

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860780

研究課題名(和文)WASP異常症及び新規常染色体劣勢WASの分子病態と迅速診断法に関する研究

研究課題名(英文)The open conformation of WASP regulates its nuclear localization and gene transcription in myeloid cells

研究代表者

渡辺 祐子(WATANABE, YUKO)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：40610671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：X染色体連鎖性好中球減少症は、WASP恒常的活性化変異型WASP遺伝子(L270P)発現ベクターを骨髄球系細胞株に恒常的発現し作成した。活性化変異WASPが細胞核内に強発現し、WASPチロシンリン酸化と活性化していた。この遺伝子導入細胞株の抽出RNAは、Protein tyrosine phosphatase受容体c/CD45高発現、G-CSF受容体、Runx1低発現あり、骨髄球細胞分化と生存に重要な遺伝子群発現変化をみれた。Genomic DNAクロマチン免疫沈降法と高密度タイリングアレイでは野生型WASPとL270Pでは同遺伝子座のDNA結合パターンは同様に結合親和性が異なっていた。

研究成果の概要(英文)：I showed that all reported constitutively activating mutants of WASP were hyperphosphorylated by Src family tyrosine kinases and demonstrated higher actin polymerization activities compared with wild-type WT WASP. Further analysis showed a tendency of activating WASP mutants to localize in the nucleus compared with WT WASP. ChIP assays revealed that WASP associated with DNA, although the affinity was relatively weaker than RNAP II. To determine whether gene transcription was affected by WASP mutation in myeloid cells, we performed microarray analysis and found different expression profiles between WT and L270P WASP-transfected K562 cells. Among the genes affected, G-CSF receptor, Runx1, and protein tyrosine phosphatase receptor c were included. ChIP on chip analysis of genomic DNA showed WT and L270P WASP had a highly similar DNA-binding pattern but differed in binding affinity at the same locus.

研究分野：小児免疫不全症、小児腫瘍

キーワード：WASP WIP

### 1. 研究開始当初の背景

Wiskott-Aldrich 症候群 (WAS) は、多様な免疫不全、血小板減少、湿疹を三主徴とする X 染色体連鎖性原発性免疫不全症で、WASP 遺伝子変異とその蛋白発現低下による細胞骨格系の異常が分子病態の基盤にある。

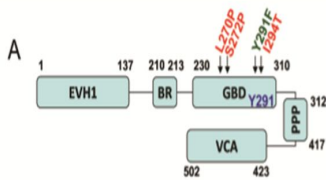
WASP-interacting protein (WIP) は WASP 結合蛋白質で、WASP 蛋白の安定性に重要な機能を果している。

### 2. 研究の目的

本研究計画は、研究代表者のこれまでの WAS に関する研究成果を基盤として、WASP 異常症および新規常染色体劣勢 WAS の分子病態の解析と、WASP interacting protein (WIP) 欠損症の迅速診断法の確立を研究目的とした。

### 3. 研究の方法

X 染色体連鎖性好中球減少症 (X-linked neutropenia: XLN) は WASP 恒常的活性化変異 (L270P) により起こる。すでに HA-tag を付加した L270P 恒常的活性化変異型 WASP、野生型 WASP 遺伝子発現ベクターを、骨髓球系細胞株 K562 に恒常的発現させ、最適な恒常的発現細胞株クローンを確認した。



この遺伝子導入細胞株より抽出した total RNA のうち、骨髓球系細胞の分化、アポトーシスに関する遺伝子群の転写に絞り、マイクロアレイ法で網羅的解析し、転写活性調整するかを、定量的 RT-PCR 法や Western Blot 法等で検証した。免疫沈降法等で WASP と転写制御に関わる分子群間の相互作用を検討し、ペプチドシークエンス法と遺伝子クローニング法で同定した。

WASP 異常症として骨髓異形成症候群 (MDS) 発症が報告されており、上記の恒常的発現細胞株を、至適最終濃度の Mitomycin C (MMC) が 6-thioguanine (6-TG) 存在下で培養後、染色体不安定性が生じるか、分子生物学的手法で検討した。

さらに、海外共同研究者である、英国 Dr. A. Thrasher より XLN/MDS 患者検体供与をうけ、分子病態やその臨床的意義を明らかにした。

常染色体劣性、Type-2 WAS としての WIP 欠損症の疾患概念を提唱するため、性別を問わず、WAS の臨床所見や経過をもち、WASP 遺伝子変異を認めない症例を、国内より検体募集する。迅速スクリーニングとして、すでに精製済みである抗 WIP モノクローナル抗体によ

る フローサイトメトリー法を用い、その至適抗体濃度などの アッセイ条件として Western Blot 法によるアッセイ系を確立する。

WIP 蛋白発現が有意に低下している症例は、遺伝子変異同定し確定診断し、WASP 蛋白質発現も確認する。

WIP 欠損症患者を発見できた場合には、詳細にその臨床経過、検査所見をまとめるとともに、免疫担当細胞の機能を検討し、常染色体劣勢 WAS である WIP 欠損症の疾患概念を確立する。これにより、X 染色体劣勢 WAS との病態相違を明らかにする。

すでに本教室では、WASP および WIP ノックアウトマウスの表現型の相違を把握しており、これを参考にヒトでの臨床所見および免疫学的所見を明らかにする。

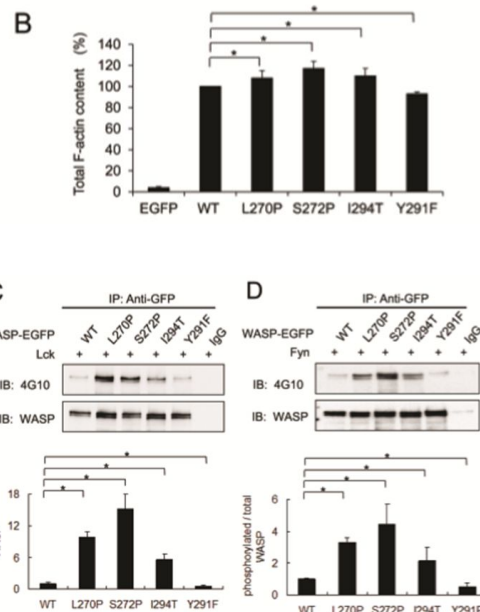
同時に広く国内より、学会発表や PID を介した検体募集を継続して行い、相手方の同意等を得たうえで研究を実施する。

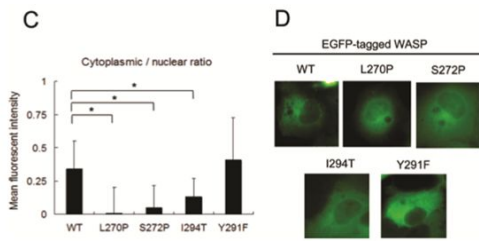
### 4. 研究成果

恒常的活性化 WASP 変異による好中球減少症と骨髓異形成症候群 (MDS) 発症の分子機構について、論文化し発表できた。(CY Looi, et al. Int Immunol 26(6):341-352. 2014)

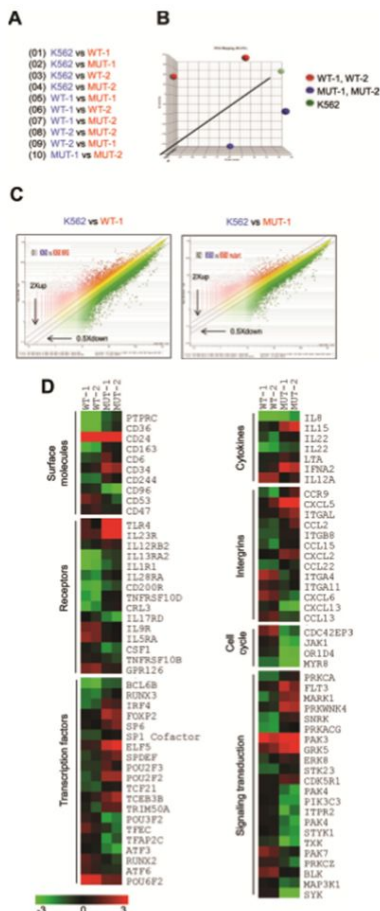
X 染色体連鎖性好中球減少症は、WASP 恒常的活性化変異 (L270P) により起こる HA-tag 付加した L270P 恒常的活性化変異型 WASP 遺伝子発現ベクターを骨髓球形質細胞株 K562 に恒常的発現させ、最適な恒常的発現細胞株クローンを選択した。

活性化変異 WASP 蛋白が細胞の核内に強発現する点、WASP チロシンリン酸化と活性化する点を確認した。



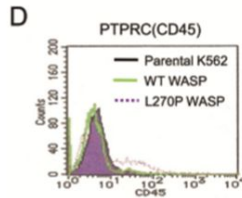
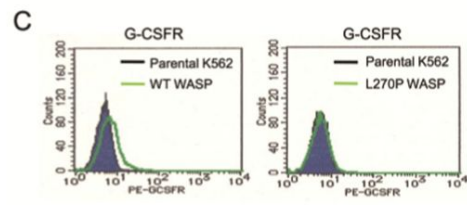
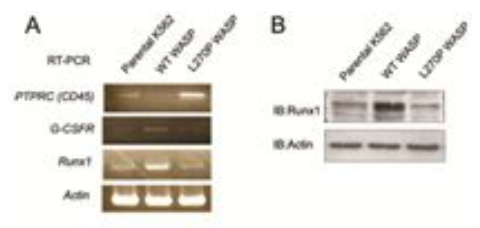


この遺伝子導入細胞株より抽出した RNA の、骨髄球形細胞の分化とアポトーシスに關与する遺伝子群の転写について、cDNA マイクロアレイ解析すると、Protein tyrosine phosphatase 受容体 c/CD45 の高発現と、G-CSF 受容体、Runx1 の低発現を確認した。

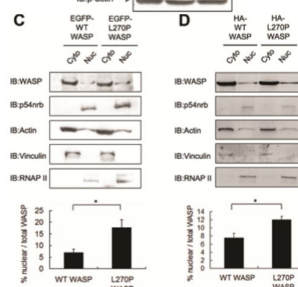
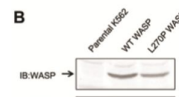
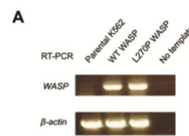
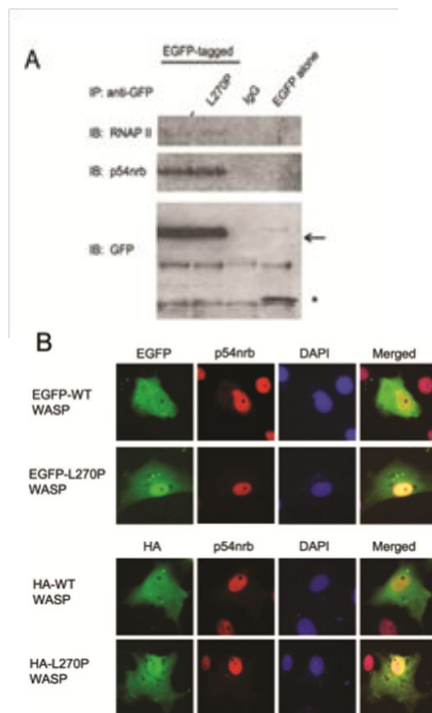


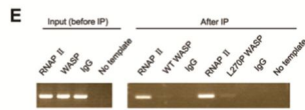
すなわち、骨髄球形細胞分化と生存に重要な遺伝子群の発現変化を発見できた。

次に、定量 RT-PCR 法と Western Blot 法で検証し、L270P においてこれら遺伝子群が真に転写活性調整を制御しているかを調べた。

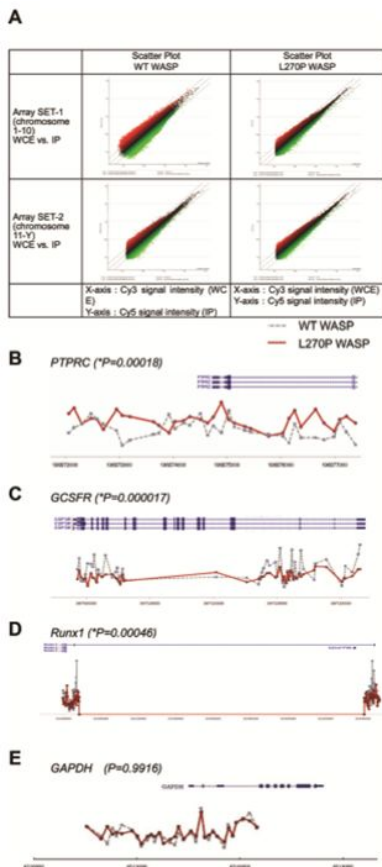


クロマチン免疫沈降法では、WASP は転写系に重要である RNA polymerase を制御する p54nrb と会合していた。また、免疫蛍光体法で細胞核内の複合体形成を確認した。





Genomic DNA のクロマチン免疫沈降法と高密度タイリングアレイの組み合わせでは、野生型 WASP と L270P では、同遺伝子座における DNA 結合パターンは同様だったが、結合性の親和性は異なっていた。



以上より、恒常的活性化 WASP 変異は、各内に位置し、骨髄球系細胞の転写遺伝子を制御しているといえた。

また、性別を問わず、WAS の臨床所見や経過をもち、WASP 遺伝子変異を認めない症例で、常染色体、Type-2 WAS としての WIP 欠損症である患者を国内外より募ったが、症例を認めなかったために、計画で述べた検討は進まなかった。

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 1 件)

The open conformation of WASP regulates its nuclear localization and gene transcription in myeloid cells  
 Chung Yeng Looi, Yoji Sasahara, Yuko Watanabe, et al. Int Immunol.

26(6):341-352.2014 (9人中3番目、査読有)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
 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：  
 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

6. 研究組織

(1)研究代表者  
渡辺 祐子 (WATANABE, YUKO)  
 東北大学・大学病院・助教  
 研究者番号：40610671

(2)研究分担者  
 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
 ( )

研究者番号：

(4)研究協力者

笹原 洋二 (SASAHARA YOJI)  
 東北大学・大学院医学系研究科・准教授  
 研究者番号：60372314