

令和 6 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：2021～2023

課題番号：21K08375

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析

研究課題名（英文）Analysis of mitochondrial iron accumulation mechanism 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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は遺伝性鉄芽球性貧血における、ミトコンドリア鉄蓄積機構および無効造血のメカニズム解明を目的として行なった。RNA-seq解析の結果、少なくとも検討に用いた鉄芽球性貧血モデル細胞株における鉄の蓄積は、鉄代謝が鉄の蓄積やヘム合成低下による影響を受けずに野生型と同等の鉄移入量があることで余剰鉄がミトコンドリアに蓄積する可能性が考えられた。また、鉄芽球性貧血モデル細胞における鉄蓄積条件下ではフェロトーシスが野生型細胞株より多く生じている可能性が考えられる結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、赤芽球系培養細胞における鉄蓄積機構の一端を明らかにした。赤芽球に鉄が蓄積する疾患において、鉄蓄積機構の解明は新たな治療法開発の一助となりうる。また、非赤芽球細胞と赤芽球細胞ではヘム合成系や鉄代謝において共通する機序も多く、近年、鉄蓄積やフェロトーシスが神経変性疾患や虚血性疾患に關与する報告があることから、鉄蓄積に關わる機序の解明はより幅広い疾患における治療法開発に寄与できる可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the mechanisms of mitochondrial iron accumulation and ineffective hematopoiesis in congenital sideroblastic anemia.

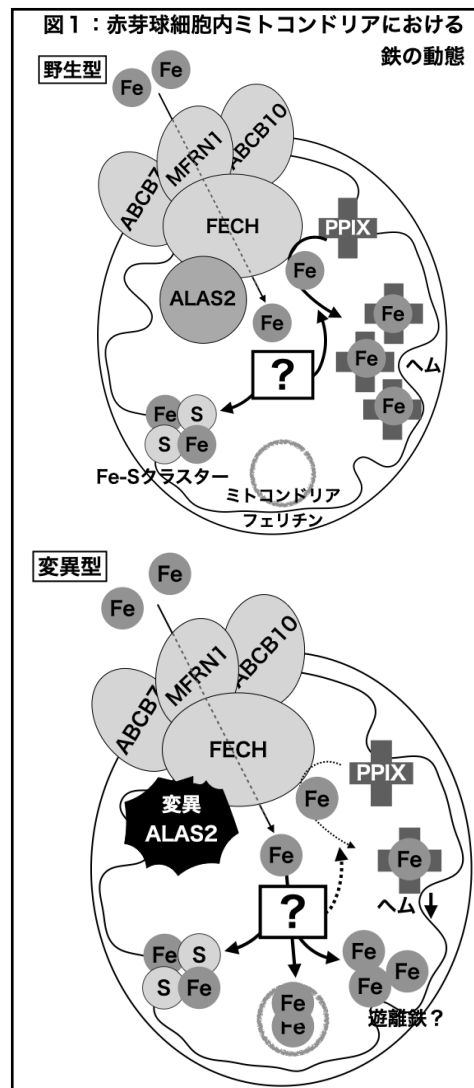
RNA-seq analysis revealed that iron import in sideroblastic anemia model cells is not affected by iron accumulation or decreased heme synthesis, and that iron is at the same level of iron import as in wild-type cells. Thus, the results suggest that excess iron may accumulate in mitochondria in model cells with reduced heme synthesis capacity. The results of investigation of ferroptosis also suggest that under conditions of iron accumulation in sideroblastic anemia model cells, ferroptosis may occur more frequently than in wild-type cell lines.

研究分野：分子生物学

キーワード：鉄代謝 ヘム合成系 フェロトーシス

1. 研究開始当初の背景

鉄芽球性貧血 (Sideroblastic Anemia, SA) は骨髄において鉄が赤芽球ミトコンドリアに蓄積した環状鉄芽球の出現を特徴とし、同時に赤芽球の骨髄内破壊 (無効造血) が進行する貧血である。遺伝性 (Congenital SA, CSA) と後天性に大別される。本邦において CSA 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がその原因の殆どである。鉄の蓄積は図 1 下に示すように変異による ALAS2 の発現低下に伴いプロトポルフィリン IX (PPIX) の合成が低下することで、PPIX に挿入されなかった余剰鉄がミトコンドリアフェリチンに蓄積したものと考えられている。しかしながら図 1 中の “?” で示すように、ミトコンドリアに移入した鉄がどのようなメカニズムでヘム合成や Fe-S クラスター合成に割り当てられるのか、ほとんど明らかではない。また、図 1 に示すように ALAS2 はフェロケラターゼ (FECH) を中心とした複合体の構成因子のひとつでもある。この複合体はミトコンドリアにおけるヘム合成系および鉄代謝に関与する因子の多くで構成されているが、複合体としての機能は不明である。また各因子は複合体を形成したまま既知の機能を果たすことが可能なのかも明らかではない。そこで申請者らは CSA における鉄蓄積機構の解明を目的に、CRISPR-Cas9 法を用いて ALAS2 に変異を持つ CSA モデル細胞を樹立した。本研究では、この細胞株を用いて ALAS2 変異による赤芽球ミトコンドリア鉄蓄積機構の解明を目的とする。さらに、鉄芽球性貧血に伴う無効造血への細胞死の関与についても検討を行う。細胞死のなかでも特にフェルトーシスは鉄過剰により生じた遊離鉄によって産生された活性酸素種 (ROS) が引き起こす脂質の過酸化反応がもたらす細胞死で、アルツハイマー病などの神経変性疾患や虚血性疾患への憎悪因子としての関与、悪性腫瘍に対する抑制因子としての機能が示唆されている⁽⁴⁾。赤芽球における鉄蓄積機構解析を介して細胞死メカニズムの一端を明らかにすることは、上記疾患の新たな治療方法開発の一助になりうる。



2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者らが樹立した鉄芽球性貧血モデル細胞を用いてミトコンドリアにおける鉄蓄積機構を明らかにすることである。生体内において最も鉄を利用する、赤芽球細胞のミトコンドリアにおける環状鉄芽球の形成およびその帰結についての多くは不明である。さらに昨今、鉄芽球性貧血による無効造血に細胞死の関与が示唆されているが、その詳細も不明である。本研究では、ALAS2 変異による鉄蓄積機構を明らかにすることを目的とし、さらに鉄蓄積による活性酸素種 (ROS) の産生を介した細胞死にそれらの鉄蓄積機構が関与する可能性を模索した。

3. 研究の方法

ヒト臍帯血由来赤血球前駆細胞株 HUDEP-2 を野生型、および我々の研究室で樹立した鉄芽球性貧血モデル細胞を用いて検討を行った。ALAS2 を含む複合体の同定には抗 ALAS2 抗体および抗 FECH 抗体を用いた免疫沈降を行った。鉄蓄積に関与する因子の同定・検索を目的とした網羅的解析には分化誘導前後の細胞より抽出した RNA を用いて RNA-seq 解析を行った。ALAS2 変異細胞と細胞死の関与検討には、Western blotting 法、qPCR、脂質過酸化検出によってフェルトーシスが起きているかどうか検討を行った。

4. 研究成果

(1) ALAS2 を含む複合体の同定

ヘム合成に関与する ALAS2 や FECH が複合体を形成する報告から、複合体の機能を調べる目的で HUDEP-2 細胞から抽出した可溶性タンパク質溶液と、抗 ALAS2 抗体および抗 FECH 抗体を用いて免疫沈降を行ったが、ほとんどタンパク質が回収できなかった。抗体が用いた条件では機能しにくい可能性を考慮し、FECH に His 標識を付加した組換えタンパク質を作成し、強制発現させた FECH タンパク質を抗 His 抗体にて免疫沈降を試みた。しかしながら、HUDEP-2 細胞において FECH タンパク質の発現効率が非常に低く、免疫沈降が困難であった。検討の結果、現在の条件では複合体の回収が難しいことが明らかになった。ヘム合成に関与する因子同士の相互作用は明らかになっていないことから、今後の検討が必要である。

(2) 鉄蓄積に関与する因子の同定・検索を目的とした網羅的解析

鉄芽球性貧血の特徴の一つは、ミトコンドリアに鉄が蓄積するが、そのメカニズムの多くは明らかになっていない。鉄蓄積に関与する因子を検索、同定を行う目的で、鉄が蓄積する条件で分化誘導を行った HUDEP-2 細胞と CSA モデル細胞より RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行った。その結果、細胞内の鉄量を反映して転写が調節される鉄トランスポーターであるトランスフェリン受容体 1 (TFRC)、DMT1、細胞質における鉄補足タンパク質であるフェリチン (FTH1)、ミトコンドリアにおける鉄トランスポーター SLC25A37、鉄を細胞内から細胞外へ排出するフェロポーチンのいずれにおいても、遺伝子発現と一致が高いとされる TPM (transcripts per million) の値に統計学的に有意な発現差が認められなかった (図 2)。これらの結果から、野生型と CSA モデル細胞内の鉄移入、排出における差異がないと考えられる。このことから、CSA モデル細胞では、ヘム合成能が低下しているにも関わらず、鉄の移入および排出が野生型と同様であることから、ヘム合成に利用されない余剰鉄がミトコンドリアにおいて蓄積する可能性が考えられた。これらの結果を元に、さらなる鉄蓄積機構の検討を行う予定である。

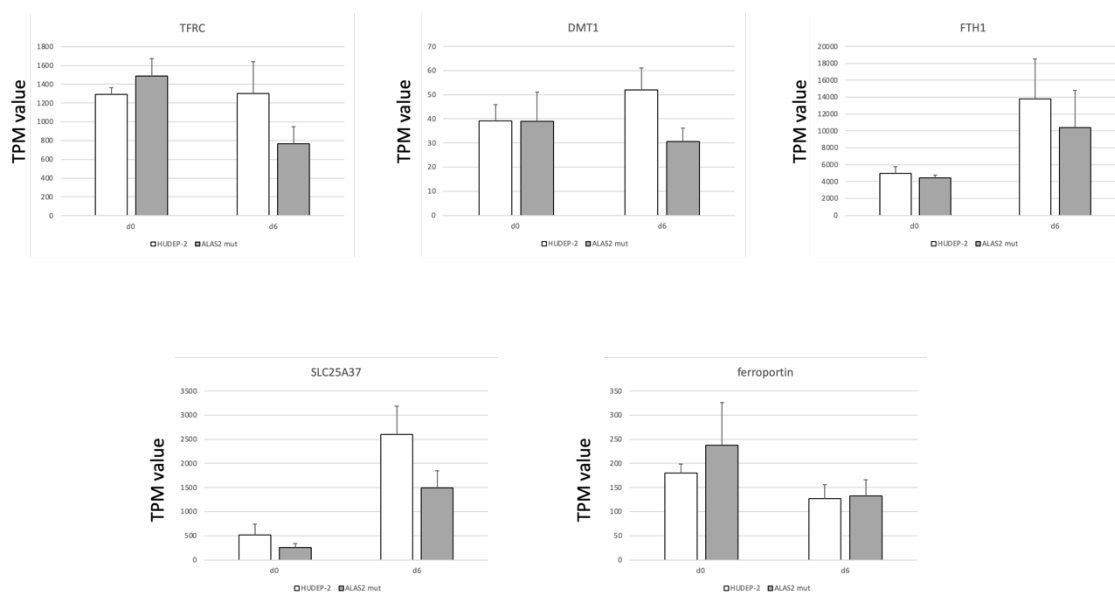


図 2. HUDEP-2 細胞と CSA モデル細胞 (ALAS2 変異導入細胞) を用いた RNA-seq における TPM

(3) フェロトーシスの検討

鉄芽球性貧血の特徴の一つは無効造血がある。無効造血とは、血球細胞が成熟細胞へ分化する過程に異常があり、正常に分化することができず末梢へ出る前に細胞が破壊される状態のことを言う。近年、鉄芽球性貧血における無効造血は鉄の蓄積によるフェロトーシスによるものと考えられているが、詳細は明らかではない。フェロトーシスとは鉄依存性の脂質過酸化の蓄積に起因する細胞死機構のひとつである。CSA モデル細胞において鉄蓄積条件下ではフェロトーシスが生じているのか、過酸化脂質検出試薬を用いて検討を行った。その結果、脂質の過酸化は野生型細胞でも分化誘導で生じていることがわかった。さらに、CSA モデル細胞は野生型と比較して増加傾向であった (図 3)。加えて、フェロトーシス阻害剤を添加したところ、過酸化脂質陽性細胞の割合が抑制傾向を示し、CSA モデル細胞にフェロトーシス阻害剤を添加し分化誘導を行った場合は脂質の過酸化は阻害剤を加えない野生型と同程度であった (図 3)。これらの結果から、CSA モデル細胞では鉄が蓄積する条件下ではフェロトーシスが野生型より多く生じている可能性が考えられた。しかしながら、他の CSA モデル細胞やフェロトーシス検出実験による更なる検証が必要である。

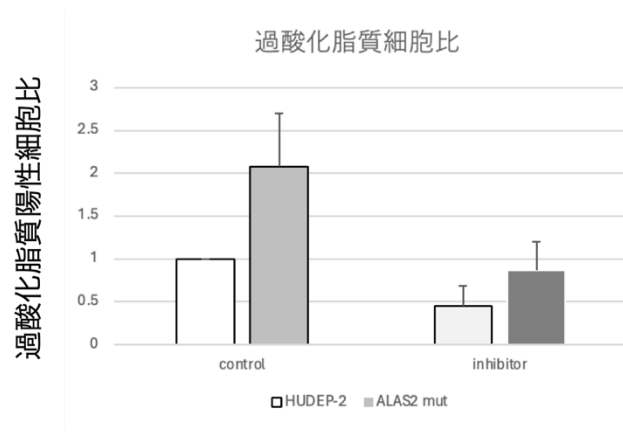


図 3. 分化誘導条件における HUDEP-2 細胞と CSA モデル細胞 (ALAS2 変異導入細胞過酸化脂質の検出

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金子 桐子, 久保田美子, 鈴木 亘, Kamata Costantine Chasama, 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

〔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)	
研究分担者	鈴木 亘 (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
---------	---------