

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

遺伝性鉄芽球性貧血の遺伝子型と表現型の関連解析

研究分担者 古山和道（岩手医科大学大学生化学講座分子医化学分野 教授）

研究要旨:先天性疾患の多くでは親から子へと受け継がれる遺伝子変異が発症原因である。次世代シーケンサの性能の向上は遺伝子変異の同定を容易にしたが、変異を有する遺伝子が疾患の原因遺伝子である事を明らかにするためには更なる検討が必要である。本研究では近年利用可能になったゲノム遺伝子改変システムを利用し、培養細胞を用いて遺伝子変異が表現型に与える影響を明らかにすることを試みた。

A．研究目的

次世代シーケンサの開発と検出手技の改良により、特定の遺伝子の解析、あるいは網羅的な遺伝子解析が比較的容易となりつつあり、様々な遺伝子変異が患者において同定される様になってきた。一方で、数多く同定される遺伝子変異のうち、大きなアミノ酸の欠失により明らかにタンパク質の機能が障害されると予想される変異を除くと、多くの遺伝子変異と表現型（疾患）の直接的な関連を確定するのは困難である事が多い。特に、遺伝子発現調節領域であるプロモーター領域やエンハンサー/サプレッサー領域の変異の評価は難しく、野生型と比較してプロモーター活性やエンハンサー活性が低下することを明らかにできても、それが病的な低下と言えるかどうかについては議論の余地がある。

最近、分担研究者の古山は *ALAS2* 遺伝子第1イントロンに赤芽球特異的エンハンサーが存在することを見出し、遺伝性鉄芽球性貧血患者において同部に変異を有する家系が存在することを明らかにして報告した。その際、プロモーターアッセイなどの方法により、エンハンサーの変異が *ALAS2* のプロモーター活性を低下させることを明らかにしたが、同部の変異により実際に赤芽球内におけるヘム合成量が低下するかどうかについては確証が得られていない。

そこで、本研究では遺伝子変異と表現型の関連を比較的簡便かつ直接的に明らかにする方法を樹立する事を目的に、近年広く用いられつつあるゲノム編

集技術により赤芽球系培養細胞の *ALAS2* 遺伝子のエンハンサー部分に変異を導入し、実際にヘム生成量が低下するかどうかを明らかにすることを試みた。

B．研究方法

赤芽球系培養細胞である K562 細胞を用い、ゲノム編集技術としては Life Technologies 社の GeneArt CRISPR/Cas9 システムを用いた。このシステムは、ガイド RNA と Cas9 nuclease を同じベクターから発現させる方法により、一種類のベクターを細胞内に導入するのみで、ゲノム DNA の目的の部分切断することができる。その後、切断部の修復が起こる際に同部のゲノム DNA にランダムな欠失や塩基の挿入が起こるため、高頻度に変異が導入されるシステムである。ガイド RNA の配列としては、ヒト *ALAS2* 遺伝子第1イントロンのエンハンサー配列、その中心となる GATA1 結合配列の近傍の配列とした。このようにして作成した *ALAS2* intron1 enhancer editing 用ベクター（以下、pCRISPR-*ALAS2*int1GATA）を Nucleofector（ロンザジャパン株式会社）を用いて K562 細胞に導入し、限界希釈法によりクローニングを行った。その後、Survayor Assay（Transgenomic 社）により変異が導入されていると予想されるクローンを選択し、最終的に *ALAS2* エンハンサー部分を PCR 法により増幅した後に塩基配列を決定し、変異が導入されてい

るクローンを選択した。このようにして *ALAS2* エンハンサーに変異が導入されたクローン(変異 K562 細胞)を選別し、それらから total RNA を抽出し、*ALAS2* mRNA の発現量を RealTime PCR 法により野生型 K562 細胞と比較した。また、ヘモグロビン染色によりヘモグロビン陽性細胞の割合を算出した。

C . 研究結果

Nucleofector による K562 細胞への pCRISPR-*ALAS2*int1GATA (プラスミド) 導入高率は非常に良好で、限界希釈によりクローニングした後も約 50% 程度のクローンで目的の部位の変異が確認された。また、それぞれのクローンの変異導入部位における変異のタイプをシーケンスにより検討した所、多くは欠失で、数塩基から 30 塩基程のものが大半を占めた。それ以外に一部では数塩基の挿入も認められた。また、今回の検討では過半数の変異導入クローンで両方のアレルに異なる変異が導入されており、変異導入の効率も非常に良好であった。これらのクローンの中から両方のアレルに変異が導入されたクローンを選択して *ALAS2* mRNA 量を Real Time PCR 法により野生型の K562 細胞と比較した所、比較した全ての変異導入クローンで *ALAS2* mRNA の発現が低下しており、また、これらの変異導入クローンにおいては野生型と比較してヘモグロビン陽性率も低下していた。

D . 考察

コード領域の変異がタンパク質の機能に与える影響を明らかにすることは、そのタンパク質の機能の評価方法が確定している場合にはそれほど困難ではないと考えられる。一方、タンパク質の機能が明らかでない場合、あるいは機能が明らかであってもその評価の方法が確立していない場合には、遺伝子変異が同定されたとしても、それが疾患の原因になりうるかどうかを判定することは非常に困難である。実際、近年の次世代シーケンサの進歩により全てのタンパク質のコード領域の配列を明らかにするエクソーム解析が盛んに行われるようになり、家族歴などから遺伝性と推定されていても原因が不明であった症例で新たな候補遺伝子が次々に同定されつつあり、現在これらの遺伝子変異がどのように当該疾患

の発症に関与するののかについて更なる検討が行われている。また、次世代シーケンサの更なる改良とコストの低減により、エクソーム解析によっても原因遺伝子が明らかにならない症例については、全ゲノム解析が行われる可能性も高まっている。このような場合、プロモーター部分やイントロン部分の変異、さらには遺伝子と遺伝子の間の領域における変異なども多数同定される様になると予想されることから、バイオインフォマティクスを駆使して候補となる変異を絞り込んだとしても、その候補の変異がどのように疾患の発症と関与するのかを明らかにするのは非常に困難であると予想される。

今回我々は、近年盛んに用いられる様になりつつあるゲノム編集システムを用いて培養細胞のゲノムの特定の領域に変異を導入することにより、イントロン領域の変異が内在性遺伝子の発現制御に関与している可能性が高いことを示した。今回導入し得たのは非特異的な欠失・挿入変異であり、患者のゲノム DNA で同定された変異とは異なる点や、ゲノム編集システムにより他の遺伝子へ非特異的な変異が導入された可能性など、今後解決して行かなければならない問題は多数存在しているが、内在性の遺伝子の発現調節を直接観察できるメリットは大きいと思われる。従って、今回行ったのと同様の方法は、遺伝性鉄芽球性貧血のみならず、様々な遺伝性疾患家系において、網羅的な検索により同定された遺伝子変異と疾患との関連を明らかにするために有用である可能性は高いと考えられる。

E . 結論

CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムを用いて赤芽球系培養細胞である K562 細胞の *ALAS2* 遺伝子の第 1 イントロンに存在するエンハンサー領域に変異を導入し、これにより内在性 *ALAS2* mRNA の発現が低下し、ヘモグロビン陽性率が低下することを明らかにすることができた。この方法は、特定の遺伝子のコード領域で同定される変異のみならず、今後全ゲノム DNA の解析に伴い増加すると考えられる遺伝子の非コード領域の変異の疾患との関連を評価するためにも有用であると考えられる。

F . 研究発表

1. 論文発表

- 1) 張替秀郎, 藤原亨, 古山和道 . ヘム代謝と貧血 . **臨床血液** 2014;55(7):729-734.
- 2) Kaneko K, Furuyama K, Fujiwara T, Kobayashi R, Ishida H, Harigae H, Shibahara S. Identification of the novel erythroid-specific enhancer for ALAS2 gene and its loss-of-function mutation associated with congenital sideroblastic anemia. **Haematologica** 2014;99(2):252-61.

2. 学会発表

- 1) 古山和道, 山下莉奈, 野村和美, 加藤恭丈, 久保田美子 . 非特異的 5-アミノレブリン酸合成酵素 (ALAS1) の新たなヘム依存的分解機構 . **第 87 回日本生化学会大会** (2014 年 10 月 15-18 日, 京都).
- 2) 山下莉奈, 久保田美子, 野村和美, 古山和道 . 非特異的 5-アミノレブリン酸合成酵素 (ALAS1) のミトコンドリア内半減期調節におけるヘム結合モチーフの役割 . **第 650 回岩手医学会例会** (2014 年 7 月 25 日, 盛岡).
- 3) 古山和道, 久保田美子 . CRISPR/CAS9 システムを用いた 5-アミノレブリン酸合成酵素 (ALAS2) 遺伝子の赤芽球特異的エンハンサーの機能解析 . **第 650 回岩手医学会例会** (2014 年 7 月 25 日, 盛岡).

G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

