

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860725

研究課題名(和文) MYH9異常症の原因遺伝子であるR702C変異による赤血球分化阻害のメカニズム

研究課題名(英文) The mechanism of erythroid lineage caused by Myh9 R702C mutation

## 研究代表者

鈴木 伸明 (Suzuki, Nobuaki)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70637686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：血球特異的にMyh9 R702C変異を組み込んだマウスを作製することにより、非筋性myosinIIAが赤血球系に与える影響を検討した。その結果、野生型マウスと比較して、貧血傾向であることが認められ、エリスロポエチンも高い傾向にあった。赤血球分化についての検討や、赤血球の性質についてもいくつかの実験を行ったが、今回行った検討では貧血傾向になる原因について特定には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：We generated hematopoietic stem cell(HSC)-specific Myh9 R702C mice, and estimated red blood cells (RBCs) and cells of the erythroid lineage. HSC-specific Myh9 R702C mice displayed mild anemia and high erythropoietin level compared with wild type mice. However, we could not find no difference in the character of RBC and differentiation of erythroid lineage compared with wild type mice in this research.

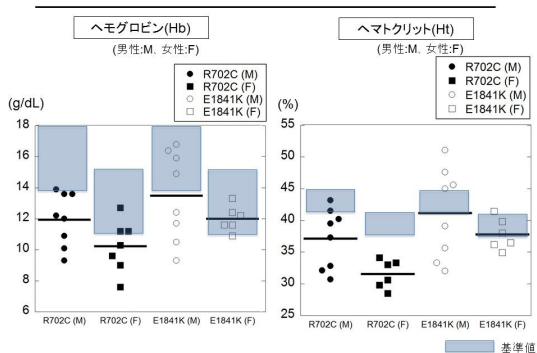
研究分野：血液学

キーワード：MYH9 赤血球

1. 研究開始当初の背景

メイ-ヘグリン異常に代表される *MYH9* 異常症は常染色体優性遺伝の疾患であり、巨大血小板、血小板減少、顆粒球封入体を臨床的特徴とし、症例によっては巣状系球体硬化症による腎症や感音性難聴、さらには白内障といったアルポート症状を合併する。申請者らのグループは、この疾患の原因が非筋ミオシン重鎖 IIA をコードする *MYH9* 遺伝子異常であることを突き止め、報告した (Kunishima et al. Blood 2001)。非筋ミオシン重鎖 IIA は血液細胞全般に発現し、白血球においては顆粒球の細胞質に異常ミオシンの凝集塊からなる封入体を形成する。血小板においては巨大血小板減少症を呈することが知られているが、今までに赤血球系細胞についての検討はなされてこなかった。しかし、蓄積した *MYH9* 異常症のデータを解析したところ、*MYH9* 異常症は全体的に貧血傾向を示し、特に R702C 変異による症例においては、ほかの遺伝子異常に比較して、ヘモグロビン(Hb)値とヘマトクリット(Ht)値が低い傾向にあった(図1)。

図1 *MYH9*異常症におけるヘモグロビン値とヘマトクリット値



申請者らは最近の研究において R702C 変異を持つノックインマウスを作製し、このマウスがヒト *MYH9* 異常症の表現型を忠実に再現することを報告しており、*MYH9* 異常症の病態解析を進めやすい環境にあった (Suzuki et al. Plos one 2013)。ヒトでの解析においては腎症から生じる腎性貧血の存在が、赤血球系の検討をする障害となるが、マウスモデルにおいては腎機能障害が進行する前に検討する。あるいは遺伝子操作を行い、血液系細胞のみに *Myh9* R702C を発現させることが可能であるため、このマウスを用いて *Myh9* R702C が赤血球系細胞に与える影響について検討した。

2. 研究の目的

本研究では、当グループで作製したマウスモデルを用いて赤血球系細胞の検討を行い、非筋ミオシン重鎖 IIA の異常が赤血球造血に与える影響を明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

(1) R702C ノックインマウス (*MYH9* 異常症モデルマウス) の供給。当初は全身性に R702C 変異を発現したマウスを使用する予定であ

ったが、合併する腎症からくる腎性貧血の影響を避けるため、Vav1-Cre マウスとの交配を行い、造血幹細胞に特異的に *Myh9* R702C を発現させ、検討を行うこととした。

(2) 末梢血所見の検討

EDTA 採血管に血液を採取し、計測を行う。評価項目は RBC 数、Hb、Ht、MCV、MCHC、網状赤血球数である。またメイ-ギムザ染色によるスミア作成を行い、肉眼的検鏡による評価を行う。脱核に異常がある場合、有核赤血球が見られることが知られており、スミアにより有核赤血球の確認をする。

(3) エリスロポエチンの測定 *MYH9* 異常症モデルマウスは腎障害を来すマウスであるため、腎性貧血ではないことをエリスロポエチンの測定によって確認する。この測定には Mouse Erythropoietin Immunoassay キット (R & D Systems) を使用し、Enzyme-linked immunosorbent (ELISA) 法を行うことにより測定する。

(4) マウス胎児肝細胞を用いた赤血球分化の評価 (図2)

マウス胎児の肝細胞は胎生 14 日目あたりではほとんどが赤芽球系細胞であるため、この細胞をエリスロポエチン添加にて培養し、赤血球に分化させ、その過程を評価する方法である。この実験方法は赤血球分化を経時的に観察できる実験モデルであり、マウスを用いた赤血球分化の実験手法として広く行われている。

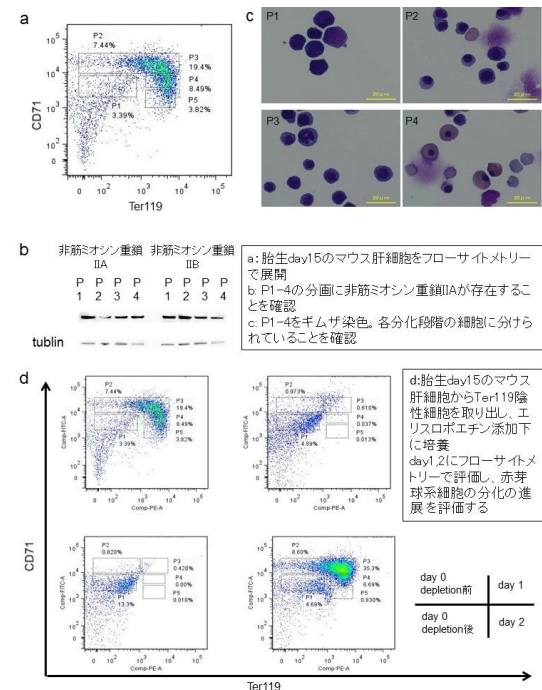


図2 マウス胎児肝細胞をエリスロポエチン下に培養し、赤芽球系細胞の分化を評価

(5) 骨髄細胞を用いた赤血球分化の評価

マウスの骨髄細胞から磁気細胞分離法により赤芽球系細胞を分離し、その後、フローサイトメトリーにより、各成熟段階の細胞数 (比率) を計測するという手法である。

#### 4. 研究成果

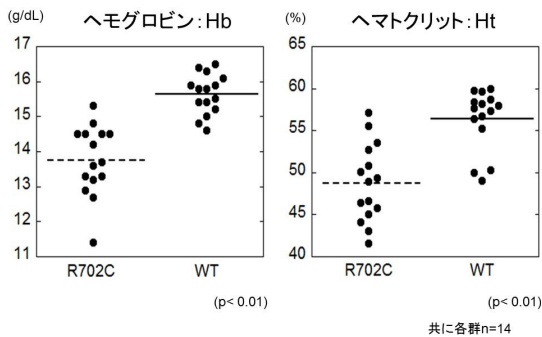
Vav1-Cre との交配により、生まれたマウスについて、皮膚組織と血液の両方で遺伝子確認を行ったところ、血液にのみ R702C が発現していることが確認された。また表現型解析として、尿たんぱくを測定したが、Vav1-Cre と交配して生まれた R702C マウスは全身性に R702C を発現するマウスで見られたタンパク尿は見られなかった一方で、血小板の減少と巨大化が確認され、血液については R702C 変異による表現型が出ていることが確認された。

##### ・末梢血所見

血球測定の結果、Hb、Ht において、R702C マウスは低下傾向となることが示された(図 3)。しかしながら、網状赤血球の上昇は認められず、追加実験で行ったパーパート法による溶血実験でも赤血球膜の脆弱性を示唆する所見は得られなかった。

一方、エリスロポエチンの値は全体的に高値を示し、貧血に対する代償性の反応であると考えられた。これらの末梢血を用いた解析により、R702C マウスは貧血傾向を示すものの、その原因は赤芽球系細胞の最終産物である赤血球ではないと考えられ、エリスロポエチンが上昇している割に網状赤血球が増加していない点から、骨髄での造血機構に原因があるのではないかと考えられた。

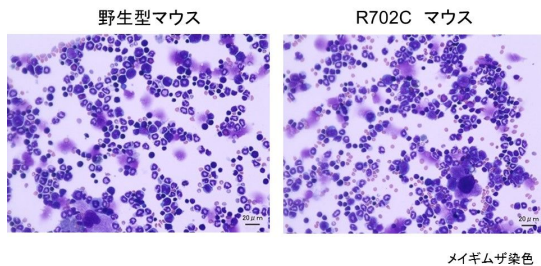
図3 R702C マウスは野生型と比較して貧血傾向



##### ・骨髄・脾細胞の検討

まずは骨髄細胞をメイギムザ染色にて染色し、県境を行った。しかしながら、明らかな赤芽球系細胞の異常を指摘することは出来なかった(図 4)。

図4 骨髄細胞



メイギムザ染色

そこでフローサイトメーターを用いて評価したところ、変異型マウスでは若い赤芽球系細胞の減少がみられた(図 5)。

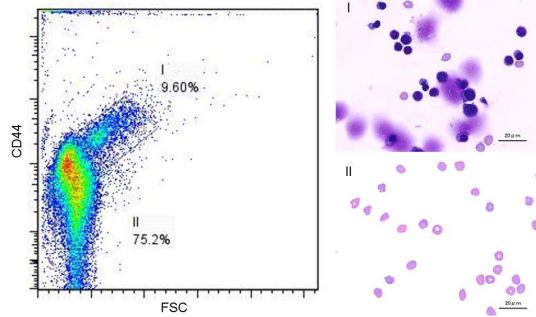


図5 マウス骨髄のフローサイトメリーによる解析

骨髄からCD45陰性細胞(赤血球系細胞)を採取して解析  
I分画が幼若な細胞、II分画が成熟した赤血球細胞である。R702CマウスではII分画の細胞が減少している個体が見られた

同時に脾臓細胞での解析では Ter119, CD71 の両方が陽性の細胞が多くみられ、これらは赤芽球系の細胞であると考えられるため、髄外造血の亢進が疑われた(図 6)。

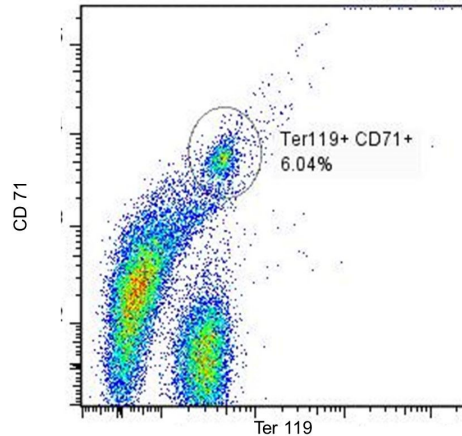


図6 フローサイトメリーによる脾細胞の解析

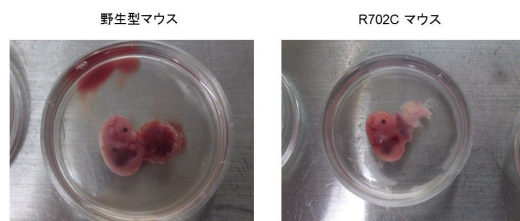
Ter119+かつCD71+の細胞が赤血球系細胞である  
02Cマウスではこの分画の細胞が増加しており、髄外造血が亢進していると考えられた

この二つの所見から貧血傾向となる原因は、骨髄での赤芽球系細胞の文化異常の可能性が示唆された。

##### ・胎児肝細胞を用いた赤芽球系細胞の分化機能評価

胎生 14 日目の胎児を取り出し、検討を行った。高度な貧血がある場合は胎児の外観から、肝臓を見ると正常な場合に比較して、白色に

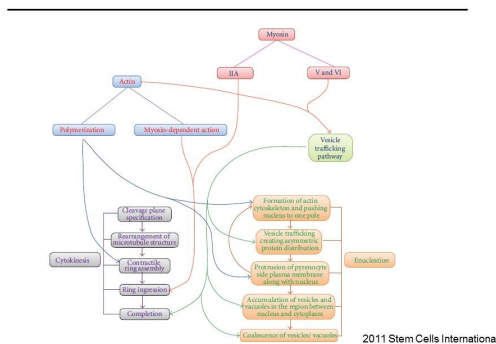
図7 マウス胎生14.5日目



見えるため、評価が可能である、しかしながら、胎生 14 日目の R702C マウスは外観上野生型マウスと比較して大きな違いを認めなかった(図 7)。

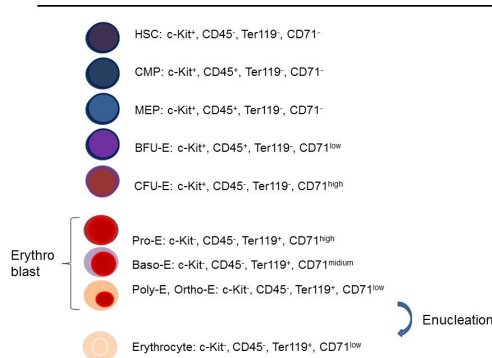
次に胎児の肝細胞を取り出し、エリスロポエチンの添加下に培養し、赤芽球系細胞の分化能を評価したが、今回行った実験では野生型マウスと変異型マウスとの間に赤芽球系細胞の明らかな分化上の違いは見られなかった。この結果から考えるに、おそらくはこのアッセイ系で評価できる段階よりも、もっと上流である分化段階での異常が考えられた。以上までの検討から、MYH9 異常症を引き起こす異常ミオシン IIA は最終産物の赤血球や脱核には大きな影響を与えないと考えられた。これまでの報告からは非筋性のミオシン IIA は細胞質分離に大きな役割を果たすことが知られている(図 8)。

図8 ミオシンIIAと脱核、細胞質分離



胎児の肝細胞を用いた実験の結果には、まだ検討の余地があると考えられるが、今回の結果が正しいとすると、赤芽球系細胞以降では分化異常はないと考えられ、MYH9 異常症において貧血傾向となる原因は骨髓球系共通前駆細胞(CMP)や巨核球・赤芽球系共通前駆細胞(MEP)といった分化段階での細胞質分離異常により、もたらされる可能性が考えられた(図 9)。

図9 赤芽球系細胞の分化過程



<引用文献>

1. Kunishima S, Kojima T, Matsushita T, Tanaka T, Tsurusawa M, Furukawa Y, Nakamura Y, Okamura T, Amemiya N, Nakayama

T, Kamiya T, Saito H. Blood. 2001 Feb 15;97(4):1147-9. Mutations in the NMMHC-A gene cause autosomal dominant macrothrombocytopenia with leukocyte inclusions(May-Hegglin anomaly/Sebastian syndrome).

2. Suzuki N, Kunishima S, Ikejiri M, Maruyama S, Sone M, Takagi A, Ikawa M, Okabe M, Kojima T, Saito H, Naoe T, Matsushita T. Establishment of Mouse Model of MYH9 Disorders: Heterozygous R702C Mutation Provokes Macrothrombocytopenia with Leukocyte Inclusion Bodies, Renal Glomerulosclerosis and Hearing Disability.

PLoS One. 2013 Aug 20;8(8):e71187.

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 1 件) Kanematsu T, Suzuki N, Yoshida T, Kishimoto M, Aoki T, Ogawa M, Kagami Y, Kiyoi H, Matsushita T, Kunishima S. A case of MYH9 disorders caused by a novel mutation (p.K74E). Ann Hematol. (査読あり) 2016 Jan;95 (1):161-3. doi: 10.1007/s00277-015-2506-9. (Corresponding author)

[学会発表](計 3 件) 兼松毅、鈴木伸明、小川実加、岸本磨由子、國島伸治、松下正 末期腎不全の経過中、家族歴を有する巨大血小板減少症に気付かれ、新規 p.K74E 変異による MYH9 異常症と診断した 1 例 第 16 回日本検査血液学会学術集会 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市) 2015 年 7 月 11-12 日

Takeshi Kanematsu, Nobuaki Suzuki, Mayuko Kishimoto, Tomohiro Aoki, Mika Ogawa, Yoshitoyo Kagami, Shinji Kunishima, Hitoshi Kiyoi, Tadashi Matsushita A case of MYH9 disorders caused by a novel mutation (p.K74E). Internal Society Thrombosis and Haemostasis 2015 congress 2015 年 6 月 20-25 日 トロント(カナダ)

兼松毅、鈴木伸明、小川実加、岸本磨由子、國島伸治、松下正 新規変異を有する MYH9 異常症の 1 例 第 37 回日本血栓止血学会学術集会 甲府市総合市民会館(山形県甲府市)

2015年5月21-23日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 伸明 ( SUZUKI, Nobuaki )

名古屋大学医学部附属病院・助教

研究者番号：70637686

(2) 研究分担者

なし