

201231083B

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 23 年度～24 年度 総合研究報告書

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 23 年度～24 年度 総合研究報告書

研究代表者 黒川 峰夫

平成 25 (2013) 年 5 月

目 次

I. 総合研究報告書		
家族性血小板異常症に関する調査研究	黒川 峰夫	3
II. 資料		43
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		61
IV. 研究成果の刊行物・別刷		73

1. 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患等克服研究事業)

総合研究報告書

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。そこで当調査研究は、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として開始した。当調査研究においては全国 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、その結果、血小板減少家系 60 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、FPD と診断した。RUNX1 遺伝子変異を認めなかった家系については、家族性に血小板減少症をきたす他の候補遺伝子変異を検索し、血小板減少家系の遺伝子変異プロファイルを明らかにした。さらに、FPD において同定された RUNX1 遺伝子変異の変異体を用いた解析を行い、その意義について検討した。FPD から造血器腫瘍に進展する機序については、その造腫瘍性に関わる協調因子についての検討により、BMI1 の高発現が RUNX1 遺伝子変異と強調することが明らかになった。また、FPD から白血病を発症した 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 CDC25C 遺伝子変異が 2 家系 3 症例に共通して認められることがわかった。これらの遺伝子変異は前白血病段階(骨髄異形成症候群や骨髄線維症の段階)からほぼすべての腫瘍細胞に認められており、造腫瘍性の基盤を形成することが予想された。実際に CCDC25C の変異体を導入した細胞は、野生型 CDC25C を導入した細胞と比較して mitosis entry が亢進し、放射線障害等の DNA 傷害が加わるとさらにその差が顕著になることがわかった。FPD における血小板産生低下や血小板機能異常についてさらなる検討を行うため、FPD の 1 家系から皮膚線維芽細胞を採取し、iPS 細胞を樹立した。樹立した FPD_iPS 細胞を造血細胞に再分化させると、巨核球系への分化が正常細胞由来の iPS 細胞と比較して低下することが示された。以下に当調査研究の研究成果を詳説する。

研究分担者

鈴木憲史

日本赤十字社医療センター

副院長・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

名古屋医療センター臨床研究センタ

ー臨床疫学研究室 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 30 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・経過観察が十分に行われているとは言い難い状況にある。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。また、FPD における造血器腫瘍発症の分子遺伝学的機序について明らかにする。

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した。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。他施設の症例から臨床情報や検体の提供を受ける際には、事前に当該施設の倫理審査の承認を得た上で実施した。臨床情報と検体を用いた遺伝子変異解析のそれぞれについて文書による同意が得られた患者について、臨床情報および遺伝子変異の解析を行った。

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ームシーケンシング(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

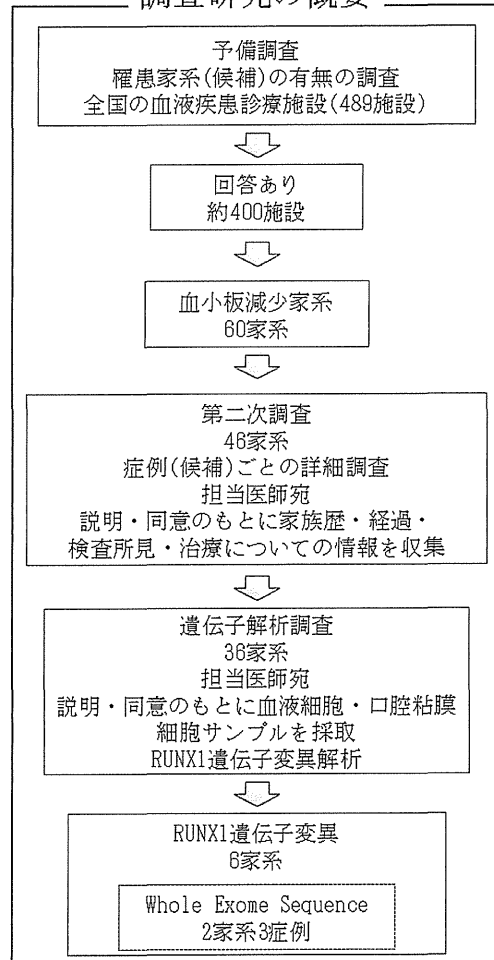
本調査研究の結果について、下記の項目順に記載する。

1. 血小板減少家系の臨床情報の解析
2. 血小板減少家系の原因遺伝子変異の解析
3. FPD に認められた RUNX1 変異体に関する解析
 - (a) FPD家系の詳細病歴
 - (b) FPD以外の血小板減少家系の遺伝子解析結果
4. RUNX1 点変異を有する家族性血小板異常症からの白血病化機序の解明
5. FPD における造血器腫瘍発症の責任遺伝子変異同定
6. FPD における造血器腫瘍発症の clonal evolution/devolution
7. iPS 細胞を用いた FPD の病態解析

1. 血小板減少家系の臨床情報の解析

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(右図参照)。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

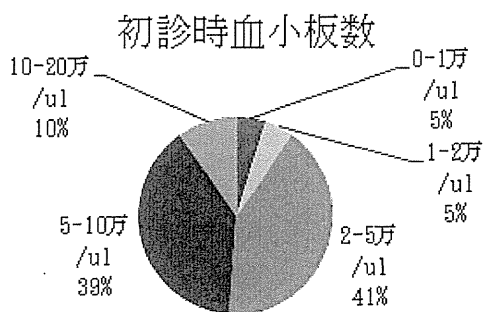
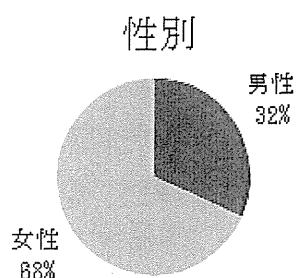
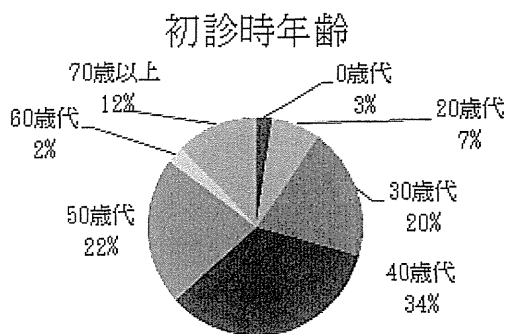
調査研究の概要



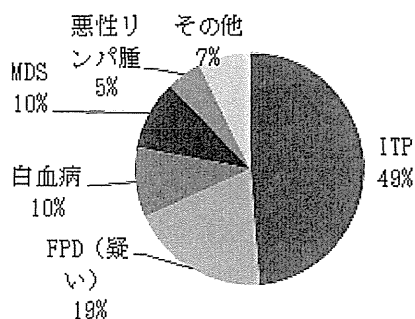
め血小板減少症を伴う症例のうち、血小板減少症の家族歴を認める症例を対象としてその有無を調査した。また、血小板減少とそれに伴う出血傾向の程度が軽度である症例については FPD と認識されずに通常の急性白血病をはじめとする造血器腫瘍と診断されている可能性がある。したがって、造血器腫瘍症例のうち血小板減少症の家族歴を認める例も調査対象とした。それぞれについて、常染色体優性遺伝が疑われる家系・家族内に白血病や他の造血器腫瘍の集積を認める家系、RUNX1 変異がすでに明らかとなっている家系の有無を調査した。

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(右図)。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



初診時診断



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. 血小板減少家系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。

(a) FPD 家系の詳細病歴

ここで、当調査研究により RUNX1 遺伝子変異を同定した FPD 家系のうち、詳細な臨床情報を入手した 3 家系について、その病歴をそれぞれ記載する。

家系 1

症例 1: 41 歳の女性。2007 年に 8 月から

月経が 2 週間継続したため、近医受診。Plt2.8 万と低下みられ、前医入院し、急性骨髄性白血病(AML M4)と診断(染色体は正常核型)。8 月 21 日から寛解導入療法 (IDR+AraC) 施行したが寛解に至らず、移植の検討も含めた精査加療目的に当科紹介、10 月 22 日に入院。子供の頃より血小板が低いことを指摘されていたが、詳細な検査を受けたことはなかった。父親は血小板低下を認め、骨髄異形成症候群から急性骨髄性白血病へ移行し、死亡していた。造血幹細胞移植を検討し、HLA1 座不一致の弟をドナー候補として検査を行った。しかし、弟もまた血小板 9.2 万と低く、末梢血に骨髄球がみられた。そのため、弟はドナーとして非適格と判断した。また姉(特発性血小板減少性紫斑病と診断され他院で加療中)と息子(症例 2)、娘にもすべて血小板低下を認めた。入院後、再寛解導入療法として IDR+AraC、AEM、High dose AraC を施行したが寛解に至らなかった。2008 年 3 月 19 日に CY + TBI を前処置にして HLA 一致の骨髄バンクドナーからの非血縁者間骨髄移植を施行。2013 年 4 月現在まで完全寛解を維持している。

症例 2: 20 歳男性。症例 1 の息子。2009 年に 8 月に両頸部リンパ節腫大のため前医受診。左優位に頸部、鎖骨上、腋窩、上縦隔まで多数のリンパ節腫大を認めたため、リンパ腫疑いにて 8 月 10 日に当科紹介受診。頸部リンパ節生検施行、異型リンパ球の増殖を認め、Precursor T lymphoblastic lymphoma と診断。FACS 解析で TdT+、

CD3 +、CD5 +、CD7 +。染色体検査 (G-banding) では、46, XY, t(1;7) (p34.1;q22)の染色体異常を認めた。8月31日に当科入院。末梢血所見はWBC 29000/ μ L (blasts 3.0%, promyelocytes 0.0%, myelocytes 0.0%, metamyelocytes 0.0%, neutrophils 58.0%, eosinophils 4.0%, basophils 0.0%, monocytes 3.0%, lymphocytes 32%), Hb 14.1 g/dL, Plt 4万/ μ L。骨髓穿刺検査では、42%の異型リンパ球を認めた。FACS検査で、CD5+、CD7+、CD38+、CD56-、HLA-DR-。染色体検査では正常核型であったが、PHA刺激により、9/20細胞に、t(1;7)(p34.1;q22)の染色体異常をみとめた。以上から急性リンパ性白血病(Precursor T ALL)と診断された。JALSG ALL 202-U induction therapyのプロトコールに従い治療を開始、完全寛解に至った。しかし、完全寛解となった後も血小板は5万をこえることはなかった。3コースの地固め療法の後、2010年1月26日にCY+TBIを前処置としてHLA一致の骨髓バンクドナーからの非血縁者間骨髓移植を施行。2013年4月現在まで完全寛解を維持している。

症例1、症例2の診断時の血液と、症例1のドナー候補となった弟の血液の分析で、すべて同じRUNX1変異(R174X)が検出された。

家系 2

37歳男性、10年前から血小板減少があ

り、他院で MDS refractory anemia with excess blasts と診断され転院。その際、WBC 3600/ μ L、Hb 12.7g/dL、Plt 6.8万/ μ Lであった。骨髓染色体検査では 46,XY idic(7)(q11) [11/20]、46,XY, t(7;8) (q34;q11) [3/20]の異常を認めた。血小板のコラーゲン凝集能、エピネフリン凝集能は低下していたが、リストセチン凝集能は保たれていた。同種造血幹細胞移植のためのドナー検索の過程で家族 2 人(II-1、II-2)に血小板減少(それぞれ Plt 10.3 万/ μ L、Plt 8.6 万/ μ L)が認められ、3年後にII-1(17歳女性)は汎血球減少をきたし、骨髓線維症と診断された(家系図参照)。染色体検査では 47,XX, +8 [20/20]の異常を認めた。I-1、I-3 には血小板減少は認められなかった。以上の病歴から FPD が疑われ、同意のもとRUNX1 遺伝子変異の検索を行ったところ、RUNX1_F303fsX566 変異を認めたため、FPDと診断した。

家系 3

72歳の男性で、主訴は特になく、血算の異常があり、2011年10月に当科に紹介初診となった例である。現病歴では、糖尿病、前立腺癌で前医通院中であった。前医、健康診断での血液検査の推移は以下の通りであった。09/5/14 WBC 4400/ μ L、Hb 13.0g/dL、Plt 20.1万/ μ L、11/9 WBC 4500 Hb 12.7 Plt 17.8万、10/2/16 WBC 4100 Hb 13.3 Plt 15.5万、4/27 WBC 4600 Hb 12.2 Plt 14.0万、7/27 WBC 5000 Hb 11.7 Plt 3.1万、11/16 WBC 5400 Hb 1

2.3 Plt 10.7万。2011年10月初旬に全身に皮疹が出現し近医を受診し、採血で WBC 12300/ μ L、Hb 11.1g/dl、Plt 9万/ μ Lと白血球増加、貧血、血小板減少が認められた。皮疹は消退したものの、血球異常には改善なく、10月中旬に当科紹介初診となった。既往歴に 糖尿病、前立腺癌があった。身体所見では、発熱および体重減少はなく、夜間盗汗はなかった。リンパ節腫大や肝脾腫はなかった。家族歴では、同胞は妹1人で、その妹が急性骨髄性白血病であった。本人には健常の息子1人がいる。

生化学検査では、総蛋白 7.1g/dL、アルブミン 4.3g/dL、尿酸 5.5mg/dL、尿素窒素 19.2mg/dL、クレアチニン 0.84mg/dL、総ビリルビン 0.7mg/dL、AST 19IU/L、ALT 15 IU/L、LDH 148IU/L、血糖 139mg/dL、Na 142mmol/L、K 4.1mmol/L、Cl 105mmol/L、Ca 9.3mg/dL、P 3.0mmol/L、CRP 0.3 mg/dL以下、血算ではWBC 13300/ μ L、Hb 11.5g/dL、Plt 9.4万/ μ L、網赤血球 1.7% 5.5万/ μ L、好中球 13.0% 1796/ μ L、リンパ球 4.5% 599/ μ L、分類不能細胞 80.5%であった。CTでは脾腫と脾臓内のlow density areaを2箇所みとめた。

骨髄穿刺検査では、有核細胞数4.2万/ μ L、巨核球(-)、低一正形成骨髄で帰属不明の小型～中型で細胞質は淡青色、細胞辺縁に毛状突起を有する成熟リンパ球様細胞を56.1%認めた。この細胞は酒石酸抵抗試験の結果が陽性であり、FACS解析では、CD45 gatingのgate A 47.5%において、 λ clonality(+), CD25(+), CD19(+), CD11c

(+), FMC7(+), HLADR(+), CD22(+), CD19(+), CD103(+), CD79a(+), cytoplasmic μ (+), CD10(-), CD20(+))であった。サザンブロット解析ではIgH遺伝子の再構成を認めた。骨髄の病理検査では、人工的に胞体が収縮して核周囲が明るく抜けた (fried egg appearance) 小型核を有する中型のリンパ球様細胞のびまん性浸潤を認め、好銀線維の増加を認めた。免疫組織化学的に、リンパ球様細胞はCD20(+), CD79a(+), CD3(-), CD5(-), TdT(-)で、成熟B細胞由来と考えられ、CD10(-), CD23(-), CD25(+))であり、MIB-1 labeling indexは50%未満であった。以上から有毛細胞白血病と診断した。

診断後、2011年12月2日よりCladribineによる化学療法を1コース施行し、骨髄抑制の後に12月21日には血算WBC 1900/ μ L、好中球 1387/ μ L、Hb 8.3g/dL、Plt 20.6万/ μ Lで、12月27日の骨髄検査でHematological CRへの到達を確認した。

同患者の末梢血および口腔粘膜のゲノムDNAから、RUNX1_L445P変異が同定され、FPDから発症した有毛細胞白血病と診断した。また、有毛細胞白血病に特徴的な BRAF_V600E変異を末梢血のみに認めた。なお、本患者の家族からはRUNX1遺伝子変異解析の同意が得られなかった。

(b) FPD以外の血小板減少家系の遺伝子解析結果

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 (それぞれ、F41L、D1424N)、1 家系に ANKRD26 遺伝子の 5' UTR 変異 (c.-134G->A) を認めた。

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。

血小板減少家系には ANKRD26 の 5' UTR に保存された 22 塩基配列 (ANKRD26 5' UTR c.-134 to c.-113) に比較的高頻度 (約 10%) に変異が認められると最近報告されたことから、本研究でも検索

を行ったところ、1 家系に c.-134G->A 変異が同定された。ANKRD26-related thrombocytopenia は中等度の血小板減少をきたし、一般的に出血傾向を示すことは少ないが、 α 顆粒の欠損や GPIa の減少が時折みられる。また、急性白血病の発症頻度が健常者の約 30 倍と言われるが、その機序は不明である。本研究に同定された ANKRD26-related thrombocytopenia の家系では、発端者および母に血小板減少がみられ、また従兄弟に白血病の病歴があった。

家系 4

23 歳男性、初診時は再生不良性貧血と判断され経過観察をされていた (Plt 10 万/ μ L)。その約 2 年後に全身倦怠感が出現し、骨髄検査の結果、AML M0 (正常核型) と診断された。化学療法後に同種骨髄移植を施行し、その後寛解を維持しており、完治したものと考えられる。なお、本人の父は 42 歳時に血小板減少を指摘されたが放置し、56 歳で MDS RCMD (正常核型) と診断された (その際、Plt 1.0 万/ μ L)。その後徐々に骨髄不全が進行し、ATG+CyA 療法を施行されたが無効であり、感染症および脳出血のため死亡した。上記の家族歴より FPD が疑われ、RUNX1 遺伝子変異解析の結果、2 症例に共通して RUNX1_S140N 変異が認められた。また、発端者の白血病細胞には RUNX1_S114P も認められ、両アレルの RUNX1 変異が同定された。上記の結果から、FPD 家系と診

断された。

3. FPD に認められた RUNX1 変異体に関する解析

我々の研究班は本邦で初めての FPD と考えられる症例 (FPD-Yamanashi と命名) を発見した。責任遺伝子は連鎖解析から ch21q22.1-22.3 の領域に存在することが示され、*RUNX1* 遺伝子の解析により exon8 における1塩基の欠失を見いだした。*RUNX1* 遺伝子は、血小板系列特異的な機能を持つだけでなく、FPD が高率 (30-40%) に急性骨髄性白血病や骨髄異形成症候群が発症することから、これら疾患の発症機序にも深く関与していると考えられている。我々が本家系で見いだした新規の変異である exon8 変異はフレームシフトを起こすことにより転写活性領域である *RUNX1* 蛋白の C 末領域が野生型とはまったく異なるアミノ酸配列へと変化する (Haematologica 2008; 93:155-156)。これまでの変異は DNA 結合領域に集中していることから、本家系で見いだされた C 末領域の変異は FPD 発症機序の解明に新たな知見を加えると考えられる。そこで、本家系において認められた *RUNX1* 遺伝子のプロモーター領域の rSNP と exon 8 の変異が *RUNX1* 蛋白発現に及ぼす影響について検討した。その結果、exon 8 の変異を持つ construct は rSNP の有無にかかわらず野生型に比べて蛋白量の発現低下が認められた。これはフレームシフトによって野生型蛋白には存在しないリジン残基が新たに 4

カ所に存在するためにユビキチン化による蛋白分解を受けている可能性が示唆され、FPD-Yamanashi タイプの変異はハプロ不全が FPD の病態に関与している可能性が考えられた。

4. *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

RUNX1 点突然変異は、高率に白血病に移行する家族性血小板異常症 FPD/AML の責任遺伝子として同定され、AML の最末分化型 M0、de novo MDS や放射線・治療関連の MDS および AML など、様々な骨髄系造血器腫瘍に認められることが明らかになっている。しかし FPD/AML 患者では、全ての血球が先天的に *RUNX1* 点変異を有しているにもかかわらず、MDS/AML 発症は成年以降であることが多いことから、白血病化には他の遺伝子異常の積み重ねが必要と考えられる。そこで、*RUNX1* 変異による骨髄系造血腫瘍の発症メカニズムを明らかにするため、*RUNX1* 変異体導入ヒト造血幹細胞およびマウスモデルの解析を行った。

FPD/AML を含む様々な骨髄系造血器腫瘍患者から得られた検体を用い、*RUNX1* 変異や各種遺伝子発現を解析した。レトロウイルスベクターを用いて *RUNX1* 変異体をヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞に組み込み、単独あるいは BMI1 との共発現による生物学的影響を検討

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

した。またマウスBMTモデルを用いて生体内での影響を解析した。なお、本研究は広島大学医学部倫理委員会承認済みであり、同委員会の定めるヒトゲノム遺伝子解析研究の指針に従って実施した。検体提供者にはインフォームドコンセントを行い、個人

情報保護のため個々の試料情報は連結可能匿名化した。動物実験は研究協力機関において承認を得た上で、指針に従って実施した。

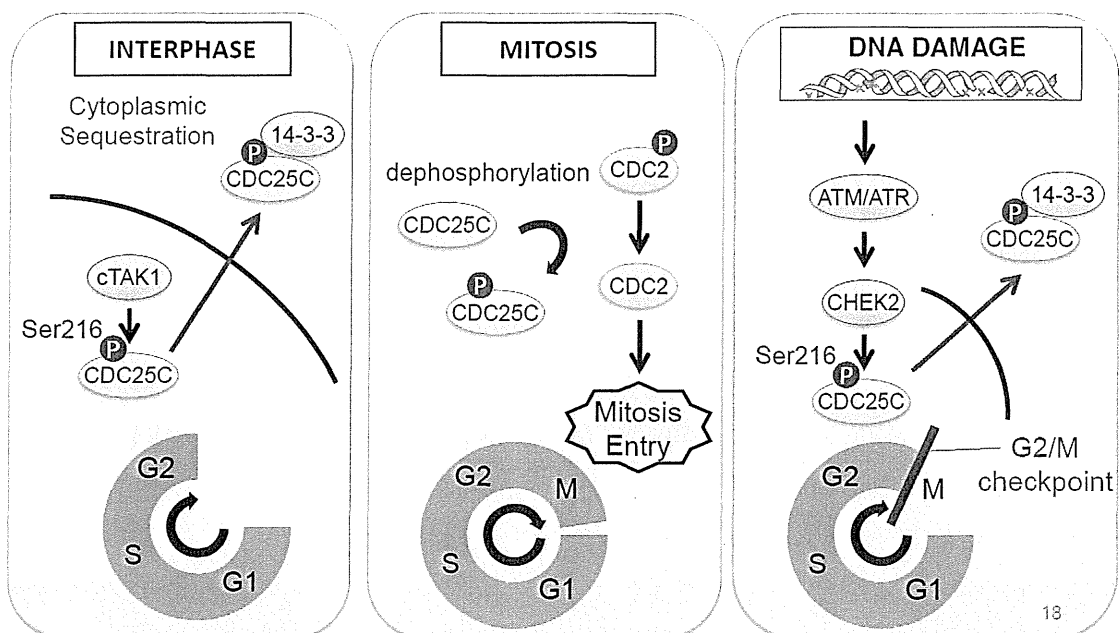
その結果、RUNX1 変異体 D171N をヒト CD34 陽性細胞に導入すると、分化が阻害

されて自己再生能が亢進し、腫瘍細胞様となるが、増殖能を欠いており、G1 arrest の状態であった。*RUNX1* 変異患者では *BMI1* が高発現であることから、両者を共発現させると、増殖能の亢進が認められた。マウス BMT モデルでは、D171N 変異体と *BMI1* 高発現の協調により白血病発症が確認できた。*RUNX1* 変異と *BMI1* 高発現を併せ持つ患者およびマウスモデルでは、*ARF/INK4A* の発現低下が認められ、さらに *BMI1* ノックダウンにより増殖能の低下が認められた。しかし、*RUNX1* 変異と *BMI1* 高発現を併せ持つ細胞を NOG マウスに導入しても生着しなかった。

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 (前ページ) 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

5. FPD における造血器腫瘍発症の責任遺伝子変異同定

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

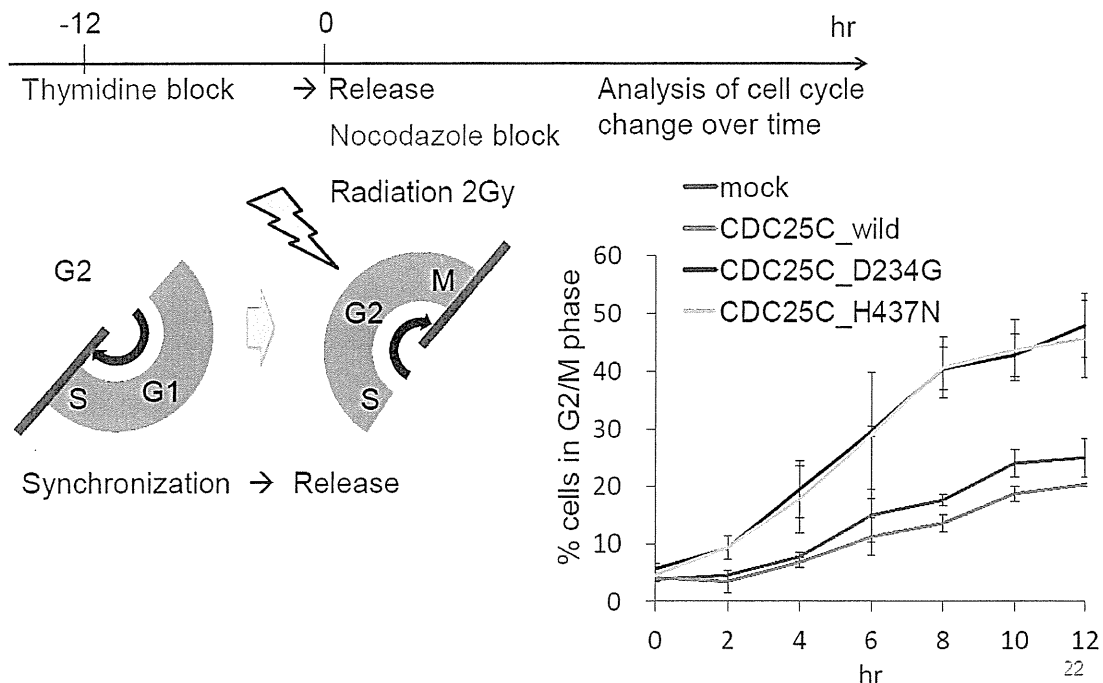


CDC25C 遺伝子変異は Pt1 と Pt2 に共通して認められた上に (D234G)、他の FPD から AML を発症した症例においても遺伝子変異 (H437N) が認められ、さらには de novo の MDS 患者 91 名のゲノム DNA をスクリーニングした結果、1 例に CDC25C 遺伝子変異 (A344V) を認めたことから、同遺伝子の変異体の機能に注目した。

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 (前ページ図)。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、いわば不活化された状態にあるが、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 細胞にレトロウイ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コ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

Disruption of G2/M checkpoint in CDC25C mutant cells



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(前ページ図)。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 部位のリン酸化が减弱しており(下図)、また、C-TAK1 や 14-3-3 との結合が减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

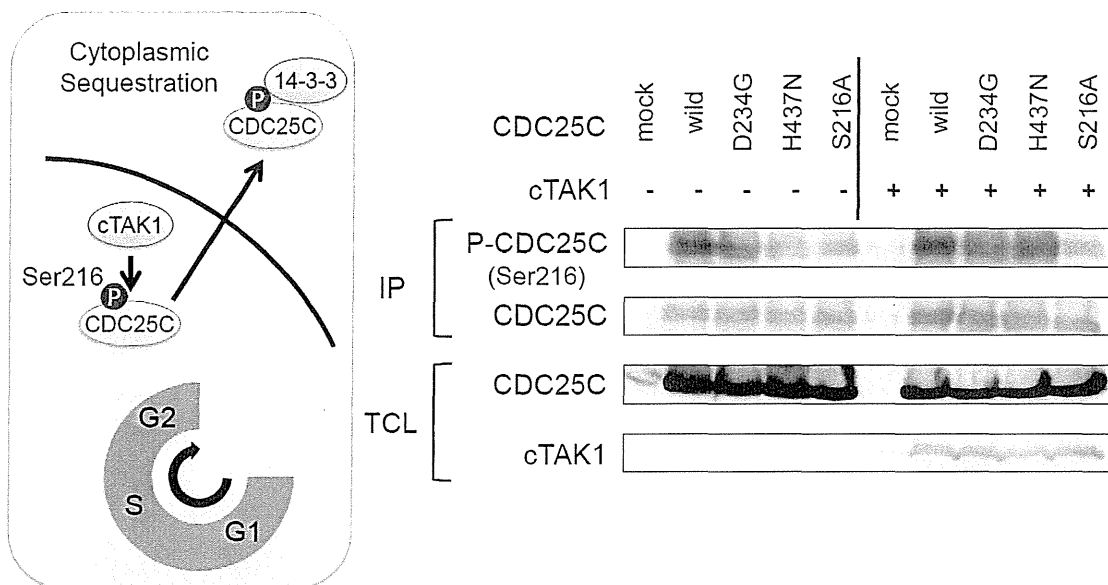
い状態となり、細胞周期を常に促進してしまうことが造血器腫瘍発症の基盤となることが推察された。

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

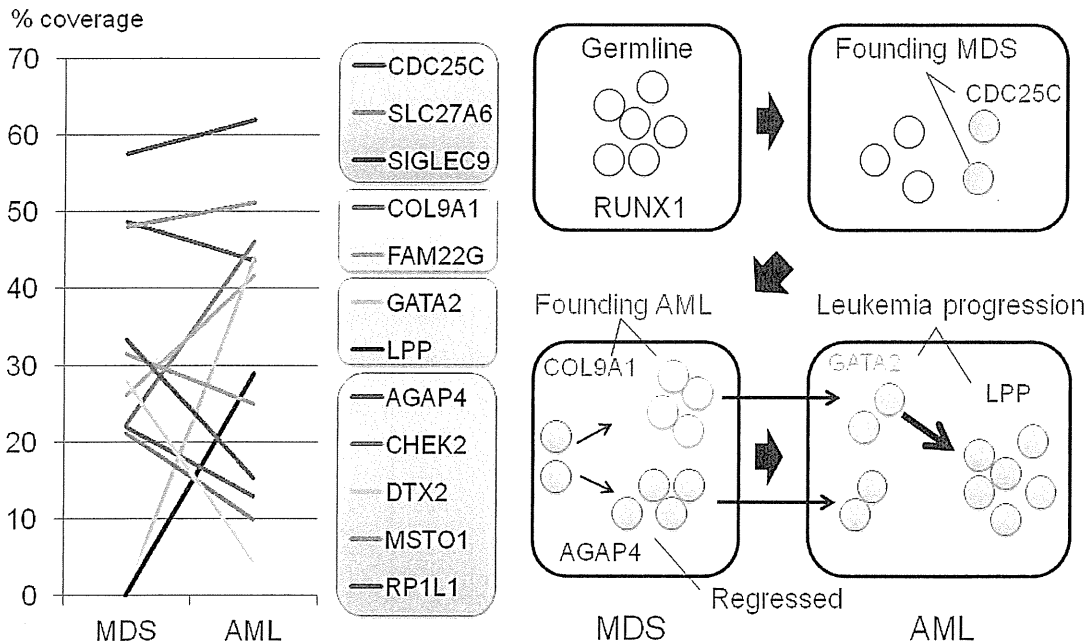
上記の WES 解析の結果は、FPD における腫瘍発症の過程に対する示唆を与えてくれる。ここでは Pt1 について注目する。Pt1 においては、CDC25C を含む計 12 の遺伝子の heterogenous な変異が確認されたが、MDS から AML に進展する際の各遺伝子変異のアレル頻度から、12 の遺伝子変異は下記の 4 つのグループに分類することができる。

- ①MDS のほぼすべての clone に存在する変異(次ページ図の Founding MDS clone)
- ②MDS の時点で一部の clone に存在し、

Reduced phosphorylation at Ser216 in CDC25C mutants



Clonal evolution and devolution in FPD



AML ではほぼすべての clone に存在する
変異(上図の Founding AML clone)

③MDS の時点では検出されず、AML で
出現する変異(上図の 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
(上図の 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(上図)。
前述の evolution/devolution モデルに
single cell sequencing の結果に当てはめる

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	-	3
3	-	x	-	変異あり	-	変異あり	x	x	x	-	-	-	2
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	-	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	-	x	-	2
15	変異あり	-	x	-	-	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	-	x	変異あり	-	-	-	x	-	2
19	変異あり	-	x	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	-	x	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	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	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	-	x	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	-	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	x	-	-	-	x	-	3
36	変異あり	変異あり	-	-	-	-	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	x	-	2
47	変異あり	-	-	変異あり	変異あり	変異あり	x	-	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	-	-	-	-	-	3
52	-	変異あり	x	-	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	-	-	-	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	-	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	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、x: 判定不能

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

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 と各遺伝子の有無は下

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%)