

令和 2 年 5 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05079

研究課題名(和文) ABO式血液型遺伝子転写調節機構解明と法医学および医療への応用

研究課題名(英文) Complete elucidation of Transcriptional regulation of ABO gene

研究代表者

佐野 利恵 (Rie, Sano)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70455955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：ABO遺伝子の転写調節機構の完全解明を図るため、クロマチン構造変化によるABO遺伝子転写調節の研究を行った。ABO遺伝子のCRISPR/Casシステムを用い、血球細胞、上皮細胞においてインシュレーターやエンハンサーを欠失させた細胞株を作製し、RNAシーケンス法およびリアルタイムPCRで遺伝子発現を調べた。胃癌細胞KATOIII細胞を用いた上皮細胞エンハンサー欠失細胞においてABO遺伝子の転写が低下し、ABO遺伝子下流に存在するOBP2B遺伝子の発現が約1/10に低下した。以上から、ABO遺伝子はエンハンサーの共有、染色体の高次構造を介し遺伝子の発現調節を受けることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ABO式血液型は輸血医療および個人識別の重要な指標であることは周知の事実であるが、「ABO遺伝子は何のためにあるのか？」という問いは未だ解明されていない。本研究成果から、ABO遺伝子の下流に存在するOBP2B遺伝子はエンハンサーを共有しており、ABO遺伝子は、他の遺伝子発現を活性化するために存在する『利他的な遺伝子』と考えられる。また、ABO遺伝子とその類縁遺伝子はヒトにかぎらず、脊椎動物などに幅広く存在することから、生命に重要な何らかの機能にABO遺伝子座が関与していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the transcriptional regulation of the ABO gene, we generated hematopoietic or epithelial cell-specific enhancer region deletion cell lines using the CRISPR/Cas system. These cells were used for RNA sequencing and real-time PCR to determine which genes were down-regulated compared to the wild type. The epithelial cell-specific enhancer region deletion cell line using KATOIII gastric cancer cells showed decreased expression of the ABO gene and the OBP2B gene, which is downstream of the ABO gene. These results indicate that the ABO gene is transcriptionally regulated, including sharing of enhancers and regulation of gene expression via higher order structure of chromosomes.

研究分野：法医学 人類遺伝学

キーワード：ABO式血液型 ABO遺伝子 遺伝学 転写調節

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ABO 式血液型は法医学分野においては個人識別に重要な指標として利用され、輸血医療においても必須の検査項目であることは周知の事実である。しかしながら、オモテ・ウラ試験不一致の最も多い原因である ABO 亜型 (遺伝的に血液型抗原の発現が弱い型) のメカニズムはこれまで完全に明らかにされていなかった。移植医療では、血液型不適合移植における拒絶反応が問題とされている。更に、ABO 式血液型に関連する疾患として、静脈血栓症、冠動脈疾患等の重症度等が明らかにされている (Senthil K, et al. ABO Blood Group and Risk of Thromboembolic and Arterial Disease: A Study of 1.5 Million Blood Donors. *Circulation*, 2016)。特に、静脈血栓症に関しては、我々の経験した肺動脈血栓症の解剖例 8 例に O 型はおらず、血液型と発症のリスクの関係を支持するものであった。つまり、これまでの報告や自験例は A/B 抗原の存在が移植医療や疾患発症のリスクと成り得ることを示唆するものであり、翻すと A/B 抗原を減少させることでこれらの問題を改善できると考えられる。つまり、ABO 式血液型に関連する研究は、法医学や輸血医療のみならず、医療の幅広い分野において潜在的な有益性を持っている。研究代表者は、これまで ABO 遺伝子の発現制御機構の研究を行い、転写開始に関与するプロモーター、第 1 イントロン内で翻訳開始点の下流 5.8-kb (+5.8-kb site)、および遺伝子 3' 側で遺伝子の下流 2.6-kb (+22.6-kb site) にエンハンサー (転写活性化領域) を同定し、これまで ABO 遺伝子の発現制御機構の研究を行い、転写開始に関与するプロモーター、第 1 イントロン内で翻訳開始点の下流 5.8-kb (+5.8-kb site)、および遺伝子 3' 側で遺伝子の下流 2.6-kb (+22.6-kb site) にエンハンサー (転写活性化領域) を同定した (図 1)。

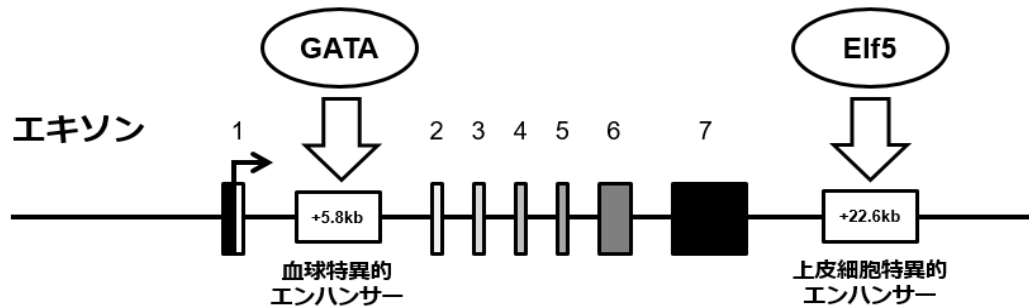


図 1. ABO 式血液型遺伝子のゲノム構造と転写調節領域.

A 遺伝子は A 抗原を合成する糖転移酵素をコードする。O 遺伝子 (001) は A 遺伝子の第 6 エキソンに G の一塩基欠失 (c.261Gdel) からフレームシフトおよび終止コドンが生じ、糖転移酵素活性を有しない蛋白の合成に至る。遺伝子第 1 イントロン内 (+5.8-kb site) に血球細胞エンハンサー、**遺伝子下流 (+22.6-kb site) に上皮細胞エンハンサーがある。**

2. 研究の目的

クロマチン構造変化による ABO 遺伝子転写調節の研究を行い、ABO 遺伝子の転写調節機構の完全解明を図る。これらの研究成果により完全な ABO 遺伝子診断の実現、薬剤による ABO 遺伝子の転写抑制から血液型抗原の減少を図り、安全な血液型不適合臓器移植や血栓症予防等を介して、医療全般に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

ABO 遺伝子発現に係るトポロジカル関連ドメイン (TAD) を明らかにするために、血球系および上皮系細胞において、+36.0-kb site およびプロモーターに CTCF が結合することを証明する。さらに CTCF ノックダウン細胞および CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集により +36.0-kb site およびプロモーター等の領域を欠失させることにより TAD 形成阻害を起こし、クロマチン構造、転写調節エレメントにおけるヒストン修飾、ABO 遺伝子発現、血液型抗原発現等の変化を調べる。また、これらの研究成果をもとに、血液型亜型において当該領域の遺伝子解析や、薬剤添加による ABO 遺伝子発現減少の機序を明らかにし、適切な投与法を検討する。

4. 研究成果

真核生物のゲノムには、トポロジカル関連ドメイン (TAD) と呼ばれる三次元構造が存在し、このドメイン内では配列上離れたプロモーターやエンハンサーであっても、近接して相互作用

し、遺伝子発現が制御されることや、TADの境界にCCCTC結合因子(CTCF)が結合することが報告されている。ABO遺伝子下流16.0-kbには、インシュレーターとして機能すると考えられるABO遺伝子発現に係るトポロジカル関連ドメイン(TAD)を明らかにするために、血球系および上皮系細胞において、+36.0-kb site およびプロモーターにCTCFが結合することを証明した。KATOIII、K562細胞等において、shRNAを用いて転写因子CTCFの発現をノックダウンした。ノックダウン細胞とコントロール細胞について、ABO遺伝子発現の変化をqRT-PCRで調べ、ABO遺伝子発現が増加することを確認した。

また、CRISPR/Cas9システムを用いたゲノム編集によりK562細胞およびKATOIII細胞において+36.0-kb siteを欠失させ、想定されるTAD構造の形成を阻害した。これらの細胞と野生型の細胞において、ABO遺伝子発現の変化をqRT-PCRおよびRNA-seqで、血液型抗原発現の変化をFCMで調べたところ、ABO遺伝子および周辺の遺伝子発現が大きく変化したことから、+36.0-kb siteはABO遺伝子とその周囲の遺伝子発現に大きな影響を与えていることが分かった

また、トポロジカル関連ドメインと関係して、一つの転写活性化領域(エンハンサー)を複数の遺伝子が共有して共同して転写調節がなされることが知られてきた。ABO遺伝子のエンハンサーにおいても同様の機序が存在すると考えられたことから、エンハンサー欠失細胞を作製し、ABO周辺の遺伝子の発現変化について調べてみることにした。その結果、隣接する遺伝子以外にもやや遠くの遺伝子座においても遺伝子発現の変化が見られるものがあった。これはゲノムアノテーションデータによるGENEHANCERが示すデータに矛盾しないものであった。これらの実験結果から考察すると、一つの小さなTAD内における転写調節だけでなく、複数のTADが近接して転写調節を受け、小さなTADを内包する、より大きなTADによる転写調節が関与している可能性が考えられた。ABO遺伝子と周囲の遺伝子の転写調節機構について明らかに関係する遺伝子座には、生理活性と関係する遺伝子も含まれていることから、これらの知見はABO遺伝子の存在意義に係わる重要な結果であると考えられた。そこでwCRISPR/Casシステムを用い、血球細胞、上皮細胞エンハンサー欠失細胞株を作製し、野生型と比較してどのような遺伝子の発現減少が見られるかをRNAシーケンス法およびリアルタイムPCRで調べた。その結果、胃癌細胞KATOIII細胞を用いた上皮細胞エンハンサー欠失細胞においてABO遺伝子の転写が低下し、さらにABO遺伝子下流に存在するOBP2B遺伝子の発現が約1/10に低下した。以上から、ABO遺伝子はエンハンサーの共有、染色体の高次構造を介した遺伝子の発現制御等の転写調節機構を受けていることがわかった。

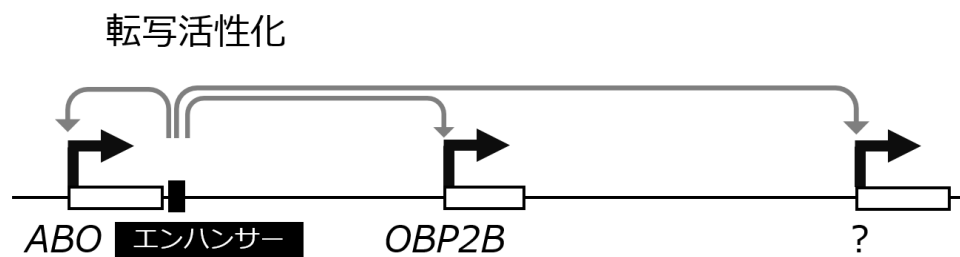


図2. ABO遺伝子は他の遺伝子の転写を促進するための「利他的な遺伝子」である。その根幹をなすのは、エンハンサーの共有である。

一方、白血病における血液型変換の原因について、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析とインビトロ実験から、転写因子RUNX1の体細胞変異が原因である事を明らかにした。これらのABO遺伝子の転写調節研究の成果は法医学および輸血医療をはじめとする臨床上の諸問題の解決に寄与するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kominato Yoshihiko, Sano Rie, Takahashi Yoichiro, Hayakawa Akira, Ogasawara Kenichi	4. 巻 60
2. 論文標題 Human ABO gene transcriptional regulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transfusion	6. 最初と最後の頁 860 ~ 869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/trf.15760	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hayakawa Akira, Sano Rie, Takahashi Yoichiro, Kubo Rieko, Harada Megumi, Omata Masato, Yokohama Akihiko, Handa Hiroshi, Tsukada Junichi, Takeshita Haruo, Tsuneyama Hatsue, Ogasawara Kenichi, Kominato Yoshihiko	4. 巻 60
2. 論文標題 RUNX1 mutation in a patient with myelodysplastic syndrome and decreased erythrocyte expression of blood group A antigen	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transfusion	6. 最初と最後の頁 184 ~ 196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/trf.15628	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yokobori Takehiko, Yazawa Shin, Asao Takayuki, Nakazawa Nobuhiro, Mogi Akira, Sano Rie, Kuwano Hiroyuki, Kaira Kyoichi, Shirabe Ken	4. 巻 9
2. 論文標題 Fucosylated 1-acid glycoprotein as a biomarker to predict prognosis following tumor immunotherapy of patients with lung cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14503-14503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-51021-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takei H, Sano R, Takahashi Y, Takahashi K, Kominato Y, Tokue H, Shimada T, Awata S, Hirasawa S, Ohta N.	4. 巻 30
2. 論文標題 Usefulness of coronary postmortem computed tomography angiography to detect lesions in the coronary artery and myocardium in cases of sudden death.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Leg Med.	6. 最初と最後の頁 46-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.legalmed.2017.11.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sano R, Takahashi Y, Hayakawa A, Murayama M, Kubo R, Hirasawa S, Tokue H, Shimada T, Awata S, Takei H, Yuasa M, Uetake S, Akuzawa H, Kominato Y.	4. 巻 32
2. 論文標題 Use of postmortem computed tomography to retrieve small metal fragments derived from a weapon in the bodies of victims in two homicide cases.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Leg Med.	6. 最初と最後の頁 87-89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.legalmed.2018.03.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hayakawa A, Sano R, Takei H, Takahashi Y, Kubo R, Tokue H, Hirasawa S, Shimada T, Awata S, Yuasa M, Uetake S, Akuzawa H, Kominato Y, Tattoo image composed of radiopaque deposits demonstrated by postmortem computed tomography.	4. 巻 35
2. 論文標題 Tattoo image composed of radiopaque deposits demonstrated by postmortem computed tomography.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Leg Med.	6. 最初と最後の頁 9-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.legalmed.2018.09.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Y, Kubo R, Sano R, Nakajima T, Takahashi K, Kobayashi M, Handa H, Tsukada J, Kominato Y.	4. 巻 57
2. 論文標題 Histone deacetylase inhibitors suppress ABO transcription in vitro, leading to reduced expression of the antigens	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Transfusion	6. 最初と最後の頁 554-562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/trf.13958	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sano R, Haruki F, Takahashi Y, Takahashi K, Kubo R, Kobayashi M, Fujihara J, Takeshita H, Kominato Y.	4. 巻 27
2. 論文標題 Sequence analysis of ABO and its homologues is valid for species identification.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Transfus Med.	6. 最初と最後の頁 428-436
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tme.12455	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Sano R, Akira Hayakawa, Yoichiro Takahashi, Yoshihiko Kominato
2. 発表標題 RUNX1 mutation in a patient with MDS and decreased erythrocyte expression of blood group A antigen
3. 学会等名 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野 利恵、早川 輝、高橋 遥一郎、福田治紀、窪 理英子、小湊 慶彦
2. 発表標題 A B O式血液型判定でみられるmixed field agglutinationは血液型亜型か？それとも骨髓悪性疾患か？
3. 学会等名 人類遺伝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野利恵
2. 発表標題 ABO遺伝子の転写調節研究と血液型亜型の遺伝子解析
3. 学会等名 日本医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kaori Kimura-Kataoka, Misuzu Ueki, Toshihiro Yasuda, Reiko Iida, Junko Fujihara, Kazuo Yamada, Rie Sano, Yoshihiko Kominato, Haruo Takeshita.
2. 発表標題 Interleukin 8-251 A>T polymorphism(rs4073) in Japanese subpopulations and its correlation with smoking rates.
3. 学会等名 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine(IALM). (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Rie Sano, Rieko Kubo, Yoichiro Takahashi, Haruo Takeshita, Yoshihiko Kominato.
2. 発表標題 Reduction of CTCF binding to the ABO promoter by nucleotide substitutions found in individuals with phenotypes A3 and B3.
3. 学会等名 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine(IALM). (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Rie Sano, Yoichiro Takahashi, Kaori Kimura-Kataoka, Haruo Takeshita, Yoshihiko Kominato.
2. 発表標題 Usefulness of coronary postmortem computed tomography angiography to detect lesions in the coronary artery and myocardium in cases of sudden death..
3. 学会等名 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine(IALM). (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐野利恵, 高橋遥一郎, 伊佐和美, 常山初江, 小笠原健一, 横濱章彦, 小湊慶彦
2. 発表標題 A3, B3型におけるABO遺伝子プロモーターの一塩基置換はCTCFの結合を減弱させる.
3. 学会等名 第66回日本輸血・細胞治療学会総会. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐野利恵, 高橋遥一郎, 窪理英子, 早川輝, 藤原純子, 竹下治男, 小湊慶彦.
2. 発表標題 A3, B3型におけるABO遺伝子プロモーターの一塩基置換はCTCFの結合を減弱させる.
3. 学会等名 日本DNA多型学会第27回学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐野利恵, 中島たみ子, 高橋遥一郎, 窪理英子, 高橋圭子, 竹下治男, 小湊慶彦
2. 発表標題 . ABO遺伝子下流に存在する上皮細胞特異的エンハンサーの同定.
3. 学会等名 第101次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐野利恵, 福田治紀, 高橋遥一郎, 窪理英子, 高橋圭子, 藤原純子, 竹下治男, 小湊慶彦.
2. 発表標題 ABO式血液型遺伝子とそのパラログ, オーソログの遺伝子解析による種判別法.
3. 学会等名 第101次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐野利恵, 中島たみ子, 高橋遥一郎, 小笠原健一, 小湊慶彦.
2. 発表標題 ABO遺伝子下流に存在する上皮細胞特異的エンハンサーの同定.
3. 学会等名 第65回日本輸血・細胞治療学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐野利恵, 高橋遥一郎, 窪理英子, 高橋圭子, 竹下治男, 小湊慶彦.
2. 発表標題 ABO遺伝子下流に存在する上皮細胞特異的エンハンサーの同定.
3. 学会等名 日本DNA多型学会第26回学術集会.
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----