

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461562

研究課題名(和文) 小型・正常大の血小板を有する先天性血小板減少症の原因遺伝子と分子病態に関する研究

研究課題名(英文) Responsible genes and molecular pathogenesis of inherited thrombocytopenia with small or normal-sized platelets

研究代表者

笹原 洋二 (SASAHARA, Yoji)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：60372314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：小児期の血小板減少症には、特発性血小板減少性紫斑病(以下ITP)に加えて、遺伝子変異を原因とする先天性血小板減少症がある。本研究では、研究代表者のこれまでのWiskott-Aldrich症候群に関する研究成果を基盤として、小型および正常大の血小板を有する慢性かつ難治性ITPおよび家族歴を有する血小板減少症症例を解析対象とし、先天性血小板減少症の既知遺伝子の迅速な遺伝子診断系を確立した。また、エクソーム解析により、本邦3症例においてMECOM遺伝子異常による新規病型を発見し、世界に先駆けて論文報告を行った。更に全体を通して遺伝子診断結果を主治医へ報告し、臨床への迅速な還元を行った。

研究成果の概要(英文)：Thrombocytopenia in childhood includes inherited thrombocytopenia caused by gene mutations, in addition to non-inherited immune thrombocytopenia. Based on my basic research for Wiskott-Aldrich syndrome, I established rapid mutation analysis system for known responsible genes for inherited thrombocytopenia with small or normal-sized platelets. I also identified novel responsible gene, MECOM gene, for newly identified disease entity in three patients by exome analysis, and reported as an article worldwide. In addition, I reported the results of gene analysis to the doctors and contributed to clinical rapid diagnosis and concise management for patients with inherited thrombocytopenia with small or normal-sized platelets.

研究分野：小児科学、小児血液・腫瘍学、原発性免疫不全症

キーワード：遺伝子 シグナル伝達 血液学 トランスレーショナルリサーチ

## 1. 研究開始当初の背景

小児期の血小板減少症として最も頻度が高いのは特発性血小板減少性紫斑病(以下ITP)であるが、他に先天的な遺伝子変異を原因とする先天性血小板減少症が存在する。しかしその診断系が未だ確立されていないために、未診断のまま不適切な治療を受けている症例もあると予想される。慢性かつ難治性ITP症例あるいは家族歴のある症例の中に、先天性血小板減少症症例が含まれている可能性がある。ITPとの鑑別診断と適切な治療方針選択のためには、遺伝子診断による確定診断法の確立が重要である。これまでは一部の限られた研究機関において、限られた先天性血小板減少症についてのみ確定診断が可能であった。

研究代表者は、これまで長期間に渡り、WASP異常症である小型血小板を有するWiskott-Aldrich症候群(WAS)およびX連鎖性血小板減少症(XLT)の迅速診断系を確立し、特にWASの分子病態の研究を継続し、筆頭著者として多くの論文報告を行ってきた。特に、WASP-interacting protein(WIP)のWASP異常症における機能解析は本邦では唯一の業績を残している。

## 2. 研究の目的

本研究では、研究代表者のこれまでのWASP、WIP関連の研究体制を基盤として、ITPとの鑑別診断が必要な小型および正常大サイズの血小板を有する先天性血小板減少症の迅速診断系と分子病態の研究、新規原因遺伝子の発見に発展させ、広く臨床に還元することを目的としている。具体的に以下の3項目を目的とした。

(1)小型および正常大血小板を有する先天性血小板減少症における既知原因遺伝子の遺伝子診断および迅速スクリーニング法の確立

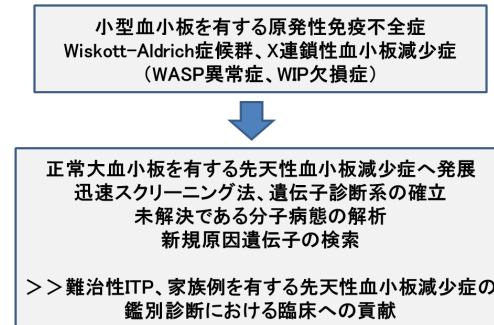
(2)既知原因遺伝子が正常である症例を対象とした、アレイCGH法およびエクソーム解析

を用いた新規原因遺伝子の検索とその機能解析

(3)遺伝子解析結果の臨床への還元

図1に本研究の学術的背景と目的をまとめた。

図1. 本研究計画の学術的背景



## 3. 研究の方法

(1)小型および正常大血小板を有する先天性血小板減少症における既知原因遺伝子の遺伝子診断および迅速スクリーニング法の確立

既知遺伝子として、WAS, WIPF1, MPL, HOXA11, RBM8A, RUNX1, ANKRD26, CYCS 遺伝子を選定し、それぞれにおける遺伝子解析システムを構築した。

(2)既知原因遺伝子が正常である症例を対象とした、アレイCGH法およびエクソーム解析を用いた新規原因遺伝子の検索とその機能解析

既知遺伝子に有意な変異が同定できない症例を対象として、当研究室にて既に解析可能なアレイCGH法およびエクソーム解析を用いて、新規遺伝子変異の検索を行った。同様の臨床所見があり、2家系以上に共通する同一遺伝子の変異があるかを検討した。橈骨尺骨癒合を伴う血小板減少症例の中で、HOXA11およびRBM8A遺伝子に変異を認めない症例が本邦で3例存在し、いずれも乳児期に血小板減少症から汎血球減少症へ病態が移行し、同種造血幹細胞移植を必要とした症例であり、巨核球系のみならず造血幹細胞レベルでの造血障害が示唆される症例であった。代諾

者への説明と同意のもと、臨床検体を収集し、アレイ CGH 法とエクソーム解析を行って、新規原因遺伝子変異の検索を行った。2 症例以上に共通し、かつ機能的に重要なドメインに新規遺伝子変異が同定されれば、原因遺伝子である可能性が高いと判断できる。次に野生型あるいは変異遺伝子を線維芽細胞に導入し、標的遺伝子の転写活性をルシフェラーゼアッセイにて比較するなどの機能解析を行い、この新規原因遺伝子が造血幹細胞の恒常的維持や血小板産生に重要な機能を持っている遺伝子かどうかを検証した。

### (3) 遺伝子解析結果の臨床への還元

解析した全症例において、遺伝子解析結果を速やかに主治医に報告し、臨床への還元を図った。

## 4. 研究成果

(1) 小型および正常大血小板を有する先天性血小板減少症における既知原因遺伝子の遺伝子診断および迅速スクリーニング法の確立

既に総説として小児血液・がん学会雑誌に発表し、同学会血小板委員会として診断アルゴリズムを学会ホームページに掲載しており、診断コンサルト先として当研究室を推奨しているため、全国から解析対象症例が集積された。研究期間内で 35 症例の解析を行い、WAS 異常症を 3 例、MPL 異常症を 1 例、RUNX1 異常症を 5 例、ANKRD26 異常症を 3 例において遺伝子異常を同定し、確定診断を行うことができ、2015 年時点での解析結果を英文論文として報告した (Pediatr. Blood Cancer, 2015)。

(2) 既知原因遺伝子が正常である症例を対象とした、アレイ CGH 法およびエクソーム解析を用いた新規原因遺伝子の検索とその機能解析

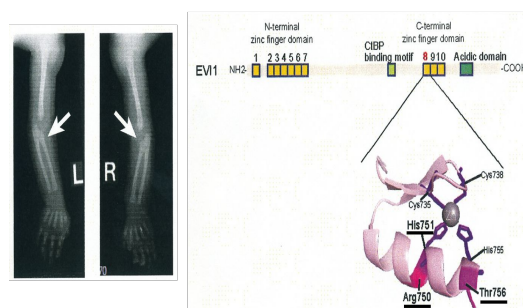
これまで橈骨尺骨癒合の骨格異常を伴いながら、既知原因遺伝子として報告されていた HOXA11 および RBM8A 遺伝子に変異を認め

ない国内症例 3 症例において、HiSeq 2000 法によるエクソーム解析を行い、その病因为 EVI-1 蛋白をコードする MECOM 遺伝子異常であることを新たに発見し、世界に先駆けて論文発表を行った (Am. J. Hum. Genet., 2015)。

この 3 症例は、乳児期に血小板減少症から汎血球減少症へ病態が進行し、早期に同種造血幹細胞移植を必要とした症例であり、巨核球系のみならず造血幹細胞レベルでの造血障害が示唆される症例である。3 症例とも変異部位が MECOM 遺伝子の 2nd zinc finger domain に集中していたため、この領域は機能的に重要なドメインであると考えられた。次に野生型あるいは変異遺伝子を線維芽細胞に導入し、標的遺伝子の転写活性をルシフェラーゼアッセイにて機能喪失型変異であることを明らかにした。

図 2 にこの成果の概要を図示した。

図 2. 新規原因遺伝子 EVI-1 の変異による遺伝性血小板減少症の発見



(3) 遺伝子解析結果の臨床への還元

遺伝子解析を行った全症例において、変異の有無に関わらず全ての症例に対して遺伝子解析結果を速やかに主治医に報告した。これにより、ITP の治療は行わない方針とした症例や、造血幹細胞移植の方針となった症例が存在しており、臨床へ広く還元することができた。

## 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 14 件)

1. 笹原洋二. 総説：単一血球減少と小児がんを合併する原発性免疫不全症. 日本小

- 児血液・がん学会雑誌, 54(2), 101-105, 2017. 査読無. オープンアクセスなし.
2. 笹原洋二. TAR 症候群 (thrombocytopenia with absent radius 症候群). 小児科診療, 第 79 巻増刊号 小児の症候群, 191, 2016. 査読無. オープンアクセスなし.
  3. 笹原洋二. 血小板減少症 遺伝性血小板減少症. 小児内科, 48 巻 7 号 特集: 血球の増加と減少, 1026 -1031, 2016. 査読無. オープンアクセスなし.
  4. 笹原洋二. Wiskott-Aldrich 症候群の分子病態に関する研究. 東北医学雑誌, 128:52-53, 2016. 査読無. オープンアクセスなし.
  5. 笹原洋二. WIP 欠損症. 日本臨床, 免疫症候群, 183-186, 2016. 査読無. オープンアクセスなし.
  6. 笹原洋二. Wiskott-Aldrich 症候群. 日本臨床, 免疫症候群, 179-182, 2016. 査読無. オープンアクセスなし.
  7. Sasahara Y. The WASP-WIP complex in the molecular pathogenesis of Wiskott-Aldrich syndrome. *Pediatr. Int.* 58(1):4-7, 2016. 査読有. DOI:10.1111/ped.12819
  8. 笹原洋二. 総説: ITP と鑑別が必要な小型・正常大の血小板を有する遺伝性血小板減少症. 日本小児血液・がん学会雑誌, 52(3), 311-316, 2015. 査読無. オープンアクセスなし.
  9. Niihori T, Ouchi-Uchiyama M, Sasahara Y, Kaneko T, Hashii Y, Irie M, Sato A, Saitoh-Nanjyo Y, Funayama R, Nagashima T, Inoue S, Nakayama K, Ozono K, Kure S, Matsubara Y, Imaizumi M, Aoki Y. Mutation in MECOM, encoding oncoprotein EVI1, cause amegakaryocytic thrombocytopenia with radioulnar synostosis. *Am. J. Hum. Genet.*, 97(6):848-854, 2015. 査読有. DOI:10.1016/j.ajhg.2015.10.010
  10. Ouchi-Uchiyama M, Sasahara Y, Kikuchi A, Goi K, Nakane T, Ikeno M, Noguchi Y, Uike N, Miyajima Y, Matsubara K, Koh K, Sugita K, Imaizumi M, Kure S. Analyses of genetic and clinical parameters for screening patients with inherited thrombocytopenia with small or normal-sized platelets. *Pediatr. Blood Cancer*, 62(12), 2082-2088, 2015. 査読有. DOI:10.1002/pbc.25668
  11. 笹原洋二. 総説: 先天性血小板減少症の診断と分子病態. 小児科, 55(1):105-114, 2014. 査読無. オープンアクセスなし.
  12. Izumi R, Niihori T, Suzuki N, Sasahara Y, Nishiyama A, Nishiyama S, Endo K, Kato M, Warita H, Konno H, Tateyama M, Nagashima T, Funayama R, Nakayama K, Kure S, Matsubara Y, Aoki Y, Aoki M. GNE myopathy associated with congenital thrombocytopenia: a report of two siblings. *Neuromuscul. Disord.*, 24(12), 1068-1072, 2014. 査読有. DOI:10.1016/j.nmd.2014.07.008
  13. Ramesh N, Massaad MJ, Kumar L, Suresh K, Sasahara Y, Anton I, Bhasin M, Libermann T, Geha RS. Binding of WASP/N-WASP interacting protein WIP to actin regulates focal adhesion assembly and adhesion. *Mol. Cell. Biol.*, 34(14):2600-2610, 2014. 査読有. DOI:10.1128/MCB.00017-14
  14. Looi CY, Sasahara Y, Watanabe Y, Satoh M, Hakozaiki I, Du W, Uchiyama T, Kumaki S, Kure S, Tsuchiya S. Open conformation of WASP regulates its nuclear localization and gene transcription in myeloid cells. *Int.*

Immunol., 26(6): 341-352, 2014. 査読有. DOI:10.1093/intimm/dxt072

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 笹原洋二. シンポジウム:小児血液疾患のゲノム医療への新展開 原発性免疫不全症におけるゲノム医療の新展開. 第79回日本血液学会学術集会, 2017年.
2. 小澤麻紀, 笹原洋二, 相場節也. 特発性血小板減少性紫斑病を合併し血清 TARC値が低値であったアトピー性皮膚炎の1例. 第116回日本皮膚科学会総会, 2017年.
3. 笹原洋二. 招待講演:ITPと鑑別が必要な原発性免疫不全症と遺伝性血小板減少症. 第1回道北免疫不全症講演会, 2016年.
4. 笹原洋二, 内山芽里, 三浦佐和子, 相原悠, 鈴木資, 渡辺祐子, 入江正寛, 新妻秀剛, 力石健, 呉繁夫. 当科で診断した遺伝性血小板減少症とその分子病態. 第9回東北小児血液疾患研究会, 2016年.
5. 笹原洋二. シンポジウム:造血障害を伴う先天性免疫不全症 単一血球減少と免疫不全症. 第58回日本小児血液・がん学会学術集会, 2016年.
6. 笹原洋二, 内山芽里, 今泉益栄, 呉繁夫. Plenary session: 小型・正常大の血小板を有する先天性血小板減少症の臨床的および遺伝学的解析. 第57回日本小児血液・がん学会学術集会, 2015年.
7. 笹原洋二. 招待講演:ITPと鑑別が必要な小型・正常大の血小板を有する先天性血小板減少症. 第23回日本小児ITP研究会, 2015年.
8. Sasahara Y. Invited lecture: Hematopoietic stem cell transplantation for primary immunodeficiency and inborn errors of metabolism: a Japanese multicenter study. 2015 National CME Program,

Pediatric Hematology and Oncology Precision Therapy Forum, Children's Hospital of Fudan University, Shanghai, China, 2015.

9. 笹原洋二. 特別講演:ITPと鑑別が必要な先天性血小板減少症・免疫不全症. 第1回山形血液研究会, 2015年.
10. 笹原洋二. 特別講演:ITPと鑑別が必要な先天性血小板減少症・免疫不全症. 第15回若葉小児科臨床研究会, 2015年.
11. Sasahara Y, Looi CY, Kure S. Functional analysis of constitutively activating mutations of WASP in myeloid cells. 11<sup>th</sup> Asian Society for Pediatric Research, 2015.
12. 笹原洋二. 教育講演:ITPと鑑別が必要な血小板疾患. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 2014年.
13. Sasahara Y, Watanabe Y, Kure S, Massaad MJ, Ramesh N, Geha RS. T cell receptor ligation causes Wiskott-Aldrich syndrome protein degradation and F-actin assembly downregulation in T cells. 16<sup>th</sup> Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies, 2014.

〔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〕  
なし。

6. 研究組織

(1)研究代表者

笹原 洋二 (SASAHARA YOJI)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号: 60372314

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
なし