

先天性無巨核球性血小板減少症におけるトロンボポ イエチン受容体(*c-mpl*)遺伝子異常

井原, 健二
九州大学大学院医学研究院成長発達医学（小児科学）

<https://doi.org/10.15017/7236448>

出版情報：福岡醫學雑誌. 91 (9), pp.207-211, 2000-09-25. 福岡医学会
バージョン：
権利関係：



第2回福岡医学会賞受賞者及び受賞論文紹介

先天性無巨核球性血小板減少症における
トロンボポイエチン受容体 (*c-mpl*) 遺伝子異常九州大学大学院医学研究院成長発達医学 (小児科学)
井 原 健 二Identification of Mutations in *c-mpl* Gene in Congenital
Amegakaryocytic Thrombocytopenia

Proc Natl Acad Sci USA 96; 3132-3136, 1999

はじめに

血球系の成熟を司る多くのサイトカインの中で、トロンボポイエチン (TPO) が巨核球系細胞の分化増殖に最も重要なサイトカインと考えられている。TPO は主に肝臓で産生されるサイトカインで、主として巨核球の分化と血小板産生を刺激する作用がある (図1)。一方、TPO 受容体に関しては、1990年マウス骨髓性白血病を起こすレトロウイルス (MPLV) の癌遺伝子 *v-mpl* の同定後にサイトカインスーパーファミリーに属する *c-mpl* がクローニングされ、これが巨核球系細胞や血小板に発現する TPO 受容体であることが証明された。ヒト *c-Mpl* には膜貫通型の受容体として P 型と K 型、可溶型として S 型が存在する。シグナル伝

達に必要な Box 1, Box 2 を持つ P 型のみが TPO 受容体としての機能を有する。ヒト *c-mpl* 遺伝子は 12 個のエキソンから構成され、細胞外領域はエキソン 1 から 9、膜貫通領域はエキソン 10、細胞内領域はエキソン 11 と 12 にコードされ、巨核球前駆細胞、巨核球、血小板、CD 34 陽性細胞のほか脳や胎児期の肝臓で発現している¹⁾。また、*c-mpl* 遺伝子を人工的に欠失させたマウス (ノックアウトマウス) が、すでにいくつかの研究グループから発表され、骨髓巨核球細胞と末梢血中の血小板の著減を呈したと報告されている²⁾。しかしながら *c-mpl* 遺伝子異常による遺伝病は、ノックアウトマウスと同様に先天性血小板減少症をきたすと推定されているが、これまで同定されていなかった。今回、先天性無巨核球性血小板減少症 (CAMT) と診断し、血清中 TPO が異常高値を呈するとともに特徴的な神経系合併症を有する患者の *c-mpl* 遺伝子を解析した³⁾⁴⁾。

症 例

症 例：1989 年生 女児

家族歴：血族結婚なし。

病 歴：生直後より末梢血中の血小板数の減少と骨髓巨核球の著減を認め、CAMT と診断。血小板数は、1 歳時には $3 \text{ 万}/\mu\text{L}$ 程度、3 歳頃から $1 \text{ 万}/\mu\text{L}$ 以下となり推移している。各種治療が無効で、貧血も徐々に

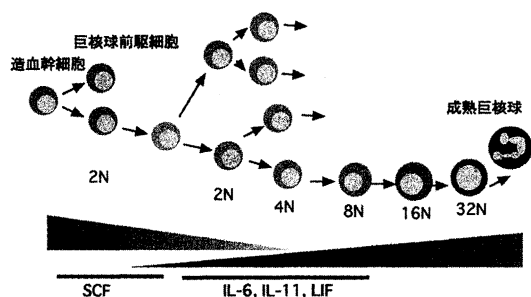


図1 骨髓巨核球・血小板の分化と各種サイトカインの関わり

進行している。6歳時の血清トロンボポイエチン値は、18.47 fmol/mlと著増していた。神経学的な評価では、生後10ヶ月時の頭部MR画像で小脳虫部の低形成と後頭蓋窩に嚢胞形成が認められたが、臨床的に明らかな異常を認めず、知的な発達も正常であった。

方 法

(1) 患者骨髓単核球細胞のコロニー形成能の解析

患者骨髓より単核球細胞採取し、インビトロで培養後、各造血系コロニー形成能を検討した。また、TPO添加後の巨核球系コロニー形成能を解析した。

(2) 患者骨髓単核球細胞における *c-mpl* 遺伝子発現解析

患者骨髓単核球細胞からRNAを抽出し、ノーザンプロット法とRT-PCR法により *c-mpl* 遺伝子発現を解析した。

(3) 患者 *c-mpl* 遺伝子の塩基配列の解析

患者末梢血よりDNAを抽出後、*c-mpl* 遺伝子の12個のエキソンとエキソン・イントロン境界領域をカバーするようにPCR法にて *c-mpl* 遺伝子を増幅した。プロモーター領域を含めてエキソン1から6、エキソン7から8、エキソン9、エキソン10、エキソン11から12をそれぞれ増幅し、ダイレクトシーケンス法にてプロモーター領域および蛋白をコードする領域の全塩基配列を決定した。

(4) PCR-制限酵素消化法による家族内検索

PCRにより増幅されたエキソン4の380 bpのバンドは制限酵素 *Pvu* IIにより175 bp、105 bpと100 bpに消化されるが、Q186 Xにより1ヶ所の *Pvu* II部位が消失し、275 bpと105 bpになる。また、エキソン10の265 bpのバンドは制限酵素 *Bfa* Iにより162 bp、70 bpと33 bpに消化されるが、1499 delTにより1ヶ所の *Bfa* I部位が消失し、195 bpと70 bpのみに消化される。この方法で、患者の両親、弟と妹におけるこれらの変異をスクリーニングした。

結 果

(1) コロニー形成能

本症例と正常小児コントロールから採取した骨髓単核球を、SCF+IL-3+IL-6+Epo存在下で培養した結果、コントロールに比して本症例では巨核球系コロ

ニーのみならず、赤芽球系、骨髓球系のコロニーの形成も不良であった。さらに、TPO存在下の培養では、コントロールではTPOの濃度依存性にコロニー形成が増加したが、本症例では巨核球系のコロニーの増殖が全くみられなかった。

(2) *c-mpl* 遺伝子発現

CAMT患者の骨髓単核球細胞の *c-mpl* 遺伝子の発現は、ノーザンプロット法では検出できなかった。RT-PCR法にても、血液幹細胞中に発現する *c-kit* 遺伝子は正常に観察されたが、*c-mpl* 遺伝子の発現は確認できなかった。

(3) CAMT患者の *c-mpl* 遺伝子の塩基配列の解析

ダイレクトシーケンス法にてプロモーター領域および蛋白をコードする領域の全塩基配列を決定した。その結果、エキソン4とエキソン10に点突然変異をそれぞれヘテロで同定した。1つはエキソン4内に位置する、186番目のアミノ酸のコードンのCからTへの変異によりグルタミンがストップコドンに変化するナンセンス変異Q186 Xで、他の1つはエキソン10内に位置する、1499番目のTの1塩基欠失1499 delTを同定した(図2)。

(4) *c-mpl* 遺伝子変異の家系解析

家族内検索の結果、母親および弟はQ186 Xを、父親は1499 delTをヘテロで有していた(図3)。

考 察

先天性無巨核球性血小板減少症(CAMT)は、乳児期に発症し単独の血小板減少と巨核球減少を呈する稀な疾患である。ヒトのCAMTとマウスの *c-mpl* 遺伝子欠損の表現型の類似性から、我々は日本人女児CAMT患者における *c-mpl* 遺伝子を解析し、その結果、エキソン4にナンセンス変異(Q186 X)とエキソン10にフレームシフト変異(1499 delT)をともにヘテロで同定した。Q186 XによりTPO受容体は細胞外ドメインの途中で切断され、全長の71%を欠くため細胞表面には発現できないと推定される。また1499 delTという1塩基欠失によりフレームシフトが起こり、細胞膜貫通領域の途中から異常な13アミノ酸が付加された後に切断され、全長の21%を欠く。細胞膜貫通領域の途中の変異のため細胞表面には発現できない可能性が高く、発現したとしても細胞内領域を全て欠

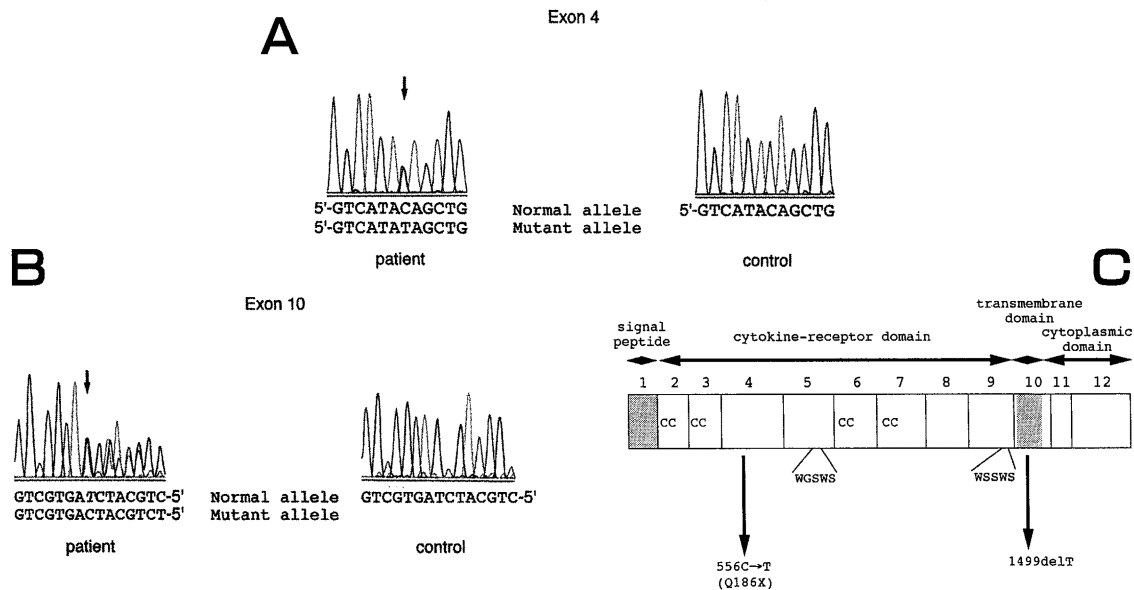


図2 CAMT患者に同定された2ヶ所の*c-mpl*遺伝子変異

- (A) 患者と健常コントロールの*c-mpl*エクソン4の塩基配列. CAMT患者において, cDNAの556番塩基(186番コドン)のCからTへの変異によりグルタミンがストップコドンに変化するナンセンス変異Q186Xをヘテロで検出した.
- (B) 患者と健常コントロールの*c-mpl*エクソン10の塩基配列. CAMT患者において, エクソン10内に位置する, 1499番塩基のTの1塩基欠失1499 delTをヘテロで検出した.
- (C) ヒトc-Mplの構造と, CAMT患者に同定された2ヶ所の*c-mpl*遺伝子変異の位置

くため受容体として機能しないと推定された. スプライシングバリエーションのc-Mpl S型は膜貫通領域を欠き, 可溶型のアイソフォームと考えられ, TPOの阻害作用を有すると推定されている. したがって1499 delTアレルからはこのような可溶型が分泌される可能性がありTPOの作用を阻害するかもしれない. 以上より患者の*c-mpl*遺伝子は両アレルとも機能し得ず, この患者のCAMTの原因であると考えられた.

CAMTは, 骨格系を含めた様々な先天奇形の有無からいくつかの病型が知られており, 遺伝的には多様な疾患と考えられている. CAMTは, 先天性無巨核球性血小板減少症に骨欠失を伴う疾患(TAR症候群)とは異なる疾患群である. TAR症候群は, 1歳以降にはしばしば自然に巨核球造血が回復し, また骨格系の異常や時に先天性心臓病を伴う. TAR症候群においては, *c-mpl*遺伝子発現が正常であったという報告があり, シグナル伝達の異常の可能性が示唆されている.

過去に, 大脳や小脳の形成不全などの中枢神経異常

の合併をCAMTの兄弟例に認めたという報告がある. 今回の我々の症例で認められた小脳虫部の低形成は軽度であり, 無症状であった. *c-mpl*は巨核球前駆細胞, 未熟造血幹細胞, 血小板, 胎児期の肝臓のほか, 脳で発現していることが報告されていることから, *c-mpl*遺伝子の欠損が胎児期の脳形成に影響を与えた可能性がある. したがって, *c-mpl*欠損マウスの脳に関してさらに研究を進める必要がある.

本研究の結果, 中枢神経系の異常を伴うが他の外表奇形を伴わないタイプのCAMTは, TPO受容体の機能を損なう*c-mpl*遺伝子異常が原因であることが示唆された. 今後, さらに多くのCAMT患者のTPO受容体*c-mpl*遺伝子を解析することは, CAMTの病態生理を理解する上で重要であるのみならず, 診断・遺伝カウンセリングや, 合成TPO製剤の臨床応用への治療判断にとって有用であると考えられる.

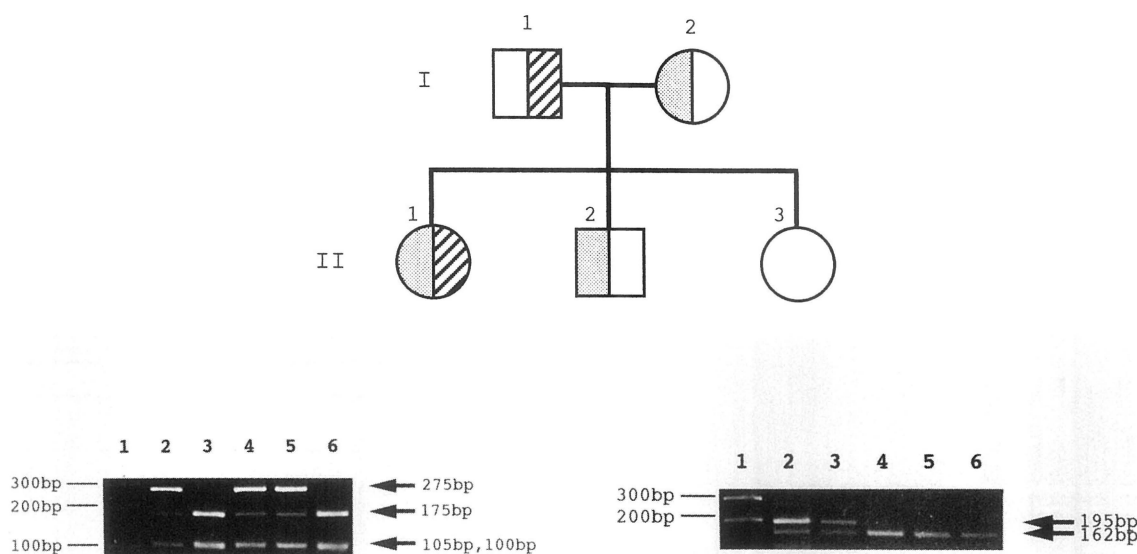


図3 CAMT患者における *c-mpl* 遺伝子変異検索

(A) 家族の樹形図。半分がドットで塗られた○または□は、Q 186 X の保因を示し、半分が斜線で塗られた○または□は、1499 delT の保因を示す。発端者 (CAMT 患者) は II-1。

(B) PCR-制限酵素消化法による Q 186 X の家族内検索

エキソン 4 の 380 bp のフラグメントは制限酵素 *Pvu* II により 175 bp, 105 bp と 100 bp に消化されるが、Q 186 X により 1 ケ所の *Pvu* II 部位が消失し、275 bp と 105 bp になる。

患者 (列 2)、母 (列 4) と弟 (列 5) は、この変異をヘテロで保因するが、父と妹は保因しない。列 1 は分子サイズマーカー。

(C) PCR-制限酵素消化法による 1499 delT の検索

エキソン 10 の 265 bp のフラグメントは制限酵素 *Bfa* I により 162 bp, 70 bp と 33 bp に消化されるが、1499 delT により 1 ケ所の *Bfa* I 部位が消失し、195 bp と 70 bp になる (図には 195 bp と 162 bp のバンドのみ示す)。患者 (列 2)、父 (列 3) はこの変異をヘテロで保因するが、母と弟と妹は保因しない。列 1 は分子サイズマーカー。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に対し第 2 回福岡医学会賞を授与いただき、福岡医学会幹事の諸先生方に深謝申し上げます。また研究のご指導いただきました九州大学大学院医学研究院成長発達医学、原 寿郎教授、ならびに浜の町病院小児科部長、石井榮一先生に心より御礼申し上げます。

文 献

1) Columbyova L, Loda M and Scadden DT: Thrombopoietin receptor expression in human cancer cell lines and primary tissues. *Cancer Res.* 55: 3509-3512, 1995.

2) Gurney AL, Carver-Moore K, de Sauvage FJ and Moore MW: Thrombocytopenia in *c-mpl*-deficient mice. *Science.* 265: 1445-1447, 1994.

3) Ihara K, Ishii E, Eguchi M, Takada H, Suminoe A, Good RA and Hara T: Identification of mutations in the *c-mpl* gene in congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96: 3132-3136, 1999.

4) Muraoka K, Ishii E, Tsuji K, Yamamoto S, Yamaguchi H, Hara T, Koga H, Nakahata T and Miyazaki S: Defective response to thrombopoietin and impaired expression of *c-mpl* mRNA of bone marrow cells in congenital amegakaryocytic throm-

bocytopenia. Br J Haematol. 96: 287-292, 1997.

著者プロフィール

井原 健二 (いはら けんじ)

九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野 助手 医学博士

1989年 九州大学医学部卒業 '89年6月-'91年3月 同大学医学部附属病院研修医(小児科) '91年4月 同大学大学院医学系研究科内科系専攻入学 '95年4月 同大学生体防御医学研究所研究生(生化学) '95年6月 福岡市立こども病院(第二内科医長) '96年6月 九州大学医学部附属病院 医員(小児科) '97年6月 同病院 助手(小児科) '98年9月 九州大学医学部 助手(小児科) 2000年4月 同大学大学院医学研究院成長発達医学分野 助手 現在に至る。◇研究テーマ:小児遺伝病の分子遺伝学的・分子免疫学的解析。◇趣味:野球をすること・観ること, 絵画鑑賞。

