

ダイヤモンド・ブラックファン貧血における軟骨形成不全と *RPL5* 変異に起因する細胞死との関連

【目的】

ダイヤモンド・ブラックファン貧血 (DBA) は、リボソームの成熟に関わるリボソームタンパク質 (RP) 遺伝子の変異が原因とされる希少な先天性赤芽球癆である。DBA の約 40% で、軟骨形成不全が関与すると思われる頭蓋顔面や全身の形態異常など様々な奇形を合併する。原因遺伝子としていくつかの RP 遺伝子変異が報告されているが、その中でも特に *RPL5* 変異は形態異常を合併する割合が 70% と高頻度で、またその程度は重篤であることが報告されている。主症状である赤血球産生障害の原因に関しては、RP 異常に起因した核小体ストレス反応として、p53 の主要な抑制因子の一つとされる Murine double minute 2 (MDM2) の機能が抑制されることで p53 細胞死経路が活性化し、赤血球の生成過程でアポトーシスが誘導されるためと考えられている。このように貧血の原因が解明されてきた一方で、DBA に合併される形態異常に関しては、DBA モデルの *RPS19* 欠損ゼブラフィッシュにおいて頭蓋顔面の軟骨形成不全が報告されているが、分子学的機序についての報告は乏しく、未だ不明な点が多い。そこで本研究は、形態異常の合併率が高い *RPL5* 変異に着目し、*RPL5* 変異患者由来の人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells : iPS 細胞) を樹立して病態モデルの軟骨細胞を作製することで形態異常の発生機序を検討した。

【試料および方法】

RPL5 変異 c.175_176del:p.D59Yfs*53 患者および健常血縁者である患者母親の血球細胞から iPS 細胞を樹立した。本研究では骨格を形成する骨と軟骨に着目し、間葉系幹細胞 (MSC) を経て、iPS 細胞を軟骨細胞、骨芽細胞へ分化させた。そして、定量 RT-PCR 法にて軟骨細胞および骨芽細胞への分化能を比較し、Alcian-blue (AB) 染色および Alizarin-red (AR) 染色にて軟骨基質および骨基質形成能を評価した。次に、軟骨細胞、骨芽細胞におけるアポトーシスを評価するため、TUNEL 染色および定量 RT-PCR を行った。最後に、軟骨細胞のアポトーシスにおける MDM2 の関与を検討するため、DBA 患者由来の軟骨細胞に MDM2 促進薬、健常者由来の軟骨細胞に MDM2 阻害薬を添加し、TUNEL 染色および定量 RT-PCR 法を用いて軟骨細胞におけるアポトーシスを評価し、AB 染色

により基質形成能への影響を確認した。

【結果および考察】

健常者由来の対照群 (CONT) と DBA 患者由来の実験群 (DBA) は、ともに軟骨細胞への分化誘導後に *SOX9*, *ACAN*, *Col X* 発現は上昇したが、DBA では AB 染色の染色性が低く、染色領域の比較では有意差が認められた。一方で、骨芽細胞への分化誘導後の DBA および CONT では、どちらも *OSX*, *OPN*, *BSP* の発現が上昇し、AR 染色においては有意差を認めなかった。軟骨細胞、骨芽細胞におけるアポトーシスを検討するために TUNEL 染色を行ったところ、DBA の軟骨細胞では TUNEL 陽性細胞数の著明な増加を認め、また *p53* 下流遺伝子である *BAX*, *CASP9* は有意に上昇した。これと対照的に、CONT の軟骨細胞および CONT と DBA の骨芽細胞では TUNEL 陽性細胞をほとんど認めず、さらに *BAX*, *CASP9* 発現においても著明な増加はみられなかった。また、*TP53* の発現は、CONT および DBA の軟骨細胞および骨芽細胞のいずれにおいても減少を示したことから、DBA の軟骨細胞の *p53* 細胞死経路には *p53* の転写異常ではなく *p53* の翻訳後修飾における異常が関与していることが示された。*p53* 細胞死経路の活性化における *MDM2* の関与を検討するため、DBA に対して *MDM2* 促進薬を添加した結果、アポトーシス陽性細胞数が減少し、*BAX*, *CASP9* 発現は有意に減少した。その一方で、AB 染色性は増加を示したが、CONT と同様のレベルまでアポトーシス陽性細胞数を減少し基質形成を増加させるまでには至らなかった。また、CONT に対して *MDM2* 阻害薬を添加した結果、アポトーシス陽性細胞数および *BAX*, *CASP9* 発現の著明な増加を認め、AB 染色性は減少を示した。これらの結果から、DBA の軟骨細胞のアポトーシスにおける *MDM2* の関与が示された。

【結論】

RPL5 変異患者由来の軟骨細胞では、*RP* 遺伝子変異に起因する *MDM2* の機能抑制による *p53* 細胞死経路の活性化の結果アポトーシスが誘導され、頭蓋底、鼻中隔、長管骨端の軟骨形成不全によって、扁平な鼻をはじめとした頭蓋顔面形態異常や四肢の短小、低身長が生じている可能性が示唆された。