

審査の結果の要旨

氏名 遠矢 嵩

本研究は家族性血小板減少症の患者における血液腫瘍発症機序を明らかにするため、家族性血小板減少症患者(FPD/AML)の検体を用いて次世代シーケンス技術により腫瘍発症時に出現する変異の同定を行い、さらにその変異体機能解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 血小板減少家系についての全国調査により7家系13人のFPD/AMLが同定された。
13人のうち7人が骨髄異形成症候群(MDS)、急性骨髄性白血病(AML)などの造血器腫瘍を発症していた。FPD/AML患者とそれ以外の血小板減少家系の患者では診断時の血小板数等の臨床データに有意な差は認めなかった。
2. FPD/AMLのうち同一家系(RUNX1_p.Phe303fsのヘテロ変異を有する家系)の2人について、前白血病期(MDSまたは骨髄線維症)及びAML診断時の骨髄検体から採取したゲノムDNAを用いてWhole exome sequencingを行った。口腔粘膜から採取したゲノムDNAをリファレンスとしてSanger sequencingでバリデーションを行った結果、MDSからAMLになった患者で10個、骨髄線維症からAMLになった患者で8個の体細胞変異が確認された。これらの変異はdeep sequencingでも確認された。両患者の前白血病期およびAML診断時に共通してCDC25Cの点突然変異が同定された。
3. 13人のFPD/AML患者についてCDC25Cのdeep sequencingを行ったところ、13人中7人でCDC25Cの体細胞変異が同定された。このうち4人は造血器腫瘍を発症している患者であったが、3人は血小板減少のみの患者であった。血小板減少のみで造血器腫瘍を発症していない3人については、CDC25C変異のvariant allele frequencyは数%であり極一部のクローンのみがCDC25C変異を持っていると考えられた。また、90例の孤発性MDSおよび53例の孤発性AMLにおいて、CDC25C変異は1例のMDSのみでしか認められなかった。
4. 野生型および変異型のCDC25Cを293T細胞にtransfectionしWestern blottingを行ったところ、変異体ではSer216のリン酸化が低下していることが示された。また、CDC25Cと14-3-3またはCDC25CとcTAK1をco-transfectionした293Tで免疫沈降実験を行ったところ、変異体では14-3-3およびcTAK1との結合が低下していることも示された。さらにCDC25Cを感染させたBa/F3細胞をThymidineによりG1/S期にsynchronizeした上で免疫染色を行ったところ、変異型CDC25Cは野生型に比べて核に局在している事が示された。これらの結果から、CDC25C変異

体は cTAK1 によるリン酸化を受けにくくなり、その結果 14-3-3 との結合が阻害されるために間期においても核内にとどまると考えられた。

5. 野生型および変異型の CDC25C を感染させた Ba/F3 細胞について、thymidine で細胞周期を synchronize した後に wash し、nocodazole を加えて細胞周期が M 期に達すると block されるようにした系において、変異型 CDC25C は野生型や mock に比べてわずかながら細胞周期の進行を促進する事が示された。放射線照射により DNA damage を与えるとこの差は助長された。

6. Deep sequencing の variant allele frequency (VAF)を用いて clonal evolution model について検討すると、Whole exome sequencing を行った 2 症例いずれでも発症早期に CDC25C 変異が生じた可能性が示唆された。MDS から AML になった患者の AML 発症時の骨髓検体を single cell sort し、個々の細胞について変異を見た結果、この clonal evolution model と矛盾しない結果が得られた。

7. 13 例の FPD/AML 患者について GATA2 変異の有無を確認すると、3 例の患者で GATA2 の変異が確認され、この 3 例はいずれも CDC25C 変異を持っていた。うち 1 例について治療の各時点において骨髓中の VAF を調べると、GATA2 変異の VAF は鏡検上の芽球の割合とほぼ一致して推移していたが、CDC25C 変異の VAF は高い割合を保っていた。この患者は芽球以外の細胞にも異型性が認められた患者であり、治療中芽球の割合が少ない時期でも背景の細胞には異型性が認められた。

8. RUNX1_p.Arg174X および p.Phe303fs を感染させた Ba/F3 細胞において、cDNA を用いた定量的 PCR により Gadd45a 等の DNA 修復遺伝子の発現が低下しており、また γ H2AX のリン酸化を免疫染色で評価したところ野生型 RUNX1 や mock を感染させた Ba/F3 に比べて DNA damage が蓄積している事が示された。さらに 5. と同様の系を用いて細胞周期を調べると、mock を感染させた Ba/F3 細胞に比べて RUNX1 変異体単独感染では細胞周期の進行が抑制されるのに対し、RUNX1 変異体と CDC25C 変異体を共感染させた Ba/F3 の場合は逆に細胞周期の進行が亢進している事が示された。この事から、RUNX1 変異と CDC25C 変異が協同的に働く事により変異が蓄積し、GATA2 等の変異が更に生じる事で造血器腫瘍発症に寄与している事が示唆されると考えられた。

以上、本論文は患者検体を用いた次世代シーケンスにより、家族性血小板異常症の造血器腫瘍発症過程の比較的早い段階において CDC25C の変異が高率に生じることを示した。また、in vitro の実験による機能解析の結果から、CDC25C の変異体により checkpoint 機構が破綻し、DNA damage による cell cycle arrest が阻害される結果、変異が蓄積しやすい状態になり、造血器腫瘍発症に寄与しているものと考えられた。造血器腫瘍発症において新規の変異を見出しており血液腫瘍学の発展に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。