

$\beta$ -thalassemia の原因となった  
新規の *KLF1* 変異 (c.947 G>A)

学位申請者

山口大学大学院医学系研究科保健学専攻  
生体情報検査学領域

新田 孟徳

関連論文

A New Krüppel-Like Factor 1 Mutation (c.947G>A or p.C316Y) in Humans Causes  $\beta$ -Thalassemia Minor.

(Takenori Nitta, Fumio Kawano, Yasuhiro Yamashiro, Fumiya Takagi, Tomoaki Murata, Tatehiko Tanaka, Mella Ferania, Chris Adhiyanto, Yukio Hattori)

Hemoglobin

(to appear in, DOI: 10.3109/03630269.2015.1008702)

目次

<b>Absract</b> .....	3
<b>Introduction</b> .....	4
<b>Materials and methods</b> .....	6
<b>Results</b> .....	13
<b>Discussion</b> .....	17
<b>Summary</b> .....	20
<b>References</b> .....	21

## Absract

$\beta$ -Thalassemia は  $\beta$ -globin 鎖の産生低下によって起こる遺伝性疾患で、殆どが  $\beta$ -globin 遺伝子の点突然変異や数塩基の挿入/欠失が原因である。我々は、血液生化学データ及び Hb スクリーニングの結果から軽症型  $\beta$ -Thalassemia が疑われたが、 $\beta$ -globin 遺伝子自身に異常がない日本人症例に遭遇した。そこで  $\beta$ -globin 遺伝子の発現に強く関連する *Erythroid Krüppel-Like Factor (KLF1)* 遺伝子に焦点を絞り解析を行ったところ、新規の変異 *KLF1 c.947 G>A, p.C316Y* が認められた。この変異は KLF1 の 2nd zinc finger motif の C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 構造形成に関わる 2 番目のシステインにあたる。KLF1 の 3 つの zinc finger motif のうち中央の 1 つの機能欠失により、 $\beta$ -globin 遺伝子 promoter(CACCC box)への結合能に影響を及ぼしたことが推測された。

様々な発現実験の結果、この *KLF1* 変異が  $\beta$ -globin 遺伝子発現を 7%まで低下させることが判明した。さらに、*KLF1* 変異ヘテロ接合体では  $\beta$ -globin 遺伝子発現が 70%に低下するという実験結果は、患者の臨床症状（軽症型  $\beta$ -Thalassemia）を説明できるデータであった。また、次世代シーケンサーを用いた全 exome 解析の結果、本症例において *KLF1 c.947 G>A* のみが  $\beta$ -Thalassemia 発症に関連する遺伝子変異であることが明らかになった。

本研究によって新規 *KLF1* 変異(c.947 G>A)が  $\beta$ -globin 遺伝子発現低下を引き起こすことが証明された。 $\beta$ -Thalassemia が原因遺伝子の  $\beta$ -globin 遺伝子異常ではなく、発現調節因子である *KLF1* 変異によって引き起こされることを報告したものはこれまでなく、本報が第一報目となる。

## Introduction

ヒトの血色素 (Hb)は 2 分子の  $\alpha$ -globin 鎖と 2 分子の非  $\alpha$ -globin 鎖から成る四量体のタンパク質である。 $\alpha$ -globin 遺伝子群は 16p13.33 に 5'側から、 $\zeta$ 、 $\psi\zeta$ 、 $\psi\alpha 2$ 、 $\psi\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 1$ 、 $\theta 1$  の順、 $\beta$ -globin 遺伝子群は 11p15.5 に 5'側から、 $\varepsilon$ 、 $G\gamma$ 、 $A\gamma$ 、 $\psi\gamma$ 、 $\psi\beta$ 、 $\delta$ 、 $\beta$  の順に配列している。さらにそれぞれの遺伝子群上流には DNase I hypersensitive sites (HS)があり、locus control region (LCR)と呼ばれており、これらは下流の globin 遺伝子群の発現に関与している。胎生期には  $\gamma$ -globin 鎖が優位に発現しており Hb のほとんどが HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ) であるが、出生直前から  $\beta$ -globin 鎖の産生が始まり、HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ) の割合が急激に増加する。出生時では HbF が 80%程度を占めるが、徐々に減少し 5 歳前後で成人の値に近づく。

通常、 $\alpha$ -globin および、 $\beta$ -globin は赤芽球・網球内でバランスよく産生されている。Thalassemia は  $\alpha$  鎖、非  $\alpha$  鎖のどちらか一方の産生が低下して両鎖に産生の不均衡が起こった結果、引き起こされる疾患である。そのため、血球中の Hb は減少し小球性赤血球を呈する。同時に正常に産生された globin 鎖は結合相手が無いために相対的な過剰状態となり、過剰鎖は変性したタンパク分解酵素により除去される。しかし、不均衡の度合いが激しい場合、過剰鎖は赤血球膜に障害を与え溶血を引き起こす。 $\alpha$ -globin 鎖の産生低下を  $\alpha$ -thalassemia ( $\alpha$ -thal)、 $\beta$ -globin 鎖の産生低下を  $\beta$ -Thalassemia ( $\beta$ -thal)と称する。臨床的には、軽症型・中間型・重症型に分類され、日本人に認められるサラセミアの大部分は軽症型である。頻度は  $\beta$ -Thalassemia が 1000 人に 1 人、 $\alpha$ -thalassemia が 3500 人に 1 人である。

Thalassemia は、非鉄欠乏性の小球性赤血球症として発見されることが多い。日本人においては軽症型の Thalassemia が多く、軽い低色素性と代償的な赤血球数増加を示す。そのため、Mentzer index (Mean corpuscular volume (MCV) / RBC, fl/ $10^{12}$ /L) が 13 以下を示すことが診断に有効とされている<sup>1</sup>。鉄欠乏性貧血 (IDA) では赤血球数の増加が見られないため Mentzer index が 13 を下回ることは稀である。加えて、Thalassemia に共通して見られる所見はグリセロール溶血時間 (GLT<sub>50</sub>) の延長である。末梢血像においては小球性赤血球と標的

赤血球の出現が特徴とされる。

$\beta$ -thal は  $\beta$ -globin 鎖の産生低下によって引き起こされる疾患で、そのほとんどは、 $\beta$ -globin 遺伝子の点突然変異もしくは数塩基の挿入/欠失によって引き起こされる。日本人の  $\beta$ -thal の大部分は軽症型で臨床症状はほとんどなく鉄剤不応性の小球性貧血として発見されることが多い。変異遺伝子から  $\beta$ -globin が全く産生されないものを  $\beta^0$ -thal、産生されるが正常に比べて減少しているものを  $\beta^+$ -thal と称している。 $\beta$ -thal では HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ) の産生低下を代償するため、Hb スクリーニング検査において、HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ) および HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ) の軽度上昇が特徴となる。胎児期には  $\beta$ -globin 遺伝子の発現が低いため、問題ないが、出生時に  $\gamma$ -globin から  $\beta$ -globin 遺伝子にスイッチングが起るため、 $\beta$ -thal は出生後から発症する。

$\beta$ -globin 遺伝子 promoter 領域には distal と proximal な CACCC-BOX が存在し、そこに変異が発生すると  $\beta^+$ -thal を呈することが知られている<sup>2</sup>。これは CACCC-BOX に変異が起ると、 $\beta$ -globin 遺伝子発現に必須である転写制御タンパク質である Erythroid Krüppel-Like factor (EKLF, KLF1)<sup>3</sup> が結合出来なくなるからである。現在、数種類の KLF1 変異がすでに報告されており、赤血球疾患に関連を持つことが知られている<sup>4</sup>。

赤芽球系細胞の成熟に関する転写制御因子の一つとして知られている KLF1 タンパクは、3つの C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 型の zinc finger (ZF) domain を持っている。この ZF domain によって  $\beta$ -globin 遺伝子 promoter 領域の CACCC-BOX に結合することで  $\beta$ -globin 遺伝子発現に関与している。加えて、KLF1 は  $\gamma$ -globin から  $\beta$ -globin へのヘモグロビンスイッチングに関与しており<sup>5</sup>、変異が起ると HbF および Hb A<sub>2</sub> レベルが上昇すると報告もある<sup>6-8</sup>。加えて、*KLF1* 遺伝子変異によって congenital dyserythropoietic anemia (CDA) が引き起こされる報告もあり<sup>9</sup>、KLF1 変異は多様な表現型を持つとされている。

今回我々は、軽症型  $\beta$ -thal が疑われる日本人症例を経験した。しかし、患者の  $\beta$ -globin 遺伝子解析の結果、exon 領域、intron 領域、promoter 領域、上流 1kb、下流 1kb には変異が認められなかった。加えて遺伝子定量の結果、 $\beta$ -globin 遺伝子自身の欠失も認められなかつ

た。そこで、ノックアウトマウス実験において重篤な $\beta$ -thal を引き起こす報告がある<sup>10</sup>、Erythroid Krüppel-Like factor (KLF1)に絞って解析を行った。

その結果、患者には *KLF1*: c.947G>A (*KLF1*: p.C316Y) が認められ、本変異は新規の変異であった。そこで *KLF1* 遺伝子変異と  *$\beta$ -globin* 遺伝子発現の関連性を検索するために、正常 *KLF1* および変異 *KLF1* の Coding Sequence(CDS)を組み込んだ発現用ベクターと正常  *$\beta$ -globin* 遺伝子を組み込んだベクター、内部標準ベクターを赤芽球系細胞株 K562 に遺伝子導入し、Promoter luciferase reporter assay を用いた transient な発現実験を行なった。加えて、次世代シーケンサーを用いて解析を行った結果、本患者において hemoglobinopathies に関連する遺伝子変異が *KLF1* 遺伝子以外に存在しないことが明らかになった。

以上から、遺伝子発現調節因子である *KLF1* 変異がごく軽度な $\beta$ -thal を引き起こすことを明らかにし、これが患者の phenotype に強く関連していることを証明したので報告する。

## Materials and methods

### Case report

発端者は30歳日本人男性。非鉄欠乏性の貧血を指摘されて精査の依頼を受けた。血液生化学検査において RBC  $5.53 \times 10^{12}$  /L, Hb 13.2 g/dl, PCV 0.406 L/L, MCV 73.0 fl, MCH23.9 pg, MCHC 32.5 %, Ferritin 100.8 ng/ml, Ret 1.2 %, T.bil 0.5 mg/dl と、赤血球数軽度増加を伴う非鉄欠乏性の小球性貧血を呈していた(Table 1)。患者血液塗抹標本には *Target cell* が散見された。

**Table 1 The Laboratory Data**

	Proband (30yrs, Male)	Reference range(♂)
RBC	5.53	4.2-5.5 × 10 <sup>12</sup> /L
Hb	13.2	13-17 g/dl
PCV	40.6	40-50 L/L
MCV	73.0	82-98 fl
MCH	23.9	26-34 pg
MCHC	32.5	31-37 g/dl
Ret	1.2	0.5-1.5 %
T.Bil	0.5	0.3-1.2 mg/dl
D.Bil	0.2	0-0.4 mg/dl
LDH	362	120-230 IU/l
Haptoglobin	10	19-170 mg/dl
Ferritin	100.8	18.6-261 ng/ml

#### ヘモグロビンスクリーニング検査

患者全血を用いて、あらゆるサラセミアで延長を示すグリセロール溶血時間 (GLT<sub>50</sub>) の測定、赤血球内封入体の検出を目的とした超生体染色を行った。また、高速液体クロマトグラフィー法を用いて HbF 測定を行った。加えて、ヘモグロビン溶液を用いてβ-thal の指標となる HbA<sub>2</sub> の測定、異常血色素症のスクリーニング検査である等電点電気泳動 (IEF) 及び、イソプロパノールテストを行った。

#### β-globin 遺伝子解析

ゲノム DNA は EDTA 加患者末梢血から phenol-chloroform 法を用いて抽出したものを使



用した。

患者 DNA より  $\beta$ -globin 遺伝子を PCR で増幅し ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Tokyo)を用いてシーケンシング解析を行った。増幅した  $\beta$ -globin 遺伝子領域は -234~+1712 までの  $\beta$ -globin 遺伝子全体とその 5'、3'、flanking region を含めた 1.9kb である。primer は forward primer:  $\beta$ F: 5'-AGT AGC AAT TTG TAC TGA TGG TAT GG-3'、reverse primer は  $\beta$ D: 5'-AAA GGG TTC CAA ACT TGA TCG AGA A-3'を用いた。また、 $\beta$ -globin promoter 領域よりさらに上流の 1kb 及び、3'側下流約 1kb の異常をシーケンシング解析により検索した。

#### **KLF1 DNA/mRNA 解析**

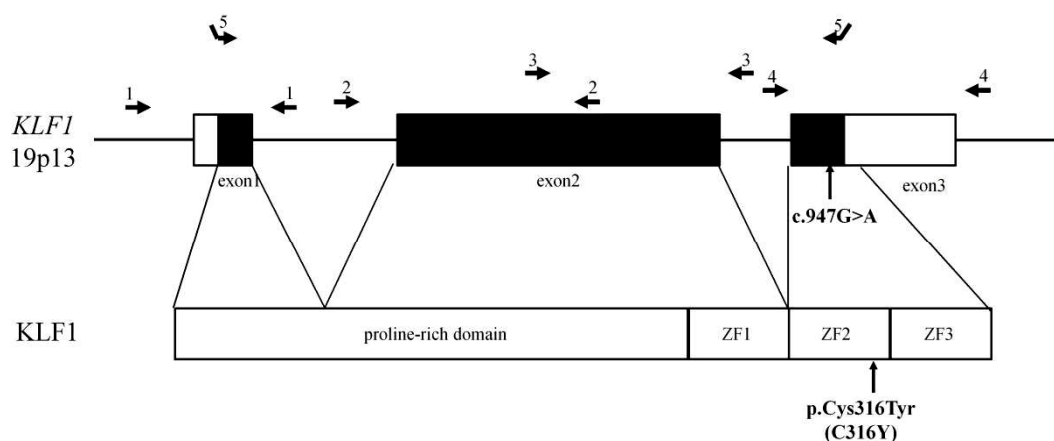
全 *KLF1* 遺伝子を PCR で増幅し、ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Tokyo)を用いてシーケンシング解析を行った(Table 2)(Figure 1)。Total RNA は TRIZOL Reagent (Invitrogen, Tokyo, Japan)を用いて正常人全血から抽出した。抽出した RNA を用いて、reverse transcriptase PCR (RT-PCR)を行い、cDNA を得た。

また、ミスマッチ PCR-RFLP 法を用いて、患者に認められた *KLF1* c.947G>A 置換が多型か変異かを検索した。PCR primer は EKLFex3-D: 5'-GGA CAG ACA GTG GCG CTT ATG GCT T-3'、 EKLF-CD316U: 5'-GTC CGA GCG CGC GAA TCT CCA TAC G-3'を用いた。

**Table 2 *KLF1* 遺伝子解析に用いた primer**

<i>n</i>	Primers	Primer Sequences (5'>3')
1	EKLFex1-D EKLFex1-U	CGT CTG GGG TGT CTG ATA ATG CTT G GCC CAG GCT ACC TTC GTT TTC TAT T

2	EKLF-D2 EKLFex2-U	GTC TCC AGC CAG ACC TGA TCG GTT T CGG GCC CCG GGT ACA CCG GTT GCA G
3	EKLFex2-D EKLF-U2	ATA TCC GCC GCC GCC CGA GAC TCT G CTG CAT CTG GTC ACA CCC CTT TAC T
4	EKLFex3-D EKLF-U1	GGACAG ACA AGT GGC GCT TAT GGC TT CTG AAC TGG GTG GGA AAA GAG AGG A
5	EKLF-D-SgfI EKLF-U-PmeI	GCA CGC GAT CGC CAT GGC CAC AGC CGA GAC C CCA GGT TTA AAC TCA AAG GTG GCG CTT CAT GT



**Figure 1** *KLF1* 遺伝子の構造と *KLF1* タンパク質構造.

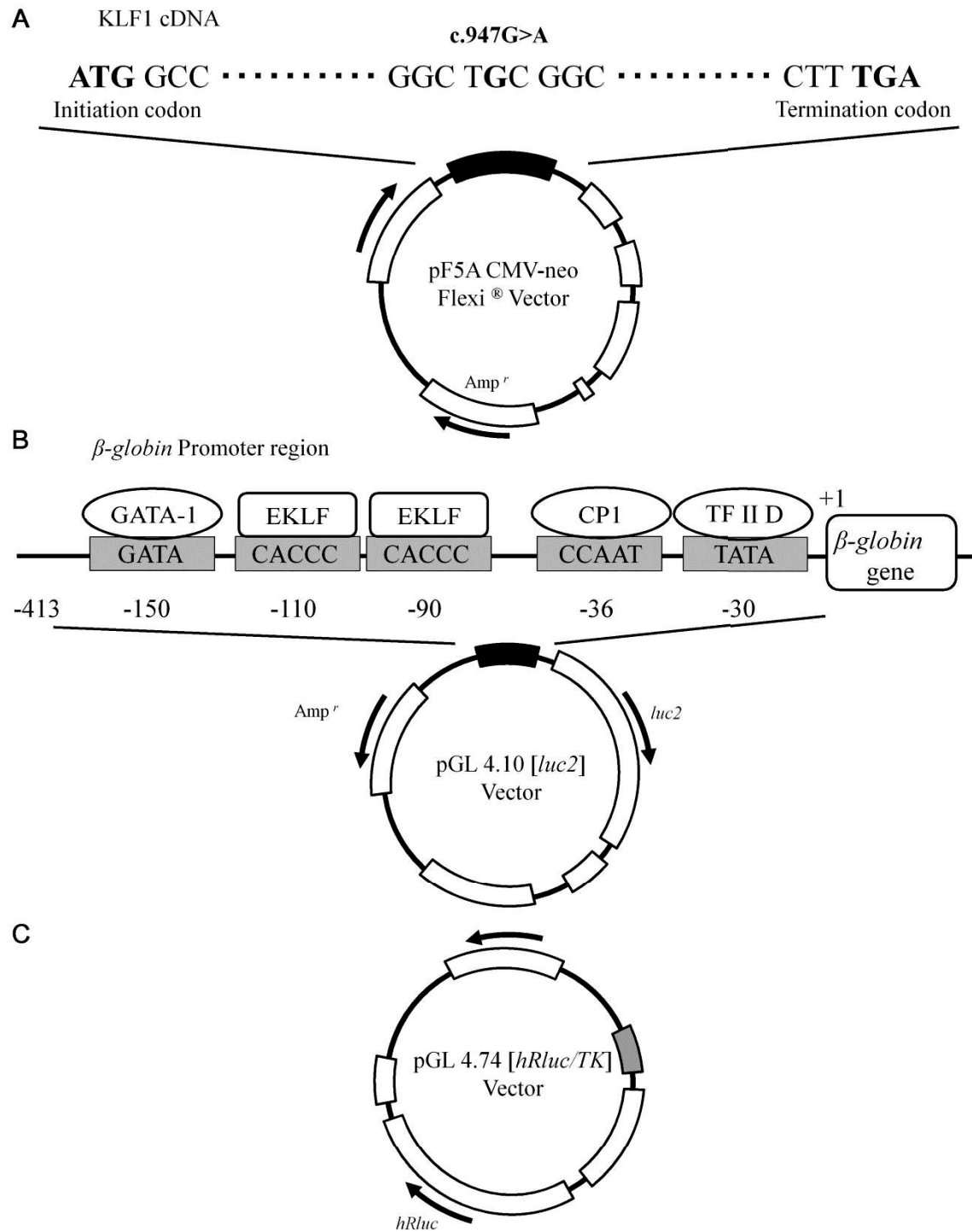
上段は *KLF1* 遺伝子を示しており、黒色の box は各 exon 領域を示している。*KLF1* は N 末端側に 3 つの zinc finger domain を持っており、この domain は DNA に結合する際に重要な役割を担っている。

最上段の矢印は解析に用いた primer set を示しており、primer シーケンスは Table1 に示しているものである。

本症例の新規変異である *KLF1* p.C316Y は 2 番目の ZF に位置しておりその部位を矢印で示している。

## Promoter-luciferase reporter assay コンストラクト作成 (Figure 2)

野生型の *KLF1* と変異を持つ *KLF1* の coding sequences (CDSs)を発現 vector である、CMV neo Flexi®vector pF5A (PromegaKK, Tokyo, Japan)にクローニングした。CMV neo Flexi®vector はCMV promoter 配列を有しておりその下流に目的タンパク質コード領域をクローニングすることで哺乳動物細胞において高レベルの発現を安定して行うことが可能である。またレポーター-vector には、正常 *β-globin* 遺伝子 の promoter 領域(-1 to -413)を pGL4.10[luc2] vector (PromegaKK) の *firefly luciferase* 遺伝子上流に組み込んだものを用いた。内部標準 vector には *renilla luciferase* 遺伝子をもつ pGL4.74[hRluc/TK] vector (PromegaKK)を用いた。



**Figure 2 発現 vector とレポーター-vector**

(A) CMV promoter を持った CMV neo Flexi® (PromegaKK) を発現 vector として用いた。正常 KLF1 と変異

KLF1 (p.C316Y) の cDNA を 3'側に挿入した。(B) 正常 *β-globin* 遺伝子を、p.GL4.10[luc2] reporter vector

中のホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだ。(C)内部標準ベクターとして p.GLA.74 [*hRluc*/TK] Vector を用いた。以上3種類のコンストラクトを K562 細胞に co-transfect した。

### Promoter-luciferase reporter assay

本実験に用いる細胞には、浮遊系の赤芽球系細胞である K562(human chronic myelogenous leukemia)を採用した。K562 は KLF1 の発現が無いいため、細胞由来の KLF1 の影響を受けない。正常 KLF1/異常 KLF1 発現 vector、 $\beta$ -globin 遺伝子 promoter を組み込んだレポーター vector、内部標準 vector それぞれを K562 細胞に MicroPorator-mini MP-100 (Digital Bio Technology, AR Brown Co., Ltd., Tokyo, Japan)を用いて co-transfect した。細胞培養条件、transfect 条件は文献を参考に行った<sup>11</sup>。

モデルは、1)Non transfect モデル 2)正常 KLF1 を組み込んだ正常モデル 3)変異 KLF1 を組み込んだ変異モデル 4) 正常 KLF1 に等量の異常 KLF1 を組み込んだ患者モデルの4種類を作成した。(Figure 3)

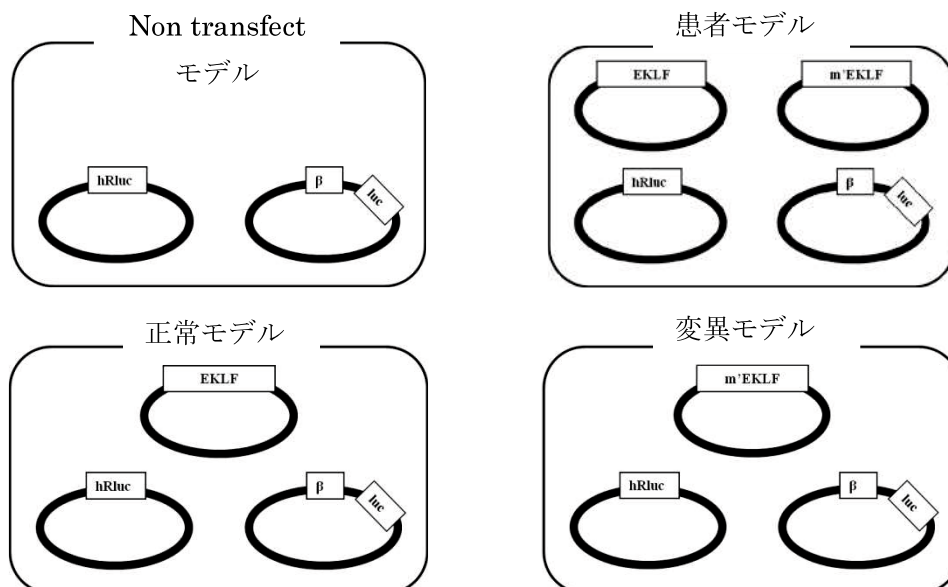


Figure 3 Dual-Luciferase assay コンストラクト

Transient な発現実験には Dual-luciferase Reporter Assay System® (Promega KK)を用い、提供元

の資料通りに実験を行った。24 時間後、firefly luciferase 活性と renilla luciferase 活性をルミノメーター(96F NONTREATED WHITE MICROWELL SI(nunc<sup>TM</sup>))を用いて測定した。relative luciferase 活性値を得た後に、正常モデルの relative luciferase 活性と、その他のモデルの比較を行った。

### **Whole exome analysis by NGS**

患者 DNA は末梢血から抽出したものを PureLink Genomic DNA Mini Kit (Life Technologies, USA)を用い精製を行った。その後、フラグメントライブラリを NGS analysis using the 5500 SOLiD Fragment Library Core kit (Life Technologies)を用いて作成し、PCR 反応を 8 サイクル行った。増幅後、ライブラリの長さや濃度を確認した。

Exon 領域を Target Seq<sup>TM</sup> Exome Enrichment Kit (Life Technologies)で濃縮した。それらを、次世代シーケンサー SOLiD5500 (Life Technologies)を用いて解析を行った。そのデータを LifeScope (Life Technologies)を用いてマッピングを行った。リファレンスには UCSC (University of California Santa Cruz) が提供する hg19 配列を使用した。

得られた全ての変異/多型について QIAGEN 社の variant analysis ([www.ingenuity.com/variants](http://www.ingenuity.com/variants))を用いて解析を行った。その際、ターゲットとして、hemoglobinopathies を指定した。

## **Results**

### **Hb スクリーニング**

Hb スクリーニング検査において HbA<sub>2</sub> が 4.1%、HbF が 1.3%と高値を示した。以上のことから患者はβ-thal を疑われた。しかし、サラセミアにおいて延長することが知られているグリセロール溶解時間 (GLT<sub>50</sub>) は 32sec と延長は認められなかった(Table 3)。

**Table 3 Hb スクリーニング**

	Proband (30yrs, Male)	Reference range
HbF	1.3	<1.0 %
HbA <sub>2</sub>	4.1	2.5-3.5%
Isopropanol test	-	-
GLT <sub>50</sub>	32	22-55 sec
Inclusion body	-	-
Isoelectricfocusing(IEF)	-	-

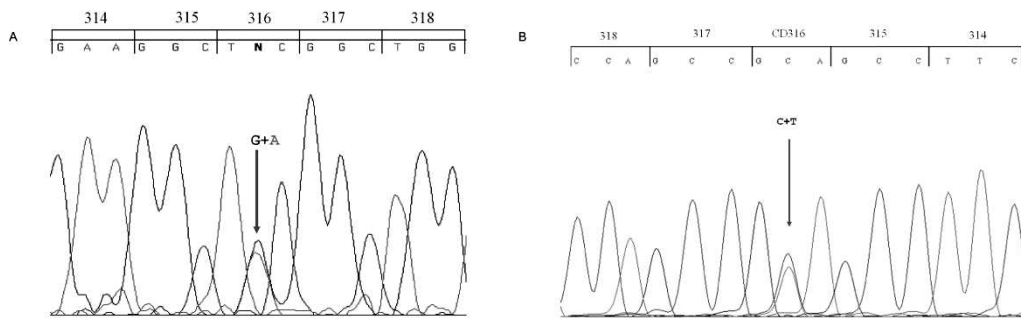
### ***β-globin* 遺伝子解析**

*β-globin* 遺伝子全体とその 5'-、3'-、flanking region に異常は認められなかった。さらに、*β-globin* 遺伝子 promoter 領域よりさらに上流の 1kb 及び、3'側下流約 1kb にも異常は認められなかった。また、*β-globin* 遺伝子の多型部位として知られている HgiAI site (codon2) に 2 種類の多型(C/T)が認められた。このことから *β-globin* 遺伝子自身の欠失も否定された。

### ***KLF1* 遺伝子と cDNA 解析**

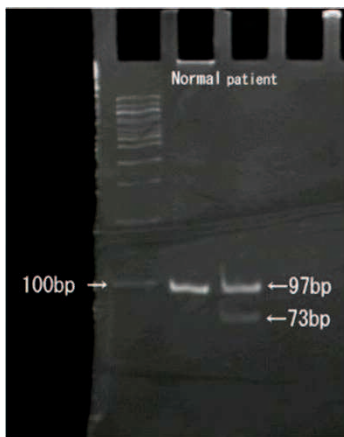
*KLF1* 遺伝子解析の結果、患者は *KLF1* 遺伝子の新規置換である c.947G>A (p.C316Y) の heterozygote であることが分かった(Figure 4A)。

また、cDNA 解析の結果、患者には正常 *KLF1* mRNA と同程度の変異 *KLF1* mRNA が存在していた(Figure 4B)。このことから変異 *KLF1* タンパクは正常 *KLF1* タンパクと同程度産生されていることが示唆された。加えてミスマッチ PCR-RFLP 法の結果、正常個体 50 名 (100allels) には本置換は認められなかったため、本置換は変異であることが明らかになった(Figure 5)。



**Figure 4 KLF1 遺伝子と cDNA 解析**

*KLF1* 遺伝子 c.947G>A (左, genome DNA) と codon 316 (G>A) (右, cDNA) が認められた。cDNA シーケンス解析において、G/A ピークが同程度確認された。このことから、正常 *KLF1* mRNA と変異 *KLF1* mRNA が同程度産生されていることが明らかになった。



**Figure 5 ミスマッチ PCR-RFLP 法結果**

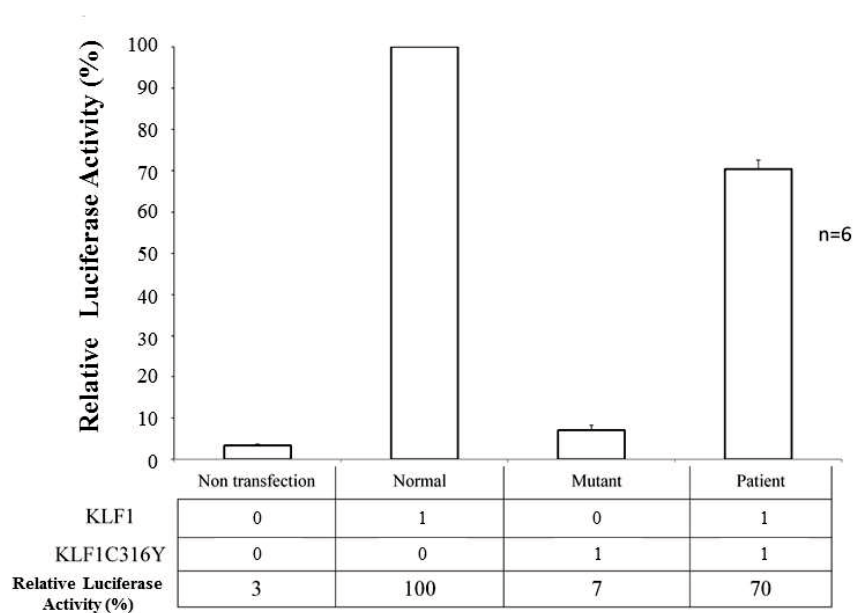
制限酵素処理後の産物を、7%PAG ゲルを用いて定電圧 100V, 90min の泳動を行った。正常人検体(Normal)には 97bp 付近に産物が確認された。対して、患者(patient) には変異が存在するため、97bp 付近の産物に加えて制限酵素 *snabI* によって切断された産物が 73bp 付近に認められた。

### Promoter-luciferase reporter assay

正常モデルの relative luciferase activity と変異モデル、患者モデルの relative luciferase



activity を比較した(Figure 6)。正常モデル relative luciferase activity を 100%とした時に p.C316Y 変異モデルの relative luciferase activity は 7%に低下していた。また、患者モデルでは relative luciferase activity が 70%に低下していた。このことから KLF1 p.C316Y の存在が  $\beta$ -globin 遺伝子 promoter 活性を低下させることが明らかになった。



**Figure 6 正常 (N) 変異 (M) 患者モデル (N/M) の Relative luciferase activity 比較**

正常モデルの Relative luciferase activity を 100%とした時に、変異モデル、患者モデルの Relative luciferase activity はそれぞれ7%と70%を示した。KLF1 遺伝子を挿入していないモデルでは Relative luciferase activity は3%になった。

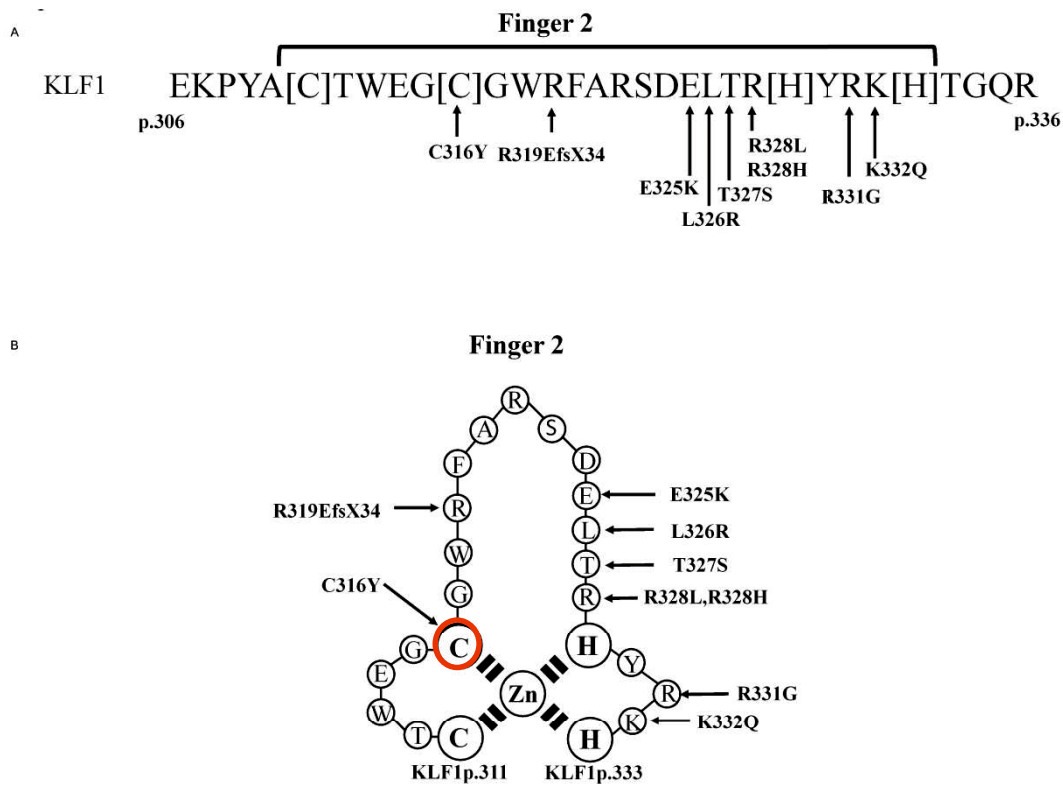
#### 次世代シーケンサーを用いた Whole exome 解析

LifeScope (Life Technologies)を用いたマッピングの結果3.7Gbのシーケンスデータを得た。

リードの 93%が染色体上にマップされほぼ正確にシーケンスが行われたことが確認された。シーケンスの結果、患者は 44,070 の変異/多型 537 の欠失を持っていることが明らかになった。また、すべてのデータにおいて、5 回以上のシーケンスと 30 以上のカバレッジが確保されていたため、本 NGS データは十分な解析精度があると考えられる。これらの変異データを Ingenuity Company の variant analysis を用いて解析を行った結果、3 遺伝子(*KLF1*, *GRIN3B*, *CACNA1F*) 5 変異が患者、hemoglobinopathies に関連していることが示唆された。その後、文献由来の知見によって、患者の  $\beta$ -thal に関連する遺伝子変異は *KLF1* c.947 G>A, p.C316Y のみであることが明らかになった。

## Discussion

本研究によって、新規 *KLF1* 変異(c.947G>A) ヘテロ接合体が軽症型の $\beta$ -thal を引き起こすことが明らかになった。本変異によって *KLF1* Codon 316 のシステインからチロシンへのアミノ酸置換が引き起こされる (p.C316Y)。Codon 316 部位は *KLF1* が DNA に結合する際に必要な 3 つの zinc finger motif の 2 番目に位置しており、Zn を取り囲むタンパク構造形成に必須である(Figure 7)。



### Figure 7 KLF1 の 2nd zinc finger の構造

(A) 本症例変異と現在報告されている変異を矢印で示している。[ ]で囲っているシステインとヒスチジンは Zn を取り囲む形で存在する C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 構造の構成部位である。(B) 本変異の p.C316Y 部分を丸で囲っている。このシステインがチロシンに変異することで構造が崩れることが予想される。

以上のことから、p.C316Y が ZF motif 機能が損なわれ、*β-globin* 遺伝子 promoter 領域への結合能もしくは親和性が低下した結果、患者は *β-globin* 発現の低下を引き起こしていることが考えられた。本症例の表現型は promoter 変異による軽症型 β<sup>+</sup>-thal よりも軽度である<sup>12</sup>。*KLF1* 遺伝子ナンセンス変異、フレームシフト変異はハプロ不全を引き起こすという報告がある。一方、本変異 p.C316Y と同様に 2 番目の ZF domain に位置するミスセンス変異 (p.R328L, p.R328H, p.R331G) においては *KLF1* タンパクに結合能が無く、表現型はほぼ正常である<sup>13</sup>。これらの *KLF1* 変異では *β-globin* 発現においてハプロ不全を引き起こさないことが示唆され

る。本発現実験で relative luciferase activity が 70%に低下した原因は p.C316Y が promoter への結合能・親和性を有している結果、正常 KLF1 タンパクが  $\beta$ -globin 遺伝子 promoter への結合する際に変異 KLF1 タンパクが競合的に阻害し  $\beta$ -globin 発現の低下を引き起こしたことが考えられた。

本変異 p.C316Y と同様に 2 番目の ZF domain に位置する p.E325K は CDA を引き起こす報告がある。p.E325K 症例では mRNA が正常と同程度存在することが分かっており、promoter 結合能をもった異常タンパク p.E325K が産生されていると考えられている<sup>13</sup>。しかし本症例では軽症型の  $\beta$ -thal 症状を呈しており、CDA 様ではない。KLF1 タンパクは 700 以上もの遺伝子発現に関与すると報告がある<sup>14</sup>。そのため、p.E325K は  $\beta$ -globin 遺伝子発現への影響以上に他の遺伝子への影響が大きくその結果 CDA を引き起こしたと推測した。

本症例において、HbF・HbA<sub>2</sub> の上昇レベルは通常の軽症型  $\beta$ -thal 症例で認められるものと同程度である。通常、 $\beta^0$ -thal、 $\beta^+$ -thal 患者では HbA<sub>2</sub> がそれぞれ 4.5-5.5%、3.6-4.2%と増加を示し、HbA<sub>2</sub> レベルはより重症な  $\beta$ -thal 表現型で高値を示す傾向がある<sup>12</sup>。しかし、当研究室における  $\beta$ -globin promoter 変異による  $\beta^+$ -thal では比較的高い HbA<sub>2</sub> レベル(4.5-6.5%)を示している(n=29)。p.C316Y は  $\beta$ -globin promoter 変異による  $\beta^+$ -thal と同義であると考えられ、表現型は promoter 変異による Thalassemia よりも軽度であり、HbA<sub>2</sub> レベルも promoter 変異によるものを少し下回っていた。

Perseu らは、HbA<sub>2</sub> 境界値(3.3-3.8%) を示した正常人検体 52 検体中に 6 種類の *KLF1* 変異が認められたと報告しているが、彼らの MCV、MCHC は正常下限から減少傾向を示していた。報告にあった変異 (p.L326R, p.T327S and p.K332Q) は p.C316Y と同じ 2 番目の zinc finger domain 内に位置している。

*KLF1* の compound ヘテロ接合体 (p.S270X・p.K332Q) や 10 種類の *KLF1* 変異が HbF レベルの上昇と関連があると報告がある。Giardine らも、*KLF1* 変異は hereditary persistence of fetal Hb (HPFH)に関連し、HbF レベルを上昇させると述べている。本症例の HbF レベルは

1.3%と軽度上昇を来していた。p.C316Y が  $\gamma$ -globin 遺伝子の発現に関連していると仮定すると非常に軽度の影響である。

GLT<sub>50</sub> 試験はサラセミアでは延長をきたす(正常範囲 22-55 seconds)ことが特徴であり、当研究室においても、promoter 変異 (-31 A>G)、 $\beta^+$ -thal、 $\beta^0$ -thal、-31 A>G ホモ接合体の GLT<sub>50</sub> は 97, 96, 112 and 154 seconds と延長傾向を示している。しかし、半数以上の promoter 変異 (-31 A>G) において GLT<sub>50</sub> は延長しておらず、本症例も GLT<sub>50</sub> の延長をきたしていない。これは本症例が promoter 変異による  $\beta^+$ -thal であることと同意義であるためであると考えられた。

QIAGEN 社の Ingenuity® Variant Analysis™ software( (www.qiagen.com/ingenuity) from QIAGEN, Redwood City, CA, USA)を用いた NGS 解析の結果、本患者の持つ変異のうち、3 遺伝子 (*KLF1*, *CACNA1F*, *GRIN3B*)の変異が hemoglobinopathies に関わることが示唆された。しかし、*GRIN3B* 遺伝子は鎌状赤血球症の治療に関連する遺伝子であることが報告されており、*CACNA1F* 遺伝子は  $\beta$ -thal 患者における鉄過剰への治療に関連する遺伝子であることが報告されている。このことから、これらは *GRIN3B* 遺伝子と *CACNA1F* 遺伝子は hemoglobinopathies の発症に直接かかわる因子ではないことが考えられた。つまり、*KLF 1* 遺伝子変異のみが本症例において  $\beta$ -thal 発症に関わることが明らかになった。

## Summary

ヘモグロビンスクリーニングおよび血液化学検査により  $\beta$ -thal が疑われたが、 $\beta$ -globin 遺伝子解析の結果、全く異常が認められない症例を経験した。そこで患者の *KLF1* 遺伝子解析を行った結果、*KLF1*: p.C316Y 変異のヘテロ接合体であることが分かった。本変異は、 $\beta$ -globin 遺伝子発現を 7%まで低下させることが発現実験により明らかになった。また、患者と同じ変異ヘテロ接合体の場合  $\beta$ -globin 遺伝子発現が正常に比べて 70%に低下することが確認され、患者の表現型 (軽症型  $\beta$ -thal) と合致していた。以上より、*KLF1*: p.C316Y に

よってごく軽度の  $\beta$ -thal が引き起こされることが明らかになった。加えて、患者 whole exome 解析の結果、本症例において *KLF1* 変異のみが  $\beta$ -thal 発症の原因になっていることが証明された。 $\beta$ -thal が責任遺伝子である  *$\beta$ -globin* 遺伝子異常ではなく、遺伝子発現調節因子 *KLF1* 変異によって引き起こされることを報告したものはこれまでなく、本報が第一報目となる。

## 謝辞

本研究を進めるに当たり、様々なご指導を頂いた山城安啓 准教授ならびに服部幸夫 名誉教授に深謝致します。また、ご協力いただいた山口大学総合科学実験センター生命科学分野、村田智昭分野長に感謝致します。コンピテントセル、細胞株 K562 は山口大学遺伝子実験施設より供与していただきました。

## References

1. 佐藤 淳, 丹田 恵, 安藤 健, 中山 俊, et al. Mentzer index を指標に検索しえた血色素異常症. 日本検査血液学会雑誌. 2006;7(1):10-9.
2. Faustino P, Lavinha J, Marini MG, Moi P. beta-Thalassemia mutation at -90C-->T impairs the interaction of the proximal CACCC box with both erythroid and nonerythroid factors. Blood. 1996;88(8):3248-9.
3. Moi P, Faa V, Marini MG, Asunis I, et al. A novel silent beta-thalassemia mutation in the distal CACCC box affects the binding and responsiveness to EKLF. British journal of haematology. 2004;126(6):881-4.
4. Borg J, Patrinos GP, Felice AE, Philipsen S. Erythroid phenotypes associated with *KLF1* mutations. Haematologica. 2011;96(5):635-8.
5. Zhou D, Liu K, Sun CW, Pawlik KM, et al. *KLF1* regulates *BCL11A* expression and gamma- to beta-globin gene switching. Nature genetics. 2010;42(9):742-4.
6. Gallienne AE, Dreau HM, Schuh A, Old JM, et al. Ten novel mutations in the erythroid transcription factor *KLF1* gene associated with increased fetal hemoglobin levels in adults. Haematologica. 2012;97(3):340-3.
7. Satta S, Perseu L, Moi P, Asunis I, et al. Compound heterozygosity for *KLF1* mutations associated with remarkable increase of fetal hemoglobin and red cell

protoporphyrin. *Haematologica*. 2011;96(5):767-70.

8. Perseu L, Satta S, Moi P, Demartis FR, et al. KLF1 gene mutations cause borderline HbA(2). *Blood*. 2011;118(16):4454-8.

9. Arnaud L, Saison C, Helias V, Lucien N, et al. A dominant mutation in the gene encoding the erythroid transcription factor KLF1 causes a congenital dyserythropoietic anemia. *American journal of human genetics*. 2010;87(5):721-7.

10. Perkins AC, Sharpe AH, Orkin SH. Lethal beta-thalassaemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLF. *Nature*. 1995;375(6529):318-22.

11. Hino M, Ito H, Yamashiro Y, Hattori Y, et al. The +1,506 (A>C) mutation in the 3' untranslated region affects beta-globin expression. *Hemoglobin*. 2012;36(4):399-406.

12. Weatherall DJ, Clegg JB. *The Thalassaemia Syndromes* [Internet]. Oxford, London: Blackwell Science Ltd. 2001.

13. Singleton BK, Lau W, Fairweather VS, Burton NM, et al. Mutations in the second zinc finger of human EKLF reduce promoter affinity but give rise to benign and disease phenotypes. *Blood*. 2011;118(11):3137-45.

14. Hodge D, Coghill E, Keys J, Maguire T, et al. A global role for EKLF in definitive and primitive erythropoiesis. *Blood*. 2006;107(8):3359-70.