



Title	ヒト家族性血小板増多をきたすTHP0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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16148
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/93549
Type	doctoral thesis
File Information	KIMURA_Hiroyuki.pdf



学位論文

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)

2024 年 9 月

北 海 道 大 学

木村弘幸

学位論文

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)

2024 年 9 月

北 海 道 大 学

木村弘幸

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
【第一章】新規の家族性血小板増多症家系における遺伝子変異の解析	
緒言	8 頁
方法	10 頁
結果	15 頁
考察	24 頁
総括と結論	28 頁
【第二章】家族性血小板増多症に関連する <i>THPO</i> 遺伝子変異の比較	
緒言	30 頁
方法	32 頁
結果	36 頁
考察	39 頁
総括と結論	42 頁

【第三章】マウスの血小板数と遺伝的背景

緒言	44 頁
方法	45 頁
結果	46 頁
考察	48 頁
総括と結論	52 頁
謝辞	53 頁
利益相反	54 頁
引用文献	55 頁

【発表論文目録および学会発表目録】

本研究の一部は以下の論文に発表した。

【第一章】

著者：Hiroyuki Kimura, Masahiro Onozawa, Junichi Hashiguchi, Daisuke Hidaka, Minoru Kanaya, Toshihiro Matsukawa, Hiromi Okada, Takeshi Kondo, Yoshihiro Matsuno, Takanori Teshima

論文タイトル：Hereditary thrombocythemia due to splicing donor site mutation of *THPO* in a Japanese family

学術雑誌名：Annals of Hematology 2024 Jan;103(1):89-96.

【第二章】

著者：Hiroyuki Kimura, Masahiro Onozawa, Toshihiro Matsukawa, Hideki Goto, Takeshi Kondo, Takanori Teshima

論文タイトル：Relative impact of *THPO* mutation causing hereditary thrombocythemia

学術雑誌名：Experimental Hematology 2024 Mar 26:104208.

【第三章】

著者：Hiroyuki Kimura, Masahiro Onozawa, Takanori Teshima

論文タイトル：Genetic background of thrombocytosis in mice mimicking hereditary thrombocytosis in humans

学術雑誌名：Platelets 2023; 34(1): 2276697

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。我々は家族性血小板増多症家系に新たな *THPO* 遺伝子変異を同定し、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。また、これまでに 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おらず、既報において報告されている全ての *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、蛋白発現量を比較した。マウスモデルはヒトの疾患を研究する際に広く用いられており、マウスの血小板数がヒトよりも多いことはよく知られているが、その機序に関しては明らかではない。我々はヒトの HT について研究していく過程で、いくつかの遺伝子が家系の血小板数を規定していることを見出した。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検証した。

【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ケンスした。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で作成し、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 タンパク発現をウエスタンブロット法で、*THPO* 転写産物の性状および発現量を RT-PCR 法で比較した。マウスのヒトに対する相対的血小板増多については、ヒトの HT の責任遺伝子として報告されている *THPO*, *MPL*, *JAK2* 変異を公開データベース上のマウスリファレンスゲノムと比較した。

【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かかわらず *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。ヒト HT で報告されている *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。

【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 を欠失することで翻訳亢進を介して HT の原因とな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、一様に 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かか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。MPL K39N はヒト HT 家系で同定された MPL Baltimore と呼ばれるものであり、THPO のクリアランス低下により血中 THPO 濃度が上昇して HT を引き起こすことが知られている。マウスでは Mpl39 番目のアミノ酸が N(アスパラギン)であることにより、同様の機序で種として血小板数がヒトよりも相対的に高くなっている可能性が示唆された。

【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で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。哺乳類の血小板数を規定している因子の一つとして、MPL の 39 番目のアミノ酸多型がある可能性を示した。

【略語表】

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

BSA	bovine serum albumin
CML	chronic myeloid leukemia
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
ET	essential thrombocythemia
FISH	fluorescence in situ hybridization
HE	hematoxylin and eosin
HT	hereditary thrombocythemia
mRNA	messenger RNA
NAS	nonsense-associated altered splicing
ORF	open reading frame
PTC	premature termination codon
RQ-PCR	relative quantification polymerase chain reaction
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SNP	single nucleotide polymorphism
uORF	upstream open reading frame
WB	western blotting
5'-UTR	5'-untranslated region

【緒言】

ヒトおよびマウスの血小板数は、いくつかの遺伝子および、それによってコードされるタンパク質によって規定されている。トロンボポエチン(THPO)は主に肝臓で産生されるタンパク質で、巨核球の分化・増殖と血小板産生に重要な役割を持つ成長因子である(Gurney, 1995)。THPO はその受容体である MPL を刺激し、MPL はその下流の JAK2 を活性化することにより JAK-STAT 系に増殖シグナルを伝える(Kaushansky, 1998; Kaushansky, 2006)。

ヒトの血小板増多をきたす疾患として本態性血小板血症(ET) が知られている。ET の原因として、*MPL*, *JAK2*, *CALR* の体細胞変異が知られている。ET は血栓や出血、骨髓線維化、白血病への進展といった合併症を起こす。孤発性の ET と異なり、家系内の遺伝的素因が原因で血小板増多をきたす疾患として家族性血小板増多症(HT)が知られている。HT の病態は ET と類似している。HT の原因として、*THPO*, *MPL*, *JAK2* の胚細胞変異が報告されている。新規の家族性血小板増多症家系の解析、既報の *THPO* 変異間でのスプライシングパターン、THPO 発現量直接比較を行った。ヒトの疾患モデルとしてマウスモデルが広く用いられているが、ヒトに対してマウスの血小板数は高値であることが知られている。ヒトの HT 家系における *THPO* 変異の解析から、マウスの血小板増多が遺伝的に規定されたものであるという仮説に思い至り、比較ゲノム解析によりヒト HT に関わる遺伝子変異をマウスのリファレンスゲノムの中に見出した。

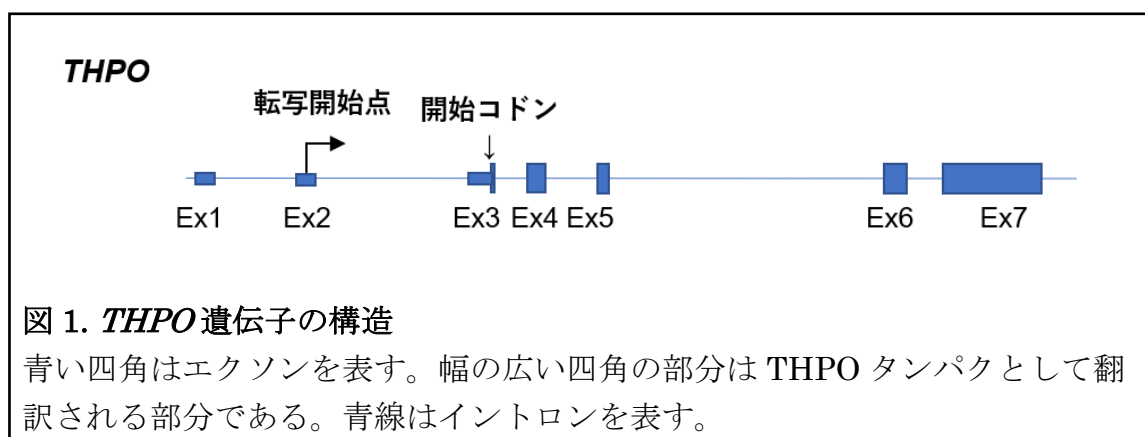
第一章

新規の家族性血小板増多症家系における遺伝子変異の解析

【緒言】

我々は血小板増多を来たし、本態性血小板血症様の病態をとる新たな家系を見出した。血小板増多の家族歴が明らかとなり、原因遺伝子検索を開始した。

本態性血小板血症(ET)は巨核球増加によって血小板数が増加し、血栓あるいは出血の合併症を引き起こし、白血病に至る場合がある骨髓増殖性疾患である。ETの原因として、*JAK2*, *MPL*, *CALR*の体細胞変異が知られている。一方、家族性血小板増多症(HT)は常染色体優性遺伝の形式をとり、その原因として *THPO*, *MPL*, *JAK2*の胚細胞変異が報告されている。トロンボポエチン(THPO)は主に肝臓で産生され、巨核球の分化・増殖と血小板産生に重要な役割を持つ成長因子である。*THPO* 遺伝子は7番染色体の長腕に位置しており(Gurney, 1995)、7つのエクソンを持ち、肝臓における主な転写産物はエクソン2から7のものである(Ghilardi, 1998) (図1)。*MPL*はTHPOをリガンドとする受容体であり、巨核球と血小板の表面に分布する。THPOによって刺激を受けたMPLはJAK2を活性化することによりJAK-STAT系に増殖シグナルを伝える(Kaushansky, 1998; Kaushansky, 2006)。



HTの原因としては *THPO* (Harrison et al, 1998; Jorgensen et al, 1998; Kondo et al, 1998; Wiestner et al, 1998; Ghilardi et al, 1999; Ghilardi et al, 1999; Liu et al, 2008; Graziano et al, 2009; Zhang et al, 2011; Stockklauser et al, 2012; Jung et al, 2020; Prouzet et al, 2020)、*MPL* (Moliterno AR et al, 2004; Ding J et al 2009; Liu K et al, 2009; El-Harith el HA et al, 2009; Teofili et al, 2010)、*JAK2* (Mead et al, 2014) の胚細胞変異が知られている。我々は新たな HT の家系を見出し、*THPO* 遺伝子のスプライシングドナーサイトに位置する一塩基置換(*THPO* c.13+1G>A)を同定した。

THPO c.13+1G>A という変異による転写産物、細胞内での THPO タンパクの発現とプロセッシング、分泌量の変化については明らかにされていない。以

上のような背景をふまえ、*THPO*c.13+1G>A が家族性血小板増多症の発生に寄与する機序を明らかにすることを目的に実験を行った。

【方法】

1. 倫理・コンプライアンス

ヒト末梢血、ヒト骨髄検体を用いた検討においては、ヘルシンキ宣言に則り、臨床研究「新規家族性血小板増多家系の原因遺伝子検索に関する臨床研究」としてプロトコールを作成し、北海道大学病院の自主臨床研究審査委員会の承認を得た（医 17-037）。本研究は患者および家族より書面同意を得て、検体を採取した。

2. 細胞培養

Human embryonic kidney 293 T (HEK293T) 細胞、ヒト肝細胞癌由来細胞株 HepG2 は 10% ウシ胎児血清と 1% ペニシリン・ストレプトマイシンを添加したダルベッコ変法イーグル培地（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO）を用い、37℃、5% CO₂ 下で培養した。

3. 家系

当該家系を図で示す(図 2)。患者は 20 代女性とその弟であった。両者とも血液検査で血小板数の増多がみられた。父親と、父方の祖母も血小板数増多を指摘されていた。一方で母親の血小板数は正常であった。父は慢性骨髄性白血病 (CML) の既往を持つ。

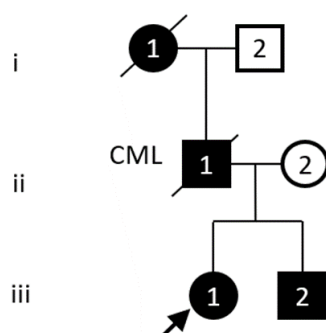


図 2. 新規の家族性血小板増多症家系

丸は女性、四角形は男性を表す。黒塗りは血小板増多がある者を表す。白抜きは血小板数正常の者を表す。矢印は発端者、斜線は死亡を表す。

4. 患者検体

発端者の末梢血と骨髄、その弟と母親の末梢血の検体を解析対象とした。末梢血よりゲノム DNA を抽出した。

5. 病理検査

発端者より得た骨髓検体を Hematoxylin and eosin (HE) 染色と、巨核球系のマーカーである CD61 の免疫染色で評価した。

6. 遺伝子解析

G-banding で発端者の染色体を解析した。*BCR::ABL1* 融合遺伝子を検出するため fluorescence in situ hybridization (FISH) 法を行った。患者のゲノムを用いて *JAK2*、*MPL*、*CALR*、*THPO* の各遺伝子をターゲットにサンガー法を用いて遺伝子の塩基配列を解析した。

7. クローニング

変異を含んだ *THPO* と野生型の *THPO* を発現ベクターに組み込むことにした。ベクターのサイズを小さくして遺伝子導入を容易にするため、ヒト肝臓における *THPO* の転写開始点であるエクソン 2 からイントロン 3 までをゲノム DNA から取り出し、エクソン 4 からエクソン 7 までは cDNA を用いることにした。患者の末梢血より QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hulsterweg, Netherlands) を用いてゲノム DNA を作成した。このゲノム DNA をテンプレートとして、プライマー(フォワード 5'-CGTATGACCTGCTGCTGTGG-3'、リバーズ 5'-GAGAAGCATGACCACGAGGAG-3')を用いて以下の条件で PCR を行った。98℃で変性、60℃でアニーリング、68℃で伸長反応のサイクルを 35 サイクル行い増幅させた。Thermus aquaticus DNA ポリメラーゼとして PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TAKARA BIO INC. Shiga, Japan) を使用した。ヒト肝細胞癌由来細胞株 HepG2 から TRI Reagent (COSMO BIO CO. LTD. Tokyo, Japan) を用いて RNA を抽出し、SuperScript III First Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) で cDNA を作成した。この cDNA をテンプレートとして、プライマー(フォワード 5'-CTCCTCGTGGTCATGCTTCTC-3'、リバーズ 5'-TTACCCTTCCTGAGACAGATTC-3')を用いて以下の条件で *THPO* を増幅する PCR を行った。98℃で変性、60℃でアニーリング、68℃で伸長反応のサイクルを 35 サイクル行い増幅させた。Thermus aquaticus DNA ポリメラーゼとして PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TAKARA BIO INC. Shiga, Japan) を使用した。増幅された PCR 産物を、1.5%のアガロースゲルに泳動し目的のバンドをゲルカットし、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hulsterweg, Netherlands) を用いて精製した。発現ベクターとして pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いた。pcDNA3 を制限酵素である Hind III (TAKARA, Kusatsu, Japan)、Xho I (TAKARA, Kusatsu, Japan) で 37℃、12 時間かけて

処理を行い開環した。このようにして得た *THPO* エクソン 2-4、*THPO* エクソン 4-7 の cDNA、pcDNA3 を In-Fusion HD Cloning Kit (TAKARA, Kusatsu, Japan)を用いてライゲーションし、発現ベクターを作成した。野生型 *THPO* を組み込んだベクターを pcDNA3/*THPO* wt、変異型 *THPO* を組み込んだベクターを pcDNA3/*THPO* c.13+1G>A とした (図 3)。

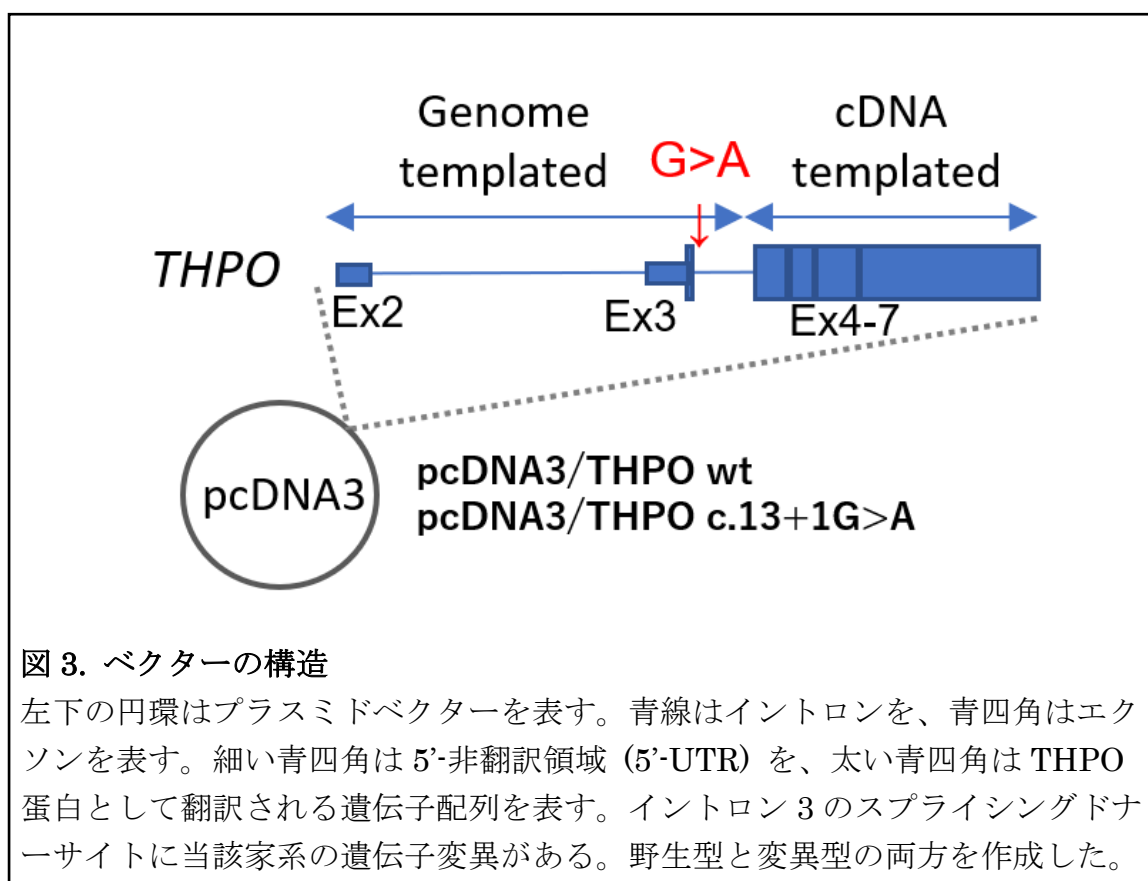


図 3. ベクターの構造

左下の円環はプラスミドベクターを表す。青線はイントロンを、青四角はエクソンを表す。細い青四角は 5'-非翻訳領域 (5'-UTR) を、太い青四角は *THPO* 蛋白として翻訳される遺伝子配列を表す。イントロン 3 のスプライシングドナーサイトに当該家系の遺伝子変異がある。野生型と変異型の両方を作成した。

8. トランスフェクション

作成した pcDNA3/*THPO* wt と pcDNA3/*THPO* c.13+1G>A に加えて、コントロールベクターとして GFP 発現プラスミドである pmaxGFP (Lonza, Basel, Switzerland) を用いた。これらのベクターをヒト腎芽腫由来細胞株である HEK293T に一過性トランスフェクションした。トランスフェクション試薬として TransIT-293 Reagent (TAKARA, Kusatsu, Japan) を使用した。HEK293T を用いたトランスフェクションの概要を以下に示す。トランスフェクション前日に 1.0×10^6 個の HEK293T を 6 well プレートに撒いた。pcDNA3/*THPO* wt 用のチューブには OPTI-MEM $250 \mu\text{L}$ 、pcDNA3/*THPO* wt $2.5 \mu\text{g}$ 、TransIT-293 $7.5 \mu\text{L}$ を混合した。pcDNA3/*THPO* c.13+1G>A 用のチューブには OPTI-MEM $250 \mu\text{L}$ 、pcDNA3/*THPO* c.13+1G>A $2.5 \mu\text{g}$ 、

TransIT-293 7.5 μ L を混合した。pmaxGFP 用のチューブには OPTI-MEM 250 μ L、pmaxGFP 2.5 μ g、TransIT-293 7.5 μ L を混合した。それぞれのチューブの反応液を室温で 30 分間インキュベートした。3 つのチューブの反応液を各 well に加え、18 時間後に DMEM+1%FCS 2ml に培地交換した。37°C でインキュベートを継続し、トランスフェクションから 72 時間後に培養上清を回収し、HEK293T を剥離して回収し、遠心分離によってペレットとした。

9. 培養上清中の THPO 濃度の測定

回収した培養上清を外注で検査会社 (SRL, Inc. Tokyo, Japan) に提出し、Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay 法 (ELISA 法) で THPO タンパクの濃度を測定した。

10. 転写産物の解析

回収した細胞でペレットを作成し、TRI Reagent (COSMO BIO CO. LTD. Tokyo, Japan) を用いて RNA を抽出し、その RNA から SuperScript III First Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて cDNA を作成した。*THPO* のエクソン 2-6 をターゲットとした Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) を行い、得られた PCR 産物をアガロースゲル電気泳動を行うことで転写産物の長さを解析した。アガロースゲル上のバンドをカットし Gel extension kit (Quiagen, Hilden, Germany) を用いてゲル精製した。得られた産物に対しサンガー法でシーケンスを行って塩基配列を確認した。プライマーは(フォワード 5'-CGTATGACCTGCTGCTGTGG-3', リバーズ 5'-CAGAATGTCCTGTGCCTTGG-3')を用いた。変異型と野生型の *THPO* で共通して発現している配列であるエクソン 4-6 をターゲットとして relative quantification polymerase chain reaction (RQ-PCR) で *THPO* mRNA の発現を解析した。内部コントロールとして β -actin を用いた。プライマーは *THPO* (フォワード 5'-GTGGTCATGCTTCTCCTAACTG-3', リバーズ 5'-GGACCTGTCCAGAAAGCTGC-3')、 β -actin (フォワード 5'-AGGCCGGCTTCGCGGGCGAC-3', リバーズ 5'-CTCGGGAGCCACACGCAGCTC-3')を用いた。

11. 細胞内の THPO 発現の測定

トランスフェクションを行った細胞内および培養上清中での THPO タンパクの発現とプロセッシングを評価するため、ウェスタンブロット (WB) を行った。回収した細胞のペレットを RIPA buffer (Nakalai tesque, Kyoto, Japan)

で処理し、ライセートのサンプルを作成した。内部コントロールとしてライセートでは β -actin を、培養上清ではウシ血清アルブミン (BSA) を用いた。一時抗体として anti-thrombopoietin (THPO) antibody (#ab196026, Abcam, Cambridge, UK), anti- β -actin antibody (AC-15, Sigma-Aldrich, MO), anti-BSA antibody (66201-1-Ig, Proteintech, IL, USA) を用いた。二次抗体で染色したあと、enhanced chemiluminescence detection system (Image Quant LAS 4000, GE Healthcare Chicago, IL) を用いてバンドを解析した。

11. 統計解析

2 群間の平均値の比較には t 検定を用いた。P 値<0.05 を有意とした。これらの統計学的解析は EZR version 1.55 (Kanda, 2013) を用いて行った。

【結果】

1. 身体所見と血液検査

患者(iii1)の腹部エコー検査では軽度の脾腫がみられた(109.4 mm×36.6 mm)。筋骨格系の異常はみられなかった。当該家系の血液検査結果を表に示す(表 1)。患者である(iii1)及び弟である(iii2)では血小板数の増多と血中 THPO 濃度の上昇がみられた一方で白血球数、赤血球数は正常値であった(表 1)。父にあたる(ii1)も同様に血小板数の増多がみられたものの白血球数と赤血球数は正常であり、血中 THPO 濃度は測定されていない。患者の母親にあたる(ii2)は血球数、血中 THPO 濃度ともに正常値であった。

表 1. 当該家系における血球数と血中 THPO 濃度

(ii1)は CML が寛解状態のときに得られた検査結果である。

Family member	Age	Sex	WBC (/μL)	Hb (g/dL)	Platelets (x10 ⁹ /L)	TPO (Fmol/mL)
ii1	49	M	7300	12.9	1558	NA
ii2	NA	F	6600	15.2	331	1.04
iii1	21	F	10100	14.7	1050	5.04
iii2	20	M	7000	17.1	847	6.56

患者の末梢血液像では巨大血小板を伴った血小板増多がみられた。一方で、白血球、赤血球には異型がみられなかった。末梢血塗抹標本を以下に示す(図 4)。

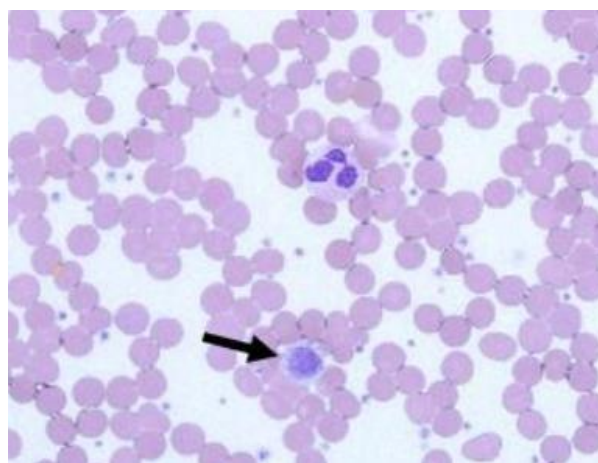


図 4. 患者 (iii1) の末梢血塗抹標本

血小板増多がみられる。黒矢印は巨大血小板を指し示している。

2. 骨髄所見

骨髄生検で得られた検体では、血小板凝固を伴った巨核球の過形成がみられた。CD61 による免疫染色では異形成を伴った巨核球増加がみられ、本態性血小板血症を含めた骨髄増殖性疾患との鑑別は困難であった。骨髄線維化を示す指数である MF スコアは MF=0 であり、骨髄線維化は見られなかった (図 5, 図 6)。

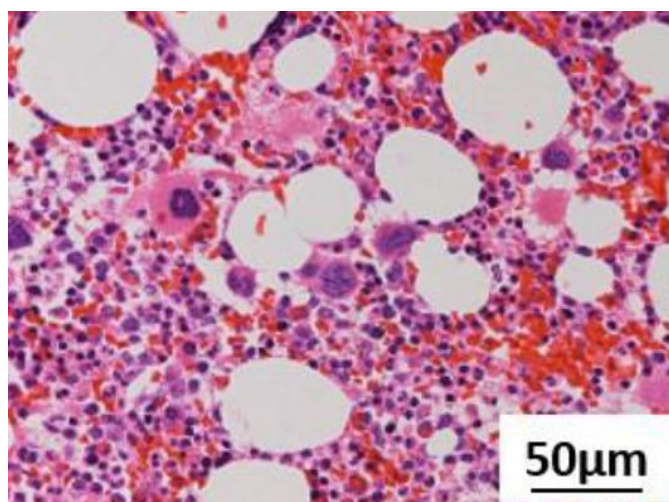


図 5. 患者 (iii1) の骨髄生検標本 (HE 染色)

巨核球の過形成がみられる。

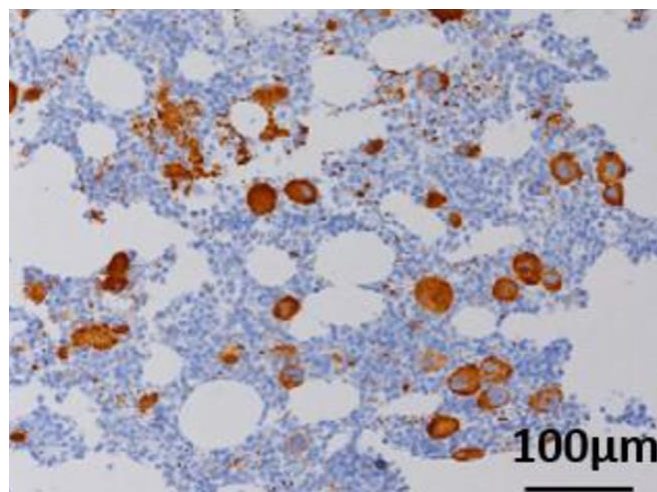


図 6. 骨髄生検標本 (CD61 染色)

褐色に染色された細胞が巨核球である。異型を伴って増殖しており、骨髄増殖性疾患、本態性血小板血症を示唆する所見であった。

3. 遺伝子解析

G-banding で患者の核型は 46, XX の女性正常核型であった。FISH 法で *BCR::ABL1* 融合遺伝子は検出されなかった。*JAK2V617F*、*JAK2* exon 12、*MPL*、*CALR* の遺伝子変異はみられなかった。*THPO* のシーケンスでは発端者とその弟ではイントロン 3 の 5'側に G>A の一塩基置換がみられた (*THPO* c.13+1G>A)。シグナルピークが野生型とほぼ等しかったため、片アレルの胚細胞変異と考えられた。また、発端者とその弟で c.13+1G>A のおよそ 150 bp 上流に一塩基置換多型 (SNP) である rs956732 がみられた。*THPO* c.13+1G>A と SNP rs956732 は同一アレル上にみられた。一方で、血小板数正常であった母親には SNP も *THPO* c.13+1G>A いずれもみられなかった (図 7, 8)。

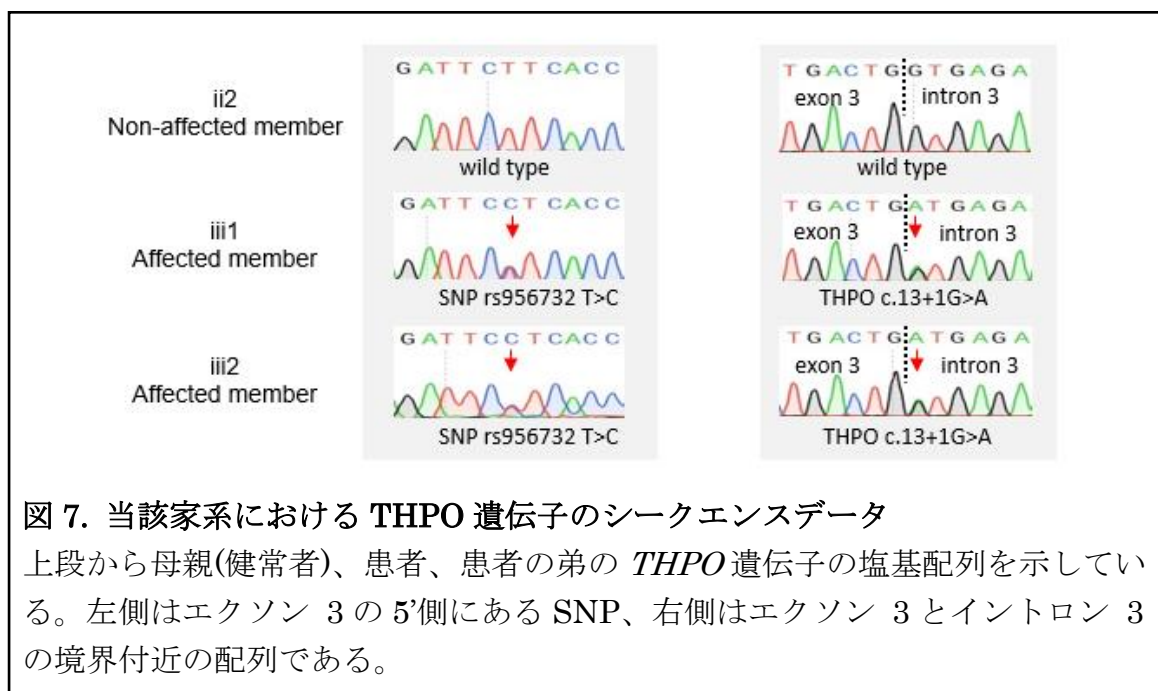


図 7. 当該家系における *THPO* 遺伝子のシーケンスデータ

上段から母親(健常者)、患者、患者の弟の *THPO* 遺伝子の塩基配列を示している。左側はエクソン 3 の 5'側にある SNP、右側はエクソン 3 とイントロン 3 の境界付近の配列である。

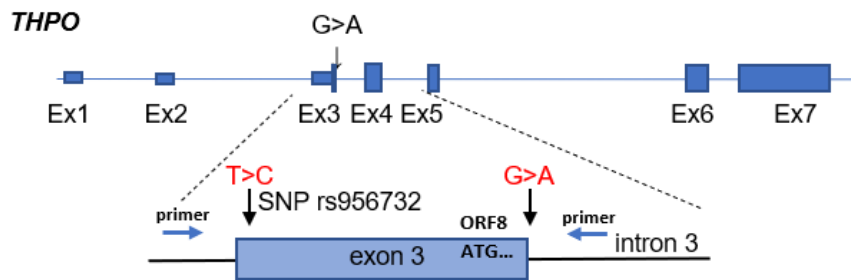


図 8. 当該家系における *THPO* 遺伝子変異と SNP の位置関係

SNP rs956732 はエクソン 3 の 5'側に、c.13+1G>A はエクソン 3 とイントロン 3 の境界付近に存在する。青矢印はシーケンス用のプライマー設定部位を表す。

4. 転写産物の解析

回収した HEK293T のペレットより精製した cDNA を用いて RQ-PCR を行い、その PCR 産物をアガロースゲル電気泳動した。THPO c.13+1G>A の PCR 産物をアプライした RT+ のレーンでは 350 bp 付近に明瞭なバンドがみられ、THPO wt の RT+ の PCR 産物をアプライしたレーンでは 500 bp 付近に明瞭なバンドがみられ、これらが主な転写産物とみられた。RT- のレーンではバンドがみられず、RT+ のレーンのみにバンドがみられたことから、バンドが転写産物由来であり、DNase 処理が正常に行われたことが示唆された。その結果を図 9 に示す。

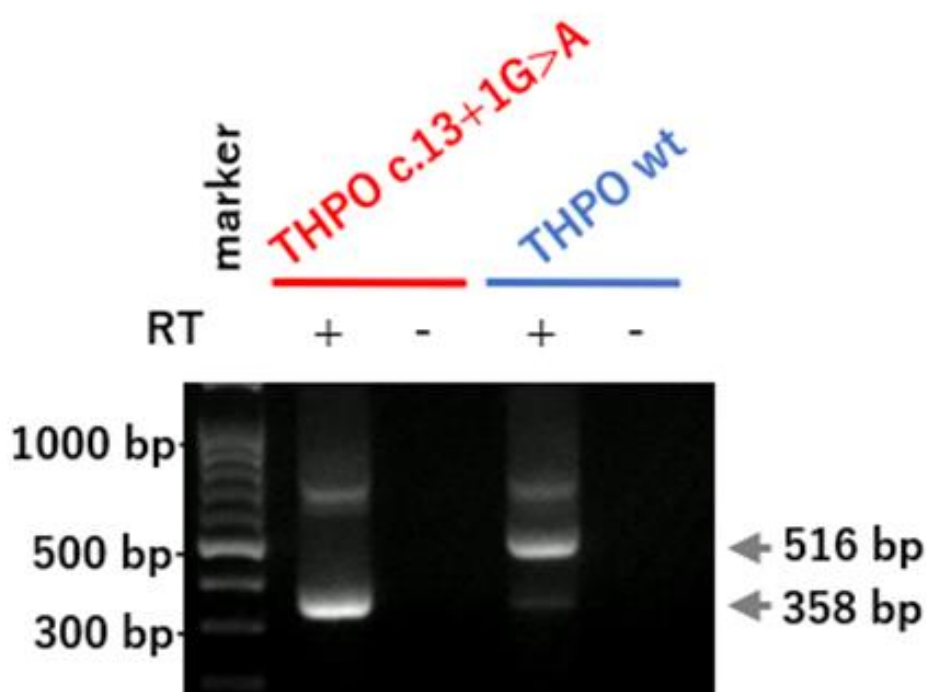


図 9. RT-PCR 産物のアガロースゲル電気泳動結果

左端のレーンはマーカである。左側が THPO c.13+1G>A の転写産物、右側が THPO wt の転写産物である。RT の +/- は cDNA 作成時の逆転写酵素の有無を示す。

それぞれのバンドを切り取り、ゲル精製しサンガー法でシーケンスしたところ、*THPO* c.13+1G>A でみられたバンドはエクソン 2 の終端に続きエクソン 4 の配列がみられ、エクソン 3 を欠く転写産物であった (図 10)。*THPO* wt でみられたバンドはエクソン 2 とエクソン 3 が連続しており、野生型の転写産物であった (図 11)。

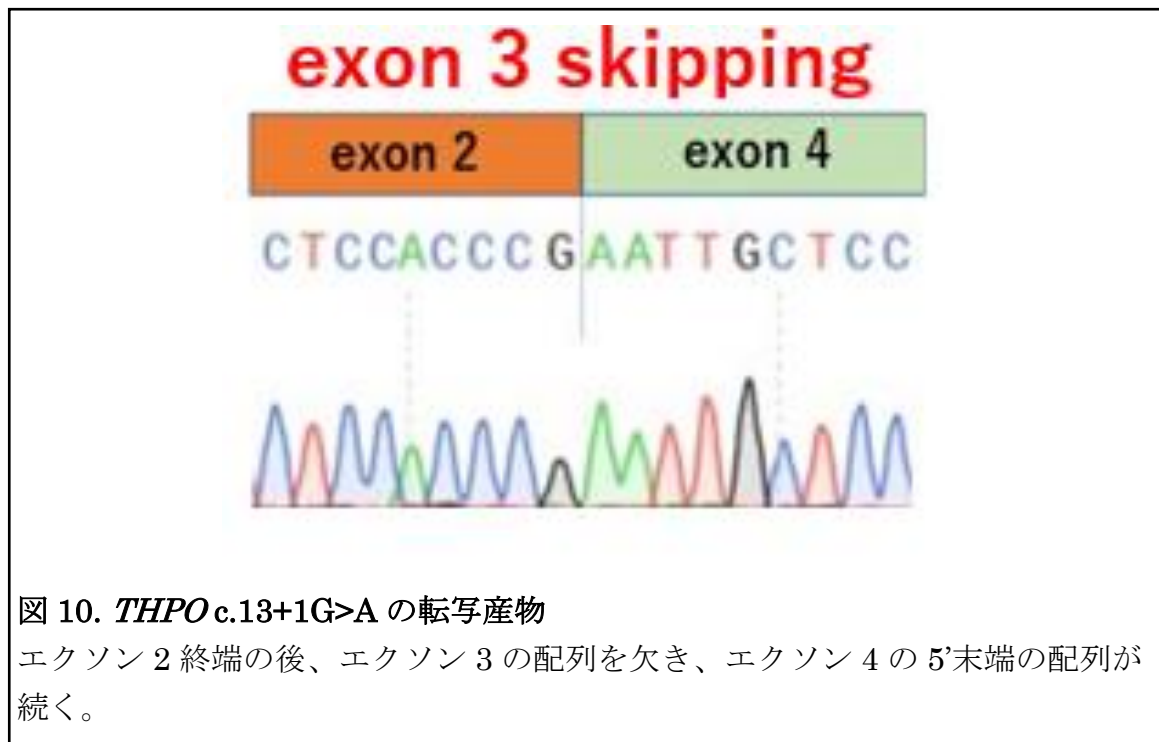


図 10. *THPO* c.13+1G>A の転写産物

エクソン 2 終端の後、エクソン 3 の配列を欠き、エクソン 4 の 5'末端の配列が続く。

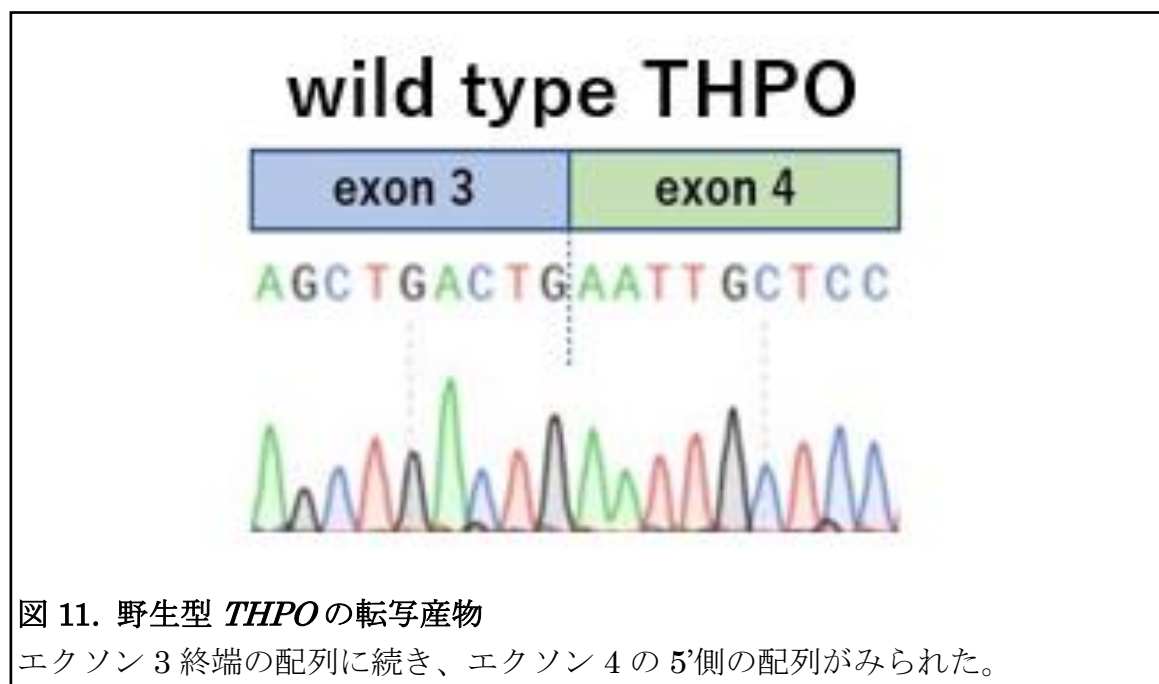


図 11. 野生型 *THPO* の転写産物

エクソン 3 終端の配列に続き、エクソン 4 の 5'側の配列がみられた。

5. RQ-PCR

THPO wt と *THPO* c.13+1G>A の mRNA の共通部分であるエクソン 4-6 をターゲットに RQ-PCR を行い、*THPO* の mRNA 発現量を比較した。コントロールとして pmaxGFP をトランスフェクションして GFP を発現させた HEK293T から回収した cDNA を用いた結果を 1 としている。*THPO* wt と *THPO* c.13+1G>A いずれも、GFP を発現させた細胞より *THPO* の mRNA の発現量は高く、*THPO* wt と *THPO* c.13+1G>A の *THPO* mRNA の発現量は統計学的に有意差がみられなかった (図 12)。

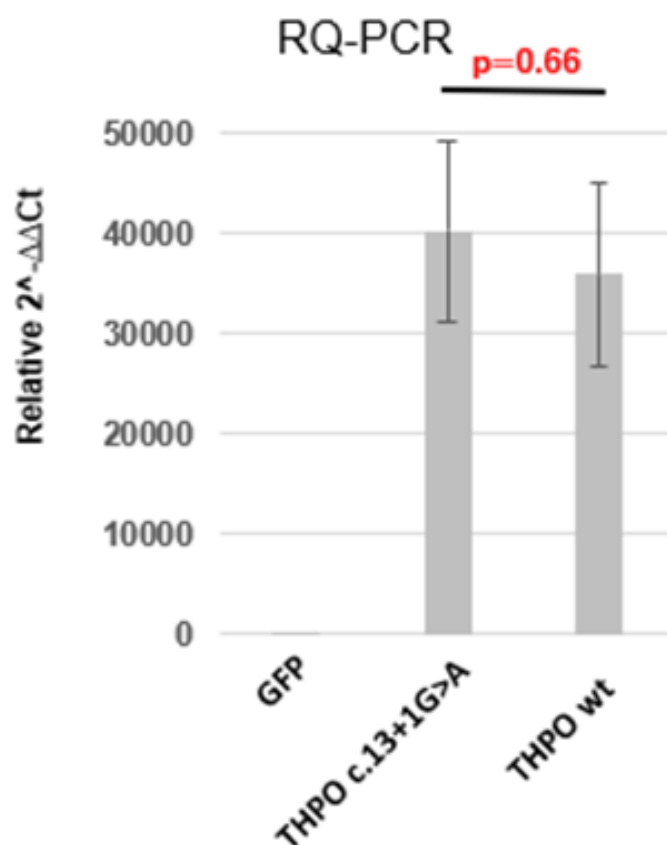


図 12. *THPO* のエクソン 4 からエクソン 6 をターゲットにした RQ-PCR
一番左はコントロールとして用いた GFP である。pmaxGFP をトランスフェクションした細胞における *THPO* mRNA の発現量を 1 とした。

6. 培養上清の THPO タンパク濃度測定

回収した培養上清の THPO タンパク濃度測定結果を以下に示す。pmaxGFP のみをトランスフェクションさせた HEK293T の培養上清における THPO タンパク濃度より *THPO* c.13+1G>A および *THPO* wt をトランスフェクションさせた HEK293T の培養上清の THPO タンパク濃度が高値であった。*THPO* wt をトランスフェクションさせた細胞の培養上清より、*THPO* c.13+1G>A をトランスフェクションさせた細胞の上清の THPO タンパク濃度が 5 倍ほど高く、統計学的有意に高い濃度であった (図 13)。

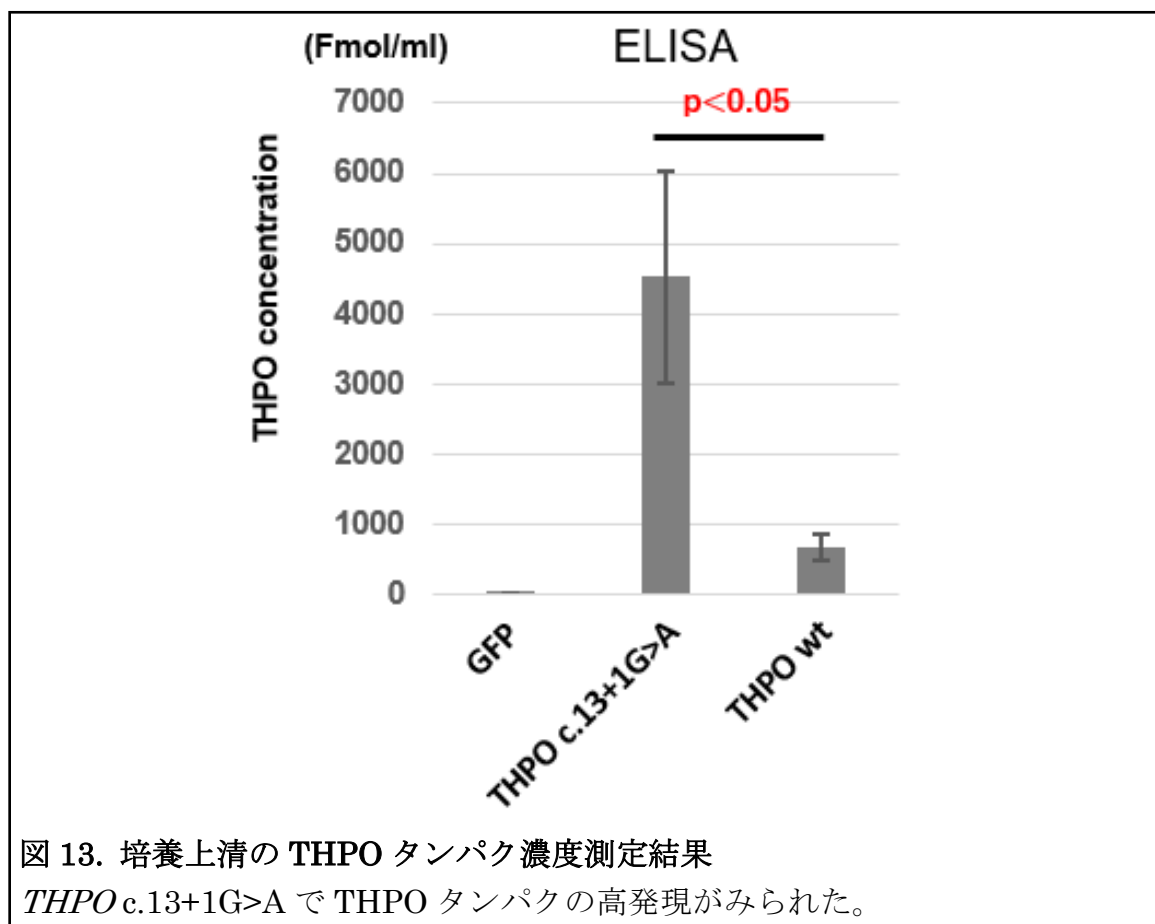


図 13. 培養上清の THPO タンパク濃度測定結果

THPO c.13+1G>A で THPO タンパクの高発現がみられた。

7. ウェスタンブロット

回収した細胞のライセートを用いたウェスタンブロットの結果を以下に示す(図 14 左)。36 kDa および 55 kDa 付近に THPO のバンドがみられた。どちらのバンドも THPO wt と比較して THPO c.13+1G>A で濃いバンドがみられた。内部コントロールとして用いた β アクチンのバンドは、いずれも同等の濃さであった。

次に、培養上清を用いたウェスタンブロットの結果を示す(図 14 右)。およそ 90 kDa 付近に THPO のバンドがみられた。THPO wt と比較して THPO c.13+1G>A で濃いバンドがみられた。コントロールとして用いた BSA は、いずれの検体でも同等の濃さであった。

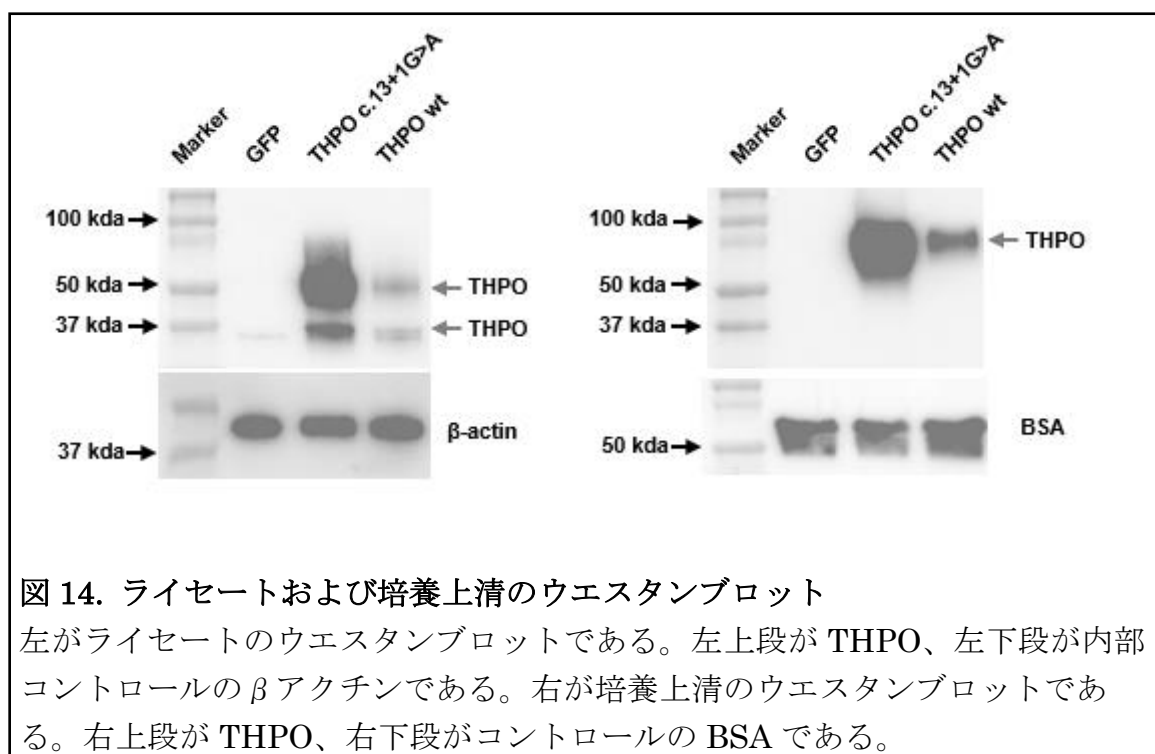


図 14. ライセートおよび培養上清のウェスタンブロット

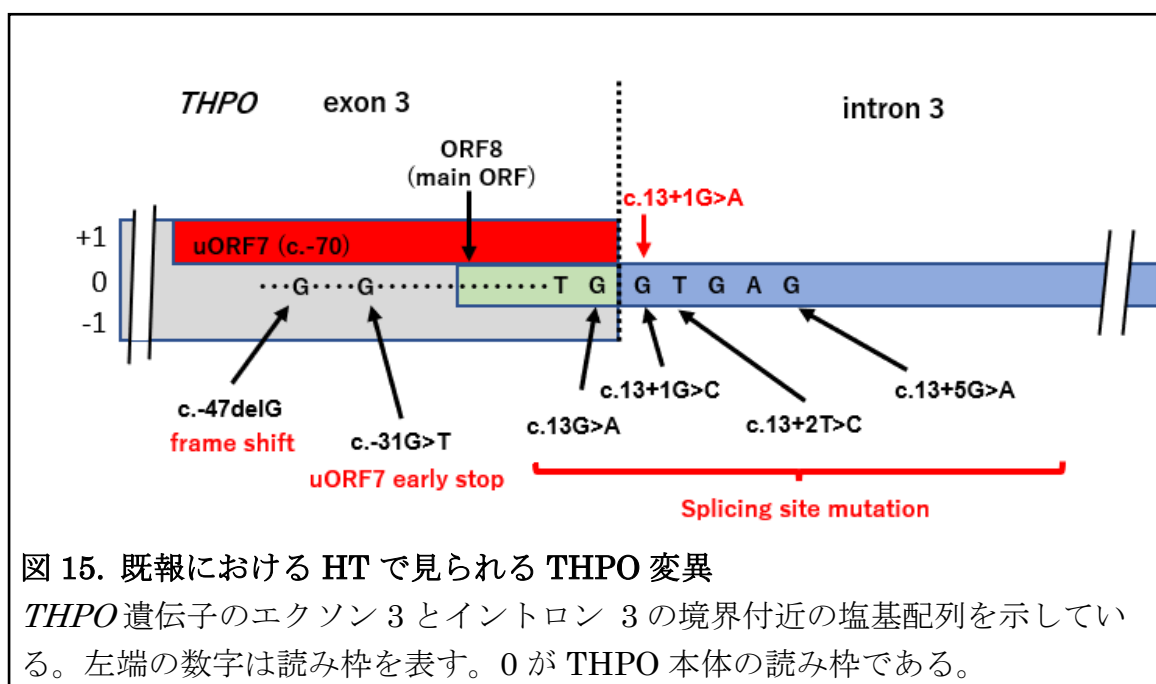
左がライセートのウェスタンブロットである。左上段が THPO、左下段が内部コントロールの β アクチンである。右が培養上清のウェスタンブロットである。右上段が THPO、右下段がコントロールの BSA である。

培養上清においても THPO c.13+1G>A により THPO タンパクが過剰産生されることが確認された。一方でコントロールである GFP をトランスフェクションさせた well から回収した上清では THPO タンパクのバンドがみられなかった。内部コントロールである BSA のバンドは 3 つのレーンで同等であった。

以上を示したデータから、THPO c.13+1G>A の変異により、THPO の mRNA の発現レベルを変えることなく、翻訳レベルで THPO タンパクの過剰発現が生じることが示された。

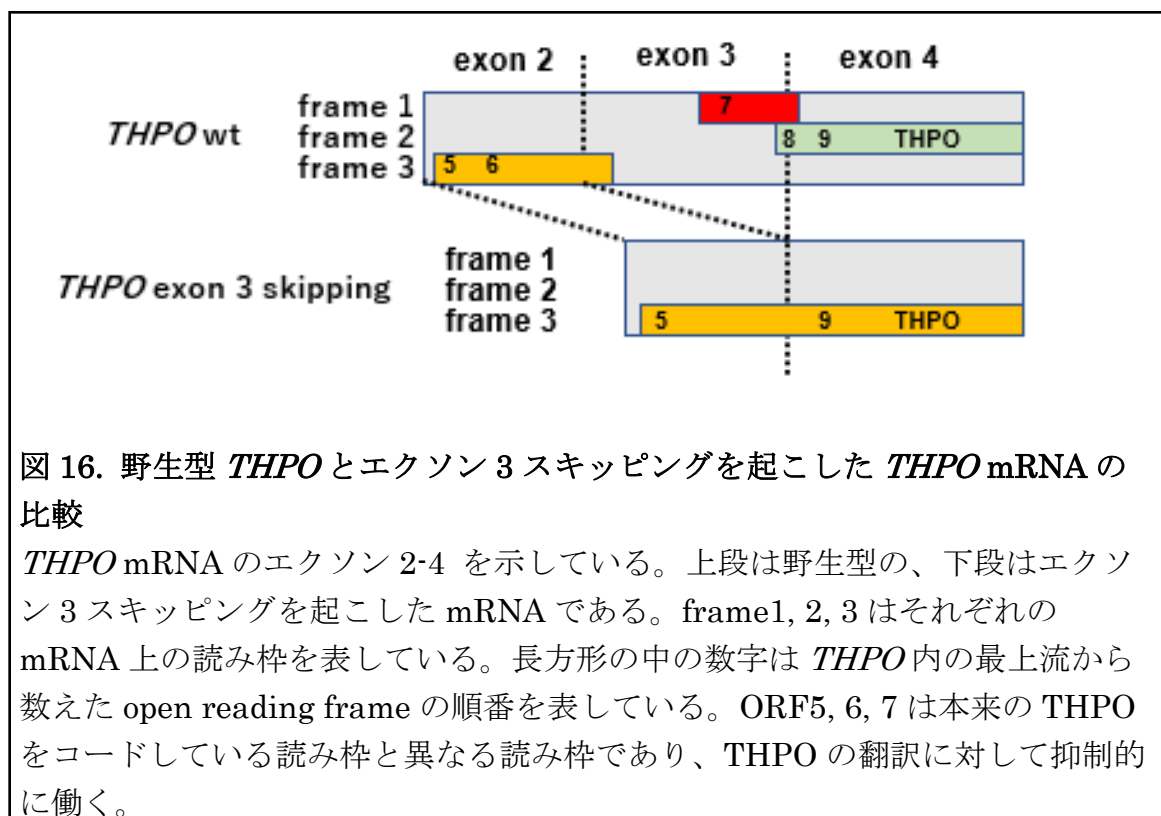
【考察】

これまでに HT の原因として報告されている *THPO* 遺伝子の変異は 5'-UTR (Kondo et al, 1998; Ghilardi et al, 1999; Graziano et al, 2009) とエクソン 3 及びイントロン 3 の境界付近に位置するスプライシングドナーサイトの胚細胞変異である (Wiestner et al, 1998; Jorgensen et al, 1998; Zhang et al, 2010; Jung et al, 2020; Prouzet et al, 2020)。既報において報告されている *THPO* 変異の位置を図に示す (図 15)。



THPO エクソン 3 終端とイントロン 3 の 5'側に位置するスプライシングドナーサイトの変異によって pre mRNA の正常なスプライシングが行われなくなり、エクソン 3 を欠く *THPO* の mRNA を生じる (エクソン 3 スキッピング)。開始コドンと終止コドンに挟まれた遺伝子配列を open reading frame (ORF)といい、タンパク質本体をコードしている配列より上流の ORF を upstream open reading frame (uORF) という。*THPO* の野生型 mRNA は 5'-UTR にいくつかの uORF を持ち、それらの配列が *THPO* タンパクの翻訳を抑制している (Ghilardi et al, 1998)。

エクソン 3 スキッピングにより uORF7 と *THPO* の開始コドン付近、uORF6 の末端が欠損した mRNA が生じ、uORF6 が *THPO* 本体をコードする ORF9 とインフレームで接続することで、翻訳抑制の配列を失った *THPO* タンパクの翻訳が亢進する (図 16)。



血中 THPO タンパク濃度の上昇が HT 患者で確認されているが、THPO タンパクは血小板や巨核球の表面に存在する MPL によって吸着され、細胞内に取り込まれてしまうため、血小板や巨核球が増加した場合は取り込まれる THPO タンパクの量もまた増大することになる (Kuter et al, 1994; Fielder et al, 1997)。そのため、HT 患者と健常者における血中 THPO タンパク濃度の差は、必ずしもその生産量を直接反映するものとはいえないと考えられる。我々の研究は血小板・巨核球が THPO タンパクと相互作用しない環境で変異型遺伝子由来の THPO の翻訳が亢進することを示した。細胞のライセートを用いたウエスタンブロットでは 36 kDa と 55 kDa のところに THPO タンパクのバンドがみられ、培養上清を用いたウエスタンブロットでは 90 kDa 付近に THPO のバンドがみられた。THPO は 36 kDa の前駆タンパクとして生成され、N 末側のシグナルペプチドが取り除かれ、段階的な糖鎖修飾を受けると報告されている (Kuter 2013)。

Zhang らは、細胞 lysate 中にみられる 55 kDa の THPO タンパクと、細胞外に分泌された 94 kDa の THPO タンパクが糖鎖修飾を受けたものだと報告している (Zhang et al, 2022)。このことから、我々の実験結果も THPO タンパクの段階的な糖鎖修飾の過程をとらえており、ウエスタンブロットの結果が

ら、変異型の *THPO* タンパク量はいずれの段階でも野生型より多く、野生型と同様に段階的な糖鎖修飾を受けていることを示している。

HT において既報及び当該家系で見られた遺伝子変異が反映されるのは *THPO* タンパクの N 末端にみられるシグナルペプチドの部分のアミノ酸配列であるものの、シグナルペプチドとして重要な配列である疎水性アミノ酸に富む部分は保たれる。*THPO* タンパクが成熟する過程でシグナルペプチドの部分は取り除かれてしまうため、既報及び当該家系で見られた変異型 *THPO* 由来タンパクのアミノ酸配列は野生型 *THPO* タンパクと同様となる (Wiestner et al, 1998)。我々は、それぞれの成熟段階において、野生型より変異型由来の *THPO* タンパクが増加していることを示した。

HT は巨核球系のみが影響を受けるポリクローナルな血小板増多症であるとされている (Teofili et al, 2011)。*THPO* 遺伝子の変異による HT の患者のうち大部分は良性の血小板増多を呈すが、多発性骨髄腫 (Stockklauser et al, 2012)、急性骨髄性白血病 (Posthuma et al, 2010)、B 細胞性悪性リンパ腫 (Kikuchi et al, 1995)、骨髄線維症 (Posthuma et al, 2010) といった、造血器悪性腫瘍を発症した症例が報告されており、当該家系においては 1 名が CML を発症している。HT そのものが希少疾患であるため、HT と造血器悪性腫瘍の因果関係及び機序は必ずしも明らかではない。ET の経過中に CML クローンが出現する症例が繰り返し報告されている (Mizutani et al, 2010; Piccin et al, 2014; Xia et al, 2019)。また、*JAK2* の活性化が遺伝子を不安定化させることが報告されており (Plo et al, 2008)、出生時からの恒常的な *JAK-STAT* 系に対する刺激が HT における CML 発症に寄与している可能性が考えられる。したがって、HT 患者の長期フォローアップの際には血液悪性腫瘍を発症する可能性を念頭に置くのが望ましい。

HT の患者においては、合併症として血栓・出血を起こす例が報告されている (Schlemper et al, 1994; Liu et al, 2008; Teofili et al, 2010)。Schlemper らは、11 人の患者を持つ HT の家系において、6 人が血栓による合併症を発症し、2 人が出血による合併症が生じたと報告している (Schlemper, 1994)。後年、この家系において *THPO* 遺伝子の変異 (c.13+1G>C) が世界で初めて同定された (Wiestner et al, 1998)。Schlemper らが報告した家系では、血小板数と血栓あるいは出血による合併症の頻度に直接の関係がみられなかったとされている一方で、血栓による合併症を生じた 6 人のうち 5 人は 40 歳以上であったという。このことから、血栓による合併症のリスクには年齢が関連している可能性がある。家族性血小板増多症の血栓予防に関しては、低用量アスピリンが用いられている (Liu et al, 2008; Teofili et al, 2010; Jung et al, 2020)。*MPL* の変異による HT では、血栓と出血の合併症は稀であると報告されては

いるものの (Moliterno et al, 2004; El Harith et al, 2009)、MPL の膜貫通ドメイン変異 (S505N、L502G) は血栓と骨髄線維症のリスクが高いと報告されている (Teofili et al, 2010; Rendo et al, 2022)。JAK2 変異による HT に関しては 6 人の患者のうち 3 人に血栓の合併症がみられ、3 人全員が 40 歳以上であった (Mead et al, 2012)。これらのことから、40 歳以上または MPL の膜貫通領域の変異による HT 患者には血栓の一次予防としての低用量アスピリンまたは抗血小板薬の投与が考慮される。当該家系においては、介入は行っていないものの今のところ血栓・出血の合併症を生じていない。HT に対する最適なマネジメントに関しては、未だ確立されていない。

我々は *THPO* c.13+1G>A という胚細胞変異による新たな HT の家系を同定した。我々は、この変異がスプライシングドナーサイトに影響することで、エクソン 3 を欠く変異型の転写産物ができることを示した。変異型 *THPO* の mRNA の発現量は野生型 *THPO* の mRNA と同等であるにも関わらず、変異型の mRNA からは効率的に *THPO* タンパクが翻訳され血中の *THPO* タンパク濃度が高値になることにより、HT が発症する。注意深い家族歴聴取と、血清 *THPO* の濃度測定が HT と ET の鑑別に有用である。HT 患者に関しては、血液悪性腫瘍、骨髄の線維化、血栓と出血の合併症の可能性があるため、注意深いフォローアップが望まれる。

【総括と結論】

新知見

- ・ *THPO* c.13+1G>A は *THPO* のエクソン 3 スキッピングを生じ、*THPO* の翻訳が亢進することによって家族性血小板増多症の責任遺伝子変異となりえる。
- ・ *THPO* c.13+1G>A の変異は *THPO* mRNA の発現量に有意な影響を与えない。

意義

- ・ 家族歴を有する血小板増多症において、*THPO* 遺伝子変異を同定した。本変異は *THPO* タンパクの機能変化を伴わず、翻訳効率上昇による *THPO* タンパクの高発現により血小板増多をきたす。

今後の課題

- ・ HT の至適な治療に関しては統一された見解が得られていない。
- ・ これまで良性疾患と考えられてきた HT であるが、血液腫瘍の報告が散見されるものの、詳しい関連はわかっていない。トロンボポエチン受容体作動薬の長期投与により染色体異常が誘発されるか否かについては、はっきりとした見解が得られていない。

今後の研究展開

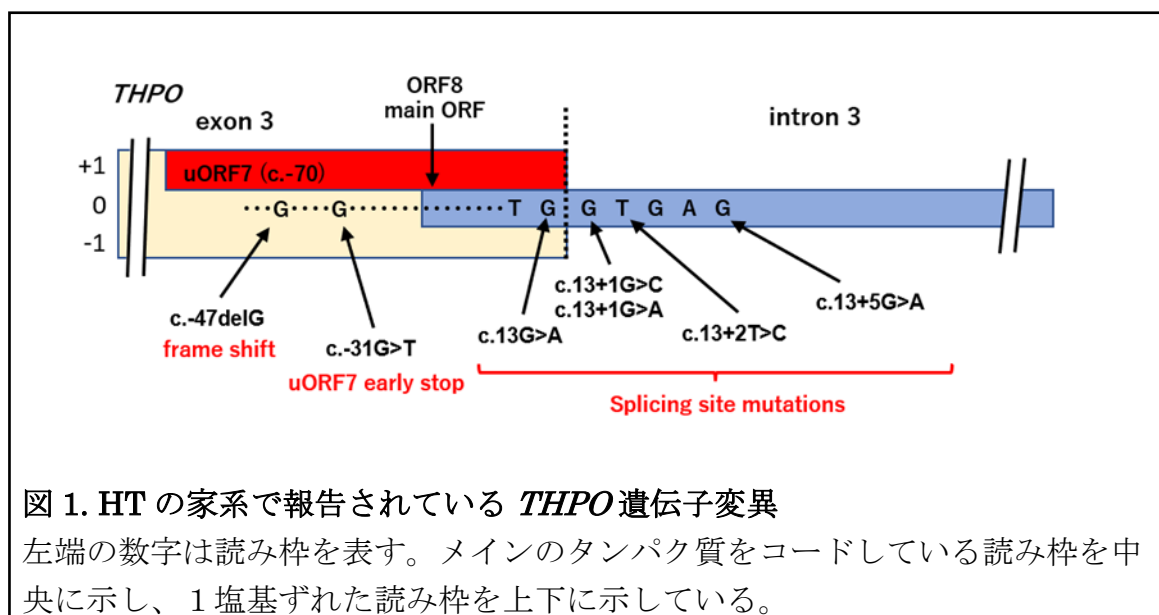
- ・ JAK2 阻害薬など、HT の至適な治療を検索する。
- ・ 持続する血中の内因性 *THPO* 高値と血液腫瘍の関連について基礎・臨床それぞれの面から検討する必要がある。

第二章

家族性血小板増多症に関連する *THPO* 遺伝子変異の比較

【緒言】

前章において、*THPO* c.13+1G>A という胚細胞変異が翻訳亢進を介して *THPO* タンパクの過剰産生を起こし、HT の原因となることを示した。これまでに HT の原因として報告されている *THPO* 遺伝子の胚細胞変異は 5'-UTR およびエクソン 3 のスプライシングドナーサイトに集中し 6 箇所が報告されている(図 1) (Kondo et al, 1998; Kikuchi et al, 1995; Prouzet et al, 2020; Wiestner et al, 1998; Kimura et al, 2024; Zang et al, 2011; Jorgensen et al, 1998) 。それぞれの変異は個別に報告されており、各変異における mRNA の発現の程度、翻訳効率の差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。



これらの *THPO* 遺伝子変異は成熟した *THPO* タンパクのアミノ酸残基を変えることはないものの、野生型 *THPO* タンパクの過剰生産を引き起こす (Wiestner et al, 1998; Ghilardi et al, 1998)。このため、HT の診断にあたっては血清 *THPO* タンパク濃度の測定が重要な要素となる (Nelson et al, 2016)。 *THPO* は巨核球と血小板産生に重要な役割を持つ成長因子である (Kaushanski 1998; Kaushanski et al, 2006)。 *THPO* 遺伝子変異による HT は常染色体優性遺伝を示し、血小板数は $437\text{-}1600 \times 10^6/\text{L}$ の血小板増多となることが報告されている (表 1)。

表 1. 既報における家族性血小板増多症の原因遺伝子と血小板数及び機序
NA=not available, uORF=upstream open reading frame.

<i>THPO</i> mutation	Estimated Function	Platelet count ($\times 10^9/L$) mean (range), N
<i>THPO</i> c.-47delG	uORF 7 shifted to in frame with <i>THPO</i> coding sequence	1305.0 (847.9-1600.0), N=5
<i>THPO</i> c.-31G>T	Early stop codon was created shortening uORF 7 and translational reinitiation	1189.0 (1095.0-1380.0), N=4
<i>THPO</i> c.13G>A	exon 3 skipping	750.0 (600.0-850.0) N=3
<i>THPO</i> c.13+1G>C	exon 3 skipping	763.0 (533.0-1516.0), N=11
<i>THPO</i> c.13+1G>A		995.5 (437.0-1558.0), N=6
<i>THPO</i> c.13+2T>C	exon 3 skipping	759.0 (555.0-1015.0), N=3
<i>THPO</i> c.13+5G>A	unknown	NA (700.0-1000.0), N=4

THPO タンパクの過剰生産に関するメカニズムについては、いくつかの変異で同定されている一方で (Kondo et al, 1998; Prouzet et al, 2020; Wiestner et al, 1998; Kimura et al, 2024; Zang et al, 2011)、推測されているのみ、あるいは明らかにされていない変異がある (Jorgensen et al, 1998; Ghilardi et al, 1999)。これらの *THPO* 変異のうち、我々は既報において HT の原因として報告されている変異をクローニングし、そのメカニズムと効果を明らかにすることとした。

【方法】

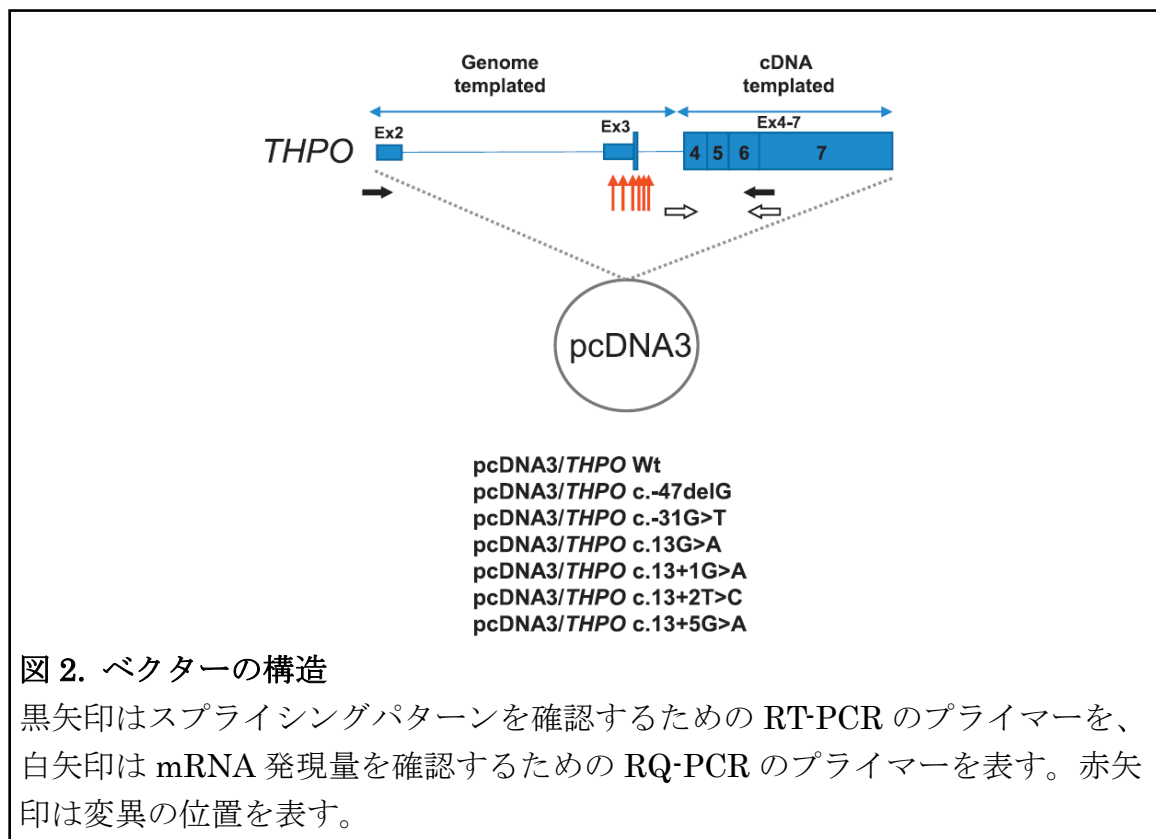
1. 細胞培養

Human embryonic kidney 293 T (293T) 細胞を 10%ウシ胎児血清と 1%ペニシリン・ストレプトマイシンを添加したダルベッコ変法イーグル培地 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を用い、37°C、5% CO₂ 下で培養した。

2. クローニング

前章で作成した野生型 *THPO* を含んだベクターと *THPO* c.13+1G>A を含んだベクターに加え、既報で報告されている変異を含んだ 5 種類のベクター (*THPO* c.-47delG, *THPO* c.-31G>T, *THPO* c.13G>A, *THPO* c.13+2T>C, *THPO* c.13+5G>A) を PCR 法を用いた部位特異的変異導入法で作成することにした。前章で作成した野生型 *THPO* を含んだベクターをテンプレートとして、プライマーは *THPO* c.-47delG (フォワード 5'-GGAAGGATTCAGGGAGAGGC-3'、リバーズ 5'-GCCTCTCCCTGAATCCTTCC-3')、*THPO* c.-31G>T (フォワード 5'-CCCCAAACAGTGAGCCACGC-3'、リバーズ 5'-GCGTGGCTCACTGTTTGGGG-3')、*THPO* c.13G>A (フォワード 5'-GAGCTGACTAGTGAGAACACACC-3'、リバーズ 5'-GGTGTGTTCTCACTAGTCAGCTC-3')、*THPO* c.13+2T>C (フォワード 5'-GAGCTGACTGGCGAGAACACACC-3'、リバーズ 5'-GGTGTGTTCTCGCCAGTCAGCTC-3')、*THPO* c.13+5G>A (フォワード 5'-GAGCTGACTGGTGAAAACACACC-3'、リバーズ 5'-GGTGTGTTTTTCACCAGTCAGCTC-3')を用いて以下の条件で inverse PCR を行った。98°Cで変性、60°Cでアニーリング、68°Cで伸長反応のサイクルを 29 サイクル行い開環させて増幅させた。Thermus aquaticus DNA ポリメラーゼとして PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TAKARA BIO INC. Shiga, Japan)を使用した。増幅された PCR 産物を、1.5%のアガロースゲルに泳動し目的のバンドをゲルカットし、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hulsterweg, Netherlands) を用いて精製した。得られた PCR 産物を In-Fusion HD Cloning Kit (TAKARA, Kusatsu, Japan)を用いてライゲーションし、ベクターを作成した。第一章で作成した野生型 *THPO* を組み込んだベクターを pcDNA3/*THPO* wt、*THPO* c.13+1G>A を組み込んだベクターを pcDNA3/*THPO* c.13+1G>A とした。それに加え、新たに作成した *THPO* c.-47delG、*THPO* c.-31G>T、*THPO* c.13G>A、*THPO* c.13+2T>C、*THPO* c.13+5G>A を含むベクターをそれぞれ pcDNA3/*THPO* c.-47delG、pcDNA3/*THPO* c.-31G>T、pcDNA3/*THPO* c.13G>A、pcDNA3/*THPO*

c.13+2C>T、pcDNA3/*THPO* c.13+5G>A とした。ベクターの構造を以下に示す (図 2)。



3. トランスフェクション

第一章において作成した pcDNA3/*THPO* wt と pcDNA3/*THPO* c.13+1G>A に加えて、このたび作成した pcDNA3/*THPO* c.-47delG、pcDNA3/*THPO* c.-31G>T、pcDNA3/*THPO* c.13G>A、pcDNA3/*THPO* c.13+2C>T、pcDNA3/*THPO* c.13+5G>A、そしてコントロールベクターとして GFP 発現プラスミドである pmaxGFP (Lonza, Basel, Switzerland) を用いた。これらのベクターをヒト腎芽腫由来細胞株である HEK293T に一過性トランスフェクションした。トランスフェクション試薬として TransIT-293 Reagent (TAKARA, Kusatsu, Japan) を使用した。HEK293T を用いたトランスフェクションの概要を以下に示す。トランスフェクション前日に 1.0×10^6 個の HEK293T を 6 well プレーットのそれぞれの well に撒いた。トランスフェクションに用いる DNA と試薬の混合物はそれぞれ別個の 1.5ml チューブで作成した。それぞれのチューブで OPTI-MEM $250 \mu\text{L}$ 、TransIT-293 $7.5 \mu\text{L}$ 、そしてそれぞれのベクター $2.5 \mu\text{g}$ を混合した DNA 混合物を作成した。それぞれのチューブの反応液を室温で 30 分間インキュベートした。3 つのチューブの反応液を各 well に加え、18 時間後に DMEM+1%FCS 2ml に培地交換した。37°C でインキュペートを継続し、トランスフェクションから 72 時間後に培養上清を回収し、HEK293T を剥離して回収し、ペレットとした。

4. 転写産物の解析

回収した細胞でペレットを作成し、TRI Reagent (COSMO BIO CO. LTD. Tokyo, Japan) を用いて RNA を抽出し、その RNA から SuperScript III First Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて cDNA を作成した。*THPO* のエクソン 2-6 をターゲットとした Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) を行い、得られた PCR 産物をアガロースゲル電気泳動を行うことで転写産物の長さを解析した。アガロースゲル上のバンドをカットし Gel extension kit (Quiagen, Hilden, Germany) を用いてゲル精製した。得られた産物に対しサンガー法でシーケンスを行って塩基配列を確認した。プライマーは(フォワード 5'-CGTATGACCTGCTGCTGTGG-3', リバーズ 5'-CAGAATGTCCTGTGCCTTGG-3')を用いた。変異型と野生型の *THPO* で共通して発現している配列であるエクソン 4-6 をターゲットとして relative quantification polymerase chain reaction (RQ-PCR) で *THPO* mRNA の発現を解析した。内部コントロールとして β -actin を使い、pcDNA3/*THPO* Wt をトランスフェクションした細胞における *THPO* mRNA の発現量を 1 とした。プライマーは *THPO* (フォワード 5'-GTGGTCATGCTTCTCCTAACTG-3', リバーズ 5'-

GGACCTGTCCAGAAAGCTGC-3'), β -*actin* (フォワード 5'-AGGCCGGCTTCGCGGGCGAC-3', リバーズ 5'-CTCGGGAGCCACACGCAGCTC-3')を用いた。

5. タンパク発現の解析

培養上清中での THPO タンパクの発現とプロセッシングを評価するため、ウエスタンブロット (WB) を行った。内部コントロールとしてウシ血清アルブミン (BSA) を用いた。一時抗体として anti-thrombopoietin (THPO) antibody (#ab196026, Abcam, Cambridge, UK), anti-BSA antibody (66201-1-Ig, Proteintech, IL, USA) を用いた。二次抗体を反応させた後、バンドを解析した。バンドの定量には ImageJ software version 1.53 (National Institutes of Health, Bethesda, MD)を用いた。

5. 統計解析

THPO mRNA および THPO タンパクの発現量は analysis of variance (ANOVA)によって計算した。P 値が 0.05 未満の場合を統計学的有意差ありとした。統計解析には Easy R version 1.55 (Kanda, 2013)を用いた。

【結果】

1. 転写産物の解析

RT-PCR を行った産物のアガロースゲル電気泳動では、*THPO* c.-47delG では Wt と同等の長さのバンドがみられ、全てのスプライシングドナーサイト変異と *THPO* c.-31G>T でエクソン 3 スキッピングの短いバンドがみられた (図 3)。

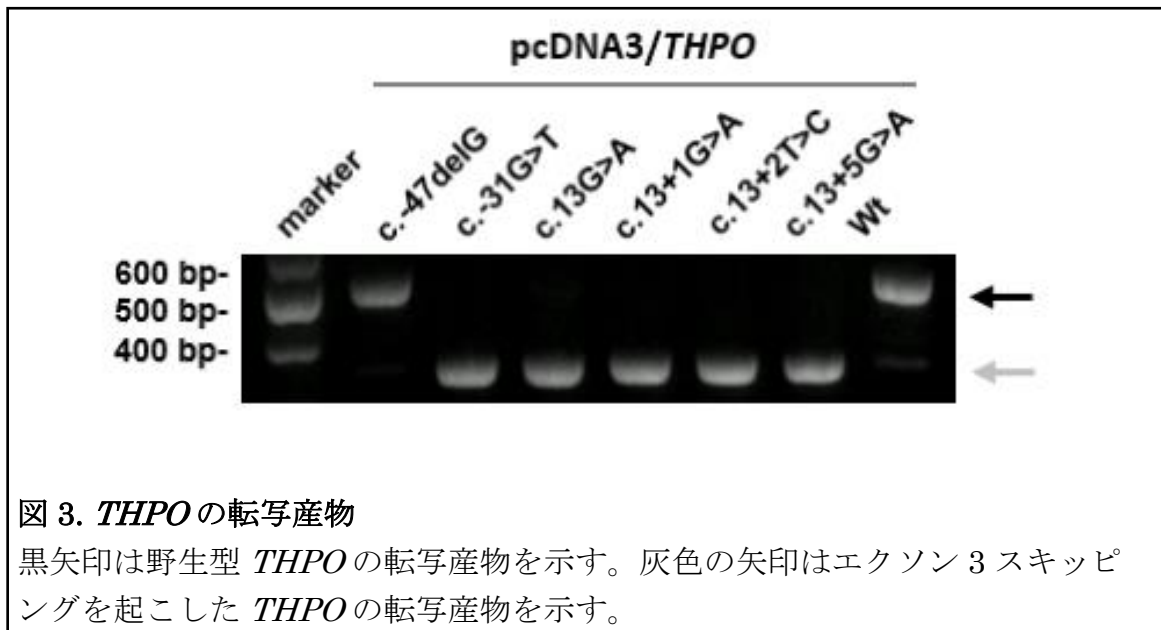
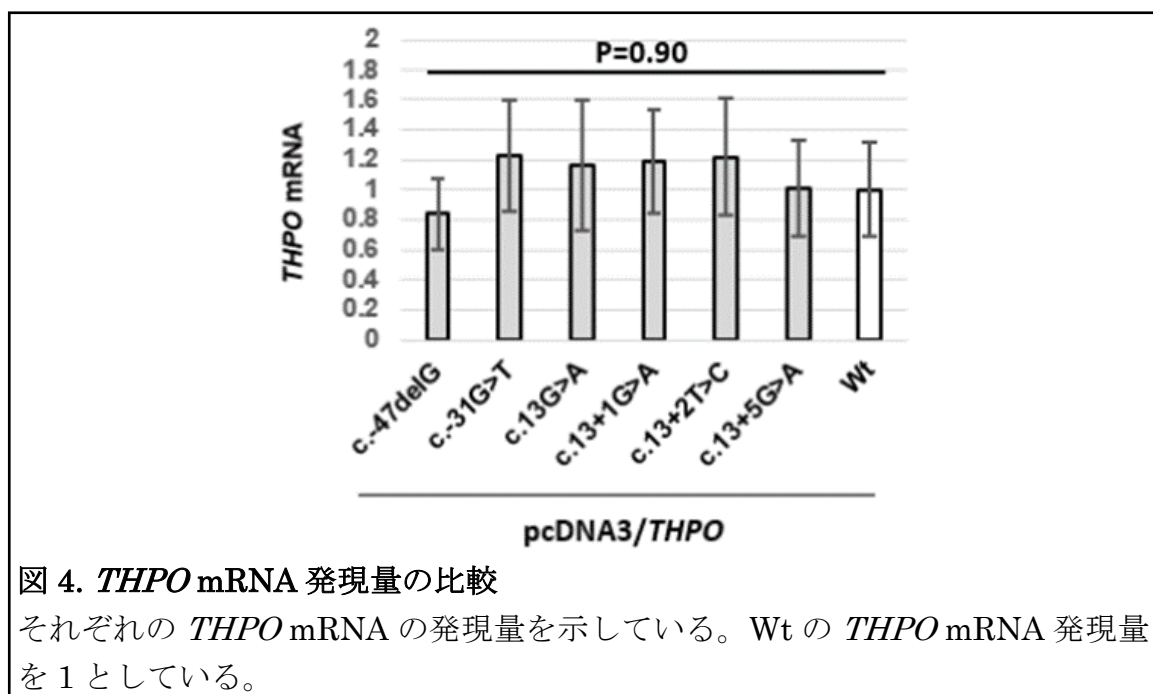


図 3. *THPO* の転写産物

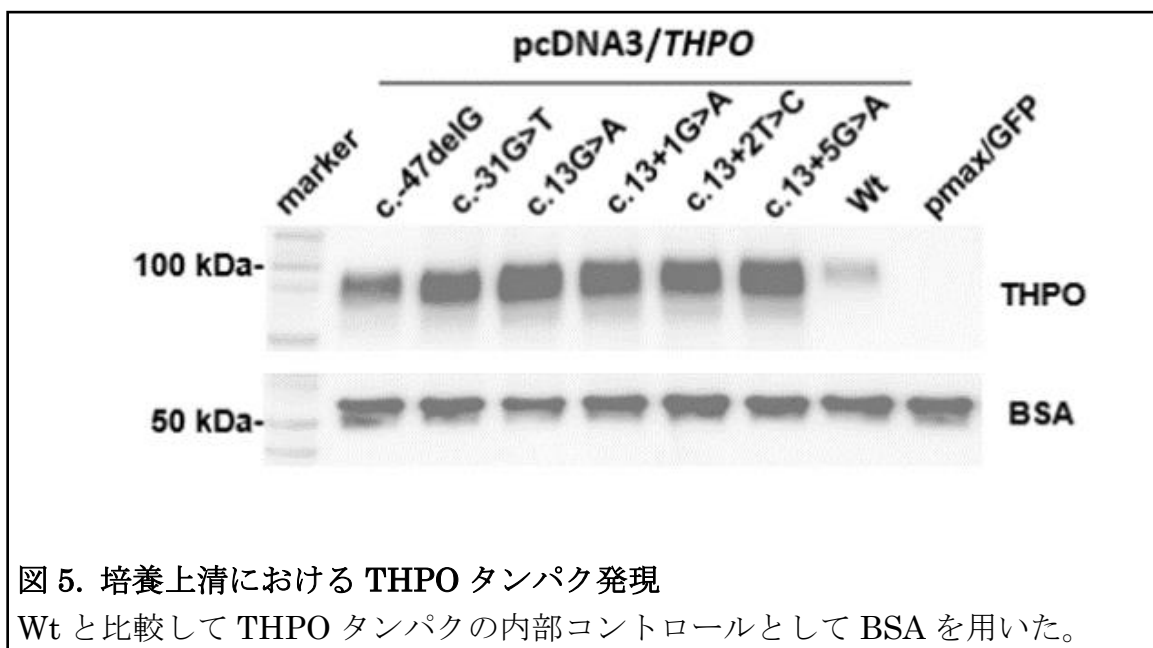
黒矢印は野生型 *THPO* の転写産物を示す。灰色の矢印はエクソン 3 スキッピングを起こした *THPO* の転写産物を示す。

次に RQ-PCR の結果を示す。THPO mRNA の発現量は、それぞれの変異と Wt で統計学的有意差がみられなかった (図 4)。



2. タンパク発現の解析

培養上清中への THPO タンパク分泌量をウエスタンブロットで解析した (図 5)。成熟した THPO タンパクのサイズは変異を持った THPO を Wt で同等であった。



培養上清における THPO タンパクの発現量は、それぞれの変異で差がみられなかった一方で、変異を持った THPO タンパクの発現量は Wt と比較して高発現していた (図 6)。

THPO c.-47delG の THPO タンパク発現量はわずかに少なく見えるものの、他の変異と比較して統計学的有意差はみられなかった (図 6)。

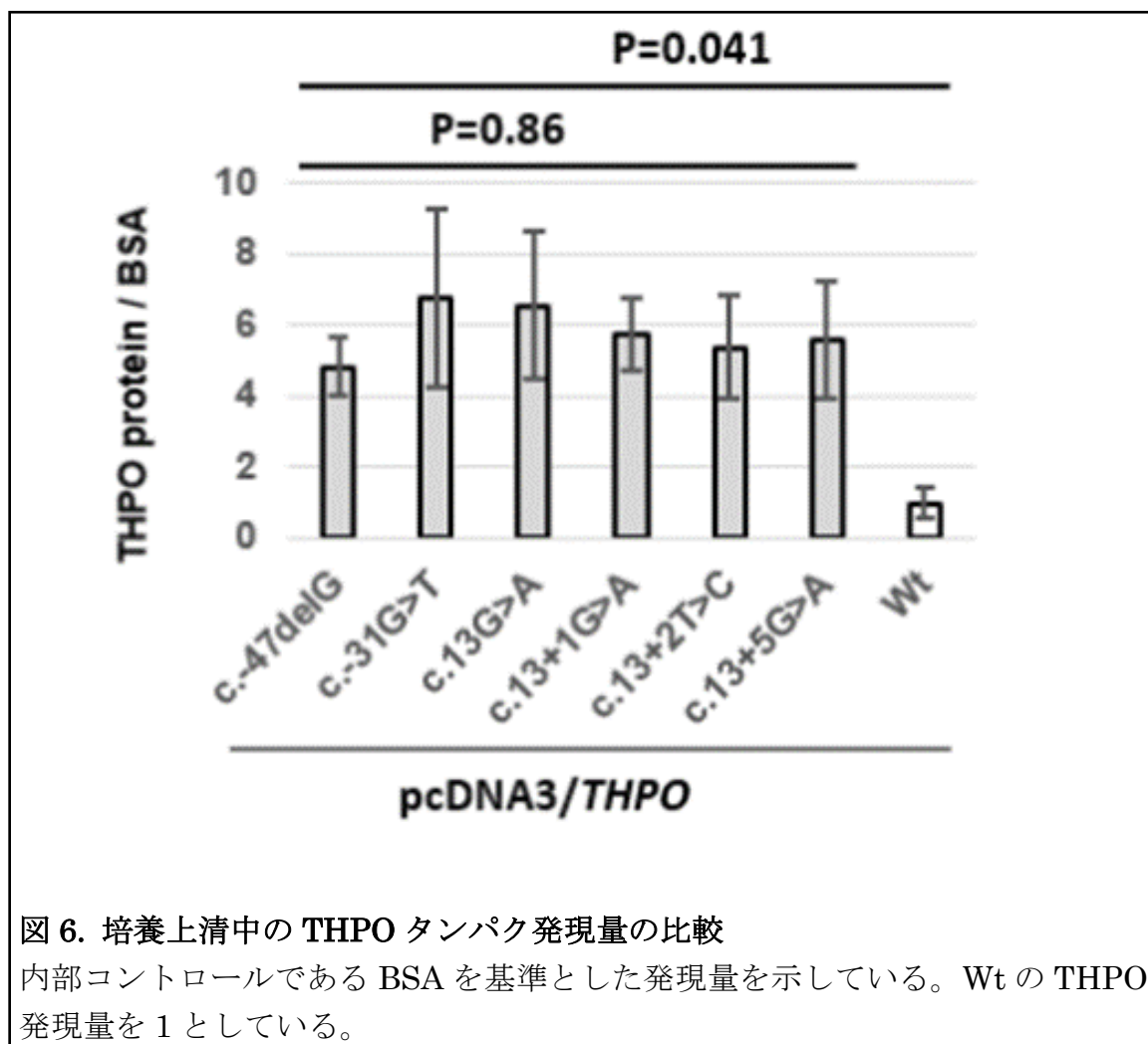


図 6. 培養上清中の THPO タンパク発現量の比較

内部コントロールである BSA を基準とした発現量を示している。Wt の THPO 発現量を 1 としている。

【考察】

我々は全ての *THPO* 変異において *THPO* の過剰発現が転写の段階ではなく、翻訳の段階で起こることを示した。Wt の *THPO* の mRNA は、*THPO* タンパク質本体とは異なる読み枠で開始コドンより上流にある upstream open reading frame (uORF) 5, 6, 7 を持つ (図 7)。

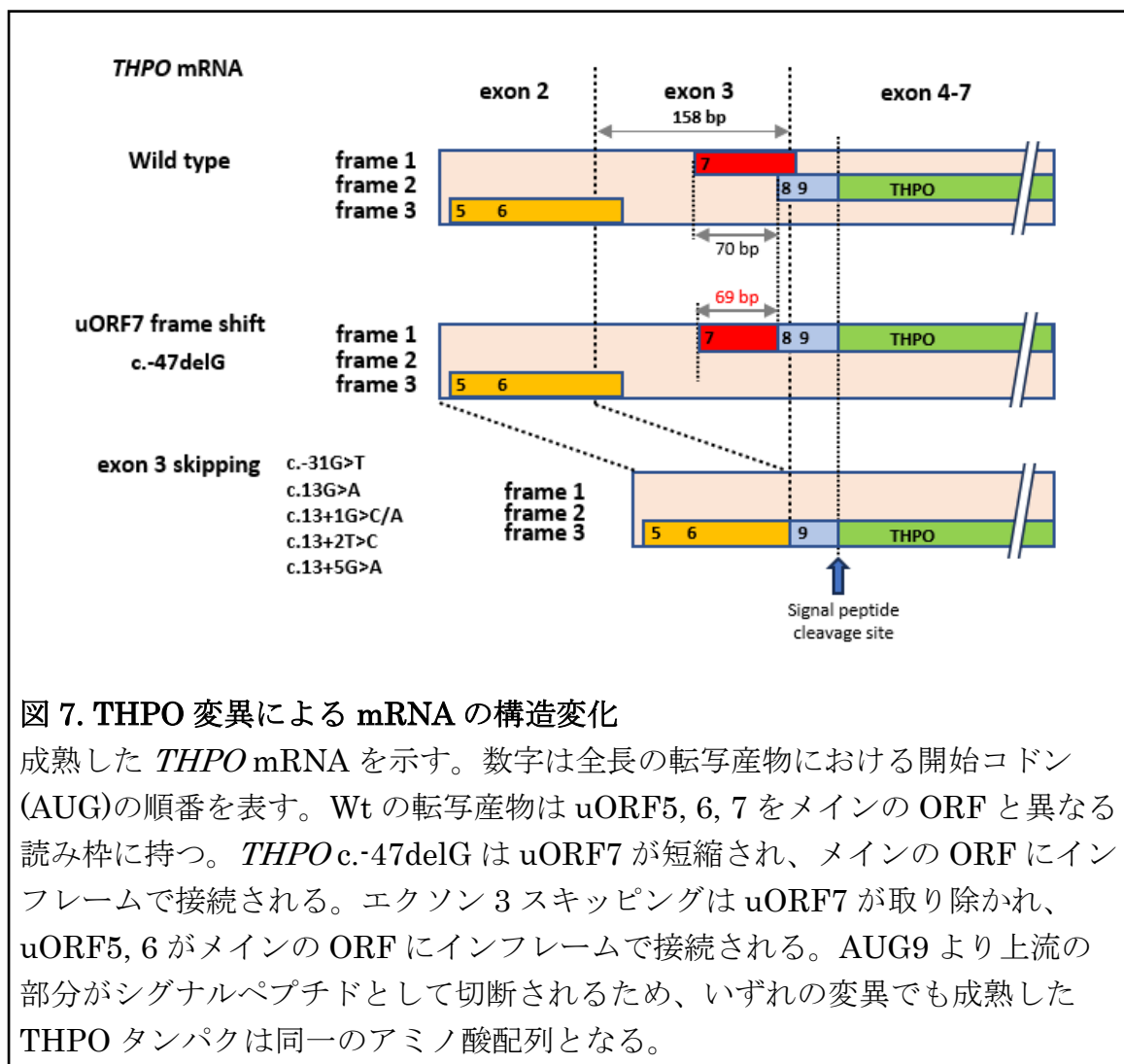
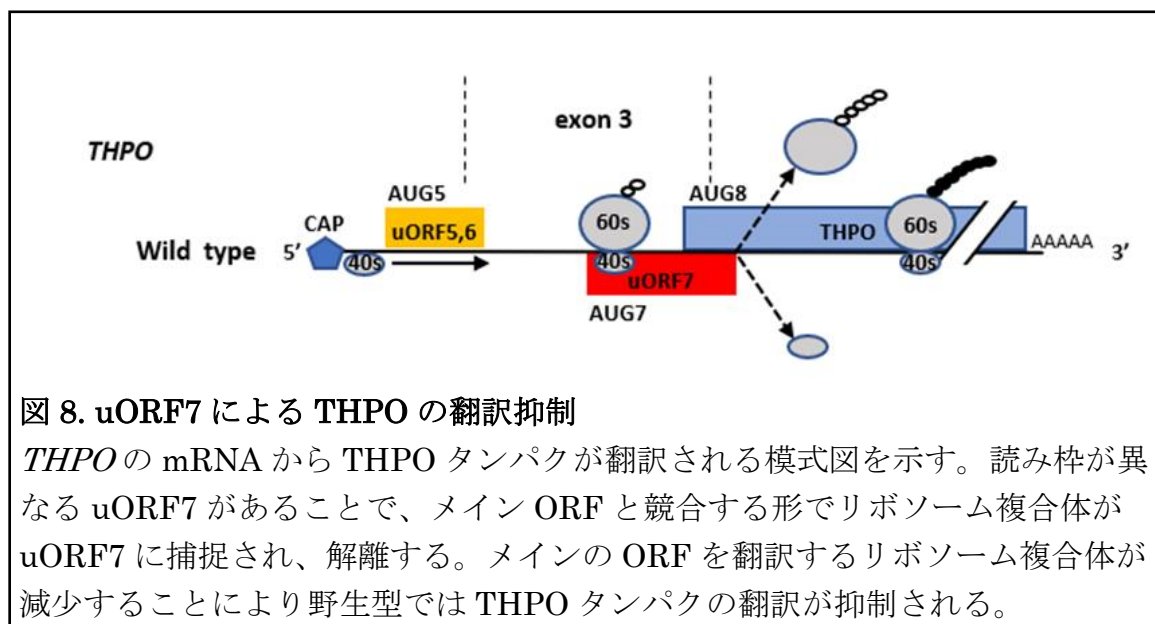


図 7. *THPO* 変異による mRNA の構造変化

成熟した *THPO* mRNA を示す。数字は全長の転写産物における開始コドン (AUG) の順番を表す。Wt の転写産物は uORF5, 6, 7 をメインの ORF と異なる読み枠に持つ。 *THPO* c.-47delG は uORF7 が短縮され、メインの ORF にインフレームで接続される。エクソン 3 スキッピングは uORF7 が取り除かれ、uORF5, 6 がメインの ORF にインフレームで接続される。AUG9 より上流の部分がシグナルペプチドとして切断されるため、いずれの変異でも成熟した *THPO* タンパクは同一のアミノ酸配列となる。

THPO の mRNA 上にある uORF7 は、開始コドンより上流でリボソーム複合体を捕捉し、開始コドンより下流でリボソーム複合体を解離させる。このことにより、THPO タンパク本体をコードしている ORF を翻訳するリボソームが少なくなるため、THPO タンパクの発現量が抑制されている (図 8)。



THPO c.-47delG は uORF7 がインフレームで main ORF に結合することで翻訳抑制効果を失うため、THPO の翻訳が亢進する (Cazzola et al, 2000) (図 7)。一方で、*THPO* のエクソン 3 スキッピングが起こった場合は翻訳抑制の機能を持つ uORF7 がスプライシングの過程で取り除かれてしまい、uORF5, 6 がインフレームで THPO をコードしている ORF に接続され、5 番目の AUG から翻訳が開始される (図 7)。

THPO c.-31G>T は uORF7 の途中で新たに終止コドンが形成され、uORF7 が短縮することによって翻訳抑制機能が弱まり、THPO の翻訳が亢進すると報告されている (Ghilardi et al, 1999a; Teofili et al, 2011)。しかし、我々のデータでは *THPO* c.-31G>T もまた他のスプライシングドナーサイトの変異と同様にエクソン 3 スキッピングを起こすことが示された。*THPO* c.-31G>T がスプライシングサイトから離れた部分に位置している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 (Cartegni et al, 2002)。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 (Hentze et al, 1999)。*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。我々は *THPO* において PTC によって NAS が起きることを初めて示した。さらに、これまで *THPO* c.13+5G>A については、どのような分子学的機序によって HT の発症に寄与するかは明らかでなかった (Jorgensen et al, 1998)。スプライシングドナーサイトの 2 塩基がスプライシングによって重要であることが示されていたが、我々はイントロンの 5 塩基目の本変異によってもまたエクソン 3 スキッピングが生じることを示した。全ての *THPO* 変異は等しく培養上清中の *THPO* タンパク濃度を高めた。

HT における遺伝子変異については、*MPL* と *JAK2* の変異は機能獲得型のミスセンス変異であるのに対し、*THPO* の変異はタンパク質そのものの変化を生じないという点で異なる。

開始コドンより上流にある uORF による翻訳の抑制が解除されることにより、mRNA の発現量は変わらないにも関わらず、野生型の *THPO* タンパクが過剰生産される。*THPO* 遺伝子の変異により *THPO* タンパクが過剰生産される機序として、エクソン 3 スキッピングと、フレームシフトにより uORF7 が *THPO* の開始コドンとインフレームで結合することで機能が失われる場合の 2 パターンがあることを明らかにした。本研究によって得られたスプライシングパターンと *THPO* 発現量の変化の一覧を以下に示す (表 2)。

HT の診断にあたって、血清 *THPO* 濃度の測定は最初のステップである。もし血清 *THPO* 濃度が上昇していた場合、*THPO* 遺伝子の 5'-UTR、エクソン 3 とイントロン 3 の境界付近に位置しているスプライシングサイトの変異を検索することが考慮される。

表 2. 既報の *THPO* 変異におけるスプライシングパターンと *THPO* 発現量

<i>THPO</i> mutation	Our finding	<i>THPO</i> transcript	<i>THPO</i> protein
<i>THPO</i> c.-47delG	uORF 7 shifted to in frame with <i>THPO</i> coding sequence	→	↑
<i>THPO</i> c.-31G>T	exon 3 skipping	→	↑
<i>THPO</i> c.13G>A	exon 3 skipping	→	↑
<i>THPO</i> c.13+1G>C <i>THPO</i> c.13+1G>A	exon 3 skipping	→	↑
<i>THPO</i> c.13+2T>C	exon 3 skipping	→	↑
<i>THPO</i> c.13+5G>A	exon 3 skipping	→	↑

【総括と結論】

新知見

- ・これまでに報告されている *THPO* 変異それぞれで THPO タンパクが過剰発現する。
- ・THPO の過剰発現は転写レベルではなく翻訳レベルで生じる。
- ・これまでに報告されている *THPO* 変異の転写産物は 5'-UTR のフレームシフトまたはエクソン 3 スキッピングの 2 通りに分けられる。
- ・*THPO* c.-31G>T では uORF7 における premature termination codon がエクソンスキッピングを引き起こす。

意義

- ・エクソンとイントロンの境界領域に位置するスプライシングサイト以外の変異でもスプライシング異常を介して HT を発症することが示された。このことから、HT の診断にあたっては *THPO* 遺伝子の塩基配列に加えて、*THPO* mRNA のスプライシングパターンを解析することもまた重要である。

今後の課題

- ・NAS を生じる機序について、これまでにいくつかの仮説が提唱されてはいるものの、詳しい機序は明らかにされていないため、これを明らかにする必要がある。

今後の研究展開

- ・NAS を生じる詳しい機序を明らかにし、阻害や誘発を通じてスプライシング異常に伴う疾患の治療法を探る。

第三章

マウスの血小板数と遺伝的背景

【緒言】

前章までの解析で、ヒトにおける血小板数は、読み枠のずれた上流の ORF によって負に制御された結果の値であり、ヒト HT はこの ORF が取り除かれる、あるいは、メイン ORF に対してインフレームとなることで機能を喪失した結果、THPO 産生が増加し、血小板増多を来していることを明らかにした。

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。マウスの結果をヒトに外挿できるかどうかは種差を考慮する必要がある。マウスの血小板数がヒトより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。我々は、マウスの血小板数がヒトと比べて高値である原因として、ヒトの HT の責任遺伝子となりえる *THPO*、*MPL*、*JAK2* 変異のいずれかが、マウスリファレンスゲノムに存在するのではないかと考えた。

常染色体優性遺伝となる家族性血小板増多症 (HT) の臨床的特徴は、孤発性の血小板増多症と類似する。ヒトにおける HT の原因としてはトロンボポエチン (*THPO*) の胚細胞変異 (Kondo et al, 1998; Kikuchi et al, 1995; Prouzet et al, 2020; Wiestner et al, 1998; Kimura et al, 2024; Zang et al, 2011; Jorgensen et al, 1998; Harrison et al, 1998)、*THPO* の受容体である *MPL* 遺伝子の胚細胞変異 (Moliterno et al, 2004; Ballanne et al 2017; El-Harith et al, 2009; Al-Harbi et al, 2021; Vasseur et al, 2023; Rendo et al, 2022; Ding et al, 2004)、または *JAK2* 遺伝子の胚細胞変異 (Han et al, 2021) が報告されている。*THPO* と *MPL* は造血幹細胞の増殖と血小板の産生に重要な役割を持つ (Kaushansky et al, 1998)。これまでに HT の原因として同定されている *THPO* の変異は全て *THPO* の翻訳が亢進することで正常な *THPO* タンパクが過剰発現し、血小板が過剰産生されるものである。*MPL* の膜貫通領域の変異 (*MPL* S505N) は、*THPO* の結合なしに *MPL* の恒常的な活性化をもたらす (Teofili et al, 2011)。*MPL* の細胞外サイトカイン受容体モチーフの変異 (*MPL* K39N, *MPL* P106L) は *THPO* に対する親和性が低下し、その結果として血清中の *THPO* 濃度が高まる (Teofili et al, 2011)。*JAK2* の変異は機能獲得型変異であり、*JAK2* の恒常的な活性化によって *JAK*-*STAT* 系のシグナルが常に送られる状態となり、巨核球増殖と過剰な血小板産生が生じる (Han et al, 2021)。

【方法】

ヒトの *THPO*、*MPL*、*JAK2* と、マウスの *Thpo*、*Mpl*、*Jak2* を BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) で比較した。哺乳類の各動物種の平均血球数を比較した。平均血球数のデータは (Shiraishi et al, 2007) より引用した。各動物種の平均血球数比較には Mann-Whiney の U 検定を用いた。P 値が 0.05 未満の場合を統計学的有意差ありとした。統計解析には Easy R version 1.55 (Kanda, 2013) を用いた。

【結果】

ヒトの家族性血小板増多症で報告されている *THPO* c.-47delG (Kondo et al, 1998)、*THPO* c.-31G>T (Kikuchi et al, 1995)、*THPO* c.13G>A (Prouzet et al, 2020)、*THPO* c.13+1G>C (Wiestner et al, 1998)、*THPO* c.13+1G>A (Kimura et al, 2024)、*THPO* 13+2T>C (Zang et al, 2011)、*THPO* c.13+5G>A (Jorgensen et al, 1998)といった *THPO* 遺伝子変異を検索したが、マウス *Thpo* では検出されなかった。また、マウス *Thpo* の転写産物を確認したところ、ヒトの HT の原因とされるエクソン 3 スキッピング (Wiestner et al, 1998; Liu et al, 2008; Zhang et al, 2011)を起こしている転写産物はみられなかった。マウスゲノムにおいてはヒトゲノムで観察される *THPO* 上流のフレームのずれた ORF も種を超えて保存されており、*THPO* の発現において、ヒトとマウスで異なる点は見いだせなかった。

我々は次に人の骨髄増殖性疾患でみられる MPL W515L/K (Pikman et al, 2006)、JAK2V617F、そしてヒトの HT でみられる MPL のバリエント (K39N、R102P、P106N、R120W、R170H、T487A、L505G、S505N) (Moliterno et al, 2004; Ballanne et al 2017; El-Harith et al, 2009; Al-Harbi et al, 2021; Vasseur et al, 2023; Rendo et al, 2022; Ding et al, 2004)、JAK2 のバリエント (I223T、R564Q、H608N、V617I、S755R、R867Q、T875N、R938Q) (Han et al, 2021; Muller et al, 2021) について確認した。

ヒトの HT で報告されている JAK2 のバリエントはみられなかった。一方で、MPL タンパクでは、HT や MPN で報告されている 9 か所の変異部位のうち K39N、R120W、T487A の 3 か所で、ヒトとマウスのアミノ酸に違いがみられた (図 1)。これら 3 つの部位のアミノ酸のうち、39 番目のアミノ酸についてはヒトの場合はリシン(K)であるのに対して、マウスはアスパラギン(N)であり、ヒトの HT で報告されている変異と同一の変異を、マウスは正常配列として有していることを見出した (図 1)。残る R120W、T487A についてはヒトとマウスでアミノ酸が異なるものの、ヒト HT 家系で報告されている変異パターンとは異なっていた。

一般的に実験に用いられているマウス種である C57BL/6、BALB/c、DBA/2、C3H についてシークエンスを行い確認したところ、いずれも MPL N39 であることを確認した。ヒトの MPL (635 アミノ酸残基)と、マウスの Mpl (633 アミノ酸残基)を BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)で比較したところ、81%相同であった (図 1)。

Human MPL vs Mouse MPL

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
1000 bits(2586) 0.0		Compositional matrix adjust.	516/635(81%)	548/635(86%)	2/635(0%)
Human 1	MPSWALFMVTSCLLLAPQNLAVSSDDVSLASDSEPL		FSRTFEDLTCFWDEEEAAPS	60	
Mouse 1	MPSWALFMVTSCLLLA N AQV+SDDV LLA +EPL		FS+TFEDLTCFWDEEEAAPS	60	
Human 61	GTQQLLYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCFDQDEEVL		FFHLHLWVKNVFLNQT	120	
Mouse 61	GTQQLLYAY EKPRACPL SQS+P FGTRYVCFDQDEEVL		FFHLHLWVKNVFLNQT	120	
Human 121	TQRVLVDVSVGLPAPPPIKAMGSGPGELQISWEEPAPEISDFLR		ELRYGPRDPKINST	180	
Mouse 121	QRVLVDVSVGLPAPP +IKA GGSQPGELQI WE PAPEISDFLR		ELRYG D N+T	180	
Human 181	GPTVIQLIATETCCPALORPHSASALDQSPCAQTPMWDGPKQTSPSREASALTAEGGS		P+VIQL++TETCCP L P+ LQQ PC FT GP +TSP+ EA LT +GGG	240	
Mouse 181	APSVIQLLSTETCCPTLMPNPVPLDQPPCVHTASQPHGVRTSPAGEAPFLTVKGGG			240	
Human 241	CLISGLQPGNSYWLQLRSEPDGSLGGSGWSGLPVTVDLPGDAVALGLQCFTLDLKNVT		CL+SGLQ G SYWLQLRG+PDG+SL GSWG WS PVTVDLPGDAV +GLQCFTLDLK VT	300	
Mouse 241	CLVSLQAGKSYWLQLRSPDGVSLRGSWGPWSPVTVDLPGDAVTIGLQCFTLDLKNVT			300	
Human 301	CQWQQDDHASSQGGFFYHSRARCPRDRYPIWNECEEEETNPGLQTPQFSRCHFKSFWDS		CQWQQD SSQGGFF HSR RCCP DR P WE CEEEE PG Q SRCHFKSFWDS	360	
Mouse 301	CQWQQDRTSSQGGFFRHSRTRCCPTDRDPTWEKCEEEEP-RPGSQPALVSRCHFKSFWDS			359	
Human 361	IIHILVEVTTAPGTVHSYLGSPFWIHQAVRLPTPNLHWREISSGHLELWQHSPSSWAAQE		+IHILVEVTTA G VHSYLGSPFWIHQAV LPTP+LHWRE+SSG LELEWQH SSWAAQE	420	
Mouse 360	VIHILVEVTTAQGAVHSYLGSPFWIHQAVLLPTPSLHWREVSSGRLELWQHSSWAAQE			419	
Human 421	TCYQLRYTGEHQWVLEPPLGARGGTLELRPSRYRLQLRARLNGPTYQGPWSWSWDP		TCYQLRYTGGG +HWKVEP LGARGGTLELRPR+RY LQLRARLNGPTYQGPWS+WS P	480	
Mouse 420	TCYQLRYTGEHQWVLEPPLGARGGTLELRPRARYSLRARLNGPTYQGPWSAWSPP			479	
Human 481	TRVETATETAMISLVTALHLVLSGLAVLGLLLLRVFPAPHYRRLRHALWPSLPDLHRVLG		RV T +ETAMI+LVTAL LVL LSA+LGLLLL +WFPAPHYRRLRHALWPSLPDLHRVLG	540	
Mouse 480	ARVSTGSETAMITLVTALLLVLSGLALLGLLLLRVFPAPHYRRLRHALWPSLPDLHRVLG			539	
Human 541	QYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSERTPLPLCSQAQMDYRRLQPSCLG		QYLRDTAALSP KATV+D+CEEVEPSLLEILPKSSE TPLPLC SQ QMDYR LQP CL	600	
Mouse 540	QYLRDTAALSPSKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSESTPLPLCPSPQMDYRGLQP-CLR			598	
Human 601	TMPLSVCPMAESGSCCTTHIANHSYLPISYWQOP		635		
Mouse 599	TMPLSVCPMAE+GSCCTTHIANHSYLPISYWQOP		633		

Variant found in hereditary thrombocytosis

Somatic mutation found in cases with MPN

図 1. ヒトおよびマウスの MPL のアミノ酸配列比較

赤枠はヒトの家族性血小板血症増多症または骨髄増殖性疾患で同定された遺伝子変異を示している。

【考察】

MPL K39N は MPL Baltimore として知られており、39 番目のアミノ酸が リシンからアスパラギンに変わる変異である。この変異は、アフリカ系アメリカ人の 3 人の家系で初めて同定された。およそ 7% のアフリカ系アメリカ人が、この変異をヘテロで持つと報告されている (Molitero et al, 2004)。この遺伝子多型は常染色体優性遺伝であるものの、ヘテロ接合体では正常範囲内の血小板数を示す者もいれば、血小板増多を示す者もいることを考えると、浸透率は 100% ではないと考えられる。一方で、この変異をホモで持つ者は著名な血小板増多を呈す (Teofili et al, 2011)。近年、血小板の殺マラリア原虫効果が注目されており、血小板数が高いほど血中のマラリア原虫の数が少なく、重症化しにくいと報告されている (Kho et al, 2018; Attaher et al, 2024)。このことから、マラリアの流行地であるアフリカでは MPL Baltimore の保有が生存に有利であった可能性もある。Mpl K39N は細胞外のサイトカイン受容体ドメインに位置しているため、この部分に変異があるとトロンボポエチンに対する親和性が低下する。さらに、糖鎖修飾が十分に行われなため、MPL の発現が低下することでトロンボポエチンのクリアランスが低下し、家族性血小板増多症を発症する (Teofili et al, 2011)。マウスと、いくつかの動物種は MPL N39 を持つ (図 2)。これらの動物種では MPL N39 をホモで持つと考えられる。

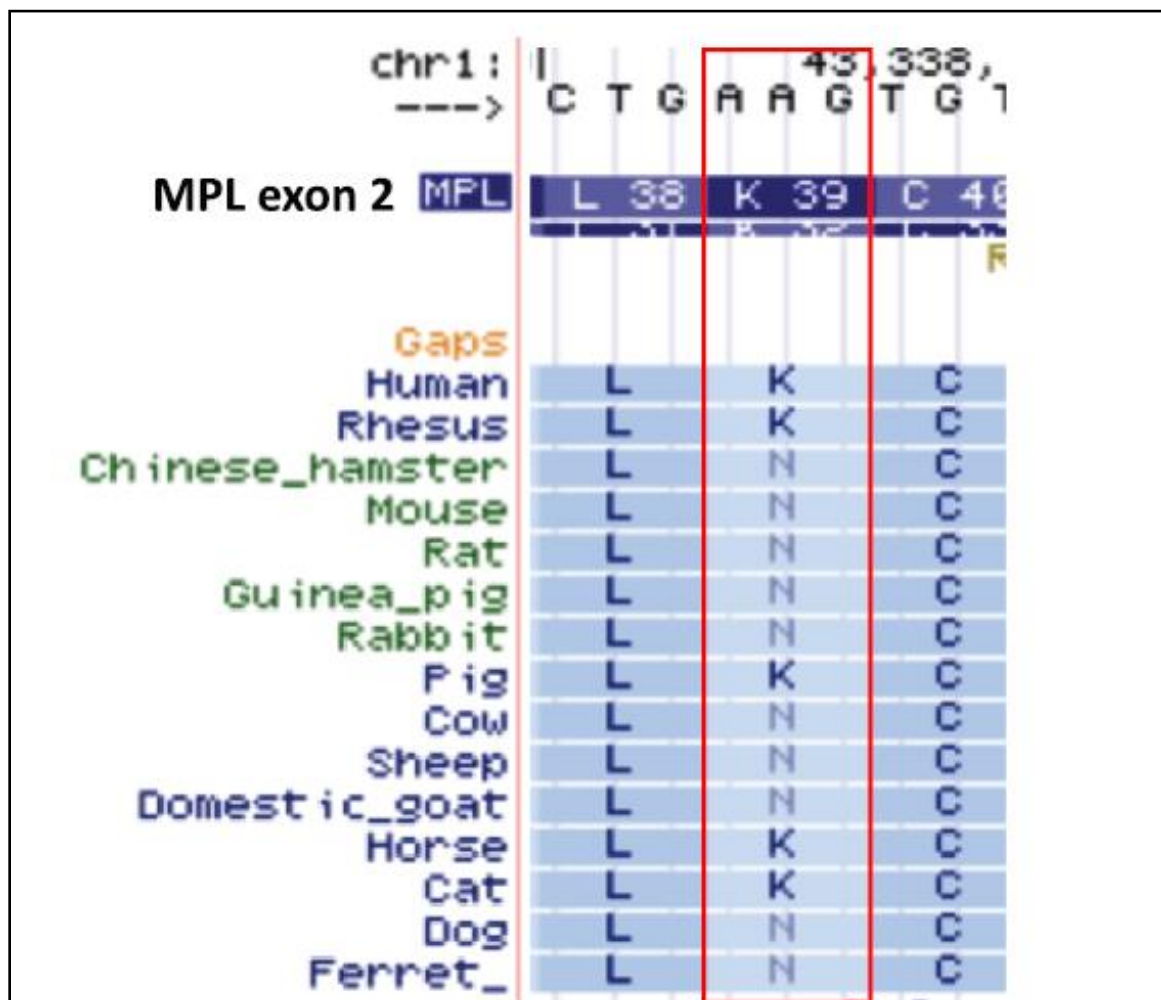
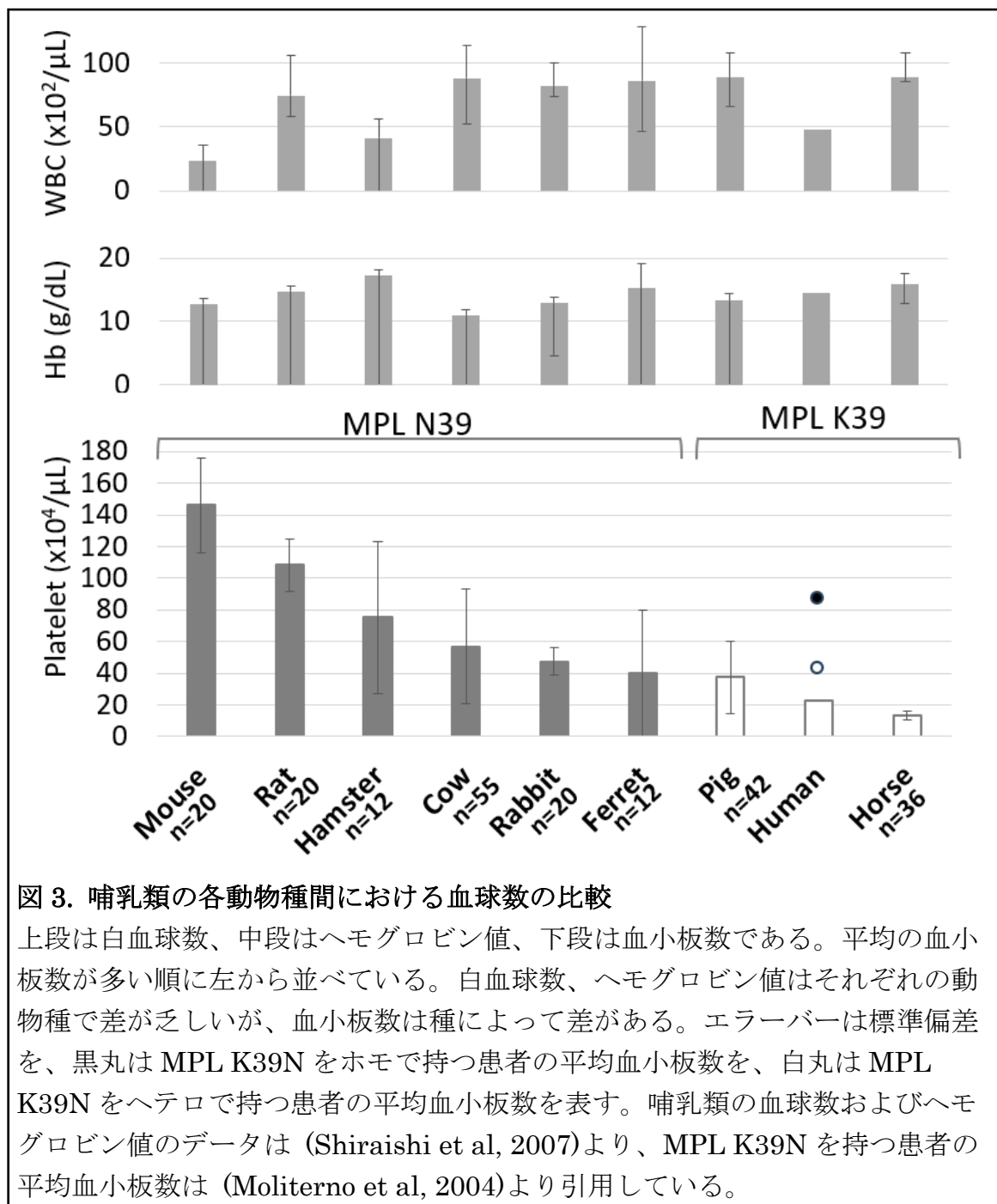


図 2. 哺乳類間での K/N39 の比較

UCSC genome browser (<http://genome.Ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) を用いて哺乳類の各動物種間で MPL の 39 番目のアミノ酸を比較した。

哺乳類同士での血球数を比較すると (Shiraishi et al, 2007)、Mpl N39 を持つ動物種では、ヒトと比較して相対的に血小板数が多い (図 3)。Mpl N39 を持つ動物種は、Mpl K39 を持つ動物種よりも有意に血小板数が多い ($P=0.024$)。さらに、ヒトで MPL K39N をホモで持つ者は、ヘテロで持つ者より平均血小板数が多い ($858000/\mu\text{L}$ vs $424000/\mu\text{L}$)。Mpl N39 を持つ動物種の中でも血小板数にはばらつきがみられる。



種を超えたゲノム多型の影響の比較は困難であるが、Mpl N39 を持つ動物種の方が、Mpl K39 を持つ動物種より有意に血小板数が多い ($P=0.024$)。注目すべきは、これがヒトにおける家族性血小板増多症の原因となる変異という点である。血小板高値は止血に優位である反面、血栓リスクが高まる可能性がある。高い血小板数によって止血しやすいことがいくつかの動物種の生存に有利に働いた可能性が考えられるが、それぞれの種の創始個体による遺伝的なボト

ルネック効果を見ているだけの可能性もある。この結果はあくまでも比較ゲノム学による推論であり、実際に検証するには、マウスにおいて *Mpl* N39→K39 に改変したトランスジェニックマウスの血小板数を検討する必要がある。

一方、*Mpl* K39 が血小板数を増加させるということを間接的に支持する報告として、近傍の *Mpl* C40R の遺伝子変異を持つマウスは血小板数が少ないと報告されている (Chen et al, 2009)。MPL の V28 から D34 までのアミノ酸を欠くスプライシングバリエーションを持つトランスジェニックマウスでも、野生型のマウスと比較して血小板数が低いと報告されている (Spivak et al, 2020)。これらのデータは、マウスにおいて、*Mpl* のこの領域が血小板数の維持に重要な役割を持つことを示している。マウスとラットはヒトの疾患の研究にしばしば用いられるが、その結果の解釈にあたり注意が必要である。マウスで *THPO* を強制発現させると、血小板増多に加えて骨髄線維化を起こす (Frey et al, 1998; Kakumitsu et al, 2005)。一方で、ヒトにおいて *THPO* 遺伝子変異による HT で骨髄線維症をおこすのは比較的稀であるとされている。

CRISPR/Cas9 によって *Mpl* S505N の胚細胞変異を導入したマウスモデルは血小板増多と骨髄線維化を生じる (Adriaanse et al, 2022)。一方で、ヒトにおける *MPL* S505N が最初に同定された家系では、血小板増多があるものの、骨髄線維化は認められていない (Ding et al, 2004)。これらの違いは、動物種によって遺伝的な背景が異なるためであるかもしれない。マウスは *Mpl* N39 をホモで持つために遺伝的に *Thpo-Mpl* 系のシグナルが活性化しやすく、ヒトよりも骨髄線維化を起こしやすい可能性がある。血小板についての研究でマウス・ラットを用いる際は、このような種特有の違いに留意する必要がある。

これらの研究を通して、ヒト HT を来す *THPO* 変異はすべて転写効率には影響せず、翻訳効率上昇を介して *THPO* 産生増多を来すことを明らかにした。また哺乳類における血小板数は大きく異なり、ヒト HT で報告のある *Mpl* N39 を遺伝的にもつ哺乳類では血小板数が高い傾向があることを見出した。

【総括と結論】

新知見

- ・哺乳類では Mpl N39 を持つ動物種が、Mpl K39 を持つ動物種より血小板数が高い傾向にあった。
- ・マウスでは Mpl N39 およびその近傍のアミノ酸配列が血小板数を規定する際に重要な役割を持つ。

意義

- ・マウスモデルやラットにおける血小板数の解釈については種特有の違いに留意する必要がある。

今後の課題

- ・マウスが骨髄線維化を起こしやすい機序について、JAK-STAT 系や RAS 経路、TGF- β など他の分子も関連している可能性があり、必ずしも明らかになっていない部分がある。

今後の研究展開

- ・マウスが骨髄線維化を起こしやすい機序について、JAK-STAT 系や RAS 経路、TGF- β など他の分子も含めてマウスが種として持っている分子学的特徴が影響していないかしていく。

【謝辞】

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただき、御指導を賜りました北海道大学大学院医学研究院内科系部門内科学分野血液内科学教室 豊嶋崇徳教授に深く感謝いたします。また、直接の御指導を賜りました北海道大学病院臨床研修センター 小野澤真弘講師に心より感謝申し上げます。最後に様々な面においてご協力いただいた血液内科学教室教室員の皆様に心よりお礼申し上げます。

【利益相反】

本研究において開示すべき特定企業との利益相反状態はない。

【引用文献】

Adriaanse FRS, Kamens JL, Vogel P, Sakurada SM, Pruett-Miller SM, Stam RW, Michel Zwaan C and Gruber TA (2022) A CRISPR/Cas9 engineered Mpl(S504N) mouse model recapitulates human myelofibrosis. *Leukemia*. 36, 2535–2538.

Al-Harbi T, Al-Zahrani M, Al-Balwi M, Al-Hazmi A, Alsuhaibani A, Aljafn N, Alsumari F, Aleshaiwi L, Alsuhibani A, Alqasim O, et al (2021) Clinical course of myeloproliferative leukaemia virus oncogene (MPL) mutation-associated familial thrombocytosis: a review of 64 paediatric and adult patients. *Br J Haematol* 194, 893–898.

Attaher O, Swihart B, Dang L, Santara G, Mahamar M, Keita S, Dembele A, Diarra BS, Issiaka D and Barry A, et al (2024) Higher platelet counts and platelet factors are associated with a reduction in *Plasmodium falciparum* parasite density in young Malian children. *Int J Infect Dis* 139, 171-175.

Bellanne-Chantelot C, Mosca M, Marty C, Favier R, Vainchenker W and Plo I (2017) Identification of MPL R102P mutation in hereditary thrombocytosis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 8, 235.

Cartegni L, Chew SL and Krainer AR (2002) Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet*. 3, 285-298.

Cazzola M and Skoda RC (2000). Translational pathophysiology: a novel molecular mechanism of human disease. *Blood*. 95, 3280-3288.

Chan ER, Lavender H, Li G, Haviernik P, Bunting KD and Adams MD (2009) An ENU-induced recessive mutation in Mpl leads to thrombocytopenia with overdominance. *Exp Hematol* 37, 276–84.

Ding J, Komatsu H, Wakita A, Kato-Uranishi M, Ito M, Satoh A, Tsuboi K, Nitta M, Miyazaki H and Iida S, et al (2004) Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation

of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood* 103, 4198–4200.

El-Harith el HA, Roesl C, Ballmaier M, Germeshausen M, Frye - Boukhriss H, Von Neuhoff N, Becker C, Nürnberg G, Nürnberg P, Ahmed MAM, et al (2009) Familial thrombocytosis caused by the novel germ-line mutation p.Pro106Leu in the MPL gene. *Br J Haematol* 144, 185–94.

Fielder PJ, Hass P, Nagel M, Stefanich E, Widmer R, Bennett GL, Keller GA, de Sauvage FJ and Eaton D (1997) Human platelets as a model for the binding and degradation of thrombopoietin. *Blood* 89, 2782–2788.

Ghilardi N, Wiestner A and Skoda RC (1998) Thrombopoietin production is inhibited by a translational mechanism. *Blood*. 92, 4023-4030.

Ghilardi N, Wiestner A, Kikuchi M, Ohsaka A and Skoda RC (1999a) Hereditary thrombocythaemia in a Japanese family is caused by a novel point mutation in the thrombopoietin gene. *Br J Haematol* 107, 310-316.

Ghilardi N and Skoda RC (1999b) A single-base deletion in the thrombopoietin (TPO) gene causes familial essential thrombocythemia through a mechanism of more efficient translation of TPO mRNA. *Blood* 94, 1480-1482.

Graziano C, Carone S, Panza E, Marino F, Magini P, Romeo G, Pession A and Seri M (2009) Association of hereditary thrombocythemia and distal limb defects with a thrombopoietin gene mutation. *Blood* 114, 1655-1657.

Gurney AL, Kuang WJ, Xie MH, Malloy BE, Eaton D and de Sauvage FJ (1995) Genomic structure, chromosomal localization, and conserved alternative splice forms of thrombopoietin. *Blood* 85, 981-988.

Frey BM, Rafii S, Teterson M, Eaton D, Crystal RG and Moore MA (1998) Adenovector-mediated expression of human thrombopoietin cDNA in immune-compromised mice: insights into the pathophysiology of

osteomyelofibrosis. *J Immunol* 160, 691–699.

Han EY, Catherwood M and McMullin MF (2021) Hereditary thrombocytosis: the genetic landscape. *Br J Haematol* 194, 1098–1105.

Harrison CN, Gale RE, Wiestner AC, Skoda RC and Linch DC (1998) The activating splice mutation in intron 3 of the thrombopoietin gene is not found in patients with non-familial essential thrombocythaemia. *Br J Haematol* 102, 1341–1343.

Hentze MW and Kulozik AE (1999) A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell* 96, 307-310.

Jorgensen MJ, Raskind WH, Wolff JF, Bachrach HR and Kaushansky K (1998) Familial thrombocytosis associated with overproduction of thrombopoietin due to a novel splice donor site mutation. *Blood (ASH Meeting Abstracts)* 92, Abstract #834

Jung N, Kim DH, Ha JS and Shim YJ (2020) Thrombocythemia 1 With THPO Variant (c.13+1G>A) Diagnosed Using Targeted Exome Sequencing: First Case in Korea. *Ann Lab Med* 40, 341-344.

Kakumitsu H, Kamezaki K, Shimoda K, Karube K, Haro T, Numata A, Shide K, Matsuda T, Oshima K and Harada M, et al (2005) Transgenic mice overexpressing murine thrombopoietin develop myelofibrosis and osteosclerosis. *Leuk Res* 29, 761–769.

Kanda Y (2013) Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 48, 452-458.

Kaushansky K and Wood AJJ (1998) Thrombopoietin. *N Engl J Med* 339, 746–754.

Kaushansky K (2006) Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N Engl J Med* 354, 2034-2045.

Kho S, Barber BE, Johar E, Andries B, Poespoprodjo JR and Kenangalem E (2018) Platelets kill circulating parasites of all major Plasmodium species in human malaria. *Blood* 132, 1332–44.

Kikuchi M, Tayama T, Hayakawa H, Takahashi I, Hoshino H and Ohsaka A (1995) Familial thrombocytosis. *Br J Haematol* 89, 900–902.

Kimura H, Onozawa M, Hashiguchi J, Hidaka D, Kanaya M, Matsukawa T, Okada H, Kndo T, Matsuo Y and Teshima T (2024) Hereditary thrombocythemia due to splicing donor site mutation of THPO in a Japanese family. *Ann Hematol* 103, 89–96.

Kondo T, Okabe M, Sanada M, Kurosawa M, Suzuki S, Kobayashi M, Hosokawa M and Asaka M (1998) Familial essential thrombocythemia associated with one-base deletion in the 5′ -untranslated region of the thrombopoietin gene. *Blood* 92, 1091–1096.

Kuter DJ, Beeler DL and Rosenberg RD (1994) The purification of megapoietin: a physiological regulator of megakaryocyte growth and platelet production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11104–11108.

Kuter DJ (2013) The biology of thrombopoietin and thrombopoietin receptor agonists. *Int J Hematol* 98(1):10–23.

Liu K, Kralovics R, Rudzki Z, Grabowska B, Buser AS, Olcaydu D, Gisslinger H, Tiedt R, Frank P, Okon K, et al (2008) A de novo splice donor mutation in the thrombopoietin gene causes hereditary thrombocythemia in a Polish family. *Haematologica* 93, 706–714.

Liu K, Martini M, Rocca B, Amos CI, Teofili L, Giona F, Ding J, Komatsu H, Larocca LM and Skoda RC (2009) Evidence for a founder effect of the MPL-S505N mutation in eight Italian pedigrees with hereditary thrombocythemia. *Haematologica* 94, 368–374.

Mead AJ, Rugless MJ, Jacobsen SE and Schuh A (2012) Germline JAK2

mutation in a family with hereditary thrombocytosis. *N Engl J Med* 366, 967–969.

Mizutani S, Kuroda J, Shimizu D, Horiike S and Taniwaki M (2010) Emergence of chronic myelogenous leukemia during treatment for essential thrombocythemia. *Int J Hematol* 91, 516–521.

Moliterno AR, Williams DM, Gutierrez-Alamillo LI, Salvatori R, Ingersoll RG and Spivak JL (2004) Mpl Baltimore: a thrombopoietin receptor polymorphism associated with thrombocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 11444–11447.

Muller J, Porret NA and Rufer A (2021) Identification of a JAK2 FERM domain variant associated with hereditary thrombocytosis. *Hemasphere* 5, e626.

Nelson ND, Marcogliese A, Bergstrom K, Scheurer M, Mahoney D and Bertuch AA (2016) Thrombopoietin measurement as a key component in the evaluation of pediatric thrombocytosis. *Pediatr Blood Cancer* 63, 1484–1487.

Piccin A, Corvetta D, Rovigatti U, Mazzoleni G, Pusceddu I, Svaldi M, Steurer M, Gastl G and Cortelazzo S (2014) Essential thrombocythemia progressing to Ph⁺ chronic myeloid leukemia with megakaryoblastic blasts, following anagrelide withdrawal. *Platelets* 25, 646–647.

Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, Cuker A, Wernig G, Moore S, Galinsky I, et al (2006) MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 3, e270.

Plo I, Nakatake M, Malivert L, Villartay JP, Giraudier S, Villeval JL, Wiesmuller L and Vainchenker W (2008) JAK2 stimulates homologous recombination and genetic instability: potential implication in the heterogeneity of myeloproliferative disorders. *Blood* 112, 1402–1412.

Posthuma HL, Skoda RC, Jacob FA, van der Maas AP, Valk PJ and Posthuma EF (2010) Hereditary thrombocytosis not as innocent as thought? Development into acute leukemia and myelofibrosis. *Blood* 116, 3375–3376.

Prouzet-Mauleon V, Montibus B, Chauveau A, Hautin M, Migeon M, Ka C, Laharanne E, Bidet A, Corcos L, Lippert E, et al (2020) A novel thrombopoietin (THPO) mutation altering mRNA splicing in a case of familial thrombocytosis. *Br J Haematol* 90, e104–e107.

Rendo M, Cavacece C, Kou CJ, Beeler BW and Fenderson J (2022) Familial essential thrombocythemia with novel MPL L502G and G208K mutations. *Cureus* 14, e23220.

Schlemper RJ, van der Maas AP and Eikenboom JC (1994) Familial essential thrombocythemia: clinical characteristics of 11 cases in one family. *Ann Hematol* 68, 153–158.

Shiraishi J, Matsumoto H and Hirayama H (2007) Experimental blood cell counting on several kinds of animals with an automated hematology analyzer. *Sysmex J Int* 17, 1–7.

Spivak JL, Merchant A, Williams DM, Rogers O, Zhao W, Duffield A, Resar LS, Moliterno AR and Zhao ZJ (2020) Thrombopoietin is required for full phenotype expression in a JAK2V617F transgenic mouse model of polycythemia vera. *PLoS One* 5, e0232801.

Stockklauser C, Echner N, Klotter AC, Hegenbart U, Dreger P and Kulozik AE (2012) Hereditary thrombocythemia caused by a thrombopoietin (THPO) gain-of-function mutation associated with multiple myeloma and congenital limb defects. *Ann Hematol* 91, 1129–1133.

Teofili L, Giona F, Torti L, Cenci T, Ricerca BM, Rumi C, Nunes V, Foa R, Leone G, Martini M and Larocca LM (2010) Hereditary thrombocytosis caused by MPLSer505Asn is associated with a high thrombotic risk, splenomegaly and progression to bone marrow fibrosis. *Haematologica* 95,

65-70.

Teofili L and Larocca LM (2022) Advances in understanding the pathogenesis of familial thrombocythaemia. *Br J Haematol* 152, 701–712.

Vasseur L, Favier R, Kim R, Rabian F, Cabannes - Hamy A, Cassinat B, Maslah N, Vasquez N, Clappier E, Kiladjian J-J, et al (2023) Clonal evolution in hereditary thrombocytosis with MPL T487A mutation. *Pediatr Blood Cancer* 70, e29905.

Wiestner A, Schlemper RJ, van der Maas AP and Skoda RC (1998) An activating splice donor mutation in the thrombopoietin gene causes hereditary thrombocythaemia. *Nat Genet* 18, 49–52.

Xia D, Hsi ED, Dal Cin P and Hasserjian RP (2019) Composite chronic myeloid leukemia and essential thrombocythemia with BCR-ABL1 fusion and CALR mutation. *Am J Hematol* 94, 504–505.

Zhang B, Ng D, Jones C, Oh ST, Nolan GP, Salehi S, Wong W, Zehnder JL and Gotlib J (2011) A novel splice donor mutation in the thrombopoietin gene leads to exon 2 skipping in a Filipino family with hereditary thrombocythemia. *Blood* 118, 6988–6990.

Zhang Y, Xi X, Yu H, Yang L, Lin J, Yang W, Liu J, Fan X and Xu Y (2022) Chemically modified in-vitro-transcribed mRNA encoding thrombopoietin stimulates thrombopoiesis in mice. *Mol Ther Nucleic Acids* 29, 657–671.