

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06874

研究課題名(和文)環状鉄芽球における細胞死のメカニズムの解明

研究課題名(英文)Analyses of the mechanism for the cell death of ring sideroblasts

研究代表者

古山 和道 (Furuyama, Kazumichi)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：80280874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性鉄芽球性貧血(CSA)は骨髄における環状鉄芽球の出現を特徴とする稀な遺伝性貧血症である。我々はゲノム編集技術を用いて、従来は患者骨髄でしか観察されなかった環状鉄芽球をin vitroで観察することに成功した。このCSAモデル細胞(HA2low細胞)を用いて検討したところ、HA2low細胞は野生型細胞に比べて分化誘導後の死細胞数が多いこと、そして、HA2low細胞の細胞死は細胞内鉄過剰が原因の細胞死であるferroptosisの阻害剤により部分的に回復することが明らかとなった。このことからHA2low細胞の過剰な細胞死の一部はferroptosisによるものである可能性が高いと推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝性鉄芽球性貧血(CSA)は環状鉄芽球の出現を特徴とする疾患だが、環状鉄芽球の性質については不明な点が多い。本研究では、in vitroで環状鉄芽球の形成を誘導可能なモデル細胞を利用し、モデル細胞は細胞死を起こしやすい性質を有すること、その細胞死のうち少なくとも一部はferroptosis(過剰な鉄に起因する酸化ストレスが誘導する細胞死)による可能性が高いことを明らかにした。臨床的にCSA患者では鉄の過剰な蓄積が見られることが知られており、除鉄により貧血が改善する例も報告されているが、その理論的背景の説明に資する結果と考えている。

研究成果の概要(英文)：Congenital sideroblastic anemia (CSA) is a relatively rare disorder characterized by the presence of ring sideroblasts in a patient's bone marrow. We have previously established the CSA model cells (HA2low cells) using cultured erythroblastoid cell lines in which the ALAS2 gene was mutated by genome editing method. Using HA2low cells, we have tried to examine the cause of cell death of erythroblasts in CSA patients. After the induction of erythroid differentiation, the rate of cell death in HA2low cells is more significant than that in wild-type cells. However, the increased rate of cell death in HA2low cells during erythroid differentiation was partially rescued by the treatment with the antagonist of ferroptosis, a kind of programmed cell death caused by the oxidative stress originated by the excess cellular iron accumulation. These results suggested that ferroptosis may be one of the causes of the increase of cell death in HA2low cells and anemia observed in CSA patients.

研究分野：生化学、分子生物学

キーワード：遺伝性鉄芽球性貧血 細胞死 ferroptosis 疾患モデル細胞 ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝性鉄芽球性貧血(CSA)は特定の遺伝子の変異により発症する遺伝性疾患の一つで、骨髄に環状鉄芽球の出現を伴うことを特徴とする貧血症である。本邦で CSA の原因遺伝子として最も多く変異が同定されるのは赤芽球におけるヘム合成の律速酵素である赤芽球特異的 5-アミノレブリン酸合成酵素遺伝子(ALAS2)である。環状鉄芽球は、赤血球の前駆細胞である赤芽球の核の周囲を取り囲む様に鉄の沈着したミトコンドリアが観察される細胞で、ミトコンドリアにおけるヘムの合成に利用されるはずであった鉄が利用されずに蓄積したものと考えられている。さらに CSA では赤芽球から赤血球に分化することができずに細胞死する、いわゆる無効造血の頻度が増すものと考えられていたことから、環状鉄芽球は赤血球に分化することなく細胞死を迎えるものと推察されていた。一方で、環状鉄芽球が無効造血の原因なのか、もしそうであればどのような機序により細胞死を起こすのかについては知られていなかった。

2. 研究の目的

環状鉄芽球は鉄芽球性貧血患者の骨髄で観察されるが、in vitro で人工的に作成することは困難であった。申請者は、ゲノム編集技術を用いてヒト臍帯血由来で非腫瘍性の赤芽球系培養細胞である HUDEP2 細胞の ALAS2 遺伝子に変異を導入することにより、環状鉄芽球を再現性よく観察できる CSA モデル細胞(HA2low 細胞)を樹立することに成功し、報告した¹⁾。この CSA モデル細胞を用いて、環状鉄芽球は細胞死を起こしやすいのか、また、起こしやすいとすればどのような種類の細胞死を起こしやすいのか。さらに、臨床的に無効造血を起こすと考えられている鉄欠乏性貧血(IDA)の赤芽球の細胞死とは種類が異なるのか、などを明らかにし、比較することにより、環状鉄芽球の細胞死のメカニズムを明らかにできると考え、本研究を立案するに至った。

3. 研究の方法

CSA モデル細胞は野生型の HUDEP2 細胞と同様に赤芽球の状態が増殖が可能だが、分化誘導することにより環状鉄芽球が観察される。環状鉄芽球はミトコンドリアに過剰な鉄が沈着した赤芽球であるため、細胞死の原因として、過剰な細胞内鉄が細胞膜の脂質の過酸化を惹起して細胞死を誘導する ferroptosis の可能性が高いと考えた。コントロールとして、無効増血が亢進することが知られている鉄欠乏性貧血のモデル細胞(IDA 細胞)を HUDEP2 細胞を鉄欠乏条件下で培養して作成し、これらと比較することにより、鉄芽球性貧血と鉄欠乏性貧血における無効造血の原因の差異を明らかにできると考えた。

4. 研究成果

(1)鉄欠乏条件の検討：HUDEP2 細胞の培養液中に鉄のキレート剤として知られる deferriprone(DFP)を添加することで鉄欠乏状態とし、細胞内の ferritin の発現量(鉄過剰状態で増加し、鉄欠乏状態では減少する)を元に細胞内の鉄欠乏状態を評価した。その結果、50 μ M の DFP を添加して4日間培養した HUDEP2 細胞では ferritin の発現が再現性よく低下することが明らかとなった。したがって、この条件下ではそれぞれの細胞は鉄欠乏状態にあるものと推察されたため、この条件で維持した HUDEP2 細胞を鉄欠乏性貧血モデル細胞(IDA 細胞)として用いることとした。

(2)FACSを用いた赤血球の検出や環状鉄芽球の検出方法の検討：まずFluorescence-activated cell sorting (FACS)法を用いて分化誘導した赤血球を検出できるか検討を行った。HUDEP2細胞はヒトパピローマウイルス16(HPV16)由来のE6/E7タンパク質をDoxycyclin(DOX)誘導性に発現させることにより不死化させ、stem cell factor (SCF)を培養液中に添加することにより赤芽球からの分化を抑制しており、DOXおよびSCFを培養液中から除去することにより赤血球への分化誘導が可能である。赤血球まで分化誘導されたHUDEP2細胞は脱核し赤血球となることが知られているが、同時に多くの細胞が崩壊し、多数の細胞断片が生じる。赤血球は通常の有核細胞に比べると非常に小さく、細胞断片の大きさと近い。FACSを用いて細胞死した細胞の断片と分化脱核した赤血球を区別することができるか検討を行ったが、我々が用いたFACS装置では判別することは困難であった。また、環状鉄芽球を鉄染色を行わずに濃縮する方法についてもいくつかの細胞表面マーカーを用いて検討を行ったが、分化誘導後に残る有核細胞はかなり少ないこともあり、我々が検討した条件ではFACSを用いて環状鉄芽球を濃縮することは困難であった。

(3)環状鉄芽球への分化誘導条件について：HUDEP2細胞とHA2low細胞を通常の分化誘導条件下で分化誘導し、trypan blue染色法を用いて細胞の生存率を比較したところ、野生型細胞では分化誘導前の約3割、HA2low細胞では約2割の細胞が有核細胞として確認されるのみであった。このため、分化後でも有核細胞が多く残る条件の検討を行っていたところ、日本国内の他のグループから、HUDEP2細胞に我々とは異なるALAS2変異を導入したCSAモデル細胞の樹立とそのCSAモデル細胞はferroptosisに対する感受性が野生型HUDEP2より高いという報告がなされた²⁾。このグループが用いていた培養条件を参考とし、分化誘導時にSCFは除去しつつDOXの添加を継続したところ、野生型細胞で分化誘導前の約6割、HA2low細胞で約4割の細胞が有核細胞として残存することが明らかとなった。

(4)細胞死の種類についての検討：環状鉄芽球ではミトコンドリアに過剰な鉄が沈着することから、遺伝性鉄芽球性貧血患者の骨髄の赤芽球がミトコンドリアの機能低下に伴い細胞死が誘導され、無効造血の原因となるものと考えられる。このため、環状鉄芽球は、過剰な細胞内の鉄が細胞死に深く関わるferroptosisにより細胞死する可能性が高いと考えていた。実際、引用文献2)では、ferroptosisの誘導剤により、CSAモデル細胞は野生型細胞より細胞死が起こりやすいことが示された。一方、我々は、野生型HUDEP2およびHA2low細胞を分化誘導後にferroptosisの阻害剤を添加したところ、HA2low細胞でのみcontrolに比較して生存率の改善が見られる傾向にあることを見出したが、ferroptosisの阻害剤を添加した場合でも野生型に比較して生存率は低いままであった。これらの結果は、分化誘導時におけるHA2low細胞の細胞死には部分的にferroptosisが関与する可能性が高いが、それのみではHA2low細胞の分化誘導後の低い生存率を説明することは困難であることを示唆するものと考えている。

引用文献

- 1) Kaneko K., et al., Exp Hematol 2018 Vol. 65 Pages 57-68 e2
DOI:10.1016/j.exphem.2018.06.002
- 2) Ono K., et al., Sci Rep 2022 Vol. 12 Issue 1 Pages 9024. DOI:10.1038/s41598-022-12940-9

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 古山 和道、Kamata Costantine Chasama	4. 巻 75
2. 論文標題 遺伝性鉄芽球性貧血の確定診断における <i>in vitro</i> 実験系の役割について	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 岩手医学雑誌	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.24750/iwateishi.75.1_1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Costantine Chasama Kamata, Yoshiko Kubota, Kazumichi Furuyama	4. 巻 75
2. 論文標題 Erythroid-specific 5-aminolevulinate synthase is stabilized by HSPA9 in mitochondrial matrix	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Iwate Medical Association	6. 最初と最後の頁 49-67
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.24750/iwateishi.75.2_49	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 鈴木 亘, Costantine Chasama Kamata, 古山 和道	4. 巻 75
2. 論文標題 質量分析による赤芽球特異的5-アミノレブリン酸合成酵素複合体タンパク質の解析	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 岩手医学雑誌	6. 最初と最後の頁 69-79
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.24750/iwateishi.75.2_69	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki Ko, Kubota Yoshiko, Kaneko Kiriko, Kamata Costantine Chasama, Furuyama Kazumichi	4. 巻 299
2. 論文標題 CLPX regulates mitochondrial fatty acid -oxidation in liver cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 105210~105210
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2023.105210	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木 亘, 久保田 美子, 金子 桐子, 古山 和道
2. 発表標題 CLPXはタンパク質相互作用の調節を介して肝細胞におけるミトコンドリア 酸化を制御する
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金子 桐子, 久保田 美子, 鈴木 亘, 古山 和道
2. 発表標題 SLC25A38遺伝子変異細胞の樹立
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久保田 美子, 鈴木 亘, 金子 桐子, 古山 和道
2. 発表標題 非特異的5-アミノレブリン酸合成酵素のヘム依存的分解反応に関わる因子の同定
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古山和道
2. 発表標題 ミトコンドリアシャペロンCLPXによる代謝制御機構について
3. 学会等名 レドックスR&D戦略委員会2022年度夏のシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木亘、久保田美子、金子桐子、Kamata Costantine Chasama、古山和道
2. 発表標題 CLPXはタンパク質相互作用の調節を介して肝細胞におけるミトコンドリア 酸化を制御する
3. 学会等名 第21回日本ミトコンドリア学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古山和道
2. 発表標題 Multiple roles of mitochondrial ATP-dependent unfoldase CLPX in the regulation of intracellular energy metabolism
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木 亘、久保田 美子、金子 桐子、Kamata C.C.、古山 和道
2. 発表標題 CLPXは肝細胞においてミトコンドリア 酸化を制御する
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岩手医科大学分子医化学分野
https://www.iwate-med.ac.jp/education/gakubu_in/med_kouza/seika/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	久保田 美子 (Kubota Yoshiko) (30260102)	岩手医科大学・医学部・准教授 (31201)	
研究分担者	金子 桐子 (Kaneko Kiriko) (10545784)	岩手医科大学・医学部・講師 (31201)	
研究分担者	鈴木 巨 (Suzuki Ko) (90610395)	岩手医科大学・医学部・助教 (31201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関