

Ⅱ. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

遺伝性鉄芽球性貧血の診断分類と治療法の確立

遺伝性鉄芽球性貧血患者で同定された ALAS2 変異の表現型の検討

研究要旨:鉄芽球性貧血患者で同定されたALAS2遺伝子変異が酵素活性に及ぼす影響について検討する事を目的に、組換えヒトALAS-Eタンパク質をTag-freeの状態に精製し、in vitro酵素活性を測定する方法を確立した。また、ヒト由来培養細胞中で誘導性にALAS-Eタンパク質を発現させ、その細胞内における安定性を検討し、さらにin vivoにおける活性を定性的に明らかにする方法も確立した。これらの方法を用いて、最近同定されたALAS2遺伝子の変異の表現型について検討したところ、これらの中には酵素活性を低下させるものだけでなく、in vitroでの酵素活性はむしろ増加させるが細胞内での酵素の安定性を低下させるものも存在する事が明らかになった。そのような場合でも安定性の低下が酵素活性の上昇を上回るため、in vivoにおける酵素活性は低下していた。また、同じ遺伝子変異を有していても、治療として投与されるビタミンB6に対する反応性が大きく異なる場合がある事も判明した。これらの結果は遺伝性鉄芽球性貧血の診断と治療方針の確立に重要な情報を提供しうるものと考えられる。

研究分担者 古山和道 東北大学大学院医学系研究科分子生物学分野 准教授

A. 研究目的

遺伝性鉄芽球性貧血の原因としては、ALAS2 遺伝子の変異が最も多くの症例で同定され報告されている。ヒト ALAS2 遺伝子は X 染色体上に存在するため、ALAS2 遺伝子の変異は X 染色体連鎖鉄芽球性貧血(XLSA)の原因と考えられている。ALAS2 遺伝子がコードするタンパク質は赤芽球特異的 5-アミノレブリン酸合成酵素(ALAS-E)で、赤芽球でのみ特異的に発現しており、赤芽球におけるヘム生合成系の律速酵素である。ALAS-E 活性の発現には補酵素としてピリドキ

サルリン酸(PLP)が必須であり、XLSA 患者の約 2 / 3 では PLP やその前駆体であるビタミン B6 (ピリドキシン) の投与が有効であるとされている。しかしながら、残りの 1 / 3 の患者では PLP の投与は効果が無く、変異酵素の生化学的特徴と臨床経過との関連が注目されている。遺伝子変異と治療の効果との関連を明らかにするためには変異酵素の機能がどのように変化するのかを明らかにする事が必須であるが、諸家からの報告では、それぞれの変異が酵素の機能にどのような影響を与えるのかについて

検討されていない例も少なくない。我々は、遺伝性鉄芽球性貧血患者で同定された ALAS2 遺伝子の変異が酵素の機能にどのような影響を与えるかを明らかにする事を目的に、同定した全ての変異酵素を組換えタンパク質として大腸菌で発現・精製し、その酵素活性を *in vitro* で測定してきた。従来は Glutathione S-transferase (GST) との融合タンパク質として *in vitro* における酵素活性を測定してきたが、本研究では GST などの発現・精製用の tag を付与しない (tag-free) 組換えタンパク質を用いての酵素活性の測定を目指した。また、一部の変異酵素についてはヒト由来の培養細胞内で発現させ、そのタンパク質の安定性の変化の有無についての検討も試みた。これらの方法を用いて、特に最近同定した ALAS2 遺伝子変異が、*in vitro* および *in vivo* における酵素活性にどのような影響を与えるかを明らかにし、臨床経過との関連についての考察を試みた。

B. 研究方法

1) 対象症例の抽出と ALAS2 遺伝子変異の同定：鉄芽球性貧血と診断された症例の中から家族歴や発症年齢を元に遺伝性である可能性が高い症例を抽出し、ALAS2 遺伝子の近位プロモーター領域、各エクソンとその近傍、第8イントロンの赤芽球特異的エンハンサー領域を PCR 法により増幅し、PCR 産物の塩基配列を決定した。

2) *in vitro* における酵素活性の測定：アミノ酸配列の変化を伴うような遺伝子変異が同定された場合にはその変異を部位特異的変異導入法を用いて cDNA

に導入し、それを用いて変異酵素を大腸菌で Intein 及び chitin binding domain (CBD) との融合タンパク質として発現させ chitin beads を用いて精製した後に Intein の自己切断機能を利用して Intein/CBB を切除して tag-free タンパク質を得て、*in vitro* での酵素活性の測定に供した。

3) *in vivo* における変異酵素の安定性と総合的な酵素活性の検討：ヒト由来培養細胞 (HEK293 細胞) で ALAS-E タンパク質を FLAG ペプチドとの融合タンパク質として発現させるため、Flp-In T-Rex system を利用した。このシステムでは、目的とするタンパク質をコードする mRNA を、テトラサイクリンを用いて誘導性に一定量を発現させる事ができる。*in vitro* での活性が低くなかった変異に関しては、本システムを用いて細胞内における半減期を測定した。また、本系を用いて ALAS-E タンパク質を誘導性に発現させると、酵素活性の高さに応じて、ヘム合成系の中間代謝産物であるプロトポルフィリン IX (PPIX) が細胞内に蓄積する。すなわち、PPIX の蓄積量は ALAS2 の酵素活性に比例すると考えられるが、本研究では PPIX は紫外線を照射すると蛍光を発する事を利用し、その細胞内における蓄積量を半定量的に測定する事により、*in vivo* における酵素活性を判定した。

(倫理面への配慮)

遺伝子診断については、東北大学医学部倫理委員会の承認を得た。また、検体の採取は患者または患者保護者の同意を取得した後に行った。

C. 研究結果と考察

検討の結果、高純度の tag-free ALAS-E タンパク質を精製し、小素活性を測定する事ができた。また、Flp-In T-Rex system を用いて、HEK293 細胞内で目的とするタンパク質 (FLAG 融合 ALAS-E タンパク質) を再現性よく誘導性に発現させる事が可能となった。これらを用いて、以下の結果を得た。

1) 日本人の成人男性の血縁関係のない 2 症例の ALAS2 遺伝子の第 5 エクソンにおいて、ALAS-E タンパク質の 170 番目のアミノ酸であるアルギニンがロイシンに置換される変異(Arg170Leu 変異)を同定した。Arg170Leu 変異を導入した組換え ALAS-E タンパク質の *in vitro* での酵素活性は補酵素のピリドキサルリン酸(PLP)をアッセイ系に加えない場合は野生型の約 30%で、PLP を 100 μ M 添加した場合でも約 60%と低下していた。従って ALAS2 遺伝子変異が本症例における発症原因である可能性が高いと考えられた。いずれの症例に対しても治療として PLP の経口投与が行なわれたが、一方の症例は初期投与量 (30 mg/day) でほぼ正常値に近いレベルまで貧血が改善したが、もう一方の症例では増量しても(400 mg/day)効果はなかった (図 1)。

In vitro での酵素活性の測定結果からは、本遺伝子変異を有する患者は PLP の投与に反応する可能性が高いと推察されるが、PLP の投与に反応しない症例が存在する理由は今のところ不明である。ALAS2 遺伝子には未知の発現調節領域 (シス配列) が存在し、PLP の投与に反

応しない症例ではそのような領域に変異を有している可能性も否定できず、また、エピジェネティックな修飾により、mRNA の発現量が低下している可能性も否定できない。しかしながら、ALAS2 遺伝子の変異に加えて他の遺伝子の変異等が臨床経過に影響する可能性も考慮すべきではないかと考えられた。同じ遺伝子変異を有するにも関わらず、治療に対する反応性が異なる例がある事は以前から知られていたが、このように極端に異なる例は稀であり、論文として投稿中である。また、PLP の投与に反応しない原因を明らかにする事は鉄芽球性貧血の新たな治療法の開発につながる可能性があると考えられるため、その要因につき更に検討中である。

2) 日本人のそれぞれ異なる男性症例で、ALAS2 遺伝子の第 11 エクソンにおいて Val562Ala と Met567Ile のアミノ酸変異を伴うミスセンス変異を同定した (図 2)。それぞれの変異 ALAS-E の酵素活性を *in vitro* で測定したところ、野生型に比較して Val562Ala の酵素活性は低下するが、Met567Ile の酵素活性はむしろ亢進する事が明らかとなった (図 3)。これらのタンパク質を HEK293 細胞で発現させ、ミトコンドリアマトリクスにおける半減期を調べたところ、Val562Ala 変異タンパクは野生型と大きく変わらなかったが、Met567Ile 変異タンパク質は野生型と比べて明らかに短縮していた (図 4)。また、それぞれの変異タンパク質を強制発現させた HEK293 細胞を集め、紫外線を照射して細胞内へのポルフィリン体の蓄積量を比較したところ、いずれの変

異タンパク質を発現させた場合も野生型に比較してポルフィリン体の蓄積量は少なかった (図 5)。以上の結果から、Val562Ala 変異は主として酵素活性を低下させる事により、また、Met567Ile 変異は主として細胞内における安定性を低下させる事により、in vivo の ALAS 酵素活性を低下させ、鉄芽球性貧血の発症原因となるものと考えられた。

ヒト ALAS-E タンパク質は 583 残基のアミノ酸で構成されるが、この C 末端の 33 残基のアミノ酸配列はほ乳類の間ではかなり保存されているものの、大腸菌などの原核生物の ALAS には存在しない。この領域における Val562Ala と Met567Ile というアミノ酸置換が全く異なる表現型を呈した事から、C 末端 33 アミノ酸を欠失させた組換えタンパク質を作成したところ、そのタンパク質は酵素活性も細胞内での安定性も亢進している事が判明した (図 6)。すなわち、この領域は内在性の抑制ドメインとして機能している事が明らかになった。この結果は、ALAS2 遺伝子の遺伝的なフレームシフト変異により ALAS2 の C 末端のアミノ酸配列が変異すると、酵素活性が上昇するために X 染色体連鎖赤芽球性ポルフィリン症を発症するという最近の報告と矛盾しない。この領域がどのように酵素活性やタンパク質の安定性の低下に寄与しているのかを明らかにすることにより、ALAS-E タンパク質の機能発現機序の詳細を明らかにするために非常に重要であると考えられる。

1) 結論

今回の研究において Tag-free タンパ

ク質としてヒト ALAS-E タンパク質及びその変異体が大腸菌内で発現させ、精製する方法を確立した。また、ヒト由来の培養細胞内で誘導的に ALAS-E タンパク質を発現させ、ミトコンドリア内における安定性を調べる方法や、細胞内における総合的な酵素活性を検出する方法も確立する事ができた。これらの方法は鉄芽球性貧血患者で同定された ALAS2 遺伝子変異の表現型を検討するための重要なツールになりうるものと期待される。

ALAS2 遺伝子の変異により ALAS2 の酵素活性が低下するような場合にはビタミン B6 (ピリドキシン) や PLP の投与に反応するケースが多いと推察されるが、同じ ALAS2 変異を有する XLSA 患者においても PLP の投与によく反応する例と全く反応しない例もある事が明らかになった。このうち PLP の投与に反応しない例では、ALAS2 遺伝子の未知の発現調節領域に変異を有するか、またはヘム生合成系や鉄代謝系に関連する未知の因子の発現や機能が障害されている可能性を考慮すべきであると考えられる。

また、ALAS-E タンパク質の C 末端に近い領域に認められる変異の中には、酵素活性を低下させる変異のみではなく、酵素活性よりも細胞内における安定性を低下させる様な変異もある事が明らかとなった。今後この領域の機能発現機序を明らかにすることにより、赤芽球の分化の制御機構に関連した重要な知見が得られる可能性が高い。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Harigae H and Furuyama K. Hereditary sideroblastic anemia: pathophysiology and gene mutations. Int J Hematol. 2010 92(3):425-431..
- 2) Furuyama K, Harigae H, Kikuchi H, Kaneko K, Ohba R, Ikegami R, Fujita H, Shibahara S. Variability in the pyridoxine-responsiveness of patients with X-linked sideroblastic anaemia associated with the Arg170Leu substitution of erythroid-specific 5-aminolaevulinate synthase. 投稿中
- 3) Kadirvel S, Furuyama K, Harigae H, Kaneko K, Tamai Y, Ishida Y, Shibahara S. The carboxyl-terminal region of erythroid-specific 5-aminolevulinate synthase modifies its catalytic activity and stability. 投稿中

2. 学会発表

- 3) Ohba R, Furuyama K, Tsuchiya S, Manabe A, Ito E, Kojima S, Ozawa K and Harigae H. Epidemiological and Genetic Analysis of Sideroblastic Anemia --- Multicenter Study In Japan. 52nd ASH annual meeting. Dec. 6, 2010. Orland, US

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1

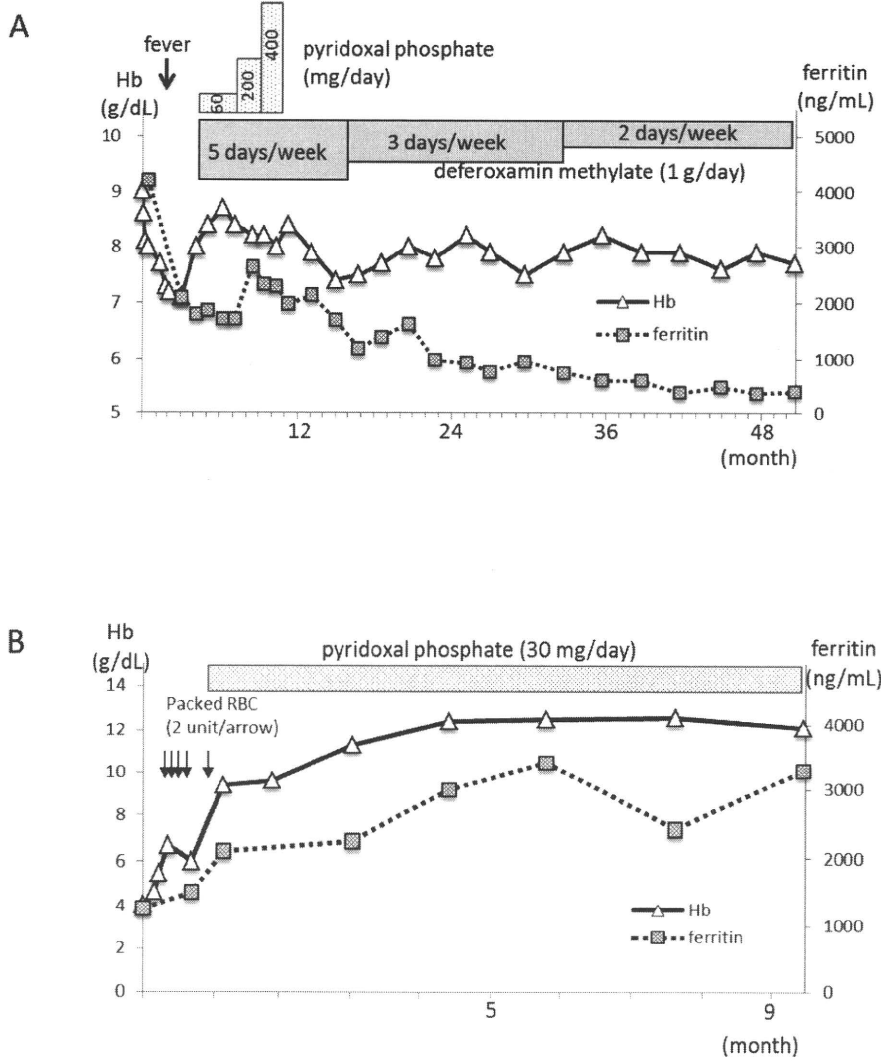


図2

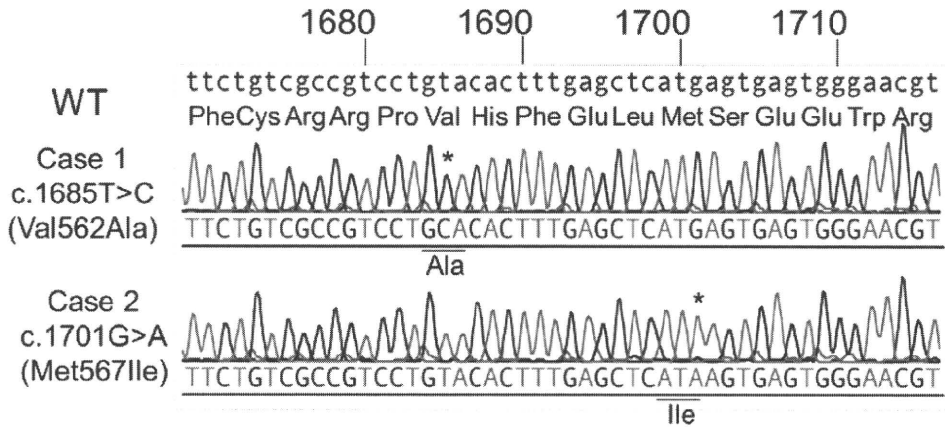


图3

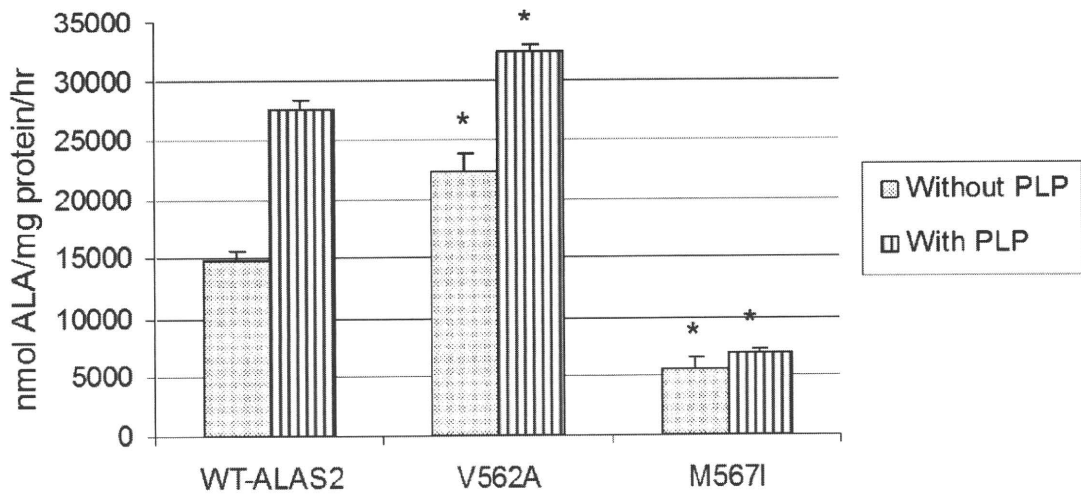


图4

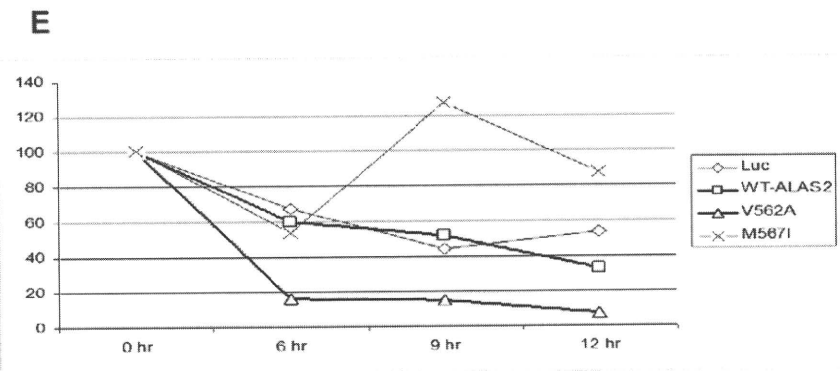
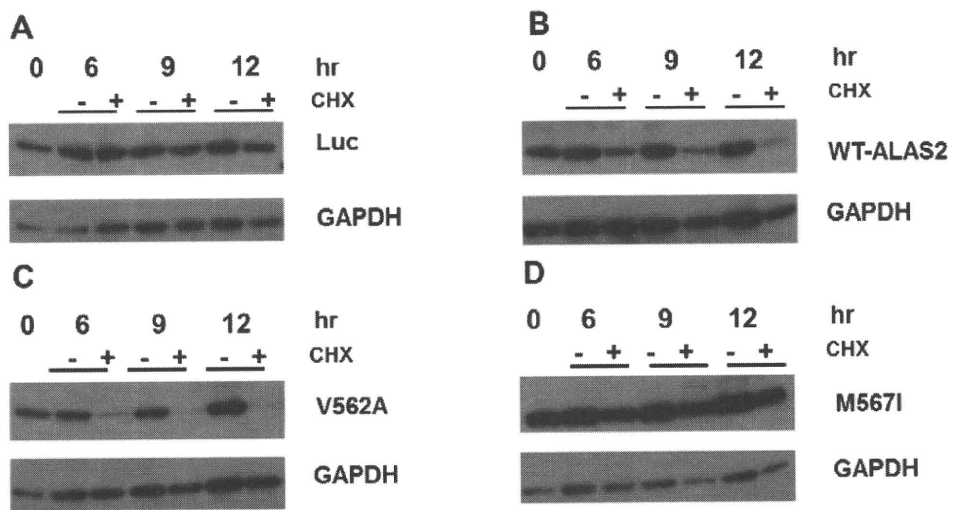
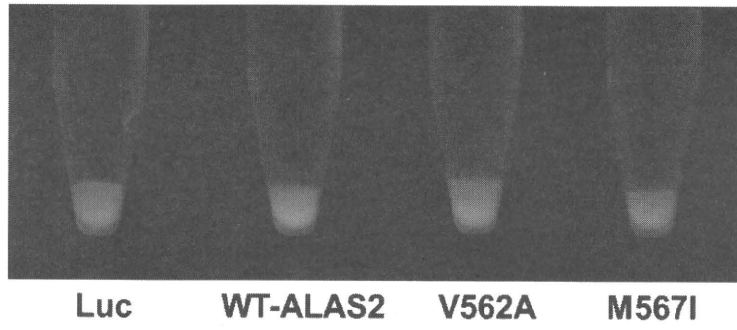


图5

A



B

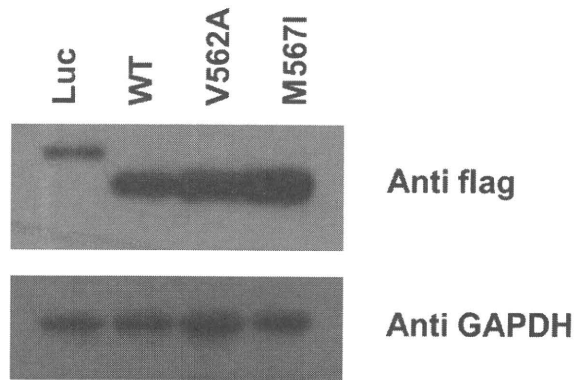
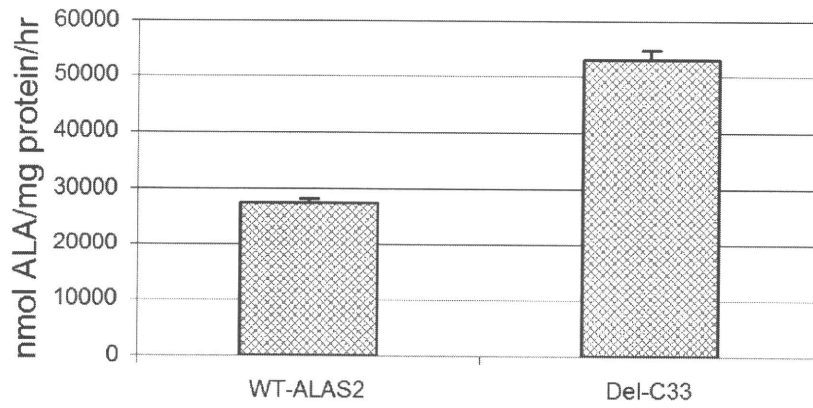


图6



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

遺伝性鉄芽球性貧血の診断分類と治療法の確立

成人鉄芽球性貧血の調査研究と新規治療法の確立に向けての基礎研究

研究分担者 小澤敬也（自治医科大学・医学部・教授）

研究要旨： 成人領域の鉄芽球性貧血症例の病態を明らかにするために、全国の血液疾患治療施設を対象に調査研究を行った。得られた臨床情報から、117例の後天性鉄芽球性貧血症例が確認された。その内訳は refractory anemia with ring sideroblasts (RARS)が 40 例, refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD)が 68 例, refractory anemia with excess blasts (RAEB)が 9 例であった。アルコール、薬剤などによる二次性の後天性鉄芽球性貧血は認められず、本邦において最も多い後天性鉄芽球性貧血は、refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD)であることが明らかとなった。さらに、新規治療法の確立に向けて DNA メチル化阻害薬アザシチジンに対する耐性細胞株を樹立し、耐性機序の解析を行った。その結果、アザシチジン活性化プロセスの障害が示唆され、耐性克服法の開発に有用な知見を得ることができた。

A. 研究目的

鉄芽球性貧血は、骨髄に環状鉄の出現を特徴とする難治性貧血である。鉄芽球性貧血は、遺伝性鉄芽球性貧血と後天性鉄芽球性貧血に大別されるが、その多くは後天性であり骨髄異形成症候群の一亜型として分類される。骨髄異形成症候群の中の鉄芽球性貧血に絞った調査研究はこれまでなされたことがなく、遺伝性鉄芽球性貧血との鑑別を明確にするためには後天性鉄芽球性貧血の病態を調査することが必須である。そこで、今

回その発症頻度や病態についての疫学調査を行った。さらに、新規治療法の確立に向けて新規治療薬であるメチル化阻害剤の有効性について検討した

D. 研究方法

全国の施設に対し、鉄芽球性貧血症例の有無を問う予備調査を行い、予備調査にて鉄芽球性貧血の症例が確認できた施設に対し、臨床データ、家族歴、生活歴、治療歴など病態解析に必要な情報を得た。

（倫理面への配慮）

本研究は主たる研究実施施設である

東北大学の倫理委員会に審査申請を行い、承認を得て実施した。一次査は患者個人情報that匿名化されている遺伝子検査を含まない、既存資料のみを用いた観察研究であるため、「疫学研究の倫理指針」に基づき、参加施設では倫理委員会での審査・承認は必要とせず、施設長の承認のみで研究に参加することが可能である。参加施設での審査申請の可否は各施設の判断に委ねた。

メチル化阻害剤の有効性の検討については、以下の方法を用いた

1. ヒト白血病細胞株を用い、アザシチジンに対する耐性細胞株を樹立する。
2. アザシチジン投与によるアポトーシスシグナリングや細胞周期調節系への影響の違いについて、アザシチジン耐性株とアザシチジン感受性の親株とで比較検討する。
3. アザシチジン耐性株における耐性機序を解析する。

E. 研究結果

1. 成人鉄芽球性貧血の調査研究

平成21年2月から平成23年1月までに診断された鉄芽球性貧血が300例確認され、このうち134例の臨床情報が得られた。これらの臨床情報から、117例の後天性鉄芽球性貧血症例が確認された。その内訳は refractory anemia with ring sideroblasts (RARS)が40例、refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD)が68例、refractory anemia with excess blasts (RAEB)が9例であった。アルコール、薬剤などによる二次性の後天性鉄芽球性貧血は認められなかった。遺伝性鉄芽球性貧血症例との病態の相違、遺伝子解析については、代表研究者の東北大学張替教授、および小児領域の分担

研究者と連携して行っていく予定である。

2. メチル化阻害剤の有効性の検討

1. ヒト急性骨髄性白血病細胞株 THP-1 および HL60 より、アザシチジン耐性株 THP-1/AR および HL60/AR をそれぞれクローニングした。
2. THP-1/AR および HL60/AR に対するアザシチジンの IC₅₀ 値は、それぞれの親株と比較して 9.77 倍および 6.73 倍であった。
3. THP-1/AR および HL60/AR は他の DNA メチル化阻害薬である 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) に対して交差耐性を示した。
4. アザシチジン投与により、親株では subG1 期の細胞の著明な増加を認めたが、耐性株ではこの現象を認めなかった。
5. アザシチジン投与後、親株ではリン酸化 JNK/SAPK 量の増加および cleaved caspases の増加がみられたが、耐性株ではこの反応がみられなかった。
6. アザシチジンによる DNA methyltransferase 活性の抑制が、耐性株ではみられなかった。
7. 耐性株と親株とで、P 糖蛋白の発現量に差はなかった。
8. 耐性株では親株と比較して、アザシチジンの活性化プロセスに重要な uridine-cytidine kinase の蛋白発現量が減少していた。

F. 考察

後天性鉄芽球性貧血症例で、最も多い病型は MDS の RCMD であることが明らかとなった。これらの症例では異型性が明らかな例が多く、遺伝性鉄芽球性貧血との鑑別は比較的容易と考えられるが、異型性が少なく貧血のみが異常として

認められる RARS については、遺伝性鉄芽球性貧血との鑑別が必要になってくる。これらの症例では、遺伝子解析が確定診断の上から非常に重要と考えられる。

本研究では、さらに新規治療法の確立に向け、MDS に対する新規治療薬であるメチル化阻害剤の有効性について基礎的検討を行った。2 種類のアザシチジン耐性株をクローニングし、耐性機序の解析を進めたところ、アザシチジン感受性の親株では、アザシチジン投与後に JNK/SAPK の活性化によるアポトーシスシグナリングの活性化が示唆されたが、耐性株では、この現象が欠落していた。一方、耐性株ではアザシチジン投与後も DNA methyltransferase 活性の抑制を認めなかったことから、細胞内におけるアザシチジンの活性化産物の低下が起こっているものと推察された。その理由としては、a) 細胞内へのアザシチジン取込機構の異常、b) アザシチジンの細胞外への排泄増加、c) 細胞内におけるアザシチジン活性化プロセスの障害などが考えられる。細胞内へのアザシチジンの取込については、現在トランスポーター蛋白である hENT1、hENT2 および hCNT1 の発現量を検討している。しかしながら、耐性株では、uridine-cytidine kinase の発現量が低下していることから、アザシチジン活性化産物量の低下は主に細胞内取込後のアザシチジン活性化プロセスの障害に起因している可能性が高い。現在、uridine-cytidine kinase 遺伝子の変異の有無についても検索を進めている。また、5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) と交差耐性を示すことから、deoxycytidine kinase の発現量および遺伝子変異についても検討する予定である。さらに、耐性

克服に有用な併用薬剤について検討するため、耐性株を用いた isobologram 法による解析を開始した。

E. 結論

1. 調査研究にて 117 例の後天性鉄芽球性貧血が確認され、そのすべてが骨髄異形成症候群に分類された。
2. アザシチジン耐性株 THP-1/AR および HL60/AR を樹立した。
3. uridine-cytidine kinase の発現量低下によるアザシチジン活性化プロセスの障害が主な耐性機序と考えられる。
4. 後天性鉄芽球性貧血に対する有効な併用療法開発のツールとして、アザシチジン耐性株は有用と思われる。

F. 研究発表

1. 学会発表

- 1) Okabe H, Suzuki T, Uehara E, Ueda M, Nagai T, Ozawa K.
Hematopoietic disturbance in iron-overload
第 72 回日本血液学会学術集会、2010 年 9 月 24 日、横浜

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

遺伝性鉄芽球性貧血の診断分類と治療法の確立

小児科領域の調査研究

研究分担者 小島勢二 名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 教授
伊藤悦朗 弘前大学大学院医学系研究科小児科学 教授
真部淳 聖路加国際病院小児科医長
土屋滋 東北大学大学院医学系研究科小児病態学教授
研究協力者 嶋田 明 名古屋医学部附属病院小児科 病院助教

研究要旨： 日本小児血液学会は平成21年2月より再生不良性貧血(AA)、骨髄異形性症候群(MDS)および先天性造血不全症候群(CBFS)を対象とした中央診断を開始した。レビュー開始から平成23年1月までに340例がレビューされた。レビュー結果より遺伝性鉄芽球性貧血の症例が1例みつかった。本児はVitamin B6投与にて貧血の改善がみられた。中央診断を行うことにより極めて希少とされる遺伝性鉄芽球性貧血の症例の発掘につながるものと考えられる。

A. 研究目的

鉄芽球性貧血は、骨髄に環状鉄芽球という特徴的な赤芽球の出現を特徴としている。この環状鉄芽球は赤芽球のミトコンドリアと呼ばれる器官への鉄の異常蓄積により形成される。鉄芽球性貧血は、遺伝性鉄芽球性貧血と後天性鉄芽球性貧血に大別されるが、遺伝性鉄芽球性貧血は患者数が少ないために、調査研究がほとんど行われたことがなく、その疫学や病態は現在でもわかっていない。遺伝性鉄芽球性貧血は、X連鎖性鉄芽球性貧血(XLSA)と呼ばれているが、発症家系が約40家系と少なく、希少疾患である

ため、その発症頻度や病態についての詳細な調査・解析はなされていなかった。(XLSAとして正確に診断されるようになれば、ビタミンB6の投与により貧血が改善する可能性があり、正確な診断は極めて重要である。

G. 研究方法

日本小児血液学会においては再生不良性貧血(AA)、骨髄異形性症候群(MDS)および先天性骨髄不全症候群(CBFS)やを対象とした中央診断を行うことになり、XLSAも施設での診断のみでなく、中央診断されるようになった。中央診断事務局を名古屋大学小児科に

設置した。AA、MDS、あるいは CBFS が疑われる症例が発生した場合は、各施設から事務局に連絡をもらい、登録番号を発行した。レビューは骨髄および末梢血塗抹標本を2施設(名古屋大学小児科、聖路加国際病院小児科)で、骨髄病理標本を1施設(名古屋第一赤十字病院病理部)で行った。

(倫理面への配慮)

中央診断およびそれに伴う検査については、名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得、患者及び患者保護者の同意を取得した後に行った。

H. 研究結果

平成21年2月から平成23年1月までに340例がレビューされ、このうち遺伝性鉄芽球性貧血が1例含まれていた。症例は生後10か月で低色素性貧血を認め、当初鉄欠乏性貧血として、鉄剤の投与を行われたが、貧血が改善せず、骨髄検査となった。骨髄は低形成で、赤芽球の異形成は乏しかったが、鉄染色にて環状鉄芽球がわずかに認められた。遺伝性鉄芽球性貧血を疑い、Vitamin B6を投与したところ、貧血の改善がみられた。遺伝子解析は今後行っていく予定である。

I. 考察

遺伝性鉄芽球性貧血の本邦での報告例は非常に少なく、まだ病態についてあきらかとなっていない。今回見つかった例のように他の貧血とされている例もあるものと考えられる。また形態学的診断も困難を極め、中央診断が重要と考えられる。今後は症例の集積を行い、あわせて分子診断も確定診断の上から非常

に重要と考えられる。

J. 結論

中央診断にて遺伝性鉄芽球性貧血の乳児例が1例みつかった。今後も症例の集積が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 2) Villalobos IB, Takahashi Y, Akatsuka Y, Muramatsu H, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Saji H, Kato M, Ogawa S, Kojima S.

Relapse of leukemia with loss of mismatched HLA resulting from uniparental disomy after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. **Blood.** 2010 ;115:3158-61.

- 3) Konno Y, Toki T, Tandai S, Xu G, Wang R, Terui K, Ohga S, Hara T, Hama A, Kojima S, Hasegawa D, Kosaka Y, Yanagisawa R, Koike K, Kanai R, Imai T, Hongo T, Park MJ, Sugita K, Ito E.

Mutations in the ribosomal protein genes in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. **Haematologica.** 2010 ;95:1293-9.

- 4) Kanazaki R, Toki T, Terui K, Xu G, Wang R, Shimada A, Hama A, Kanegane H, Kawakami K, Endo M, Hasegawa D, Kogawa K, Adachi S, Ikeda Y, Iwamoto S, Taga T, Kosaka Y, Kojima S, Hayashi Y, Ito E.

Down syndrome and GATA1 mutations in transient abnormal myeloproliferative disorder: mutation

- classes correlate with progression to myeloid leukemia.
Blood. 2010 ;116:4631-4638.
- 5) Pulsipher MA, Young NS, Tolar J, Risitano AM, Deeg HJ, Anderlini P, Calado R, Kojima S, Eapen M, Harris R, Scheinberg P, Savage S, Maciejewski JP, Tiu RV, Difrongo N, Horowitz MM, Antin JH. Optimization of Therapy for Severe Aplastic Anemia Based on Clinical, Biological and Treatment Response Parameters: Conclusions of an International Working Group on Severe Aplastic Anemia Convened by the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network, March 2010.
Biol Blood Marrow Transplant. 2011 ;17:291-9.
- 6) Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsuiki N, Takagi M, Matsuda K, Muramatsu H, Doisaki S, Nagasawa M, Morio T, Kasahara Y, Koike K, Kojima S, Takao A, Mizutani S. Autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease with somatic KRAS mutation.
Blood. 2010 Nov 9. [Epub ahead of print]
- 7) Yoshida N, Yagasaki H, Hama A, Takahashi Y, Kosaka Y, Kobayashi R, Yabe H, Kaneko T, Tsuchida M, Ohara A, Nakahata T, Kojima S. Predicting response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia.
Haematologica. 2011 Jan 27. [Epub ahead of print]
- 8) Ito E, Konno Y, Toki T, Terui K. Molecular pathogenesis in Diamond-Blackfan anemia.
Int J Hematol. 2010. ;92:413-18. Epub 2010 Oct 1.
- 9) Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, Suzuki H, Ishikawa Y, Choi YL, Ueno T, Soda M, Hamada T, Haruta H, Takada S, Miyazaki Y, Kiyoi H, Ito E, Naoe T, Tomonaga M, Toyota M, Tajima S, Iwama A, Mano H. Array-based genomic resequencing of human leukemia.
Oncogene 2010. [Epub ahead of print].
- 10) Aikawa Y, Katsumoto T, Zhang P, Shima H, Shino M, Terui K, Ito E, Ohno H, Stanley ER, Singh H, Tenen DG and Kitabayashi I. PU.1-mediated upregulation of *M-CSFR* is critical for MOZ-leukemia stem cell potential.
Nature Medicine 2010;16:580-585.
- 11) Shiba N, Kato NM, Park MJ, Sanada M, Ito E, Fukushima K, Sako M, Arakawa H, Ogawa S, and Hayashi Y. *CBL* mutations in juvenile myelomonocytic leukemia and pediatric myelodysplastic syndrome.
Leukemia 2010;24:1090-1092.
- 11) Komatsuzaki S, Aoki Y, Niihori T, Okamoto N, Hennekam RC, Hopman S, Ohashi H, Mizuno S, Watanabe Y, Kamasaki H, Kondo I, Moriyama N, Kurosawa K, Kawame H, Okuyama R, Imaizumi M, Rikiishi T, Tsuchiya S,

Kure S, Matsubara Y. Mutation analysis of the SHOC2 gene in Noonan-like syndrome and in hematologic malignancies.

J Hum Genet. 2010 ;55:801-9.

12) Kamiya T, Manabe A.

Congenital dyserythropoietic anemia.

Int J Hematol. 2010 ;92:432-8.

2. 学会発表

4) Takahashi Y, Doisaki S, Nishio N, Muramatsu H, Shimada A, Hama A, Kojima S. The telomere length in peripheral blood lymphocytes is a useful predictor of the response to immunosuppressive therapy in patients with acquired aplastic anemia. Session Type: Oral Session. 52nd ASH annual meeting. Dec. 4, 2010. Orland, USA

5) 高橋義行、ブストス・イツツェル、土居崎小夜子、村松秀城、西尾信博、嶋田明、濱麻人、小島勢二: Recovery of deficient regulatory T cells after IST or SCT using ATG in children with aplastic anemia. 第72回日本血液学会学術集会、2010年9月24日、横浜

6) 濱麻人、真部淳、伊藤雅文、野沢和江、土居崎小夜子、村松秀城、嶋田明、高橋義行、小原明、小島勢二: 小児再生不良性貧血と Refractory cytopenia of childhood の臨床像の比較: 中央診断登録例 78 例の検討: 第52回日本小児血液学会総会、2010年12月17日、大阪

7) 伊藤悦朗、照井君典、小島勢二、小原明、大賀正一、森尾友宏、浜口功、

倉光球、菅野仁、: 先天性赤芽球癆 (Diamond Blackfan 貧血) の効果的診断法の確立に関する研究. 平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業研究事業小島班「DKC の効果的診断方法の確立と治療ガイドラインの作成に関する研究」伊藤班「DBA の効果的診断法の確立に関する研究」合同班会議、名古屋 (平成 22 年 9 月 4 日).

8) 伊藤悦朗、照井君典、小島勢二、小原明、大賀正一、森尾友宏、浜口功、倉光球、菅野仁、: 先天性赤芽球癆 (Diamond Blackfan 貧血) の効果的診断法の確立に関する研究. 先天性造血不全シンポジウム 千葉浦安市 (平成 23 年 2 月 4 日).

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌 【欧文】

| 著者名 | 論文タイトル名 | 雑誌名 | 巻・号・ページ・出版年 |
|---|---|----------------|--------------------|
| Harigae H, Fruyama K | Hereditary sideroblastic anemia: pathophysiology and gene mutations. | Int J Hematol | 92(3):425-431,2010 |
| Tahara T, Yamamoto M Akagi R, Harigae H Taketani S | The low expression allele (IVS3-48C) of the ferrochelatase gene leads to low enzyme activity associated with erythropoietic protoporphyria. | Int J Hematol | 92(5):769-771,2010 |
| Konno Y, Toki T, Tandai S, Xu G, Wang R, Terui K, Ohga S, Hara T, Hama A, Kojima S, Hasegawa D, Kosaka Y, Yanagisawa R, Koike K, Kanai R, Imai T, Hongo T, Park MJ, Sugita K, Ito E. | Mutations in the ribosomal protein genes in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. | Haematologica. | 95(8):1293-9,2010 |

雑誌 【和文】

| 著者名 | 論文タイトル名 | 雑誌名 | 巻・号・ページ・出版年 |
|------|----------------|----------|-----------------------|
| 張替秀郎 | 鉄と炎症 | 日本内科学会雑誌 | 99(6):112-116,2010 |
| 張替秀郎 | 鉄代謝研究の進歩と鉄関連貧血 | 臨床病理 | 58(12):1211-1218,2010 |
| 張替秀郎 | 輸血後鉄過剰症の診断と治療 | 総合臨牀 | 58(8):1807-1810,2009 |

IV. 研究成果の刊行物、別冊

Hereditary sideroblastic anemia: pathophysiology and gene mutations

Hideo Harigae · Kazumichi Furuyama

Received: 29 June 2010 / Revised: 17 August 2010 / Accepted: 31 August 2010 / Published online: 17 September 2010
© The Japanese Society of Hematology 2010

Abstract Sideroblastic anemia is characterized by anemia with the emergence of ring sideroblasts in the bone marrow. Ring sideroblasts are erythroblasts characterized by iron accumulation in perinuclear mitochondria due to impaired iron utilization. There are two forms of sideroblastic anemia, i.e., inherited and acquired sideroblastic anemia. Inherited sideroblastic anemia is a rare and heterogeneous disease caused by mutations of genes involved in heme biosynthesis, iron–sulfur (Fe–S) cluster biogenesis, or Fe–S cluster transport, and mitochondrial metabolism. The most common inherited sideroblastic anemia is X-linked sideroblastic anemia (XLSA) caused by mutations of the erythroid-specific δ -aminolevulinic acid synthase gene (*ALAS2*), which is the first enzyme of heme biosynthesis in erythroid cells. Sideroblastic anemia due to *SLC25A38* gene mutations, which is a mitochondrial transporter, is the next most common inherited sideroblastic anemia. Other forms of inherited sideroblastic anemia are very rare, and accompanied by impaired function of organs other than hematopoietic tissue, such as the nervous system, muscle, or exocrine glands due to impaired mitochondrial metabolism. Moreover, there are still significant numbers of cases with genetically undefined

inherited sideroblastic anemia. Molecular analysis of these cases will contribute not only to the development of effective treatment, but also to the understanding of mitochondrial iron metabolism.

Keywords Sideroblastic anemia · Iron · Mitochondria

1 Introduction

Red blood cells take up large amounts of iron during terminal differentiation for the production of hemoglobin. After import through the transferrin receptor, ferric iron (Fe^{3+}) is released from transferrin (Tf) in an acidified endosome, and is reduced to ferrous iron (Fe^{2+}) by ferrireductase. Ferrous iron is exported from the endosome to the cytosol via divalent metal transporter 1 (DMT1), and then transported to the mitochondria. The pathway from the endosomes to the mitochondria remains unclear, although it has recently been proposed that Fe–Tf-containing endosomes deliver iron directly to mitochondria, avoiding the toxicity of iron by bypassing the oxygen-rich cytosol. On reaching the mitochondria, iron is imported through an importer protein, mitoferrin 1 (Mfrn1; *SLC25A38*), which is a member of the solute carrier family localized in the inner mitochondrial membrane, and is used for heme synthesis and iron–sulfur (Fe–S) cluster biogenesis.

Heme is one of the two major products that require mitochondrial iron [1]. In mammals, eight enzymes are involved in the heme biosynthetic pathway. Heme synthesis starts in mitochondria with the condensation of glycine and succinyl CoA to form aminolevulinic acid (ALA), which is catalyzed by δ -aminolevulinic acid synthase (ALAS). ALAS consists of two isoforms, i.e., ALAS1, which is expressed ubiquitously, and ALAS2, which is

H. Harigae (✉)
Department of Hematology and Rheumatology,
Tohoku University Graduate School of Medicine,
1-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8574, Japan
e-mail: harigae@med.tohoku.ac.jp

K. Furuyama
Department of Molecular Biology and Applied Physiology,
Tohoku University Graduate School of Medicine,
1-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8574, Japan