

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：先天性赤芽球癆（Diamond-Blackfan 貧血）の新規原因遺伝子の同定と病態解明に関する研究

2. 研究開発代表者：伊藤 悦朗（国立大学法人弘前大学 大学院医学研究科小児科学講座）

3. 研究開発の成果

### ① DBA患者データベース構築：臨床情報および検体収集

本邦では年間5～10人の発症がみられる。平成27年度は、9例の新規症例を含め、160症例の臨床情報と検体を収集した。全ての症例で遺伝子診断を施行し、90例で原因遺伝子を同定した。しかし、残りの70例（44%）には既知の原因遺伝の変異は検出されなかった。治療経過などについて追跡調査を行ったが、原因遺伝子とステロイドの有効性に関連は認められなかった。しかし、*RPL5* 遺伝子変異も持つ症例は有意に奇形合併率が高く、特に口蓋裂の頻度が高かった。

### ② Diamond-Blackfan 貧血の新規原因遺伝子の同定と病態解明

原因遺伝子が不明なDBA患者の両親の検体を収集し、トリオ検体の全エクソンシーケンスを推進した。その結果、新規原因候補遺伝子*RPS15A*を同定した。家族内の複数の罹患者に同一の遺伝子変異を認め、*RPS15A*変異を有する罹患者のみにスプライシング異常が検出された。次に、*RPS15A*変異の細胞増殖への影響をみるため、ヒト赤芽球系培養細胞K562にCRISPR/Cas9システムでゲノム編集して患者でみられた変異を導入した。ターゲットダイブシーケンスで、*RPS15A*サイレント変異陽性細胞は比率が増加したが、*RPS15A*変異を導入した細胞の比率は次第に低下することを見出した。さらに、siRNAで*RPL15A*をノックダウンあるいはゲノム編集で*RPS15A*変異を導入したK562細胞では、ノーザンブロット法にて、30S rRNAの蓄積と21S rRNAおよび18S-E rRNAの減少が認められ、18S rRNAのプロセッシングが障害されていることが明らかとなった。

次に、*RPS15A*の変異モデルをゼブラフィッシュで作製し、造血能などの表現型を解析した。ゼブラフィッシュ *rps15a* はヒト *RPS15A* とほぼ同様な遺伝子構造をもち、タンパク質のコード領域（CDS）はエキソンの長さ、イントロンの位置ともに完全に同一であった。スプライシングを阻害するモルフォリノアンチセンスオリゴ（MO）を受精卵に微量注入し、目的とするエキソンが欠失したゼブラフィッシュ胚を取得した。これらの胚の形態を観察した結果、尾部の屈曲や卵黄の伸長部の縮小などの異常が見られ、これらの表現型は注入したMOの濃度に依存して顕著になることも明らかになった。また、ヘモグロビン染色により血球を染めたところ、同じくMO濃度に依存して血球数の低下が観察された。さらに、表現型の異常が *rps15a* に特異的であることを確認するために、*in vitro* で合成した *rps15a* の mRNA を MO と同時に受精卵に注入したところ、形態の異常および血球数の減少ともに回復が見られた。以上の結果から、*RPS15A* で新たに変異が同定された遺伝子は、DBA の新規原因遺伝子であると考えられる。

家族歴のない2例で見出されたRP遺伝子でない新規原因遺伝子候補Aの機能解析をヒトiPS細胞で用いて行った。正常iPS細胞にゲノム編集で患者に検出された変異を導入した。造血細胞に分化誘導したところ、赤血球系細胞の増殖の低下を確認した。

同じ遺伝子変異を持つ同一家系内の症例でも、輸血依存性の重症例から軽度の貧血のみの経症例まで臨床症状に大きな差異が認められた。最近、先天性貧血の一つであるFanconi 貧血(FA)の病態に、薬物代謝酵素Aldehyde dehydrogenase 2(ALDH2)の多型が関与することが証明された。すなわち、ALDH2酵素活性の欠損をもたらす多型が骨髄不全の進行を強く促進していることが示された。そこで、113例のDBA患者についてALDH2遺伝子多型を解析した。しかし、FAと異なり、DBAの病態（奇形合併率、発症年齢、ステロイド反応性など）にはALDH2遺伝子多型は影響しないことが明らかになった。

4. その他

特記すべきことなし。