

MYH9 異常症

研究分担者 川口 裕之 (防衛医科大学校小児科学講座准教授)

研究協力者 國島 伸二 (国立病院機構 名古屋医療センター
臨床研究センター高度診断研究部)

研究要旨

先天性血小板減少症には免疫異常を合併する場合があるが、その全体像は現時点では把握されていない。先天性血小板減少症の免疫異常を検討する前提として、先天性血小板減少症の診断を適切に行なう必要があるが、今回最新技術である「ターゲットシーケンス」により効率的に先天性血小板減少症の診断を可能とする系を作製し臨床応用する作業を行なった。現在ターゲットシーケンスの条件設定の作業を行なっている。また、血小板減少症を示す症例について経時的にリンパ球機能を評価し、臨床症状との相関を検討した。

A. 研究の目的

昨年度は MYH9 異常症における免疫異常を解析するとともに、MYH9 異常症の診断を大学の研究室で診断するための系を作製したが、この結果を勘案して先天性血小板減少症を網羅的に診断するシステムの構築が必要と考えられ、「ターゲットシーケンス」を導入する方針とした。

ターゲットシーケンスとは、目的領域のゲノムを PCR により増幅し、次世代シーケンサーを用いてディープシーケンスを行なうことにより、増幅された領域の変異解析を効率よく迅速に行うことが可能な塩基配列決定法である。複数の疾患関連遺伝子の体細胞変異を同時に高解像度で評価することができ、また複数の検体を同時に解析することも可能である為、臨床検体のスクリーニングに適している。この方法により、

(a) MYH9 遺伝子の全エクソンの塩基配列の決定が可能となり (b) 先天性血小板減少症の全エクソンの塩基配列が同時に評価できるため、既知の先天性血小板減少症であれば、診断が一回の操作で可能となることが期待される。

さらに昨年度の研究を敷衍して血小板減少症を示す 1 例について経時的にリンパ球機能を評価し、血小板減少症との関連を精査した。

B. 研究方法

防衛医科大学校小児科で診療を受けている血小板減少症の症例に対して、文書による同意を得た後に、末梢血単核球を比重遠心法により分離して常法により DNA を抽出する。この DNA に対して、MYH9 異常症において変異が報告されている部位に

ついて PCR (polymerase chain reaction) を用いて DNA 断片を増幅し、常法によりダイレクトシーケンスを行って塩基配列を決定することにより変異の有無を検討した。また、同じ患者 DNA を使用してライフテクノロジーズ社の半導体シーケンサ Ion Torrent PGM を使用することにより一回の処理で同時に複数の領域の塩基配列決定を行なう。

また、昨年と同様にベクトン・ディッキンソン社製の FACSCalibur™ フローサイトメーターを使用して細胞の表面抗原の分析を行なった。並行して末梢血単核球から DNA を抽出し、TREC (T cell receptor recombination circles) と KREC (Kappa-chain recombination excision circles) について real time PCR による定量を行なう。

(倫理面への配慮)

患者に対する倫理的面での配慮として、すべての調査研究はヘルシンキ宣言 (1964 年世界医師会において策定、2000 年改訂) を遵守して行われた。すなわち、新たに検体を採取する必要のある被験者には、研究の目的・危険性・研究に伴う利益と不利益を説明した上で、書面で同意を得、同意の撤回が可能であることについても説明した。死亡例を含む後方視的な検討においては、各施設から匿名化された情報のみを収集し、各研究分担者は症例の個人情報把握できないようにした。上記の処置により、研究対象者に対する不利益は発生しなかったと考えられた。また、研究方法の特性上、研究による危険性は存在しない。

C. 研究結果

(i) MYH9 異常症の遺伝子診断

昨年度に確立した MYH9 異常症の診断の系を実際に血小板減少症の 4 症例についてこれを応用した。この結果、この 4 例には MYH9 遺伝子の既知の変異は検出されなかった。これは、(i) これらの症例が MYH9 異常症ではない (ii) これらの症例は MYH9 異常症であるが、今回検討した領域の外に変異が存在するの何れかによると考えられた。この二つの問題を同時に解決する為に、「ターゲットシーケンス」を導入する方針とした。この方法が確立すれば、(i)' MYH9 遺伝子の既知変異以外の部分の変異の有無も網羅的に評価できる (ii)' MYH9 遺伝子以外の既知の先天性血小板減少症の原因遺伝子の変異も網羅的に評価できる点で臨床に寄与する情報が多いと考えられた。

(ii) 先天性血小板減少症の遺伝子診断システムの構築

上述したターゲットシーケンスの対象とした先天性血小板減少症の遺伝子 (33 遺伝子、700 exon) を表に示す。これらは、pubmed において “congenital thrombocytopenia” もしくは “familial thrombocytopenia” をキーワードとして検索した文献によった。現在これらの遺伝子の各 exon について Ion ampliseq designer でカスタムパネルをデザインし、塩基配列の決定の為に最適な条件の設定について検討を行っている。

【表 1】今回診断システムに組み込んだ先天性血小板減少症

今回診断システムに組み込んだ 33 遺伝子を示した。Exon 数の合計は 700 である。

遺伝子		染色体上の位置	Exon 数	病名	略号
MYH9	Myosin, Heavy Chain 9	22q13.1	67	MYH-related disease	MHA, SBS, FTNS, EPTS
GPIba	Glycoprotein Iba	17pter-p12	2	Bernard-Soulier syndrome	BSS
GPIbβ	Glycoprotein Ibβ	22q11.2	2	Bernard-Soulier syndrome	BSS
GPIX	Glycoprotein IX	3q21.3	3	Bernard-Soulier syndrome	BSS
ACTN1	Actinin, Alpha 1	14q24.1	36	(Autosomal dominant macrothrombocytopenia)	
FLI-1	Friend Leukemia Virus Integration 1	11q24.3	16	Paris-Trousseau type thrombocytopenia, Jacobsen's syndrome	TCPT
FLNA	Filamin A	Xq28	67	(X-linked dominant thrombocytopenia)	
GATA1	GATA Binding Protein 1	Xp11.23	6	X-linked thrombocytopenia and dyserythropoiesis with or without anemia	XLTT
ITGA2B	Integrins alpha 2B	17q21.32	35	Glanzmann thrombasthenia	
ITGB3	Integrins beta 3	17q21.32	14	Glanzmann thrombasthenia	
NBEAL2	Neurobeachin-Like 2	3p21.31	81	Gray platelet syndrome	GPS
TUBB1	Tubulin beta-1	20q13.32	3	(Autosomal dominant macrothrombocytopenia)	
VWF	Von Willebrand Factor	12p13.3	61	Montreal platelet syndrome	MPS
ABCG5	ATP-Binding Cassette, Sub-Family G (WHITE), Member 5	2p21	13	Thrombocytopenia associated with sitosterolaemia	
ABCG8	ATP-Binding Cassette, Sub-Family G (WHITE), Member 8	2p21	13	Thrombocytopenia associated with sitosterolaemia	
MYL9	Myosin Light Chain 9	20q11.23	4		
c-MPL	Myeloproliferative Leukemia Virus Oncogene	1p34.2	11	Amegakaryocytic thrombocytopenia	CAMT
RBM8A	RNA Binding Motif Protein 8A	1q21.1	6	Thrombocytopenia with absent radii	TAR
RUNX1	Runt-Related Transcription Factor 1	21q22.3	19	Familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia	FDP/AML
ANKRD26	Ankyrin Repeat Domain 26	10p12.1	31	ANKLD26-related thrombocytopenia	
HOXA11	Homeobox A11	7p15.2	2	Amegakaryocytic thrombocytopenia with radio-ulnar synostosis	CTRUS
CYCS	Cytochrome C	7p21.2	3	(Autosomal dominant nonsyndromic thrombocytopenia)	
WAS	Wiskott-Aldrich Syndrome	Xp11.23	19	Wiskott-Aldrich syndrome, X-linked thrombocytopenia	WAS, XLT
WIPF1	WAS/WASL Interacting Protein Family, Member 1	2q31.2	6	Wiskott-Aldrich syndrome 2, XLT	WAS2, XLT
CBL	Cbl Proto-Oncogene	11q23.3	14	Familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia	FDP/AML
ACBD5	Acyl-coenzyme A binding domain containing protein 5	10p12.1	22	(Autosomal dominant inherited thrombocytopenia)	
MASTL	Microtubule associated serine threonine like kinase	10p12.1	19	(Autosomal dominant inherited thrombocytopenia)	
SBF2	SET Binding Factor 2	11p15.4	40	Charcot-Marie Tooth Disease type4B2	
ETS-1	V-Ets Avian Erythroblastosis Virus E26 Oncogene Homolog 1	11q23.3	11	Paris-Trousseau type thrombocytopenia, Jacobsen's syndrome	
COMT	Catechol-O-methyltransferase	22q11.21	17	22q11 deletion syndrome (which includes velo-cardio-facial (VCF) syndrome) and DiGeorge syndrome (DGS)	
TBX1	Testis-Specific T-Box Protein	22q11.21	10	22q11 deletion syndrome (which includes velo-cardio-facial (VCF) syndrome) and DiGeorge syndrome (DGS)	
MECOM	MDS1 And EVI1 Complex Locus	3q26.2	31	Deletion of the 3q26 (region including the EVI1 and MDS1 genes)	
PTPN11	Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 11	12q24.1	16	Amegakaryocytic thrombocytopenia in Noonan syndrome	

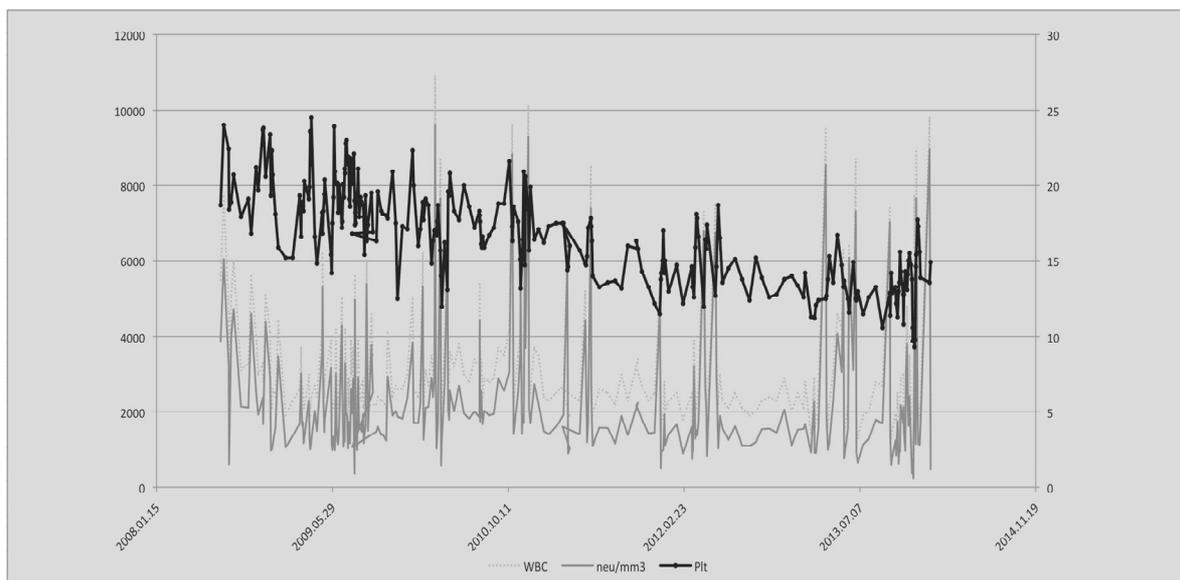
(iii) 血小板減少症の症例のリンパ球機能についての経時的評価

昨年度の研究で、同じ症例の血小板数・免疫機能の評価を時系列で比較する必要性を指摘した。今回、基礎疾患として原発性免疫不全症があり、免疫性血小板減少症（特発性血小板減少症紫斑病）が否定された一症例について、経時的にリンパ球機能と血小板数の相関を検討し、表2・図の様な結果を得た。この結果より、免疫不全症の進行と血小板減少症の進行が相関している可能性を指摘することができる。この症例については全エクソン解析により疾患責任遺伝子の候補遺伝子を特定する作業が進行中であり、近い将来免疫不全症と血小板減少症の関係について新たな知見が得られると見込まれる。

【表2】症例の免疫細胞の分布の経時的変化

	Surface marker	2009.6	2012.2	2013.11	Gate
T cell	CD3	87.17	48.60	62.25	%Lym
Helper T cell	CD4	43.83	46.03	30.80	%CD3Lym
Cytotoxic T cell	CD8	35.15	46.35	27.44	%CD3Lym
	CD4/CD8	1.25	0.99	1.12	
Memory T cell	CD4+CD45RO	0.03	28.91	25.29	%CD4CD3Lym
Thymic naive T cell	CD45RA+CD31+	69.05	61.76	52.45	%CD4CD3Lym
Central naive T cell	CD45RA+CD31-	7.56	5.51	7.78	%CD4CD3Lym
Treg	CD25+CD127-±	0.00	7.28	8.93	%CD4CD3Lym
ALPS criteria (DNT)	CD4-CD8-CD3+αβT+		0.90	1.57	%CD3TCRαβ
γδT cell	γδT	13.08	3.28	15.11	%CD3
NKT cell	CD3+TCRV2α+TCRV1β+	0.05	0.09	0.10	%CD3
B cell	CD19	3.98	28.34	11.13	%Lym
Transitional B cell	CD38+IgM+high			0.83	%CD19Lym
Plasma cell	CD38+IgM-high			0.56	%CD19Lym
pre-B2 cell (CSR B)	CD19+IgD-IgM-			0.68	%CD19Lym
Naïve B cell	CD19+CD27-IgD+	81.72	97.28	97.70	%CD19Lym
Memory B cell	CD19+CD27+	14.28	1.94	2.27	%CD19Lym
IgM memory B cell	CD19+CD27+IgD+	8.57	1.79	1.64	%CD19Lym
Switched memory B cell	CD19+CD27+IgD-	5.71	11.79	0.63	%CD19Lym
	IgK	46.49	44.57	43.46	%CD19Lym
	IgL	44.97	44.05	45.54	%CD19Lym
	KL positive	2.09	0.27	0.05	%CD19Lym
	CD38-CD24++	22.03	6.02	4.23	%CD19Lym
	CD38+CD24+	37.37	10.19	81.74	%CD19Lym
	CD38+CD24++	39.31	69.91	10.08	%CD19Lym
NK cell	CD3-CD16+CD56+	0.88	4.31	31.94	%Lym
pDC	Lin-HLADR+CD123+		0.23	0.16	%WBC
mDC	Lin-HLADR+CD11c+		0.29	0.21	%WBC
	TREC	0	0	0	
Lymphocyte turnover/proliferation marker	cjKREC	3.19E+03	3.80E+03	2.91E+04	
	sjKREC	5.30E+03	2.90E+04	1.39E+04	

【図】 症例の血小板数（黒実線）、全白血球数（灰色点線）、好中球数（灰色実線）の経時的変化



D. 考察

- (i) *MYH9* 異常症の診断の系は、ある程度の研究設備のある大学等の医療機関・研究機関で実際の診断に供することが可能であると思われる。今後、既に診断が確定している症例の検体を用いて validation を行う必要がある。
- (ii) 現在開発中の先天性血小板減少症の診断システムは、実際に応用された場合 (a) 誤診による不適切な治療を受けるリスクを抑制し (b) 疾患に応じた長期的予後の予測の精度が改善すると考えられる。現在技術的な条件設定について検討を行っているが、数か月以内には実際に稼働させることができる見通しである。
- (iii) 血小板減少症は (a) 骨髄不全 (b) 免疫性 (c) 細胞骨格・細胞接着因子の異常による疾患 の三つのサブグループに分類することができ、それぞれが免疫担当細胞の機能の異常と関連することが報告されている。この場合、疾患によっては病勢の変化に伴って、血小板数や免疫不全の重症度に変化が起きることが予想される。今回、免疫不全症の基礎疾患がある血小板異常症の症例について、免疫担当細胞の分布・リンパ球機能 (TREC/KREC) の経時的変化を検討することにより、血小板減少症が免疫不全の進行に伴って悪化する様子を観察することができた。従って、先天性血小板減少症の少なくとも一部には、免疫不全症を合併し、免疫不全症と血小板減少症が時間とともに進行する例が存

在する例があることを確認することができた。

E. 結論

- (1) *MYH9* 異常症の簡便な診断の系を完成した。
- (2) 先天性血小板減少症の網羅的な診断が可能な系の開発を進めている。
- (3) 血小板減少症の一部には、免疫不全の進行とともに血小板減少症の進行を示す例が存在することを確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kunishima S, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Muramatsu H, Chiba K, Tanaka H, Miyazaki K, Sakai M, Ohtake M, Kobayashi R, Iguchi A, Niimi G, Otsu M, Takahashi Y, Miyano S, Saito H, Kojima S, Ogawa S. ACTN1 mutations cause congenital macrothrombocytopenia. *Am J Hum Genet.* 3;7:451-458, 2013.
- 2) Noris P, Favier R, Alessi MC, Geddis AE, Kunishima S, Heller PG, Giordano P, Niederhoffer K, Bussel JB, Podda M, Vianelli N, Kersseboom R, Pecci A, Gnam C, Marconi C, Auvrignon A, Cohen W, Yu JC, Iguchi A, Imahiyerobo AM, Boehlen F, Ghalloussi D, De Rocco D, Magini P, Civaschi E, Biino G, Seri M, Savoia A, Balduini CL, Marconi C, Auvrignon A, Cohen W, Yu JC, Iguchi A, Imahiyerobo AM, Boehlen F, Ghalloussi D, De Rocco D, Magini P, Civaschi E, Biino G, Seri M, Savoia A, Balduini CL. ANKRD26-related thrombocytopenia and myeloid malignancies. *Blood.* 122;11:1987-1989, 2013.

- 3) Takagi M, Piao J, Kawaguchi H, Imai C, Ogawa A, Watanabe A, Akiyama K, Kobayashi C, Mori M, Ko K, Mizutani S. Autoimmunity and persistent RAS-mutated clones long after the spontaneous regression of JMML. *Lukemia*. 27;9:1926-1928, 2013.
- 4) Miyauchi J, Kawaguchi H. Fetal liver stromal cells support blast growth in transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome through GM-CSF. *Journal of Cellular Biochemistry*. (in press)

2. 学会発表

今回の研究の成果の一部は第76回日本血液学会学術集会(2014年10月、大阪)、第57回日本小児血液・がん学会学術集会(2014年11月、岡山)で報告する予定である。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし