

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

福井 裕子

緒言

ダイヤモンド・ブラックファン貧血 (DBA) は、およそ 15~20 万人に 1 人の割合で乳児期に発症する先天性の赤芽球癆である。DBA の臨床所見として、骨髓は正形成であるが赤血球前駆細胞の著しい減少を示し、末梢血では網状赤血球の減少と大球性正色素性貧血を呈する¹⁻⁴⁾。DBA 患者のサンプルやマウスモデルにおいては、前期赤芽球系前駆細胞 (burst-forming unit-erythroid : BFU-E) と後期赤芽球系前駆細胞 (colony-forming unit-erythrocyte : CFU-E) 形成の著しい抑制が観察される⁵⁻⁷⁾。また、DBA 全体の約 40% に大頭, 小頭, 口唇裂, 口蓋裂, 平坦な鼻, 両眼開離, 泌尿器, 生殖器, 心臓の異常や低身長などの様々な形態異常を合併し, 中でも頭蓋顔面部の異常が最も多く観察される。DBA のほとんどは散发例であるが, 10~20% には家族歴があり常染色体優性遺伝の形式をとる。病因に関しては, DBA の 60% に大小のリボソームサブユニットのタンパク質 (RP) をコードする RP 遺伝子 (*RPS19*, *RPS17*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL35a* など) のヘテロ接合突然変異あるいは欠損が見つかっており, RP 遺伝子のハプロ不全が疾患を引き起こすと考えられている。原因遺伝子とされる RP 遺伝子の中でも, 特に *RPL5* 変異は, 発症率が 6.6% と低いものの形態異常を合併する割合はおおよそ 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⁸⁾。生命予後は一般的に良好とされているが, 発がん素因を有することが報告されており, 骨髓異形成症候群 (MDS), 白血病, 大腸癌, 骨肉腫などの悪性疾患を合併する頻度が高い¹⁻⁴⁾。

近年の報告では, DBA の主症状である赤血球産生障害の原因に関しては, RP 遺伝子異常に対するストレス反応として *TP53* にコードされる代表的ながん抑制遺伝子である *p53* が活性化され, 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⁹⁻¹²⁾。この RP 遺伝子異常に起因する *p53* の活性化には, *p53* の主要な抑制因子の一つとされる E3 ユビキチンリガーゼであり, *p53* の

ユビキチン化を媒介する癌タンパク質 murine double minute 2 (MDM2) が関与する。非ストレス時、p53 は常に低いレベルで発現しているが、主に MDM2 が媒介するユビキチン-プロテアソーム経路により恒常的に分解され、核質内の p53 タンパク質レベルは低く保たれている。正常な細胞では、核小体内で rRNA が転写され、rRNA と RP からリボソームサブユニットが構築されるが、RP に異常が生じるとリボソームサブユニットの構築が阻害され、核小体ストレスが生じる。DBA では、RP 遺伝子変異により核小体ストレス応答が誘導され、RP が核小体から核質へ移行し MDM2 に結合することで MDM2 の機能を抑制する。この結果 p53 が安定化し、p53 下流遺伝子が活性化されアポトーシスが引き起こされる¹³⁻¹⁶⁾。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¹⁷⁾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。

先に示した DBA 患者に観察される形態異常の中でも、特に扁平な鼻、四肢の短小、低身長といった形態異常は軟骨形成不全に起因することが疑われる。また、過去に *Gagln3* トランスジェニックマウスにおいて、軟骨内骨化の過程で軟骨細胞にアポトーシスが生じた結果、成長板構造の破壊にともなう小人症がもたらされたことも報告されている¹⁸⁾。これらの知見から、我々は、頭蓋底、鼻中隔、長管骨端部の軟骨細胞のアポトーシスに起因する軟骨内骨化の異常が、頭蓋顔面の形態異常や低身長に関与しているのではないかと仮説立て、形態異常の合併率が高いとされる *RPL5* 変異に着目した⁸⁾。しかしながら、*RPL5* 変異を再現した動物モデルは確立されておらず、また、患者由来の細胞を得ることは疾患の希少性（特に *RPS19* 以外の RP 変異患者）および組織採取の侵襲性によって制限される。近年の研究では、DBA 患者由来の人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cells : iPS 細胞）が造血障害を再現し遺伝的補正が可能であることが示されており、DBA の病態解明において有効であることが述べられている^{19,20)}。そこで本研究では、DBA の原因遺伝子の一つである *RPL5* c.175_176del (p.Asp59Tyrfs*53) 患者の血液から iPS 細胞を樹立²¹⁾し、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。

材料ならびに方法

1. iPS 細胞の樹立

岡山大学病院小児科にて *RPL5* に mRNA 上の開始コドンから 175, 176 番目に相当する塩基の欠失によるフレームシフト変異を持つ c.175_176del

(p.Asp59Tyrfs*53) 患者, および健常血縁者である患者母親の血液を採取し, 京都大学 iPS 細胞研究所にて血液より単離した白血球から通法に従い iPS 細胞を樹立した²¹⁾。なお本研究の iPS 細胞の取り扱いおよび実験手順はすべて, 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科倫理委員会の承認 (研 1608-030) のもと行い, 研究への参加に先立ち, すべての被験者からインフォームドコンセントを得た。

2. iPS 細胞の培養

製造業者のプロトコルに従い, 60 mm 培養皿をリプロコート (Repro Cell, 神奈川, 日本) で 8 時間コーティング後, マウス胎児由来線維芽細胞 (Mouse Embryonic Fibroblast : MEF, Repro Cell) を播種した。8 時間後に MEF 上に iPS 細胞を播種し, 培地には 4 ng/ μ l 塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF: ReproCELL) を添加した ES 細胞培地 (ReproCELL) を使用した。培地は毎日交換し, 週 2 回継代を行った。オンフィーダー培養の開始から 2 週間後に, StemFit AK02N 培地 (味の素, 東京, 日本) を使用したフィーダーフリー培養へ移行した。プロトコルに従い, ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (Dulbecco's Phosphate-Buffered saline : DPBS, Gibco, Grand Island, NY, 米国) で 0.5 μ g/ μ l² に希釈したラミニン 511-E8 断片を 60 mm 培養皿に 3.3 ml 添加し, 37 °C, 5%CO₂ の加湿インキュベーター内に静置してコーティングした。1 時間後, ラミニン 511-E8 断片溶液を除去し, 培地の製造業者のプロトコルに従い iPS 細胞を播種した。要約すると以下の通りである。iPS 細胞の培養皿から使用済み培地を除去し, 細胞を PBS で洗浄した。続いて, 665 μ l の 0.5 \times TrypLE Select (Life Technologies, Carlsbad, CA, 米国) を添加し, 37 °C, 5%CO₂ の加湿インキュベーター内で 7 分間静置した。次いで, TrypLE Select を除去し, 細胞を再び PBS で洗浄し, Rho 結合キナーゼ阻害剤である Y-27632 (和光, 大阪, 日本) を 10 μ M 含む 2.2 ml の StemFit AK02N 培地を添加した。培養皿の底面に接着している iPS 細胞を, スクレーパーを用いて剥がし, 15 ml の遠心管に集め, ラミニン 511-E8 断片でコーティングした 60 mm 培養皿上に 1.3 \times 10⁵ cells/ウェルの密度で播種した。翌日培地を除去し, Y-27632 を含まない StemFit AK02N 培地と交換した。培地は 1 日目, 2 日目, 5 日目および 6 日目に交換した。

3. iPS 細胞の間葉系幹細胞 (MSC)への分化誘導

過去の報告^{22,23)}に従い、フィーダーフリー培養のiPS細胞の培養皿から使用済み培地を除去し、MSC分化誘導培地として、10%熱不活性化牛胎児血清

(Heat-Inactivated Fetal Bovine Serum : HFBS, HyClone, Logan, UT, 米国) , 1%ペニシリン/ストレプトマイシン (それぞれ 100 U/mL ならびに 100 μ g/mL : Invitrogen, Carlsbad, CA, 米国) , 4 ng/ μ l bFGF, 10 mM 非必須アミノ酸溶液

(Non-Essential Amino Acids Solution : NEAA, Gibco) を含有する α 改変型最小必須培地 (α -MEM : Invitrogen) を添加した。培地は培養1日目から14日目まで毎日交換した。培養14日目に5%トリプシン/EDTA (Life Technologies) を使用して培養皿から細胞を剥がし、100 mm 培養皿へ播種した。MSC培養培地には、15%HFBS, 1 mM ペニシリン/ストレプトマイシンを含有した低グルコース濃度のダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium : DMEM, Invitrogen) を用い、培地は週2回交換した。

4. iPS 細胞由来 MSC の軟骨細胞への分化誘導

軟骨細胞への分化のために、過去の報告²⁴⁾に従い 3×10^5 細胞を15 mLのポリプロピレン円錐管 (Corning, NY, 米国) 中に遠心して沈殿させ、100 nM デキサメタゾン, 1 mM ナトリウムピルビン酸, 0.17 mM L-アスコルビン酸, 0.35 mM L-プロリン (すべて Sigma Aldrich, St Louis, MI, 米国) , 1 mM ペニシリン/ストレプトマイシン, 1 mM ITS+Universal Culture Supplement Premix (BD Biosciences, San Jose, CA, 米国) , 及び 10 ng/ml のヒト形質転換成長因子 β 3 (Transforming Growth Factor- β 3 : TGF- β 3, R&D Systems, Minneapolis, MN, 米国) を含有する高グルコース濃度の DMEM で3週間培養した。培地は週に2回交換した。3週間培養後の軟骨細胞塊は、パラホルムアルデヒドで固定後パラフィン包埋し、常法により厚さ6 μ mの切片を作製した。軟骨細胞への分化は、定量RT-PCRとAlcian-blue染色 (AB染色) を用いて評価した。

5. iPS 細胞由来 MSC の骨芽細胞への分化誘導

骨芽細胞への分化のために、過去の報告²⁴⁾に従い 2×10^5 細胞を、6ウェル培養プレートおよびpoly-D-lysineとフィブロネクチンで二重コーティングしたチャンバースライド上で、10%HFBS, 1 mM ペニシリン/ストレプトマイシン, 100 nM のデキサメタゾン, 0.05 mM のL-アスコルビン酸, 10 mM β -グリセロリン酸

(Sigma Aldrich) を含む α -MEM で 3 週間培養した。培地は週に 2 回交換した。骨芽細胞への分化は、定量 RT-PCR と Alizarin-red 染色 (AR 染色) を用いて評価した。

6. TUNEL アッセイ

細胞死は、In Situ Cell Death Detection Kit (Roche, Mannheim, 独国) を用いた TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) アッセイにより測定した。内容は以下のとおりである。作製した切片をキシレンで脱パラフィンし、エタノール系列中で親水化後、前処理としてプロテイナーゼ K (10 μ g/ml, Tris/HCl 10 mM) で 25°C, 15 分間静置した。PBS で 2 回洗浄後、TUNEL 反応液中で 37 °C, 60 分間反応させ、PBS で 3 回洗浄後に、4', 6-diamino-2-phenylindole (DAPI: Sigma Aldrich) で室温 10 分間反応させ、DAKO Fluorescent Mounting Medium (DAKO, CA, 米国) で封入した。観察は、光学顕微鏡 (DP72, オリンパス, 東京, 日本) を用いて行った。

7. 定量 RT-PCR

ISOGEN (ニッポンジーン, 東京, 日本) を製造業者のプロトコルに従って使用し、Total RNA を抽出した。逆転写反応は ReverTra Ace qPCR RT Kit (東洋紡, 大阪, 日本) を用いた。得られた cDNA は遺伝子特異的プライマーと SYBR Green を用いて増幅させ、LightCycler System (Roche Diagnostics, Mannheim, 独国) にて定量解析を行った。各 mRNA は *Actin beta* (*ACTB*) を用いて標準化した。この実験で用いた遺伝子特異的プライマーを表 1 に記載する。

8. MDM2 促進薬および MDM2 阻害薬の添加

DBA 群および NOR 群の軟骨細胞分化誘導培地および骨芽細胞分化誘導培地に、MDM2 促進薬の NSC207895 (10 μ M, Selleck Chemicals, TX, 米国), MDM2 阻害薬の Nutlin-3, Nutlin-3a (どちらも 10 μ M, Selleck Chemicals) および YH239-EE (1 μ M, Selleck Chemicals) を添加した上で実験を行った²⁵⁾。すべてのサンプルは DMSO に溶解し使用した。コントロール群には、同量の DMSO の添加を行った。

9. 統計解析

各実験系におけるデータは平均±標準誤差 (SD) として表した。2 群間の比較はスチューデントの t 検定で行った。差は, $p < 0.05$ の場合に有意であるとみなした。3 群間の差については, 多重性を考慮してボンフェロー二法を用いた。

結果

1. *RPL5* 変異患者の臨床所見

RPL5 c.175_176del (p.Asp59Tyrfs*53) を持つ 10 歳男児の臨床所見として, 口唇裂, 口蓋裂, 両眼開離, 平坦な鼻などの頭蓋顔面の形態異常や, 四肢の短小, 低身長が観察された。口腔内では, 乳歯の晩期残存, 永久歯の先天欠如および萌出遅延がみられた。エックス線所見では, 膜性骨化を示す頭蓋冠や鎖骨の骨化には明らかな異常を認めなかった (図 1)。

2. 軟骨細胞, 骨芽細胞への分化能の評価

MSC から軟骨細胞への分化培養後の細胞では, 健常者由来の対照群 (CONT) と DBA 患者由来の実験群 (DBA) とともに, 軟骨細胞マーカー遺伝子である *SOX9*, *ACAN*, および *COL10A1* の mRNA 発現レベルは増加した。AB 染色では, DBA において軟骨細胞断面の中心部および周辺部ともに染色性の著しい低下を認めた。細胞塊断面積に対する染色面積を定量解析した結果, CONT と DBA の間には有意差が見られた (図 2A)。

MSC から骨芽細胞への分化培養後の細胞では, CONT, DBA とともに骨芽細胞マーカー遺伝子である *OSX*, *BSP* の mRNA 発現レベルの増加を認めた。AR 染色の結果, CONT 群と DBA 群ともに染色性に有意差は見られなかった (図 2B)。

3. 軟骨細胞におけるアポトーシスの増加

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, TUNEL アッセイを行った。CONT の軟骨細胞では TUNEL 陽性細胞は疎であったが, DBA の軟骨細胞では, 主に細胞塊中心部に TUNEL 陽性細胞を認めた (図 3A, B)。CONT および DBA の骨芽細胞では, どちらの群でもアポトーシスはほとんどみられな

かった。p53 細胞死経路の関与を確認するために軟骨細胞および骨芽細胞への分化前後で *TP53* および *p53* 下流遺伝子である *BAX*, *CASP9* の発現量を比較したところ、*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有意差がなかった。また、*BAX*, *CASP9* の発現は、CONT の軟骨細胞、骨芽細胞および DBA の骨芽細胞で有意差がみられなかったが、DBA の軟骨細胞では著明に増加した (図 3C, D)。

4. p53 細胞死経路の活性化における MDM2 の関与

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 患者由来 MSC の軟骨細胞分化誘導培地に MDM2 促進薬を添加した結果、DMSO を添加したコントロール群 (DMSO) と比較してアポトーシス陽性細胞数が減少 (図 4Aa) し、*BAX*, *CASP9* 発現は有意に減少した (図 4Ab)。その一方で、AB 染色性は増加を示した (図 4Ac) 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、健常者由来 MSC の軟骨細胞分化誘導培地に 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 (図 4Ba, Bb)、AB 染色性は減少を示した (図 4Bc)。

考察

DBA を含むリボソーム関連遺伝子に起因する疾患はまとめてリボソーム病とよばれており²⁶⁾、その臨床的特徴は様々である²⁷⁾。例えば、*RPS14* 変異に起因する 5q-症候群は造血障害を認めるが骨格の異常を示さない²⁸⁾ 一方で、5.8S rRNA の成熟に関わる *RMRP* の異常に起因する軟骨毛髪低形成症では、造血障害の他に毛髪や骨格の異常を合併する^{29,30)}。タンパク質合成という生命維持に必要な不可欠なリボソームの役割は体内の全ての細胞で共通しているにも関わらず、先に示したように RP 異常に起因する臨床症状は組織特異的であり、その理由は未だ解明されていない。そこで本研究では、骨格の異常を高頻度で合併する *RPL5* 変異患者由来の細胞を用い、RP 異常の軟骨組織への影響を検討した。

骨格の発達には、軟骨内または膜性骨化のいずれかにより進行するため、本研究では軟骨細胞と骨芽細胞に着目した。正常な軟骨では、軟骨細胞の増殖、前肥

大、肥大化、石灰化の順に軟骨内骨化が進行し、骨の長径が増加する。DBA の軟骨細胞では、CONT の軟骨細胞と同様に *SOX9* の発現増加を認め、また、静止軟骨細胞、増殖軟骨細胞に強く発現される *ACAN* および肥大軟骨細胞で発現される *COL10A1* も上昇を示したことから、軟骨細胞への分化誘導におけるトランスクリプトーム形成は障害されていないことが確認された。対照的に、AB 染色像からは軟骨基質の著減を認めるとともに、軟骨細胞の凝集の抑制およびアポトーシスの亢進を認めた。これらの結果からは、基質形成の低下が軟骨細胞の成熟プロセスの異常ではなく、成熟過程で軟骨細胞のアポトーシスが誘導され総細胞数の減少が起こることで、結果として AB 染色性の低下が生じたためと考察される。

DBA 患者由来の軟骨細胞では、アポトーシスの増加とともに *BAX*, *CASP9* の発現が著しく増加していた。このことから、アポトーシスにおける *p53* 細胞死経路の活性化の関与が示唆された。その一方で、*p53* の発現自体は CONT と DBA の軟骨細胞のいずれも、分化前後で有意差がなかった。これらの結果から、DBA の軟骨細胞の *p53* 細胞死経路には、*TP53* mRNA 量の亢進ではなく *TP53* 転写後の異常が関与している可能性が示された⁹⁾。

正常な細胞では、*p53* は常に低いレベルで作られているが、大部分の *p53* は E3 ユビキチンリガーゼである *MDM2* によりユビキチン化され、プロテアソーム経路に導かれ分解される。これによって、核内の *p53* タンパク質レベルは常に低く保たれている。本研究では、DBA 患者由来の軟骨細胞に対する *MDM2* 促進薬の添加により、アポトーシスの減少、*BAX*, *CASP9* の減少および軟骨基質形成の増加がみられたことから、アポトーシスへの *MDM2* の関与が示された。これまでに、*MDM2* に結合する RP として、*RPL5* 以外にも *RPS7*, *RPS14*, *RPL11*, *RPL23*, *RPL26*, *RPS27* が発見されて³¹⁻³⁸⁾ おり、本研究に用いた *RPL5* 変異軟骨細胞においても、RP 不均衡に起因する核小体ストレスによって、これらの RP が *MDM2* に結合することで *MDM2* の機能を抑制する結果、*p53* の安定化および *p53* 下流遺伝子の活性化が生じていると考察される (図 5)。マウスを用いた過去の研究では、*MDM2* の消失が、*p53* 下流遺伝子の中でも細胞周期に関わる遺伝子ではなく、特にアポトーシス関連遺伝子の活性化を示したことが報告されており³⁹⁾、軟骨細胞における細胞増殖への影響についても今後検討する必要がある。本研究では、軟骨細胞とは対照的に骨芽細胞にはアポトーシスが認められなかったが、これまでの知見では、*BMP-smad* シグナリングの亢進により *p53* 細胞死経路を活

性化されたマウスの頭蓋顔面の発生過程において、骨組織と比較して軟骨組織に多くのアポトーシスが観察されており⁴⁰⁾、この結果から、発生過程の軟骨細胞はアポトーシスに対する感受性が高い可能性が示唆される。

本研究で着目した *RPL5* 変異の DBA 患者は、多因子遺伝とされる口唇口蓋裂の合併率が高いことでも知られている。一般的な口唇口蓋裂の発症頻度は 0.1～0.2% であるのに対して、*RPL5* 変異患者では約 5% が口唇口蓋裂を合併する。しかし、*RPS19* 変異患者では口唇口蓋裂を伴うケースは報告されていない。その他にも、*RPL11* 変異患者には指の異常が多いことが報告されている⁸⁾。これらの知見は、個々の RP が様々な組織に特異的な役割を担っており、*RPL5* が頭蓋顔面の発生に特別な役割を持つ可能性を示唆している。このような、RP の組織特異的な役割についても今後の興味深い検討事項であると考えられる。

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。

謝辞

稿を終えるにあたり、懇篤なる御指導、御校閲を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯科矯正学分野上岡寛教授に心より感謝の意を表します。また、本研究の遂行に際し、御指導、御協力をいただきました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯科矯正学分野川邊紀章准教授、早野暁助教に謹んで感謝の意を表します。そして、患者および患者母親の血液標本を採取していただきました岡山大学病院小児血液・腫瘍科 嶋田明准教授、iPS 細胞を樹立していただきました京都大学 iPS 細胞研究所 臨床応用研究部門 疾患再現研究分野 斎藤潤准教授に深甚なる謝意を評します。最後に、本研究を行うにあたり多くの貴重な御援助と御協力をいただきました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯科矯正学分野の諸先生に厚く御礼申し上げます。

表題脚注

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

第 77 回日本矯正歯科学会学術大会（2018 年 11 月，横浜）

図の説明

図 1

RPL5 c.175_176del (p.Asp59Tyrfs*53) を持つ 10 歳男児の顔面写真，口腔内写真およびエックス線画像

図 2

軟骨細胞，骨芽細胞への分化能および基質形成能の比較

(A) 軟骨細胞分化マーカーである *SOX9*, *ACAN*, *COL10A1* mRNA 量の比較。軟骨細胞の Alcian blue 染色像。棒グラフは染色領域の割合を示す。平均値±標準偏差, n=3。**p<0.01 : CONT と比較。スケールバー : 10 μm。

(B) 骨芽細胞分化マーカーである *OSX*, *OPN*, *BSP* mRNA 量の比較。骨芽細胞の Alizarin red 染色像。棒グラフは染色領域の割合を示す。平均値±標準偏差, n=3。**p<0.01 : CONT と比較。スケールバー : 10 μm。

図 3

軟骨細胞，骨芽細胞におけるアポトーシスの比較

(A, B) 軟骨細胞および骨芽細胞の TUNEL 染色において，TUNEL 陽性細胞（緑色）を示す。核は DAPI（青色）で染色された。棒グラフは，軟骨細胞および骨芽細胞のアポトーシスの割合を示す。平均値±標準偏差, n=3。**p<0.01 : CONT と比較。

(C, D) 軟骨細胞，骨芽細胞における *p53* 下流遺伝子の発現比較。平均値±標準偏差, n=3。**p<0.01 : 分化前と比較。

図 4

MDM2 促進薬および MDM2 阻害薬の効果の比較

(Aa および Ba) MDM2 促進薬を添加した DBA 群の軟骨細胞, および MDM2 阻害薬を添加した CONT 群の軟骨細胞の TUNEL 染色の結果。棒グラフは, 軟骨細胞のアポトーシスの割合を示す。平均値±標準偏差, n=3。 **p< 0.01 : DMSO と比較。

(Ab および Bb) 棒グラフは, *BAX*, *CASP9* 発現の比較を示す。平均値±標準偏差, n=3。 *p< 0.05, **p< 0.01 : DMSO と比較。

(Ac および Bc) AB 染色像の比較。棒グラフは染色領域の割合を示す。平均値±標準偏差, n=3。 **p< 0.01 : DMSO と比較。スケールバー : 10 μm。

図 5

RP 異常に起因する p53 細胞死経路活性化の機序を示す概略図

(A) 健常者の軟骨細胞。p53 は低いレベルで発現しているが, ユビキチンリガゼである MDM2 が p53 に結合し, ユビキチン-プロテアソーム経路により恒常的に分解されることで核内の p53 タンパク質レベルは低く保たれている。

(B) DBA の軟骨細胞。DBA では, RP 遺伝子変異によりリボソームの成熟阻害と RP の不均衡が生じる。これにより, 核小体構造が崩壊して核小体ストレスが誘導されるため, RP が核小体から核質へ移行し MDM2 に結合する。この結果, MDM2 の機能が抑制され p53 の安定化が生じることで, p53 下流遺伝子が活性化されアポトーシスが引き起こされる。

参考文献

- 1) Boisson, B., Honda, Y., Ajiro, M., Bustamante, J., Bendavid, M., Gennery, A.R., Kawasaki Y., Ichishima J., Osawa, M., Nihira, H., Shiba T., Tanaka, T., Chrabieh, M., Bigio, B., Hur, H., Itan, Y., Liang, Y., Okada, S., Izawa, K., Nishikomori, R., Ohara, O., Heike, T., Abel, L., Puel, A., Saito, M.K., Casanova, J.L., Hagiwara, M., Yasumi, T.: Rescue of recurrent deep intronic mutation underlying cell type-dependent quantitative NEMO deficiency. *J Clin Invest.*, **129**, 583-597, 2019.
- 2) Lipton, J.M., Ellis, S.R.: Diamond Blackfan Anemia: Diagnosis, Treatment and Molecular Pathogenesis. *Hematol Oncol Clin North Am.*, **23**, 261-82, 2009.

- 3) Da Costa, L., Willig, T.N., Fixler, J., Mohandas, N., Tchernia, G.:
Diamond-Blackfan anemia. *Curr Opin Pediatr.*, **13**, 10-5, 2001.
- 4) Toki, T., Ito, E.: Molecular mechanisms underlying the pathology of
Diamond-Blackfan anemia. *Rinsho Ketsueki.*, **56**, 867-76, 2015.
- 5) Flygare, J., Karlsson, S.:
Diamond-Blackfan anemia: erythropoiesis lost in translation. *Blood.*, **109**, 3152-4,
2007.
- 6) Sjögren, S.E., Siva, K., Soneji, S., George, A.J., Winkler, M., Jaako, P., Wlodarski,
M., Karlsson, S., Hannan, R.D., Flygare, J.: Glucocorticoids improve erythroid
progenitor maintenance and dampen Trp53 response in a mouse model of
Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol.*, **171**, 517-29, 2015.
- 7) Nathan, D.G., Clarke, B.J., Hillman, D.G., Alter, B.P., Housman, D.E.:
Erythroid precursors in congenital hypoplastic (Diamond-Blackfan) anemia. *J Clin
Invest.*, **61**, 489-98, 1978.
- 8) Bagnara, G.P., Zauli, G., Vitale, L., Rosito, P., Vecchi, V., Paolucci, G., Avanzi,
G.C., Ramenghi, U., Timeus, F., Gabutti, V.:
In vitro growth and regulation of bone marrow enriched CD34+ hematopoietic pro
genitors in Diamond-Blackfan anemia. *Blood.*, **78**, 2203-10, 1991.
- 9) Gazda, H.T., Sheen, M.R., Vlachos, A., Choesmel, V., O'Donohue, M.F., Schneider,
H., Darras, N., Hasman, C., Sieff, C.A., Newburger, P.E., Ball, S.E.,
Niewiadomska, E., Matysiak, M., Zaucha, J.M., Glader, B., Niemeyer C.,
Meerpohl. J.J., Atsidaftos, E., Lipton, J.M., Gleizes, P.E., Beggs, A.H.: Ribosomal
Protein L5 and L11 Mutations Are Associated with Cleft Palate and Abnormal
Thumbs in Diamond-Blackfan Anemia Patients. *Am J Hum Genet.*, **83**, 769-80,
2008.
- 10) Dutt, S., Narla, A., Lin, K., Mullally, A., Abayasekara, N., Megerdichian, C.,

- Wilson, F.H., Currie, T., Khanna-Gupta, A., Berliner, N., Kutok, J.L., Ebert, B.L.: Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood.*, **117**, 2567-76, 2011.
- 11) Flygare, J., Kiefer, T., Miyake, K., Utsugisawa, T., Hamaguchi, I., Da Costa, L., Richter, J., Davey, E.J., Matsson, H., Dahl, N., Wiznerowicz, M., Trono, D., Karlsson, S.: Deficiency of ribosomal protein S19 in CD34+ cells generated by siRNA blocks erythroid development and mimics defects seen in Diamond-Blackfan anemia. *Blood.*, **105**, 4627-34, 2005.
 - 12) Boultonwood, J., Pellagatti, A., Wainscoat, J.S.: Haploinsufficiency of ribosomal proteins and p53 activation in anemia: Diamond-Blackfan anemia and the 5q-syndrome. *Adv Biol Regul.*, **52**, 196-203, 2012.
 - 13) Perdahl, E.B., Naprstek, B.L., Wallace, W. C., Lipton, J.M.: Erythroid failure in Diamond-Blackfan anemia is characterized by apoptosis. *Blood.*, **183**, 5-650, 1994.
 - 14) Hölzel, M., Burger, K., Mühl, B., Orban, M., Kellner, M., Eick, D.: The tumor suppressor p53 connects ribosome biogenesis to cell cycle control: a double-edged sword. *Oncotarget.*, **1**, 43-7, 2010.
 - 15) McGowan, K.A., Li, J.Z., Park, C.Y., Beaudry, V., Tabor, H.K., Sabnis, A.J., Zhang, W., Fuchs, H., de Angelis, M.H., Myers, R.M., Attardi, L.D., Barsh, G.S.: Ribosomal mutations cause p53-mediated dark skin and pleiotropic effects. *Nat Genet.*, **40**, 963-70, 2008.
 - 16) Lindström, M.S., Nistér, M.: Silencing of ribosomal protein S9 elicits a multitude of cellular responses inhibiting the growth of cancer cells subsequent to p53 activation. *PLoS One.*, **5**, e9578, 2010.
 - 17) Zhang, Q., Xiao, H., Chai, S.C., Hoang, Q.Q., Lu, H.: Hydrophilic residues are crucial for ribosomal protein L11 (RPL11) interaction with zinc finger domain of

MDM2 and p53 protein activation. *J Biol Chem.*, **286**, 38264-74, 2011.

- 18) Danilova, N., Sakamoto, K.M., Lin, S.: Ribosomal protein S19 deficiency in zebrafish leads to developmental abnormalities and defective erythropoiesis through activation of p53 protein family. *Blood.* **112**, 5228-37, 2008
- 19) Yoshida, C.A., Kawane, T., Moriishi, T., Purushothaman, A, Miyazaki, T, Komori, H, Mori, M, Qin, X, Hashimoto, A., Sugahara, K., Yamana, K., Takada, K., Komori, T.: Overexpression of Galnt3 in chondrocytes resulted in dwarfism due to the increase of mucin-type O-glycans and reduction of glycosaminoglycans. *J Biol Chem.*, **289**, 26584-96, 2014.
- 20) Ge, J., Apicella, M., Mills, J.A., Garçon, L., French, D.L., Weiss, M.J., Bessler, M., Mason, P.J.: Dysregulation of the Transforming Growth Factor β Pathway in Induced Pluripotent Stem Cells Generated from Patients with Diamond Blackfan Anemia. *PLoS One.*, **10**, e0134878, 2015.
- 21) Garçon, L., Ge, J., Manjunath, S.H., Mills, J.A., Apicella, M., Parikh, S., Sullivan, L.M., Podsakoff, G.M., Gadue, P., French, D.L., Mason, P.J., Bessler, M., Weiss, M.J.: Ribosomal and hematopoietic defects in induced pluripotent stem cells derived from Diamond Blackfan anemia patients. *Blood.*, **122**, 912-21. 2013.
- 22) Kimbrel, E.A., Kouris, N.A., Yavarian, G.J., Chu, J., Qin, Y., Chan, A., Singh, R.P., McCurdy, D., Gordon, L., Levinson, R.D., Lanza, R.: Mesenchymal stem cell population derived from human pluripotent stem cells displays potent immunomodulatory and therapeutic properties. *Stem Cells Dev.*, **23**, 1611-24, 2014.
- 23) Nejadnik, H., Diecke, S., Lenkov, O.D., Chapelin, F., doing, J., Tong, X., Derugin, N., Chan, R.C., Gaur, A., Yang, F., Wu, J.C., Daldrup-Link, H.E.: Improved approach for chondrogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev.*, **11**, 242-53, 2015.

- 24) Fukushima, H., Kawanabe, N., Murata, S., Ishihara, Y., Yanagita, T., Balam, T.A., Yamashiro, T.: SSEA-4 is a marker of human deciduous periodontal ligament stem cells. *J Dent Res.*, **91**, 955-60, 2012.
- 25) Maimets, T., Neganova, I., Armstrong, L., Lako, M.: Activation of p53 by nutlin leads to rapid differentiation of human embryonic stem cells. *Oncogene.*, **27**, 5277-87, 2008.
- 26) Nakhoul, H, Ke, J., Zhou, X., Liao, W, Zeng, S.X., Lu, H.: Ribosomopathies: mechanisms of disease. *Clin Med Insights Blood Disord.*, **7**, 7-16, 2014.
- 27) Narla, A., Ebert, B.L.: Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood.*, **115**, 3196-205, 2010.
- 28) Ebert, B.L; Pretz, J., Bosco, J., Chang, C.Y., Tamayo, P., Galili, N., Raza, A., Root, D.E., Attar, E., Ellis, S.R., Golub, T.R.: Identification of RPS14 as a 5q-syndrome gene by RNA interference screen. *Nature.*, **451**, 335-9, 2008.
- 29) Ridanpää, M., van Eenennaam, H., Pelin, K., Chadwick, R., Johnson, C., Yuan, B., vanVenrooij, W., Pruijn, G., Salmela, R., Rockas, S., Mäkitie, O., Kaitila, I., de la Chapelle, A.: *Mutations in the RNA component of RNase MRP cause a pleiotropic human disease, cartilage-hair hypoplasia.* *Cell.*, **104**, 195-203, 2001.
- 30) Trainor, P.A., Merrill, A.E.: Ribosome biogenesis in skeletal development and the pathogenesis of skeletal disorders. *Biochim Biophys Acta.*, **1842**, 769-78, 2014.
- 31) Zheng, J., Lang, Y., Zhang, Q., Cui, D., Sun, H., Jiang, L., Chen, Z., Zhang, R., Gao Y., Tian, W., Wu, W., Tang, J., Chen, Z.: Structure of human MDM2 complexed with RPL11 reveals the molecular basis of p53 activation. *Genes Dev.*, **29**, 1524-34. 2015.
- 32) Lohrum, M.A., Ludwig, R.L., Kubbutat, M.H., Hanlon, M., Vousden, K.H.: Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer Cell.*, **3**,

577-87, 2003.

- 33) Dai, M.S., Lu, H.: Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5. *J Biol Chem.*, **279**, 44475-82, 2004.
- 34) Jin, A, Itahana, K., O'Keefe, K., Zhang, Y.: Inhibition of HDM2 and activation of p53 by ribosomal protein L23. *Mol Cell Biol.*, **24**, 7669-80, 2004.
- 35) Chen, D, Zhang, Z., Li, M., Wang, W., Li, Y., Rayburn, E.R., Hill, D.L., Wang, H., Zhang, R.: Ribosomal protein S7 as a novel modulator of p53-MDM2 interaction: binding to MDM2, stabilization of p53 protein, and activation of p53 function. *Oncogene.*, **26**, 5029-37, 2007.
- 36) Zhang, Y., Lu, H.: Signaling to p53: ribosomal proteins find their way. *Cancer Cell.*, **16**, 369-77, 2009.
- 37) Zhou, X., Hao, Q., Liao, J., Zhang, Q., Lu, H.: Ribosomal protein S14 unties the MDM2-p53 loop upon ribosomal stress. *Oncogene.*, **32**, 388-96, 2013.
- 38) Xiong, X., Zhao, Y., He, H., Sun, Y.: Ribosomal protein S27-like and S27 interplay with p53-MDM2 axis as a target, a substrate and a regulator. *Oncogene.*, **30**, 1798-811, 2011.
- 39) Brooks, C.L., Gu, W.: p53 regulation by ubiquitin. *FEBS Lett.*, **585**, 2803-9, 2011.
- 40) Hayano, S., Komatsu, Y., Pan, H., Mishina, Y.: Augmented BMP signaling in the neural crest inhibits nasal cartilage morphogenesis by inducing p53-mediated apoptosis. *Development.*, **142**, 1357-67, 2015.

表 1

定量 RT-PCR に用いたプライマーの塩基配列

Primer	Direction	Sequence	Size (bp)
<i>RPL5</i>	forward reverse	5'-ATTATGCTCGGAAACGCTTGG-3' 5'-ACGGGCATAAGCAATCTGAC-3'	116
<i>SOX9</i>	forward reverse	5'-TCTGAACGAGAGCGAGAAGC-3' 5'-CCGTTCTTCACCGACTTCCT-3'	120
<i>ACAN</i>	forward reverse	5'-GGCAITTCAGCGGTTCCCTTCTCC-3' 5'-CAGCAGTTGTCTCCTCTTCTACGG-3'	136
<i>COL10A1</i>	forward reverse	5'-GGCAATAGCAGGTTACGTACA-3' 5'-CGATAACAGTCTTGCCCCACTT-3'	79
<i>OSX</i>	forward reverse	5'-TGCCACCTACCCATCTGACTTTG-3' 5'-GCTGCCACTATTTCCCACTGC-3'	135
<i>OPN</i>	forward reverse	5'-CTCAGGCCAGTTGCAGCC-3' 5'-CAAAAGCAAATCACTGCAATTCTC-3'	81
<i>BSP</i>	forward reverse	5'-TCACTGGAGCCAATGCAGAA-3' 5'-TGGAGAGGTTGTTGTCTTCGAG-3'	77
<i>TP53</i>	forward reverse	5'-TTCACCCCTCAGATCCGTGG-3' 5'-TTTGGACTTCAGGTGGCTGG-3'	135
<i>BAX</i>	forward reverse	5'-GTCTTTTCCGAGTGGCAGC-3' 5'-TGCCAGCCCATGATGGTTC-3'	150
<i>CASP9</i>	forward reverse	5'-GGTACGTTGAGACCCTGGAC-3' 5'-CACCGAAACAGCATTAGCGAC-3'	95
<i>ACTB</i>	forward reverse	5'-GCAAAGACCTGTACGCCAAC-3' 5'-TCTCATTTGTGCTGGGTGCC-3'	111