

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09447

研究課題名(和文) 赤血球特異的ノックダウン法による貧血モデルマウスの作製

研究課題名(英文) Establishment of in vivo model of anemia by shRNA transgene controlled by erythroid-lineage specific promoter

研究代表者

藤原 亨 (FUJIWARA, TOHRU)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：60333796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：赤血球系転写因子であるGATA-1プロモーター制御下にリバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子(rtTA)を発現させるトランスジェニックマウスと、テトラサイクリン応答因子(TRE)制御下に赤血球系転写因子Lmo2特異的shRNAを発現させるトランスジェニックマウスを作製した。さらに両者を掛け合わせるによりマウス赤血球特異的にshRNAを発現させる、in vivoノックダウン解析系を確立した。

研究成果の概要(英文)：To establish in vivo model of anemia, we established and crossed 1) GATA-1 promoter (G1HRD)/reverse tetracycline transactivator (rtTA)-transgenic mice and 2) Tetracycline-responsive element (TRE)/Lmo2 shRNA-transgenic mice. In the established mice (Tg-TRE-Lmo2 shRNA::Tg-G1HRD-rtTA), Lmo2 shRNA is expected to be induced specifically in erythroblasts by tetracycline administration, leading to the onset of anemia. Our established system would be applied to establish wide variety of in vivo anemia models by targeting to erythroid genes other than Lmo2.

研究分野：医歯薬学

キーワード：血液内科学 貧血

1. 研究開始当初の背景

細胞分化における遺伝子発現の調節には細胞系特異的な転写因子が関与していると考えられており、このうち赤血球の分化においては、転写因子 GATA-1 が重要な役割を果たしている。GATA-1 は、ゲノム上の WGATAR という塩基配列を認識して結合し、各種のグロビンやヘム合成酵素などの赤血球関連遺伝子の発現を制御している (Bresnick et al. *JBC* 2010)。さらに GATA-1 は、SCL/TAL1、LMO2、LDB1、ETO2 などの転写因子もしくは共役因子と複合体を形成していることが明らかとなっており、これらの因子が GATA-1 による遺伝子発現制御に影響を及ぼしていることが予想される (Fujiwara et al. *Mol Cell* 2009, *Exp Hematol* 2013, Tripic et al. *Blood* 2009)。SCL/TAL1、LMO2、LDB1、ETO2 を含む転写因子群の機能解析については多くの報告があるが、これまでの解析は *in vitro* における解析、あるいは *in vivo* においてはトランスジェニックマウス及びノックアウトマウスが中心である (Kerenyi et al. *JEM* 2010)。特に *in vivo* における解析においてはその転写因子の欠損もしくは強制発現が致死的なものである場合が多く、詳細な機能解析が困難であった。

近年、Tet-on システムと shRNA による遺伝子発現抑制システムを組み合わせたマウス個体レベルでの解析が試みられている (Dow et al. *Nat Protoc* 2012)。このシステムを応用し、赤芽球特異的に遺伝子発現を一過性に抑制するシステムを確立することで (図 2)、これまでの解析手法の限界を打破し、これらの転写因子群の成体における機能を明らかにできる可能性がある。

本研究においては、*in vivo* 遺伝子ノックダウン解析系のモデルとして LMO2 に着目し、この解析系を用い、LMO2 の赤血球系疾患の関わり、及び *in vivo* 赤芽球における LMO2 を介した遺伝子発現制御機構の一端を明らかにすることを目的とする。

2. 研究の目的

本研究の第一の目的はマウス赤血球特異的に shRNA を効果的かつ可逆的に発現させる *in vivo* 解析系を確立することである。特に今回の検討では、赤血球系転写因子・共役因子のうち LMO2 をモデルにして、マウス *in vivo* 赤芽球における意義を解明する。

3. 研究の方法

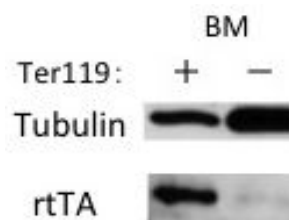
本マウスの作成には、図 1 のように 2 種類のトランスジェニックマウス (Tg-EGFP-*Lmo2* shRNA 及び Tg-G1HRD-rtTA) を掛け合わせるにより作製する。

具体的には、赤血球系の転写因子である GATA-1 プロモーター制御下にリバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子 (rtTA) を発現させるトランスジェニックマウスと、テトラサイクリン応答因子 (TRE) 制御下に *Lmo2* 特異的 shRNA を発現させるトランスジェニックマウスを作成し、両者を掛け合わせるにより目的のマウスを作成する。本マウスを用いて、末梢血及び骨髄の評価、赤芽球における遺伝子発現プロファイル、LMO2 制御下遺伝子群の LMO2 を介した発現制御機構を解析する。

4. 研究成果

(1) Tg-G1HRD-rtTA マウスの作成 (図 1)

Tg-G1HRD-rtTA を野生型マウス前核期受精卵にマイクロインジェクションにて導入後、陽性マウスをスクリーニングした。陽性マウスの骨髄 (BM: bone marrow) の解析で、rtTA が特異的に Ter119 陽性赤芽球に発現している事を確認した。



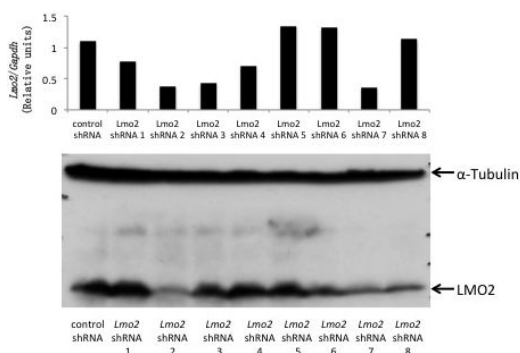
(図 1) rtTA の発現確認

ウエスタンブロット法により Tg-G1HRD-rtTA

マウス由来の骨髄 Ter119 陽性分画 (赤芽球) と陰性分画における rtTA の発現を確認。

(2) *Lmo2* shRNA 配列の選択 (図 2)

Lmo2 特異的 shRNA は、8 種類存在するマウス *Lmo2* shRNA 発現レンチウイルスベクター (pGIPZ lentiviral shRNAmir, Open Biosystems 社) から、最もノックダウン効率の良い shRNA 配列を選択する。具体的には、*Lmo2* shRNA ベクターを HEK293T 細胞に導入し、得られたウイルス上清をそれぞれマウス赤白血病細胞 (MEL) に感染させる。さらに、Puromycin の培地への添加にて *Lmo2* shRNA 導入細胞を特異的に選択後に、定量 RT-PCR 及びウエスタンブロット法により LMO2 のノックダウン効率を比較検討した。

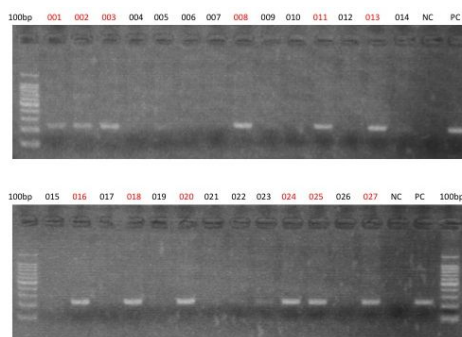


(図 2) *Lmo2* shRNA 配列の選択

RT-PCR 法 (上段) ウエスタンブロット法 (下段) の検討より、*Lmo2* shRNA 2 を選択した。

(3) Tg-EGFP-*Lmo2* マウスの作製 (図 3)

Tg-EGFP-*Lmo2* を野生型マウス前核期受精卵にマイクロインジェクションにて導入後、陽性マウスをスクリーニングした。その結果、計 14 匹の陽性マウスが得られたため、これらのマウスを既に樹立した Tg-G1HRD-rtTA マウスと交配し、目的のマウスを樹立中である。



(図 3) Tg-EGFP-*Lmo2* マウスの作製

マウス尾由来のゲノム DNA より陽性マウスをスクリーニングした。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

1. Ohashi K, Fujiwara T, Onodera K, Saito Y, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Harigae H. Establishment of a screening system to identify novel GATA-2 transcriptional regulators. *Tohoku J Exp Med.* 2018;244:41-52. 査読あり) doi: 10.1620/tjem.244.41.
2. Hatta S, Fujiwara T, Yamamoto T, Saito K, Kamata M, Tamai Y, Kawamata S, Harigae H. A defined culture method enabling the establishment of ring sideroblasts from induced pluripotent cells of X-linked sideroblastic anemia. *Haematologica.* (掲載決定済) (査読あり) doi: 10.3324/haematol.2017.179770.
3. Hasegawa S, Fujiwara T, Okitsu Y, Kato H, Sato Y, Fukuhara N, Onishi Y, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. Effects of in vivo deletion of GATA2 in bone marrow stromal cells. *Exp Hematol.* 2017;56:31-45. (査読あり) doi: 10.1016/j.exphem.2017.08.004.

4. [Fujiwara T](#), Fukuhara N, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Onishi Y, Furuyama K, Harigae H.
A novel heterozygous ALAS2 mutation in a female with macrocytic sideroblastic anemia resembling myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts: A case report and literature review. *Ann Hematol.* 2017;96:1955-1957. (査読あり)
doi: 10.1007/s00277-017-3106-7.
5. Saito K, [Fujiwara T](#), Ota U, Hatta S, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizuka M, Tanaka T, Harigae H.
Dynamics of absorption, metabolism, and excretion of 5-aminolevulinic acid in human intestinal Caco-2 cells. *Biochem Biophys Rep.* 2017;11:105-111. (査読あり)
doi: 10.1016/j.bbrep.2017.07.006.
6. [Fujiwara T](#). GATA transcription factors: basic principles and related human disorders. *Tohoku J Exp Med.* 2017;242:83-91. (査読あり)
doi: 10.1620/tjem.242.83.
7. [Fujiwara T](#), Sasaki K, Saito K, Hatta S, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Harigae H.
Forced FOG1 expression in erythroleukemia cells: induction of erythroid genes and repression of myelo-lymphoid transcription factor PU.1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;485:380-387. (査読あり)
doi: 10.1016/j.bbrc.2017.02.068.
8. Inokura K, [Fujiwara T](#), Saito K, Iino T, Hatta S, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Shimoda K, Harigae H. Impact of TET2 deficiency on iron metabolism in erythroblasts. *Exp Hematol.* 2017;49:56-67. (査読あり)
doi: 10.1016/j.exphem.2017.01.002.
9. Kobayashi M, Kato H, Hada H, Itoh-Nakadai A, [Fujiwara T](#), Inoguchi Y, Ichiyanagi K, Muto A, Tomosugi N, Sasaki H, Harigae H, Igarashi K.
Iron-heme-Bach1 axis is involved in erythroblast adaptation to iron deficiency. *Haematologica.* 2017;102:454-465. (査読あり)
doi: 10.3324/haematol.2016.151043.
10. Kanehira M, [Fujiwara T](#), Nakajima S, Okitsu Y, Onishi Y, Fukuhara N, Ichinohasama R, Okada Y, Harigae H.
An Lysophosphatidic Acid Receptors 1 and 3 Axis Governs Cellular Senescence of Mesenchymal Stromal Cells and Promotes Growth and Vascularization of Multiple Myeloma. *Stem Cells.* 2017;35:739-753. (査読あり) doi: 10.1002/stem.2499.
11. Onodera K, [Fujiwara T](#), Onishi Y, Okitsu Y, Itoh-Nakadai A, Okitsu Y, Fukuhara N, Ishizawa K, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. GATA2 regulates dendritic cell differentiation. *Blood.* 2016;128:508-518. (査読あり)
doi: 10.1182/blood-2016-02-698118.
12. Sakurai K, [Fujiwara T](#), Hasegawa S, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Yamada-Fujiwara M, Ichinohasama R, Harigae H. Inhibition of human primary megakaryocyte differentiation by anagrelide: A gene expression profiling analysis. *Int J Hematol.* 2016;104:190-199. (査読あり)
doi: 10.1007/s12185-016-2006-2.

13. Kondo A, Fujiwara T, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Sawada K, Harigae H. Identification of a novel putative mitochondrial protein FAM210B associated with erythroid differentiation. *Int J Hematol.* 2016;103:387-395. (査読あり)
doi: 10.1007/s12185-016-1968-4.
14. Nakamura K, Kawakami T, Yamamoto N, Tomizawa M, Fujiwara T, Ishii T, Harigae H, Ogasawara K. Activation of the NLRP3 inflammasome by cellular labile iron. *Exp Hematol.* 2016;44:116-124. (査読あり)
doi: 10.1016/j.exphem.2015.11.002.
15. Saito Y, Fujiwara T, Ohashi K, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Harigae H. High-throughput siRNA screening to reveal GATA-2 upstream transcriptional mechanisms in hematopoietic cells. *PLoS ONE.* 2015;10:e0137079. (査読あり)
doi: 10.1371/journal.pone.0137079.
16. Fujiwara T, Harigae H. Biology of heme in mammalian erythroid cells and related disorders. *BioMed Res Int.* 2015;2015:278536. (査読あり)
doi: 10.1155/2015/278536.

[学会発表](計 15 件)

1. Saito K, Fujiwara T, Hatta S, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Harigae H. Establishment and characterization of *in vitro* model of X-linked sideroblastic anemia. 第 59 回米国血液学会 2017 年 12 月 9 日 アトランタ (アメリカ)
2. Hasegawa S, Fujiwara T, Okitsu Y, Kato H, Sato Y, Fukuhara N, Onishi Y,

- Ishizawa K, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. Role of GATA2 in the maintenance of bone marrow microenvironment. 第 59 回米国血液学会 2017 年 12 月 11 日 アトランタ (アメリカ)
3. Fujiwara T, Sasaki K, Saito K, Hatta S, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Harigae H. Exploring the mechanism of FOG1-dependent transcriptional regulation in erythroid cells. 第 79 回日本血液学会総会 2017 年 10 月 20 日 東京国際フォーラム (東京)
4. 藤原亨、福原規子、猪俣美津恵、大西康、古山和道、張替秀郎. ALAS2 遺伝子変異を認めた大球性鉄芽球性貧血の一例. 第 41 回日本鉄バイオサイエンス学会 2017 年 9 月 23 日 東京女子医科大学弥生記念講堂 (東京)
5. Fujiwara T, Sasaki K, Saito K, Hatta S, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Harigae H. Exploring the mechanism of FOG1-dependent transcriptional regulation in erythroid cells. 第 22 回欧州血液学会 2017 年 6 月 23 日 マドリード (スペイン)
6. Saito K, Fujiwara T, Morita M, Hatta S, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Shimizu R, Harigae H. Establishment of *in vivo* and *in vitro* model of X-linked sideroblastic anemia. 第 22 回欧州血液学会 2017 年 6 月 23 日 マドリード (スペイン)
7. Hatta S, Fujiwara T, Yamamoto T, Kamata M, Tamai Y, Nakamura Y, Kawamata S, Harigae H. Generation of induced Pluripotent Stem Cell-Derived Erythroblasts from a Patient with

- X-Linked Sideroblastic Anemia.
第7回国際鉄バイオサイエンス学会 2017
年5月10日 ロサンゼルス(アメリカ)
8. Hatta S, **Fujiwara T**, Yamamoto T, Kamata
M, Tamai Y, Nakamura Y, Kawamata S,
Harigae H. Generation of induced
pluripotent stem cell-derived
erythroblasts from a patient with
X-linked sideroblastic anemia.
第58回米国血液学会 2016年12月4
日 サンディエゴ(アメリカ)
9. **Fujiwara T**. Transcriptional
regulation of erythropoiesis.
第78回日本血液学会総会
2016年10月13日
パシフィコ横浜(横浜)
10. Kondo A, **Fujiwara T**, Okitsu Y, Fukuhara
N, Onishi Y, Nakamura Y, Sawada K,
Harigae H. Identification of a novel
putative mitochondrial protein
FAM210B associated with erythroid
differentiation. 第78回日本血液学
会総会 2016年10月13日
パシフィコ横浜(横浜)
11. **Fujiwara T**, Harigae H. Epidemiology
and pathophysiology of sideroblastic
anemia. 第89回日本生化学会
2016年9月27日
仙台国際センター(仙台)
12. Onodera K, **Fujiwara T**, Onishi Y,
Itoh-Nakadai A, Okitsu Y, Fukuhara N,
Ishizawa K, Shimizu R, Yamamoto M,
Harigae H. GATA-2 regulates dendritic
cell differentiation. 第57回米国血
液学会 2015年12月6日
オーランド(アメリカ)
13. 藤原 亨, 張替 秀郎.
遺伝性鉄芽球性貧血の疫学と分子病態.
第39回日本鉄バイオサイエンス学会.
2015年8月30日
- 岡山コンベンションセンター(岡山)
14. **Fujiwara T**, Harigae H. Role of GATA-2
in the pathogenesis of bone marrow
failure. 第6回日本血液学会国際シ
ンポジウム 2015年5月23日
軽井沢プリンスホテル(軽井沢)
15. **Fujiwara T**, Harigae H. Role of GATA-2
in the pathogenesis of bone marrow
failure. 第6回日本血液学会国際シ
ンポジウム 2015年5月23日
軽井沢プリンスホテル(軽井沢)
- 〔図書〕(計4件)
1. 藤原 亨, 張替 秀郎. 科学評論社
月刊「血液内科」; 鉄芽球性貧血の分
子病態: Tet2 の意義
2018年, 第76巻第2号, p235-241.
2. 藤原 亨. 科学評論社
月刊「血液内科」; MonoMAC 症候群
の病態と治療.
2018年, 第76巻第1号, p95-100.
3. 藤原 亨, 古山 和道, 張替 秀郎.
診断と治療社 「先天性骨髄不全症
診療ガイドライン 2017」; 遺伝性鉄芽
球性貧血. 2017年, p25-32.
17. 藤原 亨. 科学評論社
月刊「血液内科」; 鉄芽球性貧血の分
子病態研究の進展.
2016年, 第73巻第2号, p175-181.
- 〔産業財産権〕
出願状況(計0件)
取得状況(計0件)
- 〔その他〕
血液免疫病学分野ホームページ
<http://www.rh.med.tohoku.ac.jp/>
6. 研究組織
(1)研究代表者
藤原 亨(FUJIWARA, TOHRU)
東北大学・大学病院・講師
研究者番号: 60333796