

表 8. 後天性鉄芽球性貧血 (MDS-RCMD, RA) の内訳

	MDS-RCMD	MDS-RS
染色体異常 (+) 異型性 (+)	27例	13例
染色体異常 (+) 異型性 (-)	0例	4例
染色体異常 (-) 異型性 (+)	41例	20例
染色体異常 (-) 異型性 (-)	0例	8例
染色体異常もしくは異型性不明	4例	2例
計	72例	47例

表 9. 鉄芽球性貧血の予後

	遺伝性 (18例)	RARS (47例)	RCMD (72例)
生存 (例)	16	41	52
死亡 (例)	2	6	20
診断からの 観察中央期間 (月)	30.5	23.0	19.5
死因(例)	心不全 1 敗血症 1	肺炎 2 白血病化 1 その他 3	肺炎 7 心不全 3 白血病化 2 敗血症 1 慢性GVHD 2 その他 5

図4. アルコール性鉄芽球性貧血症例

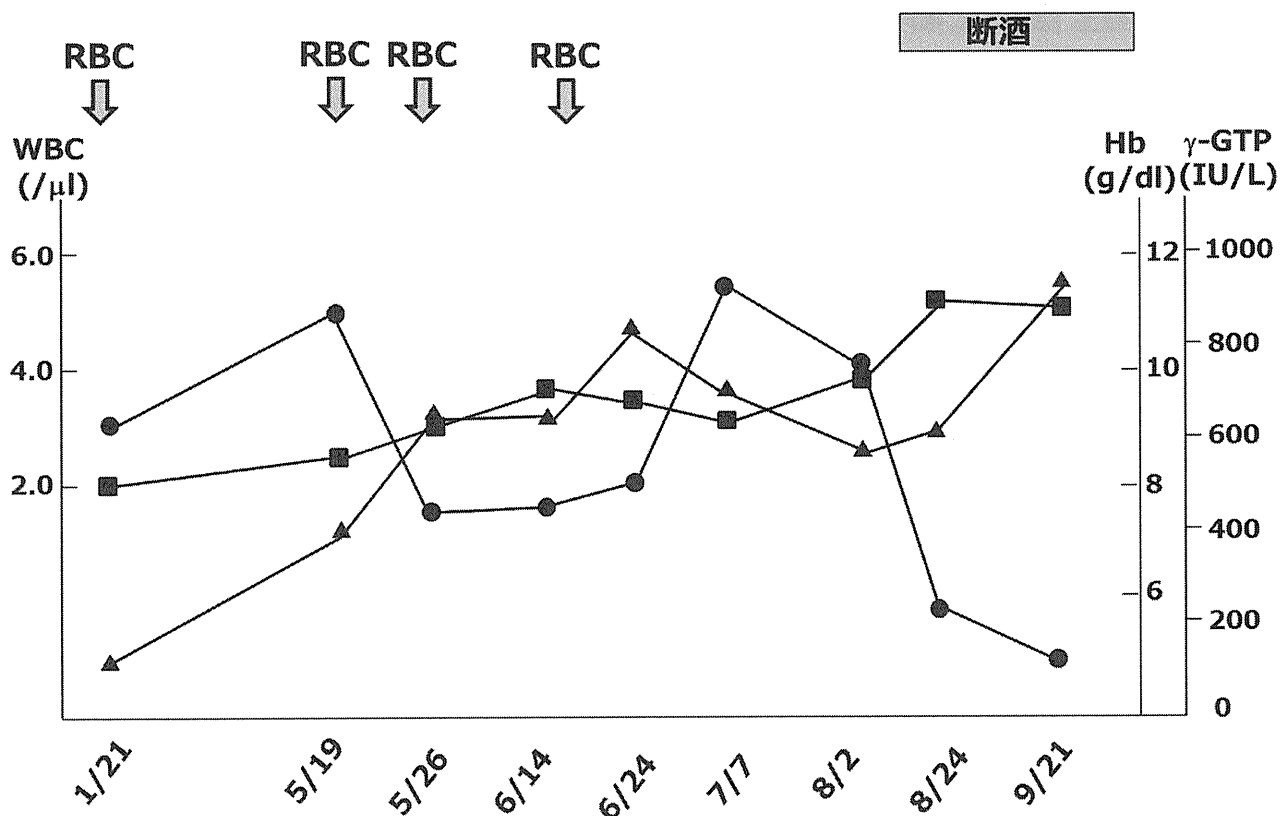


表10. 遺伝性鉄芽球性貧血(XLSA)のまとめ

No	発症年齢	性別	position of ALAS2 mutation	SF3B1 mutation	Hb at onset (g/dl)	MCV at onset (fl)	increment of Hb by Vit B6 treatment (g/dl)
1	0	M	R170C	N/D	4.8	52.5	1.7
2	20	M	R411C	N/D	4.8	52.5	5.2
3	68	M	R452C	-	6.0	67.3	No effect
4	17	M	D190V	N/D	8.9	66.9	No effect
5	36	M	R452C	-	7.4	70.0	No effect
6	36	M	M567I	N/D	6.5	64.4	3.4
7	14	M	V562A	-	8.1	61.2	4.7
8	31	M	R170L	-	4.1	50.8	8.1
9	3	M	R411C	-	5.4	54.4	2.9
10	62	M	R170L	N/D	8.0	73.9	No effect

N/D: not done

表11. 遺伝性鉄芽球性貧血(XLSA以外)のまとめ

No	発症年齢	性別	家族歴	gene mutation							Hb (g/dl)	MCV (fl)	Vit B6 の効果
				ALAS2	SLC 25A38	GLRX5	ABCB7	SLC 19A2	PUS1	SF3B1			
11	19	M	-	-	-	-	-	-	-	-	7.8	73.9	-
12	4	M	-	-	-	-	-	-	-	-	6.6	73.6	-
13	0	M	+	-	-	-	-	-	-	-	3.9	65.0	-
14	20	M	+	-	-	-	-	-	-	-	7.6	82.0	+
15	0	M	-	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	6.8	88.1	N/D*
16	32	M	-	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	11.2	69	+
17	36	M	N/A	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	10.8	67.3	+
18	18	F	+	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	9.3	96.2	+

N/D: not done, N/A: not available

*Vit B6 was not administered due to PMPS

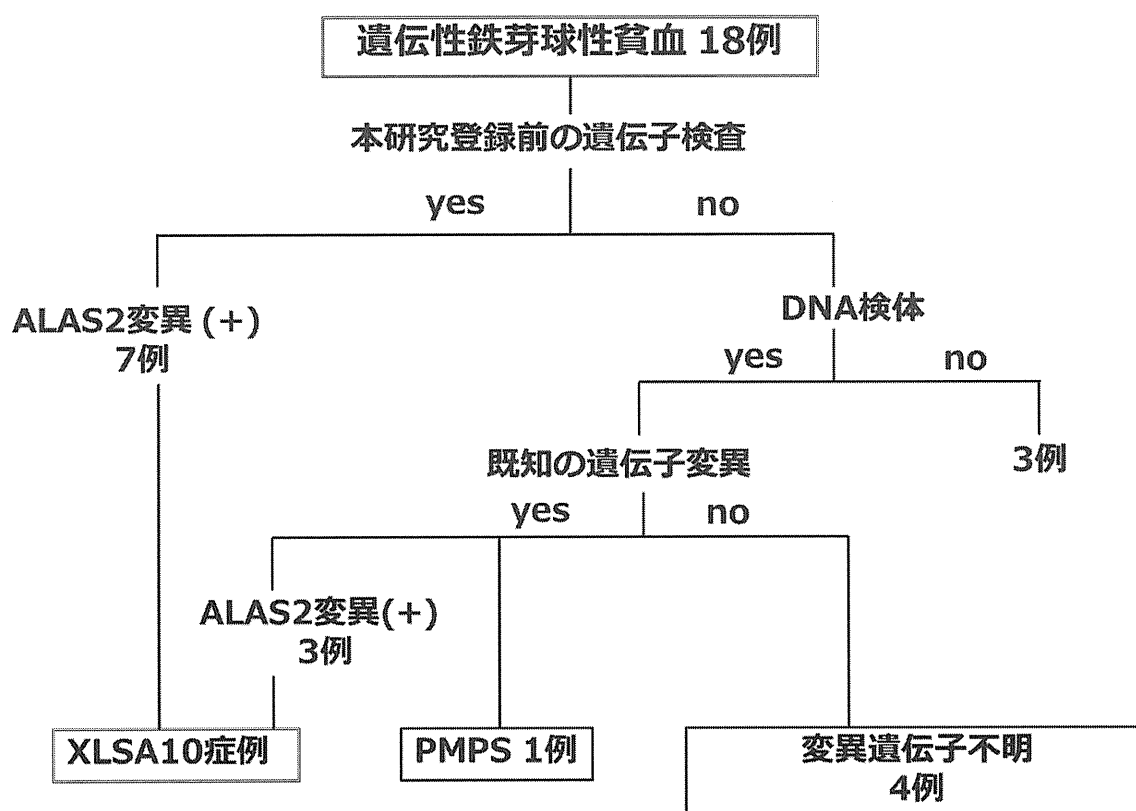
表12. 鉄芽球性貧血における ビタミンB6への反応性

	Vit B6 therapy (例)	有効 (例)	最大Hb増加値 (g/dl)
遺伝性	18	10	4.7(±2.7)
MDS-RARS	19	4	2.0(±0.4)
MDS-RCMD	26	1	2.2

表13. MDS(RARS)におけるSF3B1の変異

case number (登録No)	診断時の年齢	性別	染色体異常	position of SF3B1 mutation
1(37)	82	M	-	E622D
2(48)	57	M	-	N626S
3(40)	60	M	Including +8	K700E
4(56)	60	M	-	K700E
5(118)	73	F	-	-
6(57)	74	F	-	H662Q
7(53)	76	M	-	K700E
8(11)	67	F	-	K700E
9(150)	64	M	-	-
10(151)	66	M	-	K666E
11(147)	50	F	-	-
12*	31	F	-	-

図5. 遺伝性鉄芽球性貧血 18例のまとめ



Ⅱ. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

遺伝性鉄芽球性貧血の診断分類と治療法の確立

ALAS2 遺伝子変異の評価法に関する研究

研究分担者 古山和道 東北大学大学院医学系研究科分子生物学分野 准教授

研究要旨：赤芽球特異的アミノレブリン酸合成酵素 (ALAS2) の遺伝子変異は X 染色体連鎖鉄芽球性貧血 (XLSA) の原因となる事が以前より知られていたが、それに加えて、ALAS2 遺伝子の機能獲得型の変異は X 染色体連鎖プロトポルフィリン症 (XLPP) の原因となる事が近年報告された。今のところ機能獲得型の ALAS2 変異についての報告は多くはないが、今後 ALAS2 遺伝子に変異が同定された場合、その変異が機能喪失型であるのか、機能獲得型の変異であることを明らかにする事は鑑別診断の上からも重要である。本研究は、ALAS2 遺伝子の変異の同定方法を確立し、さらには同定した変異が ALAS2 の発現や機能にどのような影響を与えるのかを明らかにする方法を確立する事により、遺伝性鉄芽球性貧血の確実な診断と適切な治療の選択に資する事を目的に行なわれた。

A. 研究目的

アミノレブリン酸合成酵素 (5-aminolevulinate synthase; ALAS) はヘム生合成系の初発反応を触媒する酵素で、ヒトでは全ての細胞で発現する非特異的 ALAS (ALAS1 または ALAS-N) と、赤芽球にのみ特異的に発現し赤血球におけるヘモグロビン合成に必要なヘムを供給する役割を担う赤芽球特異的 ALAS (ALAS2 または ALAS-E) の 2 種類のアイソザイムが存在する。ヒトの ALAS1 遺伝子は三番染色体に、また ALAS2 遺伝子は X 染色体上に map されており、それぞれのアイソザイムは異なる発現調節を受ける事が知られている。疾患に関連しては、ALAS1 遺伝子の遺伝的変異により発症する疾

患は報告されていないが、ALAS2 遺伝子の異常は X 染色体連鎖鉄芽球性貧血 (X-linked sideroblastic anemia; XLSA) の原因となる事が知られていた。しかしながら、近年、ALAS2 遺伝子の変異が伴性優性の遺伝形式をとる骨髄性プロトポルフィリン症 (X-linked dominant protoporphyria; XLDP) の原因となる事が報告された。XLSA は ALAS2 の機能喪失型の変異、XLDP は ALAS2 の機能獲得型の変異により発症すると考えられるが、変異の部位のみからは、それを区別する事はできない。従って、本研究では ALAS2 遺伝子の変異を同定する方法を確立し、さらに、変異が同定された場合には、その変異が機能喪失型の変異であるのか、あるいは

は機能獲得型の変異であるのかを明らかにする方法を確立する事を目的とした。

B. 研究方法

1. ゲノム DNA の調製

検討を開始する前に、患者自身に、または患者が未成年である場合にはその親権者に書面で informed consent を得た後に、患者末梢血を無菌的に採取し、その末梢血を室温で受診施設から東北大学医学部に輸送し、その後、Qiagen 社の QIAamp DNA Blood Midi Kit を用いて全血から genome DNA を調製した。

2. 遺伝子変異の同定

約 50 ng の患者由来の genome DNA を鋳型として、表 1 に示すプライマーセットを用いて ALAS 2 遺伝子の各エクソンとその近傍、および第 8 イントロンを polymerase chain reaction (PCR)法により増幅した。PCR 反応は ExTaq DNA polymerase (Takara Bio 社)を用い、denature step (95°C 30 秒)、annealing step (表 1 30 秒)、extension (72°C 30 秒)を 3 5 サイクル繰り返す 3 step PCR 法で行った。PCR 反応後、1%アガロースゲルを用いて PCR 産物を分離し、予想される位置に泳動された PCR 産物を切り出して QIAGEN 社の QIAquick gel purification kit を用いて精製した後に、PCR に用いたうちの一方の primer を用いて BigDye Terminator sequencing kit ver. 1.1 (Applied biosystems 社)により sequencing 反応を行ない、ABI3100 genetic analyzer (Applied biosystems 社)を用いて塩基配列を決定した。遺伝子の変異が同定された場合には、PCR 反応から繰り返して同じ作業を行ない、同定された変異が PCR のエラーに起因するものではない事を確認した。

3. 変異を有する ALAS2 cDNA の作成

患者 ALAS2 遺伝子に疾患の原因となり得る変異を同定した場合には、その変異を有する ALAS2 タンパク質を組換えタンパク質と

して発現させる事を目的に、部位特異的変異導入法を用いて当該変異を正常 ALAS2 cDNA に導入する。変異の導入には様々な方法が提唱されており、各社からそれぞれ異なる特徴を有する kit が販売されているが、最近は効率よく変異が導入できる “PrimeStar Max site directed mutagenesis kit” (Takara Bio 社) を用いて変異を導入している。

4. in vitro 酵素活性の測定

コード領域にミスセンス変異が同定された場合、まず、ALAS2 タンパク質を組換えタンパク質として大腸菌で発現させ、精製して酵素活性を測定する。ALAS2 タンパク質は細胞質で前駆体として合成された後にミトコンドリアへ移行し、前駆体からミトコンドリア移行配列が切除されて成熟型となり、ミトコンドリアのマトリクスで機能するミトコンドリアタンパク質である。ALAS2 タンパク質を組換えタンパク質として大腸菌で発現させる場合、従来は、成熟型 ALAS2 タンパク質のアミノ末端部分にグルタチオン S 転フェラーゼ(GST)を精製用の tag として付与し、グルタチオンセファロースを用いて、GST と ALAS2 との融合タンパク質として精製した後に、必要に応じて GST tag を Factor Xa などの酵素を用いて切除して ALAS2 タンパク質を精製していた。しかしながら、この方法を用いて精製した ALAS2 タンパク質はアミノ末端の配列は保存されているものの、カルボキシル末端 (C 末端) 領域については、精製過程で限定分解を受ける可能性が否定できない。現在までに報告されている機能獲得型の変異はいずれも C 末端に近い領域で同定されており、また同じ領域では機能喪失型の変異も同定されている。一方で成熟型 ALAS2 タンパク質の N 末端に近い領域ではいずれの変異も同定されていないことから、組換えタンパク質も発現や精製の過程で C 末端側が保存されているべきであると考え、本研究ではそのような

表 1：ヒトALAS2遺伝子の増幅に用いたプライマーの塩基配列

	Forward primer	Reverse primer	Anneal (°C)
Promoter & exon 1	GATGGTCTGATTCCAAAGCC	TGTGTACAGCCCTGAGAGAC	61
exon 2	CGAGGATCAAAGGCTTGGCT	GGCCAGTATAACTTGGAACT	63
exon 3	GGGGTACATTAGATATCAGC	ATTAGAATAGCTCAGGACTG	61
exon 4	CACATGCTTTCTTTTTCCC	GATGCCTTCCCTATTCCGGT	57
exon 5	ATACAGACTAGCCAGGGAGA	TCATCTCCTCTGGCCACTGC	63
exon 6	AACATTGACTCCCATCAAGG	CTGGATGCTGTATTGCAGGA	57
exon 7	CCAGGTCAAACCTGAAGGTT	TTTTGTGAGACCAACACTAG	55
exon 8	GAAGGTTATGATGTCCTACC	AAGAATTTTGTAAGGGCCTC	55
exon 9	CATGATGGTGTTGCTCTGGA	AGCGTGAGGCTCCCAGAATA	55
exon 10	ATCTGCTTAATGGAGCTAGT	AAACTCAGTGGTCTCTGTCC	57
exon 11	TGGCTCATCTGTACTGTGAC	TGACCAACAAGTGACCTATG	55
intron 8	GGTACCACTCGCATCCCACTGCAGAG	GGTACCACACAGCCAAAGGCCTTGCC	61

条件を満たすシステムとして New England BioLab 社の Impact system を使用した。本システムでは目的タンパク質の C 末端側に Intein-tag と Chitin binding domain (CBD) を融合タンパク質として発現させ、CBD が結合する Chitin カラムを用いて精製した後に、dithiothreitol (DTT) を作用させて Intein の自己切断機能を誘導する事により、目的タンパク質の C 末端側のアミノ酸配列が保存され、かつ tag を有しない組換えタンパク質を得る事が可能となる。実際には、成熟型タンパク質をコードしている部分の野生型 ALAS2 cDNA や、患者で同定された ALAS2 変異を点変異導入法により挿入した変異型 cDNA

を pTBX ベクターに組み込み、それらのベクターを用いて大腸菌株 BL21(DE3) を形質転換した後に成熟型 ALAS2-Intein-CBD 融合タンパク質の発現を誘導する。発現の誘導は低濃度の IPTG (0.1 mM) を用いて低温で (25°C) 長時間緩徐に行ない、発現誘導した大腸菌は遠心して集菌した後、抽出バッファー中で超音波装置を用いて破碎し、それを遠心して得られた上清を可溶性画分とした。次いで、可溶化した組換えタンパク質を Chitin ビーズを用いて精製した後、DTT により Intein の自己切断活性を誘導し成熟型 ALAS2 の C 末端を Intein との融合部から切り離し溶出する。このようにして得た Tag-free の組換え成熟

型 ALAS2 タンパク質を用いて *in vitro* における ALAS 酵素活性を測定した。

5. *in vivo* 酵素活性の測定

次に、*in vivo* における酵素活性を評価する実験系を、Invitrogen 社の Flp-In T-Rex system を用いて構築した。それぞれの変異体の酵素活性を *in vivo* で比較するためには、異なる細胞内で同程度に野生型あるいは変異型 ALAS2 を再現性良く同程度に発現させる必要がある。一過性の遺伝子導入法では困難だが、Flp-In T-Rex system では、HEK293 細胞の genome DNA 中の遺伝子発現が抑制されない特定の領域に目的遺伝子を組み込む事ができ (Flp-In system)、また、tetracyclin (Tet)により制御可能なプロモーターを利用して目的遺伝子の発現量を制御する事が可能となる(T-Rex system)。従って、それぞれの変異遺伝子の mRNA の発現量を調節して同程度に揃える事ができ、転写レベルでの差を考慮する事なく、それぞれの酵素の *in vivo* における活性を比較する事が可能になる。そして酵素活性の検出には ALAS2 の発現増加に伴うポルフィリン体の蓄積を利用した。ALAS2 タンパク質を HEK293 細胞で強制発現させると、酵素活性に応じてポルフィリン体が細胞内に蓄積するが、蓄積したポルフィリン体は紫外線照射下で特徴的なピンク色の蛍光を発する。その蛍光の強度はポルフィリン体の蓄積量に比例するため、この蛍光強度を比較する事により *in vivo* における酵素活性の比較とした。また、これらの細胞を用いて野生型や変異型の ALAS2 酵素を発現させた後にシクロヘキシミド(CHX)を培養液中に添加して翻訳を抑制し、その後系時的に試料を調製して ALAS2 タンパク質の量がどの様に変化するかを Western blot 法で検出する事により、ALAS2 タンパク質の細胞内におけるおおよその半減期も測定した。この場合の ALAS2 タンパク質は大きさから考えてミトコンドリア内に局在する成熟型タンパク質であると考えられる。

(倫理面への配慮)

本研究における鉄芽球性貧血患者とその家族からの検体の採取にあたっては、東北大学医学部倫理委員会の審査を受け許可されたプロトコールに基づき、本人または親権者の同意を書面で得た後に実施された。

C. 研究結果

1. genome DNA の調製

末梢血の採血から genome DNA の採血まで通常 2-3 日を要し、時に採取から 5 日後に genome DNA の抽出を行なわざるを得ない場合もあったが、その様な場合でも、約 2 ml の末梢血から ALAS2 以外の遺伝子の解析も含め、その後の解析に十分な量の genome DNA を抽出する事が可能であった。

2. 遺伝子変異の同定

得られた患者 ALAS2 遺伝子の塩基配列は "SeqMan Pro" sequence assembly and analysis software (DNASTAR 社) を用いて基準配列と比較し、変異の有無を判定した。日本人の ALAS2 遺伝子のエクソン部分に於ける single nucleotide polymorphism (SNP)は今のところ報告されていない。また、ALAS2 遺伝子は X 染色体上に map されているため、患者が男性である場合には、変異の有無の判定には特に問題がなかったが、患者が女性の場合には変異と正常配列が重複する形で検出されるため、より注意深い検討が必要であった。今回の研究では男性の遺伝性鉄芽球性貧血患者から、c.508C>T、c.509G>T、c.1685T>C、c.1701G>A の 4 種類の新たな変異を同定した。いずれの変異もミスセンス変異であり、アミノ酸レベルではそれぞれ Arg170Cys、Arg170Leu、Val562Ala、Met567Ile というアミノ酸置換を引き起こすものと考えられた。

3. 大腸菌を用いた組換えタンパク質の精製

野生型および変異型の ALAS2 タンパク質を発現させるためのベクター(野生型酵素の

発現ベクターは pTBX-ALAS2)を用いて BL21(DE3)大腸菌を形質転換し、IPTG を用いて発現誘導をした後に、大腸菌を溶菌バッファーの中で超音波を用いて破碎し、遠

心して得られた上清(可溶性画分)を Chitin beads を用いて精製し、DTT により Intein の自己切断機能を活性化することにより

図1 : Arg170Leu と Arg170Cys の酵素活性

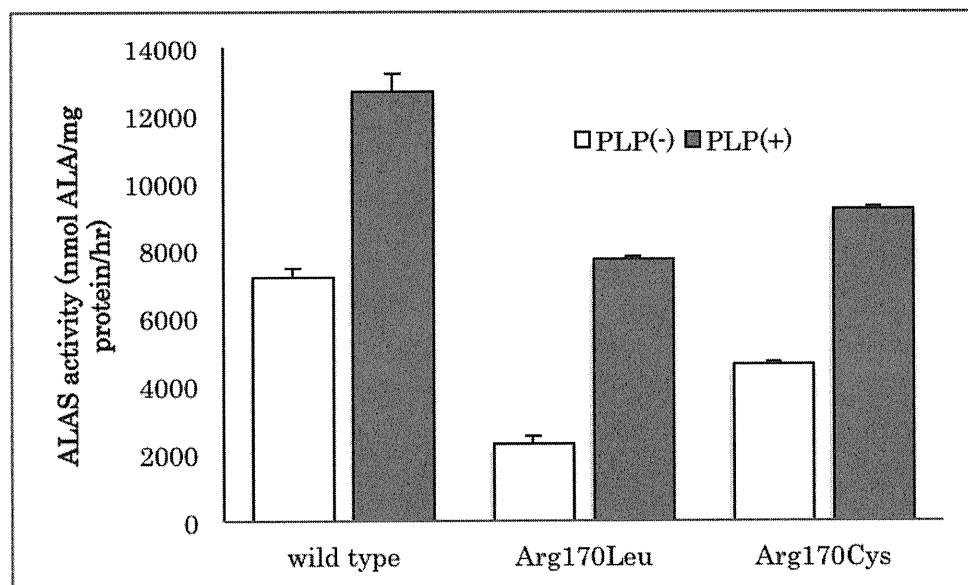
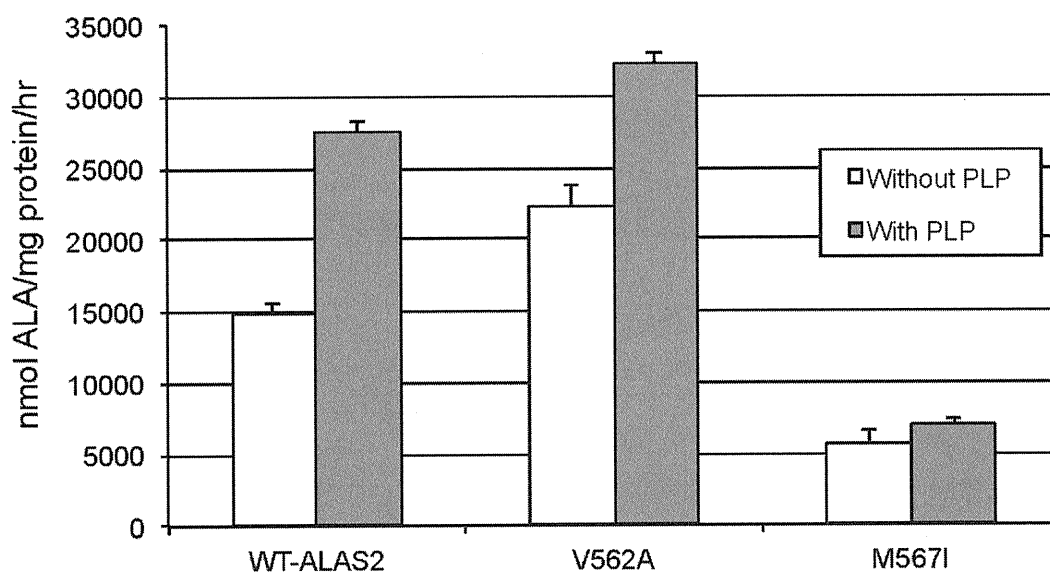


図2 : Val562Ala と Met567Ile の酵素活性



CBD-Intein tag を取り除いた。精製した組換えタンパク質の純度を、SDS-PAGE 後のアク

リルアミドゲルを Coomassie Brilliant Blue R-250 を用いて染色する方法により検討し

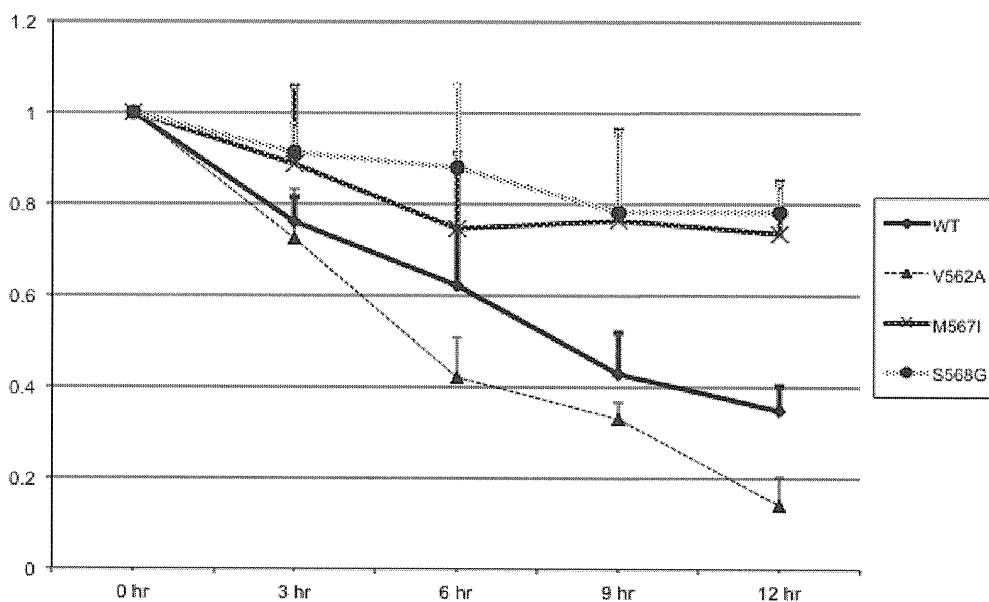
たところ、予想される部位にほぼ単一のバンドが検出された。また、その試料の酵素活性を測定したところ、生体組織から抽出された天然型 ALAS タンパク質と同等の酵素活性が得られる事を確認した。同様にして得られた変異型 ALAS2 タンパク質の酵素活性を測定したところ、Arg170Cys, Arg170Leu, Met567Ile 変異を有する組換えタンパク質の酵素活性は、測定系に ALAS の補酵素である pyridoxal 5-phosphate (PLP) を加えない場合でも、あるいは過剰に加えた場合でも野生型に比して明らかに低下していたが、Val562Ala の変異を有する酵素の活性は野生型に比べて同等以上に亢進していた。(図 1、2) ただし、それぞれの酵素活性は野生型同士を比較した場合でも図 1 と図 2 では異なっており、図 1 の野生型 ALAS2 の非活性は図 2 のその約半分であった。この原因については現在のところは不明であり、再現性の良い結果を得るために精製の方法などに改善すべき余地が残る

ものと考えられる。

4. in vivo における ALAS2 タンパク質の半減期と酵素活性の測定

Val562Ala の in vitro での酵素活性が上昇していたため、Val562Ala、M567Ile 変異酵素の細胞内における半減期を野生型と比較したところ、Met567Ile 変異酵素の半減期は野生型と比べて延長していたのに対し、Val562Ala 変異酵素の半減期は野生型と比較して短縮していた (図 3)。また、以前に本邦の鉄芽球性患者で同定された酵素活性の低い Ser568Gly 変異についても半減期を測定したところ、Met567Ile と同様に延長している事が明らかになった。次にポルフィリン体の発する蛍光を指標として in vivo における酵素活性を定性的に比較したところ、Val562Ala 変異と Met567Ile 変異および Ser568Gly のいずれの変異体の酵素活性も野生型に比較して低下していた。特に Met567Ile と Ser568Gly の in vivo における酵素活性の低下が顕著であった。

図 3 : 変異酵素の半減期



D. 結論

今回の研究結果と以前から蓄積した結果を合わせて検討すると、本邦の X 染色体連鎖鉄芽球性貧血患者で同定された ALAS2 遺伝子

変異は全てミスセンス変異であり、そのうちのほとんどの変異は in vitro の酵素活性が低下することが明らかになった。また、そのような変異体は in vivo における半減期が野生型

に比較して延長するような場合でも、*in vivo*における酵素活性はほとんど常に野生型より低下していると考えられる事が明らかになった。このことは、タンパク質寿命の延長によっても酵素活性の低下を補填する事ができない事を示唆しており興味深い。すなわち、*in vitro*における酵素活性が低下することが明らかにできた場合には、その変異は機能喪失型の変異と考えて差し支えないものと思われる。

一方、*in vitro*における酵素活性が野生型と同等以上である場合でも、*in vivo*におけるタンパク質の半減期が短縮し細胞内における酵素活性は低下する場合がある事も明らかになった。従って、*in vitro*の酵素活性が亢進している場合には、*in vivo*における酵素活性を野生型と比較する事で、当該変異が実は機能喪失型であるのか、あるいは真に機能獲得型であるのかを判定することが重要であると考えられた。

E. 考察

近年、ALAS2 遺伝子の機能獲得型の変異が赤芽球性ポルフィリン症発症の原因となり得る事が報告された。従って、ALAS2 遺伝子の変異を同定した場合、その変異が ALAS2 タンパク質の機能を喪失させるのか、あるいは機能を亢進させるのかを明らかにする事は、疾患の診断の上からも重要である。本研究により、ALAS2 変異を同定する方法を確立し、さらに、その変異が機能喪失型の変異であるのか、あるいは機能獲得型の変異であるのかを系統立てて明らかにする方法を確立した。今回の研究では Sanger sequencing 法を用いて ALAS2 遺伝子のエクソンとその近傍の配列のみを解析したが、検索対象遺伝子が限定される場合にはこの方法が現時点では最も費用対効果の高い方法であると考えられる。しかしながら次世代 DNA シーケンサーの開発とその改良は急速に進んでおり、次世代型 DNA シーケンサーが安価に使用できるようになれば、より迅速に変異の同定ができるようになるものと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1: Harigae H, Furuyama K. "Hereditary sideroblastic anemia: pathophysiology and gene mutations." *Int J Hematol.* 2010; 92(3):425-431.
- 2: Ohgari Y, Miyata Y, Miyagi T, Gotoh S, Ohta T, Kataoka T, Furuyama K, Taketani S. "Roles of porphyrin and iron metabolisms in the δ -aminolevulinic acid (ALA)-induced accumulation of protoporphyrin and photodamage of tumor cells." *Photochem Photobiol.* 2011; 87(5):1138-1145.
- 3: Kadirvel S, Furuyama K, Harigae H, Kaneko K, Tamai Y, Ishida Y, Shibahara S. "The carboxyl-terminal region of erythroid-specific 5-aminolevulinate synthase acts as an intrinsic modifier for its catalytic activity and protein stability." *Exp Hematol.* 2012 [In press]

2. 学会発表

- 1: 第 52 回アメリカ血液学会総会 (2010 年 12 月 4 日~7 日 / オレンジカウンティコンベンションセンター / アメリカ合衆国フロリダ州オーランド市) Rie Ohba, Kazumichi Furuyama, Shigeru Tsuchiya, Atsushi Manabe, Etsuro Ito, Seiji Kojima, Keiya Ozawa, Hideo Harigae. "Epidemiological and Genetic Analysis of Sideroblastic Anemia --- Multicenter Study In Japan."
- 2: 第 84 回日本生化学会大会 (平成 23 年 9 月 21-24 日 / 京都国際会議場 / 京都市) Senkottubelan Kadirvel, 古山和道、金子桐子、張替秀郎、柴原茂樹 "赤芽球特異的 5-アミノレブリン酸合成酵素のカルボキシル末端は内因性抑制ドメインとして機能する" (口演およびポスター)
- 3: 第 73 回日本血液学会総会 (平成 23 年 10 月 14-16 日 / 名古屋国際会議場 / 名古屋市) Rie Ohba, Kazumichi Furuyama, Atsushi Manaba, Etsuro Ito, Seiji Kojima, Keiya Ozawa, Hideo

Harigae “Characteristics of sideroblastic anemia in Japan-from the analysis of multicenter study”(口演)

4. 第 53 回アメリカ血液学会総会 (平成 23 年 12 月 10-13 日 / サンディエゴコンベンションセンター / アメリカ合衆国サンディエゴ市)
Kiriko Kaneko, Akiko Shibasaki, Hiroshi Nishiyama, Takuo Hirose, Koji Ohba, Kazuhito Totsune, Kazumichi Furuyama and Kazuhiro Takahashi “Expression of (pro)renin receptor in human erythroid cell lines: the effect of interferon- gamma” (ポスター)

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

1. 特許取得
該当無し
2. 実用新案登録
該当無し

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

遺伝性鉄芽球性貧血の診断分類と治療法の確立

成人鉄芽球性貧血の調査研究と新規治療法の確立に向けての基礎研究
研究分担者 小澤敬也（自治医科大学・医学部・教授）

研究要旨：成人領域の鉄芽球性貧血症例の病態を明らかにするために、全国の血液疾患治療施設を対象に調査研究を行った。得られた臨床情報から、130例の後天性鉄芽球性貧血症例が確認された。その内訳は refractory anemia with ring sideroblasts (RARS)が47例、refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD)が72例、refractory anemia with excess blasts (RAEB)が9例、アルコール性1例であった。薬剤などによる二次性の後天性鉄芽球性貧血は認められず、本邦において最も多い後天性鉄芽球性貧血は、refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD)であることが明らかとなった。さらに、新規治療法の確立に向けて DNA メチル化阻害薬アザシチジンに対する耐性細胞株を樹立し、耐性機序の解析を行った。その結果、アザシチジン活性化プロセスの障害が示唆され、耐性克服法の開発に有用な知見を得ることができた。

A. 研究目的

鉄芽球性貧血は、骨髄に環状鉄の出現を特徴とする難治性貧血である。鉄芽球性貧血は、遺伝性鉄芽球性貧血と後天性鉄芽球性貧血に大別されるが、その多くは後天性であり骨髄異形成症候群の一亜型として分類される。骨髄異形成症候群の中の鉄芽球性貧血に絞った調査研究はこれまでなされたことがなく、遺伝性鉄芽球性貧血との鑑別を明確にするためには後天性鉄芽球性貧血の病態を調査することが必須である。そこで、今回その発症頻度や病態についての疫学調査を行った。さらに、新規治療法の確立に向けて新規治療薬であるメチル化

阻害剤の有効性について検討した

E. 研究方法

全国の施設に対し、鉄芽球性貧血症例の有無を問う予備調査を行い、予備調査にて鉄芽球性貧血の症例が確認できた施設に対し、臨床データ、家族歴、生活歴、治療歴など病態解析に必要な情報を得た。

（倫理面への配慮）

本研究は主たる研究実施施設である東北大学の倫理委員会に審査申請を行い、承認を得て実施した。一次査は患者個人情報that匿名化されている遺伝子検査を含まない、既存資料のみを用いた観察研究であるため、「疫学研究の倫理指針」に基づき、参加施設では倫理委員会での審査・承認は必要とせず、施設長の承認のみで研究に参加することが可能である。参加施設での審査申請の要否は各施設の判断に委ねた。

メチル化阻害剤の有効性の検討については、以下の方法を用いた

1. ヒト白血病細胞株を用い、アザシチ

ジンに対する耐性細胞株を樹立する。

2. アザシチジン投与によるアポトーシスシグナリングや細胞周期調節系への影響の違いについて、アザシチジン耐性株とアザシチジン感受性の親株とで比較検討する。

3. アザシチジン耐性株における耐性機序を解析する。

F. 研究結果

1. 成人鉄芽球性貧血の調査研究

平成 21 年 2 月から平成 23 年 1 月までに診断された鉄芽球性貧血が 298 例確認された。これらの臨床情報から、130 例の後天性鉄芽球性貧血症例が確認された。その内訳は refractory anemia with ring sideroblasts (RARS) が 47 例, refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD) が 72 例, refractory anemia with excess blasts (RAEB) が 9 例、アルコール性 1 例であった。薬剤などによる二次性の後天性鉄芽球性貧血は認められなかった。遺伝性鉄芽球性貧血症例との病態の相違、遺伝子解析については、代表研究者の東北大学張替教授、および小児領域の分担研究者と連携して行っていく予定である。

2. メチル化阻害剤の有効性の検討

1. ヒト急性骨髄性白血病細胞株 THP-1 および HL60 より、アザシチジン耐性株 THP-1/AR および HL60/AR をそれぞれクローニングした。

2. THP-1/AR および HL60/AR に対するアザシチジンの IC₅₀ 値は、それぞれの親株と比較して 9.77 倍および 6.73 倍であった。

3. THP-1/AR および HL60/AR は他の DNA メチル化阻害薬である 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) に対し

て交差耐性を示した。

4. アザシチジン投与により、親株では subG1 期の細胞の著明な増加を認めたが、耐性株ではこの現象を認めなかった。

5. アザシチジン投与後、親株ではリン酸化 JNK/SAPK 量の増加および cleaved caspases の増加がみられたが、耐性株ではこの反応がみられなかった。

6. アザシチジンによる DNA methyltransferase 活性の抑制が、耐性株ではみられなかった。

7. 耐性株と親株とで、P 糖蛋白の発現量に差はなかった。

8. 耐性株では親株と比較して、アザシチジンの活性化プロセスに重要な uridine-cytidine kinase の蛋白発現量が減少していた。

G. 考察

後天性鉄芽球性貧血症例で、最も多い病型は MDS の RCMD であることが明らかとなった。これらの症例では異型性が明らかな例が多く、遺伝性鉄芽球性貧血との鑑別は比較的容易と考えられるが、異型性が少なく貧血のみが異常として認められる RARS については、遺伝性鉄芽球性貧血との鑑別が必要になってくる。これらの症例では、遺伝子解析が確定診断の上から非常に重要と考えられる。

本研究では、さらに新規治療法の確立に向け、MDS に対する新規治療薬であるメチル化阻害剤の有効性について基礎的検討を行った。2 種類のアザシチジン耐性株をクローニングし、耐性機序の解析を進めたところ、アザシチジン感受性の親株では、アザシチジン投与後に JNK/SAPK の活性化によるアポトーシスシグナリングの活性化が示唆されたが、

耐性株では、この現象が欠落していた。一方、耐性株ではアザシチジン投与後も DNA methyltransferase 活性の抑制を認めなかったことから、細胞内におけるアザシチジンの活性化産物の低下が起こっているものと推察された。その理由としては、a) 細胞内へのアザシチジン取込機構の異常、b) アザシチジンの細胞外への排泄増加、c) 細胞内におけるアザシチジン活性化プロセスの障害などが考えられる。細胞内へのアザシチジンの取込については、現在トランスポーター蛋白である hENT1、hENT2 および hCNT1 の発現量を検討している。しかしながら、耐性株では、uridine-cytidine kinase の発現量が低下していることから、アザシチジン活性化産物量の低下は主に細胞内取込後のアザシチジン活性化プロセスの障害に起因している可能性が高い。現在、uridine-cytidine kinase 遺伝子の変異の有無についても検索を進めている。また、5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) と交差耐性を示すことから、deoxycytidine kinase の発現量および遺伝子変異についても検討する予定である。さらに、耐性克服に有用な併用薬剤について検討するため、耐性株を用いた isobologram 法による解析を開始した。

E. 結論

1. 調査研究にて 130 例の後天性鉄芽球性貧血が確認され、1 例を除き骨髓異形成症候群に分類された。
2. アザシチジン耐性株 THP-1/AR および HL60/AR を樹立した。
3. uridine-cytidine kinase の発現量低下によるアザシチジン活性化プロセスの障害が主な耐性機序と考えられる。
4. 後天性鉄芽球性貧血に対する有効な

併用療法開発のツールとして、アザシチジン耐性株は有用と思われる。

F. 研究発表

1. 学会発表

- 1) Okabe H, Suzuki T, Uehara E, Ueda M, Nagai T, Ozawa K.
Hematopoietic disturbance in iron-overload
第 72 回日本血液学会学術集会、2010 年 9 月 24 日、横浜

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

遺伝性鉄芽球性貧血の診断分類と治療法の確立

小児科領域の調査研究

研究分担者 小島勢二 名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 教授
伊藤悦朗 弘前大学大学院医学系研究科小児科学 教授
真部淳 聖路加国際病院小児科医長
土屋滋 東北大学大学院医学系研究科小児病態学教授
研究協力者 嶋田 明 名古屋医学部附属病院小児科 病院助教

研究要旨： 日本小児血液学会は平成21年2月より再生不良性貧血(AA)、骨髄異形性症候群(MDS)および先天性造血不全症候群(CBFS)を対象とした中央診断を開始した。レビュー開始から平成23年8月までに500例がレビューされた。レビュー結果より鉄芽球性貧血の症例が3例みつかった。遺伝子解析は未施行であるが、そのうちの1例はビタミン B6投与により貧血の改善がみられALAS2遺伝子変異によるXLSAが疑われた。中央診断を行うことにより極めて希少とされる遺伝性鉄芽球性貧血の症例の発掘につながるものと考えられる。

A. 研究目的

鉄芽球性貧血は、骨髄に環状鉄芽球という特徴的な赤芽球の出現を特徴としている。この環状鉄芽球は赤芽球のミトコンドリアと呼ばれる器官への鉄の異常蓄積により形成される。鉄芽球性貧血は、遺伝性鉄芽球性貧血と後天性鉄芽球性貧血に大別されるが、遺伝性鉄芽球性貧血は患者数が少ないために、調査研究がほとんど行われたことがなく、その疫学や病態は現在でもわかっていない。遺伝性鉄芽球性貧血は、X連鎖性鉄芽球性貧血(XLSA)と呼ばれているが、発症家系

が約 40 家系と少なく、希少疾患であるため、その発症頻度や病態についての詳

細な調査・解析はなされていなかった。(XLSA として正確に診断されるようになれば、ビタミン B6 の投与により貧血が改善する可能性があり、正確な診断は極めて重要である。

H. 研究方法

日本小児血液学会においては再生不良性貧血(AA)、骨髄異形性症候群(MDS)および先天性骨髄不全症候群(CBFS)を対象とした中央診断を行うことになり、XLSA も施設での診断のみでなく、

中央診断されるようになった。

中央診断事務局を名古屋大学小児科に設置した。AA、MDS、あるいは CBFS が疑われる症例が発生した場合は、各施設から事務局に連絡をもらい、登録番号を発行した。レビューは骨髄および末梢血塗抹標本を2施設(名古屋大学小児科、聖路加国際病院小児科)で、骨髄病理標本を1施設(名古屋第一赤十字病院病理部)で行った。

(倫理面への配慮)

中央診断およびそれに伴う検査については、名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得、患者及び患者保護者の同意を取得した後に行った。

I. 研究結果

平成21年2月から平成23年8月までに500例がレビューされ、このうち鉄芽球性貧血が3例含まれていた。遺伝子解析は未施行である。このうちの1例は生後10か月で小球性低色素性貧血を発症した。当初鉄欠乏性貧血として、鉄剤の投与を行われたが、貧血は改善せず、骨髄検査を行うこととなった。骨髄は低形成で、赤芽球の異形成は乏しかったが、鉄染色にて環状鉄芽球がわずかに認められた。遺伝性鉄芽球性貧血を疑い、ビタミンB6を投与したところ、貧血の改善がみられた。遺伝子解析は今後行っていく予定である。また、過去に登録された1例はPMPSが臨床的に疑われたが、ミトコンドリアDNAに欠失が認められず、他の原因遺伝子の変異を解析中である。

J. 考察

遺伝性鉄芽球性貧血の本邦での報告

例は非常に少なく、まだ病態についてあきらかとなっていない。今回みつかった例のように他の貧血とされている例もあるものと考えられる。また形態学的診断も困難を極め、中央診断が重要と考えられる。今後は症例の集積を行い、あわせて分子診断も確定診断の上から非常に重要と考えられる。

K. 結論

今後も登録システムの活用により、症例を集積していく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Villalobos IB, Takahashi Y, Akatsuka Y, Muramatsu H, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Saji H, Kato M, Ogawa S, Kojima S.

Relapse of leukemia with loss of mismatched HLA resulting from uniparental disomy after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2010 ;115:3158-61.

- 2) Konno Y, Toki T, Tandai S, Xu G, Wang R, Terui K, Ohga S, Hara T, Hama A, Kojima S, Hasegawa D, Kosaka Y, Yanagisawa R, Koike K, Kanai R, Imai T, Hongo T, Park MJ, Sugita K, Ito E.

Mutations in the ribosomal protein genes in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Haematologica*. 2010 ;95:1293-9.

- 3) Kanazaki R, Toki T, Terui K, Xu G, Wang R, Shimada A, Hama A, Kanegane H, Kawakami K, Endo M,

- Hasegawa D, Kogawa K, Adachi S, Ikeda Y, Iwamoto S, Taga T, Kosaka Y, Kojima S, Hayashi Y, Ito E. Down syndrome and GATA1 mutations in transient abnormal myeloproliferative disorder: mutation classes correlate with progression to myeloid leukemia. *Blood*. 2010 ;116:4631-4638.
- 4) Pulsipher MA, Young NS, Tolar J, Risitano AM, Deeg HJ, Anderlini P, Calado R, Kojima S, Eapen M, Harris R, Scheinberg P, Savage S, Maciejewski JP, Tiu RV, Difronzo N, Horowitz MM, Antin JH. Optimization of Therapy for Severe Aplastic Anemia Based on Clinical, Biological and Treatment Response Parameters: Conclusions of an International Working Group on Severe Aplastic Anemia Convened by the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network, March 2010. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011 ;17:291-9.
- 5) Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsuiki N, Takagi M, Matsuda K, Muramatsu H, Doisaki S, Nagasawa M, Morio T, Kasahara Y, Koike K, Kojima S, Takao A, Mizutani S. Autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease with somatic KRAS mutation. *Blood*. 2010 Nov 9. [Epub ahead of print]
- 6) Yoshida N, Yagasaki H, Hama A, Takahashi Y, Kosaka Y, Kobayashi R, Yabe H, Kaneko T, Tsuchida M, Ohara A, Nakahata T, Kojima S. Predicting response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. *Haematologica*. 2011 Jan 27. [Epub ahead of print]
- 7) Ito E, Konno Y, Toki T, Terui K. Molecular pathogenesis in Diamond-Blackfan anemia. *Int J Hematol*. 2010. ;92:413-18. Epub 2010 Oct 1.
- 8) Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, Suzuki H, Ishikawa Y, Choi YL, Ueno T, Soda M, Hamada T, Haruta H, Takada S, Miyazaki Y, Kiyoi H, Ito E, Naoe T, Tomonaga M, Toyota M, Tajima S, Iwama A, Mano H. Array-based genomic resequencing of human leukemia. *Oncogene* 2010. [Epub ahead of print].
- 9) Aikawa Y, Katsumoto T, Zhang P, Shima H, Shino M, Terui K, Ito E, Ohno H, Stanley ER, Singh H, Tenen DG and Kitabayashi I. PU.1-mediated upregulation of *M-CSFR* is critical for MOZ-leukemia stem cell potential. *Nature Medicine* 2010;16:580-585.
- 10) Shiba N, Kato NM, Park MJ, Sanada M, Ito E, Fukushima K, Sako M, Arakawa H, Ogawa S, and Hayashi Y. *CBL* mutations in juvenile myelomonocytic leukemia and pediatric myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 2010;24:1090-1092.

- 11) Komatsuzaki S, Aoki Y, Niihori T, Okamoto N, Hennekam RC, Hopman S, Ohashi H, Mizuno S, Watanabe Y, Kamasaki H, Kondo I, Moriyama N, Kurosawa K, Kawame H, Okuyama R, Imaizumi M, Rikiishi T, Tsuchiya S, Kure S, Matsubara Y. Mutation analysis of the SHOC2 gene in Noonan-like syndrome and in hematologic malignancies. *J Hum Genet.* 2010 ;55:801-9.
- 12) Kamiya T, Manabe A. Congenital dyserythropoietic anemia. *Int J Hematol.* 2010 ;92:432-8.
2. 学会発表
- 3) Takahashi Y, Doisaki S, Nishio N, Muramatsu H, Shimada A, Hama A, Kojima S. The telomere length in peripheral blood lymphocytes is a useful predictor of the response to immunosuppressive therapy in patients with acquired aplastic anemia. Session Type: Oral Session. 52nd ASH annual meeting. Dec. 4, 2010. Orland, USA
- 4) 高橋義行、ブストス・イツツェル、土居崎小夜子、村松秀城、西尾信博、嶋田明、濱麻人、小島勢二 : Recovery of deficient regulatory T cells after IST or SCT using ATG in children with aplastic anemia. 第 72 回日本血液学会学術集会、2010 年 9 月 24 日、横浜
- 5) 濱麻人、真部淳、伊藤雅文、野沢和江、土居崎小夜子、村松秀城、嶋田明、高橋義行、小原明、小島勢二 : 小児再生不良性貧血と Refractory cytopenia of childhood の臨床像の比較 : 中央診断登録例 78 例の検討 : 第 52 回日本小児血液学会総会、2010 年 12 月 17 日、大阪
- 6) 伊藤悦朗、照井君典、小島勢二、小原明、大賀正一、森尾友宏、浜口功、倉光球、菅野仁、 : 先天性赤芽球癆 (Diamond Blackfan 貧血) の効果的診断法の確立に関する研究. 平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業研究事業小島班「DKC の効果的診断方法の確立と治療ガイドラインの作成に関する研究」伊藤班「DBA の効果的診断法の確立に関する研究」合同班会議、名古屋 (平成 22 年 9 月 4 日) .
- 7) 伊藤悦朗、照井君典、小島勢二、小原明、大賀正一、森尾友宏、浜口功、倉光球、菅野仁、 : 先天性赤芽球癆 (Diamond Blackfan 貧血) の効果的診断法の確立に関する研究. 先天性造血不全シンポジウム 千葉浦安市 (平成 23 年 2 月 4 日) .
- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし