

主論文の要約

**Functional characterization of a novel *GFI1B* mutation
causing congenital macrothrombocytopenia**

〔 先天性巨大血小板性血小板減少症を来す
*GFI1B*新規変異の機能解析 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
生物化学講座 分子細胞化学分野
(指導：岡島 徹也 教授)
北村 勝誠

【背景】

先天性血小板減少症は病因不明な疾患が多く、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）などと診断され不必要な治療を受ける症例も少なくない。先天性血小板減少症の中でも、特に先天性巨大血小板性血小板減少症（Congenital macrothrombocytopenia; 以下、CMTP）は、巨大血小板および血小板減少を特徴とし、その約三分の二で原因遺伝子が明らかとされている。これまでに同定された原因遺伝子として *GP1BA*, *GP1BB*, *GP9*, *ITGA2B*, *ITGB3*, *ACTN1* などが知られているが、近年、CMTP の新たな原因遺伝子として *GFI1B* が同定された（Stevenson et al., J Thromb Haemost, 2013; Monteferrario et al, N Engl J Med, 2014）。*GFI1B* は、巨核球系および赤芽球系の分化に関わる転写抑制因子であり、変異により DNA のプロモーター領域への結合能が低下し、転写抑制作用が阻害され、巨核球・赤芽球の分化・成熟が障害されると考えられる。本研究では、我々が新たに同定した *GFI1B* 変異と既報の 2 変異について機能解析を行い、*GFI1B* 変異が血小板産生異常を来す機序を解明することを目的とした。

【方法】

既知の変異を認めない原因不明の CMTP の親子例について、次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析を行った。サンガーシーケンス法にて *GFI1B* 遺伝子の全ての構造領域の配列を決定した。本疾患の診断スクリーニング方法として、末梢血塗抹標本を用いた血小板蛍光免疫染色の有用性を検討した。

次いで、本変異および既報 2 変異について以下の解析を行った。ルシフェラーゼアッセイによって *GFI1B* 変異が実際に遺伝子発現制御機能に影響を及ぼすかを検討した。ゲルシフトアッセイによって *GFI1B* 変異による DNA 結合能の変化について検討した。また、マウス胎児肝細胞由来の培養巨核球に、レトロウィルスを用いて野生型/変異型 *GFI1B* を発現させ、経時的に巨核球が数珠状の胞体突起を形成しながら血小板を産生する様子を観察し、血小板の形態や数への影響を検討した。

【結果】

全エクソン解析の結果、巨核球系および赤芽球系に特異的な転写因子 *GFI1B* の新規遺伝子変異を同定した。サンガーシーケンス法にて *GFI1B* の全ての構造領域の配列を決定し、今回同定された変異（c.814+1G>C, p.G272fsX274）は一塩基置換によるスプライス部位変異に伴うナンセンス変異であることが示唆された。血小板における *GFI1B* の発現を確認するため、患者血小板由来の cDNA をクローニングし、野生型および変異型が共に発現していることを確認した。

末梢血塗抹標本を用いた血小板蛍光免疫染色では、変異患者において健常人ではみられない CD34 の異常発現を認めた（Fig. 1）。また血小板 α 顆粒に含まれるトロンボスポンジン 1（TSP1）の染色性が健常人と比較し低下していた。

本変異および既報 2 変異（p.Q287X, p.H294fsX307）はいずれも、*GFI1B* の DNA 結合に関わる Zinc finger ドメインの構造変化を来すと予想された（Fig. 2）。ルシフ

ェラーゼアッセイにおいては、野生型 GFI1B はルシフェラーゼ活性を約 40%抑制したが、変異型では抑制はみられなかった。野生型と変異型を共導入すると変異型によって野生型の抑制作用が阻害され、共導入する変異型を増量すると量依存的により強く野生型の抑制作用が阻害された。ゲルシフトアッセイにおいては、野生型は GFI1B の認識配列を含むオリゴと結合を示したが、変異型は結合を示さず、変異型は DNA 結合能を失っていることが示唆された (Fig. 3)。

次いで、レトロウイルスを用いて妊娠 13.5 日マウスの胎児肝細胞へ変異型および野生型 GFI1B を感染させ、トロンボポエチン存在下に 3-5 日間培養し巨核球へ分化誘導を行った。その結果、変異型は野生型と比較し一つの巨核球から形成される胞体突起の数が少なく、また胞体突起径が大きいことが確認された (Fig. 4)。このことは GFI1B 変異により巨大血小板および血小板減少症を呈する臨床像と矛盾しない結果であった。

【考察】

GFI1B はこれまでヒトの疾患原因遺伝子として報告がなかったが、近年 Stevenson ら、Monteferrario らによって CMTP の原因遺伝子の一つとして報告された。本疾患の診断スクリーニング方法は未だ確立されておらず、我々は末梢血塗抹標本を用いた血小板蛍光免疫染色の有用性を検討した。その結果、変異患者において健常人ではみられない CD34 の異常発現を確認した。GFI1B 変異患者における血小板 CD34 の異常発現は、これまでフローサイトメトリー法を用いた検討が報告されているが、蛍光免疫染色は末梢血塗抹標本のみで行うことができる、より簡便なスクリーニング法として有用である可能性が示唆された。

今回検討した 3 変異はいずれも、GFI1B の DNA 結合に必須とされる Zinc finger ドメインの構造変化を呈すると予測された。ルシフェラーゼアッセイの結果から、変異型は野生型に対してドミナントネガティブに作用すると考えられた。このことは、マウスモデルを用いた既報において *Gfi1b* の片アレル欠損では表現型がみられず、両アレル欠損においてのみ巨核球成熟障害を認めた結果と矛盾しない。ドミナントネガティブ作用のメカニズムをさらに検証すべく行ったゲルシフトアッセイでは、変異型は DNA 結合能を失っていることが示唆された。これらの結果より、変異型は DNA 結合能を失うが、転写因子複合体を形成する他の転写因子との相互作用は温存されることにより、野生型に対してドミナントネガティブに作用している可能性が考えられた。

血小板は巨核球が形成する数珠上の胞体突起から産生される。我々は培養巨核球を用いた変異発現実験を行い、変異型を導入した巨核球において胞体突起形成異常を来すことを初めて示した。この結果は GFI1B 変異患者でみられる巨大血小板および血小板減少症と矛盾しないものであった。

【結語】

GFI1B 変異により、GFI1B タンパクが本来もつ転写抑制作用が失われ、巨核球の

胞体突起形成異常を呈することが示された。変異患者の血小板において α 顆粒減少やCD34異常発現を来すメカニズムについて、今後さらなる検討を行っていきたい。