

## 学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	成育科学領域小児病態学教育研究分野 氏名 池田史圭
<p>Exome sequencing identified <i>RPS15A</i> as a novel causative gene for Diamond-Blackfan anemia          (エクソームシーケンスで同定されたダイヤモンド・ブラックファン貧血新規原因遺伝子 <i>RPS15A</i>)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p><b>【緒言】</b> Diamond-Blackfan 貧血 (以下 DBA) は新生児期～乳児期に発症する先天性赤芽球癆である。大球性貧血・網赤血球減少・骨髓中の赤芽球減少を特徴とし、種々の奇形および悪性腫瘍の合併がみられる場合がある。DBA 患者の半数以上ではリボソームタンパク (RP) 遺伝子のヘテロ接合変異もしくは欠失が認められる。稀な X 連鎖の遺伝形式を示す DBA の 3 家系では <i>GATA1</i> 遺伝子の生殖細胞変異が同定されている。しかし、<i>GATA1</i> を除いた既知の原因遺伝子はすべて RP をコードしている。我々は 2015 年に原因遺伝子不明の患者 48 人に対し全エクソン解析を施行し、新規の原因遺伝子 <i>RPS27</i> と <i>RPL27</i> を同定した。これまでに 14 の RP 遺伝子 (<i>RPS7</i>, <i>RPS10</i>, <i>RPS17</i>, <i>RPS19</i>, <i>RPS24</i>, <i>RPS26</i>, <i>RPS27</i>, <i>RPS28</i>, <i>RPS29</i>, <i>RPL5</i>, <i>RPL11</i>, <i>RPL26</i>, <i>RPL27</i>, <i>RPL35A</i>) が原因遺伝子として報告され、これらの遺伝子に変異が認められる患者は 60% に昇る。しかし、依然多数の患者で原因が不明であり、病因の解明は十分とは言えない。今回我々は新規の DBA 原因遺伝子を検索するために、次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析と候補遺伝子の機能解析を行った。</p> <p><b>【対象と方法】</b> 発端者は、貧血の家族歴のある女兒である。総肺動脈還流異常と両側の白蓋形成不全を合併していた。3 カ月時に末梢血血液検査にて貧血と網状赤血球減少、骨髓血検査にて赤芽球系のみの著明な低形成が認められ DBA と診断された。姉と母が小児期に貧血を発症している。姉と母に合併奇形は認められない。発端者、姉と母はいずれも初回ステロイド治療に反応し、経過中にステロイド非依存性となった。弘前大学の倫理委員会の承認の上でインフォームドコンセントを得て、父親を含めた家族全員の解析を行った。</p> <p><b>【方法と結果】</b></p> <p>① DBA において変異が報告されている 11 遺伝子と 5q-骨髓不全症候群に関連する <i>RPS14</i> についてスクリーニング検査を施行したが、変異および欠失は認められなかった。そこで、無症候の父親を含めた家族全員の末梢血から抽出したゲノム DNA を用いて全エクソン解析を施行した。解析の結果、発端者、姉と母で <i>RPS15A</i> 第 3 エクソンのスプライス部位にヘテロの一塩基置換 (c.213 G&gt;A, p.K71K) が認められた。この変異は無症候の父親には認められなかった。ダイレクトシーケンスにて変異を確認した後、RT-PCR を施行し、変異により <i>RPS15A</i> に第 3 エクソンが脱落するスプライシング異常が生じることを確認した。</p> <p>② 同定された <i>RPS15A</i> 変異 (c.213 G&gt;A) が赤血球系細胞に及ぼす影響を評価するため、ヒト赤芽球系細胞株 K562 に CRISPR/Cas9 発現ベクターとともにオリゴヌク</p>	

レオチドを遺伝子導入し、サイレント変異(c.207 A>C)および c.213G>A 変異を導入した。両者のアレル頻度を継時的に比較したところ、c.207 A>C 変異に比較して c.213G>A 変異の頻度は有意に低下し、この変異が細胞増殖を抑制することが示唆された。

- ③これまで、DBA にみられる RP 遺伝子のヘテロ変異によりリボソーム RNA 前駆体 (pre-rRNA) の成熟が障害され、リボソームの合成不全が生じることが報告されてきた。赤血球系細胞において *RPS15A* ヘテロ変異が rRNA の成熟を障害するかどうかを判定するために、K562 に CRISPR/Cas9 ゲノム編集で変異を導入し、*RPS15A* ハプロ不全を示す細胞株 #75 を得た。細胞株 #75 に対しノーザンブロット法を用い、pre-rRNA の成熟の過程を解析した。その結果、*RPS15A* のハプロ不全がリボソームの小サブユニットを構成する 18S rRNA の成熟を障害することが明らかになった。
- ④さらに、*in vivo* で *RPS15A* 変異の影響をみるために、モルフォリノオリゴヌクレオチド (MO) をゼブラフィッシュの受精卵に注入し、*rps15a* をノックダウンした。ゼブラフィッシュ *rps15a* のコード領域はヒトと塩基配列で 81%、アミノ酸で 99% の相同性がある。MO は患者変異に対応する部位に設計され、ノックダウン胚には *rps15a* に第 3 エクソンの脱落するスプライシング異常が認められた。ノックダウン型と野生型を比較した結果、ノックダウン型では卵黄囊の菲薄化、尾部の屈曲などの形態異常と赤芽球系細胞の低形成がみられた。これらの異常は MO の注入量に比例し、*rps15a* mRNA を同時注入することで改善した。以上の結果から *rps15a* は形態形成や赤血球造血に重要な分子であり、*RPS15A* が DBA の原因遺伝子であることが示唆された。

#### 【考察】

今回我々は DBA の 1 家族に対し全エクソーム解析を施行し、新規原因遺伝子 *RPS15A* を同定した。解析の結果、*RPS15A* が赤血球生成に重要な機能を果たし、そのハプロ不全が DBA の原因となることが明らかとなった。新規原因遺伝子 *RPS15A* の発見は病因の解明に貢献し、DBA がリボソームの異常によるという説を支持するものである。