

先天性骨髄不全症の診断基準・重症度分類・診療ガイドラインの確立に関する研究

### 遺伝性鉄芽球性貧血における遺伝子変異と表現型の関連の検討

研究分担者 古山和道（岩手医科大学生化学講座分子医化学分野 教授）

**研究要旨：**近年、遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子として様々な遺伝子の変異が同定されているが、実際にそれらの遺伝子変異が疾患発症の原因となるかどうかを検討する方法は確立されていない。そこで、赤芽球系培養細胞とゲノム編集技術を利用して、疾患モデル細胞を作成する事により、遺伝子変異と疾患との関連を明らかにする事が出来るかどうかについて検討した。

#### A．研究目的

近年の遺伝子解析技術の進歩に伴い、以前は原因不明であった様々な遺伝性疾患で原因遺伝子の候補が次々に同定されている。遺伝性鉄芽球性貧血についても例外ではなく、以前から知られていた*ALAS2*、*ABCB7*、*GLRX5*や*SLC25A38*に加え、さらに新たな遺伝子の変異が発症原因として報告されている。しかしながら、それらの新たに同定された原因遺伝子の変異が実際に疾患の原因となるかどうかを明らかにするのは困難で、多くの場合、それぞれの遺伝子産物の発現量の減少あるいは機能低下を証明するに留まるか、疾患モデル動物を作成する事により裏付けされている。そこで、より簡便に原因遺伝子となりうるかどうかを明らかにする方法を樹立するために、本研究では、近年盛んに利用されつつあるゲノム編集技術とヒト由来培養細胞を用いて、疾患モデル細胞を作成する方法の確立を試みた。

#### B．研究方法

遺伝性鉄芽球性貧血の診断には骨髄における環状鉄芽球の確認が必須である。従って、特定の遺伝子の遺伝子産物の発現量あるいは機能の異常により、環状鉄芽球が出現する事が明らかにできれば、その遺伝子が遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子として矛盾しないものと考えた。そこでまず、遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子として知られる*ALAS2*遺伝子に機能喪失型変異を導入して*ALAS2*遺伝子の発現

を抑制し、鉄芽球が観察されるかどうかの検討を行った。遺伝子変異を導入する培養細胞として、慢性骨髄性白血病患者由来の赤芽球系培養細胞であるK562細胞と臍帯血由来の非腫瘍性培養細胞株であるHuDEP2細胞を選択し、CRISPR/Cas9システムを用いてそれぞれの培養細胞の*ALAS2*遺伝子の第1イントロンに存在する赤芽球特異的エンハンサー（以下、*ALAS2int1Enh*）に欠失変異を導入した。*ALAS2*遺伝子の発現が低下している事を確認した後、鉄染色により細胞質に鉄顆粒が認められるかどうかの検討を行った。また、K562細胞は酪酸ナトリウムやTGF- $\beta$ 1の培養液中への添加により、HuDEP2細胞は分化用培養液（*PLoS ONE* 8, e59890）に置換することにより分化を誘導してから、同様の検討を行い、さらに必要に応じて電子顕微鏡を用いた観察も行った。

（倫理面への配慮）

本研究には倫理的な配慮が必要な研究は含まれない。

#### C．研究結果

ヒト*ALAS2*遺伝子の発現制御には、*ALAS2int1Enh*が重要な役割を果たすことが知られており、特に*ALAS2int1Enh*中に存在するGATA1結合配列が重要であることが実験的に示唆されている。一方、エクソーム解析によっても原因遺伝子が不明

であった遺伝性鉄芽球性貧血患者の中に、同エンハンサー配列のGATA1結合配列に塩基置換あるいは欠失変異が認められる症例が報告されているが、それらの変異が直接的に疾患発症の原因となるかどうかについては明らかではない。そこで、ゲノム編集技術であるCRISPR/Cas9システムを用いてヒト由来赤芽球系培養細胞であるK562細胞とHuDEP2のゲノムDNA中のALAS2int1Enhに欠失変異を導入し、内在性のヘム合性能への影響と、ミトコンドリアへの鉄の沈着が観察されるかどうかを検討した。その結果、K562細胞、HuDEP2細胞のいずれにおいてもALAS2int1Enhへの欠失変異の導入によりALAS2 mRNAの発現低下とヘモグロビン合成能の低下が認められたが、通常の継代培養の条件下では細胞質に鉄顆粒はほとんど検出されなかった。次に、それぞれの細胞を分化誘導したところ、いずれの細胞でも分化誘導前に比較して分化誘導後にはヘモグロビン合成は亢進したが、K562細胞においては、野生型の細胞もALAS2int1Enhに変異を有する細胞でも、鉄染色で鉄顆粒の存在は明らかではなかった。一方、HuDEP2細胞では、野生型の細胞では分化誘導後も鉄染色により細胞質に少数の細胞で鉄顆粒が認められるのみであったが、ALAS2int1Enhに欠失変異を有するHuDEP2細胞では、分化誘導後、鉄染色により細胞質に多数の鉄顆粒を有する細胞が観察された。さらに、同細胞を電子顕微鏡により観察したところ、ミトコンドリア内に電子密度の高い領域が観察され、鉄染色の結果とあわせて、環状鉄芽球として矛盾しない結果であった。

#### D . 考察

今回の検討では、ALAS2int1Enhへの欠失変異の導入により、慢性骨髄性白血病由来のK562細胞でも、ヒト臍帯血由来のHuDEP2細胞でもALAS2 mRNAの発現量は低下し、ヘモグロビン合性能も低下した。すなわち、ALAS2int1Enhの変異が内在性のALAS2遺伝子の発現の制御に重要な役割を果たすことが明らかとなった。しかしながら、分化誘導なしにはこれらの細胞ではミトコンドリアへの鉄の沈着も明らかではなかった。一方、それぞれの細胞を分化誘導したところ、K562細胞では明らかではなかったが、ALAS2int1Enhに欠失変異を有するHuDEP2細胞で

のみ、環状鉄芽球と類似した鉄の沈着が細胞質で観察された。HuDEP2細胞でのみ観察されてK562細胞では観察されなかった理由は明らかではないが、K562細胞では様々な分化誘導によってヘモグロビン合成は増加しても脱核することが無いのに対し、HuDEP2細胞では脱核するまで分化しうることが大きく影響するのではないかと推察している。すなわち、環状鉄芽球はある特定の分化段階の赤芽球でのみ観察され、K562細胞は既にその分化段階を経過してしまっているか、あるいは分化誘導によってもその分化段階に到達しない可能性が高いのではないかと推察している。遺伝性鉄芽球性貧血患者の骨髄においても、全ての赤芽球で鉄顆粒の沈着が観察される訳ではないことも、この推察を裏付けると考えているが、詳細は不明である。今後は、HuDEP2細胞を用いて遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子として知られているALAS2以外の遺伝子、例えばSLC25A38やGLRX5、あるいはABCB7などの欠失変異体を作成し、分化誘導により環状鉄芽球が観察されるかどうかを検討する予定である。

#### E . 結論

ゲノム編集技術を用いて赤芽球系培養細胞の内在性ALAS2遺伝子の発現を低下させ、更に同細胞を分化誘導することにより、環状鉄芽球と同様の表現型を呈する細胞を樹立した。この細胞は遺伝性鉄芽球性貧血のモデル細胞として利用可能である可能性が高い。このような方法は、遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子の候補として新たに同定された遺伝子が、実際に原因遺伝子として矛盾しないかどうかを明らかにするために有用であると予想される。

#### F . 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kubota Y, Nomura K, Katoh Y, Yamashita R, Kaneko K, Furuyama K. Novel Mechanisms for Heme-dependent Degradation of ALAS1 Protein as a Component of Negative Feedback Regulation of Heme Biosynthesis. *J Biol Chem*. 2016;291(39):20516-29. doi: 10.1074/jbc.M116.719161. Epub 2016 Aug 5. PubMed PMID: 27496948.

- 2) Mu A, Li M, Tanaka M, Adachi Y, Tai TT, Liem PH, Izawa S, Furuyama K, Taketani S. Enhancements of the production of bilirubin and the expression of  $\beta$ -globin by carbon monoxide during erythroid differentiation. **FEBS Lett.** 2016 May;590(10):1447-54. doi: 10.1002/1873-3468.12178. Epub 2016 May 18. PubMed PMID:27087140.

2. 学会発表

- 1) 久保田美子, 野村和美, 蝦名真行, 金子桐子, 加藤恭丈, 古山和道. 非特異的5-アミノレブリン酸合成酵素(ALAS1)のCLPXPによる翻訳後修飾. **第89回日本生化学会大会** (2016年9月, 仙台).
- 2) 野村和美, 久保田美子, 金子桐子, 蝦名真行, 古山和道. ヒトCLPX-CLPP複合体によるミトコンドリアマトリクスのタンパク質品質管理機構の解明. **第89回日本生化学会大会** (2016年9月, 仙台).

G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし