

Title	Molecular basis of clonal expansion of hematopoiesis in 2 patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria(PNH)
Author(s)	猿丸, 朋久
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47442
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名 さる 猿 まる 丸 とも 朋 ひさ 久

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 2 0 9 2 7 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 19 年 3 月 23 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当

医学系研究科分子病態医学専攻

学 位 論 文 名 Molecular basis of clonal expansion of hematopoiesis in 2 patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH)
(発作性夜間血色素尿症の 2 症例における、異常細胞のクローン性増殖の分子基盤)

論 文 審 査 委 員 (主査)
教 授 木下タロウ

(副査)
教 授 岡田 雅人 教 授 竹田 潤二

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

発作性夜間血色素尿症 (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria ; PNH) 患者では、GPI (glycosylphosphatidylinositol) と呼ばれる糖脂質を介して細胞膜に発現している補体制御因子 CD55 および CD59 を欠く赤血球が、自己補体の攻撃を受けて溶血をきたす。PNH の責任遺伝子として、GPI の生合成に関わる PIG-A が同定されている。PNH が疾患として成立するためには、①造血幹細胞において PIG-A に突然変異が起り、②その造血幹細胞に由来する GPI 欠損クローンが骨髄および末梢血中で優位となる、という 2 つのステップが必要であるが、PIG-A の変異だけでは GPI 欠損細胞が正常血球細胞を数的に凌駕する現象は起こらず、発症には至らないことが明らかになっている。

再生不良性貧血 (aplastic anemia ; AA) 患者においては GPI 欠損細胞が正常人に比して高頻度に認められることから、このようなクローンの拡大に自己免疫的機序が関与していることは確実であるとされている。しかし、AA 患者にみられる GPI 欠損細胞は微量にとどまることが多く、また複数の GPI 欠損クローンを有する PNH 患者においても数的に拡大しないクローンを認めることから、さらなる何らかの要因がクローンの拡大に関与していることが考えられる。

我々は、骨髄において PIG-A の変異を持つ細胞と 12 番染色体の異常を持つ細胞が一致しており、2 つの異常が同一の造血幹細胞に起こったものと考えられる PNH 症例 (匿名化コード J20) を報告してきた。この症例では、GPI 欠損クローンの拡大に、染色体異常をきたしている部位に存在する遺伝子が関与していることが考えられた。今回、この症例の染色体異常について詳細な解析を行った。さらに、米国で見いだされた、12 番染色体の異常を有する PNH 症例 (匿名化コード US1) についても、検体供与を得て解析を行った。加えて、同定に至った候補遺伝子の発現についても解析を行った。

〔 方法ならびに成績 〕

症例 J20 の骨髄細胞とマウス骨髄腫細胞を細胞融合させ、J20 由来の 12 番染色体を 1 本ずつ含むようなハイブリ

ドーマを作成した。これを材料として **sequence-tagged site (STS)** マーカーを用いて染色体上の切断点をマッピングし、最終的には1塩基単位で同定した。その確認として、切断点の両側にプローブを置いたサザンブロットおよび **FISH**、切断点をまたぐような **PCR** を行った。この症例では一方の12番染色体長腕から **q12-q14** 領域の18.5 Mbp が欠失し、それがもう一方の長腕 **q14** 領域のよりテロメア側に挿入されていることが判明した。また、症例 **US1** についても同様の解析を行ったところ、12番染色体の一方の長腕 **q13-q14** 領域の19.5 Mbp が同じ染色体の短腕 **p13** 領域に移動し挿入されていた。

これら2つの症例では12番染色体の **q14** 領域に存在する **HMGA2** 遺伝子座に切断点が存在していた。**HMGA2** は **DNA** に結合し、転写の鋳型となる **DNA** 鎖の構造を変化させる転写調節因子である。胎児期に高発現しているが、成体では発現しないとされている一方で、子宮筋腫や脂肪腫などの良性腫瘍において高頻度に発現が観察され、その原因遺伝子として認知されている。症例 **J20** では **HMGA2** 遺伝子の最終 **exon** である **exon5** の5' 端から1267塩基、**US1** では633塩基の位置、いずれも3'-UTR 内で分断が起こっていた。

HMGA2 の遺伝子座が分断されたことによる影響について、**HMGA2** の **mRNA** の発現レベルをリアルタイム **PCR** を用いて検討したところ、**J20** では正常人コントロールの2.6倍、**US1** では5倍の発現上昇を認めた。また、両アレル間のポリモルフィズムを用いた解析から、こうした発現が染色体異常をきたした方のアレル、すなわち遺伝子座を分断された **HMGA2** に由来するものであることも明らかになった。

[総 括]

今回、12番染色体に異常を有する **PNH** 症例2例の解析を行ったところ、いずれの症例においても **HMGA2** 遺伝子座の3'-UTR に、それも双方の位置の差がわずか600塩基程度しかないところに切断点が存在した。莫大なゲノム領域の中からその場所が「選ばれる」確率を考えるに、この現象が **PNH** 発症に関与していることが強く示唆される。そして、この遺伝子座分断の結果、分断されたアレルに由来する **HMGA2** の **mRNA** の発現上昇が確認された。本研究の結果は、**HMGA2** の異所性発現もしくはその **pathway** 上にあって影響を受ける分子の働きが、**GPI** 欠損細胞クローンを良性腫瘍の如くに増殖させ、**PNH** 発症に至らしめるというコンセプトに裏付けを与えるものである。

論文審査の結果の要旨

発作性夜間血色素尿症 (**paroxysmal nocturnal hemoglobinuria ; PNH**) 発症には **GPI** 欠損クローンが骨髄および末梢血中で数的に優位となる必要であるが、その機序は明らかになっていない。本研究では、骨髄において **GPI** を欠損する細胞と12番染色体の異常を持つ細胞が一致しており、2つの異常が同一の造血幹細胞に起こったものと考えられる **PNH** 症例2例の解析がなされた。いずれの症例においても12番染色体 **q14** 領域に存在する **HMGA2** 遺伝子の3'-UTR 内で分断が起こっており、遺伝子座を分断されたアレルに由来する **HMGA2 mRNA** の発現上昇が認められた。この現象が **PNH** 発症に関与していることが強く示唆される。

本研究の結果は、**HMGA2** の異所性発現もしくはその **pathway** 上にあって影響を受ける分子の働きが、**GPI** 欠損クローンを良性腫瘍の如くに増殖させ、**PNH** 発症に至らしめるというコンセプトに裏付けを与える新たな知見である。よって学位に値すると考える。