

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 21 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860798

研究課題名(和文)Diamond Blackfan貧血患者由来iPS細胞を用いた赤芽球分化異常解析

研究課題名(英文)Analysis for erythroid defect in Diamond Blackfan anemia using patient-derived iPS cells

研究代表者

倉光 球(Kuramitsu, Madoka)

国立感染症研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：00566383

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)：Diamond Blackfan貧血(DBA)は、100万人出生あたり約5人程度に生後1年以内に発生する極めて稀な貧血である。これまで試験管内または実験動物で遺伝子操作技術により、その病態が研究されてきたが、患者での発症メカニズムの実態は不明のままであった。本研究では、DBA患者と遺伝的背景は完全に一致する患者由来iPS細胞を樹立し、患者背景での発症メカニズムを研究できるよう検討した。その結果DBA患者4例からiPS細胞の樹立に成功した。またDBAの発症にオートファジーを伴う細胞内代謝の活性化と赤芽球分化細胞表面マーカーの代謝が関係することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Diamond Blackfan anemia is rare congenital anemia that belongs to the inherited BM failure syndromes, generally presenting the first years of life. The onset mechanisms of the disease are widely unknown, even though progresses have been made by the analyses using various analytical methods such as gene manipulating technologies. Recently, the technology to prepare iPS cells from blood of patients has been established. These cells have the same genetic background with the patients. In this study, 4 strains of DBA-derived iPS cells were established from Japanese patients. Also, I found that the down-regulation of erythroid specific cell surface maker is closely related to the activation of intracellular metabolism including autophagy.

研究分野：血液学、ウイルス学

キーワード：リボソームタンパク質 貧血 遺伝子変異 タンパク質分解 代謝 赤血球

## 1. 研究開始当初の背景

Diamond Blackfan anemia (DBA)は、100万人出生あたり約5人に発症する極めて稀な小児の貧血である。リボソームタンパク質遺伝子のヘテロ接合型変異が原因であるが、詳しい発症メカニズムは未解明のままである。これまでDBA原因遺伝子の変異による赤芽球分化抑制メカニズムの解析は *in vitro* や実験動物モデルで検討されて来た。例えば、患者では骨髄 CD34+細胞のレベルで赤芽球前駆細胞が消失しており、RPS19 変異患者の造血幹細胞へのRPS19 遺伝子導入で赤芽球コロニー形成能が正常の50%まで回復する。また、CD34+造血幹-前駆細胞に *in vitro* においてRPS19 の発現低下を引き起こす siRNA を導入すると細胞周期のG0/G1 期で停止するなど明らかにされている。さらに動物モデルでは、最初に報告されたRPS19 ヘテロ KO マウスでは野生型マウスと表現系に差が認められなかった。その後、RPS19 点変異体マウスでは軽度な貧血を伴っており、またRPS19 の shRNA による発現抑制操作したマウスでは shRNA 誘導で貧血が発症し、Trp53(p53)ダブル KO により貧血が回復することが報告された。ところが、これらの動物モデル系は発現抑制が患者本来の状況をどの程度正確に反映したのか判断が難しく、マウスのDBAモデルは結果の解釈は慎重にならざるを得ない。

最大の課題は、DBA ではなぜ赤芽球だけが分化できないか? について明確なメカニズムの説明が出来ていないことである。

これまで我々は独自の解析結果からリボソーム遺伝子の発現低下によってオートファジー活性化が起こることを *in vitro* 実験で見出し、DBA の赤芽球分化抑制と細胞内のタンパク質代謝が密接に関与する可能性があることを発見した。しかしながらこれまでの *in vitro* モデルや動物モデルでは、ある程度DBA の状況を予測できると考えられるものの、患者の状態をどこまで反映した実験系なのか解釈が難しい。DBA の貧血発症メカニズム解明のためには、最終的には患者の造血細胞を用いた解析結果を得ることが必須であると考えられた。しかしながらDBA は極めて稀な疾患であるため、患者検体の入手は、困難であった。

ところが近年患者から無限に培養可能な iPS 細胞を作製することができるようになった。また熊本大学発生医学研究所で末梢血からの iPS 細胞の作製法が確立したことを受け、施設の倫理審査承認の上でDBA 患者の末梢血から iPS 細胞の作製し、研究をさらに進めることとした。

## 2. 研究の目的

研究代表者は、RPS19(S19)の *in vitro* での発現抑制によって培養細胞や Primary CD34+CD71high 細胞で細胞周期の停止やオートファジーの活性化を伴い、細胞無いの代謝

が大きく変化することを見出した。これらの現象が、患者の貧血を引き起こす原因となっているかは重要な問題であり、DBA の治療法開発にも直結すると考えられる。そのため、これまでの *in vitro* 疾患モデル系に加えて、iPS 細胞を用いて患者と全く同一の遺伝的背景で、分化異常メカニズムについてのこれまでの成果と合わせて新たな知見が再現できるか、詳細に解析する。

## 3. 研究の方法

DBA 疾患 iPS 細胞の樹立:

これまでにDBA 患者の担当医師らと倫理的事項を含めて研究協力体制を築き、末梢血検体の提供の協力を複数症例得ることができたに至った。各施設の倫理申請の承認の後に患者の末梢血からゲノムを傷つけないセンダイウイルスベクターを用いた方法で iPS 細胞を樹立した。細胞の樹立は熊本大学発生医学研究所の協力のもと行われた。

DBA 分化異常解析:

細胞内タンパク質分解の活性についてオートファジーを指標にし、LC-3 の発現を観察した。また赤芽球分化の指標として、赤芽球系の細胞表面マーカーであるCD71 を用いて、分化の重要因子のターンオーバーを観察した。リソソーム分解のターンオーバーの観察には、E64d および PepstatinA で、リソソームを阻害することで、分子の動態の変化を観察した。

## 4. 研究成果

DBA 患者由来 iPS 細胞の樹立:

熊本大学発生医学研究所の協力のもと研究期間内に4名の日本人の患者から iPS 細胞を樹立することができた。DBA は極めて稀な難治疾患であることから、解析のために患者の骨髄や血液などの研究材料を得ることが極めて困難であったことから、患者と同一の遺伝的背景を有したDBA 患者由来 iPS 細胞の樹立は、今後の研究材料の確保のしやすさや、研究条件の均一化、また薬剤候補スクリーニング等の進展が期待でき、極めて有意義であると考えられた。今後も関係医師との協力の上で症例数の増加が見込まれた。

DBA の分化異常解析:

iPS 細胞からの赤芽球分化系を用いて、DBA の発症メカニズム解析を進めた。培養細胞やCD34+造血前駆細胞での *in vitro* 培養モデルでは、DBA 原因遺伝子のRPS19 の発現を抑制するとオートファジー活性化を伴うリソソーム分解系のタンパク質代謝の活性化が見出された。また、DBA の特徴的な現象である細胞表面のCD71 (Transferrin 受容体) の発現減少が *in vitro* 細胞モデルで再現できることを見出した。そこで、これまでの結果と照らし合わせ、CD71 の減少とオートファジー活性化との関わりについて解析した

ところ、DBA 細胞モデルでは CD71 はリソソームで積極的に分解されて発現が減少することが判明し、タンパク質分解活性化が DBA の病態へ密接に関与することが示唆される結果を得た。DBA では、造血幹 前駆細胞の早い段階ですでに分化異常が認められることから、in vitro で認められた CD71 のターンオーバーの変化が、分化段階のどのあたりから生じているか、樹立した DBA 由来 iPS 細胞 2 株を用いて確認するため、最適な培養条件、解析の時期等の検討を進めた。

疾患 iPS と健常人より樹立された iPS との遺伝子発現の違いについて、アレイを用いて網羅的に解析を進めた。

## 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)

{雑誌論文}(計 5 件)

Wang R, Yoshida K, Toki T, Sawada T, Uechi T, Okuno Y, Sato-Otsubo A, Kudo K, Kamimaki I, Kanazaki R, Shiraiishi Y, Chiba K, Tanaka H, Terui K, Sato T, Iribe Y, Ohga S, Kuramitsu M, Hamaguchi I, Ohara A, Hara J, Goi K, Matsubara K, Koike K, Ishiguro A, Okamoto Y, Watanabe K, Kanno H, Kojima S, Miyano S, Kenmochi N, Ogawa S, Ito E. 2015. Loss of function mutations in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol* 168:854-864.

Kuramitsu M, Okuma K, Yamagishi M, Yamochi T, Firouzi S, Momose H, Mizukami T, Takizawa K, Araki K, Sugamura K, Yamaguchi K, Watanabe T, Hamaguchi I. 2015. Identification of TL-Om1, an Adult T-Cell Leukemia (ATL) Cell Line, as Reference Material for Quantitative PCR for Human T-Lymphotropic Virus 1. *Journal of clinical microbiology* 53:587-596.

Momose H, Mizukami T, Kuramitsu M, Takizawa K, Masumi A, Araki K, Furuhashi K, Yamaguchi K, Hamaguchi I. 2015. Establishment of a new quality control and vaccine safety test for influenza vaccines and adjuvants using gene expression profiling. *PloS one* 10:e0124392.

Mizukami T, Momose H, Kuramitsu M, Takizawa K, Araki K, Furuhashi K, Ishii KJ, Hamaguchi I, Yamaguchi K. 2014. System vaccinology for the evaluation of influenza vaccine safety by multiplex gene detection of novel biomarkers in a preclinical study and batch release test. *PloS one* 9:e101835.

Takizawa K, Nakashima T, Mizukami T, Kuramitsu M, Endoh D, Kawauchi S, Sasaki K, Momose H, Kiba Y, Mizutani T, Furuta RA, Yamaguchi K, Hamaguchi I. 2013. Degenerate polymerase chain reaction strategy with DNA microarray for detection of multiple and various subtypes of virus during blood screening.

Transfusion 53:2545-2555.

{学会発表}(計 2 件)

Madoka Kuramitsu, Isao Hamaguchi  
Development of a HTLV-1 DNA standard.  
SCIENTIFIC WORKING GROUP ON THE  
STANDARDISATION OF GENOME  
AMPLIFICATION TECHNIQUES 2014 年 5  
月 28 日 オーストリア GRAZ

井上由紀子、守田麻衣子、相良康子、後藤信代、倉光 球、浜口功、迫田岩根、入田和男、清川博之. WB 判定保留事例の Follow-up -HTLV-1 抗体確認検査に関する考察 - O-21. 第 1 回日本 HTLV-1 学会 (2014 年 6 月 東京)

招待講演

倉光 球 第 13 回血液フォーラム 21 - 造血不全、Diamond Blackfan 貧血の分子病態 2013 年 5 月 18 日東京国際フォーラム HALL D7 (有楽町 東京)

{図書}(計 2 件)

倉光 球、浜口 功 血液フロンティア特集 赤血球造血の基礎と臨床 8. リボソーム異常症と関連疾患 Vol.24 No.4p81 (591)-p89 (599) 2014

相良 康子、後藤 信代、井上由紀子、守田麻衣子、倉光 球、大隈 和、浜口 功、入田 和男、清川 博之 抗 HTLV-1 抗体検査 (ウエスタンプロット法) 判定保留例の解析 *Japanese Journal of Transfusion and Cell Therapy*, Vol. 60. No. 1 60 (1): 18-24, 2014

{産業財産権}

出願状況(計 1 件)

名称: HTLV-1 プロウイルス検出のためのプライマーセット、及びそれを用いた検出方法  
発明者: 倉光 球、浜口 功、大隈 和  
権利者: ヒューマンサイエンス振興財団  
種類: 特許権  
番号: 特願 2013-196247  
出願年月日: 平成 25 年 9 月 20 日  
国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
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)

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: