HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ヒト家族性血小板増多をきたすTHPO変異の解析およびマウスにおける血小板高値に関する遺伝的考察［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	木村, 弘幸
Description	配架番号：2872
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16148号
Issue Date	2024-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/93548
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	KIMURA_Hiroyuki_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏名　木　村　弘　幸

学 位 論 文 題 名

ヒト家族性血小板増多をきたす *THPO* 変異の解析および
マウスにおける血小板高値に関する遺伝的考察
(Genetic analysis of the human hereditary thrombocythemia and thrombocythemia in mice)

【背景と目的】家族性血小板増多症（hereditary thrombocythemia, HT）は常染色体優性遺伝を呈し、その臨床像は本態性血小板血症に類似する。その原因として、*THPO, MPL, JAK2* の胚細胞変異が報告されている。我々は新規の家族性血小板増多症家系の原因遺伝子を同定し、その生理的機能を解析することで発症機構を明らかにすることを目標とした。HT の原因としていくつかの *THPO* の胚細胞変異が報告されているものの、それぞれの mRNA の発現、翻訳効率については直接比較されていない。そこで我々は既報において報告されているそれぞれの *THPO* 変異をクローニングし、それぞれのトランスクリプト発現量、スプライシングパターン、蛋白発現量を比較することにした。

【材料と方法】患者とその弟、母親の末梢血よりゲノム DNA を抽出した。抽出したゲノム DNA を用いて、*THPO, JAK2, MPL, CALR* をサンガー法でシークエンスした。患者より得られた変異型と野生型の *THPO* を PCR 法で増幅してクローニングし、発現ベクターである pcDNA3 ベクターに組み込んで、変異を含むベクターと野生型のベクターを作成した。作成したベクターをヒト胎児腎細胞由来の細胞株 HEK293T にトランスフェクションした。トランスフェクションから 72 時間後に培養上清と細胞を回収した。回収した細胞より抽出した RNA から cDNA を作成した。培養上清中の THPO タンパク濃度 ELISA 法で測定し、cDNA を用いた RT-PCR で野生型および変異型 THPO 転写産物の性状を解析し、RQ-PCR で *THPO* mRNA の発現量を解析した。また、細胞上清とライセートでの THPO タンパクの発現をウエスタンブロット法で解析した。野生型 *THPO* 遺伝子と、既報において報告されている変異型 *THPO* 遺伝子を部位特異的変異導入を用いて PCR 法で増幅してクローニングした。変異型と野生型の *THPO* を含んだベクターをヒト胎児腎細胞由来細胞株である HEK293T にトランスフェクションし、72 時間後に培養上清と細胞を回収した。培養上清中の THPO タンパクの濃度をウエスタンブロット法で、*THPO* 転写産物の性状を RT-PCR 法で、*THPO* の mRNA の発現量を比較した。

【結果】サンガー法でシークエンスを行って *THPO* の塩基配列を解析したところ、発端者と弟で *THPO* c.13+1 で G>A の一塩基置換を同定したが、その母親にはみられなかった。変異型 *THPO* をトランスフェクションした細胞では、エクソン 3 を欠く *THPO* の転写産物がみられた。RQ-PCR では、野生型 *THPO* と変異型 *THPO* で *THPO* mRNA の発現量に有意差を認めなかった。培養上清、細胞中のいずれにおいても変異型 *THPO* で有意に THPO タンパクが高発現していた。
THPO c.-31G>T では、変異がスプライシングサイトに位置していないにも関わらず *THPO* のエクソン 3 を欠く転写産物がみられた。それぞれの変異型 *THPO* と野生型の *THPO* では mRNA の発現量に統計学的有意差はなく、変異型 *THPO* をトランスフェクションした培養上清ではいずれ

も野生型 *THPO* より THPO タンパクの発現が有意に亢進していた一方で、それぞれの変異の間では THPO タンパクの発現量に有意差がみられなかった。
【考察】当該家系において、*THPO* c.13+1G>A という胚細胞変異が、スプライシング異常によって THPO タンパクの翻訳を妨げている uORF7 を消失させることで翻訳亢進を介して HT の原因となる遺伝子変異である可能性が示唆された。既報におけるどの変異においても、統計学的に等しく THPO タンパクの翻訳が亢進する。*THPO* c.-31G>T がスプライシングサイトに位置していないにも関わらずスプライシング異常を引き起こすメカニズムとしては premature termination codons (PTCs)による影響が考えられている。PTCs を含むエクソンは、スプライシングの際に取り除かれてしまうことが報告されており、これは nonsense-associated altered splicing (NAS) と呼ばれている 。*THPO* c.-31G>T では NAS によって PTC を含んだエクソン 3 がスプライシングによって取り除かれ、エクソン 3 スキッピングが生じたと考えられた。
【結論】新たな家族性血小板増多症家系において、原因遺伝子として *THPO* c.13+1G>A の胚細胞変異を同定した。当該変異が *THPO* 遺伝子のスプライシングドナーサイト に位置するため、エクソン 3 スキッピングを生じ、THPO の翻訳を抑制している uORF の構造を破壊することで THPO タンパクの過剰生産を引き起こし、家族性血小板増多症の発症に寄与することを示した。それぞれの *THPO* 変異において、統計学上有意差なく THPO タンパクが過剰発現していた。既存の *THPO* 変異でみられる転写産物は uORF7 のフレームシフトまたはエクソン 3 スキッピングのいずれかである。我々はエクソンの途中に終止コドンを生じる変異において、そのエクソンがスプライシングの過程で取り除かれることを示した。

マウスモデルはヒトの疾患を研究に広く用いられている。マウスの血小板数が多いことはよく知られてはいるものの、その機序に関しては明らかではない。我々はこれまでヒトの HT について研究していく過程で、マウスは種そのものがヒトに対して相対的血小板増多を来す遺伝的背景をもっているという仮説を立てた。ヒトの HT の責任遺伝子として報告されている *THPO, MPL, JAK2* 変異をマウスリファレンスゲノムで検索したところ、MPL K39N がマウスにおいては Mpl N39 として種全体で保有していることを見出した。Mpl N39 の動物種は、Mpl K39 の動物種よりも血小板数が高い傾向があり、ヒトにおいても MPL K39N をヘテロに持つ者より、ホモで持つ者の方が血小板数が高い傾向にある。
このことがマウスの血小板数がヒトよりも有意に高い原因の候補である可能性が示唆された。