

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08314

研究課題名(和文) 後天性鉄芽球性貧血の分子疫学及び病態の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular epidemiology and pathophysiology of acquired sideroblastic anemia

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：鉄芽球性貧血は、先天性と後天性に大別されるが、その大部分は骨髄異形成症候群(MDS)に伴う後天性鉄芽球性貧血(MDS-RS)である。MDS-RSにおいては、RNAスプライシング機構に関わるSF3B1遺伝子の変異を多くの症例で認めるが、環状鉄芽球の形成機序については明らかとされていない。ヒトさい帯血由来赤血球前駆細胞株HUDEP-2細胞についてSF3B1-K700E安定発現株を樹立したところ環状鉄芽球形成が確認された。さらに先天性鉄芽球性貧血の原因遺伝子であるABCB7の低下を認めたので、HUDEP-2細胞でABCB7遺伝子をノックダウンしたところ、同様に環状鉄芽球形成が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

後天性鉄芽球性貧血の代表であるMDS-RSにおける環状鉄芽球形成機序について、先天性と共通の分子基盤が存在する可能性があるが、この点について包括的な解析を行った報告は国内外を含め認められない。本分子基盤の一端を明らかにしたことは、MDS-RSのみならず鉄芽球性貧血全体の病態の理解に繋がるだけでなく、MDS-RSへの新規治療法の開発にも繋がる可能性がある。また、本研究成果が赤芽球におけるヘム・鉄代謝に関する未知の生理的機構の解明に繋がる可能性もある。

研究成果の概要(英文)：Acquired sideroblastic anemia, characterized by bone marrow ring sideroblasts (RS), is predominantly associated with myelodysplastic syndrome (MDS). Although somatic mutations in splicing factor 3b subunit 1 (SF3B1), which is involved in the RNA splicing machinery, are frequently found in MDS-RS, the detailed mechanism contributing to RS formation is unknown. To explore the mechanism, we established human umbilical cord blood-derived erythroid progenitor-2 (HUDEP-2) cells stably expressing SF3B1K700E. SF3B1K700E expressing cells showed higher proportion of RS than the control cells along with erythroid differentiation. In SF3B1K700E expressing cells, ABCB7 and ALAS2, known causative genes for congenital sideroblastic anemia, were downregulated. ABCB7-knockdown HUDEP-2 cells revealed an increased frequency of RS formation along with erythroid differentiation. Finally, RNA-seq analysis of MDS clinical samples demonstrated decreased expression of ABCB7 by the SF3B1 mutation.

研究分野：血液内科学

キーワード：後天性鉄芽球性貧血

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

鉄芽球性貧血は、骨髄における環状鉄芽球の出現を特徴とする難治性の貧血である。鉄芽球性貧血は、先天性と後天性に大別されるが、その大部分は骨髄異形成症候群(MDS: Myelodysplastic syndrome)に伴う後天性鉄芽球性貧血(MDS-RS: MDS with ring sideroblasts)である。MDS-RS においては、RNA スプライシング機構に関わる *SF3B1* 遺伝子の変異を多くの症例で認める一方で、*SF3B1* 遺伝子変異を有さない MDS-RS の分子疫学は未だ不明である。さらに、*SF3B1* 遺伝子変異の有無に関わらず、MDS における環状鉄芽球の形成機序については十分に明らかとされていない。先天性鉄芽球性貧血は、赤芽球でのヘム・鉄代謝などに関わる遺伝子の変異により発症するが、MDS-RS における環状鉄芽球形成機序についても先天性と共通の分子基盤が存在する可能性がある。

2. 研究の目的

本研究においては、MDS-RS における *SF3B1* 遺伝子変異による環状鉄芽球 (RS: ring sideroblasts) 形成機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

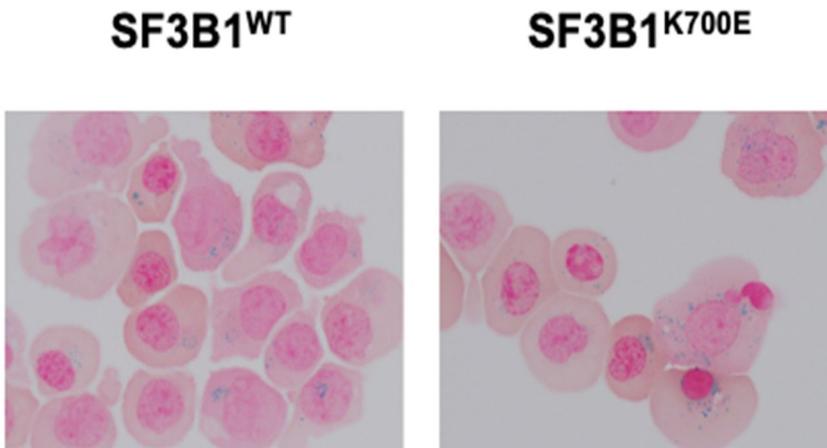
ヒトさい帯血由来赤血球前駆細胞株 HUDEP-2 細胞において、レトロウイルスベクター-pBABE-puro を用いた *SF3B1*-K700E 安定発現株を樹立し、OP9 細胞との共培養により赤血球系分化誘導を行った。さらにレンチウイルスベクターを用いて HUDEP-2 細胞における *ABC7* 遺伝子のノックダウンも施行した。また当院で MDS-RS と診断された臨床検体を用いて、RNA-seq 解析を行った。

4 . 研究成果

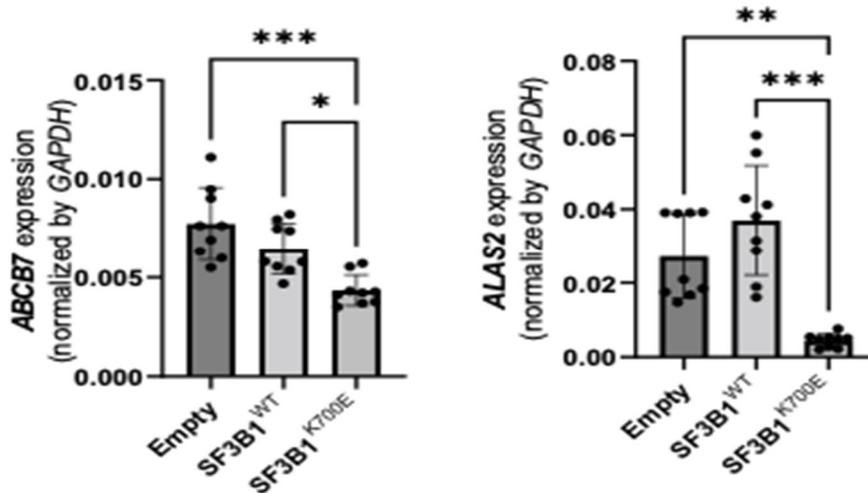
(1) SF3B1-K700E 安定発現 HUDEP-2 細胞の解析

SF3B1 変異が鉄芽球形成をもたらすかどうか確認するために、HUDEP2 細胞を用い SF3B1^{WT} および SF3B1^{K700E} 安定発現細胞を樹立した。それぞれの細胞を OP9 細胞との共培養による分化 day6-7 にサイトスピン標本を作成し、May-Grunwald Giemsa 染色および Prussian blue 染色を行った。May-Grunwald Giemsa 標本ではすべてのサンプルで細胞の小型化、核濃縮、細胞質の色調変化が認められ、多染性赤芽球レベルの細胞が大部分を占めていた。Prussian blue 染色標本では SF3B1^{K700E} 安定発現 HUDEP-2 細胞において多くの RS が観察され、計数によっても RS 割合が高い傾向を確認した (図 1)。電子顕微鏡標本において SF3B1^{K700E} 安定発現 HUDEP-2 細胞ではミトコンドリアに鉄の異常沈着を示唆する高電子密度の沈着が目立っていた。さらに先天性鉄芽球性貧血の原因遺伝子である ABCB7、ALAS2 の低下を認めた (図 2)。

当院で MDS と診断した症例についても RNA-seq 解析を行った。SF3B1 変異陽性 MDS 症例 (SF3B1^{MUT}-MDS) と SF3B1 正常型 MDS 症例 (SF3B1^{WT}-MDS) の間で遺伝子発現量を比較した所、SF3B1^{MUT}-MDS では ABCB7 発現量が低く、ALAS2 の発現量が高い傾向を認めたが有意差は認められなかった。また少数例ではあるが、公共データベースより得られた大規模検体の解析と同様に SF3B1 変異の有無によって CSA 原因遺伝子の発現パターンが異なっており、特に SF3B1 変異例における ABCB7 発現低下は一貫して確認された。



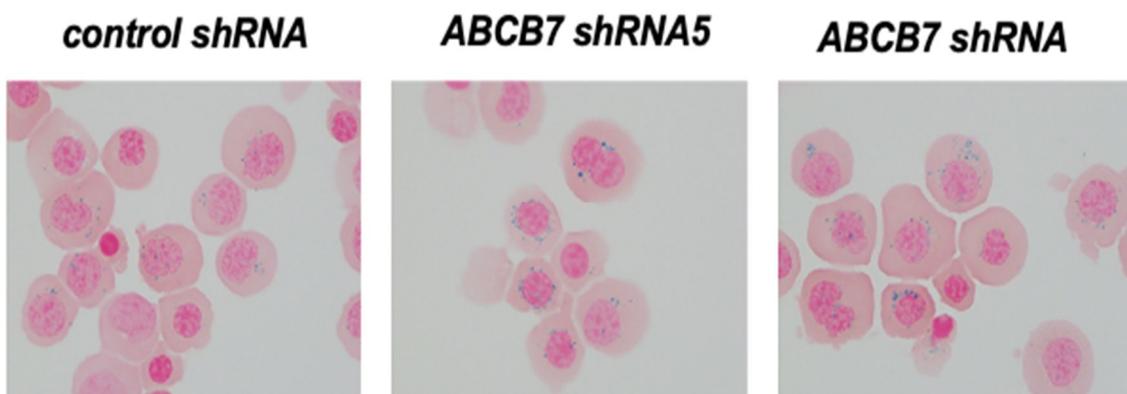
(図 1) 変異 SF3B1 発現 HUDEP-2 細胞による RS 形成



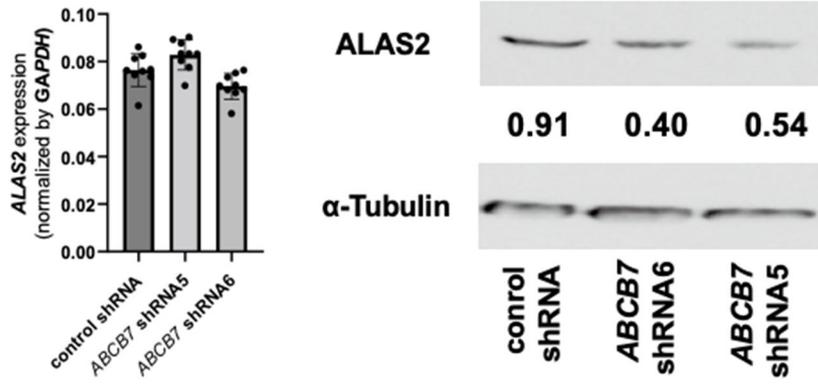
(図 2) 変異 SF3B1 発現 HUDEP-2 細胞における *ABCB7*、*ALAS2* 遺伝子の発現低下

(2) *ABCB7* ノックダウンによる環状鉄芽球の誘導

ABCB7 の発現異常と RS 形成との関連を明らかとするために、HUDEP-2 細胞において *ABCB7* ノックダウンを行い、OP9 との共培養により分化誘導を行った。その結果、Prussian blue 染色標本にて *ABCB7* ノックダウン株 (*ABCB7* shRNA5, shRNA6) における RS 形成を確認した (図 3)。定量 RT-PCR により *ABCB7* ノックダウン HUDEP-2 細胞における *ABCB7* 発現量低下を認めたが、*ALAS2* 発現量の変化は認めなかった。一方、ウエスタンブロットでは *ABCB7* ノックダウン HUDEP-2 細胞における *ALAS2* 蛋白質の減少が確認され、*ALAS2* mRNA の翻訳が抑制されていることが示唆された (図 4)。



(図 3) *ABCB7* ノックダウン HUDEP-2 細胞による RS 形成



(図 4) ABCB7 ノックダウン HUDEP-2 細胞における *ALAS2* 遺伝子発現 (左) と *ALAS2* 蛋白質発現 (右)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Abe Kotaro, Kanehira Masahiko, Ohkouchi Shinya, Kumata Sakiko, Suzuki Yamato, Oishi Hisashi, Noda Masafumi, Sakurada Akira, Miyauchi Eisaku, Fujiwara Tohru, Harigae Hideo, Okada Yoshinori	4. 巻 -
2. 論文標題 Targeting stanniocalcin 1 expressing tumor cells elicits efficient antitumor effects in a mouse model of human lung cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.3852	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 Ichikawa Satoshi, Fujiwara Tohru, Saito Kei, Sakurai Kazuki, Inokura Kyoko, Fukuhara Noriko, Yokoyama Hisayuki, Onodera Koichi, Onishi Yasushi, Kameoka Junichi, Harigae Hideo	4. 巻 -
2. 論文標題 Salvage Cord Blood Transplantation for Sustained Remission of Acute Megakaryoblastic Leukemia That Relapsed Early after Myeloablative Transplantation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.6796-20	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 Nishimura Akira, Hirabayashi Shinsuke, Hasegawa Daisuke, Yoshida Kenichi, Shiraishi Yuichi, Ashiarai Miho, Hosoya Yosuke, Fujiwara Tohru, Harigae Hideo, Miyano Satoru, Ogawa Seishi, Manabe Atsushi	4. 巻 68
2. 論文標題 Acquisition of monosomy 7 and a RUNX1 mutation in Pearson syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatric Blood & Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pbc.28799	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 Ichikawa Satoshi, Fujiwara Tohru, Saito Kei, Fukuhara Noriko, Yokoyama Hisayuki, Hatta Shunsuke, Onodera Koichi, Onishi Yasushi, Fujishima Fumiyoshi, Ichinohasama Ryo, Harigae Hideo	4. 巻 -
2. 論文標題 A novel case of T cell leukemia with recurrent genetic abnormalities accompanied by agranulocytosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00277-020-04241-w	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 藤原 亨	4. 巻 61
2. 論文標題 環状鉄芽球と鉄代謝	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 770 ~ 778
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.61.770	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 Iwaki K, Fujiwara T, Ito T, Suzuki C, Sasaki K, Ono K, Saito K, Fukuhara N, Onishi Y, Yokoyama H, Fujimaki S, Tanaka T, Tamura H, Fujiwara M, Harigae H	4. 巻 249
2. 論文標題 Flow cytometry-based photodynamic diagnosis with 5-aminolevulinic acid for the detection of minimal residual disease in multiple myeloma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Tohoku J Exp Med	6. 最初と最後の頁 19-28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1620/tjem.249.19	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 Kedar PS, Harigae H, Ito E, Muramatsu H, Kojima S, Okuno Y, Fujiwara T, Dongerdiye R, Warang PP, Madkaikar MR	4. 巻 60
2. 論文標題 Study of pathophysiology and molecular characterization of congenital anemia in India using targeted next-generation sequencing approach	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Hematol	6. 最初と最後の頁 408-416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-019-02716-9	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 該当する

1. 著者名 Nakagawa R, Onishi Y, Kawajiri A, Onodera K, Furukawa E, Sano S, Saito K, Ichikawa S, Fujiwara T, Fukuhara N, Harigae H	4. 巻 98
2. 論文標題 Preemptive therapy for cytomegalovirus reactivation after daratumumab-containing treatment in patients with relapsed and refractory multiple myeloma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ann Hematol	6. 最初と最後の頁 1999-2001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00277-019-03645-7	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 Fujiwara T	4. 巻 60
2. 論文標題 Sideroblastic anemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Rinsho Ketsueki	6. 最初と最後の頁 408-416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.60.408	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 Saito K, Fujiwara T, Hatta S, Morita M, Ono K, Suzuki C, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Kawamata S, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H	4. 巻 39
2. 論文標題 Generation and molecular characterization of human ring sideroblasts: A key role of ferrous iron in erythroid differentiation and ring sideroblast formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Cell Biol	6. 最初と最後の頁 pii: e00387-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MCB.00387-18	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 Saito K, Fujiwara T, Hatta S, Morita M, Ono K, Suzuki C, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Kawamata S, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Generation and molecular characterization of human ring sideroblasts: A key role of ferrous iron in erythroid differentiation and ring sideroblast formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Cell Biol	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MCB.00387-18	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 Fujiwara T	4. 巻 60
2. 論文標題 Molecular pathophysiology of sideroblastic anemia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Rinsho Ketsueki	6. 最初と最後の頁 1979-1987
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.59.1979	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 Kato H, Itoh-Nakadai A, Matsumoto M, Ishii Y, Watanabe-Matsui M, Ikeda M, Ebina-Shibuya R, Sato Y, Kobayashi M, Nishizawa H, Suzuki K, Muto A, Fujiwara T, Nannya Y, Cazzola M, Ogawa S, Harigae H, Igarashi K	4. 巻 19
2. 論文標題 Infection perturbs Bach2- and Bach1-dependent erythroid lineage choice to cause anemia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nat Immunol	6. 最初と最後の頁 496-497
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-018-0202-3	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 該当する

1. 著者名 Fujiwara T, Harigae H	4. 巻 133
2. 論文標題 Molecular pathophysiology and genetic mutations in congenital sideroblastic anemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Free Radic Biol Med	6. 最初と最後の頁 179-185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2018.08.008	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 Ishida H, Imamura T, Morimoto A, Fujiwara T, Harigae H	4. 巻 60
2. 論文標題 Five-aminolevulinic acid: New Approach for Congenital Sideroblastic Anemia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatr Int	6. 最初と最後の頁 496-497
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.13558	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 Hatta S, Fujiwara T, Yamamoto T, Saito K, Kamata M, Tamai Y, Kawamata S, Harigae H	4. 巻 103
2. 論文標題 A defined culture method enabling the establishment of ring sideroblasts from induced pluripotent cells of X-linked sideroblastic anemia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 e188-e191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2017.179770	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15件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Fujiwara T, Suzuki C, Sasaki K, Sano S, Ono K, Saito K, Onodera K, Ichikawa S, Fukuhara N, Onishi Y, Hisayuki Y, Harigae H.
2. 発表標題 FOG1-DEPENDENT TRANSCRIPTIONAL NETWORK INVOLVES GLUCOSE METABOLIC REGULATION OF ERYTHROID CELLS.
3. 学会等名 第25回欧州血液学会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ono K, Fujiwara T, Saito K, Suzuki C, Takahashi N, Yan Y, Onodera K, Ichikawa S, Fukuhara N, Onishi Y, Hisayuki Y, Fujimaki S, Nakamura Y, Harigae H.
2. 発表標題 TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF FERROPTOSIS IN X-LINKED SIDEROBLASTIC ANEMIA.
3. 学会等名 第62回米国血液学会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ono K, Fujiwara T, Saito K, Suzuki C, Takahashi N, Yan Y, Onodera K, Ichikawa S, Fukuhara N, Onishi Y, Hisayuki Y, Fujimaki S, Nakamura Y, Harigae H.
2. 発表標題 ROLE OF FERROPTOSIS IN X-LINKED SIDEROBLASTIC ANEMIA.
3. 学会等名 第25回欧州血液学会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fujiwara T, Ochi T, Suzuki C, Ono K, Saito K, Fukuhara N, Onishi Y, Yokoyama H, Nakamura Y, Harigae H.
2. 発表標題 Establishment of congenital sideroblastic anemia model due to ABCB7 defect.
3. 学会等名 第82回日本血液学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ono K, Fujiwara T, Saito K, Suzuki C, Takahshi N, Yan Y, Onodera K, Ichikawa S, Fukuhara N, Onishi Y, Yokoyama H, Nakamura Y, Harigae H.
2. 発表標題 Impact of ferroptosis in X-linked sideroblastic anemia.
3. 学会等名 第82回日本血液学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fujiwara T, Suzuki C, Ochi T, Ono K, Saito K, Fukuhara N, Onishi Y, Hisayuki Y, Fujimaki S, Nakamura Y, Harigae H
2. 発表標題 Characterization of congenital sideroblastic anemia model due to ABCB7 defects: How do defects in iron-sulfur cluster metabolism lead to ring sideroblast formation?
3. 学会等名 The 61th American Society of Hematology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fujiwara T, Saito K, Suzuki C, Ono K, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Harigae H
2. 発表標題 EPIDEMIOLOGY AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF CONGENITAL SIDEROBLASTIC ANEMIA
3. 学会等名 The 8th International Bioiron Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suzuki C, Fujiwara T, Shima H, Saito K, Ono K, Fukuhara N, Onishi Y, Hisayuki Y, Fujimaki S, Nakamura Y, Harigae H
2. 発表標題 Proteomic analysis of mitochondrial membrane protein FAM210B in erythroid cells
3. 学会等名 The 61th American Society of Hematology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ono K, Fujiwara T, Saito K, Suzuki C, Takahashi N, Onodera K, Ichikawa S, Fukuhara N, Onishi Y, Hisayuki Y, Nakamura Y, Harigae H
2. 発表標題 Molecular Characterization and Novel Therapeutic Strategy for X-linked Sideroblastic Anemia Associated with ALAS2 Missense Variants
3. 学会等名 The 61th American Society of Hematology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fujiwara T
2. 発表標題 Ring sideroblast and iron metabolism
3. 学会等名 The 81th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 1.Saito K, Fujiwara T, Hatta S, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Harigae H
2. 発表標題 Generation and molecular characterization of human ring sideroblasts
3. 学会等名 The 60th American Society of Hematology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Saito K, Fujiwara T, Hatta S, Onodera K, Ichikawa S, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Harigae H
2. 発表標題 Characterization of in vitro model of X-linked sideroblastic anemia
3. 学会等名 第80回日本血液学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ohashi K, Fujiwara T, Onodera K, Saito Y, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Harigae H
2. 発表標題 Establishment of a screening system to identify novel GATA-2 transcriptional regulators
3. 学会等名 第80回日本血液学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Onishi Y, Fujiwara M, Sano S, Nakagawa R, Kawajiri A, Saito K, Onodera K, Ichikawa S, Fukuhara N, Fujiwara T, Harigae H
2. 発表標題 Cyclosporine A treatment for T-cell large granular lymphocytic leukemia: a single-center experience
3. 学会等名 第80回日本血液学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤原 亨
2. 発表標題 鉄芽球性貧血の分子病態
3. 学会等名 第80回日本血液学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------