

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293225

研究課題名(和文) in vitro, in vivo モデル作製による鉄芽球性貧血の病態解明

研究課題名(英文) Generation and analysis of in vitro, in vivo model of sideroblastic anemia

研究代表者

張替 秀郎 (Harigae, Hideo)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50302146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性鉄芽球性貧血患者由来iPS細胞からin vitro培養系で誘導した赤芽球においては、グロビン遺伝子の発現や赤血球関連転写因子群が低下しており、赤血球分化が阻害されている可能性が示唆された。ストローマ細胞と共培養系を用いることにより、鉄芽球が得ることができたため、現在その形質を解析中である。また、CRISPR/CAS9システムを用いてALAS2遺伝子のエンハンサーに変異を導入したマウスを作成したこのマウスは貧血を呈し、ALAS2の発現も抑制されていることが確認できた。今後、鉄代謝、赤血球造血について解析を進めるとともに、治療法の開発に供する予定である。

研究成果の概要(英文)：Sideroblastic anemia is characterized by anemia with ring sideroblasts in the bone marrow. In order to develop a novel therapy for sideroblastic anemia, iPS cells were established from a patient of X-linked sideroblastic anemia (XLSA), which is caused by mutations of 5-aminolevulinate synthase (ALAS2) gene. The expression profiling of erythroblasts derived from XLSA iPS cells showed that the expression levels of globins and erythroid-specific transcription factors were decreased compared to those derived from control iPS cells. When XLSA derived iPS cells were co-cultured with stromal cells; aberrant mitochondrial iron deposition was detected by prussian blue staining and electron microscope analysis. In addition, XLSA model mouse has been generated by introducing mutations to the enhancer lesion of ALAS2 gene by CRISPR/CAS9 system. Mutant mice were anemic, and the expression level of ALAS2 of bone marrow was decreased. Iron metabolism and erythropoiesis are under investigation.

研究分野：血液内科学

キーワード：内科学

1. 研究開始当初の背景

ヘム、鉄 - 硫黄クラスターといった生命現象に必須の鉄利用分子はミトコンドリアにて合成される。このミトコンドリアでの鉄利用障害が生じると、鉄が異常沈着し、環状鉄芽球が形成され、貧血の発症へと至る。この環状鉄芽球の出現を特徴とする鉄芽球性貧血には、遺伝性鉄芽球性貧血と後天性鉄芽球性貧血の二種類が存在する。これまでに、遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子として、ミトコンドリアでのヘム合成、鉄 - 硫黄クラスターの合成、もしくは輸送にかかわる遺伝子が同定されてきたが、これらの遺伝子の同定は鉄芽球性貧血の発症機序の解明だけでなく、ヒトにおけるミトコンドリアでの鉄代謝機構の解明という点においても大きく貢献してきた。今後も、新たな変異遺伝子の同定がミトコンドリアでの生理的鉄代謝機構および鉄芽球における鉄沈着メカニズムの解明に直結していくものと考えられる。申請者は日本における鉄芽球性貧血の調査研究(厚生労働省難治性疾患克服事業)を進め、その病態・疫学を明らかにしてきた(Ann Hematol 2012, Exp Hematol 2012, Hematologica 2013)。さらに、この作業仮説に基づき、既知の原因遺伝子の変異が認められない遺伝性鉄芽球性貧血の家系を対象に全エクソン解析を行った結果、3家系で新たな候補遺伝子の同定に至った。これらの遺伝子の変異がミトコンドリアにおける病的な鉄沈着をもたらしているとするれば、その機能解析は新たなミトコンドリアでの生理的鉄代謝機構および鉄芽球の形成機序の解明にもつながることが期待される。

一方で、原因遺伝子の同定により鉄芽球の

形成機序が明らかになったとしても、鉄芽球性貧血を再現するモデルが作製できなければ、病態の解明や治療法の開発にはつながらない。しかしながら、これまで同定された鉄芽球性貧血の原因遺伝子を欠損するマウスは胎生致死であるため鉄芽球性貧血モデルは作製できておらず、単純な遺伝子ノックアウト法以外の新たなアプローチが必要である。

2. 研究の目的

本研究では下記を目的とする。

(1) 新たに同定した遺伝性鉄芽球性貧血の変異遺伝子の機能解析を行う。

(2) *in vitro* で鉄芽球を作成し、正常赤血球との細胞生物学的相違を明らかにする。

(3) *in vivo* で鉄芽球性貧血モデルマウスを作製し、個体内での赤血球造血・鉄代謝の異常について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 新たに同定した候補遺伝子の機能解析
既知の原因遺伝子の変異が認められない鉄芽球性貧血家系の全エクソンシーケンスから同定された3遺伝子、*APEX2*、*ZIP8*、*NDUFV1*の機能解析を行う。最初にこれらの遺伝子の発現を各種組織、各血球系列、さらに *in vitro* CD34 陽性細胞からの赤血球分化系を用いて作製した各分化段階の赤血球において解析する。次に、*in vitro* で変異たんぱく質を作成し機能解析を行う。

(2) ヒト iPS 細胞からの *in vitro* 赤血球分化系の確立

XLSA症例iPS細胞から赤血球を分化誘導し、鉄芽球を作成する。得られた鉄芽球のapoptosis比率、酸化ストレスレベル、ミトコンドリア電位、ROS (reactive oxygen species)レベルをフローサイトメトリーにて解析する。既に同定されている主要な鉄関連分子である

トランスフェリンレセプター、フェリチン、ミトコンドリアフェリチン、IRP1、IRP2、ALAS2の発現をRT-PCR法、免疫組織学的解析にて検討する。さらに、包括的cDNAアレイ・プロテオミクス解析を用いて正常赤芽球との遺伝子プロファイルを解析し、発現の異なる赤血球・鉄代謝・レドックス制御関連遺伝子を同定する。また、鉄キレート剤、酸化ストレス除去剤により、ミトコンドリア内の鉄が除去可能であるか、鉄芽球における酸化ストレスレベル、アポトーシスが改善されるかどうかを検討する。

また、今回作成する鉄芽球はALAS2遺伝子変異により発症したXLSA症例のiPS細胞由来である。ALAS2遺伝子は、赤血球におけるヘム合成の初発酵素でグリシンとスクシニルCoAからALAを合成酵素であることから、ALAS2変異赤芽球ではALAが不足しヘム合成にいたらず鉄利用不全が起こる。従って、ALAを補充すればヘム合成が回復し、ミトコンドリアにおける鉄沈着が消失する可能性がある。そこで、XLSA症例iPS細胞の赤血球分化系にALAを添加することにより、鉄芽球の消失、正常赤血球の誘導が得られるかどうかを検討する。

(3) ドキシサイクリンによる shRNA 発現誘導系を利用した in vivo 遺伝子発現抑制システムによる疾患モデルの作成

遺伝性鉄芽球性貧血モデルマウス作成のためには胎生致死を避けるために、赤血球特異的に対象遺伝子の発現を抑制するような in vivo システムの構築が必要である。本研究ではこのシステムとして、ドキシサイクリン誘導システムを応用する。

リバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子(rtTA)はドキシサイクリンと

結合すると、テトラサイクリン応答エレメント(TRE)に結合し、下流の遺伝子を発現させる。まず、赤血球分化のマスター転写因子である GATA1 の発現制御領域(G1HRD)下流に rtTA を組み込んだコンストラクトをトランスジーンしたマウスを作成する。このマウスでは赤血球特異的に rtTA が発現している。一方で、TRE 下流に ALAS2 の発現を抑制する shRNA を組み込んだコンストラクトをトランスジーンしたマウスを作成する。これらのマウスを掛け合わせたマウスにドキシサイクリンを投与すると、赤血球特異的に rtTA が TRE に結合し shRNA が発現誘導され ALAS2 の発現が抑制される仕組みである。

このシステムを用いて作成したモデルマウスの赤血球造血・鉄代謝を解析する。具体的な解析法については、鉄芽球性貧血モデルマウスにおける骨髓鉄芽球の apoptosis 比率、酸化ストレスレベル、ミトコンドリア電位、ROS (reactive oxygen species) レベルを解析するとともに、赤血球特異的遺伝子、主要な鉄関連分子の発現解析および造血コロニーアッセイなどによる造血能の解析を行う。さらに、肝臓・心臓など実質臓器への鉄沈着の検討、および鉄キレート、酸化ストレス除去剤による改善効果の確認などを in vivo で解析する。In vitro の解析同様に、本モデルマウスに ALA を投与し、貧血・鉄代謝の改善、鉄芽球の消失が認められるかどうか検討し、本剤の治療薬としての有効性について追及する。

4. 研究成果

(1) 遺伝性鉄芽球性貧血家系にて新規に同定した候補遺伝子のうち、APEX2 については変異マウスを用いて解析した。その結果軽

度の貧血が認められたが、明らかな鉄芽球性貧血の発症に至らなかった。この貧血の原因について、APEX2 は X 連鎖性鉄芽球性貧血の原因遺伝子である ALAS2 遺伝子に隣接して存在しており、変異マウス作成の際に ALAS2 遺伝子の一部に欠失が起きているためであることが推察された。また APEX2 遺伝子変異を有する症例の詳細な遺伝子解析により、本症例は ALAS2 遺伝子のイントロンに存在するエンハンサーに変異を有することが明らかとなり、このエンハンサー変異が鉄芽球性貧血発症の主因であると考えられた。従って APEX2 については遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子である可能性は低いと結論付けた。また、ZIP8、NDUFV1 遺伝子については赤血球系細胞にてその発現が確認できたものの、他の論文で報告された症例で貧血が認められず、認められた変異が多型である可能性が否定できないことから、やはり原因遺伝子としての可能性は低いものと推察された。

(2) 遺伝性鉄芽球性貧血患者由来 iPS 細胞から in vitro 培養系で鉄芽球を作成する計画については、複数のサイトカインを用いた液体培養により赤芽球への分化誘導が実現できた。各グロビンの発現を解析した結果、成人型グロビンである β globin を発現していないことから、iPS 細胞由来赤芽球は primitive erythroblast である可能性が示唆された。また、XLSA-iPS 由来赤芽球は XLSA 患者と同様の変異を有しているものの Prussian blue 染色で確認しても、環状鉄芽球は観察されなかった。一方で、得られた iPS 細胞由来赤芽球を用いたマイクロアレイ解析の結果、XLSA-iPS 細胞由来赤芽球においては、Hemoglobin epsilon 1(HBE1)、Hemoglobin gamma 1(HBG1)等の各

種グロビン遺伝子の発現や GATA binding protein1(GATA1)、T cell acute lymphoblastic leukemia 1(TALI)等の赤血球関連転写因子群が低下していることが示された。

さらに種々の培養方法を検討した結果、ストローマ細胞との共培養により、最終的に鉄芽球を得ることができた。また、CRISPR/CAS9 システムを用いてヒト iPS 細胞由来の赤血球細胞株である HiDep 細胞に ALAS2 遺伝子変異を導入した亜株を樹立し、同様の共培養系でさらに分化誘導したところ、安定的に鉄芽球が作成できた。現在、この方法で得られた鉄芽球の形質を詳細に解析している。

(3) in vivo 遺伝子発現抑制系を確立し、鉄芽球貧血モデルを作成するという計画については、GATA1-rtTA のトランスジェニックマウスは作成できたものの、その発現効率が悪くまたマウスの継代とともに発現が低下したため、ドキシサイクリンによる shRNA 発現誘導系を利用した in vivo 遺伝子発現抑制システムを用いたモデルマウスの作成は断念した。代わりに CRISPR/CAS9 システムを用いて ALAS2 遺伝子のエンハンサーに変異を導入したマウスを作成することとした。このエンハンサー変異は実際に複数の症例で認められた変異である。その結果、個体の誕生頻度は極めて低いものの、変異マウスを得ることができた。このマウスは貧血を呈し、ALAS2 の発現も抑制されていることが確認できている。今後、マウス個体を増やし、目的とした解析を進める予定である。

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)

1. Forced FOG1 expression in erythroleukemia cells: Induction of erythroid genes and repression of myelo-lymphoid transcription factor PU.1.
Fujiwara T, Sasaki K, Saito K, Hatta S, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Harigae H.
Biochem Biophys Res Commun. 2017;485:380-387. 査読有
 2. Clinical utility of next-generation sequencing for inherited bone marrow failure syndromes.
Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Doisaki S, Narita A, Sakaguchi H, Kawashima N, Wang X, Xu Y, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Sanada M, Takahashi Y, Kanno H, Yamaguchi H, Ohga S, Manabe A, Harigae H, Kunishima S, Ishii E, Kobayashi M, Koike K, Watanabe K, Ito E, Takata M, Yabe M, Ogawa S, Miyano S, Kojima S.
Genet Med. 2017; Jan 19. doi: 10.1038/gim.2016.197. 査読有
 3. Iron-heme-Bach1 axis is involved in erythroblast adaptation to iron deficiency.
Kobayashi M, Kato H, Hada H, Itoh-Nakadai A, Fujiwara T, Muto A, Inoguchi Y, Ichiyana K, Hojo W, Tomosugi N, Sasaki H, Harigae H, Igarashi K.
Haematologica. 2017;102:454-465. 査読有
 4. Identification of a novel putative mitochondrial protein FAM210B associated with erythroid differentiation.
Kondo A, Fujiwara T, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Sawada K, Harigae H.
Int J Hematol. 2016 103:387-95 査読有
 5. Activation of the NLRP3 inflammasome by cellular labile iron.
Nakamura K, Kawakami T, Yamamoto N, Tomizawa M, Fujiwara T, Ishii T, Harigae H, Ogasawara K.
Exp Hematol. 2016 44:116-24. 査読有
- [学会発表](計10件)
1. Shunsuke Hatta, Tohru Fujiwara, Takako Yamamoto, Mayumi Kamata, Yoshiko Tamai, Yukio Nakamura, Shin Kawamata, Hideo Harigae.
Generation of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Erythroblasts from a Patient with X-Linked Sideroblastic Anemia
58th American Society of Hematology Annual Meeting&Exposition San Diego Convention Center, December 3 2016 (米国・サンディエゴ)
 2. Clinical and genetic characteristics of sideroblastic anemia (招請講演)
Hideo Harigae
The 14th China National Congress of Hematology 2016年10月28日
Suzhou Jinji Lake International Convention Center China (中国・上海)
 3. Impact of TET2 deficiency on iron metabolism in erythroblast: A potential link to ring sideroblast formation. 齋藤慧、猪倉恭子、藤原亨、八田俊介、沖津庸子、福原規子、大西康、石澤賢一、下田和哉、張替秀郎
第76回日本血液学会学術集会 2016年10月15日パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
 4. Identification of a novel mitochondrial protein FAM210B associated with erythroid differentiation. 近藤愛子、藤原亨、沖津庸子、福原規子、大西康、中村幸夫、澤田賢一、張替秀郎
第76回日本血液学会学術集会 2016年10月15日パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

5. 腸管上皮モデルにおける ALA の代謝 齋藤慧、藤原亨、田中徹、張替秀郎
第 40 回鉄バイオサイエンス学会学術集会 2016 年 9 月 10 日名古屋大学豊田講堂 (愛知県名古屋市)
6. 遺伝性鉄芽球性貧血の疫学と分子病態 (シンポジウム) 藤原亨、張替秀郎
第 39 回鉄バイオサイエンス学会学術集会 2015 年 8 月 30 日岡山コンベンションセンター (岡山県岡山市)
7. Impact of TET2 deficiency on iron metabolism in erythroblast: A potential link to ring sideroblast formation. Kyoko Inokura, Tohru Fujiwara, Yoko Okitsu, Noriko Fukuhara, Yasushi Onishi, Kenichi Ishizawa, Kazuya Shimoda, Hideo Harigae
56th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition
San Francisco Convention Center December 8, 2014 (米国・サンフランシスコ)
8. Exploring the potential usefulness of 5-aminolevulinic acid (ALA) for sideroblastic anemia. 新國僚祐、藤原亨、沖津庸子、福原規子、大西康、石澤賢一、一迫玲、田中徹、張替秀郎
第 76 回日本血液学会学術集会 2014 年 11 月 1 日大阪国際会議場 (大阪府大阪市)
9. TET2 遺伝子の鉄芽球性貧血発症への関与 猪倉恭子、藤原亨、下田和哉、張替秀郎
第 38 回鉄バイオサイエンス学会学術集会 2014 年 9 月 7 日仙台国際センター(宮城県仙台市)
10. 鉄芽球性貧血に対する ALA の有用性の基礎的検討 藤原亨、新國僚祐、田中徹、張替秀郎
第 38 回鉄バイオサイエンス学会学術集会 2014 年 9 月 8 日仙台国際センター (宮城県仙台市)

〔図書〕(計 0 件)

〔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 0 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

張替 秀郎 (HARIGAE Hideo)
東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号：50302146

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

川真田 伸 (KAWAMATA Shin)
公益財団法人先端医療振興財団副事業統括
研究者番号：00360842

藤原 亨 (FUJIWARA Tohru)
東北大学・大学病院・講師
研究者番号：60333796

(4) 研究協力者

()