

先天性骨髄不全症の登録システムの構築と診断基準・重症度分類・診断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原因遺伝子の妥当性についての検討

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：遺伝性鉄芽球性貧血の家系の解析により、遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子として、さまざまな遺伝子の変異が報告されている。しかしながら、当該遺伝子の欠失変異と鉄芽球性貧血の表現型との関連はほとんど明らかにされていない。本研究は、遺伝子診断の一環として、候補遺伝子の欠失が鉄芽球性貧血の表現型と直接関連するか否かを明らかにすることを目的に実施した。これにより当該遺伝子を遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子とすることが適切かどうかを明らかにすることが可能になると期待される。

A．研究目的

遺伝性鉄芽球性貧血は特定の遺伝子の変異により発症する遺伝性の貧血で、骨髄における環状鉄芽球の出現を特徴とする。現在まで、ALAS2, SLC25A38, GLRX5, ABCB7, PUS1などさまざまな遺伝子が家系内での検索等をもとに原因遺伝子として報告されているが、実際に当該遺伝子の変異が環状鉄芽球の原因であることを明らかにし得た例は多くない。実際に、特定の遺伝子の変異により環状鉄芽球が出現するかどうかについての検討が遺伝子診断の結果を解釈する上では重要である。したがって、本研究では培養細胞を用いて原因遺伝子とされている遺伝子の欠失細胞を作成し、環状鉄芽球が観察されるか否かを明らかにすることにより、当該遺伝子を遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子とすることの妥当性を検証することを目的とした。

B．研究方法

慢性骨髄性白血病由来の赤芽球系培養細胞株であるK562細胞と、臍帯血幹細胞由来の非腫瘍性赤芽球系培養細胞株であるHUDEP2細胞を用いて、遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子とされる遺伝子に欠失変異をゲノム編集の手技の一つであるCRISPR/Cas9法を用いて挿入した。Western blot法やリアルタイムPCR法、遺伝子配列の確認などにより当該遺伝子の発現低下や欠失を確認した後に、赤血球への分化を誘導し、分化誘導の前後で鉄染色によ

り環状鉄芽球が観察されるかどうかを確認した。
（倫理面への配慮）

本研究は公に入手可能な情報と試料を用いて実施しており、個人情報などの取り扱いに倫理的配慮を必要とする研究は含まない。

C．研究結果

我々は、まず本邦で原因遺伝子として報告されることが最も多いALAS2遺伝子に着目し、赤芽球系培養細胞のALAS2遺伝子の第一イントロンに存在する赤芽球特異的エンハンサーを欠失させることによりALAS2遺伝子の発現を抑制し、環状鉄芽球が観察されるか観察した。ALAS2遺伝子はX染色体上に存在するため、ALAS2遺伝子の変異による鉄芽球性貧血は伴性劣性遺伝の遺伝形式をとるX染色体連鎖鉄芽球性貧血(XLSA)として知られている。K562細胞は慢性骨髄性白血病の女性由来の培養細胞で、特定の試薬を培養液に添加することにより分化の誘導が可能で、その際、ヘモグロビン合成が刺激されることが知られている。まず、CRISPR/Cas9システムを用いてX染色体の両方のアレルの第一イントロンのエンハンサー部位に変異が導入されたクローン[K562(ALAS2^{low})細胞]を選択し、さらなる解析を行った。その結果、K562(ALAS2^{low})細胞は野生型細胞に比べてALAS2 mRNAの発現量が低く、ヘモグロビン合成能も低下していた。また、その差は分化誘導後にも認められたが、K562細胞

は脱核するまで分化することはなく、また野生型、変異型、分化誘導前後のいずれの細胞においても環状鉄芽球は観察されなかった。

次に、非腫瘍性の赤芽球系培養細胞株で臍帯血幹細胞に由来するHUDEP2細胞を用いて同様の検討を行った。HUDEP2細胞も女性由来の細胞であるためX染色体の両方のアレルに変異が挿入されなければ表現型が観察されない可能性が高い。CRISPER/Cas9システムを用いてALAS2遺伝子の第一イントロンのエンハンサー部位に変異を導入し、両方のアレルに変異が導入されているクローン [HUDEP2(ALAS2^{low})細胞] を選択した。HUDEP2 (ALAS2^{low}) 細胞では野生型細胞に比べてALAS2mRNAの発現量が低下し、ヘモグロビン合成能も低下していることを確認した。HUDEP2 (ALAS2^{low}) 細胞を分化誘導すると野生型細胞と同様に一部の細胞は脱核するまで分化が進み、さらに分化誘導後のHUDEP2 (ALAS2^{low}) 細胞では環状鉄芽球が多数観察された。これらの結果から、ALAS2遺伝子の発現低下が遺伝性鉄芽球性貧血の直接の発症原因となることは明らかであると思われる。

遺伝性鉄芽球性貧血は、症状が貧血のみが中心の非症候性遺伝性鉄芽球性貧血と、さまざまな貧血以外の全身性の症状を伴う症候性遺伝性鉄芽球性貧血とに分類されるが、XLSAと同じく非症候性遺伝性鉄芽球性貧血で、常染色体劣性遺伝の遺伝形式をとるものの原因遺伝子として報告されているSLC25A38 および GLRX5 遺伝子についてもCRISPR/Cas9システムを用いて欠失変異の挿入を試みた。その結果、どちらの遺伝子についても欠失変異を導入することが可能であったが、欠失の詳細と表現系、そしてそれぞれの関連については現在解析を続けているところである。

D . 考察

上記の結果により、同様の遺伝子変異を導入した場合でも、白血病由来の培養細胞株であるK562細胞と、非腫瘍性培養細胞であるHUDEP2細胞ではその表現型は明らかに異なっており、K562細胞では観察できなかった環状鉄芽球が、HUDEP2細胞では観察が可能であった。この差が何に由来するのかに

ついては不明なままであるが、腫瘍性培養細胞株では分化誘導をした状態でも増殖能はあまり低下せず、生理的な分化状態とは大きく異なるものと考えられた。それに比較してHUDEP2細胞では分化に伴い増殖能が極端に低下しており、赤芽球の生理的な分化に近いような印象であった。これらの点が表現型の違いに与える影響は大きいように思われる。今回はHUDEP2細胞を用いてXLSAの疾患モデル細胞を樹立することができたが、患者由来のiPS細胞を用いて疾患モデル細胞を樹立する試みもさまざまな疾患で進められている。しかしながら、そのような方法で疾患モデル細胞を樹立するには時間的および経済的な問題を解決する必要がある。その点を考慮すると非腫瘍性の培養細胞を用いた疾患モデル細胞の樹立はより現実的な選択肢の一つであると思われる。

また、少なくともXLSAにおいてはALAS2遺伝子の発現量の低下が、環状鉄芽球形成の直接的な原因となりうること、そして環状鉄芽球は分化の過程で出現することが明らかになった。さらに、今回の研究結果はALAS2遺伝子のコード領域のみならず、遺伝子発現調節領域における変異も疾患の原因となることを示している。したがって、XLSAを疑う患者では、ALAS2遺伝子のエクソン領域のみならず、第一イントロンの赤芽球特異的エンハンサー領域についても塩基配列を確認する必要があると思われる。遺伝性鉄芽球性貧血が疑われる患者家系の症例でも、エクソーム解析で候補となる原因遺伝子のコード領域には変異を認めず、さらに他の遺伝子のコード領域にも原因となりそうな変異が同定されない例が少なくない。そのような場合には、既に原因として知られる遺伝子の発現調節領域における遺伝子変異の有無を解析するというようなアプローチも必要と思われる。遺伝性鉄芽球性貧血に限らず、その他の遺伝性疾患においても、エクソーム解析により原因遺伝子が同定できない場合には、それぞれの疾患の原因候補遺伝子の特異的な発現調節領域(プロモーター、エンハンサー領域)を同定することにより、原因遺伝子が明らかにできる可能性があると思われる。

最後に、その他の原因遺伝子として報告されている遺伝子についても、同様の方法により環状鉄芽球

が同定できれば、原因遺伝子であることが確実と考えられるので、今後さらに検討を重ねていきたいと考えている。しかしながら、完全な欠失変異ではなくミスセンス変異しか同定されていない原因遺伝子の場合には、完全な欠失が細胞レベルでの致死の表現型を呈する可能性を考慮する必要もあると考えられるため、単純な欠失のみでは疾患モデル細胞の樹立は困難になると思われる。そのような場合、ミスセンス変異を効率よく導入する方法の確立など、さらなる主義の検討も必要である。

E . 結論

X染色体連鎖鉄芽球性貧血のモデル細胞を樹立したことにより、ALAS2遺伝子の変異が環状鉄芽球の形成に直接寄与することを明らかにした。他の候補遺伝子においても同様の手技を用いることにより、今後の遺伝性鉄芽球性貧血の遺伝子診断に際して、結果の妥当性を担保することが可能になると考えられる。

F . 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
 - 1) 久保田美子, 金子桐子, 鈴木亘, Kamata Costantine Chasama, 古山和道. ミトコンドリア内へム依存的ALAS1分解の調節機構. 第92回日本生化学大会(2019年9月18-20日, 横浜).

G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし