

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19539

研究課題名(和文) 赤芽球におけるヘム合成調節機構の解明と鉄芽球性貧血モデル細胞の樹立

研究課題名(英文) The analysis of heme synthesis mechanism and the establishment of disease model cells for X-linked sideroblastic anemia using an immortalized human erythroid cell line.

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではヘム合成の律速酵素の一つである赤芽球特異的アミノレブリン酸合成酵素(ALAS2)の変異による遺伝性鉄芽球性貧血(XLSA)の発症メカニズム解明を目的に、CRISPR/Cas9システムを用いてヒト非腫瘍性赤芽球前駆細胞のALAS2遺伝子に変異を導入し、モデル細胞の樹立を試みた。変異導入細胞では分化誘導に伴い、環状鉄芽球が観察されたことから、変異細胞は疾患モデル細胞として利用可能であると考えられた。本研究の主な成果は、鉄芽球性貧血モデル細胞の樹立に初めて成功したことであり、ALAS2変異を原因とした鉄芽球性貧血の発症機序と鉄蓄積機構の解明に寄与する。

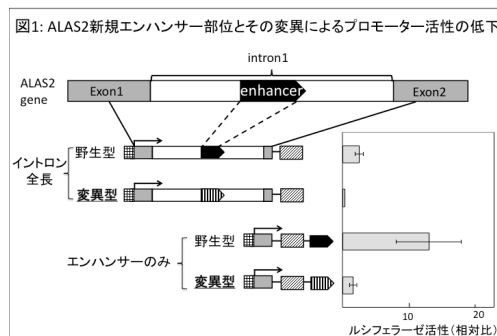
研究成果の概要(英文)：Erythroid-specific 5-aminolevulinic acid synthase (ALAS2) is the rate-limiting enzyme of heme biosynthetic pathway in erythroid cells. The mutation of ALAS2 gene causes X-linked sideroblastic anemia (XLSA). The aim of this project is to clarify the pathogenic mechanism of ALAS2-mutated XLSA in erythroid cells, and we tried to establish model cells. We have introduced the mutation, which disrupts the ALAS2, into the genome DNA of human erythroid progenitor cells using CRISPR/Cas9 system. The accumulation of iron was increased and showed circular pattern around the nucleus during the erythroid differentiation of ALAS2-deficient cells. Since the occurrence of ringed sideroblast was equal to diagnostic criterion for sideroblastic anemia, the established cells were considered available for model cells of XLSA. We believe that our disease model cells will be able to provide a lot of valuable information related to the cellular background for the formation of ring sideroblasts.

研究分野：赤芽球分化

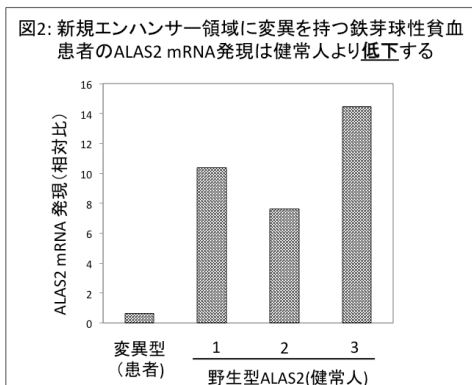
キーワード：ヘム合成 鉄代謝 赤芽球分化

1. 研究開始当初の背景

遺伝性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遺伝性の貧血であり、本邦の鉄芽球性貧血患者では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原因である場合でも根治的な治療法は見つかっておらず、さらに補助療法として用いられる ALAS2 の補因子であるピリドキシンの経口投与への反応も約半数の患者には確認できていない。研究開始当時、申請者らは原因遺伝子が不明であった先天性鉄芽球性貧血患者から、ALAS2 遺伝子の第1イントロンにおいて GATA 配列を含む特定領域に新たな遺伝子変異を同定した (図1 上部”enhancer”領域)。



赤芽球特異転写因子である GATA-1 は赤芽球分化に必須の転写因子であり、GATA 配列に特異的に結合する。この領域についてプロモーターアッセイを行った結果、これらの変異が同定された領域は野生型で赤芽球特異的に ALAS2 のプロモーター活性を増幅するが、先天性鉄芽球患者由来の変異はその効果を喪失させ (図1)、さらに患者赤芽球の ALAS2 mRNA 発現量も著明に低下していた (図2)。



これらの結果から、この領域は ALAS2 遺伝子の転写エンハンサーとして機能すること、さらに ALAS2 イントロン1にはエンハンサー領域外に ALAS2 プロモーターの活性を細胞非特異的に抑制すると考えられるサプレッサー機能も存在する可能性が高いこと (図1 イントロン全長 vs エンハンサーのみ) を報告した。しかしながら、ALAS2 イントロン1におけるエンハンサー及びサプレッサー領域の転写調節機構の詳細については未解明な部分が多

く、ALAS2 イントロン1 エンハンサー領域の変異による鉄芽球性貧血には特異的な治療方法が見つかっていなかった。また、鉄が蓄積するメカニズムも詳細は明らかではない。

2. 研究の目的

ALAS2 イントロン1 エンハンサー領域の調節機構を含めた鉄芽球性貧血の発症メカニズム、特に鉄の蓄積機構の解明を目的に、当該領域に変異を有する赤芽球系培養細胞の遺伝性鉄芽球性貧血の疾患モデル細胞の作製および有用性を確認する。

3. 研究の方法

(1) CRISPR/Cas9 システムを用いて赤芽球系培養細胞 K562 と非腫瘍性の赤芽球前駆細胞 HUDEP2 の ALAS2 イントロン1 エンハンサー領域に変異を持つ細胞株を作製、得られたクローンについてリアルタイム PCR にて ALAS2 mRNA 発現の確認およびヘモグロビン合成等、細胞の特徴を検討した。

(2) K562 変異型細胞を用いて DNA アレイ解析による鉄顆粒蓄積に関与する因子の同定・検索を行った。

(3) 鉄顆粒の出現条件および出現場所について鉄染色、電子顕微鏡を用いた元素分析によって条件検討および解析を行った。

4. 研究成果

(1) K562 細胞

①変異導入：CRISPR/Cas9 システムを用いて赤芽球系培養細胞 K562 の ALAS2 イントロン1 エンハンサー領域のゲノム DNA に変異を導入した。クローニングを行って得られた数クローンから、変異部位の配列を DNA シークエンス解析にて確認し、そのうち両 allele に変異が導入されていて、かつ ALAS2 mRNA 発現およびヘモグロビン合成の低い変異型細胞を選択した (以下 KdelG12) (図3)。

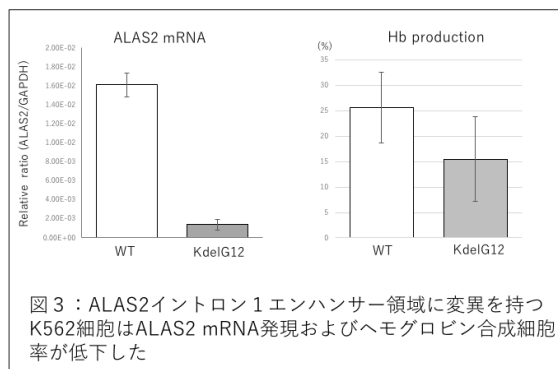


図3：ALAS2イントロン1エンハンサー領域に変異を持つK562細胞はALAS2 mRNA発現およびヘモグロビン合成細胞率が低下した

②DNA アレイ解析：KdelG12 より抽出した RNA を用いて、鉄顆粒蓄積に関与する遺伝子の検索および同定を目的に DNA マイクロアレイ法にて野生型 (WT) と遺伝子発現の比較を行った。得られた結果から、危険値が 0.05 以下、発現が WT と比較して 2 倍以上変化した遺伝子数はそれぞれ増加 87、減少 40 であった。その中から、ヘム合成および鉄芽球出

現に関与の可能性が考えられた6遺伝子についてリアルタイムPCRで発現変化を確認したところ、造血に関与が報告されている、あるサイトカイン（以下、サイトカインX）が特に大きな発現増加を示した。サイトカインXの発現はヘムに調節される可能性を考え、培養上清中に細胞中ヘム濃度を増加する目的で、ヘミンおよびアミノレブリン酸（ALA）を添加してサイトカインX mRNAの発現を検討したところ、WTの発現に変化はなかったが、KdelG12はヘミンおよびALAの添加によってその発現が抑制された。この結果より、サイトカインXの発現はヘム量に調節される可能性が考えられた。

③鉄芽球出現条件検討：環状鉄芽球の出現条件について検討を行った。WTおよびKdelG12のいずれも通常培養では鉄芽球は認められなかった。次に、ヘモグロビン合成の誘導剤として培養上清に酪酸ナトリウム（NaB）を、鉄過剰環境にするためクエン酸第一鉄、塩化鉄、トランスフェリン（Tf）をそれぞれ添加して培養を行ったところ、NaBとTfを添加して7日目に鉄顆粒の出現が確認された。しかしながら、鉄芽球の割合は有核細胞中の5%に満たず、環状鉄芽球は確認されなかった。また、NaBとTfを添加した細胞は、ヘモグロビン合成細胞は増加したものの、ギムザ染色による形態観察では、分化の進行目安のひとつである核が濃縮している細胞は非常に少なく、鉄顆粒が観察された細胞は核が他の細胞より濃縮していた。これらの結果から、鉄芽球の出現には脱核まで赤芽球の成熟が可能な細胞を用いることが必要であると考えられた。この結果を受けて、②のAREI解析で得られた候補因子の解析は鉄顆粒が蓄積するモデル細胞を作製したのちに改めて行うものとした。

(2) HUDEP2細胞

①変異導入：成熟赤芽球まで分化が可能な非腫瘍性ヒト赤芽球前駆細胞 Human Umbilical cord blood-derived progenitor 2

(HUDEP2)細胞にK562細胞と同様の手法で同領域に変異を導入し、得られた数クローンから最も目的に則したクローンをHdelG1とした。HdelG1細胞はWTと比較してALAS2 mRNA発現の抑制が確認された。また、ALAS2発現抑制に伴い、ヘモグロビン合成も低下していることがヘモグロビン合成細胞率及び細胞ペレットの色調より考えられた（図4）。

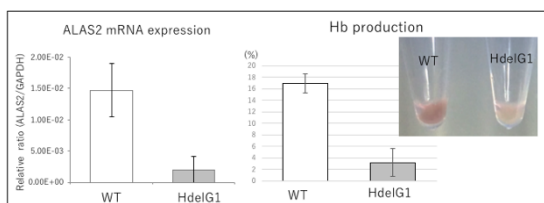


図4：ALAS2イントロン1エンハンサー領域に変異を持つHUDEP2細胞はALAS2 mRNA発現が低下（左）、ヘモグロビン陽性細胞率および細胞ペレットの色からヘモグロビン合成も低下している（右）と考えられた

②分化誘導：HUDEP2細胞を樹立したKuritaらの報告（Kurita et al, 2013, PLOS ONE）を参考に分化誘導を行った。分化誘導の指標として、ギムザ染色による形態的な観察、細胞ペレットの色調、細胞表面抗原マーカーの発現を検討した。形態的には核の濃縮および細胞質が多染性から正染性を示し、細胞ペレットの色調が紅鮮色に変化したことからヘモグロビン合成が誘導されていると考えられた（図5）。さらに赤芽球分化の進行に伴い発現が増加する細胞表面抗原マーカーとしてGlycophorinA（CD235a）の発現をフローサイトメトリー法にて検出したところ、WT、HdelG1ともに分化誘導前と比較して、分化誘導後に発現が有意に増加したが、誘導後ではWTとHdelG1にCD235a発現の差はなかった。

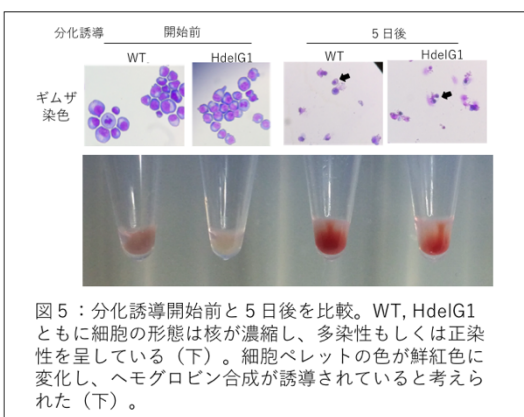


図5：分化誘導開始前と5日後を比較。WT、HdelG1ともに細胞の形態は核が濃縮し、多染性もしくは正染性を呈している（下）。細胞ペレットの色が鮮紅色に変化し、ヘモグロビン合成が誘導されていると考えられた（下）。

③鉄芽球出現条件検討：HdelG1は、分化誘導前はWTと同様に鉄染色での鉄顆粒は観察されなかった。明らかな赤芽球分化が確認された誘導5日目の細胞を鉄染色したところWTでは鉄芽球がほとんど出現しなかったのに対し、HdelG1には複数の鉄芽球が確認された（図6）。HdelG1の鉄芽球出現率は有核細胞の約30%で、そのうち環状鉄芽球は17%であった。鉄芽球形貧血の診断基準は環状鉄芽球の出現率が骨髓総赤芽球の15%以上（FAB分類）であり、分化誘導を行ったHdelG1の環状鉄芽球出現率は診断基準と同程度であった。また、分化誘導が4日より短いと、鉄芽球の出現は10%に満たなかった。以上の結果から鉄芽球は分化の進行に伴ってHdelG1特異的に出現すると考えられた。

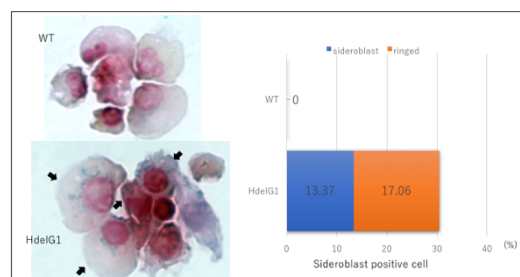
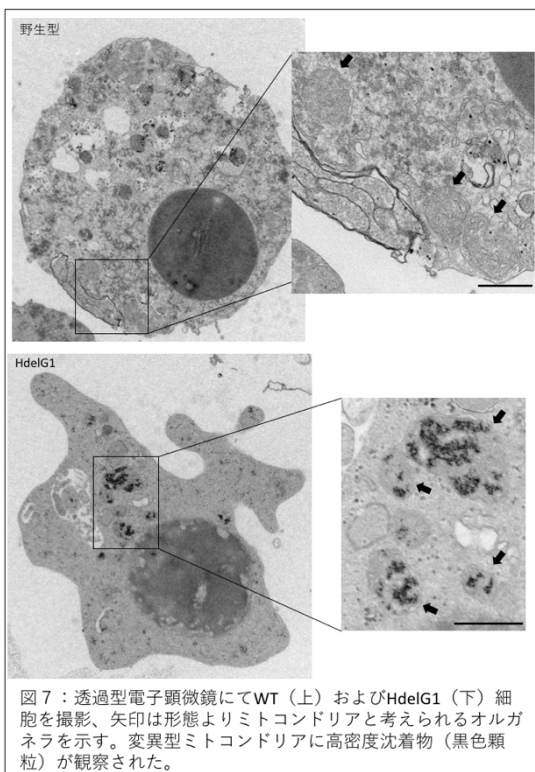


図6：分化誘導5日目で変異型に特異的に環状鉄芽球が鉄染色で観察された（矢印の細胞、赤い核の周囲にある青く顆粒状に染まっているのが蓄積した鉄）。核周囲1/3以上、10個以上の鉄顆粒が存在する赤芽球を環状鉄芽球と定義（新WHO分類）。

④電子顕微鏡による解析：5日間の分化誘導を行ったWT, HdelG1をそれぞれ透過型電子顕微鏡下にて観察したところ、ミトコンドリア（図7矢印）と思われるオルガネラにHdelG1特異的に高密度物質の蓄積が観された（図7下矢印、黒色顆粒）。そこで、この高密度蓄積物についてエネルギー分散型X線分析装置を用いた元素分析を行ったところ、鉄と同じエネルギーの特性X線を観察した。さらに、元素マッピング法でもミトコンドリアに存在する高密度沈着物と鉄の局在がほぼ同一であった。これらの結果から、HdelG1細胞特異的に観察されるミトコンドリア内高密度沈着物は鉄である可能性が示唆された。



(3) まとめ

本研究は当初、ALAS2イントロン1エンハンサー領域における転写調節機構の解明を目的のひとつとしていたが、モデル細胞作製の過程において、鉄芽球性貧血の理解には鉄顆粒の蓄積が明らかな細胞の樹立が重要であると考え、細胞種を変更して再現性良く環状鉄芽球が出現するモデル細胞の作製と鉄顆粒出現条件の検討を行った。研究内容は予定変更となったが、その結果として結果的に再現性よく環状鉄芽球が出現する培養細胞を初めて樹立できた。この細胞はALAS2に変異を有する鉄芽球性貧血患者由来の赤芽球とほぼ同等の特徴を有することから、鉄芽球性貧血モデル細胞として利用可能と考えられる。現在、本細胞を用いた解析を進めており、ALAS2欠損による鉄芽球性貧血の発症機構及び鉄顆粒蓄積メカニズムの解明を目指している。一方、ALAS2変異による鉄芽球性貧血でも変異部位によってピリドキシンの効果に差異があるこ

とから、既報の変異を持つ細胞を同様の方法にて作成し、新たな治療法の検討にも有用であると考えられる。また、本研究で確立した細胞の樹立法はALAS2以外の遺伝子変異を原因とする鉄芽球性貧血モデル細胞の作製にも有用であると考えられる。本研究の遂行によって得られた成果は今後の幅広い展開への寄与が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

1. Kaneko K, Ohba K, Hirose T, Totsune K, Furuyama K, Takahashi K. Expression of (Pro)renin Receptor During Rapamycin-Induced Erythropoiesis in K562 Erythroleukemia Cells and Its Possible Dual Actions on Erythropoiesis. *Tohoku J Exp Med*. 241. 35-43 (2017) 査読あり

2. Kubota Y, Nomura K, Katoh Y, Yamashita R, Kaneko K, Furuyama K. Novel Mechanisms for Heme-dependent Degradation of ALAS1 Protein as a Component of Negative Feedback Regulation of Heme Biosynthesis. *J Biol Chem*. 2016 Sep 23; 291(39): 20516-20529 査読あり

3. Takahashi K, Ohba K, Kaneko K. Ubiquitous expression and multiple functions of biologically active peptides. *Peptides*. 2015 Oct;72:184-91. Epub 2015 Apr 11. 査読あり
DOI:10.1016/j.peptides.2015.04.004

[学会発表] (計3件)

1. 久保田美子、野村和美、蝦名真行、金子桐子、加藤恭丈、古山和道 非特異的5-アミノレブリン酸合成酵素(ALAS1)のCLPXPによる翻訳後修飾 第89回日本生化学会大会 2016年09月26日 仙台国際センター

2. 野村和美、久保田美子、金子桐子、蝦名真行、古山和道 ヒトCLPX-CLPP複合体によるミトコンドリアマトリクスのタンパク品質管理機構の解明 第89回日本生化学会大会 2016年09月25日 仙台国際センター

3. 金子桐子、久保田美子、野村和美、古山和道 CRISPR/Cas9システムと赤芽球系培養細胞を用いた先天性鉄芽球性貧血モデル細胞の樹立 The establishment of cell models of congenital sideroblastic anemia using CRISPR/Cas9 system and human erythroid cell line. 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会合同大会 2015年12月2日 神戸ポートアイランド

6. 研究組織

(1) 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