

論文の内容の要旨

論文題目 赤血球分化における鉄のホメオスタシスと遺伝子発現制御
 ～赤血球系細胞における鉄応答性配列を介したヘム合成律速酵素の発現調節機構解析～

氏名 日下 智聖

哺乳動物の血球系細胞は、造血幹細胞からの正常な細胞運命決定により、好中球をはじめとする白血球、巨核球、赤血球へと終末分化する。その分化過程は巧妙かつ複雑な制御の元であり、それらの分化・増殖の障害により、血液の癌、白血病などを発症する原因となる。近年臨床で有望視され、成功している白血病の治療法として、分化誘導剤を使用する方法がある。例えば、急性前骨髄球性白血病 (APL) の代表的な治療法としては、内因性レチノイドである, all-trans レチノイン酸 (ATRA) を投薬することで、白血病細胞を成熟好中球へと分化誘導させ、高い完全寛解率が得られている。ATRA 耐性の再発性・難治性 APL には、新規合成レチノイド Am80 や亜砒酸も臨床的に用いられ、高い有効性を示している。APL 以外にヒト慢性骨髄性白血病細胞 K562 の古典的な分化誘導剤としてはヘミンが知られており、K562 にヘミンを投薬することにより、当該の白血病細胞は赤血球へと分化誘導する。

赤血球分化は、造血幹細胞から赤血球系への運命決定がなされる初期分化と、鉄を細胞内へ取り込みながらヘモグロビンを産生して赤血球として機能成熟する後期分化の2段階に分けられる。ヘミン投薬による K562 の赤血球分化誘導は、赤血球分化の後期過程を反映しており、後期分化におけるヘムの作用は赤血球分化の機能成熟を促進させる方向に働くと考えられる。一方で、初期分化に対するヘムの影響を検討するため、ヘム合成関連化合物やその阻害剤存在下で、マウス骨髄細胞中の赤血球前駆細胞である CFU-E とより幼弱な BFU-E を対象にコロニー形成能を解析した。はじめに、ヘム前駆体である 5-アミノレブリン酸 (ALA) とその代謝産物であるプロトポルフィリンIX (PPIX) の存在下、野生型マウス骨髄細胞を用いてコロニーアッセイを行った(図1)。ALA と PPIXは、細胞内に取り込まれるとヘムへと変換され、ヘム産生増加に伴う影響を検証できる。無添加培地と比較して、ALA は BFU-E においてのみ、PPIXは BFU-E/CFU-E 双方においてコロニー形成の抑制が認められた。特に BFU-E において著しい抑制が観察されたことから、幼弱な程ヘム産生に伴う増殖抑制効果が強くなる傾向があり、後期分化とは相反して赤血球分化初期におけるヘム過剰は赤血球増殖障害となることが示唆された。

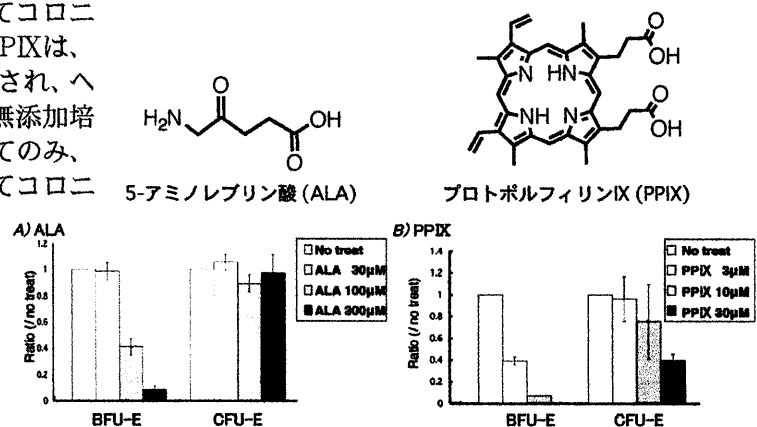


図1 マウス野生型骨髄細胞を用いたヘム前駆体添加培地でのコロニーアッセイ

次に、鉄キレート剤 desferrioxamine (DFO) とヘム合成阻害剤 succinylacetone (SA) を添加し、ヘム産生低下に伴う影響を調べた (図2)。3 μ M の DFO 添加時に CFU-E 数が3倍以上に増加することが認められ、BFU-E では変化が認められなかった。

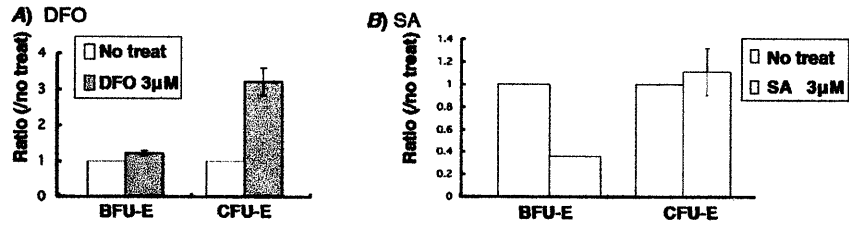


図2 ヘム合成阻害剤・鉄キレート剤添加による細胞内鉄濃度低下条件下における赤血球前駆細胞増殖能の検討

従って、鉄依存的なヘム合成能の低下によっても、赤血球初期分化が促進されることが明らかとなった。一方、SA 3 μ M 処理で、CFU-E 数が微増しており、全体としては SA の効果は抑制的に強く現れたが、PPIX の結果と合わせて考えると、赤血球前駆細胞では分化の進行にとって細胞内ヘムの至適濃度が存在することが推測された。赤血球分化の初期と後期では、ヘモグロビン合成の有無から細胞内鉄濃度は大きく異なり、鉄代謝による分化関連遺伝子調節機構がヘム産生をコントロールしている可能性が考えられ、ヘム産生調節という観点から、ヘム合成経路の初発酵素である赤血球型 5-アミノレブリン酸合成酵素 (ALAS-E) 遺伝子に着目した。ALAS-E 遺伝子 mRNA の非翻訳領域 (5' -UTR) には、トランスフェリン受容体や鉄貯蔵タンパク質フェチリンなどの鉄代謝関連遺伝子の中で保存性が高い、鉄応答性配列 (IRE) が存在し、Iron regulatory proteins (IRP1 および 2、IRPs) が細胞内鉄濃度依存的に ALAS-E IRE に結合・乖離し、鉄利用度に応じた当該遺伝子の発現制御によりヘム産生をコントロールしていることが *in vitro* 解析から明らかにされている。本研究では、赤血球分化段階に応じたヘム合成量の適切なコントロールを、ALAS-E IRE による ALAS-E 遺伝子発現調節が担っている可能性を追究した。

ALAS-E IRE の赤血球分化初期および後期に対する役割を同時に解析するため、遺伝子導入マウス (Tg) の確立を試みた。赤血球組織特異的に発現させるため、転写因子 GATA-1 遺伝子プロモーターを用い、その下流に野生型および IRE が欠失した ALAS-E cDNA をそれぞれ連結させたトランスジーンを用いて (図 3A)、野生型および IRE 欠失型 ALAS-E 遺伝子導入マウス (WT Tg および Δ IRE Tg) を作製した。確立された複数ラインの Tg のうち、RT-PCR 法により導入遺伝子の発現が同程度である WT Tg と Δ IRE Tg A/B の 3 ラインを選び、野生型マウス (Non Tg) をコントロールとして解析を進めた (図 3B)。

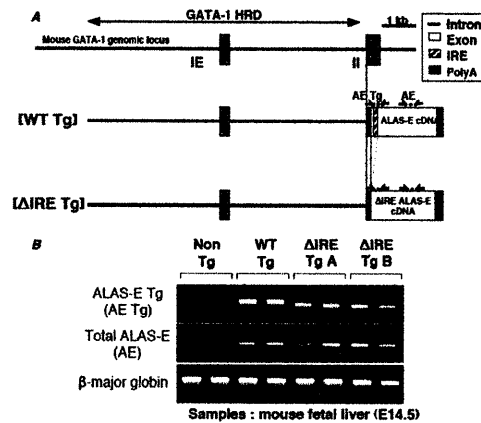


図3 ALAS-E IRE欠損遺伝子発現マウスの確立

今回、確立した Tg は内因性の ALAS-E プロモーターではなく、GATA-1 プロモーターを用いているため、CFU-E から発現する内因性 ALAS-E よりもより早期である BFU-E 辺りから外因性 ALAS-E 遺伝子を発現していると推測でき、赤血球初期における ALAS-E 過剰発現に伴うヘムの作用をモニタリングすることが可能となる。そこで、先程と同様にコロニーアッセイを行った結果、通常培地中では、WT Tg, Δ IRE Tg とも、Non Tg と比較して、BFU-E ではほとんどコロニーが形成されず、CFU-E でもコロニー数が半減することがわかった。赤血球初期分化に対する ALAS-E 過剰発現は ALA や PPIX 同様に抑制的に作用することが明らかとなった。一方、DFO を添加すると、WT Tg では、Non Tg と同様に無添加時よりも CFU-E 数が 3.2 倍まで増加したのに対し、 Δ IRE Tg ではその変化が認められなかった (図 4)。但し、BFU-E 形成に対しては、DFO は Non Tg, Δ IRE Tg および WT Tg すべてに対し無効であった。これらの結果から、ALAS-E IRE が赤血球初期分化において、細胞内鉄代謝に応じてヘム産生を抑制することで赤血球初期分化をコントロールしていることが示唆された。

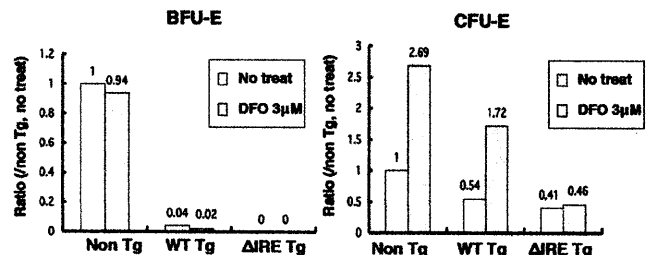


図4 Desferrioxamine (DFO) 添加による細胞内鉄濃度低下条件下における赤血球前駆細胞増殖能の検討

通常培地中では、WT Tg と Δ IRE Tg の間で顕著な差がなかったこと、定常状態飼育下、成体の Δ IRE Tg および WT Tg 間で軽度な貧血が認められたが、両者に顕著な差はなかったことから、定常状態では鉄が過剰に存在し、IRE が機能的でない条件に近いと推測されたので、次に IRE が機能的である鉄欠乏状態を誘導するために、成体マウスに対し断続的な瀉血を行った。2週間にわたる断続的な瀉血後、 Δ IRE Tg の末梢血においてのみ、UV 照射下でポルフィリン由来と考え

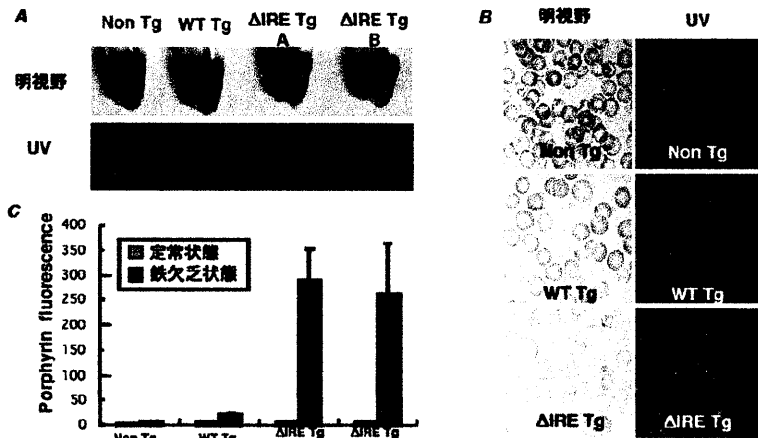


図5 瀉血による鉄欠乏状態誘導時に Δ IRE Tgの赤血球で顕著なポルフィリン蛍光蓄積が観察された

られる強い赤色蛍光が観察され、蛍光顕微鏡下でこの蛍光が赤血球由来であることを確認した (図 5A-B)。続いて FACS による定量的な解析を行った結果、瀉血後に Δ IRE Tg の赤血球に蓄積した平均ポルフィリン量は WT Tg の 15 倍に達した (図 5C)。尚、成熟赤血球に蓄積したポルフィリンは、HPLC により PPIX と同定した。これらの結果から、赤血球後期分化において、ALAS-E IRE は鉄の生物学的利用度に応じてポルフィリン合成をコントロールし、特に鉄欠乏状態において、ポルフィリン合成を抑制して赤血球での異常な PPIX の蓄積を回避する役割を担っていることが明らかとなった。

瀉血された Δ IRE Tg および WT Tg での赤血球におけるポルフィリンの蓄積量と ALAS-E タンパク質発現レベルが相関するかを検証した結果、赤血球のポルフィリン量と ALAS-E タンパク質発現量は正の相関を示した (図 6)。加えて、瀉血により成体の中で ALAS-E IRE への IRPs の結合能が亢進しているか検証するため、ALAS-E IRE をプローブとした RNA EMSA を行い、赤血球中における IRPs の IRE 結合能を測定した。その結果、Non Tg、 Δ IRE Tg および WT Tg すべての赤血球で、IRP1 の IRE 結合能は鉄欠乏状態時で亢進していた (図 7)。以上の結果から、 Δ IRE Tg におけるポルフィリンの異常蓄積が、ALAS-E IRE を介して翻訳が抑制されるはずの鉄欠乏状態で ALAS-E IRE が機能しないことから起こる ALAS-E 発現の異常亢進により惹起されることが明らかとなった。

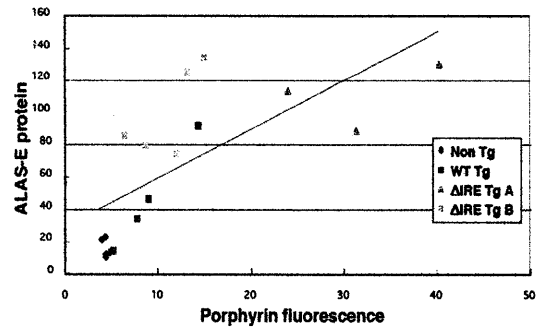


図6 赤血球内ポルフィリン量とALAS-Eタンパク質発現量は正の相関を示す

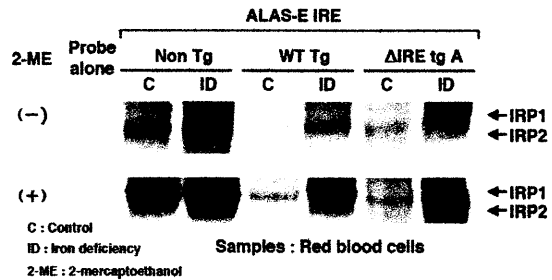


図7 RNA EMSAによるIRPsのALAS-E IRE結合能の測定

本研究から ALAS-E IRE は、(1)赤血球初期分化では、細胞内の低い鉄濃度に応じて ALAS-E 発現を抑制してヘム生合成量を低下させ、ヘムによる分化阻害作用が発揮されないように機能していること、(2)一方赤血球後期分化では、病理学的な鉄欠乏状態で鉄の生物学的利用度に応じて赤血球でのポルフィリン合成を制御することにより PPIX蓄積を防ぐのに機能していること、が示唆された。さらに、(3)鉄欠乏時に Δ IRE Tg の赤血球内で蓄積したポルフィリンが PPIXのみであったことから、正常な鉄が十分に供給される状態では、赤血球において ALAS-E がヘム生合成の律速酵素であることが実証された。今後、赤芽球系白血球病や貧血、ポルフィリン症を含めた原因遺伝子未同定の遺伝性疾患には、ALAS-E IRE 変異により惹起される疾患が存在する可能性がある。