

平成28年度（第21回）  
弘前大学医学部学術賞  
奨励賞受賞論文

WANG R, YOSHIDA K, TOKI T, SAWADA T, UECHI T, OKUNO Y, SATO-OTSUBO A, KUDO K, KAMIMAKI I, KANEZAKI R, SHIRAISHI Y, CHIBA K, TANAKA H, TERUI H, SATO T, IRIBE Y, OHGA S, KURAMITSU M, HAMAGUCHI I, OHARA A, HARA J, GOI K, MATSUBARA K, KOIKE K, ISHIGURO A, OKAMOTO Y, WATANABE K, KANNO H, KOJIMA S, MIYANO S, KENMOCHI N, OGAWA S, ITO E. Loss of function mutations in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol*. 2015;168:854-64.

Diamond-Blackfan 貧血において全エクソン・シーケンスによって見出された RPL27 と RPS27 遺伝子の機能喪失変異

中国医科大学附属盛京医院 小児科  
弘前大学大学院医学研究科 小児科学講座  
王 汝 南

はじめに

Diamond-Blackfan 貧血 (DBA) は、稀な遺伝性骨髄不全症の一つであり、赤血球造血不全と先天性の奇形によって特徴づけられる。末梢血では正色素性・大球性の貧血と網状赤血球の消失あるいは著しい減少が認められる<sup>1)</sup>。観察される奇形としては、平坦な鼻、口蓋裂、高アーチ口蓋、両眼隔離、眼角贅皮などの頭・顔部の異常が最も多く、多指症などの上肢の異常、稀に泌尿生殖器系や心奇形もみられ、低身長などを含めると全体の40%ほどで外表奇形が観察される。さらに、発がん素因を有し、急性骨髄性白血病や骨髄異形成症候群への移行や固形癌の合併が報告されている<sup>1)</sup>。

DBA の発生頻度は100万出生あたり4～7例で、日本での発症は年間約10例である。多くが散発例であるとされるが、10～20%においては家族歴がある。症例の40～60%で遺伝子変異が明らかにされている。リボソームタンパク (RP) の遺伝子の一つである RPS19 遺伝子が最初の DBA 原因遺伝子として発見された<sup>2)</sup>。その後の研究で、RPS19 遺伝子変異は最も多く、DBA 患者の約25%に認められることが明らかとなった。さらに、別のリボソームタンパク (RPS7, RPS10, RPS17, RPS24, RPS26, RPS29, RPL5, RPL11, RPL35a, RPL26) の遺伝子変異が発見されている。その他、稀なX連鎖の遺伝形式を示す DBA の家系で、赤血球・巨核球系転写因子 GATA1 をコードする遺伝子に変異が同定されている。これまで発見された DBA の遺伝子変異は、稀な GATA1 変異以外、すべてリボソームタンパク遺伝子のヘテロ変異であった。

リボソームは、mRNA の情報を読み取りタンパクを合成する翻訳が行われる細胞内小器官である。真核生物の場合、4種類のリボソーム RNA (rRNA) と79種類の RP からなる大きなリボ核タンパク複合体であり、40S と60S の2つのサブユニットからなっている。小サブユニットである40S は18S rRNA を、大サブユニットである60S は28S, 5.8S, 5S の rRNA を含んでいる。小サブユニットを形成する RP は RPS と呼ばれ、大サブユニットを形成する RP は RPL と呼ばれる。DBA においては RP のハプロ不全によってポリソームの形成が抑制されることが示されている。また、ハプロ不全は rRNA 前駆体から成熟

rRNA へのプロセッシングにも影響を与える。一般に RPS の異常は 18S の成熟を、RPL の異常は 28S, 5.8S の成熟を阻害するとされる。貧血の起こる仕組みはまだ完全には理解されていないが、リボソームの機能障害の結果、p53 の活性化が起こることが DBA の中心的な病因と考えられている。

### 本邦における DBA の原因遺伝子の検索

本邦では、原因遺伝子が同定されている症例はほとんどなく、家族の解析も行われていなかった。我々は、我が国における DBA の病態を明らかにするために、全国から検体を収集し、既知の原因遺伝子の解析を行ってきた。初期には、各々の遺伝子のエクソンを増幅し高解像度融解曲線分析 (HRM) とダイレクト・シーケンス法を組み合わせる方法で行っていたが、最近では、より正確かつ迅速に行える次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンスで解析している。

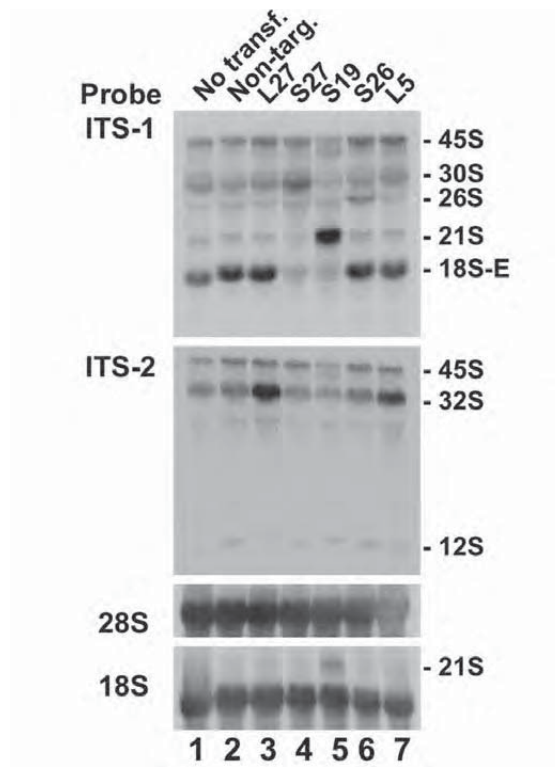
本邦では、2009 年以前には DBA で原因遺伝子が同定されている症例は極めて少なく、家族の解析もほとんど行われていなかった。我々は、49 例の臨床検体について、DBA で遺伝子変異が報告されている 6 つの RP 遺伝子を解析した。その結果、*RPS19*, *RPL5*, *RPL11*, *RPS17* に変異を認め、その頻度は、それぞれ 13%, 9%, 4% および 2% であった<sup>3)</sup>。欧米に比して本邦における RP 遺伝子の変異頻度は低く、約 70% の症例では原因遺伝子が不明であった。しかし、この方法では、遺伝子領域全体を含む比較的大きな欠失が原因になっている場合には検出することができない。そこで、ダイレクト・シーケンス法では検出できない片アレルの欠失を迅速・簡便に検出することができる DBA の遺伝子コピー数解析法 (DBA 同期的 qPCR 法) を開発し、変異同定を試みた。その結果、遺伝子変異未知の 31 例中 7 例で DBA の原因遺伝子の片アレル欠失を検出し、SNP アレイで欠失を確認した<sup>4)</sup>。その後の解析で、RP 遺伝子の欠失は約 10% の症例にみられることが明らかになった。

### 新規原因遺伝子の同定

しかし、まだ約半数の症例の原因遺伝子が不明であった。そこで、新規原因遺伝子を見出すために、既知の原因遺伝子に変異や大欠失が検出されない 48 症例について次世代シーケンサーでエクソーム解析を行った。その結果、新規原因候補遺伝子 *RPL27* と *RPS27* を各々 1 人の患者に見出した。2 人とも孤発例で、両親には変異を認めず、患者に生じた *de novo* 変異であった。*RPL27* 変異 (c.-2-1G>A) はスプライシング変異、*RPS27* 変異 (c90delC) はフレームシフト変異であり、両者とも機能喪失変異であった<sup>5)</sup>。

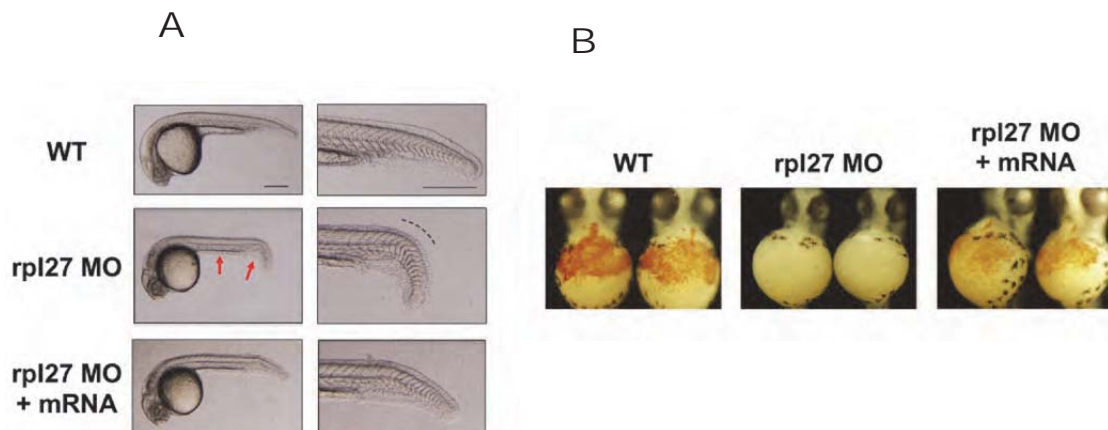
DBA においては RP 遺伝子の機能喪失変異により、rRNA のプロセッシングが阻害される可能性がある。今回認められた *RPL27* と *RPS27* の変異がそのような現象を引き起こすか調べるために、K562 細胞に siRNA を導入することにより *RPL27* と *RPS27* の発現を抑制し、rRNA 前駆体をノーザンブロット法にて検索した (Fig. 1)。導入した K562 細胞から全 RNA を抽出し、rRNA 前駆体および成熟 rRNA を 4 つのプロープで検出した。その結果、*RPL27* siRNA の導入により 32S rRNA の蓄積が認められ、これは *RPL5* を抑制したパターンと類似していた。一方、*RPS27* siRNA の導入では、30S rRNA の蓄積と 21S rRNA および 18S-E rRNA の減少が認められた。これらの前駆体の蓄積および減少は、*RPL27* の抑制では 28S と 5.8S rRNA の成熟が抑制され、*RPS27* の抑制では 18S rRNA の抑制が引き起こされる可能性が示唆された (Fig. 1)。このような結果は、これまで報告されている DBA 原因遺伝子の抑制による表現型と矛盾しないものであった。

次に、ゼブラフィッシュを用いて両遺伝子の機能解析をした。ゼブラフィッシュは胚が透明で観察が容易であることや短時間で表現型を確認できるなど疾患モデルとして非常に有用である。今回 *rpl27* と *rps27* を抑制するために 1 細胞期の胚にモルフォリノ・アンチセンス・オリゴヌクレオチド (MO) を導入した。ゼブラフィッシュの *rpl27* はヒト *RPL27* とヌクレオチド配列で 84%、アミノ酸配列で 96% の相同性がある。MO 導入により第 2 エクソンをスプライシングしたところ (Fig. 2)、卵黄囊の菲薄化、尾の屈曲、および赤血球造血の抑制が認められた。ヒトの *RPS27* のパラログには *RPS27L* が存在するが、ゼ



**Figure 1** Perturbation of pre-rRNA processing by knockdown of the RPL27 or RPS27 gene

Northern blot analysis using K562 cells knocked down by siRNAs. The 5' extremities of the internal transcribed spacer 1 (ITS-1) and internal transcribed spacer 2 (ITS-2) were used as probes to detect the precursors to the 18S rRNA associated with the small subunit and 28S rRNA and 5.8S rRNA associated with the large subunit of the ribosome, respectively. ITS-1 and ITS-2 probes revealed the accumulation of 30S pre-rRNA in RPS27 knocked-down cells and 32S pre-rRNA in RPL27 knocked-down cells, respectively.



**Figure 2** Morphological defects and decreased erythropoiesis in *rpl27* morphants

(A) Morphological features of wild-type and MO-injected embryos. A thin yolk sac extension and a bent tail are prominent in the morphants injected MO (arrows), whereas these features are rescued in the embryos injected with *rpl27* mRNA.

(B) The hemoglobin staining of cardiac veins at 48 hours post-fertilization (hpf). Compared to wild-type embryos, *rpl27* morphants showed a drastic reduction in the number of hemoglobin-stained blood cells.

ブラフィッシュにおいては rps27.1, rps27.2, rps27.3 の3コピーが存在する。このうち96%のアミノ酸の相同性が認められる rps27.1 の抑制を試みた。その結果, rpl27 同様に卵黄嚢の菲薄化, 尾の屈曲, および赤血球造血の抑制, さらに頭部の奇形が認められた。これらの結果は, *RPL27* および *RPLS27* が新規の DBA 責任遺伝子であることを示唆している<sup>5)</sup>。

### おわりに

この論文は, 我が国から初めて同定された DBA 新規原因遺伝子の報告である。新規原因遺伝子が2つ見出されたが, エクソーム解析を行ったほとんどの症例でまだ原因遺伝子が同定されていない。この結果は, RP 遺伝子以外の原因遺伝子が存在することを強く示唆する。今後, トリオ検体を収集し, 全エクソーム解析とゼブラフィッシュモデルを用いた機能解析と組み合わせることで, 新規原因遺伝子の同定を進めたい。

### 参考文献

- 1) Ito E, Konno Y, Toki T, Terui K. Molecular pathogenesis in Diamond-Blackfan anemia. *Int J Hematol.* 2010;92:413-8.
- 2) Gustavsson P, Willing TN, van Haeringen A, et al. Diamond-Blackfan anaemia: genetic homogeneity for a gene on chromosome 19q13 restricted to 1.8 Mb. *Nat Genet.* 1997;16:368-71.
- 3) Konno Y, Toki T, Tandai S, et al. Mutations in the ribosomal protein genes in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Haematologica.* 2010;95:1293-9.
- 4) Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, et al. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Blood.* 2012;119:2376-84.
- 5) Wang R, Yoshida K, Toki T, et al. Loss of function mutations in *RPL27* and *RPS27* identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol.* 2015;168:854-64.