

先天性骨髄不全症の登録システムの構築と診断ガイドラインの作成に関する研究

### DBA の患者由来多能性幹細胞の樹立と発症メカニズム解析

研究分担者 浜口 功（国立感染症研究所血液・安全性研究部 部長）  
協力研究者 松岡佐保子（国立感染症研究所血液・安全性研究部 室長）  
協力研究者 倉光 球（国立感染症研究所血液・安全性研究部 研究員）

**研究要旨：**Diamond-Blackfan 貧血 (DBA) の発症メカニズムは未だ不明なところが多く、根治の手掛かりがつかめていない。DBA の原因遺伝子の 1 つである *RPS19* を培養細胞株で発現抑制すると、オートファジーの活性化がみられ、赤血球分化異常への関与が示唆された。患者由来 iPS 細胞を用いて発症機序の解析を検討することで精度の高い結果を得られると考え、熊本大学の協力により 3 症例の DBA 由来 iPS 細胞を樹立した。DBA 由来 iPS 細胞の *in vitro* 分化誘導法を構築し、これまで培養細胞株等で得られた成果を確認するため研究環境を整えた。

#### A . 研究目的

これまで本研究班において DBA の原因遺伝子のリボソーム遺伝子の片アレルの大欠失等を同定して来たが、貧血発症のメカニズムの詳細は未だ不明のままであり、治療法開発が遅れている。我々は、これまでにリボソーム遺伝子の発現量の減少によって、細胞内のタンパク質代謝活性が大きく変化することを培養細胞株で見出している。

そこで、shRNA を用いて *in vitro* で作製した DBA の発症モデル系で、さらなる発症メカニズムを探索することとした。さらに、患者と遺伝的背景が完全に一致している患者由来多能性幹細胞 (iPS 細胞) を、熊本大学発生医学研究所 (江良拓実教授) の協力のもと樹立し、これまで得られた知見をもとに解析を行うこととした。

#### B . 研究方法

shRPS19 細胞を用いた DBA 発症メカニズム解析：shRNA で RPS19 を発現抑制した K562 細胞を作製し、オートファジーの活性および赤血球分化異常への影響を検討した。

DBA 患者由来 iPS 細胞の樹立：3 例の DBA 患者から末梢血を採血し、単核球を分離した。患者細胞

へセンダイウイルスベクターを用いた方法で山中 4 因子を遺伝子導入し、iPS 細胞を樹立した。iPS 細胞から赤血球分化誘導系を構築した。

(倫理面への配慮)

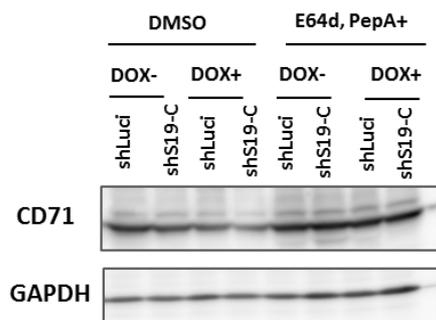
本研究は、熊本大学発生医学研究所 (倫理第 335 号)、および国立感染症研究所 (受付番号 404) におけるそれぞれのヒトを対象とする医学研究倫理審査の承認を得た上で実施した。検体採取においては、DBA 患者 (または患者の両親) へ研究内容について十分に説明し、研究協力への了承を得た場合のみ実施した。

#### C . 研究結果

K562 細胞へ shRNA で DBA の原因遺伝子の 1 つである *RPS19* をレンチウイルスで発現抑制すると、培養後 4 日目以降にオートファジーの活性化を伴いリソソームを介するタンパク質分解系が活性化することを見出した。CD71 (Transferrin receptor) は、細胞膜に発現し、特に赤芽球前駆細胞で高発現し、鉄の取り込みに重要な分子である。CD71 はファゴサイトーシスにより細胞内へ取り込まれるが、再利用され再び細胞膜へ移行する。RPS19 が発現抑制さ

れリソソーム分解が活性化した K562 細胞では CD71 の発現は減少していた。驚いたことに E64d と PepstatinA でリソソームの分解を阻害すると CD71 の発現が回復した (図 1)。しかしながら、細胞表面の CD71 の発現量には変化が無かった。これらのことからリソソームの分解の活性化と赤芽球分化異常が密接に関わっている可能性が示唆された。

図1



そこで、DBA 患者から樹立した iPS 細胞を用いてリソソーム分解活性と赤芽球分化抑制について同時に観察できる評価系を構築することとした。3 例の DBA 患者の末梢血単核球から iPS 細胞を作製した。DBA 患者由来 iPS 細胞は、健常者由来 iPS 細胞と比して、継代時の力学的ストレスによる細胞ダメージを受けやすくアポトーシスに陥る傾向が認められたが、定常状態における未分化性維持や増殖は遜色なく、目的とするアッセイ系に使用可能であることが確認できた。そこで、DBA 患者由来 iPS 細胞から embryoid body 形成法を用いた赤血球への分化誘導系を構築した。現在オートファジーのマーカである LC3 (GFP 融合: LC3-GFP) をレンチウイルスで iPS 細胞を導入し、薬剤セレクションすることでオートファジーが観察できる DBA 患者由来 iPS 細胞を作製している。LC3-GFP 導入 DBA 由来 iPS 細胞を *in vitro* で赤芽球へ分化誘導することでリソソームの活性化と CD71 のターンオーバーの変化等を観察し、発症メカニズムの解明を目差している。

#### D . 考察

DBA の原因遺伝子の抑制によって培養細胞でリソソームによる分解が活性化し、また赤芽球分化の最も重要な分子の一つである CD71 の発現が減少す

る。CD71 の発現減少はリソソーム分解の阻害によって回復することから、CD71 はリソソームでの分解により減少していることになる。リボソームタンパク質の発現減少が結果的に CD71 のターンオーバー経路を変化させていることが明らかになり非常に興味深い。また DBA では、CD34+造血前駆細胞の段階で CD71 陽性細胞数が顕著に減少していることが知られていることから、DBA の赤芽球分化異常が細胞膜表面の CD71 の発現量コントロールの異常に起因する可能性がある。これらのことから DBA では、細胞内の代謝のドラマチックな変化が起き、このとき細胞飢餓マーカーであるオートファジーが関与しているため、例えばミトコンドリアでの細胞内のエネルギー生産を高く維持させる等、細胞が飢餓状態へ移行することを回避させることが治療法樹立への鍵となる可能性がある。このことは DBA の治療薬の可能性が指摘されている L-ロイシンもエネルギー代謝に深く関与することからも強く示唆される。

#### E . 結論

DBA の発症メカニズムに新たにオートファジーの関与が強く示唆された。これまで培養細胞等で明らかになっている DBA の発症メカニズム仮説について、DBA 患者由来 iPS 細胞を樹立し、患者に最も近い環境で検証することができるようになった。今後、iPS 細胞を用いて DBA 発症の本態を同定する。DBA 由来 iPS 細胞は効果的な DBA の治療薬の開発にも同時に使用できるため、意義深いと考えられる。

#### F . 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Wang R, Yoshida K, Toki T, et al. Loss of function mutations in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. **Br J Haematol.** 2015;168(6):854-864.
- 2) 倉光球 浜口功 .リボソーム異常症と関連疾患 . **血液フロンティア** 特集 赤血球造血の基礎と臨床 2014;24:p81(591)-p89(599).

##### 2. 学会発表

特になし

**G . 知的財産権の出願・登録状況**

特になし

