

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10093

研究課題名（和文）ダイヤモンド・ブラックファン貧血の発症機構の解明と新規治療標的分子の同定

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenesis of diamond-blackfan anemia and identification of novel therapeutic targets

研究代表者

土岐 力 (Toki, Tsutomu)

弘前大学・医学研究科・講師

研究者番号：50195731

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究においては、リボソーム・タンパク質遺伝子異常と、新規に発見したTP53変異による赤血球造血障害に注目することにより、遺伝性骨髄不全症のひとつであるダイヤモンド・ブラックファン貧血の発症機構について検索を試みた。発見したTP53変異は活性化型変異であり、この変異が赤芽球低形成と著しい成長障害を引き起こすことを報告した。共通のカスケードの検索については、検索中であり翻訳に関わる新規の調整メカニズムの存在する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ダイヤモンド・ブラックファン貧血は、赤血球造血のみが障害される先天性の造血不全症で、頭・顔部・上肢などに奇形がみられることがあり、発がん素因を有することも報告されている。原因はリボソームタンパク質をコードする遺伝子の変異であるが、変異が明らかなのは60%ほどで、残りの症例は原因遺伝子が不明である。本研究は、多くの症例の変異検索から新たな原因遺伝子を同定し、それを手掛かりに本疾患の発症機構を明らかにし、新たな治療法の開発の礎となる研究である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to investigate the pathogenesis of Diamond-Blackfan anemia, one of the hereditary bone marrow failures, by focusing on erythropoietic disorders caused by ribosomal protein gene mutations and a novel TP53 mutation. We reported that the TP53 mutation we found is an activating mutation that causes erythroid hypoplasia and significant growth disorders. The search for a common cascade triggered by both mutations is ongoing, and novel mechanisms to regulate translation efficiency may exist.

研究分野：血液学

キーワード：赤血球造血 ダイヤモンド・ブラックファン貧血 TP53 リボソームタンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ダイヤモンド・ブラックファン貧血(DBA)は稀な遺伝性骨髄不全症のひとつである。遺伝性の骨髄不全症は、様々な遺伝的因子の異常によって造血細胞の分化・増殖が障害されて、血球の減少をきたす疾患の総称である。責任遺伝子の機能は、造血細胞にとどまらないため、血球減少に加えて外表奇形、内臓奇形などの身体所見を伴うことが多く、DBAもこの例に漏れない。DBAの場合、奇形は、頭・顔部・上肢などにみられることが多く、全体の40%ほどの症例で報告がある。さらに、発がん素因を有することも報告されている。

DBAの概念は古く、1938年に確立していたが、原因は1999年の*RPS19*遺伝子変異の発見(文献1)まで不明であった。*RPS19*は80個あるリボソーム・タンパク(RP)遺伝子の一つである。今日までDBAには15種類のRP遺伝子の異常が発見され、DBAはリボソーム病という概念の最初の疾患になった。しかし、RP遺伝子で説明がつくのは全体の60%ほどで、残りの症例については、非常にまれな赤芽球系転写因子*GATA1*をコードする遺伝子の変異を有する症例以外、原因が不明のままである。

興味深いことに、DBAでみとめられる*GATA1*変異は、これまで我々が研究してきたダウン症関連白血病(DS-AMKL)にみとめられたものと同じく、N末端にある転写活性化領域を欠いた*GATA1s*と呼ばれる分子を発現するものであった。

DBAはリボソーム生合成の障害に由来すると考えられているが、全ての細胞に存在するリボソームの異常が、どのような経路で貧血を引き起こすのか、明らかにされていない。

ひとつの説は、RP遺伝子変異によりRP量のインバランスが引き起こされ、これが核小体ストレスを誘導し、その結果、TP53が活性化し赤芽球系細胞の細胞周期の停滞とアポトーシスを引き起こすというものである。

もう一つはRP遺伝子変異によりリボソームの機能が障害され*GATA1*の効率的な翻訳が行われず、赤芽球系細胞にアポトーシスが引き起こされるとの説である。しかし、いずれの説も推論の域を出ていない。

## 2. 研究の目的

DBA症例の中には未治療のまま自然寛解に至る例もあれば、治療抵抗性を示し骨髄移植が必要になる症例もある。我々や海外の研究者は、DBA患者や家族のエクソーム解析などを行っているが、依然として40%弱の症例では原因が明らかになっていない。

本研究では、DBA患者のスクリーニングの中でみとめた新規*TP53*の生殖系列変異を有する症例に注目して、TP53の活性化による赤芽球造血の抑制機構とRP遺伝子変異による同抑制機構を比較することにより、共通のカスケードの検索を進め、そこからDBAの新たな原因と病態を明らかにすることを目的としている。

DBAの治療は、副腎皮質ステロイドの投与が第一選択であるが、効果がみられるのは約20%にかぎられ、有効な治療法はない。DBAの発症メカニズムを明らかにし、そのカギとなる分子を明らかにすることは治療法の開発にも重要であると考えている。

## 3. 研究の方法

本研究では、赤芽球系細胞株にCRISPR/Cas9システムを用いた相同組み換え修復によって症例にみられた数種類のRP遺伝子の変異の導入を試みた。

方法の詳細としては、細胞株:赤芽球系細胞株(K562, HUDEP)に、ゲノム編集:CRISPR/Cas9発現ベクター、gRNA発現ベクターおよび一本鎖DNAオリゴ(ssODN)を細胞株にトランスフェクションし、相同組み換え修復により目的の変異を導入する。しかし、このようなDBAモデルにおいては、著しく細胞増殖が抑制されることを観察しており、単純に変異クローンを単離できない場合があることも経験した。また今回、患者で認められた変異の中でアミノ酸置換変異についても注目した。これまで、DBAで報告されているRP遺伝子のアミノ酸置換変異については、機能解析がなされていない、機能欠損型の変異か、稀な多型であるのか不明なまま報告されているものが多くある。我々は、CRISPR/Cas9のゲノム編集と次世代シーケンサーを用いて、目的の変異アレルの細胞増殖に対する影響を見る簡易機能解析法を開発し、本研究でさらに検証を進めた。

#### 4. 研究成果

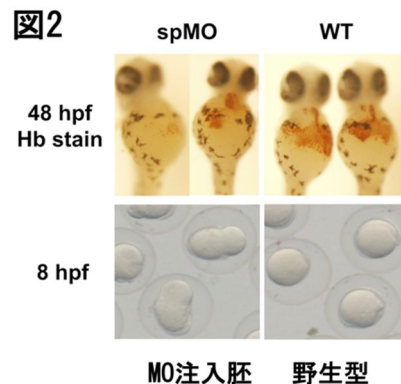
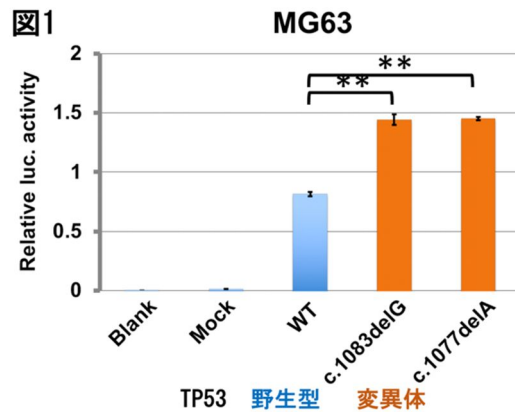
我々は、DBA 患者の原因遺伝子を調べるスクリーニングにおいて、赤芽球癆と著しい低身長を呈する2例を経験した。全エクソーム解析をしたところ、予期せぬことに両症例とも生殖系列に TP53 遺伝子の変異を有し、その変異は約3万種類に及び、Li-Fraumeni 症候群やがんにみられる変異とは異なるC末端領域を欠く新規のものであった。

これまで、生殖系列に TP53 のC末端領域に変異を持った症例の報告はなく、新規の先天性赤芽球癆であることが示唆された。TP53 のC末端の機能については、これまで数は多くないもののいくつかの報告があったが、その機能は不明なままであった。ところが最近、この領域を欠失したマウスは成長が著しく抑制されること(文献2,3)、さらにこの領域が転写効率を負に制御する SET 因子と相互作用することが報告された(文献4)。

本研究の検索でも、この変異 TP53 は野生型 TP53 と比較して、CDKN1A のプロモーター活性を1.5倍ほど高いことが示された(図1)。既に、同変異を持つ iPS 細胞を樹立し、赤血球系への分化誘導で障害が生ずることも確認した。in vivo でのこの変異の赤血球造血における影響を見る目的で、C末端部分を欠いた p53 を発現するゼブラフィッシュを開発した。その方法を以下に示す。ゼブラフィッシュの一細胞期胚に、イントロン10のスプライス部位を標的としたモルフォリノ・アンチセンスオリゴ(MO)を注入した。その結果、スプライシングの異常が引き起こされ、エクソン10の直後に早熟な停止コドンを導入され、Tp53 のC末端部位の除去を引き起こした。MOを注入した胚は、形態学的異常を伴う発生障害を呈し、受精後96時間までに死亡した。受精後48時間でのヘモグロビン染色は、胚の赤血球産生の減少を反映していた(図2)。これらの結果は、C末端を欠いた p53 がゼブラフィッシュの初期発生と赤血球産生に影響を与えていることを示唆していた。TP53 変異を有する iPS 細胞と野生型との遺伝子発現を RNA-Seq 解析で比較したところ、予期せず RP 遺伝子の発現に差が認められた(未発表)。この知見はこれまで推論された TP53 の活性化と RP 遺伝子変異の因果関係とは全く逆の関係を示唆するものであり、現在検索を続けている。

TP53 の新規変異の機能解析の一方で、RP 遺伝子変異の機能解析についても検索を進めた。本研究では、赤芽球系細胞株に CRISPR/Cas9 システムを用いた相同組み換え修復によって、症例にみられた数種類の RP 遺伝子の変異の導入を試みた。ゲノム編集を加えた細胞から継時的に gDNA を抽出し、目的の変異アレールとそれ以外の変異アレールを、次世代シーケンサーを用いて解析した。その結果、患者に認められた変異アレールは他の変異と比較してアレール頻度の継時的な低下が認められた。このアッセイ方法で有害なアレールであると判断された、ものについては、限界希釈法で単一クローンにすることにより、より詳細に変異の機能解析を進めた。RP 遺伝子の異常は rRNA の成熟にも影響を与えることが知られており、単離した rRNA の成熟をノーザンブロット法で調べた。しかしながら、変異の一部では rRNA の成熟障害が示されなかった。rRNA の成熟障害は RP 遺伝子変異によるリボソームの生合成の障害を反映していると考えられていたが、それと DBA の病態を直接結びつける研究は報告されていない。今回得られた結果が、限られた実験系で起こっていることなのか、それとも rRNA の成熟障害を示さない、DBA に至る経路が RP 遺伝子変異の下流にあるのか詳細を検索中である。

当初、活性型 TP53 変異と機能不全型 RP 変異の下流を比較して、共通のカスケードから DBA



の発症機序に迫ることを目的にしていたが、検索を進めたところ、これまで推論されていたものとは全く異なるメカニズムが存在する可能性が示されつつある。現在、我々は DBA の中には RP 遺伝子に変異が認められないものの中に、RP 遺伝子の発現を制御する新たな仕組みがあり、それがこれまで責任遺伝子の不明な DBA の原因になっている可能性を考え解析を進めている。

#### <引用文献>

1. Draptchinskaia, N., Gustavsson, P., Andersson, *et al.* (1999) The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat Genet* 21, 169-175
2. Hamard, P. J., Barthelery, N., Hogstad, B., *et al.* (2013) The C terminus of p53 regulates gene expression by multiple mechanisms in a target- and tissue-specific manner in vivo. *Genes Dev* 27, 1868-1885
3. Simeonova, I., Jaber, S., Draskovic, I., Bardot, B., Fang, *et al.* (2013) Mutant mice lacking the p53 C-terminal domain model telomere syndromes. *Cell Rep* 3, 2046-2058
4. Wang, D., Kon, N., Lasso, G., Jiang, L., *et al.* (2016) Acetylation-regulated interaction between p53 and SET reveals a widespread regulatory mode. *Nature* 538, 118-122

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Toki Tsutomu, Yoshida Kenichi, Ogawa Seishi, Ito Etsuro et al.	4. 巻 103
2. 論文標題 De Novo Mutations Activating Germline TP53 in an Inherited Bone-Marrow-Failure Syndrome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The American Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 440 ~ 447
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajhg.2018.07.020	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2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林 明恵, 久保 かほり, 金崎 里香, 佐藤 知彦, 土岐 力, 伊藤 悦朗, 他
2. 発表標題 ダイヤモンド・ブラックファン貧血におけるリボソーム蛋白遺伝子のGATA1結合部位の変異解析
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 土岐 力
2. 発表標題 本邦におけるDiamond-Blackfan 貧血の診断的ターゲットおよびエクソームシーケンス解析
3. 学会等名 第79回日本血液学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

弘前大学医学小児科学教室  
<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~pedia/index.html>

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
研究分担者	種田 晃人  (Tanida Akito)  (70332492)	弘前大学・理工学研究科・准教授   (11101)	