

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09910

研究課題名(和文)鉄芽球性貧血モデル細胞を用いたミトコンドリア鉄蓄積機構の解明

研究課題名(英文)The analysis of mechanism for mitochondrial iron accumulation on sideroblastic anemia model cells

研究代表者

金子 桐子(Kaneko, Kiriko)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：10545784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本課題は鉄芽球性貧血における鉄蓄積する機構の解明を目的に、モデル細胞の樹立および解析を行った。先天性鉄芽球性貧血の責任遺伝子であるSLC25A38およびGLRX5各ゲノムDNAに変異を導入した。これらの細胞は分化誘導によって鉄芽球が出現することを確認した。さらにこれらの細胞の特徴は、すでに報告しているALAS2変異導入細胞と同等であった。また、細胞内における鉄代謝関連因子の発現に変化が認められたことから、変異導入細胞では鉄の移入量が増加することによって鉄の蓄積が促進される可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題の成果として樹立した細胞は鉄芽球性貧血における鉄蓄積機構の解明を目的とした。すでに樹立に成功、報告したALAS2変異細胞であるHA2low1細胞について、国内外の研究者より分与依頼を受けた。これまでに培養細胞において鉄蓄積を誘導できる細胞株がなかったことから、鉄芽球性貧血のみならず、赤芽球分化研究のツールのひとつとして有用である可能性が考えられた。赤芽球系の疾患は血液系の中でも大きな割合ではないが、確かに存在する疾患の治療への一助となりうる疾患モデル細胞のひとつとして樹立できた成果は学術的のみならず、社会的にも貢献できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：This study tried to establish model cells for sideroblastic anemia and analyze for elucidation of the iron accumulation mechanism in congenital sideroblastic anemia (CSA). To establish model cell, SLC25A38 and GLRX5, a kind of CSA responsible genes, were inserted mutation its genomic DNA using CRISPR-Cas9 system. And these cells were observed sideroblast after differentiation. The characters of these mutated cells were similar to ALAS2 mutated cells. As the analyze for iron accumulation mechanism, the result of induction of DMT1 expression in HA2low1 cells suggested that iron import may enhance on CSA model cells.

研究分野：ヘム合成

キーワード：鉄代謝 ヘム合成 赤血球分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先天性鉄芽球貧血(Congenital Sideroblastic Anemia, CSA)は骨髄における環状鉄芽球の出現を特徴とする遺伝性の貧血で、本邦の CSA 患者ではヘム合成系の初発律速酵素である赤血球特異的アミノレブリン酸合成酵素(ALAS2) 遺伝子のミスセンス変異を原因とする事が最も多い。我々は ALAS2 遺伝子の新規エンハンサーを同定し、既報 CSA 原因遺伝子エクソン部分に変異が認められず原因不明の CSA であった患者にそのエンハンサーの変異を見出した(引用文献 1)。しかしながら、ミトコンドリアへの鉄が蓄積するメカニズムの詳細は未解明な部分が多い。これまでに、鉄芽球の出現を認める ALAS2 欠失モデルマウスはすでに作成されているが、培養細胞におけるモデル細胞は作製されていなかった。そこで我々は鉄蓄積機構の解明を目的に、ALAS2 に変異を導入し、鉄芽球が出現する細胞株を樹立した。(引用文献 2)

2. 研究の目的

遺伝性の貧血である先天性鉄芽球性貧血は原因となる遺伝子が複数報告されているが、共通の特徴である環状鉄芽球の形成機序およびその帰結についての多くは不明である。我々は鉄の蓄積が貧血の病態に関与する可能性を考え先行研究においてALAS2 変異モデル細胞の樹立に成功した。本研究では、ALAS2以外の鉄芽球性貧血原因遺伝子に変異を有するモデル細胞の樹立およびそれらを用いた鉄蓄積機構の解明を目的とした。

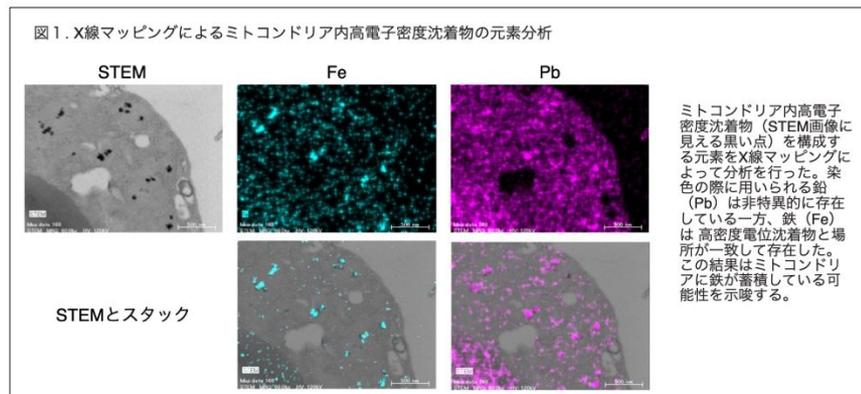
3. 研究の方法

- (1)CRISPR-Cas9 システムを用いて非腫瘍性の赤芽球前駆細胞 HUDEP2 を用いて、GLRX5, SLC25A38, SF3B1 各遺伝子に変異導入を行う。
- (2)変異導入クローン細胞について各遺伝子 mRNA 発現およびタンパク質発現の検討、ヘモグロビン合成能、鉄の蓄積など鉄芽球性貧血における特徴の有無を検討した。
- (3)鉄顆粒の出現条件および出現場所について鉄染色、電子顕微鏡によって解析を行った。

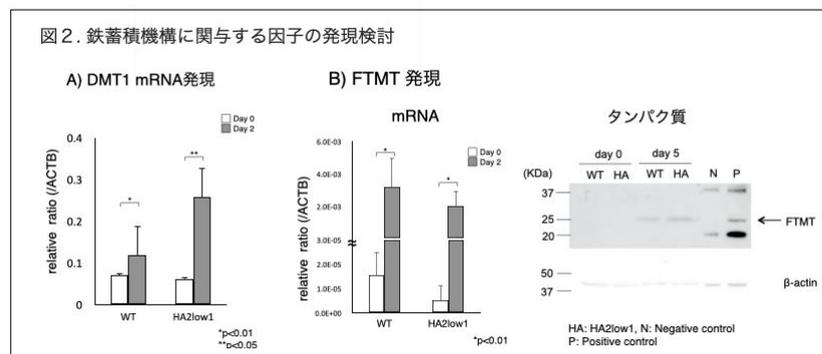
4. 研究成果

(1) ALAS2 に変異を導入した鉄芽球性貧血モデル細胞の作製および解析

すでに樹立した ALAS2 のイントロン 1 エンハンサー領域に変異導入した細胞株 HA2low1 細胞を用いた検討ミトコンドリア内高密度電位沈着物の解析：電子顕微鏡によって観察されたミトコンドリア内に見える高密度電位沈着物を構成する元素の同定を目的にエネルギー分散型 X 線分析 (Energy dispersive X-ray spectroscopy) を用いて分析を行った。その結果、沈着物は野生型として用いた HUDEP2 細胞(以下 WT)と比較して鉄が多く検出された。この結果より、変異細胞に特徴的に観察されたミトコンドリア内高密度電位沈着物は鉄であることが同定された。(図 1)



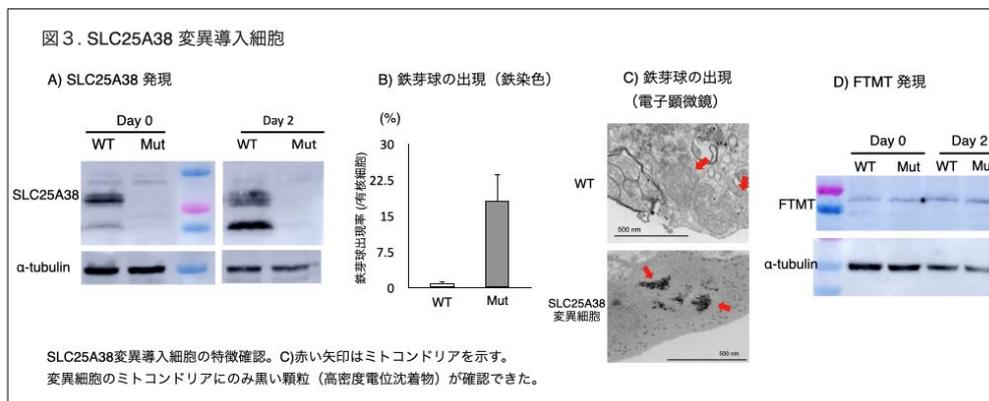
鉄蓄積機構の検討：細胞質およびミトコンドリアにおける鉄代謝関与因子について発現検討を行った。その結果、WTと比較してHA2low1細胞におけるDMT1 mRNAの増加を確認した(図 2A)。一方、ミトコンドリアにおいて鉄が蓄積すると考えられているミトコンドリアフェリチン(FTMT)の発現は鉄の蓄積に差があるにも関わらず、mRNA、タンパク質ともにWTとHA2low1細胞間における発現の差は認められなかった(図 2B)。



(2) ALAS2以外の鉄芽球性貧血モデル細胞作製および解析

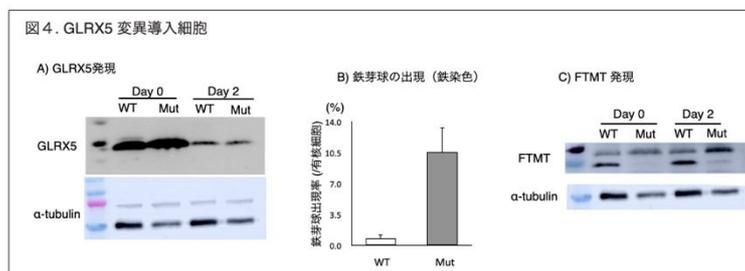
鉄芽球性貧血におけるミトコンドリア鉄蓄積機構の解明を目的に、異なる原因遺伝子の変異を持つ細胞を用いた比較検討を行う目的で、ALAS2以外の鉄芽球性貧血原因遺伝子に変異を持つモデル細胞の作製および解析を行った。

SLC25A38: 2種類のコホ変異を導入したクローンを得た。変異型はいずれも既報(引用文献3)の患者変異に類似している。その発現はWTと比較してmRNA発現において変化はないが、タンパクの発現はほとんど確認できない程度に低下した(図3A)。分化誘導による鉄芽球の蓄積を鉄染色(図3B)、および電子顕微鏡によるミトコンドリアへの高密度電位沈着物をそれぞれ確認した(図3C)。FTMTのタンパク質発現もHA2low1細胞と同様にWTとの差は認められなかった(図3D)。



GLRX5: 1種類の変異を導入したクローンを得た。エクソンジャンクション部分にそれぞれ挿入/欠失が導入されたコンパウンドヘテロであった。その発現はWTと比較してタンパク質の発現は低下した(図4A)。

分化誘導による鉄の蓄積を確認したが、前述2つの細胞株と比較して鉄芽球の出現率は低かった(図4B)。一方、FTMTのタンパク質発現は同様にWTとの差は認められなかった(図4C)。



SF3B1: 変異導入については条件検討を何度も行ったがこれまでにホモ欠失変異導入された細胞株は得られなかったが、野生型と変異型のヘテロ欠失変異細胞を得た。SF3B1ホモ欠失マウスは胎生致死であることから、培養細胞も生存が困難である可能性が高いと考えられた。得られたヘテロ変異クローンの発現はWTと比較してタンパクの発現は低下したが、分化誘導による鉄芽球の出現率はWTと差異が認められなかった。現在、さらにその特徴について解析を進めるとともに、ホモ変異細胞の樹立を継続して試みている。

以上から、本課題によって鉄芽球性貧血の責任遺伝子として報告されていた SLC25A38 および GLRX5 各遺伝子の変異によってミトコンドリアに鉄が蓄積すること、それ以外の特徴が HA2low1 と同等であることを確認した。しかしながら、ヘテロ変異によりその発現が低下したものの、鉄芽球が観察されなかった SF3B1 については引き続き検討を行う。鉄蓄積機構については鉄の蓄積先はいずれの変異細胞での FTMT である可能性が考えられた。DMT1 mRNA 発現に変化が認められた結果は、変異導入により鉄の移入が増加する可能性が考えられた。本研究で得られたこれらの結果を元に、各細胞株を用いて鉄蓄積機構の解明をするべく、さらなる検討を行う予定である。

引用文献

Kaneko K. et al., Identification of a novel erythroid-specific enhancer for the ALAS2 gene and its loss-of-function mutation which is associated with congenital sideroblastic anemia *Haematologica*, 99, 2, 2014, 252-261

Kaneko K. et al., Establishment of a cell model of X-linked sideroblastic anemia using genome editing *H Experimental Hematology*, 65, 2018, 57-68

Guernsey L. et al, Mutations in mitochondrial carrier family gene SLC25A38 cause nonsyndromic autosomal recessive congenital sideroblastic anemia *Nature Genetics*, 41, 6, 2009, 651-653

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hirose Takuo, Cabrera-Socorro Alfredo, Chitayat David, Lemonnier Thomas, Feraud Olivier, Cifuentes-Diaz Carmen, Gervasi Nicolas, Mombereau Cedric, Ghosh Tanay, Stoica Loredana, Bacha Jeanne d' Arc Al, Yamada Hiroshi, Lauterbach Marcel A., Guillon Marc, Kaneko Kiriko, Norris Joy W., Siriwardena Komudi et al.	4. 巻 129
2. 論文標題 ATP6AP2 variant impairs CNS development and neuronal survival to cause fulminant neurodegeneration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 2145-2162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI79990	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 該当する

1. 著者名 Kaneko Kiriko, Kubota Yoshiko, Nomura Kazumi, Hayashimoto Haruka, Chida Taisei, Yoshino Naoto, Wayama Marina, Ogasawara Katsutoshi, Nakamura Yukio, Tooyama Ikuo, Furuyama Kazumichi	4. 巻 65
2. 論文標題 Establishment of a cell model of X-linked sideroblastic anemia using genome editing	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Hematology	6. 最初と最後の頁 57 ~ 68.e2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exphem.2018.06.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Furuyama Kazumichi, Kaneko Kiriko	4. 巻 107
2. 論文標題 Iron metabolism in erythroid cells and patients with congenital sideroblastic anemia	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 44 ~ 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-017-2368-0	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久保田美子, 金子桐子, 鈴木巨, Kamata Costantine Chasama, 古山和道
2. 発表標題 ミトコンドリア内ヘム依存的ALAS1分解の調節機構
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金子桐子
2. 発表標題 赤芽球における鉄蓄積機構解析
3. 学会等名 第91回 日本生化学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金子桐子
2. 発表標題 ALAS2変異による遺伝性鉄芽球性貧血のモデル細胞樹立
3. 学会等名 2017年度生命科学系合同年次大会 第90回日本生化学会大会 第40回日本分子生物学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	古山 和道 (Furuyama Kazumichi) (80280874)	岩手医科大学・医学部・教授 (31201)	