

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遺伝子診断

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： 遺伝性鉄芽球性貧血は稀な遺伝性貧血症であるが、近年の次世代シーケンサーの性能向上に伴い、エクソームシーケンスが比較的容易に実施されるようになり、多数の新たな原因遺伝子が報告されている。しかしながら、網羅的な遺伝子変異の解析を実施しても原因遺伝子が同定されない患者も少なくない。今後はこれらの患者における原因遺伝子を同定するための方策を考える必要があると思われる。

A．研究目的

遺伝性鉄芽球性貧血の診断基準を確定し、さまざま果等を参照して重症度を分類し、それに基づいて治療法を決定するための診療ガイドラインを確立することが本研究の目的である。このうち、当分担研究者の主な役割は、遺伝性疾患の診断基準を確定するための原因遺伝子の同定である。実際、エクソームシーケンスにより、知られている全てのタンパク質をコードする遺伝子のエクソン部分の変異の有無が明らかにされるようになり、その結果、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、そのような網羅的な遺伝子解析の方法を用いても未だに原因遺伝子が明らかにならない患者も少なくない。そのような患者ではさらなる解析手段として whole genome sequencing (WGS) による遺伝子解析が想定されるが、これにより網羅的で膨大な情報が得られるものの、その中から疾患の原因となる変異を同定するのは容易ではない。多数の患者を含む家系において解析することが可能な場合には連鎖解析により責任領域を絞り込むことも可能であるが、本疾患の患者数が少ないことや、核家族化の進展に伴う家系内の親族患者についての情報不足などにより、そのような手法の適用は困難な状況となりつつある。一方、既知の原因遺伝子の転写に重要な役割を果たす転写調節領域が存在することが明らか場合には、当該領域における遺伝子変異の有無を明らかにすることを優先させることにより、効率よく原因遺伝子を明らかにできるのではないかと考えた。

B．研究方法

本研究分担者が分担している疾患は遺伝性鉄芽球性貧血である。特に、X染色体連鎖鉄芽球性貧血（XLSA）の原因遺伝子は赤芽球のみで発現する赤芽球特異的5-アミノレブリン酸合成酵素遺伝子（ALAS2）であることが明らかなので、まず、ALAS2の赤芽球特異的転写調節を同定し、次に同領域における遺伝子変異の有無をエクソーム解析によっても原因遺伝子が同定されない男性患者で明らかにし、さらに疾患モデル細胞を用いて、患者で同定された遺伝子発現調節領域の変異により環状鉄芽球が観察されるか否かを確認した。

（倫理面への配慮）

本研究計画は、主たる実施施設である東北大学医学部、および岩手医科大学医学部の倫理委員会の審査を受けて承認された後に、患者およびその家族の個人情報の保護等につき十分に配慮して実施された。

C．研究結果

まず、ALAS2遺伝子の赤芽球特異的転写調節領域の同定を試みた。GATA1転写因子はさまざまな遺伝子の赤芽球特異的転写調節に深く関与することが知られている。GATA1に対する抗体を用いたクロマチン免疫沈降法（ChIP法）によりGATA1転写因子が結合している赤芽球系培養細胞（K562細胞）の遺伝子断片を濃縮し、次世代シーケンサーにより解析した結果が既に報告されていた（Fujiwara et al., 2009, PMID 2784893）が、標

的遺伝子のリストの中にALAS2遺伝子も含まれていた。ALAS2遺伝子におけるGATA1の結合部位について詳細に検討したところ、ChIP法でGATA1が結合しているとされた領域はALAS2遺伝子の第1イントロンの中程に存在し、今までALAS2の遺伝子発現調節領域としては未報告の領域であった。このため、赤芽球系培養細胞を用いてChIP法により同領域に特異的にGATA1が結合することを確認し、さらにプロモーターアッセイ法により当該部位がALAS2遺伝子における赤芽球特異的なエンハンサー(ALAS2int1Enh)として機能することを明らかにした。また、エクソーム解析によっても原因遺伝子が同定できなかった遺伝性鉄芽球性貧血患者のALAS2遺伝子について同領域の変異の有無を検索したところ、3家系5人の男性患者で変異を同定し、さらに、いずれの変異によってもGATA1が同部に結合できなくなることを確認した。これらの結果から、原因遺伝子として既知であるALAS2遺伝子の組織特異的発現調節領域の変異が、遺伝性鉄芽球性貧血発症の原因となる可能性が高いことが示された。

さらに、同領域の変異が貧血、および鉄芽球性貧血の代表的な表現型である環状鉄芽球の出現に直接関与するか否かを明らかにするために、疾患モデル細胞の樹立を試みた。モデル細胞の樹立のために赤白血病細胞由来のK562細胞のALAS2int1EnhにGATA1が結合できない欠失変異を導入したところヘモグロビン合成能の低下は確認できたが、環状鉄芽球は観察されなかった。

次に、非腫瘍細胞由来の赤芽球系培養細胞株であるHUDEP2細胞株を用いて同様の検討を実施したところ、ヘモグロビン合成能の低下が観察されたのに加えて、変異を導入した細胞では環状鉄芽球が再現性良く観察されることが明らかになった。

D . 考察

既知の原因遺伝子の組織特異的なエンハンサー領域を同定し、次いで同領域における変異の有無を明らかにすることにより、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かった遺伝性鉄芽球性貧血の症例において、原因遺伝子の候補を同定することが可能であった。遺伝性鉄芽球性貧血患者におけるALAS2int1Enhの中のGATA1結合領域の変異については海外のグループからも報告されており、自検例も含めこれらの患者では同領域の

変異が原因である可能性は極めて高いと考えられる。さらに、疾患モデル細胞を樹立して環状鉄芽球の形成をin vitroで確認することができたことも、同領域の変異が疾患の原因として重要であることを示唆している。このような結果から、エクソーム解析によっても原因遺伝子が同定できない患者については、本研究で試みた手法の適用についても検討の対象になるものと考えられる。

また、HUDEP2細胞とゲノム編集法を組み合わせた疾患モデル細胞の樹立は、ALAS2遺伝子のみならず、鉄芽球性貧血の原因遺伝子として知られる他の遺伝子の未知の変異や、エクソーム解析等により同定された新たな遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子が、疾患の原因となりうるかどうかを明らかにするためにも有用であると予想されるため、遺伝性鉄芽球性貧血における確定診断に至るためのツールとしても利用可能であると考えられる。

E . 結論

エクソーム解析によっても原因遺伝子が同定できない遺伝性鉄芽球性貧血患者において、原因遺伝子を明らかにする方法を検討した。その結果、既知の原因遺伝子の赤芽球特異的エンハンサーを同定し、さらに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同領域に変異を同定した。加えて、培養細胞株とゲノム編集法を用いて疾患モデル細胞を樹立することに成功し、確定診断に至るための方法の一つを示すことができた。

F . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Furuyama K, and Kaneko K. Iron metabolism in erythroid cells and patients with congenital sideroblastic anemia. *Int J Hematol.* 2018;107:44-54.
- 2) 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.
- 3) Fujiwara T, Fukuhara N, Ichikawa ., Kobayashi M, Okitsu Y, Onishi Y,

Furuyama K and Harigae H. A novel heterozygous ALAS2 mutation in a female with macrocytic sideroblastic anemia resembling myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts: a case report and literature review. **Ann Hematol.** 2017;96:1955-1957.

- 4) Kaneko K, Ohba K, Hirose T, Totsune K, Furuyama K and Takahashi K. (2017) Expression of (Pro)renin Receptor During Rapamycin-Induced Erythropoiesis in K562 Erythroleukemia Cells and Its Possible Dual Actions on Erythropoiesis. **Tohoku J Exp Med.** 2017;241:35-43.
- 5) 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;291:20516-20529.
- 6) 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 β -globin by carbon monoxide during erythroid differentiation. **FEBS Lett.** 2016;590:1447-1454.

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).

- 4) 久保田美子, 久慈強, 古山和道. ヘム合成経路の律速酵素 ALAS1 の分解経路の低下によるゲノム不安定性の誘導. **2017 年度生命科学系学会合同年次大会** (2017 年 12 月 6-9 日, 神戸).
- 5) 金子桐子, 千田大誠, 久保田美子, 野村和美, 古山和道. ALAS2 変異による遺伝性鉄芽球性貧血のモデル細胞樹立. **2017 年度生命科学系学会合同年次大会** (2017 年 12 月 6-9 日, 神戸).
- 6) 野村和美, 北川悠, 大木祐亮, 久保田美子, 金子桐子, 古山和道. ヒト CLPX-CLPP 複合体によるヘム結合型 ALAS1 の認識及び分解メカニズムの解明. **2017 年度生命科学系学会合同年次大会** (2017 年 12 月 6-9 日, 神戸).
- 7) 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).
- 8) 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