

博士論文

小型・正常大の血小板を有する先天性血小板減少症の臨床的および遺伝学的解析

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻
小児血液腫瘍学分野
内山 芽里

【略語表】

AML	Acute myelogenous leukemia	急性骨髄性白血病
ANKRD26	Ankyrin repeat domain-containing protein 26	ANKRD26
CAMT	Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia	先天性無巨核球性血小板減少症
CGH	Comparative Genomic Hybridization	比較ゲノムハイブリダイゼーション法
CYCS	cytochrome c	CYCS
FGF2	fibroblast growth factor 2	FGF2
FLI1	Friend leukemia integration 1 transcription factor	FLI1
FPD/AML	Familial platelet disorder and predisposition to acute myelogenous leukemia	急性骨髄性白血病を伴う 家族性血小板減少症
HOXA11	homeobox A11	HOXA11
ITP	Immune thrombocytopenia	免疫性血小板減少症
IVIG	Intravenous immunoglobulin	大量ガンマグロブリン療法
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	MAPK
MDS	Myelodysplastic syndrome	骨髄異形性症候群
MPL	Myeloproliferative leukemia virus oncogene	MPL
MPV	Mean platelet volume	平均血小板容積
MYH9	myosin light chain 9	MYH9
PDGF-BB	platelet-derived growth factor BB	PDGF-BB
PF4	platelet factor 4	血小板第4因子
PIDJ	Primary Immunodeficiency Database in Japan	日本原発性免疫不全症データベース
PKC	Protein kinase C	プロテインキナーゼC
RBM8A	RNA-binding motif protein 8A	RBM8A
RUNX1	Runt-related transcription factor 1	RUNX1
SNP	Single nucleotide polymorphism	一塩基多型
TAR	Thrombocytopenia with absent radii	橈骨欠損を伴う血小板減少症
TGF β	Transforming growth factor β	TGF β
THC2	Autosomal dominant thrombocytopenia 2	常染色体優性遺伝性血小板減少症
TPO	Thrombopoietin	トロンボポエチン
WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein	Wiskott-Aldrich 症候群蛋白
WHO	World Health Organization	世界保健機関
WIP	WASP-interacting protein	WIP
XLT	X-linked thrombocytopenia	X連鎖性血小板減少症
5' -UTR	5' -untranslated region	5' -非翻訳領域

【要約】

小児期の血小板減少症は免疫性血小板減少症(Immune thrombocytopenia:ITP)の他に、血小板造血の維持に重要な遺伝子の変異による先天性血小板減少症が存在する。これまで本疾患群では血小板サイズによる分類が提唱されているが、本邦では包括的な小型・正常大の血小板を有する先天性血小板減少症の臨床的および遺伝学的解析は行われていない。

本研究では、家族歴、幼少時から認められる血小板減少、ITP 治療に反応が乏しい点などから小型・正常大の血小板を有する先天性血小板減少症が疑われる計 32 症例 (29 家系) を対象とし、その臨床的および遺伝学的解析を行った。その結果、12 症例 (37.5%) において先天性血小板減少症の確定診断ができ、3 家系 3 症例の *WASP* 異常症(Wiskott-Aldrich 症候群および X 連鎖性血小板減少症)、4 家系 5 症例の *RUNX1* 遺伝子変異を伴う急性骨髄性白血病を伴う家族性血小板減少症(Familial platelet disorder and predisposition to acute myelogenous leukemia:FPD/AML)、4 家系 4 症例の *ANKRD26* 遺伝子異常を伴う常染色体優性遺伝性血小板減少症 (Autosomal dominant thrombocytopenia 2:THC2)において遺伝子変異を同定した。*WASP* 遺伝子変異例のうち、2 例で稀な *WASP* 遺伝子内の染色体レベルの欠失を同定した。また FPD/AML の 2 家系、THC2 の 1 家系は家族歴がなく、家族内の遺伝子解析から *de novo* 変異を同定した。患者の血液以外の体細胞解析から FPD/AML 2 例、THC2 1 例は全て生殖細胞系列の変異と判明した。家族歴のある家系でも患者の

体細胞検索を行い、生殖細胞系列の変異と診断した。

臨床的検討では、遺伝子変異を認めない群と比較して、発症年齢は WAS および FPD/AML 群でより低年齢であること、血小板数は WAS 群で低い傾向であること、平均血小板容積は有意差がないこと、出血症状は WAS および FDP/AML 群で強い傾向があることを抽出した。遺伝子変異が同定された FPD/AML 6 症例、THC2 5 症例の血清トロンボポエチン(TPO)測定を行ったところ、健常コントロールと比較し全例において有意に血清 TPO 値は上昇していた。ITP 患者の TPO は正常もしくは軽度上昇と報告されており、血清 TPO 値の測定は ITP との鑑別に有用であった。また、骨髓像を検討できた FPD/AML 2 症例および THC2 2 症例の全例で巨核球系の異形成所見が観察され、*RUNX1* および *ANKRD26* 遺伝子異常と巨核球形態異常の相関が明確となった。

小型・正常大の血小板を有する先天性血小板減少症の多症例での遺伝学的および臨床的解析により、*de novo* 遺伝子変異症例を含む生殖細胞系列の責任遺伝子変異を同定した。臨床所見の特徴、血清 TPO 値測定と骨髓像における巨核球系異形成所見は、本疾患群のスクリーニングおよび慢性 ITP との鑑別診断に有用であった。先天性血小板減少症において、不要な ITP の治療を避けられること、また血液悪性疾患合併の可能性のある FPD/AML や THC2 を注意深く経過観察できることから、その確定診断法の確立は有用であると考えられた。

【研究背景】

小児期の血小板減少症は免疫性血小板減少症(Immune thrombocytopenia:ITP)が発症頻度としては多く、血小板や巨核球膜表面に発現する GP II b/III a や GP I b/IX などに対する自己抗体などの自己免疫応答で発症する。しかし自己抗体検査方法が限られており、現在は除外診断が基本となっている。

先天性血小板減少症は、血小板造血や血小板機能に関わる遺伝子変異により起こる稀な疾患である。先天性血小板減少症は血小板サイズによる疾患分類が提唱されている¹⁾²⁾ (表 1)。血小板サイズは、平均血小板容積 (Mean platelet volume:MPV) と顕微鏡下目視による評価に基づき、以下の通り定義した。小型血小板：正常MPV以下あるいは正常大血小板サイズ以下；正常大血小板：正常MPV域内あるいは正常人血小板サイズと同等；大型血小板：正常MPV以上で正常血小板の 2 倍程度(直径 $4\mu\text{m}$)；巨大血小板：正常MPV以上で赤血球大(直径 $8\mu\text{m}$)以上。小型血小板を有する疾患は、*Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)*あるいは*WASP-interacting protein (WIP)*遺伝子変異を持つWiskott-Aldrich syndrome(WAS)³⁻⁶⁾、同遺伝子変異で血小板減少のみを呈するX-linked thrombocytopenia(XLT)⁷⁾がある。正常大の血小板を有する疾患は、トロンボポイエチン(thrombopoietin:TPO)受容体遺伝子である*Myeloproliferative leukemia virus oncogene(MPL)*遺伝子変異を持つ先天性無巨核球性血小板減少症(Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia:CAMT)^{8,9)}、*homeobox A11(HOXA11)*遺伝子変異を持つ橈骨尺骨融合を伴う血小板減少症

(Amegakaryocytic thrombocytopenia with radio-ulnar synostosis)¹⁰⁻¹²、
RNA-binding motif protein 8A (RBM8A) 遺伝子変異を持つ橈骨欠損を伴う血小板減少症 (Thrombocytopenia with absent radii: TAR syndrome)¹³⁻¹⁵、*runt-related transcription factor 1 (RUNX1)* 遺伝子変異を持つ急性骨髄性白血病を伴う家族性血小板減少症 (Familial platelet disorder and predisposition to acute myelogenous leukemia: FPD/AML)¹⁶、*ankyrin repeat domain 26 (ANKRD26)* 遺伝子の 5'-非翻訳領域 (5'-untranslated region: 5'-UTR) に変異を持つ常染色体優性遺伝性血小板減少症 (Autosomal dominant thrombocytopenia 2: THC2)^{17,18}、*cytochrome c (CYCS)* 遺伝子変異を持つチトクロームc異常症 (Cytochrome c mutation)^{19,20}がある。

WASは易感染・難治性湿疹・血小板減少症を3主徴とする原発性免疫不全症で、X染色体劣性遺伝形式で一般的に男児に発症する。*WASP* 遺伝子異常症の中で血小板減少症（時に軽度の湿疹・易感染あり）を呈する場合はXLTと診断し、特に慢性ITPとの鑑別が重要である。多くの*WASP* 遺伝子変異が報告されており、特にエクソン1-4のミスセンス変異が多い。*WAS*の出血症状はほぼ必発で、重症出血の可能性も高い⁵⁾。また自己免疫疾患や、悪性リンパ腫などの悪性疾患の合併も知られている。*WAS*は出血、感染、悪性疾患などで死亡頻度の高い疾患であり、早期の診断確定と治療が必要な疾患であり、根本的治療は造血幹細胞移植である。

CAMTは常染色体劣性遺伝形式で、*MPL* 遺伝子変異を持つホモ接合体あるいは複合ヘテロ接合体で発症する。これまで約60症例が報告される先天性血小板減少症で

あり、徐々に骨髄不全が進行する^{8,9)}。

橈骨尺骨癒合を伴う血小板減少症は常染色体優性遺伝形式で、これまで*HOXA11* 遺伝子異常を伴う 2 家系と、*HOXA11* 遺伝子変異のない 7 家系が報告されている¹²⁾、稀な先天性血小板減少症である。

TAR症候群は常染色体劣性遺伝形式で、*RBM8A*遺伝子の稀なSingle nucleotide polymorphism (SNP)とエクソン接合部複合体のnull変異が原因として報告され¹³⁾、10 万から 20 万人に 1 人の頻度とされている¹⁴⁾。橈骨欠損が特徴であるが、上下肢など骨格系の異常や腎臓、心奇形、顔貌異常など全身の奇形を合併することが多い。新生児期から著明な血小板減少を示すが、2 歳頃から改善し、成人期にはほぼ正常値になる。TPOシグナルの異常が報告されている¹⁵⁾。

FPD/AMLは常染色体優性遺伝形式で*RUNX1* 遺伝子の変異をもつヘテロ接合体で発症し、これまで約 40 家系が報告されている。FPD/AMLの約 35-40%が急性骨髄性白血病(Acute myelogenous leukemia:AML)や骨髄異形成症候群(Myelodysplastic syndrome:MDS)に移行するといわれている¹⁶⁾。

THC2 は常染色体優性遺伝形式で、*ANKRD26* 遺伝子の 5'-UTRの変異をもつヘテロ接合体で発症する。これまで 45 家系の報告があり、血液悪性疾患に進展する可能性が示唆されている^{17,18)}。

チトクロームc異常症は常染色体優性遺伝形式で、これまで 2 家系の報告がある非常に稀な血小板減少症である^{19,20)}。

このように小型・正常大血小板を有する先天性血小板減少症は稀な疾患群として報告されているが、本邦では臨床的に認知度は高いとは言えず、これまでに多症例における本疾患群の臨床的および遺伝学的解析の報告は存在しなかった。

【研究目的】

臨床的に慢性 ITP との鑑別疾患として重要である小型・正常大の血小板を有する先天性血小板減少症において本邦症例を蓄積し、発症頻度、臨床所見の特徴及び診断に有用な指標を抽出し、遺伝子変異の全体像との相関を明確にすることを研究目的とした。

【研究方法】

1) 対象症例および臨床所見の評価

解析対象症例は、家族歴がある、低発症年齢である、ITP 治療への反応が乏しい点などから本疾患群が疑われる 20 歳以下の症例とした。小型血小板を有する WAS が疑われる症例は Primary Immunodeficiency Database in Japan(PIDJ)を介して、正常大の先天性血小板減少症が疑われる症例は 2013 年から小児血液・がん学会血小板委員会を通じて、解析症例として計 32 症例 (29 家系) を蓄積した。各症例毎の発症年齢、血小板数、平均血小板容積 (Mean platelet volume:MPV) を確認し、疾患毎の平均を算出した。出血症状は World Health Organization (WHO) bleeding scale を用いて評価を行い、Grade2 以上を出血症状ありと定義した。MPV が低値あるいは末梢血塗抹標本で小型血小板を持つ症例は *WASP* および *WIP* 遺伝子を、骨髄巨核球が少なく血小板数が低値である症例は *MPL* を、特に家族歴がある患者は *RUNX1* および *ANKRD26* を、橈骨尺骨融合の症例は *HOXA11* 遺伝子を、橈骨欠損の伴う症例は *RBM8A* 遺伝子を変異解析対象遺伝子とした。東北大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認を得た後、解析症例全員及び保護者に書面による同意を得た上で解析を行った。

2) 遺伝子変異解析

血液からの DNA 抽出は PAXgene Blood DNA kit (Qiagen)、あるいは、QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen) を用いた。爪・毛髪からの DNA 抽出は、

ISOHAIR(NIPPON GENE)を、頬粘膜からのDNA抽出はBuccalAmp DNA Extraction Kit (Epicentre)を用いた。Polymerase chain reaction (PCR) に用いる Primer は過去の文献を参照した^{17,21-24}。

PCRは、*WAS*、*RUNX1*(exon2、6)の反応液の組成は、genomic DNA50ng、20pmol primer、400 μ M dNTP、10 \times PCR buffer (1.5mM MgCl₂を含む)、1U Taq DNA polymerase (Takara)を用いた。*MPL*、*RUNX1*(Ex2、6以外)、*ANKRD26*はさらに400 μ M MgCl₂、10%DMSOを追加し、計 25 μ lの系で行った。PCR条件は、以下の通りとした。*WASP*: 95°C5分1サイクル、94°C30秒・55°C1分・72°C30秒35サイクル、72°C7分1サイクル; *MPL*: 94°C4分1サイクル、94°C30秒・56°C30秒・72°C30秒35サイクル、72°C10分1サイクル; *RUNX1*: 94°C5分1サイクル、94°C30秒・58°C1分・72°C30秒35サイクル、72°C7分1サイクル; *ANKRD26*: 94°C5分1サイクル、94°C30秒・62°C1分・72°C30秒35サイクル、72°C7分1サイクル。

PCR産物は1.5%アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色を行った。PCR産物は QIAquick Gel extraction kit(Qiagen)で精製し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems)を用いてシーケンス反応を行った。シーケンス解析は、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer または 3500xL Genetic Analyzer(Applied Biosystems)を用いた。

3) TA クローニング法による変異頻度解析

TOPO® TA Cloning Kit (Invitrogen)を用いて、PCR産物をpCR 2.1-TOPO vector

に導入し、E.Coli (ECOS competent E.coli)に形質転換した。2% X-gal 40 μ lを塗布したABPC含有 (100 μ g/ml) Luria-Bertani (LB) agar plateプレートに播種し、37°Cで1晩培養した。PCR産物が挿入されたクローンを30~40個選択し、ABPC含有LB液体培地 1.5mLに播種し、37°Cで約10時間振盪培養を行った。Mini plus Plasmid DNA Extraction System (VIOGENE)を用いてプラスミドを抽出し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems)を用いてシーケンス反応を行った。シーケンス解析は、3500xL Genetic Analyzer(Applied Biosystems)を用いた。

3) RT-PCR 法による RUNX1 mRNA 解析

家系4(患者兄弟とその父)の末梢血から、QIAamp RNA Blood Mini Kit(QIAGEN)を用いてRNAを抽出し、RNA PCR kit(AMV)Ver3.0 (Takara)を用いてRT-PCRを行った。RT-PCRの条件は、94°C5分1サイクル、94°C30秒・60°C30秒・72°C1分35サイクル、72°C10分1サイクルで行い、プライマーは、フォワードプライマー: 5'-TGAATCCTTCTAGAGACGTCCAC-3'、リバースプライマー: 5'-GCTCGGAAAAGGACAAGCTC-3'を用いた。

4) フローサイトメトリー法およびウエスタンブロット法による WASP 蛋白質発現解析

患者の末梢血よりFicoll-Paque PREMIUM(GE Healthcare)を用いて単核球を分離し、細胞溶解は氷上で1%TritonX-100とプロテアーゼ阻害剤を含んだLysis Buffer

で溶解し、14,000g, 4°Cで 20 分遠心し、蛋白上清を回収した。蛋白抽出液を 10%SDS-PAGEで電気泳動後、ニトロセルロースメンブレンに転写した。5%スキムミルクでブロッキングを行い、0.1%Tween20 含有のTBSで洗浄した。一次抗体は、WASPのアミノ酸 146 から 265 をエピトープとし、我々の施設で作成した抗WASP 5A5 モノクローナル抗体を用いた²⁵⁾。コントロール抗体としては抗アクチンモノクローナル抗体(Sigma)を用いた。二次抗体はホースラディッシュペルオキシターゼ標識抗マウス抗体を用い、化学発光を検出した。

各細胞分画におけるWASP蛋白質発現は、抗WASP抗体 (5A5) による細胞内染色とフローサイトメトリー法により確認した²⁵⁾。

5) アレイ CGH(Comparative Genomic Hybridization)法による *WASP*遺伝子コピー数の解析

アレイ CGH 法は、Human Genome CGH Microarray Kit 244A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)を用いて行った。

6) ELISA による血清トロンボポエチン値測定

FPD/AML 症例 (n=6)、THC2 症例(n=5)と血小板数正常な健常者コントロール (n=12)より血清を分離し、-20°Cで保存した。これらの保存血清において Human Thrombopoietin Quantikine ELASA kit (R&D systems)を用いて血清 TPO 値を測定した。

7) 統計処理

データは平均±標準偏差 SD で表記した。検定は Dunnett の検定を用いて、p 値が 0.01 未満を統計学的に有意差があるとした。

【研究結果】

1) 臨床像の解析

本邦 20 施設より合計 32 症例 (29 家系) の解析を行った。WASP 遺伝子変異が 3 症例 (3 家系)、RUNX1 遺伝子変異 5 症例 (4 家系)、ANKRD26 遺伝子変異 4 症例 (4 家系) が確定診断され、合計 12 症例 (11 家系) であり、解析症例の 37.5% に相当した。血小板減少症の家族歴は、WAS は 3 家系とも家族歴を認めたが、RUNX1 変異の 2 家系、ANKRD26 変異の 1 家系には家族歴を認めなかった。家族歴のある RUNX1 変異 2 家系では、両家系に血液悪性疾患(AML、MDS)の合併を認め、家族歴のある ANKRD26 変異 3 家系には、血液悪性疾患の合併は認めなかった。表 2 に症例毎の臨床所見のまとめを示す。

疾患毎のまとめを表 3 に示す。出血症状あるいは血小板減少を呈した年齢は、変異を同定できなかった群が 4.5 ± 5.3 歳であるに対し、WAS 群 2.1 ± 3.4 歳、FDP/AML 群 1.7 ± 1.1 歳、TCH2 群 8.2 ± 7.7 歳で、WAS 群と FDP/AML 群で低年齢、THC2 群で高年齢である傾向があった。血小板数の平均は全体 $62.9 \pm 30.4 \times 10^9/L$ で、WAS 群 $37.0 \pm 27.9 \times 10^9/L$ 、FDP/AML 群 $78.2 \pm 18.3 \times 10^9/L$ 、TCH2 群 $64.5 \pm 19.3 \times 10^9/L$ 、変異を同定できなかった症例群 $62.7 \pm 33.6 \times 10^9/L$ で、有意差はなかったが WAS 群で低値を示した (図 1)。MPV は、WAS 群 11.1fl 、FDP/AML 群 $9.5 \pm 1.5 \text{fl}$ 、THC2 群 $9.7 \pm 0.3 \text{fl}$ 、変異を同定できなかった症例群は $9.8 \pm 0.9 \text{fl}$ といずれも正常範囲であった。白血球数、ヘモグロビン値は FDP/AML 群、THC2 群で正常範囲であり、WAS 群では

白血球数は正常範囲であったが、ヘモグロビン値が低値であった。出血症状については、WAS群は皮下出血・紫斑の他、消化管出血・硝子体出血・硬膜下血腫の重度の出血症状を認めた。FPD/AML群は5人中4人で鼻出血や皮下出血・紫斑など軽微な出血症状を認めた。THC2群4人中3人には明らかな出血症状を認めず、1人に鼻出血・皮下出血など軽微な出血症状を認めた。血小板数と出血症状に関して有意差はなかったが、WAS群およびFPD/AML群でGrade2以上の症例が多く、特にFPD/AML群では比較的高い血小板数にも関わらず強い出血症状を呈す傾向がみられた(図2)。

2) 遺伝子変異解析および家系解析

WASP遺伝子変異は3家系(家系1~3)、3症例にて同定した(図3A)。症例1は出生時や幼少期には問題なく経過したが、6歳から紫斑出現し血小板 $5 \times 10^9/L$ と著明な血小板減少を認めた。ITPの治療(大量ガンマグロブリン療法 (Intravenous immunoglobulin:IVIG)、リツキシマブ、シクロスポリン、ステロイドパルス療法など)の効果は一時的で治療抵抗性であった。基礎疾患の検索を行い、WASP蛋白質のフローサイトメトリー法およびウエスタンブロット法でWASP蛋白質発現の低下を認めた(図3Ca, Da)。WASP遺伝子検査で、ミスセンス変異(c.C1378T、p.Pro460Ser)を同定し、易感染や発疹がないことからXLTと診断した(図3B)。難治性の血小板減少と今後の悪性疾患合併の可能性から、骨髄非破壊的前処置を用いて非血縁者間臍帯血移植を施行し、完全キメラと血小板数の回復を達成し、明らかな移植合併症なく経過している。症例2は家族歴で、母方の大叔父が幼少期にITPで死亡している(図3A)。

分娩後に頭血腫あり、 $56 \times 10^9/L$ と血小板減少を認めた。*WASP*遺伝子解析にてエクソン 3-7 の欠失と、直接シーケンスにて *WASP*の約 1.8kbの欠失(c.274_734del、p.Gly93CysfsX13)を認めた(図 3B)。症例 3 は家族歴で、母方叔父 2 人が出血・感染が原因で 1 歳未満に死亡している(図 3A)。症例は生後より血小板減少 $20-50 \times 10^9/L$ があり、血小板輸血を要した。家族歴から *WAS*が疑われ、フローサイトメトリー法およびウエスタンブロット法で *WASP*蛋白質の欠損を認めた(図 3Cb,3Db)。アレイ CGH法ではイントロン 2 上およびエクソン 12 上の領域でのコピー数は正常であったが、イントロン 9 上の領域でアレルが欠損していた(図 3E)。PCR法では、エクソン 3-12 でPCR増幅が得られず、*WASP*のエクソン 3 以降の約 60kbの欠失を認め、*WAS*と診断した。易感染のエピソードもあり、2 歳時に非血縁者間臍帯血移植を行い、完全キメラを得ている。

RUNX1 遺伝子変異を伴う FPD/AML は、4 家系(家系 4~7)、5 症例に認められた。家系 4、家系 7 は血小板減少症の家族歴があり、血液悪性疾患で死亡した家族が存在した(家系 4 父方祖父:56 歳時に MDS で死亡、家系 7 父方叔父:49 歳時に AML 発症し 51 歳で死亡)(図 4A)。症例 4 の兄弟症例とその父に、*RUNX1* にイントロン 3 のアクセプター部位に新規のスプライシング変異(c.271-1G>A、p.Val91fsX6)をヘテロで認めた(図 4B)。*RUNX1* の RT-PCR では、エクソン 4 をスキッピングしてエクソン 3 とエクソン 5 が直接連続した mRNA が認められた(図 4C)。症例 7 には、*RUNX1* エクソン 5 にヘテロで 1 塩基重複(c.520dupC、p.Arg174ProfsX12)を認めた。

いずれの患者の血液以外の体細胞（爪・髪・頬粘膜 DNA）でも同変異を認め、生殖細胞系変異と考えられた。症例 5 には、エクソン 4 に既報のミスセンス変異(c.416G>A、p.Arg139Gln)を認めた。症例 6 には *RUNX1* にヘテロで新規ミスセンス変異(c.511G>A、p.Asp171Asn)を認めた(図 4B)。症例 5、6 には血小板減少症の家族歴は認めず(図 4A)、両親・兄弟はいずれも *RUNX1* 遺伝子は正常であったため、*de novo* 変異と考えられた。患者の血液以外の体細胞でも同変異を認め、生殖細胞系変異と考えられた(図 5)。

ANKRD26 遺伝子変異を伴う *THC2* は、4 家系(家系 8~11)、4 症例に認められた。家系 9、10、11 に血小板減少症の家族歴を認め、血液悪性疾患の家族歴はなかった(図 6A)。症例 9 には *ANKRD26* の 5'-UTR に c.-118C>T のヘテロ変異、症例 10、症例 11 に c.-134G>A のヘテロ変異を認めた。症例 10 は、患者の血液以外の体細胞検索でも同変異を認め生殖細胞系列の変異と考えられた。症例 8 には血小板減少の家族歴は認めなかった。症例は血液 DNA より c.-118C>T のヘテロ変異を認めたが、両親・兄弟は正常型で同変異を認めず、*de novo* 変異と考えられた。TA クローニングを用いた患者の血液以外の組織における体細胞検索では、血液と同様に正常型アレルと変異アレルが共存するヘテロ変異が確認され生殖細胞系列の変異と考えられたが、発生初期段階での胚で起こった変異(モザイク)である可能性は否定はできない。(図 6B)。

3. 血清 TPO 値

健常コントロールの血清 TPO は 35.50 ± 11.12 pg/ml(範囲:12.55-50.37)であった。

FPD/AML患者の血清TPOは 176.10 ± 89.48 pg/ml(範囲:99.7-349.63)と有意に上昇していた($p < 0.001$)。THC2患者の血清TPOは 156.36 ± 53.54 pg/ml(範囲:102.44-231.76)と有意に上昇していた($p < 0.001$) (図 7)。

4. FPD/AML 及び THC2 症例における骨髓像

FPD/AML では症例 5、6 の計 2 症例で骨髓検査が施行され、多核や分離核などもつ巨核球や小型巨核球など特徴的な異形成を認めた(図 8)。大きな細胞質を持つ成熟巨核球はほとんど見られなかった。THC 2 症例の症例 8、症例 11 の計 2 症例の骨髓検査でも、同様に異形成を伴う巨核球 (小型巨核球や分離核) を認め、白血球や赤芽球系には異形成を認めなかった(図 9)。

【考察】

これまで本邦における小型・正常大先天性血小板減少症の発症頻度は不明であった。イタリアを中心に先天性血小板減少症 376 人を解析した報告では、巨大血小板を呈する Bernard-Soulier 症候群 33.8%、MYH9 異常症 32.2% などは症例数が多く、小型・正常大血小板減少症は WASP 異常症 2.4%(9/376 人)、CAMT 1.3%(5/376 人)、FPD/AML 1.1%(4/376 人)、THC2 15.4%(58/376 人)、TAR 0.3%(1/376 人) と少ない結果であった²⁶⁾。これまで FPD/AML は約 40 家系、THC2 は約 45 家系の報告に留まっている。これは FPD/AML は 1999 年に *RUNX1* が、THC2 は 2011 年に *ANKRD26* が原因遺伝子と判明した比較的新しい疾患であり、まだ疾患認知度が低いこと、ITP との鑑別が難しいことが影響していると考えられる。今回我々は日本における 32 症例 29 家系解析し、新たに WAS 異常症 3 家系、FPD/AML 家系 4 家系、THC2 家系 4 家系を含む 12 症例(37.5%)を同定した。WAS の発症頻度は、男子出生数 100 万人に対し 1-4 人と報告されている²⁷⁾。本研究は、2012 年 4 月から 2014 年 10 月までの症例を蓄積している。総務省統計局の調査によると、本邦の 2013 年 20 歳未満の総人口は 2243.7 万人と報告されており、本研究に日本全国から症例が集まったと仮定すると、FPD/AML の 20 歳未満の発症頻度は 0.22 人/100 万人、THC2 の発症頻度は 0.18 人/100 万人と算出されるが、実際にはこれより多い頻度が推定される。本研究において、より症例の漏れが少ないと考えられる宮城県に限定すると、本研究内には FPD/AML の 3 症例、THC2 の 1 症例（いずれも 15 歳未満）が含まれており、宮城

県の平成 25 年 10 月 1 日現在の 15 歳未満の人口は 29.9 万人と報告されている。宮城県に限定した 15 歳未満の発症頻度は、FPD/AML 10 人/100 万人、THC2 3.3 人/100 万人と推定できる。しかし、本疾患群は、慢性ITPと診断されている症例、あるいは血小板減少に気づかれていない症例として存在する可能性があり、実際の頻度はより高いと考えられる。

今回の解析では、WAS群は血小板数が少ない傾向があり、MPVは疾患群で有意差はなかった。WASの平均血小板数は $36\sim 37\times 10^9/L$ 、平均MPVは約 6.0fl（範囲 4.0-10.5fl）と報告されており⁵⁾、血小板数は今回と一致している。MPVは症例 1 の検査結果のみで 11.1flと正常であったが、ITP患者のMPVは健常人と比較し高値²⁸⁾との報告もあり、ITP合併例であったことが影響していたと考えられる。WAS群のヘモグロビン値が低値なのは、新生児・乳児が含まれていること、出血症状が強いことが原因と考えられる。FPD/AMLの血小板減少の程度は中等度（ $30\sim 100\times 10^9/L$ ）と報告されており、今回の平均血小板数と一致していると思われる。THC2 患者の平均血小板数は $47.5\pm 28.3\times 10^9/L$ 、平均MPVは $9.3\pm 1.6fl$ と報告されており¹⁷⁾、今回のデータとも矛盾はしない。

今回の解析では、WAS症例、FPD/AML症例が比較的低年齢で発症し、出血症状が強い傾向が見られた。WASは血小板機能異常を伴うため、出血症状は重篤な症例が多い。今回のXLT症例は血小板に対する自己抗体が検出できなかったが、IVIGが一時的でも有効で血小板輸血不応からITP合併していたことが示唆され、より診断が困難

であったと考えられる。従ってITP治療不応の場合は、基礎疾患の検索が重要であることが再認識された。FPD/AML症例の出血症状は軽度から中等度と報告され、今回の結果に矛盾しない。症例6は血小板機能解析を施行され、コラーゲン・ADP・エピネフリン・アラキドン酸刺激での血小板凝集能の低下、血小板 α 顆粒の減少が認められ、血小板機能異常が観察された。これはFPD/AML症例で出血症状が強いことと関連していると考えられる。WAS、FPD/AMLの発症年齢が比較的低いのは、出血症状が強いことが一因と考えられる。THC2の出血症状は約80%がWHO bleeding scale Grade 1か2と軽微な症例が多い¹⁷⁾といわれている。THC2の血小板機能は、コラーゲン・ADP・リストセチンに対する血小板凝集能は正常といわれており¹⁷⁾、今回の結果とも関連している。THC2の発症年齢が比較的高いのは、出血症状が軽微であることが一因と考えられる。

WASP変異は、これまでミスセンス変異やナンセンス変異、重複、スプライス変異、小さな欠失などが報告されているが、大きな欠失症例はこれまで14例報告されている²⁹⁾。今回我々は、新規のエクソン3-12の大きな欠失と、既報のエクソン3-7の大きな欠失の症例を報告した。WAS/XLTともに早期発見・治療介入が必要と考えられ、男児・小型血小板で血小板減少を伴う症例はWAS/XLTを念頭にいれ、WASP遺伝子変異のスクリーニングをする必要がある。これまでFPD/AML、THC2は家族歴のある症例がほとんどであったが、今回我々は初めてFPD/AML2家系に生殖細胞系列で*de novo*のRUNX1ミスセンス変異を、THC21家系に生殖細胞系列で*de novo*の

ANKRD26 遺伝子変異を認めた。常染色体優性遺伝形式のFPD/AML、THC2 は遺伝子の1つの変異で疾患が起こるため *de novo*が多いと思われる。巨大血小板を呈す先天性血小板減少症の *MYH9* 異常症は常染色体優性遺伝で、*de novo*の症例が約30%含まれると報告されている³⁰⁾。従って家族歴のない血小板減少症症例でも、正常大血小板で軽度から中等度の血小板減少を認めた際には、先天性血小板減少症を疑い検索をする必要がある。

WASは摘脾で血小板数増加が得られる場合が多いことから、血小板減少の一因は脾臓での血小板捕捉と考えられている。またWASのマウスモデルでは骨髄内での未熟な *proplatelet*形成や巨核球の類洞への遊走障害が認められ、血小板減少の一因である可能性が報告されている³¹⁾。

RUNX1 は胎児造血や成人造血幹細胞の維持に関わる非常に重要な転写因子であり³²⁾、また血小板造血において重要な転写因子である。*RUNX1* が *MPL*発現を造血幹細胞では負に、巨核球では正に制御しており³³⁾、FPD/AMLでは *MPL*発現低下が示されている³⁴⁾。また *RUNX1* は血小板造血や血小板機能に関わる *Protein kinase C* (*PKC*)^{35,36)}、*platelet factor 4* (*PF4*)遺伝子³⁷⁾、*myosin light chain 9* (*MYH9*)遺伝子³⁸⁾ の発現を制御しており、FPD/AMLではこれらの発現が低下しており、血小板造血や血小板機能異常との関連が示唆されている。

THC2 の血小板減少の機序としては、TPOシグナル伝達系の異常との関連が報告されている。*ANKRD26* の5'-UTRに *RUNX1*、*Friend leukemia integration 1*

transcription factor(*FLI1*)が結合し、*ANKRD26* 転写を抑制することでTPOシグナルの下流のMitogen-activated protein kinase(MAPK)経路が抑制され、正常なproplatelet形成が行われている。しかしTHC2患者は*RUNX1*、*FLI1*が結合できないために*ANKRD26*によるproplatelet形成が阻害されることが報告されている³⁹⁾。

THC2患者の巨核球・血小板でアポトーシスが亢進しているとの報告もある⁴⁰⁾。

FPD/AML、THC2では血液悪性疾患の合併が報告されている。FPD/AML患者の35-40%が血液悪性疾患を合併するといわれ、平均発症年齢は33歳と若い⁴¹⁾。最近、*CDC25C*変異がFPD/AML患者の53%に見られ、癌化に関与している可能性が報告された⁴²⁾。*RUNX1*は多くのDNA修復関連因子の発現を転写レベルで調整していることで癌抑制遺伝子として機能している。しかし*RUNX1*変異でDNA修復機構が抑制され*CDC25C*変異を起こし、さらに*GATA2*などの遺伝子変異が加わり血液悪性疾患になると考えられている。また発癌していないFPD/AML患者にも低アレル頻度の*CDC25C*変異が見られる場合があり、前白血病段階を示唆する可能性がある。今後、*CDC25C*変異をモニタリングすることでFPD/AML患者を注意深く経過観察することができ、悪性疾患の早期診断治療に寄与する可能性がある。また今回解析したTHC2 4家系には血液悪性疾患の家族歴はなかったが、THC2家系の44家系中12家系に血液悪性疾患(AML、MDSなど)の合併が観察され、有病率は健常集団と比較し高いと報告されている¹⁸⁾。THC2症例で変化しているTPO/MAPKシグナル伝達系は、巨核球だけでなく造血幹細胞の増殖にも関与しており⁴³⁾、また多くの腫瘍細胞でMAPKの

活性化による細胞増殖亢進が報告されている。THC2 患者の悪性疾患発症機序の詳細はまだ不明であり、今後の症例の蓄積・研究が期待される。

TPOは巨核球前駆細胞や巨核球の分化や増殖に関わる造血因子で、主に肝臓で産生される。TPO受容体 (*MPL*) は、巨核球・血小板だけでなく、造血幹細胞、ヘマンジオブラストに発現し、造血幹細胞の維持に関わる重要な因子である^{43,44}。血清中の遊離TPO値は、主に血小板や巨核球のTPO受容体に結合し消費される量で調整される。Kurataらの報告によると、ITPと同程度の血小板減少を呈する再生不良性貧血や化学療法後の骨髄低形成患者は健常人 ($43 \pm 29 \text{pg/mL}$) と比較し著明にTPO値が上昇している ($349 \pm 210, 402 \pm 329 \text{pg/mL}$) のに対し、ITP患者では $74 \pm 66 \text{pg/mL}$ と正常あるいはわずかに上昇している程度である⁴⁵。またKappers-Klunneらの報告でもITP患者のTPO値は $87.91 \pm 60.19 \text{pg/mL}$ とわずかに上昇している程度である⁴⁶。これはITP患者の骨髄巨核球の数が十分にあること、末梢の血小板数の消費回転が早いために血小板内に取り込まれたTPOの分解が早まることが考えられる。また炎症時にはインターロイキン-6 が肝臓産生TPOを増加させ、血漿TPO値と血小板数が増加することが知られている^{44,47}。またTPOは骨髄ストローマ細胞でも産生され、それは血小板によりフィードバック調節されていると考えられている。血小板 α 顆粒中のplatelet-driven growth factor BB(PDGF-BB)、fibroblast growth factor 2(FGF2)刺激によりストローマ細胞でのTPO産生は上昇し、トロンボスポンジン、Transforming growth factor β (TGF β) 刺激により減少するという報告がある⁴⁸。

今回ITP患者コントロール検体を得られなかったが、健常人と比較しFPD/AML、THC2患者は有意にTPO値が上昇していた。THC2患者の多くは血清TPO高値で、健常人の7倍、血小板数がほぼ同程度のITPの2倍と報告されている。これは巨核球数の差によると考えられ、一般的に巨核球が増加するITP患者と比較し、THC2患者の巨核球数は軽度上昇する程度であるためといわれている¹⁷⁾。今回の家系8の症例では骨髄巨核球数は $16/\mu\text{l}$ と上昇はないが、TPO値は 178.62pg/ml と上昇していた。またFPD/AML患者の血漿TPO値は(n=4)軽度～中等度上昇と報告されている³⁴⁾。*RUNX1*が*MPL*を制御しており³³⁾、FPD/AML患者で*MPL*発現低下があること³³⁾、*RUNX1*が*ANKRD26*を制御することでTPOシグナルを調節していることから、*RUNX1*は直接的・間接的にTPOシグナルに関わっていると思われ、FPD/AML患者ではTPOシグナル異常が血清TPO値上昇と関連していると考えられる。WAS患者の血漿TPO値は5人で正常と報告されている⁴⁹⁾が、多症例での解析結果の報告がなく不明である。今回症例1、3は移植後で検体を得られず、症例2と、別の*WASP*点変異患者2症例で血清TPO値測定を行った。結果は提示していないが症例2は軽度上昇(57.3pg/ml)、他の2症例は高値で、平均TPO値は $256.55\pm 182.61\text{pg/ml}$ と高値であった。WASは血小板減少だけではなく免疫不全による感染・炎症がありうること、また*WASP*が血小板中のTGF β 1の放出を制御している報告⁵⁰⁾があり、WASにおけるTPO値には血小板・巨核球数だけでなく複数の因子が関与していると思われる。また*WASP*がTPOシグナル伝達系の下流に関連しているは不明であり、今後の解析が必要である。この結

果から、FPD/AML、THC2 症例は血清TPO値が優位に上昇しており、ITP患者の既報のTPO値と比較し、TPO値が上昇しないITPとの鑑別診断の指標になると思われる。

今回の解析では、FPD/AMLの2家系に骨髄巨核球の異形性を認めた。同様に骨髄巨核球の低分葉や小型巨核球が見られ、in vitroでCD34陽性細胞から分化する巨核球数の減少、成熟巨核球の減少、細胞核の倍数化減少が示されている⁵¹⁾。また今回THC2の2家系でもFPD/AML類似の骨髄巨核球の異形を認め、同様の報告がある¹⁷⁾。これらの所見は骨髄巨核球の造血障害を示唆しており、FPD/AMLやTHC2に特徴的な所見であることから、血清TPO値と同様に、鑑別診断の指標となると考えられる。

血小板造血機構には多くの遺伝子や転写因子及びサイトカインが関与している。我々は、*WASP*は細胞核内にも分布し転写因子として機能すること、*WASP*が発現していない骨髄球・巨核球系細胞株K562に*WASP*を強発現させると、*RUNX1*のmRNAと蛋白質発現量が上昇することを報告している⁵²⁾。しかしWAS患者において、*RUNX1*や*ANKRD26*、TPOシグナルが病態に関わっているかは不明で、今後検討が必要である。*RUNX1*は造血幹細胞のマスター遺伝子と考えられており、血小板造血に関しても多くの転写因子と関わっている。*RUNX1*は*MPL*の発現を制御し³¹⁾、また*ANKRD26*の5'-UTRへの結合を介して間接的にTPOシグナルを調整している³⁷⁾。変異*RUNX1*が*ANKRD26*を制御できるかは不明であり、今後の検討が必要である。先天性血小板減少症の責任遺伝子群が相互作用し、正常の血小板造血維持機構に重要な役割を果たしていることが考えられる。

今回の解析症例では、その 62.5%でまだ既知遺伝子変異が同定されていない。先天性無巨核球性血小板減少症における *MPL* 遺伝子変異、橈骨尺骨癒合あるいは橈骨欠損を伴う家族性血小板減少症における *HOXA11* および *RBM8A* 遺伝子変異が報告されているが、臨床所見が類似するにも関わらず、これらの既知遺伝子に変異を認めない症例が存在し、今後その病因について遺伝学的検討を行う予定である。

【結論】

本研究では、本邦における小型・正常大血小板を有する先天性血小板減少症が疑われた計 32 症例 (29 家系) を解析し、計 12 症例 (11 家系) の 37.5% に責任遺伝子変異を同定した。3 家系の *WASP* 異常症、4 家系の *RUNX1* 変異を伴う FPD/AML、4 家系の *ANKRD26* 遺伝子変異を伴う THC2 を診断することができた。*De novo* 変異家系を 3 家系で診断し、家族歴に関わらず検索することが重要と思われた。発症年齢、血小板数および出血症状は疾患毎に特徴があり、FPD/AML 症例、THC2 症例の血清 TPO 値は健常人と比較し有意に高く、TPO 値が上昇しない ITP との鑑別に有用であった。また、FPD/AML 症例、THC2 症例での骨髄巨核球の異形成は特徴的所見であり診断に有用であった。

これまで小型・正常大血小板を有する先天性血小板減少症の包括的な解析報告は少なく、本邦での臨床所見の特徴や発症頻度は不明であったが、慢性 ITP として管理されている症例の中に、先天性血小板減少症症例が混在する可能性が示唆された。本疾患群においては、ITP に対する不要な治療を避けることができ、また血液悪性疾患発症の可能性を考え経過観察することができるため、先天性血小板減少症のスクリーニング法と確定診断系の確立は重要であると考えられた。

【文献】

- 1) 笹原洋二, 大内芽里, 今泉益栄: 小型および正常サイズの血小板を有する先天性血小板減少症の診断と分子病態における最近の知見. 日本小児血液・がん学会雑誌 2013;50:186-191.
- 2) Balduini CL, Pecci A, Noris P: Inherited thrombocytopenias: the evolving spectrum. *Hamostaseologie*. 2012;32:259-270.
- 3) 笹原洋二: Wiskott-Aldrich 症候群の分子病態—最近の知見から— . 日本臨床免疫学会誌 2005;28:140-147.
- 4) 笹原洋二: Wiskott-Aldrich 症候群の分子病態における WIP の役割. 日本小児血液学会雑誌 2007;21:217-226.
- 5) Imai K, Morio T, Nonoyama S, et al: Clinical course of patients with WASP gene mutations. *Blood* 2004;103:456-464.
- 6) Buchbinder D, Nugent DJ, Fillipovich AH: Wiskott-Aldrich syndrome: diagnosis, current management, and emerging treatments. *Appl Clin Genet*. 2014;7:55-66.
- 7) Albert MH, Bittner TC, Ochs HD, et al: X-linked thrombocytopenia(XLT) due to WAS mutations: clinical characteristics, long-term outcomes, and treatment options. *Blood* 2010;115:3231-3238.
- 8) Ballmaier M, Germeshausen M: Advances in the understanding of congenital

amegakaryocytic thrombocytopenia. *Br J Haematol.* 2009;146:3-16.

9) Ballmaier M, Germeshausen M: Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia: clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Semin Thromb Hemost.* 2011;37:673-681.

10) Thompson AA, Nguyen LT: Amegakaryocytic thrombocytopenia and radio-ulnar synostosis are associated with HOXA11 mutation. *Nat Genet.* 2000;26:397-398.

11) Horvat-Switzer RD, Thompson AA: HOXA11 mutation in amegakaryocytic thrombocytopenia with radio-ulnar synostosis syndrome inhibits megakaryocytic differentiation in vitro. *Blood Cells Mol Dis.* 2006;37:55-63.

12) Castillo-Caro P, Dhanraj S, Haut P, et al: Proximal radio-ulnar synostosis with bone marrow failure syndrome in an infant without a HOXA11 mutation. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2010;32:479-485.

13) Albers CA, Paul DS, Ghevaert C, et al: Compound inheritance of a low-frequency regulatory SNP and a rare null mutation in exon-junction complex subunit RBM8A causes TAR syndrome. *Nat Genet.* 2012;44:435-439.

14) Houeijeh A, Andrieux J, Saugier-veber P, et al: Thrombocytopenia-absent radius (TAR) syndrome: a clinical genetic series of 14 further cases. impact of the associated 1q21.1 deletion on the genetic counselling. *Eur J Med Genet.*

2011;54:e471-477.

15) Fiedler J, Strauss G, Wannack M, et al: Two patterns of thrombopoietin signaling suggest no coupling between platelet production and thrombopoietin reactivity in thrombocytopenia-absent radii syndrome. *Haematologica*. 2012;97:73-81.

16) Owen CJ, Toze CL, Koochin A, et al: Five new pedigrees with inherited RUNX1 mutations causing familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy. *Blood*. 2008 ;112:4639-4645.

17) Noris P, Perrotta S, Seri M, et al: Mutations in ANKRD26 are responsible for a frequent form of inherited thrombocytopenia: analysis of 78 patients from 21 families. *Blood*. 2011;117:6673-6680.

18) Noris P, Favier R, Alessi MC, et al: ANKRD26-related thrombocytopenia and myeloid malignancies. *Blood*. 2013 ;122:1987-1989.

19) Morison IM, Cramer Bordé EM, Cheesman EJ, et al: A mutation of human cytochrome c enhances the intrinsic apoptotic pathway but causes only thrombocytopenia. *Nat Genet*. 2008;40:387-389.

20) De Rocco D, Cerqua C, Goffrini P, et al: Mutations of cytochrome c identified in patients with thrombocytopenia *THC4* affect both apoptosis and cellular bioenergetics. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842:269-274.

21)Kwan SP, Hagemann TL, Radtke BE, et al: Identification of mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome gene and characterization of a polymorphic dinucleotide repeat at DXS6940, adjacent to the disease gene. Proc Natl Acad Sci USA. 1995;92:4706-4710.

22)van den Oudenrijn S, Bruin M, FolmBruan CC, et al: Mutations in the thrombopoietin receptor, Mpl, in children with congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. Br J Haematol. 2000;110:441-448.

23)Kosaki K, Kosaki R, Suzuki T, et al: Complete mutation analysis panel of the 39 human HOX genes. Teratology. 2002;65:50-62.

24)Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adelaide J, et al: Genome profiling of chronic myelomonocytic leukemia: frequent alterations of RAS and RUNX1 genes. BMC Cancer. 2008;8:229-313.

25) Kawai S, Minegishi M, Ohashi Y, et al: Flow cytometric determination of intracytoplasmic Wiskott-Aldrich syndrome protein in peripheral blood lymphocyte subpopulations. J Immunol Methods. 2002;260:195-205.

26) Noris P, Biino G, Pecci A, et al: Platelet diameters in inherited thrombocytopenias: analysis of 376 patients with all known disorders. Blood. 2014;124:e4-e10.

- 27) Buchbinder D, Nugent DJ, Fillipovich AH: Wiskott-Aldrich syndrome: diagnosis, current management, and emerging treatments. *Appl Clin Genet.* 2014 ;7:55-66.
- 28) Noris P, Klersy C, Gresele P, et al: Platelet size for distinguishing between inherited thrombocytopenias and immune thrombocytopenia: a multicentric, real life study. *Br J Haematol.* 2013 ;162:112-119.
- 29) Gulácsy V, Soltész B, Petrescu C, et al: A novel large deletion and single nucleotide insertion in the Wiskott-Aldrich syndrome protein gene. *Eur J Haematol.* 2014,in press
- 30) Kunishima S, Kitamura K, Matsumoto T, et al: Somatic mosaicism in MYH9 disorders: the need to carefully evaluate apparently healthy parents. *Br J Haematol.* 2014;165:885-887.
- 31) Sabri S, Foudi A, Boukour S, et al: Deficiency in the Wiskott-Aldrich protein induces premature proplatelet formation and platelet production in the bone marrow compartment. *Blood.* 2006;108(1):134-40.
- 32) Ichikawa M, Yoshimi A, Nakagawa M, et al: A role for RUNX1 in hematopoiesis and myeloid leukemia. *Int J Hematol.* 2013;97:726-734.
- 33) Satoh Y, Matsumura I, Tanaka H, et al: AML1/RUNX1 works as a negative regulator of c-Mpl in hematopoietic stem cells. *J Biol Chem.*

2008;283:30045-30056.

34) Heller PG, Glembotsky AC, Gandhi MJ, et al: Low Mpl receptor expression in a pedigree with familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia and a novel AML1 mutation. *Blood*. 2005;105:4664-4670.

35) Jalagadugula G, Mao G, Kaur G, et al: Platelet protein kinase C-theta deficiency with human RUNX1 mutation: PRKCQ is a transcriptional target of RUNX1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:921-927.

36) Sun L, Mao G, Rao AK: Association of CBFA2 mutation with decreased platelet PKC-theta and impaired receptor-mediated activation of GPIIb-IIIa and pleckstrin phosphorylation: proteins regulated by CBFA2 play a role in GPIIb-IIIa activation. *Blood*. 2004;103:948-954.

37) Okada Y, Watanabe M, Nakai T, et al: RUNX1, but not its familial platelet disorder mutants, synergistically activates PF4 gene expression in combination with ETS family proteins. *J Thromb Haemost*. 2013;11:1742-1750.

38) Jalagadugula G, Mao G, Kaur G, et al: Regulation of platelet myosin light chain (MYL9) by RUNX1: implications for thrombocytopenia and platelet dysfunction in RUNX1 haplodeficiency. *Blood*. 2010;116:6037-6045.

39) Bluteau D, Balduini A, Balayn N, et al: Thrombocytopenia-associated mutations in the ANKRD26 regulatory region induce MAPK hyperactivation. *J*

Clin Invest. 2014;124:580-591.

40) Necchi V, Balduini A, Noris P, et al: Ubiquitin/proteasome-rich particulate cytoplasmic structures (PaCSs) in the platelets and megakaryocytes of ANKRD26-related thrombo-cytopenia. *Thromb Haemost.* 2013;109:263-271.

41) Liew E, Owen C: Familial myelodysplastic syndromes: a review of the literature. *Haematologica.* 2011;96:1536-1542.

42) Yoshimi A, Toya T, Kawazu M, et al: Recurrent CDC25C mutations drive malignant transformation in FPD/AML. *Nat Commun.* 2014;5:4770.

43) de Graaf CA, Metcalf D: Thrombopoietin and hematopoietic stem cells. *Cell Cycle.* 2011;10:1582-1589.

44) Hitchcock IS, Kaushansky K: Thrombopoietin from beginning to end. *Br J Haematol.* 2014;165:259-268.

45) Kurata Y, Hayashi S, Kiyoi T, et al: Diagnostic value of tests for reticulated platelets, plasma glyocalicin, and thrombopoietin levels for discriminating between hyperdestructive and hypoplastic thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol.* 2001;115:656-664.

46) Kappers-Klunne MC, de Haan M, Struijk PC, et al: Serum thrombopoietin levels in relation to disease status in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* 2001;115:1004-6.

- 47) Kaser A, Brandacher G, Steurer W, et al: Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood*. 2001 ;98:2720-2725.
- 48) Sungaran R, Chisholm OT, Markovic B, et al: The role of platelet alpha-granular proteins in the regulation of thrombopoietin messenger RNA expression in human bone marrow stromal cells. *Blood*. 2000;95:3094-3101.
- 49) van den Oudenrijn S, Bruin M, Folman CC, et al: Three parameters, plasma thrombopoietin levels, plasma glyocalicin levels and megakaryocyte culture, distinguish between different causes of congenital thrombocytopenia. *Br J Haematol*. 2002 ;117:390-398.
- 50) Kim H, Falet H, Hoffmeister KM, et al: Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) controls the delivery of platelet transforming growth factor- β 1. *J Biol Chem*. 2013;288:34352-34363.
- 51) Bluteau D, Glembotsky AC, Raimbault A, et,al: Dysmegakaryopoiesis of FPD/AML pedigrees with constitutional RUNX1 mutations is linked to myosin II deregulated expression. *Blood*. 2012;120:2708-2718.
- 52) Looi CY, Sasahara Y, Watanabe Y, et al: The open conformation of WASP regulates its nuclear localization and gene transcription in myeloid cells. *Int Immunol*. 2014;26:341-352.

【図表の説明】

図 1 : WASP 異常症、FPD/AML、THC2、遺伝子変異を同定できなかった血小板減少症各症例群の血小板数。グラフ上の横線は全体の平均値を示す。

図 2 : WASP 異常症、FPD/AML、THC2、遺伝子変異を同定できなかった血小板減少症各疾患群における血小板数と出血症状の有無をまとめた。WHO bleeding scale で Grade2 以上を出血症状ありと定義した。

図 3 : WASP 異常症家系の遺伝学的解析と WASP 蛋白質発現量の解析。(A) WASP 異常症 3 家系の家系図。遺伝子解析を行った個人にアスタリスクを付けた。(B) 正常及び変異 WASP の一次構造。(C) フローサイトメトリー法による WASP 蛋白質発現量の解析。緑が IgG2a を用いたアイソタイプコントロールで、青が抗 WASP 5A5 モノクローナル抗体を用いた結果。健常人コントロールと比較し、症例 1 は WASP 発現がわずかに低下、症例 3 は WASP の発現が欠損している。(D) ウェスタンブロット法による WASP 蛋白質発現量の解析。健常人コントロールと比較し、症例 1 は WASP 発現が低下、症例 3 は WASP の発現が欠損している。(E) アレイ CGH 法による WASP 遺伝子コピー数の解析。症例 3 では WASP 遺伝子のイントロン 9 に置かれたプローブ領域でアレルの欠失を認めた。WT; wild type, Pt; patient, Ctr; health control.

EVH1; Ena-VASP homology domain, Basic; Basic region, GBD; G-protein binding

domain, Pro-rich;proline-rich domain, VCA;Verprolin, Coffilin and acidic domain, AA;amino acids.

図 4 : FPD/AML 家系の遺伝学的解析と *RUNX1* mRNA 発現の解析。(A) FPD/AML4 家系の家系図。遺伝子解析を行った個人にアスタリスクを付けた。(B) 正常及び変異 *RUNX1* の一次構造。(C) RT-PCR 法による *RUNX1* mRNA 発現量の解析。スプライシング変異を持つ家系 4 の 3 症例で、エクソン 4 をスキッピングした異常 mRNA の発現を認めた。Ctr; health control, AA;amino acids.

図 5 : *de novo* の *RUNX1* 変異を有する FPD/AML 2 症例の体細胞 DNA シークエンス解析。症例 5、6 ともに末梢血、爪、毛髪及び頬粘膜で同変異を認め、生殖細胞系列の変異と考えられた。

図 6 : THC2 家系の遺伝学的解析。(A)THC2 4 家系の家系図。遺伝子解析を行った個人にアスタリスクを付けた。(B) TA クローニング法による変異頻度解析。*De novo* 変異を有する症例 8 では、末梢血以外の体細胞にも変異を認め、生殖細胞系列の変異と考えられた。

図 7: FPD/AML 及び THC2 症例における ELISA 法による血清トロンボポエチン値。

FPD/AML 症例(n=6)、THC2 症例(n=5)において、健常コントロール(n=12)と比較して、有意に血清 TPO 値の上昇を認めた。(* $p < 0.001$)

図 8 : FPD/AML 症例における骨髓巨核球像。症例 5、6 において、多核や分離核、小型巨核球など巨核球系の異形性を認めた。

図 9 : THC2 症例における骨髓巨核球像。症例 8、11 において、分離核や小型巨核球など巨核球系の異形性を認めた。

表 1 : 小型・正常大血小板を有する先天性血小板減少症の分類。

表 2 : 小型・正常大血小板を有する先天性血小板減少症 12 例を含む解析症例 32 例の遺伝子型と臨床像。遺伝子型、家族歴の有無、発症年齢、血小板数、MPV 及び WHO bleeding scale に基づく出血症状、検索した遺伝子につき症例毎にまとめた。

表 3 : 小型・正常大血小板を有する先天性血小板減少症における疾患毎の臨床像。疾患毎の発症年齢、血小板数、MPV の各平均値、白血球数、ヘモグロビン値及び WHO bleeding scale をまとめた。SD;standard deviation, fl;femtoliter.

图1

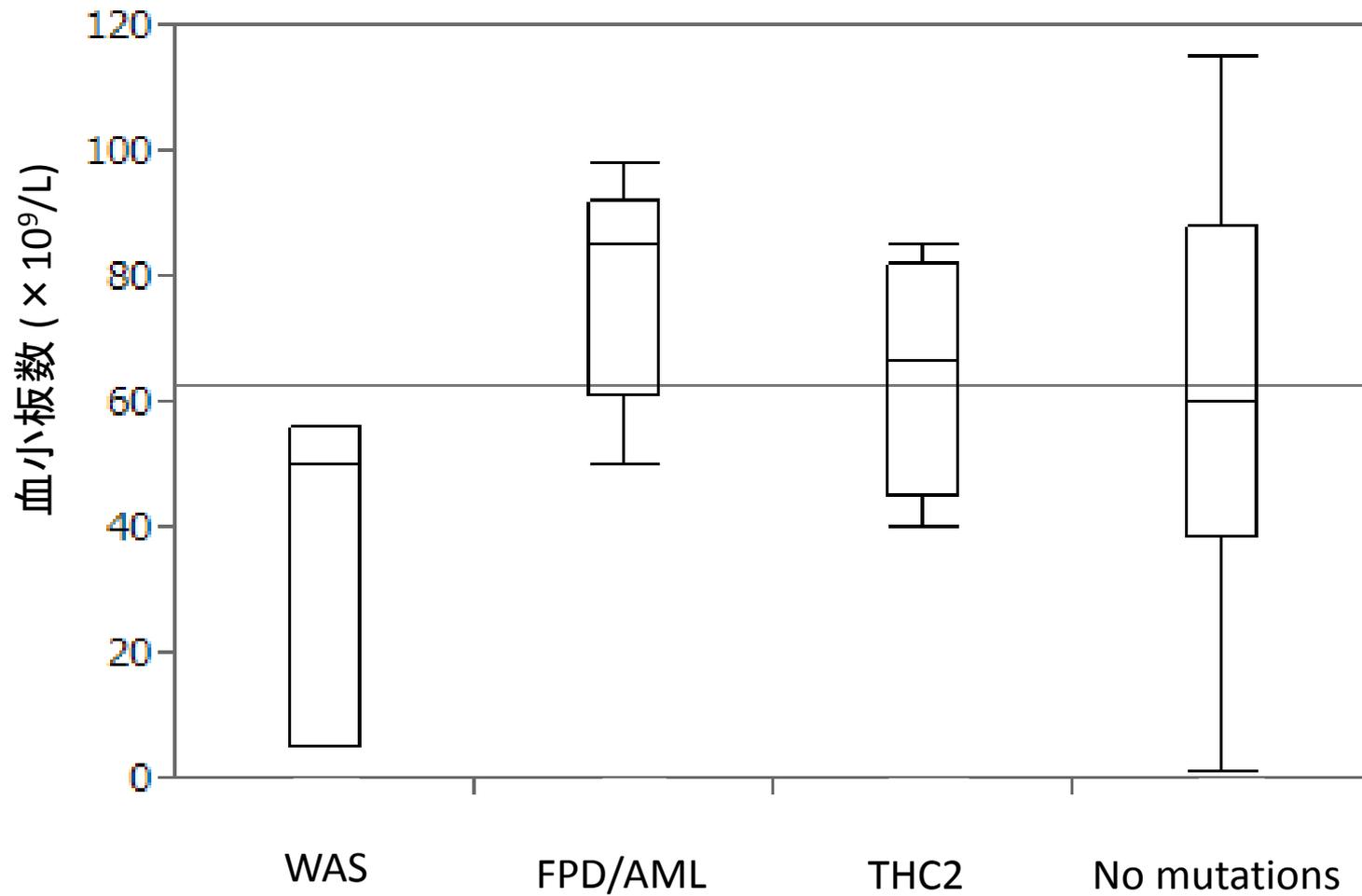


図2

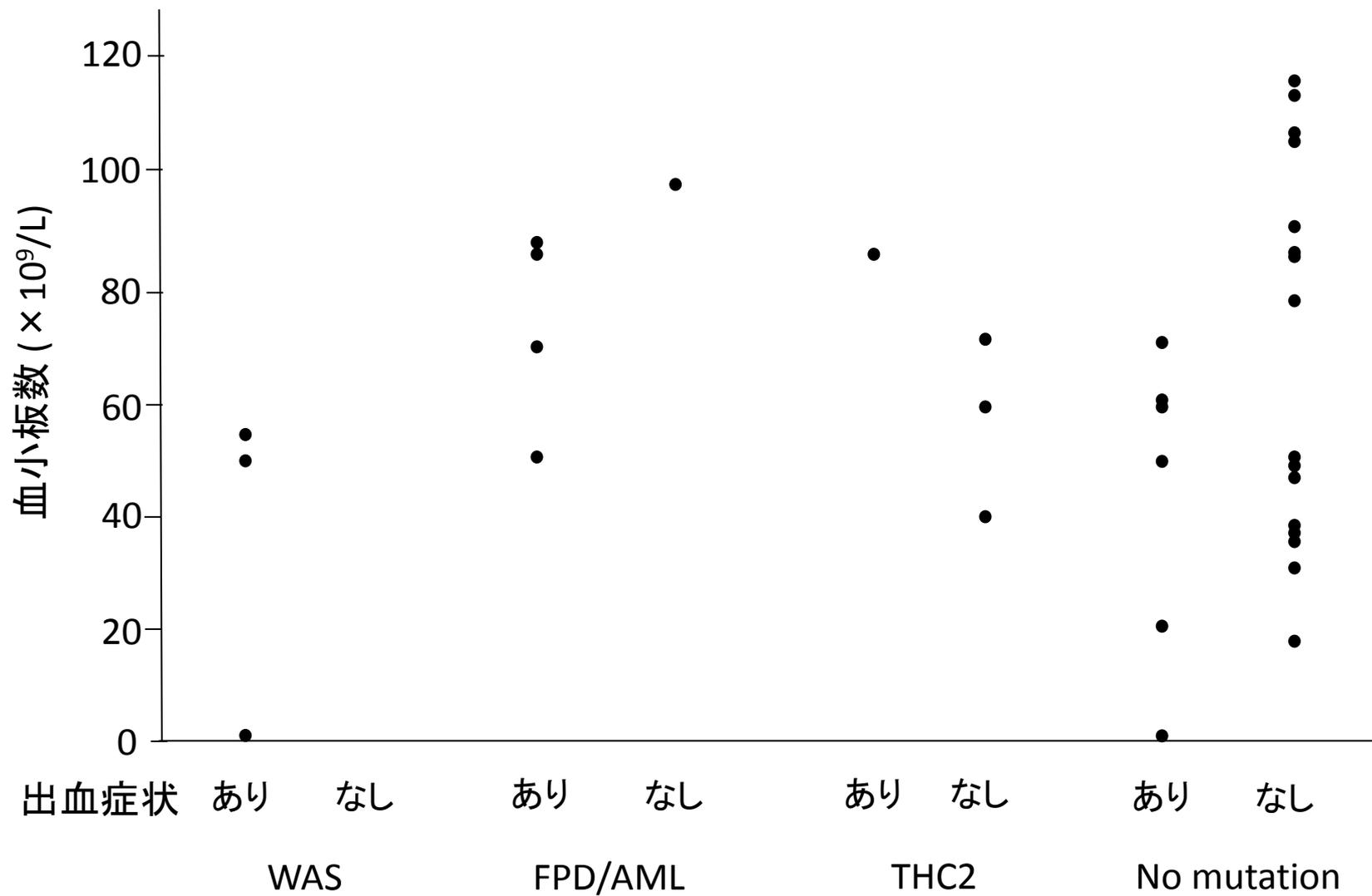
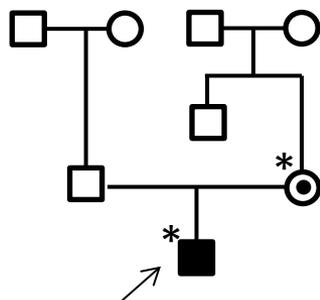


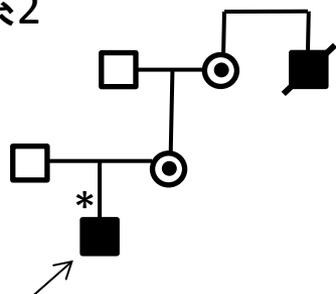
図3

A

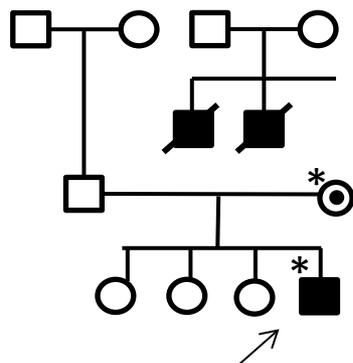
家系1



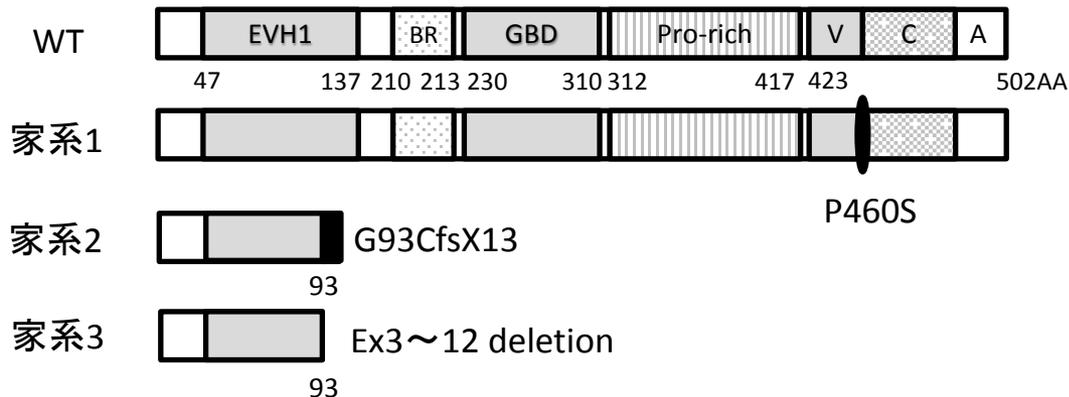
家系2



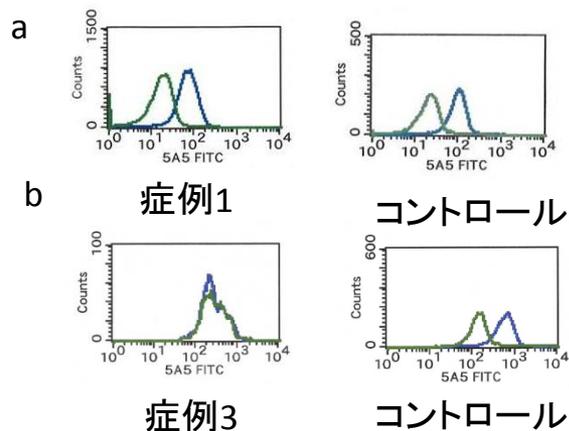
家系3



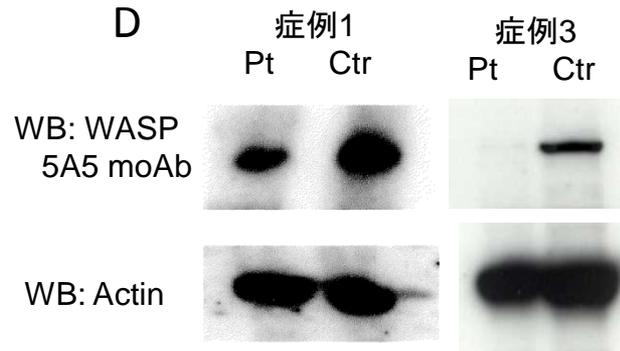
B



C



D



E

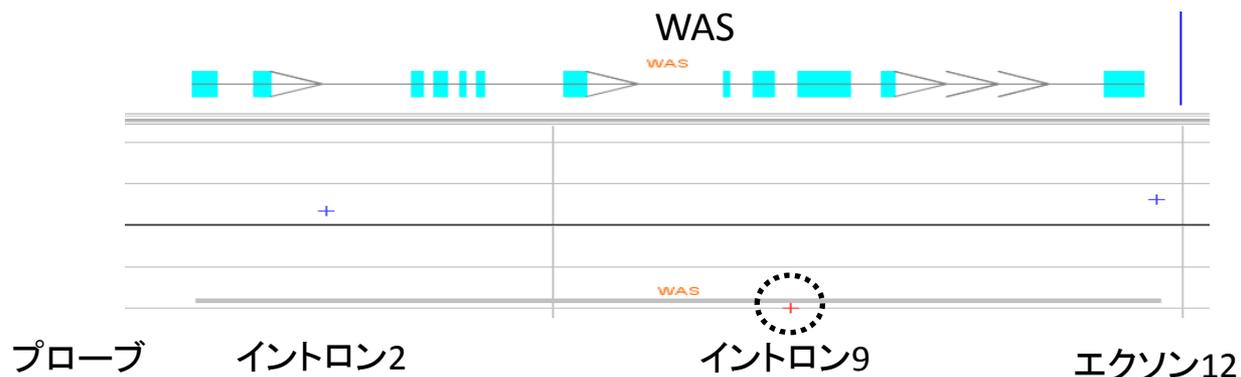
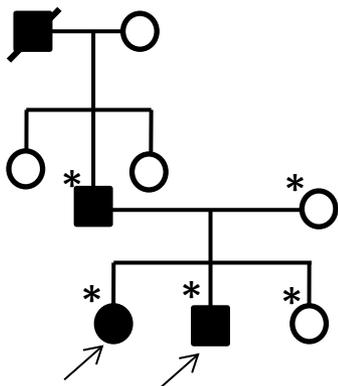


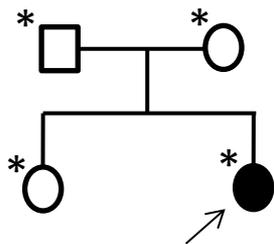
图4

A

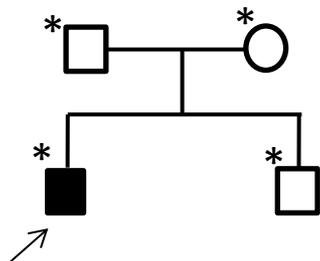
家系4



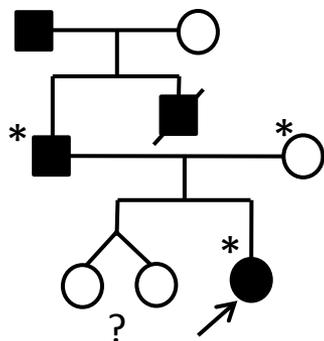
家系5



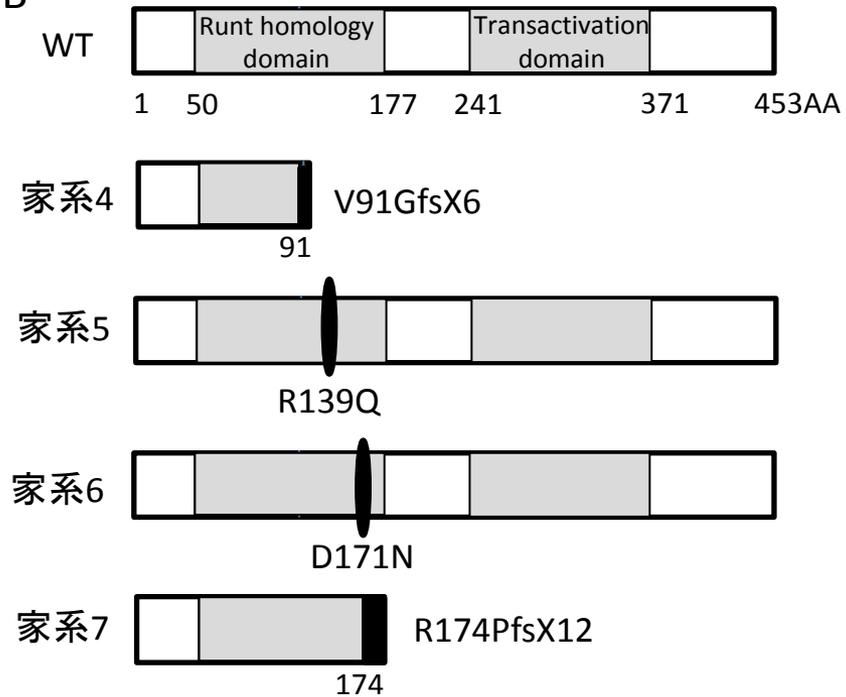
家系6



家系7



B



C

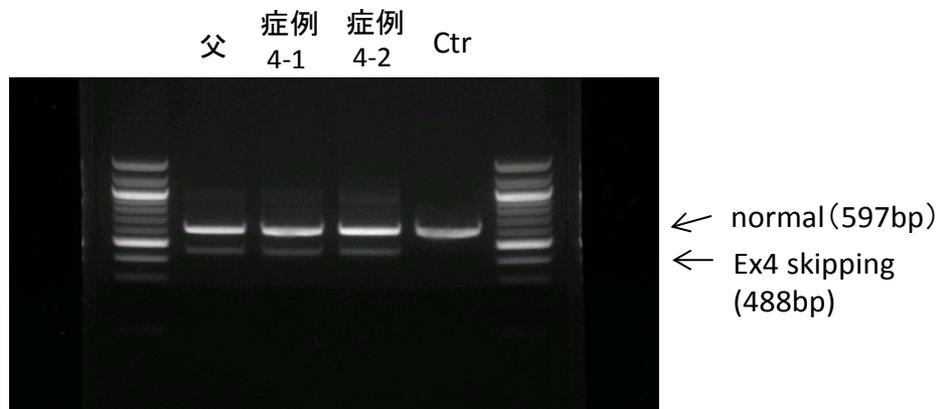
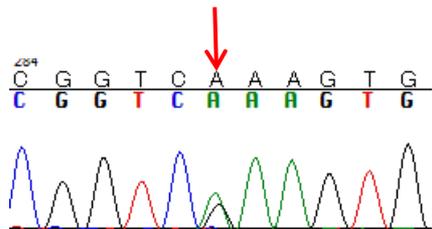


图5

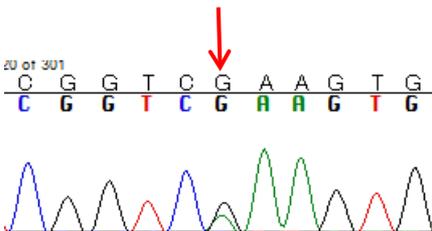
症例5

RUNX1 c.416G>A
De novo

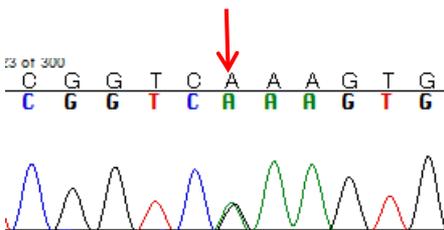
末梢血



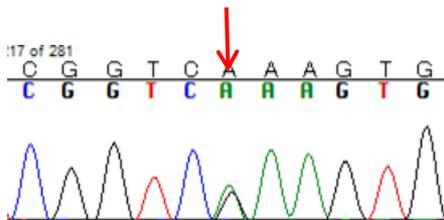
爪



毛髮



頬粘膜



症例6

RUNX1 c.511G>A
De novo

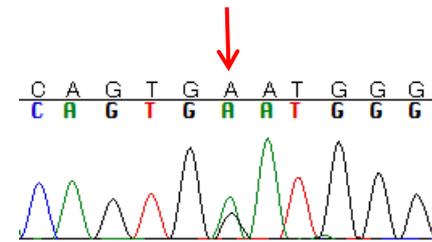
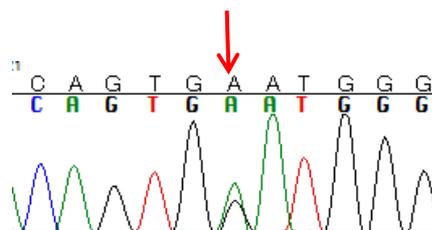
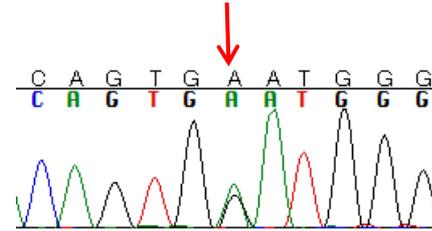
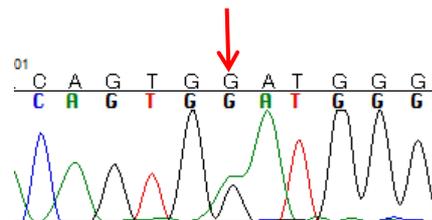
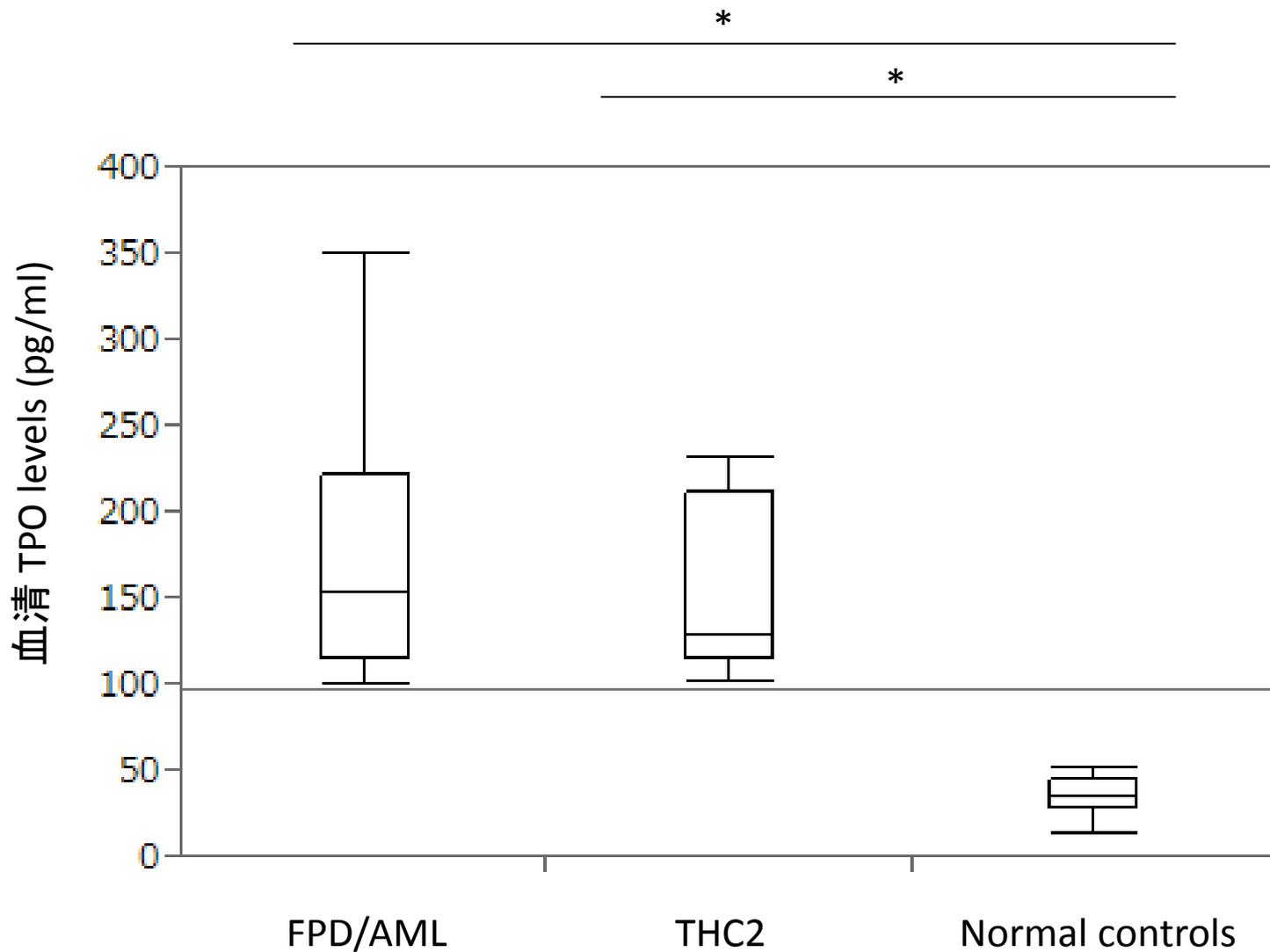
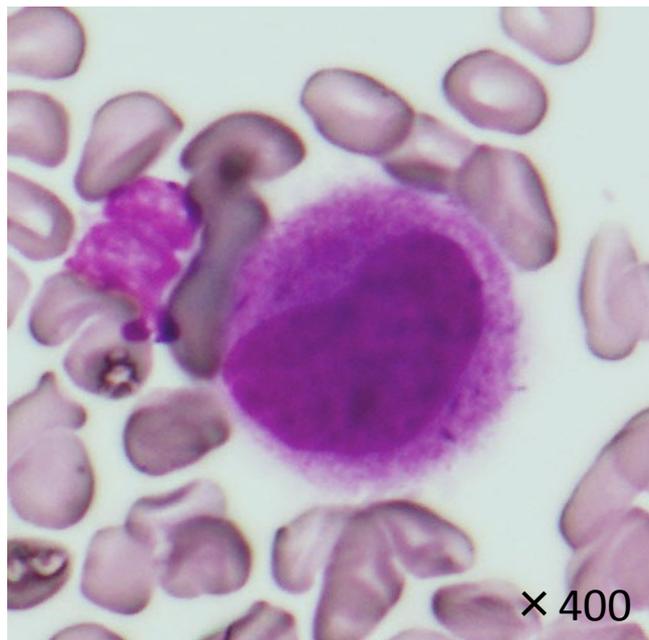
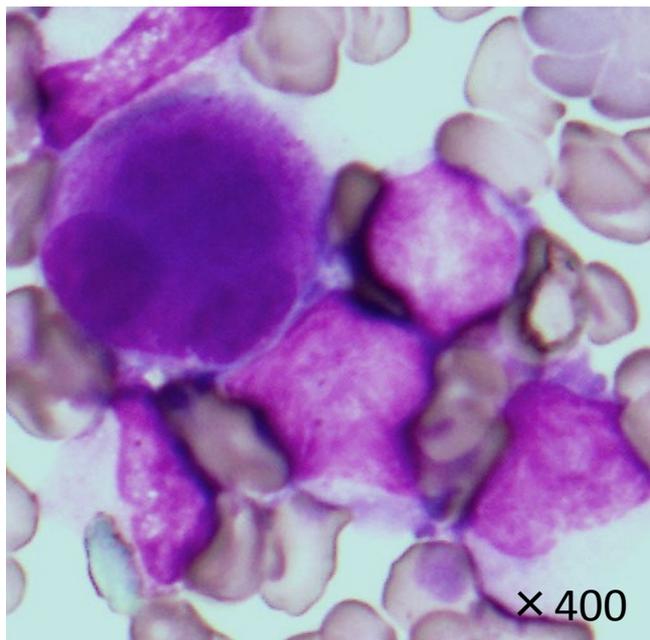


图7



*p<0.001

症例5



症例6

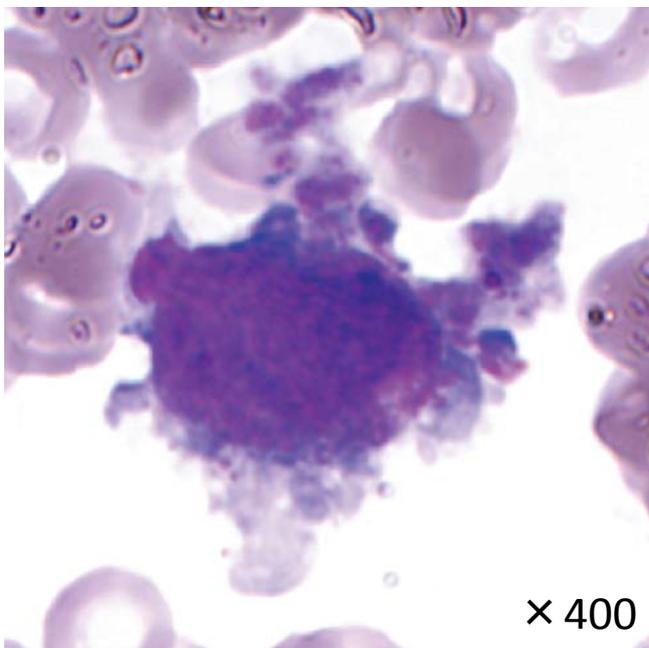
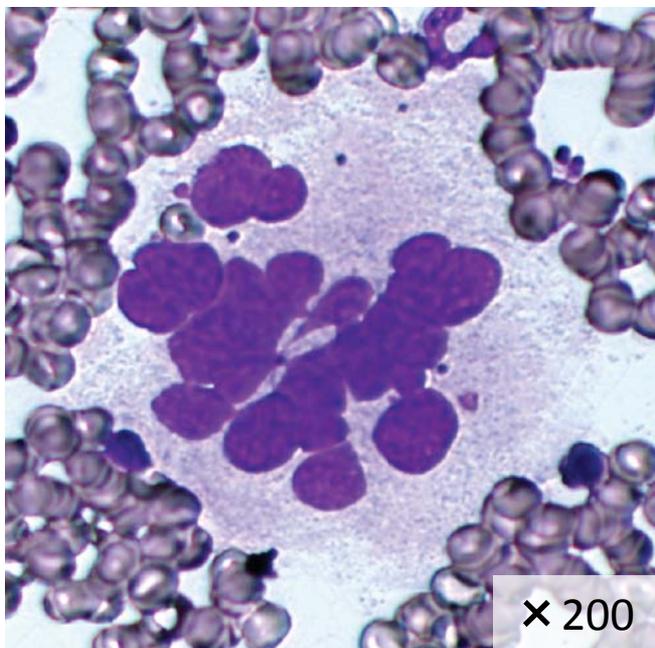
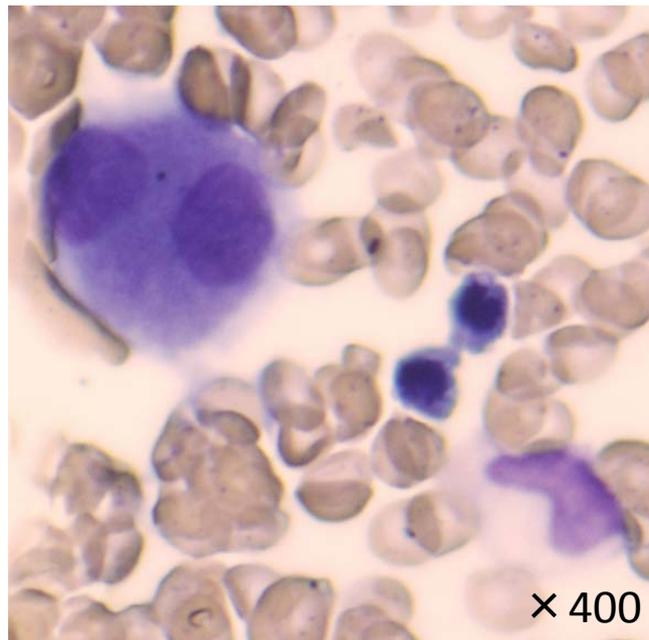
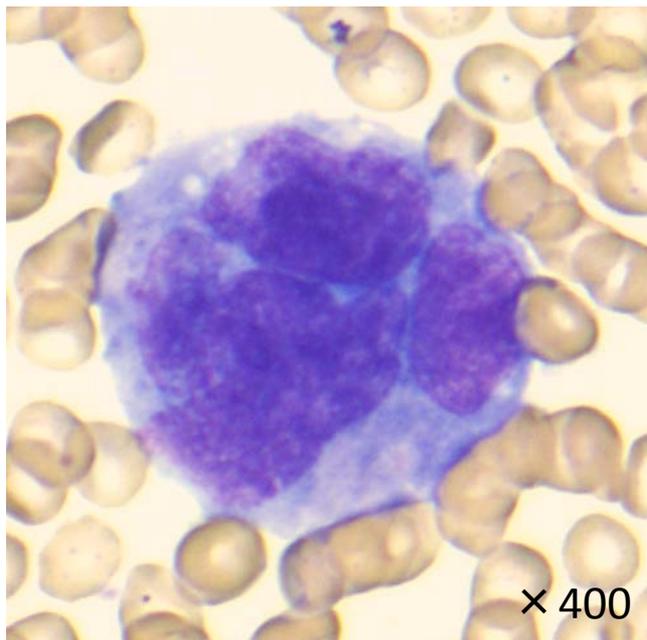


图9

症例8



症例11

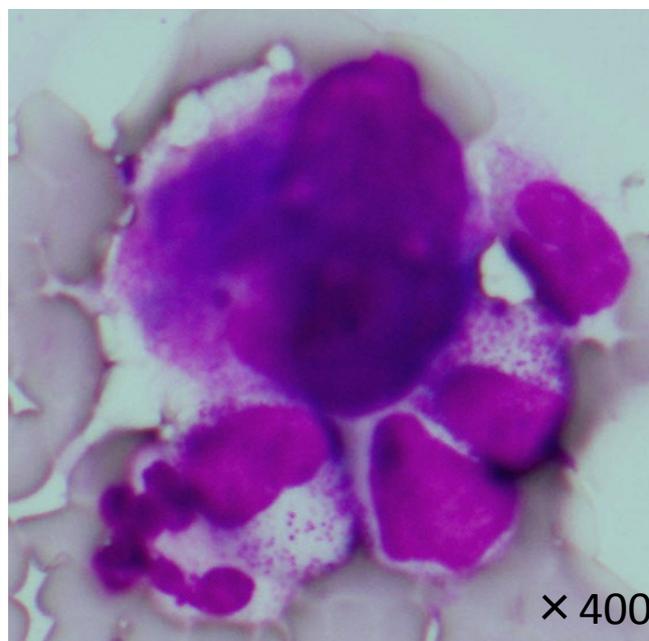
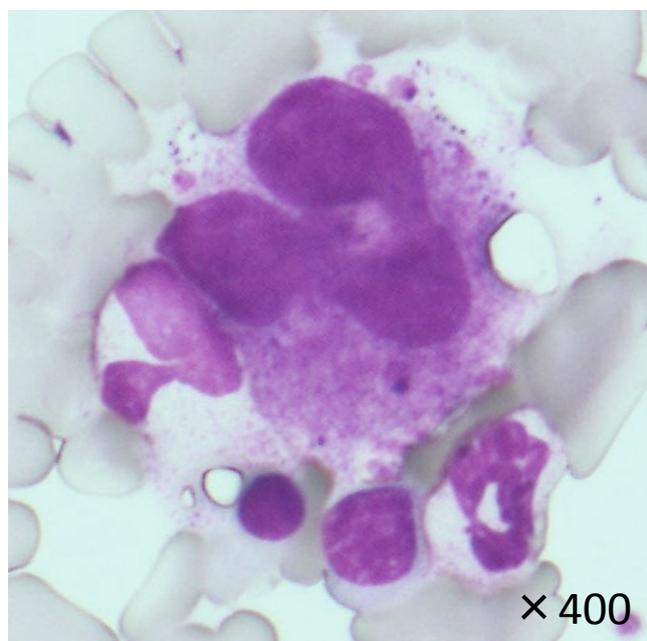


表1

疾患	遺伝形式	責任遺伝子	特徴
小型血小板性 (Small platelet)			
Wiskott-Aldrich症候群 (Wiskott-Aldrich syndrome: WAS)	X	<i>WASP</i>	免疫不全、湿疹、血小板減少
X連鎖性血小板減少症 (X-linked thrombocytopenia: XLT)	X	<i>WASP</i>	血小板減少(時に軽度の湿疹、易感染あり)
正常大血小板性 (Normal-sized platelet)			
先天性無巨核球性血小板減少症 (Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia: CAMT)	AR	<i>MPL</i>	巨核球著減、骨髓不全
橈骨尺骨癒合を伴う血小板減少症 (Congenital thrombocytopenia with radio-ulnar synostosis)	AD	<i>HOXA11</i>	橈骨尺骨癒合、骨髓不全
橈骨欠損を伴う血小板減少症 (Thrombocytopenia with absent radii: TAR)	AR	<i>RBM8A</i>	橈骨欠損、年齢と共に血小板正常化
急性骨髄性白血病を伴う家族性血小板減少症 (Familial platelet disorder and predisposition to acute myelogenous leukemia : FPD/AML)	AD	<i>RUNX1</i>	急性骨髄性白血病へ移行
常染色体優性遺伝性血小板減少症 (Autosomal dominant thrombocytopenia2: THC2)	AD	<i>ANKRD26</i>	急性骨髄性白血病へ移行
チトクロームC異常症 (Cytochrome c mutation)	AD	<i>CYCS</i>	巨核球アポトーシス

X : X連鎖性
 AR : 常染色体劣性
 AD : 常染色体優性

表2

家系/症例番号	変異遺伝子	cDNA変異	アミノ酸変異	家族歴	発症年齢	血小板数 ($\times 10^9/L$)	MPV(fl)	WHO bleedingスケール	検索した遺伝子
1	<i>WAS</i>	c.1378C>T	p.Pro460Ser	yes	6	5	11.1	2	<i>WAS,WIP</i>
2	<i>WAS</i>	c..274_734del	p.Gly93CysfsX13	yes	at birth	56		4	<i>WAS,WIP,MPL,RUNX1,ANKRD26</i>
3	<i>WAS</i>	Ex3-12 deletion		yes	at birth	50		4	<i>WAS,WIP</i>
4-1	<i>RUNX1</i>	c.271-1G>A	p.Val91GlyfsX6	yes	2	72		2	<i>RUNX1,ANKRD26</i>
4-2	<i>RUNX1</i>	c.271-1G>A	p.Val91GlyfsX6	yes	2	85		2	<i>RUNX1,ANKRD26</i>
5	<i>RUNX1</i>	c.416G>A	p.Arg139Gln	no	at birth	50	10.2	2	<i>RUNX1,ANKRD26</i>
6	<i>RUNX1</i>	c.511G>A	p.Asp171Asn	no	3	86	10.5	2	<i>MPL,RUNX1,ANKRD26</i>
7	<i>RUNX1</i>	c.520dupC	p.Arg174ProfsX12	yes	1.5	98	7.8	1	<i>RUNX1,ANKRD26</i>
8	<i>ANKRD26</i>	c.-118C>T	-	no	8	60	9.7	0	<i>RUNX1,ANKRD26</i>
9	<i>ANKRD26</i>	c.-118C>T	-	yes	5	85	9.3	2	<i>RUNX1,ANKRD26</i>
10	<i>ANKRD26</i>	c.-134G>A	-	yes	1	40	10	0	<i>RUNX1,ANKRD26</i>
11	<i>ANKRD26</i>	c.-134G>A	-	yes	19	73	9.9	0	<i>RUNX1,ANKRD26</i>
12	none			yes	at birth	40	10.8	1	<i>RUNX1,ANKRD26</i>
13-1	none			yes	at birth	40		0	<i>RUNX1,ANKRD26</i>
13-2	none			yes	at birth	115		0	<i>RUNX1,ANKRD26</i>
14	none			yes	2	38		0	<i>RUNX1,ANKRD26</i>
15	none			yes	at birth	1		4	<i>WAS,WIP,MPL,RUNX1,ANKRD26</i>
16-1	none			yes	0.75	70	10.3	2	<i>RUNX1,ANKRD26</i>
16-2	none			yes	1	60	10.3	2	<i>RUNX1,ANKRD26</i>
17	none			yes	3	77	9.9	0	<i>RUNX1,ANKRD26</i>
18	none			no	8	22	10.1	2	<i>RUNX1,ANKRD26</i>
19	none			no	at birth	50		2	<i>WAS,WIP,MPL,RUNX1,ANKRD26</i>
20	none			no	11	85	9.3	0	<i>RUNX1,ANKRD26</i>
21	none			no	0.1	48	8	0	<i>MPL,RUNX1,ANKRD26</i>
22	none			no	12	105	9.4	0	<i>RUNX1,ANKRD26</i>
23	none			no	at birth	85	9.2	1	<i>RUNX1,ANKRD26</i>
24	none			no	5	18	8.6	0	<i>WAS,WIP,RUNX1,ANKRD26</i>
25	none			no	2	113	11.1	0	<i>RUNX1,ANKRD26</i>
26	none			no	5	30		1	<i>RUNX1,ANKRD26</i>
27	none			no	10	107	10	0	<i>RUNX1,ANKRD26</i>
28	none			no	16	60		2	<i>MPL,RUNX1,ANKRD26</i>
29	none			no	14	89	10.6	1	<i>WAS,WIP,RUNX1,ANKRD26</i>

表3

	家系数 (患者数)	発症年齢(年) Mean±SD	血小板数 ($\times 10^9/L$) Mean±SD	MPV(fl) (患者数)	白血球数 ($/\mu L$)	ヘモグロビン (g/dL)	WHO Bleeding scale		
							Grade 0	1	≥ 2
WAS	3(3)	2.1±3.4	37.0±27.9	11.1 (1)	8100.0±2981.6(3)	9.7±2.3(3)	0	0	3
FPD/AML	4(5)	1.7±1.1	78.2±18.3	9.5±1.5 (3)	6960.0±763.5(5)	12.1±1.0(5)	0	1	4
THC2	4(4)	8.2±7.7	64.5±19.3	9.7±0.3 (4)	10762.5±1468.2(4)	14.3±1.6(4)	3	0	1
no mutation	18(20)	4.5±5.3	62.7±33.6	9.8±0.9 (13)	7754.4±3224.7(9)	13.0±2.0(9)	10	4	6
total	29(32)	4.3±5.3	62.9±30.4	9.8±0.9(21)	8187.6±2697.6(21)	12.5±2.2(21)	13	5	14