

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07868

研究課題名(和文) リボソーム蛋白遺伝子異常に着目したDiamond-Blackfan貧血の病因解明

研究課題名(英文) Elucidation of etiology in Diamond-Blackfan anemia focusing on the ribosomal protein genes abnormality

研究代表者

神尾 卓哉 (KAMIO, TAKUYA)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50587011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Diamond-Blackfan貧血(DBA)は、赤血球造血不全のメカニズムが未だ解明されていない。以前我々は、リボソーム蛋白とMDM2が結合できないMDM2C305F変異マウスが特異的赤血球造血不全を起こすことを報告した(PLoS One, 2016)。そのマウスの胎仔線維芽細胞を用い、RNA-seqを行うことで、MDM2C305F変異マウスでは特定の遺伝子が赤芽球癆に関与していることを発見した。また、我々はDBA診療している施設へアンケート調査を行い、DBAにおける骨髄非破壊的前処置を用いた造血細胞移植の有用性を報告した(Bone Marrow Transplant, 2020)

研究成果の学術的意義や社会的意義

Diamond-Blackfan貧血(DBA)は、乳幼児期に発症する赤芽球造血のみが障害される先天性の赤芽球癆である。約70%の症例でリボソーム蛋白遺伝子のハプロ不全を認めるが、それがどのように赤血球の造血不全を起こすか、未だ解明されていない。

本研究は、どのような標的遺伝子の発現制御が造血不全を引き起こすのか、その分子生物学的な機構の一端が明らかとなる可能性がある。また、他の先天性造血不全症のメカニズムを解明する上でも重要な情報が得られることが予想され、先天性造血不全症の新たな治療法の発見につながるメカニズムが解明される可能性を秘める。

研究成果の概要(英文)：In Diamond-Blackfan anemia (DBA), a red blood cell hematopoietic failure mechanism is still unknown. Previously, we reported that the MDM2C305F mutation mouse, MDM2 could not be inhibited the bind to specific ribosomal proteins, caused specific red blood cells hematopoiesis failure(PLoS One, 2016). Using the murine embryo fibroblasts by performing RNA-seq, we discovered that a specific gene was associated with pure red cells aplasia with the MDM2C305F mutation mouse. Also, we sent questionnaires about the responses to therapeutic procedures, stem cell transplantation(SCT), complications, and prognosis to the physicians of the DBA patients enrolled in our cohort. In this retrospective study, we reported the success of SCT of DBA patients following reduced-intensity conditioning regimens(Bone Marrow Transplant, 2020).

研究分野：小児血液腫瘍

キーワード：Diamond-Blackfan貧血 リボソーム蛋白 MDM2 p53

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Diamond-Blackfan 貧血 (DBA) は、乳幼児期に発症する赤芽球造血のみが障害される先天性の赤芽球癆であるが、それがどのように赤血球の造血不全を起こすか、未だ解明されていない。一つの仮説として、リボゾームタンパクのハプロ不全がリボゾームタンパクの組み立てを障害し、過分なリボゾームタンパクが MDM2 と結合することで MDM2 の p53 ユビキチン化を抑制して、安定化した p53 がアポトーシスを起こすことにより、造血不全が起こるのではないかと考えられている。そのため、リボゾームタンパクと、MDM2/p53 が関与した赤血球造血不全のメカニズムを解明することが、DBA の研究に重要であると思われる。

2. 研究の目的

我々は、リボゾームタンパクと MDM2 が結合できない MDM2C305F 変異をもつマウスが特異的赤血球造血不全を起こすことを報告した。そこで我々は、MDM2C305F 変異がリボゾームタンパクと MDM2 との結合、p53 の相互作用のみで赤血球造血不全を引き起こすのか、それともその他の遺伝子・タンパクと MDM2C305F 変異が赤血球造血不全に関与しているのかを解明する。

3. 研究の方法

具体的には以下の3点に焦点を絞って研究を行う予定であった。

1. MDM2 遺伝子の変異体である MDM2C305F を培養細胞株に導入し、過剰発現系を構築することで、MDM2C305F 変異により発現が変化する遺伝子を抽出する。2. ゲノム編集 CRISPR/Cas9 法を用いて MDM2C305F 変異を細胞株に作成し、MDM2C305F 変異により発現が変化する遺伝子を抽出する。3. MDM2C305F 変異マウス胎児線維芽細胞・造血細胞で候補遺伝子・タンパクに変化があるか、検証する。

4. 研究成果

上記 1 から 3 の順で研究を行う予定であったが、より明確な結果が出る可能性のある上記 3 の、『MDM2C305F 変異マウス胎児線維芽細胞 (MEF) から RNA を抽出し、RNA-seq にて MDM2C305F 変異により発現が変化する遺伝子を比較検討する』ことから始めた。

まず、研究代表者が留学中にフィラデルフィア小児病院より輸送、凍結保存した MDM2C305F 変異マウス MEF (ホモ、ヘテロ、野生型) を解凍し、RNA を抽出。クオリティ・チェックを行った後、共同研究者とともに RNA-seq を行った。解析には、iDEP を使い、MDM2C305F 変異マウス MEF (ホモ、ヘテロ、野生型) で変動遺伝子の比較を行った (未発表データ)。

次に、研究代表者が留学中から始めていた、上記 1 の『HEK293T 細胞株より MDM2 遺伝子とホモログの HDM2 遺伝子を単離し、FLAG タグとネオマイシン耐性遺伝子をもった p3XFLAG-CMV-14 ベクターのマルチクローニングサイトに HDM2 遺伝子を挿入した産物を使用した実験』に取り組んだ。予備実験では、ウエスタンブロッティングによる抗 HDM2 (MDM2) 抗体の免疫沈降効果が弱いため、FLAG タグを持つベクターを使用し、その後 HDM2C305F 変異を Mutagenesis Kit を用いて作成。HDM2 遺伝子、HDM2C305F 遺伝子が挿入された p3XFLAG-CMV-14 ベクターをマキシプレップで増やした後、HeLa 細胞株、U2OS 細胞株、K562 細胞株などへ Lipofectamine を使用して遺伝子導入し、これに G418 Sulfate を加え、HDM2C305F が挿入された p3XFLAG-CMV-14 ベクターが安定して導入された細胞を使用することにしていたが、安定したデータがなかなか得られず実験が滞っていた。

その間、DBA の臨床データを用いた研究を大学院学生とともに進めることにした。当科で遺伝子解析を行った日本国内の DBA 患者の主治医へ DBA の治療を中心としたアンケート調査を実施。

骨髄破壊的前処置 (MAC) (n=12) vs 骨髄非破壊的前処置 (RIC) (n=15)

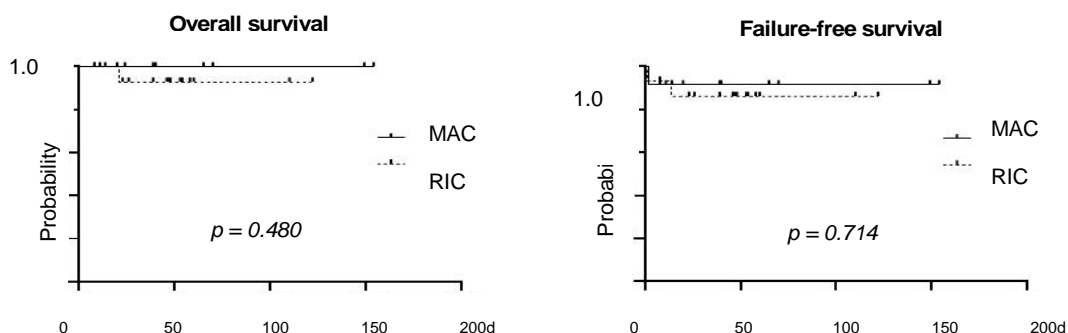


図 1 DBA に対する造血細胞移植の生存率

そこで得られたデータをまとめ、特に DBA の造血細胞移植について解析を行った。186 名の DBA 患者から 165 名分の返答が得られ、そのうち 27 名の DBA 患者で移植が行われていた。移植ソースや転帰、移植合併症について、統計学的に検討がなされた。これまで、DBA において移植合併症が少ないことが期待される骨髄非破壊的前処置による移植について、まとまった報告がなかったが、我々がはじめて骨髄破壊的前処置と同等の成績が得られたことを学会（欧州骨髄移植学会、日本血液学会、日本造血細胞移植学会）で報告（図 1, 2）し、論文化を行った（Koyamaishi S, Kamio T, et al. Bone Marrow Transplant. 2020）。

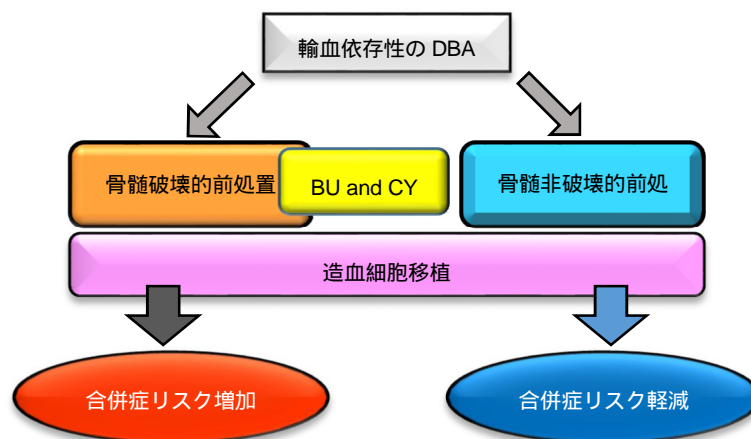


図 2 DBA に対する移植前処置による合併症

今回の報告では、移植後観察期間が短いため、さらなるデータの蓄積が必要であり、我々は DBA を含む先天性造血不全症の疾患レジストリを、AMED 難病プラットフォームを用いて 2020 年に構築した（2021 年度より運用開始）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 0件）

1. 著者名 Koyamaishi Shun, Kamio Takuya, Kanazaki Rika, Toki Tsutomu, Terui Kiminori, Ito Etsuro	4. 巻 56
2. 論文標題 Reduced-intensity conditioning is effective for hematopoietic stem cell transplantation in young pediatric patients with Diamond-Blackfan anemia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone Marrow Transplantation	6. 最初と最後の頁 1013 ~ 1020
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41409-020-01056-1	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 神尾卓哉
2. 発表標題 ダイヤモンドブラックファン貧血における骨髄非破壊的前処置による移植の有用性
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 神尾卓哉
2. 発表標題 ダイヤモンドブラックファン貧血における骨髄非破壊的前処置による移植の有用性
3. 学会等名 第43回造血細胞移植学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shun Koyamaishi
2. 発表標題 Reduced-intensity conditioning is effective for hematopoietic stem cell transplantation in young pediatric patients with Diamond-Blackfan anemia.
3. 学会等名 European Society for Blood and Marrow Transplantation annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 神尾卓哉、伊藤悦朗	4. 発行年 2019年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 6
3. 書名 血液内科	

1. 著者名 神尾卓哉、伊藤悦朗	4. 発行年 2019年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 6
3. 書名 血液疾患最新の治療	

1. 著者名 神尾卓哉、伊藤悦朗	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医薬情報研究所	5. 総ページ数 8
3. 書名 新薬と臨床	

〔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
研究分担者	土岐 力 (TOKI TSUTOMU) (50195731)	弘前大学・医学研究科・講師 (11101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	金崎 里香 (KANEZAKI RIKA) (60722882)	弘前大学・医学研究科・助教 (11101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関