結果より、家系 A の長男と次男を FPD/MM 患者と同定し、両者の検体を用いてテーマ 1, 2 について検討した。



(図 4) RUNX1 の切断点



テーマ 1 を検討する目的で、患者の骨髄細胞をセルソーターを用いて造血幹細胞から巨核球・血小板に分化するまでの各分化段階の細胞に分けることを試みた。研究期間内ではここまでしか達成できなかった。今後、それぞれの分化段階において cMPL 発現量、TPO 依存性コロニー形成能、TPO 刺激による STAT5 リン酸化などの実験を引き続き行っていく予定である。

テーマ 2 を検討する目的で、現在血小板の遺伝子プロファイリングの実験計画をたてている段階であり、研究期間内では FPD/MM 患者らと健常人とで発現レベルに明らかに差異のある遺伝子を抽出するまでには至らなかった。

研究として、患者の同定に時間を要した。また、途中で研究中断期間を挟んだため、中断前と再開後の実験結果の一致 (再現性) の確認等にも時間を要し、進行が遅れた。

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 5 件)

- ① Kubuki Y, Yamaji T, Hidaka T, Kameda T, Shide K, Sekine M, Kamiunten A, Akizuki K, Shimoda H, Tahira Y, Nakamura K, Abe H, Miike T, Iwakiri H, Tahara Y, Sueta M, Yamamoto S, Hasuike S, Nagata K, Kitanaka A, Shimoda K, TET2 mutation in diffuse large B-cell lymphoma., Journal of clinical and experimental hematopathology, 査読有, 56, 2017, 145-149, 10.3960/jslirt.56.145
- ② Kubuki Y, Shide K, Kameda T, Yamaji T, Sekine M, Kamiunten A, Akizuki K, Shimoda H, Tahira Y, Nakamura K, Abe H, Miike T, Iwakiri H, Tahara Y, Sueta M, Hashimoto K, Yamamoto S, Hasuike S, Hidaka T, Nagata K, Kitanaka A, Shimoda K, Differences in Hematological and Clinical Features Between Essential Thrombocythemia Cases With JAK2- or CALR-Mutations., Annals of laboratory medicine., 査読有, 37, 2017, 159-161, 10.3343/alm.2017.37.2.159.
- ③ Sekine M, Kubuki Y, Kameda T, Takeuchi M, Toyama T, Kawano N, Maeda K, Sato S, Ishizaki J, Kawano H, Kamiunten A, Akizuki K, Tahira Y, Shimoda H, Shide K, Hidaka T, Kitanaka A, Yamashita K, Matsuoka H, Shimoda K, Effects of mogamulizumab in adult T-cell leukemia/lymphoma in clinical practice., European journal of haematology., 査読有, 98, 2017, 501-507, 10.1111/ejh.12863.
- ④ Shide K, Kameda T, Yamaji T, Sekine M, Inada N, Kamiunten A, Akizuki K, Nakamura K, Hidaka T, Kubuki Y, Shimoda H, Kitanaka A, Honda A, Sawaguchi A, Abe H, Miike T, Iwakiri H, Tahara Y, Sueta M, Hasuike S, Yamamoto S, Nagata K, Shimoda K, Calreticulin mutant mice develop essential thrombocythemia that is ameliorated by the JAK inhibitor ruxolitinib., Leukemia., 査読有, 308, 2016, 1-21, 10.1038/leu.2016.308
- ⑤ 下田晴子、久富木庸子：著明な血小板増加と環状鉄芽球を伴う不応性貧血 (RARS-T). 臨床検査、査読無、59(10)、2015、998-1002、<http://www.igaku-shoin.co.jp/>

[学会発表] (計 6 件)

- ① Masaaki Sekine, Yoko Kubuki, Takuro Kameda, Masaki Takeuchi, Takanori Toyama, Noriaki Kawano, Kouichi Maeda, Siichi Sato, Junzo Ishizaki, Hiroshi Kawano, Ayako Kamiunten, Keiichi Akizuki, Yuki Tahira, Haruko Shimoda, Kotaro Shide, Tomonori Hidaka, Akira Kitanaka, Kiyoshi Yamashita, Hitoshi Matsuoka, Kazuya Shimoda, Mogamulizumab for adult T-cell leukemia/lymphoma in clinical practice, 58th ASH Annual Meeting & Exposition, 2016/12/4, アメリカ合衆国
- ② Yuki Tahira, Keiichi Akizuki, Masaaki Sekine, Ayako Kamiunten, Takuro Kameda, Kotaro Shide, Haruko Shimoda, Tomonori Hidaka, Yoko Kubuki, Kazuya Shimoda, Testicular relapse of primary central nervous system lymphoma, 第79回日本血液学会学術集会, 2017/10/21, 東京都
- ③ Kotaro Shide, Takuro Kameda, Masaaki Sekine, Ayako Kamiunten, Keiichi Akizuki, Yuki Tahira, Haruko Shimoda, Tomonori Hidaka, Yoko Kubuki, Arata Honda, Masahito Ikawa, Kazuya Shimoda, Murine CALR mutants homologous to human CALR mutants activate STATs, but do not develop MPNs in vivo, 第79回日本血液学会学術集会, 2017/10/21, 東京都
- ④ Ayako Kamiunten, Yuki Tahira, Keiichi Akizuki, Masaaki Sekine, Takuro Kameda, Kotaro Shide, Haruko Shimoda, Tomonori Hidaka, Yoko Kubuki, Kazuya Shimoda, Retrospective analysis of allo-HSCT for ATLL in single center experience. 第79回日本血液学会学術集会, 2017/10/21, 東京都
- ⑤ Takuro Kameda, Kotaro Shide, Masaaki Sekine, Ayako Kamiunten, Yuki Tahira, Keiichi Akizuki, Haruko Shimoda, Tomonori Hidaka, Yoko Kubuki, Kazuya Shimoda, Effect of HBZ and PRKCbD427N in ATLL development. 第79回日本血液学会学術集会, 2017/10/21, 東京都
- ⑥ Masaaki Sekine, Yoko Kubuki, Takuro Kameda, Masanori Takeuchi, Takanori Toyama, Noriaki Kawano, Kouichi Maeda, Siichi Sato, Junzo Ishizaki, Hiroshi Kawano, Ayako Kamiunten, Keiichi Akizuki, Yuki Tahira, Haruko Shimoda, Kotaro Shide, Tomonori Hidaka, Akira Kitanaka, Kiyoshi Yamashita, Hitoshi Matsuoka, Kazuya Shimoda, Effects of mogamulizumab in adult T-cell leukemia/lymphoma in clinical practice. 第79回日本血液学会学術集会, 2017/10/22, 東京都

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：該当なし
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：該当なし
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下田 晴子 (SHIMODA, Haruko)
宮崎大学・医学部・医員
研究者番号：10452921

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし