

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の確定診断のための補助的ツールの開発

研究分担者 古山和道（岩手医科大学医学部生化学講座分子医化学分野 教授）

研究要旨： 次世代シーケンサーにより、遺伝性鉄芽球性貧血においても新たな原因遺伝子が次々に報告されている。しかしながら、それらの遺伝子変異が疾患の原因かどうかを明らかにする方法は確立されていない。本研究では、ゲノム編集技術を用いて遺伝子変異を培養細胞に導入することにより、疾患特有の表現型を *in vitro* で確認しうることを明らかにした。この結果は、本手法が遺伝性鉄芽球性貧血の確定診断に有用である可能性を示唆している。

A．研究目的

次世代シーケンサーの性能向上に伴い、今まで原因不明とされていた症例においてもさまざまな遺伝子に変異が同定され、報告されている。しかしながら、新たに同定された遺伝子変異が疾患の原因となるのかどうかについて明らかにする方法は確立されていない。本研究では比較的簡便に確定診断に至る方法として、ゲノム編集技術を利用して培養細胞に遺伝子変異を導入し、それにより、疾患特異的な表現型が観察されるかどうかの検討を行った。

B．研究方法

非腫瘍性の赤芽球系培養細胞であるHUDEP2細胞にCRISPR/Cas9システムを用いて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領域に欠失変異の挿入を試みた。同エンハンサーには赤芽球特異的な転写因子であるGATA1の結合配列が存在し、赤芽球分化の制御の中心を担うことが知られている。また、複数の遺伝性鉄芽球性貧血患者で同部に変異が同定されている。この部分に変異を挿入するためのプラスミドを導入し、限界希釈法を用いてクローン化した後、当該GATA結合配列に欠失変異が挿入されていることを確認した。その変異は、遺伝性鉄芽球性貧血患者で同定され、既に報告されている変異と同様に、GATA結合配列にGATA1転写因子が結合し得なくなるような変異であった。このようにしてクローン化したALAS2遺伝子に変異

を有する細胞（変異型細胞）と、変異を導入前の野生型細胞とを赤血球に分化誘導した後、鉄染色を実施して評価した。

（倫理面への配慮）

本研究においては倫理面への配慮が必要な個人情報等は取り扱っていない。

C．研究結果

変異型細胞は、赤血球への分化誘導前からヘモグロビン合成能が低下していることが、その細胞沈殿の色合いから推定できたが、分化を誘導した後も野生型と比較してヘモグロビン合成能が低下していることが推察された。また、分化後のそれぞれの細胞を用いてヘモグロビン染色を行ったところ、野生型と比較して変異型細胞ではヘモグロビン量が減少していた。さらに、分化誘導前後の細胞を用いて鉄染色を行ったところ、分化誘導前にはどちらの細胞でも鉄芽球性貧血に特徴的な環状鉄芽球は観察されなかった。一方、変異型細胞では、分化誘導後に多数の環状鉄芽球が観察されたが、野生型細胞ではそのような細胞はほとんど認めなかった。

D．考察

次世代シーケンサーを用いたExome解析やWhole genome解析により、様々な疾患で新たな原因遺伝子の同定が報告され、また、既知の原因遺伝子でも新

たな変異が報告される機会が増えている。家系の連鎖解析などにより、疾患との関連が判断されることが多いが、それらの遺伝子変異が実際に疾患の原因となっているのかどうかを明らかにすることは容易ではない。組換えタンパク質を用いて遺伝子変異によるタンパク質機能の低下を直接的に証明したり、モデル動物を用いて証明する試みが行われているが、いずれもそれぞれの研究を専門とする施設以外では、実施することが困難である場合が少なくない。鉄芽球性貧血の場合も、原因遺伝子は大きく分けて、ヘム合成系、鉄-硫黄クラスター合成系、電子伝達系に関わる分子、の3つに分類できると報告されているが、それぞれ合理的な推定は可能であっても実際に遺伝子変異の結果としての環状鉄芽球を実験的に観察し得た例は多くない。本研究では、近年ゲノム編集技術として多用されているCRISPR/Cas9システムを用いて遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子としてよく知られたALAS2遺伝子に機能欠失型変異を挿入し、in vitroで環状鉄芽球の形成を再現することができた。特別な装置などは用いておらず、どの研究室でも実施可能であり、鉄染色も市販の染色キットが利用可能である。従って、適切な培養細胞さえ入手可能であれば、鉄芽球性貧血に限らず、様々な遺伝性疾患の診断手技として応用可能である。一方、この方法により目的の遺伝子に欠失変異（frame-shift変異）を導入することは比較的容易だが、特定のミスセンス変異を導入することにはまだ困難を伴うため、ミスセンス変異により発症するような疾患については、目的のミスセンス変異を導入する方法については今後のさらなる検討が必要である。

E . 結論

培養細胞とゲノム編集技術を利用して、特殊な装置を用いることなく遺伝性鉄芽球性貧血の疾患モデル細胞を樹立することができた。同様の手法を用いることにより、新たに同定された原因遺伝子が鉄芽球性貧血の原因となりうるかどうかを明らかにできる可能性が示唆された。また、他の遺伝性疾患の確定診断にも応用可能なシステムであると考えられる。

F . 研究発表

1. 論文発表

1) Kaneko K, Kubota Y, Nomura K, Hayashimoto H, Chida T, Yoshino N, Wayama M, Ogasawara K, Nakamura Y, Tooyama I, and Furuyama K. Establishment of a cell model of X-linked sideroblastic anemia using genome editing. **Exp Hematol**. 2018;65:57-68.e2. doi: 10.1016/j.exphem.2018.06.002. PMID: 29908199.

2. 学会発表

- 1) 金子桐子, 久保田美子, 野村和美, 林本遥, 千田大誠, 吉野直人, 和山真里奈, 小笠原勝利, 中村幸雄, 遠山育夫, 古山和道. ALAS2 変異による鉄芽球性貧血のモデル細胞構築. **第 682 回 岩手医学会例会**(平成 30 年 4 月 27 日, 盛岡).
- 2) 金子桐子, 林本遥, 千田大誠, 久保田美子, 野村和美, 小笠原勝利, 和山真里奈, 吉野直人, 中村幸夫, 遠山育夫, 博多修子, 古山和道. 遺伝性鉄芽球性貧血モデル細胞の樹立. **日本生化学会東北支部第 84 回例会シンポジウム**(平成 30 年 5 月 19 日, 盛岡).
- 3) 久保田美子, 草壁香帆里, 久慈強, 金子桐子, 野村和美, 博多修子, 古山和道. ヘム合成経路の律速酵素 ALAS1 の分解経路の抑制によるゲノム不安定性の誘導. **日本生化学会東北支部第 84 回例会シンポジウム**(平成 30 年 5 月 19 日, 盛岡).

G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし