

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 19日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22790922

研究課題名（和文） 先天性赤芽球癆の原因遺伝子によるオートファジー活性化の解析

研究課題名（英文） Analysis for the association of autophagy with diamond blackfan anemia associated genes.

研究代表者

倉光 球（Kuramitsu Madoka）

国立感染症研究所 血液・安全性研究部 研究員

研究者番号：00566383

研究成果の概要（和文）：リボソームタンパク質 S19 などが先天性赤芽球癆の原因遺伝子として明らかにされたが、発症メカニズムの詳細はまだ不明である。本研究では先天性赤芽球癆の原因遺伝子と細胞内物質の代謝機構の1つであるオートファジーとの関わりについて解析した。その結果、原因遺伝子の発現抑制によってオートファジーによる細胞内物質の分解が促進している可能性を *in vitro* 培養細胞の実験系等を用いて見いだした。

研究成果の概要（英文）：Responsible genes for Diamond Blackfan anemia are found in 50-70% of the patients, but the precise mechanism of the specific defect on erythroid differentiation is largely unknown. This study focused on the relationship between the responsible genes and cellular metabolism especially the activity of autophagy which is one of the bulk degradation processes of cellular materials. The one of the responsible genes was found to be associated with the activation of autophagy in *in vitro* culture model system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1200000	0	1200000
2011年度	1100000	0	1100000
2012年度	700000	0	700000
年度			
年度			
総計	3000000	0	3000000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：血液内科学

1. 研究開始当初の背景

先天性赤芽球癆は、近年その原因としてリボソームタンパク質遺伝子の変異が発見され、リボソームストレスが貧血の根幹にあることが明らかになった。しかしながら原因遺伝子がどのようなメカニズムで赤芽球特異的な分化抑制を誘導するのか明らかになっておらず、細胞内の様々な機能との関わりについて詳細に解析する必要があっ

た。

2. 研究の目的

これまでに原因遺伝子の1つのRPS19を発現抑制する*in vitro*培養モデルを構築し、培養細胞や赤芽球前駆細胞で細胞周期が停止することを発見した(2008)。本研究ではこれまでに構築した培養モデルを用いて、先天性赤芽球癆におけるリボソームストレ

スに伴うオートファジーの活性化およびオートファジー誘導と赤芽球分化の関係について詳細に解析することを目的とした。これらの解析を介して貧血とオートファジーがどのように関連しているか検討する。

3. 研究の方法

1. 培養細胞における S19 によるオートファジー活性化の解析

オートファジーの活性化について、培養細胞を用いて S19 の発現を抑制した系で観察する。方法としてオートファジーマーカーを用いて免疫染色しマーカー陽性小胞等を蛍光顕微鏡で観察する。またマーカー分子の代謝をリソソーム阻害剤を用いて WB 法で検出する。さらにオートファジー小胞の形成について S19 を抑制した細胞での電子顕微鏡解析で観察する。

2. S19 発現抑制モデル系をもちいた血液細胞におけるオートファジー活性化の解析。

造血前駆細胞で S19 の発現を抑制するとまず赤芽球前駆細胞で細胞周期が停止する。そこで、赤芽球系前駆細胞でオートファジーが誘導されるかオートファジーマーカーを指標に測定する。しかしながら、赤芽球系前駆細胞は造血幹前駆細胞の分画のなかでも比較的少数であるため、一般的な手法での解析は困難であると予想される。そこで、shRNA 発現レンチウイルスを造血幹細胞に導入し、細胞増殖が停止する 4 日目以降の細胞について細胞表面マーカーでフローサイトメーター用いて分取し、分取後にサイトスピンでスライドグラスへ張り付けた。それぞれの分画した細胞で細胞あたりのオートファジー小胞数をコントロールと比較することとする。造血前駆細胞の S19 発現抑制によるオートファジー誘導を検討できると考える。

4. 研究成果

DBA の *in vitro* 培養細胞モデルで原因遺伝子 RPS19 の発現抑制によりオートファジーの活性化を引き起こすことを蛍光顕微鏡観察で発見できた。また電子顕微鏡解析では、脂質 2 重膜構造を持ったオートファゴソームの過剰な形成が多数確認できオートファジーの活性化を確認した。初代培養細胞でも同様の現象が認められるか確かめるために骨髓 CD34+ 細胞 (市販品) に shRNA を導入し、フローサイトメーターで赤芽球前駆細胞を分取、Primary 赤芽球前駆細胞におけるオートファジーマーカーの発現を免疫染色にて確認した。その結果赤芽球前駆細胞で

のオートファジーが活性化を見いだした。

今後は患者検体を用いて DBA 疾患細胞内で解析の解析が必須であることからこれまで DBA の遺伝子解析研究等で構築した DBA の担当医師や研究者とのネットワークを活用し、DBA 由来疾患多能性幹細胞を研究に利用できるように樹立の準備に取りかかった。

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)

Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, RuNan Wang, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kitoh T, Goi K, Kudo K, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. **Blood** 2012;119(10):2376-84

DOI : 10.1182/blood-2011-07-368662

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

1. 'New Determination Method for Extensive Gene Deletions in Diamond -Blackfan Anemia' Madoka Kuramitsu, Tomohiro Morio,, Masatoshi Takagi, Tsutomu Toki, Kiminori Terui, RuNan Wang, Atsuko Masumi, Takuo Mizukami, Haruka Momose, Kazuya Takizawa, Kazunari Yamaguchi, Etsuro Ito, and Isao Hamaguchi Poster III-1010、第 52 回アメリカ血液学会、2010 年 12 月 4-7 日 オランダ、米国。

2. 'A novel method to analyze genomic copy number of Diamond Blackfan anemia responsible genes.' Madoka Kuramitsu, Tomohiro Morio, Masatoshi Takagi, Michio Ozeki, Atsuko Masumi, Takuo Mizukami, Haruka Momose, Kazuya Takizawa, Ito Etsuro, Kazunari Yamaguchi, Isao Hamaguchi 第 72 回日本血液学会、2010 年 9 月 24-26 日 横浜

3. 'Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond Blackfan anemia' Madoka Kuramitsu, Aiko Matsubara, Tomohiro Morio, Masatoshi Takagi, Tsutomu Toki, Kiminori Terui, RuNan Wang, Hitoshi Kanno, Shoichi Ohga, Akira Ohara, Atsuko Masumi, Haruka Momose, Takuo Mizukami, Kazuya Takizawa, Kazunari Yamaguchi, Seishi Ogawa, Etsuro Ito, Isao Hamaguchi 第 73 回日本血液学会、2011 年 10 月 14-16 日 名古屋

〔図書〕(計1件)

浜口功、倉光球 Diamond-Blackfan 貧血の
分子異常. ニューサイエンス社、細胞 42(7)
(通号 554) 2010.7: 282-285.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉光 球 (Kuramitsu Madoka)

国立感染症研究所 血液・安全性研究部
研究員

研究者番号：00566383

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：