

201231083A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業

家族性血小板異常症に関する調査研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 黒川 峰夫

平成25（2013）年5月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業

家族性血小板異常症に関する調査研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 黒川 峰夫

平成25（2013）年5月

目 次

I. 総括研究報告書		
家族性血小板異常症に関する調査研究	黒川 峰夫	3
II. 分担研究報告書		
1. 家族性血小板異常症に関する調査研究	鈴木 憲史	21
2. 家族性血小板異常症に関する調査研究	臼杵 憲祐	23
3. 家族性血小板異常症に関する調査研究	高橋 強志	29
4. 家族性血小板減少症 - 責任遺伝子 Runx1 の変異解析		
	小松 則夫	31
5. RUNX1 点変異を有する家族性血小板異常症 FPD からの白血病化機序の解明		
	原田 浩徳	34
6. 家族性血小板異常症に関する調査研究	齋藤 明子	37
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		43
IV. 研究成果の刊行物・別刷		51

1. 総括研究報告書

家族性血小板異常症に関する調査研究

研究代表者 黒川 峰夫 東京大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学 教授

研究要旨

家族性血小板異常症 (familial platelet disorder, FPD) は血小板減少と出血傾向を伴い、高率に白血病に移行する難治性遺伝性疾患であり、白血病関連遺伝子 RUNX1 (AML1) の変異が病因と考えられている。当疾患については国際的にも有病率・長期予後などの実態は明らかにされてこなかったため、当調査研究においてはじめて全国 489 施設を対象にこの疾患についてのアンケート調査を実施し、60 の血小板減少家系の存在を明らかにした。また、46 家系につき詳細な経過や家族歴などの臨床情報を入手し、36 家系の遺伝子検査により、6 家系に RUNX1 遺伝子変異を認めた。さらに、このうちの 2 家系について、白血病発症前後の検体の whole exome sequence を行うことで、FPD における白血病への進展に際しての責任候補遺伝子変異を同定した。当調査研究は、臨床像や疫学・病態にわたって FPD の全容を明らかにし、的確な診断法と治療指針を確立しようとする国際的にも初めての試みである。

研究分担者

鈴木憲史・日本赤十字社医療センター血液内科部長

小松則夫・順天堂大学医学部血液内科教授

臼杵憲祐・NTT 東日本関東病院血液内科部長

原田浩徳・広島大学原爆放射線医科学研究所 ゲノム疾患治療研究部門講師

高橋強志・三井記念病院血液内科部長

齋藤明子・独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター 臨床

研究企画部 臨床疫学研究室 室長

A. 研究目的

家族性血小板異常症 (FPD) は常染色体優性遺伝形式をとり、高率に急性骨髄性白血病 (AML) や骨髄異形成症候群 (MDS) などを発症する稀な疾患である。血小板減少による出血傾向の程度には個人差が大きく、白血病を発症して初めて診断が確定することが多い。多くの場合、この白血病は通常の化学療法では治癒が望めないと考えられ、造血幹細胞移植が必要となる可能性があるが、その効果は未確定であり、標準治療は定まっていない。この疾患の本態は長い間不明であったが、

1999年に白血病関連遺伝子RUNX1の変異がFPDの家系において発見されて以降、散発的に全世界で20家系程度の報告があり、その報告数は増え続けている。また、孤発性のAMLやMDSの症例の中にRUNX1の変異も報告されており、その一部にFPDからの発症が含まれている可能性もある。血小板減少のみを認める病期においても、AMLやMDSのほか、特発性(免疫性)血小板減少性紫斑病(ITP)、May-Hegglin異常やBernard-Soulier症候群などの血小板異常症と診断されている可能性もある。的確な診断法が確立していないため、FPDは日常診療において見逃されており、そのために適切な治療・経過観察が行われていない可能性が高い。そこで、本調査研究においては、難治性で重大な結果をもたらすにもかかわらずその実態が殆ど把握されていない希少疾患であるFPDについて、家族性に血小板減少をきたす家系や血小板減少の既往をもつAMLの症例などを手掛かりに、遺伝子変異のスクリーニング、家系解析や血球数・血小板機能などのデータを集積し、その有病率や、診断基準につながる病態の把握を行う。また、研究期間内に一元的な症例登録システムを構築する。患者の臨床経過を前方視的に追跡し、白血病移行時期などこの疾患の自然史を明らかにするとともに、予後を含めた解析を行うことにより、造血幹細胞移植の適応の有無を明らかにするなど、治療方針の決定につながるデータとする。

B. 研究方法

1. 解析症例の収集

本調査研究は本邦において、あるいは世界的にも報告が極めて稀な疾患を対象としており、本研究の参加施設のみにおいて解析に十分な症例数の蓄積は見込めない。そこで、まず造血不全症候群の診療に携わる全国の主要な施設に対して広くアンケート調査を実施し、血小板減少やAMLの家族歴をもつ家系の概数を予測する調査を行った。FPDが疑われる家系については、引き続いてその遺伝形式、末梢血血算データ、血小板機能異常の有無、感染症や奇形その他の遺伝性疾患の合併の有無など、疾患の病態の把握につながる基礎データを収集する。本研究においては正確な頻度が全く把握されていない希少疾患であるFPDについて全例に近い数を把握することを目標としており、全国レベルでの調査に基づく症例収集を行った。

2. FPDの原因遺伝子変異の解析

当研究は主にRUNX1の変異に伴う家族性血小板異常症を対象としている。罹患家系についてはRUNX1の体細胞における変異を同定し、血小板減少の程度や白血病発症などの臨床経過とRUNX1変異の機能欠失の程度を比較し、変異の種類とFPDの重症度の相関についても明らかにすることを目標としている。このため、

RUNX1 変異と下流の遺伝子の変化を指標とした変異の機能解析を行う。

(倫理面への配慮)

世代間に伝わる遺伝子変異を解析する研究であるため、人権擁護上対象者に対する配慮が必要である。当研究ではヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針、疫学研究に関する倫理指針、臨床研究に関する倫理指針を遵守するとともに、事前に東京大学医学部倫理委員会の承認を得て施行した。

3. FPD における造血器腫瘍発症の責任遺伝子同定に向けた解析

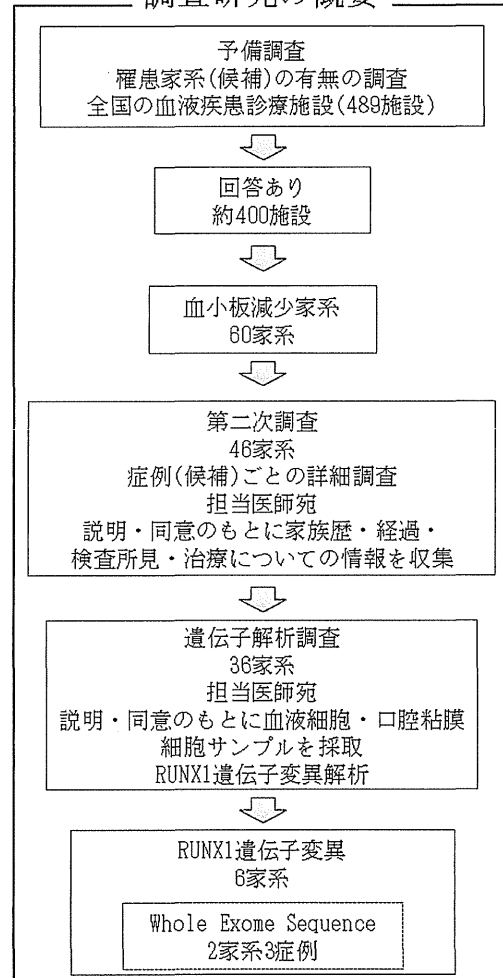
FPD 患者においては、血小板減少をきたすのみならず、様々な年齢で AML や MDS を中心とする造血器腫瘍の合併がみられることから、RUNX1 変異以外のさらなる遺伝子異常が付加されることによりこれらの腫瘍の発症が誘導されるものと考えられる。当調査により、造血器腫瘍発症前後の臨床検体が 2 家系 3 症例から入手できたことから、これらの検体を用いて全エクソシーケンス (whole exome sequence) を行い、造血器腫瘍発症の責任遺伝子の同定を試みた。

C. 研究結果

1. 解析症例の収集

当調査研究が採択された平成 22 年 8 月より調査を開始した。全国の主要な血液

調査研究の概要

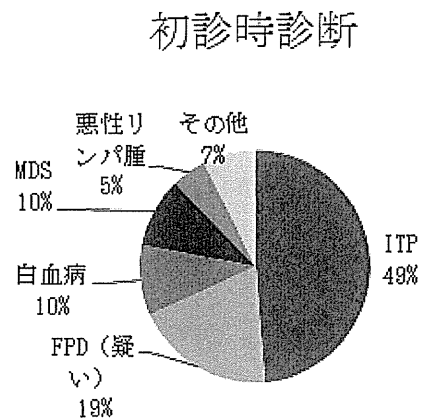
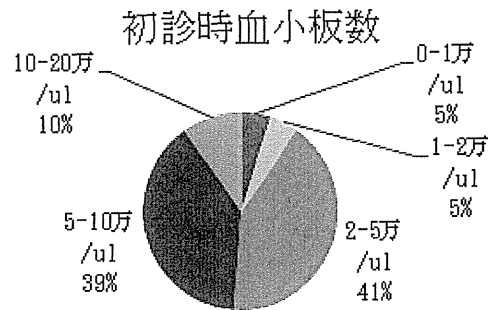
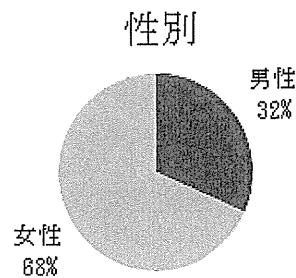
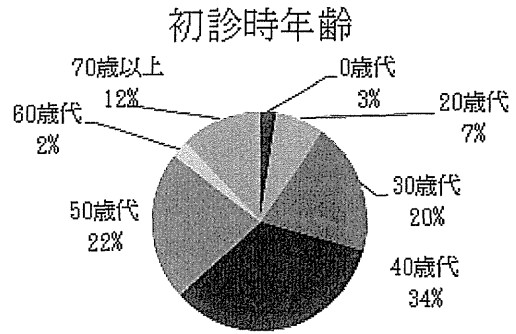


疾患診療施設 489 施設を対象に、罹患家系の抽出を目的とした予備調査を行った。FPD については疾患に対する認知が十分でなく、骨髓造血細胞の形態や血小板機能、出血傾向の程度などの臨床的特徴が知られていない。したがって、この疾患の罹患症例は特発性(免疫性)血小板減少性紫斑病 (ITP)、MDS、もしくはその他の血小板異常症と診断されている可能性がある。そのため、ITP や MDS を含め血小板減少症を伴う症例のうち、血小板減少症の家族歴を認める症例を対象としてその有無を調査した。また、血小板減少とそれに

伴う出血傾向の程度が軽度である症例については FPD と認識されずに通常の急性白血病をはじめとする造血器腫瘍と診断されている可能性がある。したがって、造血器腫瘍症例のうち血小板減少症の家族歴を認める例も調査対象とした。それぞれについて、常染色体優性遺伝が疑われる家系・家族内に白血病や他の造血器腫瘍の集積を認める家系、RUNX1 変異がすでに明らかとなっている家系の有無を調査した。

この調査により、血小板減少症の家族歴を認める家系を 60 家系抽出した。本調査研究の目的である FPD の全容解明に向けて、これらの家系に対してその詳細な臨床所見を収集し、さらに遺伝子変異同定のための検体を収集する目的で、二次調査用紙を用いた調査を行った。

その結果、46 家系 52 症例について詳細な臨床情報が入手された。これらの症例・家系で血小板減少と判定された年齢の中央値は 38 歳(0-72 歳)で、女性が約 60%であった。また、初診時の血小板数の中央値は $5.8 \times 10^4/\mu\text{l}$ ($0.1-18.7 \times 10^4/\mu\text{l}$) であり、出血症状は 11 例にみられた。初診時の診断は、ITP が最も多く 23 例(47%)、続いて造血器腫瘍 13 例(MDS 6 例、AML 3 例、急性リンパ性白血病(ALL) 2 例、悪性リンパ腫 2 例、ヘアリー細胞白血病 1 例)、FPD と診断された症例あるいは FPD が疑われた症例 9 例、その他(再生不良性貧血 1 例、May-Hegglin 異常 1 例、原因不明 1 例)であった。また、家族歴では



血小板減少のみの診断・検査結果を有する家系が 19 家系あり、その他の家系では何らかの血液疾患を指摘されていた

(AML 7 家系、ALL 3 家系、MDS 5 家系、悪性リンパ腫 1 家系、多発性骨髄腫 1 家系、詳細不明の造血器腫瘍 6 家系、ITP 2 家系)。後述する FPD 3 家系においては、AML 3 例 (MDS あるいは骨髄線維症を経て発症した症例がそれぞれ 1 例ずつ) に加えて ALL 1 例、ヘアリー細胞白血病 1 例の計 5 症例の造血器腫瘍の発症が認められた。初診時に ITP と診断された 3 例において、その 56 か月後、73 か月後、208 か月後に MDS と診断された 3 例が存在した。なお、造血器腫瘍発症例以外には輸血依存の症例は認められなかった。

2. 血小板減少の原因遺伝子変異の解析

上記の調査と並行して、遺伝子変異同定のため、ダイレクトシーケンス法による RUNX1 変異検出系を構築した。その結果、検体採取・検査に同意が得られた 36 家系 40 症例中、3 家系 5 症例に RUNX1 遺伝子変異を認めた (それぞれ、R174X、F303fsX566、L445P)。これらの変異は、いずれも皮膚あるいは口腔粘膜から採取したゲノム DNA においても同一の変異が検出され、これらの 3 家系はいずれも FPD であると考えられた。また、研究分担者の解析により、他に 3 つの FPD 家系が見出され (それぞれ G172E、G143W、S140N)、計 6 家系の FPD 家系が同定された。なお、再生不良性貧血の集積を認める家系において血液細胞から RUNX1 遺伝子変異 (M439I) が検出されたが、口腔粘膜のゲノム DNA からは同変異が検出されず、体細

胞変異と判定した。

一方、RUNX1 遺伝子変異が認められなかった症例については、巨核球の分化や機能に重要な役割を果たす遺伝子や、既知の家族性 MDS、家族性 AML の原因となるような遺伝子 (MPL、MYH9、MYL9、GATA1、GATA2、GP1BA、GP9、MASTL、HOXA11、CEBPA、CBL、DIDO1、ANKRD26) についてもダイレクトシーケンス法による遺伝子変異検出系を構築し、遺伝子変異解析を進めた。その結果、2 家系 2 症例において MYH9 遺伝子変異を認めた (それぞれ、F41L、D1424N)。MYH9 は non-muscle myosin IIA heavy chain を code する遺伝子で、その機能欠失型変異による遺伝性巨大血小板性血小板減少症は May-Hegglin 異常などと呼ばれ、血小板減少症の他に進行性腎障害や難聴を生じうる。MYH9 の変異部位は全長にわたって報告されているが、中でも D1424 は coiled-coil domain に位置し変異好発部位の 1 つで、その変異蛋白は coiled-coil の構造や二量体化に問題が生じることが報告されている。F41L は globular head domain の変異であり、既報はない。知られている globular head domain の変異蛋白については、ATPase 活性やアクチンフィラメント上の移動に障害が生じることが報告されている。

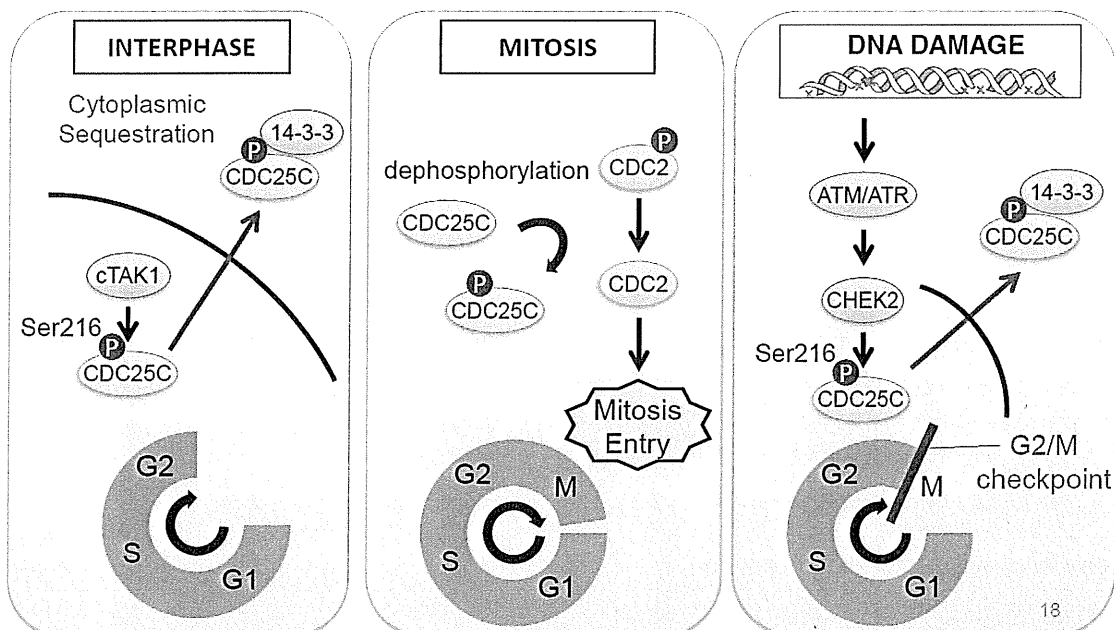
3. FPD における造血器腫瘍発症の責任遺伝子変異同定

FPD 症例においては高率に AML をはじめとする造血器腫瘍を合併するといわれており、その腫瘍発症のメカニズムの解明は FPD/AML に対する治療法の開発に向けて大変重要な意義がある。そこで本研究では、AML 発症前後の検体を入手可能であった 2 家系 3 症例について whole exome sequence を行うことで、白血病発症の際に生じた遺伝子変異を同定する試みを行った。特にそのうちの 1 家系では 1 症例目 (Pt1) は MDS を経て AML を、2 症例目 (Pt2) は骨髄線維症 (MF) を経て AML を発症していた。それぞれの症例の MDS と AML、MF と AML の時点での遺伝子変異を調べた。その結果、表 (次ページ) に示

すような複数の遺伝子変異が Sanger 法による sequence により確認された。このうち CDC25C 遺伝子変異は Pt1 と Pt2 に共通して認められた上に (D234G)、他の FPD から AML を発症した症例においても遺伝子変異 (H437N) が認められ、さらには de novo の MDS 患者 91 名のゲノム DNA をスクリーニングした結果、1 例に CDC25C 遺伝子変異 (A344V) を認めたことから、同遺伝子の変異体の機能について注目した。

CDC25C は細胞周期、特に mitosis entry を制御し、また DNA 損傷応答にも関わる遺伝子である (下図)。細胞周期の間期には CDC25C は主に C-TAK1 により S216 がリン酸化され、14-3-3 と結合して細胞質へ異動するため、いわば不活性化され

The roles of CDC25C in the regulation of cell cycle and DNA damage response



Gene Symbol	RefSeq_no.	AA change	Genomic DNA change (hg19)	Base change	Mutation type	Disease status
<i>Patient 1</i>						
AGAP4	NM_133446	R484C	g.chr10:46321905	C→T	Missense	MDS, AML
CDC25C	NM_001790	D234G	g.chr5:137627720	A→G	Missense	MDS, AML
CHEK2	NM_007194	R406H	g.chr22:29091740	G→A	Missense	MDS, AML
COL9A1	NM_001851	G878V	g.chr6:70926733	G→T	Missense	MDS, AML
DTX2	NM_001102594	P74R	g.chr7:76110047	C→G	Missense	MDS, AML
FAM22G	NM_001170741	S508T	g.chr9:99700727	T→A	Missense	MDS, AML
GATA2	NM_001145661	L321H	g.chr3:128202758	T→A	Missense	AML
LPP	NM_001167671	V538M	g.chr3:188590453	G→A	Missense	AML
MSTO1	NM_018116	V8M	g.chr1:155580061	G→A	Missense	MDS, AML
RP1L1	NM_178857	1-ins	g.chr8:10480295	insC	frameshift	MDS, AML
SIGLEC9	NM_014441	S437G	g.chr19:51633253	A→G	Missense	MDS, AML
SLC27A6	NM_001017372	R479H	g.chr5:128363006	G→A	Missense	MDS, AML
<i>Patient 2</i>						
ANXA8L1	NM_001098845	V281A	g.chr10:48268018	T→C	Missense	MF, AML
CDC25C	NM_001790	D234G	g.chr5:137627720	A→G	Missense	MF, AML
DENND5A	NM_001243254	R320S	g.chr11:9215218	A→C	Missense	MF, AML
FER	NM_005246	Y634C	g.chr5:108382876	A→G	Missense	AML
FNDC1	NM_032532	R189C	g.chr6:159636081	C→T	Missense	MF, AML
KIAA2018	NM_001009899	K1523R	g.chr3:113375961	A→G	Missense	AML
OR8U1	NM_001005204	N175I	g.chr11:56143623	A→T	Missense	MF, AML
PIDD	NM_145886	R342C	g.chr11:802347	C→T	Missense	AML
SLC27A6	NM_001017372	R479H	g.chr5:128363006	G→A	Missense	MF, AML
ZNF614	NM_025040	E202G	g.chr19:52520246	A→G	Missense	MF, AML

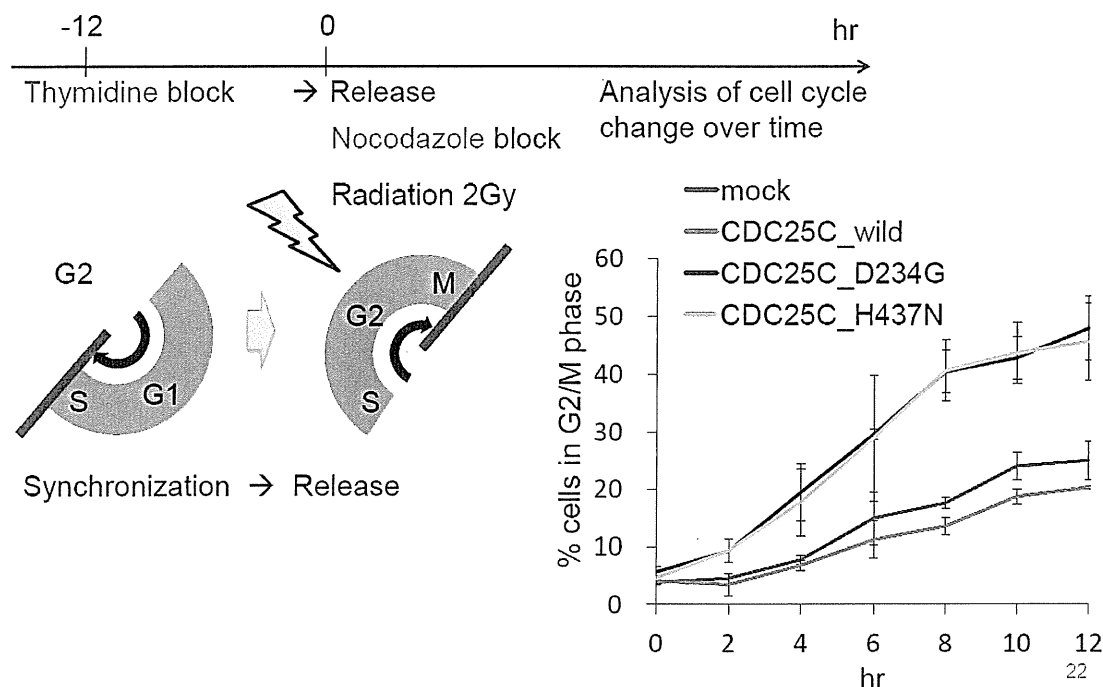
た状態にあるが、細胞分裂の際にはこのリン酸化がなくなるため核内で CDK1 を脱リン酸化して mitosis entry を促進する。DNA 損傷がある場合には CHEK1/2 が CDC25C をリン酸化して不活化することで、mitosis

entry を抑制し、DNA 損傷をもったまま細胞が分裂することを防ぐとされている。そこで、今回 FPD において同定された CDC25C 遺伝子変異 (D234G、A344V、H437N) について、それぞれの変異体を作

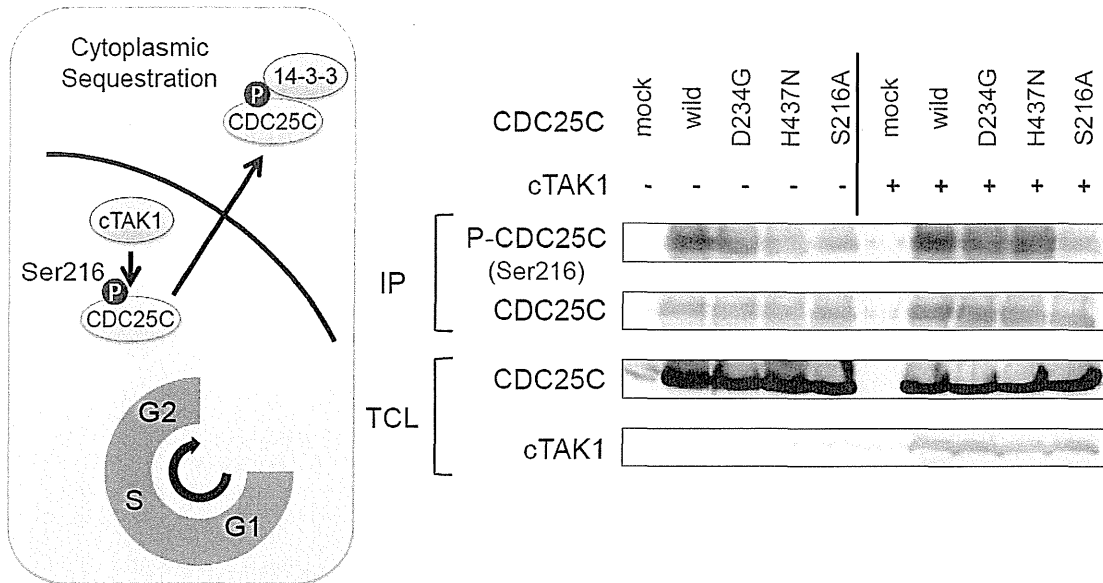
成し、Ba/F3 細胞にレトロウィルスを用いて導入した。サイミジブロックを用いてこれらの細胞の細胞周期を S 期に同期させた上で、ブロックからリリースするとともにノダゾールブロックにより細胞周期を M 期に留めたところ、上記の変異体を導入した細胞では、コントロールの細胞と比較して有意に mitosis entry が促進されることがわかった。さらにこの実験系において放射線を 2Gy 照射して細胞に DNA 損傷を与えると、この差が顕著に増大した(下図)。以上のことから、FPDあるいはMDSにおいて同定された CDC25C 変異体は定常状態あるいは DNA 損傷時の細胞周期回転を促進する働きがあり、造腫瘍効果を持つことが示唆された。これらの現象の分子メカニズムを

みるために、上記の CDC25C 遺伝子変異体を 293T 細胞に一過性に強制発現させたところ、それぞれの変異体は C-TAK1 による S216 部位のリン酸化が減弱しており(次ページ図)、また、C-TAK1 や 14-3-3 との結合が減弱されていることが確認された。つまり、CDC25C 変異体は C-TAK1 と十分に結合できないことから S216 のリン酸化が不十分となり、14-3-3 との結合不全を生じることから不活化しにくい状態となり、細胞周期を常に促進してしまうことが造血器腫瘍発症の基盤となることが推察された。

Disruption of G2/M checkpoint in CDC25C mutant cells



Reduced phosphorylation at Ser216 in CDC25C mutants



4. FPDにおける造血器腫瘍発症の clonal evolution/devolution

上記の WES 解析の結果は、FPD における腫瘍発症の過程に対する示唆を与えてくれる。ここでは Pt1 について注目する。Pt1 においては、CDC25C を含む計 12 の遺伝子の heterogenous な変異が確認されたが、MDS から AML に進展する際の各遺伝子変異のアレル頻度から、12 の遺伝子変異は下記の 4 つのグループに分類することができる。

- ①MDS のほぼすべての clone に存在する変異 (前ページ下図の Founding MDS clone)
- ②MDS の時点で一部の clone に存在し、AML ではほぼすべての clone に存在する変異 (同図の Founding AML clone)

③MDS の時点では検出されず、AML で出現する変異 (同図の Leukemia progression clone)

④MDS の時点で一部の clone に存在し、AML への進展の過程で縮小する変異 (同図の Regressed clone)

同じグループに分類された遺伝子変異は、ほぼ同じアレル頻度を MDS、AML それぞれの病期で有していた。このグループ分けをもとに、Pt1 において造血器腫瘍の発症・進展にどのような clone がどの程度存在したのかをモデル化したのが次ページ右の図になるが、図内で Founding MDS clone → Founding AML clone → GATA2 変異 → LPP 変異と遺伝子変異が集積して AML の主要 clone へと進展したものと、Founding MDS clone → Regressed clone → 遺伝子変異が集積して AML においては

細胞	CDC25C	SIGLEC9	SLC27A6	GATA2	LPP	FAM22G	COL9A1	AGAP4	MSTO1	RP1L1	DTX2	CHEK2	Clone
1	-	x	x	-	-	変異あり	x	-	-	-	x	-	1
2	変異あり	x	変異あり	変異あり	変異あり	変異あり	x	-	x	-	x	-	2
3	-	x	-	変異あり	-	変異あり	x	x	x	-	-	-	3
4	変異あり	変異あり	x	-	x	x	x	-	x	x	x	x	判定不能
5	-	-	変異あり	変異あり	-	-	-	-	x	-	x	-	2
6	変異あり	-	x	変異あり	変異あり	-	変異あり	-	x	-	x	-	3
7	変異あり	-	x	x	x	-	x	変異あり	変異あり	x	x	変異あり	4
8	-	変異あり	-	x	x	-	x	x	x	x	x	-	判定不能
9	変異あり	変異あり	x	変異あり	変異あり	x	x	-	x	x	x	-	3
10	-	-	-	-	-	-	-	-	変異あり	-	x	-	4
11	-	-	x	-	-	-	-	変異あり	x	変異あり	x	x	4
12	変異あり	-	x	-	変異あり	変異あり	x	x	x	x	x	x	2
13	変異あり	変異あり	x	-	-	x	変異あり	x	x	x	x	-	1
14	-	-	x	変異あり	-	変異あり	x	-	-	-	x	-	2
15	変異あり	-	x	-	-	-	-	変異あり	変異あり	x	x	x	4
16	変異あり	x	x	-	-	x	-	変異あり	-	変異あり	x	-	4
17	-	x	x	変異あり	-	変異あり	x	-	-	x	x	-	2
18	変異あり	x	x	変異あり	-	-	変異あり	-	-	-	x	-	2
19	変異あり	-	x	x	x	-	x	-	-	x	x	x	判定不能
20	変異あり	-	変異あり	-	-	-	-	-	変異あり	変異あり	x	x	4
21	変異あり	-	-	変異あり	-	変異あり	x	-	-	x	x	-	2
22	変異あり	x	x	-	-	x	x	x	-	x	x	-	判定不能
23	変異あり	-	-	x	x	-	x	変異あり	変異あり	-	x	x	4
24	変異あり	x	x	x	変異あり	変異あり	x	x	x	x	x	x	3
25	変異あり	-	x	-	x	x	x	x	x	変異あり	x	x	4
26	-	変異あり	x	変異あり	変異あり	変異あり	変異あり	-	-	x	x	-	3
27	-	変異あり	x	変異あり	-	-	変異あり	-	-	x	x	x	2
28	-	変異あり	x	変異あり	-	-	x	-	-	x	x	x	2
29	-	変異あり	x	-	-	x	-	変異あり	-	x	x	-	4
30	変異あり	-	変異あり	変異あり	-	x	変異あり	-	-	x	x	x	2
31	変異あり	-	変異あり	-	-	x	x	-	-	変異あり	x	x	4
32	-	-	-	-	x	x	-	-	x	x	x	-	4
33	変異あり	変異あり	変異あり	変異あり	-	-	x	x	x	変異あり	x	変異あり	2
34	変異あり	-	-	x	-	x	x	-	-	x	x	-	判定不能
35	-	x	変異あり	変異あり	変異あり	変異あり	x	-	-	x	x	-	3
36	変異あり	変異あり	-	x	-	-	x	-	-	変異あり	x	x	4
37	-	-	-	変異あり	変異あり	x	変異あり	-	x	-	x	-	3
38	x	変異あり	変異あり	変異あり	変異あり	-	変異あり	-	-	x	x	-	3
39	変異あり	-	変異あり	変異あり	-	-	-	-	-	x	x	-	2
40	変異あり	-	変異あり	変異あり	-	-	-	-	x	x	x	-	2
41	-	-	x	変異あり	-	x	変異あり	-	-	x	x	x	2
42	変異あり	変異あり	x	変異あり	-	x	x	-	-	x	x	x	2
43	変異あり	変異あり	-	-	-	-	-	変異あり	-	x	x	-	4
44	変異あり	-	x	-	-	変異あり	x	-	-	x	x	変異あり	1 or 4
45	変異あり	-	x	変異あり	-	x	x	-	-	x	x	-	2
46	変異あり	x	x	変異あり	-	-	x	x	x	x	x	-	2
47	変異あり	-	-	変異あり	変異あり	x	変異あり	-	x	-	x	-	3
48	変異あり	x	変異あり	変異あり	変異あり	変異あり	x	-	x	-	x	x	3
49	変異あり	-	変異あり	変異あり	変異あり	変異あり	-	-	-	-	x	-	2
50	変異あり	-	変異あり	変異あり	-	x	-	-	-	x	-	-	2
51	変異あり	-	-	変異あり	-	変異あり	変異あり	-	-	-	x	-	3
52	-	変異あり	x	-	x	-	-	変異あり	x	-	x	変異あり	4
53	-	変異あり	x	変異あり	-	x	-	-	-	-	x	-	2
54	変異あり	-	x	-	-	x	x	変異あり	変異あり	変異あり	x	-	4
55	変異あり	-	-	変異あり	-	x	x	-	-	x	-	-	2
56	変異あり	変異あり	x	変異あり	-	x	x	x	x	x	x	x	2
57	変異あり	-	-	x	x	x	x	変異あり	x	x	x	-	4
58	-	変異あり	-	変異あり	変異あり	-	変異あり	-	-	-	-	-	2
59	変異あり	-	x	-	x	-	変異あり	-	x	変異あり	x	-	1
60	変異あり	-	-	-	x	-	変異あり	-	-	-	x	-	1
61	変異あり	x	x	変異あり	変異あり	x	x	-	x	x	x	-	2
62	-	変異あり	-	変異あり	-	x	x	-	x	-	-	-	2
63	変異あり	変異あり	x	変異あり	変異あり	x	変異あり	-	x	-	-	-	2
64	-	変異あり	変異あり	変異あり	-	-	変異あり	-	-	-	-	-	3

--: 変異なし、×: 判定不能

clone	CDC25C	SIGLEC9	SLC27A6	GATA2	LPP	FAM22G	COL9A1	AGAP4	MSTO1	RP1L1	DTX2	CHEK2
1	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+

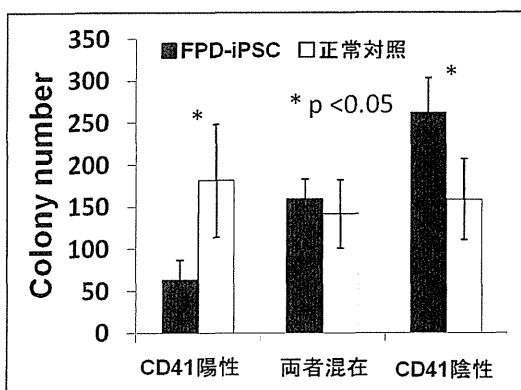
相対的に縮小した clone の 2 つが存在する可能性が示唆された。このモデルを証明するために、同一症例 (Pt1) の AML 検体を用いて、単一細胞レベルでのそれぞれの変異の有無を確認した。保存検体から抽出した生細胞を single cell sorting することにより、白血病細胞を単一細胞に分離し、それぞれの細胞からゲノム DNA を抽出・増幅した上で、上記に示した 12 個の遺伝子変異の細胞ごとの有無を Sanger 法で確認した。結果を次ページの表に示すが、下図のモデルを single cell sequencing の結果に当てはめると、解析した 64 細胞中 58 細胞はこのモデルに沿う形で clone の同定が可能であった(それぞれの clone と各遺伝子変異の有無は前ページ表)。それぞれの clone の頻度としては、clone 1; 4 個 (7%)、clone 2; 26 個 (45%)、clone 3; 12 個 (21%)、clone 4; 17 個 (29%) であり、WES によるアレル頻度から推測されたそれぞれの clone 比率とほぼ合致した結果であった。Clone の同定ができなかった 6 細胞のうち 1 細胞は、clone 1 あるいは clone 2 の遺伝子変異をあわせもち、判定ができなかった。また、残りの 5 細胞は、clone の判定に十分な sequence 結果が得られなかった。以上のことから、Single cell genome sequence は、細胞ごと、あるいは遺伝子ごとに遺伝子変異の有無の判定が技術的に困難な場合があることがわかったが、WES に基づく clonal evolution /devolution のモデルに関して裏付けを得ることができた。

5. iPS 細胞を用いた FPD の病態解析

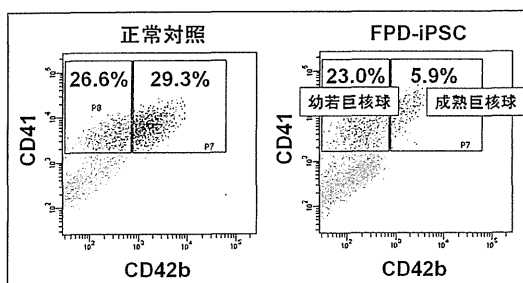
FPD における体細胞変異が血球分化異常において果たす意義を解析するため、本研究では、*RUNX1* の R174X 変異を有する FPD の 1 家系 1 症例について、同意を得た上で体細胞を採取し、iPS 細胞を樹立した。具体的には皮膚線維芽細胞を採取し、レトロウイルスベクターでリプログラミング 4 因子 *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *cMYC* を導入し、MEF (マウス胎生線維芽細胞) 上で共培養することによって iPS 細胞 (FPD-iPSC) を得ることに成功した。FPD-iPSC は RT-PCR にて多能性幹細胞のマーカーである *Nanog*, *Rex1* などを発現していることが確認され、免疫染色にて同じく幹細胞マーカーである *SSEA-4*, *TRA-1-60* を発現していることが確認された。また、免疫不全マウス精巣への注射によってテラトーマ (奇形腫) を形成し、三胚葉性の組織への分化能を有することが確認された。そして、この家系に見られる *RUNX1* R174X 変異が片アレルで認められた。

この iPS 細胞を用いて、血球への分化能を解析した。iPS 細胞をフィーダー細胞 C3H10T1/2 細胞上でサイトカイン VEGF を加えて培養すると、およそ 15 日後に袋上の細胞塊を形成し、その内部に CD34 陽性 CD43 陽性の造血幹細胞/前駆細胞 (HSPC) を産生する。この方法を用いて FPD-iPSC を分化させて HSPC を採取し、サイトカイン SCF, GM-CSF, IL-3, EPO を含む半固形培地上で主に顆粒球系、赤芽球系への血球分化能を解析した。その結果、

正常 iPSC 由来の HSPC との比較において、*RUNX1* R174X を有する HSPC の分化能に変化は見られなかった。一方、サイトカイン IL-3, IL-6, TPO を含む半固形培地上での血球分化能解析の結果、*RUNX1* R174X を有する HSPC では CD41 陽性の巨核球系への分化能が低下していた(下図)。



また、HSPC をサイトカイン SCF, TPO を含む培地を用いて引き続き C3H10T1/2 細胞上で培養すると、CD41 陽性の巨核球のなかでも CD42b 陰性の幼若巨核球と CD42b 陽性の成熟巨核球を得ることができる。この分化誘導系において、*RUNX1* R174X を有する HSPC では、特に CD41 陽性 CD42b 陽性細胞への分化が阻害されており、*RUNX1* 変異が巨核球の成熟を阻害しているものと考えられた(下図)。



FPD 遺伝子変異の修復が FPD の根本治療となりうるかどうか検証するため、ゲノム編集技術による *RUNX1* 遺伝子異常の修復を目指した。実際には、*RUNX1* R174X 変異の存在するゲノム領域に特異的にゲノム DNA2 本鎖切断を起こす人工ヌクレアーゼ (TALEN) の発現ベクターを構築し、この領域での相同組換えによって *RUNX1* 遺伝子異常の修復ができるドナープラスミドを構築した。これまでに、TALEN 発現ベクターのトランスフェクションによってゲノム上の目的部位で DNA2 本鎖切断が起こり、非相同末端結合修復によると考えられる数塩基対の欠失が起こっていることを確認した。

D. 考察

FPD は遺伝子変異が発見され一つの疾患単位として認知されてから日が浅く、その多くが見逃され適切な治療・経過観察を受けていないと考えられる。全世界での報告がこれまでに約 30 家系程度であったが、今回の全国調査によって既に血小板減少を伴う家系が 60 家系抽出された。このうち検体採取が可能であった 36 家系中 6 家系に *RUNX1* 遺伝子変異を認め、FPD 家系と考えられた。このことから、家族性に血小板減少をきたす家系のうち、約 1/6 は FPD である可能性が示唆された。また、症例数が少ないため推定は困難であるが、単純計算上、今回予備調査で報告された 60 家系中 10 家系前後の FPD 家系の存在が見込まれ、今回の全国の血液疾患診療施設には 12 家系程度の FPD 家系が見込まれ

る。さらに、FPD の疾患認知度の低さによって見逃されている症例が比較的が多いと予想されることから、およそ 20 を越える FPD 家系が国内に存在すると考えられる。今回同定された FPD 家系においてはいずれも造血器腫瘍の発症が認められたが、従来から報告されているように MDS や AML を発症した症例以外に、ALL、ヘアリー細胞白血病を発症した症例(投稿準備中)や骨髄線維症を経て AML を発症した症例など、多様な造血器腫瘍を発症し得ることがわかってきた。

一方、RUNX1 遺伝子変異がなく、家族性に血小板減少や造血器腫瘍の発症を認める家系が 29 家系同定された。家族性に血小板減少や造血器腫瘍をきたす既知の遺伝子の変異につき解析したところ 2 家系 2 症例において MYH9 遺伝子変異を、また 1 家系 1 症例に ANKRD26 の 5'UTR 変異を認めたが、その他の家系・症例においては明らかな原因遺伝子変異が認められていない。これらの家系の中には未知の遺伝子変異により定義される疾患が存在する可能性が示唆される。

今回の調査から、血小板減少家系に占める RUNX1 遺伝子変異は約 1/6 の頻度で検出されることがわかった。本調査の目的の一つとして、効率的に FPD を疑い遺伝子検索をすべき家系を明らかにする指針を立てることが挙げられるが、血小板減少家系自体はまれであるものの、その中では比較的高頻度に RUNX1 遺伝子変異が検出されることから、血小板減少家系を認

めた際には全例に RUNX1 遺伝子変異解析を行うべきだと考えられた。

FPD は希少疾患であり、今回の調査では予想以上に症例集積に難渋した。RUNX1 変異の機能欠失の程度と臨床像との関係を収集したデータから明らかにし、変異が同定された場合にその種類および年齢その他の臨床像から、本疾患で致命的となる造血器腫瘍への進展リスクなどの予後を予測することが今後の課題であり、今後も本調査研究で構築した症例集積システムを活用したさらなる FPD 家系の収集が必要である。また、FPD 家系において造血器腫瘍発症とともに生じる遺伝子変異の候補が whole exome sequence によって同定され、特に CDC25C 遺伝子変異はこれまでに造血器腫瘍で報告のない新規責任遺伝子異常であると考えられ、FPD や一部の MDS に対する新たな治療標的が同定された。

E. 結論

いまだに認知されておらずその実態が明らかでない家族性血小板異常症 (FPD) についてその有病率を明らかにするため、全国 489 施設を対象とした疫学的な調査を開始した。候補となる血小板減少家系が約 60 家系存在していることが明らかになり、これまで知られていたよりも高頻度であることが明らかとなった。また、44 の血小板減少家系の詳細な臨床情報を収集し、34 家系の遺伝子変異解析から 5 家系の FPD 家

系が抽出された。その他の家系の遺伝子変異解析や FPD 家系で造血器腫瘍発症前後の遺伝子変異解析を進めることにより、FPD や家族性の血小板減少症の病態を解明し、治療法の開発を目指すべきであると考えられる。これらの知見を集積し、疾患の自然史や長期予後を明らかにし、造血器腫瘍発症の時期の予測や造血幹細胞移植の適応の決定などの治療指針の制定につなげることが今後の課題となる。

F. 研究発表

1. 論文発表

●Watanabe-Okochi N, Yoshimi A, Sato T, Ikeda T, Kumano K, Taoka K, Satoh Y, Shinohara A, Tsuruta T, Masuda A, Yokota H, Yatomi Y, Takahashi K, Kitaura J, Kitamura T, Kurokawa M. The shortest isoform of C/EBP β , Liver inhibitory protein (LIP), collaborates with Evi1 to induce AML in a mouse BMT model. *Blood*, in press.

●Hochhaus A, Saglio G, Larson RA, Kim DW, Etienne G, Rosti G, De Souza C, Kurokawa M, Kalaycio ME, Hoenekopp A, Fan X, Shou Y, Kantarjian HM, Hughes TP. Nilotinib is associated with a reduced incidence of BCR-ABL mutations versus imatinib in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Blood*, in press.

●Kumano K, Arai S, Hosoi M, Taoka K, Takayama N, Otsu M, Nagae G, Ueda K,

Nakazaki K, Kamikubo Y, Eto K, Aburatani H, Nakauchi H, and Kurokawa M. Generation of induced pluripotent stem cells from primary chronic myelogenous leukemia patient samples. *Blood* 119: 6234-6242, 2012.

●Pinheiro I, Margueron R, Shukeir N, Eisold M, Fritsch C, Richter FM, Mittler G, Genoud C, Goyama S, Kurokawa M, Son J, Reinberg D, Lachner M, and Jenuwein T. Prdm3 and Prdm16 are H3K9me1 methyltransferases required for mammalian heterochromatin integrity. *Cell* 150: 948-960, 2012.

●Goyama S, Takeuchi K, Kanda Y, Nannya Y, Chiba S, Fukayama M, and Kurokawa M. Post-transplant endothelial disorder after hematopoietic SCT: a blinded autopsy study. *Bone Marrow Transplant* 47: 1243-1245, 2012.

●Kagoya Y, Seo S, Nannya Y, and Kurokawa M. Hyperlipidemia after allogeneic stem cell transplantation: prevalence, risk factors, and impact on prognosis. *Clin Transplant* 26: E168-175, 2012.

●Kanda J, Saji H, Fukuda T, Kobayashi T, Miyamura K, Eto T, Kurokawa M, Kanamori H, Mori T, Hidaka M, Iwato K, Yoshida T, Sakamaki H, Tanaka J, Kawa K, Morishima Y, Suzuki R, Atsuta Y, and Kanda Y. Related transplantation with HLA-1 Ag mismatch in the GVH direction

and HLA-8/8 allele-matched unrelated transplantation: a nationwide retrospective study. *Blood* 119: 2409-2416, 2012.

●Kataoka K, and Kurokawa M. Ecotropic viral integration site 1, stem cell self-renewal and leukemogenesis. *Cancer Sci* 103: 1371-1377, 2012.

●Kim J, Parrish AB, Kurokawa M, Matsuura K, Freel CD, Andersen JL, Johnson CE, and Kornbluth S. Rsk-mediated phosphorylation and 14-3-3varepsilon binding of Apaf-1 suppresses cytochrome c-induced apoptosis. *EMBO J* 31: 1279-1292, 2012.

●Koya J, Nannya Y, Ichikawa M, and Kurokawa M. The clinical role of procalcitonin in hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 47: 1326-1331, 2012.

●Kurosawa S, Yakushijin K, Yamaguchi T, Atsuta Y, Nagamura-Inoue T, Akiyama H, Taniguchi S, Miyamura K, Takahashi S, Eto T, Ogawa H, Kurokawa M, Tanaka J, Kawa K, Kato K, Suzuki R, Morishima Y, Sakamaki H, and Fukuda T. Changes in incidence and causes of non-relapse mortality after allogeneic hematopoietic cell transplantation in patients with acute leukemia/myelodysplastic syndrome: an analysis of the Japan Transplant Outcome Registry. *Bone Marrow Transplant* 48:529-36, 2013.

●Larson RA, Hochhaus A, Hughes TP, Clark RE, Etienne G, Kim DW, Flinn IW,

Kurokawa M, Moiraghi B, Yu R, Blakesley RE, Gallagher NJ, Saglio G, and Kantarjian HM. Nilotinib vs imatinib in patients with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia in chronic phase: ENESTnd 3-year follow-up. *Leukemia* 26: 2197-2203, 2012.

●Taoka K, Yamamoto G, Kaburaki T, Takahashi T, Araie M, and Kurokawa M. Treatment of primary intraocular lymphoma with rituximab, high dose methotrexate, procarbazine, and vincristine chemotherapy, reduced whole-brain radiotherapy, and local ocular therapy. *Br J Haematol* 157: 252-254, 2012.

●Yoshimi M, Goyama S, Kawazu M, Nakagawa M, Ichikawa M, Imai Y, Kumano K, Asai T, Mulloy JC, Kraft AS, Takahashi T, Shirafuji N, and Kurokawa M. Multiple phosphorylation sites are important for RUNX1 activity in early hematopoiesis and T-cell differentiation. *Eur J Immunol* 42: 1044-1050, 2012.

●Wong WF, Kohu K, Nakamura A, Ebina M, Kikuchi T, Tazawa R, Tanaka K, Kon S, Funaki T, Sugahara-Tobinai A, Looi CY, Endo S, Funayama R, Kurokawa M, Habu S, Ishii N, Fukumoto M, Nakata K, Takai T, and Satake M. Runx1 deficiency in CD4+ T cells causes fatal autoimmune inflammatory lung disease due to spontaneous hyperactivation of cells. *J Immunol* 188:

5408-5420, 2012.

2. 学会発表

●飯塚浩光、吉見昭秀、間野博行、荒井俊也、黒川峰夫. 家族性血小板異常症の病態解析, 第17回造血器腫瘍研究会, 2013年2月2日、宮崎、口演

●Yuki Kagoya, Akihide Yoshimi, Shunya Arai, Masahiro Nakagawa, Keiki Kumano, Mineo Kurokawa. NF- κ B-TNF- α positive feedback loop is universally essential for maintenance of myeloid leukemia stem cells, 第71回日本癌学会学術総会, Sep 19-21, 2012, Sapporo, Japan, Oral presentation

●Koki Ueda, Akihide Yoshimi, Masahiro Nakagawa, Satoshi Nishikawa, Keiki Kumano, Mineo Kurokawa. The histone methyltransferase EZH2 plays a crucial role in MLL-related leukemia, 第71回日本癌学会学術総会, Sep 19-21, 2012, Sapporo, Japan, Oral presentation

●Yuki Kagoya, Akihide Yoshimi, Shunya Arai, Masahiro Nakagawa, Keiki Kumano, Mineo Kurokawa. NF- κ B-TNF- α positive feedback loop is essential for maintenance of myeloid leukemia stem cells, 第74回日本血液学会総会, Oct 19-21, 2012, Kyoto, Japan, Oral presentation (plenary session)

●Koki Ueda, Akihide Yoshimi, Masahiro Nakagawa, Satoshi Nishikawa, Keiki Kumano, Mineo Kurokawa. The histone

methyltransferase EZH2 plays a crucial role in MLL-related leukemia, 第74回日本血液学会総会, Oct 19-21, 2012, Kyoto, Japan, Oral presentation

●Yuki Kagoya, Akihide Yoshimi, Shunya Arai, Keisuke Kataoka, Masahiro Nakagawa, Keiki Kumano and Mineo Kurokawa. NF- κ B/TNF- α Positive Feedback Loop with Active Proteasome Machinery Supports Myeloid Leukemia Initiating Cell Capacity, 54th ASH Annual Meeting and Exposition, December 8-11, 2012, Georgia World Congress Center, Atlanta, GA, USA, Oral presentation

●Koki Ueda, Akihide Yoshimi, Masahiro Nakagawa, Satoshi Nishikawa, Victor E Marquez, Keiki Kumano and Mineo Kurokawa. Inhibition of EZH2 Depletes MLL Fusion Leukemia Stem Cells Through Restoration of p16, Expression 54th ASH Annual Meeting and Exposition, December 8-11, 2012, Georgia World Congress Center, Atlanta, GA, USA, Oral presentation

●Yuki Kagoya, Akihide Yoshimi, Keisuke Kataoka, Masahiro Nakagawa, Keiki Kumano, Shunya Arai, Mineo Kurokawa. NF- κ B/TNF- α positive feedback loop with active proteasome system controls leukemia stem cell capacity, Keystone Symposia Stem Cell Regulation in Homeostasis and Disease (B7), February 24-March 1, 2013, Fairmont Banff Springs, Banff, Alberta,