

博士論文

DNA 脱メチル化機構を担う TET2 遺伝子変異の
鉄芽球性貧血発症への関与について

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

内科病態学講座 血液・免疫病学分野

猪倉 恭子

目次

1. 要旨	2
2. 研究背景.....	5
3. 研究目的.....	9
4. 研究方法.....	10
5. 研究結果.....	19
6. 考察	28
7. 結論	33
8. 文献.....	34
9. 表.....	45
10. 図.....	50
11. 基礎論文.....	70
12. 謝辞.....	71

1. 要旨

鉄芽球性貧血は骨髄における環状鉄芽球の増加を特徴とする難治性貧血で先天性と後天性に分類される。鉄芽球性貧血の病態は赤血球系細胞でのミトコンドリアにおける鉄利用障害と考えられるが、環状鉄芽球の形成機序を含め、鉄芽球性貧血における鉄動態や発症にいたる分子機構については不明な点も多い。

そこで、本研究では、鉄芽球性貧血の発症における分子機構を明らかにすることを目的とした。

まず本邦における先天性鉄芽球性貧血症例を対象に全エクソンシーケンス解析を行ったところ、既知の遺伝子変異が認められなかった先天性鉄芽球性貧血家系において、新たに apurinic/aprimidinic endonuclease 2(*APEX2*) 遺伝子、NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 1(*NDUFV1*) 遺伝子、solute carrier family 39 (metal ion transporter), member 8 (*SLC39A8*) 遺伝子の変異が同定された。一方、後天性鉄芽球性貧血症例においては、既知の splicing factor 3B subunit 1(*SF3B1*) の変異が最も多く認められたが、新たに先天性鉄芽球性貧血の原因遺伝子である 5-aminolevulinate synthase 2(*ALAS2*) 遺伝子と後天性のがん遺伝子である ten-eleven translocation 2(*TET2*) 遺伝子の複合遺伝子変異を有する女性の症例が認められた。

TET2 遺伝子は DNA の脱メチル化作用を持ち、生体におけるエピジェネティックな分子制御を担う遺伝子であり、これまでも造血器腫瘍において変異が認められてい

るが、鉄代謝における機能は明らかとなっていない。*ALAS2* 遺伝子は X 染色体上に存在するが、特に女性の場合では *ALAS2* 遺伝子のヘテロ変異のみでは鉄芽球性貧血の発症にはいたらないと考えられている。そこで *TET2* 遺伝子変異がヘム合成や鉄代謝に影響を与えている可能性を考慮し解析をすすめることとした。まず、16 週齢の *Tet2* ノックダウンマウスを用いて検討したところ、*Tet2* ノックダウンマウスは軽度の貧血を呈し、血清鉄、血清フェリチンの上昇を認めた。さらに、*Tet2* ノックダウンマウスの骨髄では明らかな環状鉄芽球の増加は認められなかったが、ミトコンドリアにおける鉄貯蔵蛋白質であるミトコンドリアフェリチンの発現が、骨髄の赤血球系細胞である *Ter119* 陽性細胞で上昇しており、ミトコンドリアにおける鉄量が増加していることが示唆された。また、*Ter119* 陽性細胞におけるヘム合成や鉄動態に関連する遺伝子の発現を解析したところ、*Tet2* ノックダウンマウスではヘム分解酵素である Heme oxygenase-1 (*Hmox-1*) 遺伝子、ヘム合成の最終段階を担う Ferrochelatase (*Fech*) 遺伝子の発現が低下していた。さらに、*Fech* のプロモーター領域における CpG 配列でのメチル化解析を施行したところ、*Tet2* ノックダウンマウスでは高度にメチル化されていることが分かった。この結果から *Tet2* の機能低下により *Fech* 遺伝子のプロモーター部位のメチル化がおこり、*Fech* mRNA の発現が低下していることが考えられた。また、*Tet2* ノックダウンマウスの骨髄 *Ter119* 陽性細胞においてヘム濃度が低下していたことや *Hmox-1* mRNA の発現が低下していたことも、*Tet2* ノックダウンマウスにおけるヘム合成障害を支持する結果であった。

以上の結果から、生体内における **TET2** の作用低下は、ヘム合成障害や鉄利用障害による鉄過剰の状況を引き起こし、鉄芽球性貧血の病態に寄与しうると考えられた。

また、本研究にて **TET2** 遺伝子のエピジェネティックな制御機構が正常な赤血球造血においても重要であることが明らかとなった。

2. 研究背景

鉄芽球性貧血は先天性と後天性に大別され、**French-American-British Classification(FAB)**分類では、診断基準は環状鉄芽球が骨髄総赤芽球の15%を超えることとされている¹⁻⁴。また、**World Health Organization(WHO)2008**分類では、環状鉄芽球は核周囲1/3以上にわたって10個以上の鉄顆粒が存在すると定義されている。先天性鉄芽球性貧血の発症頻度は極めてまれだが、原因遺伝子としてヘム合成系の初発酵素である *ALAS2* の変異が報告され^{5,6}、本邦でも本遺伝子の変異が最も多く報告されている⁷。その他にも鉄・硫黄クラスター合成⁸・輸送に関わる遺伝子^{5,9}、ミトコンドリアDNA遺伝子¹⁰、ミトコンドリアトランスポーター遺伝子¹¹、ミトコンドリアtRNA関連遺伝子¹²などの変異が報告されているが、原因遺伝子が同定されない先天性鉄芽球性貧血症例も多い¹³。一方、後天性鉄芽球性貧血には抗結核薬などの薬剤性、鉛による中毒性、アルコール性などの二次性と、骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndrome : MDS)の一病型である、環状鉄芽球を伴う不応性貧血(refractory anemia with ring sideroblasts : RARS)、多血球系異形性を伴う不応性血球減少症(refractory cytopenia with multilineage dysplasia : RCMD)が含まれる¹⁴。近年、MDS with ring sideroblast(MDS-RS)においてはRNAスプライシング経路に関する遺伝子である *SF3B1* の変異が高頻度で認められることが明らかになり¹⁵⁻¹⁷、鉄芽球性貧血発症への関与が強く示唆されている。しかし、先天性、後天性ともに鉄芽球性貧血発症における分子機構、および環状鉄芽球形成機序については不明な点が

多い。

東北大学血液免疫科では日本における鉄芽球性貧血の病態や発症機序を明らかにするために、鉄芽球性貧血の疫学調査および遺伝子解析を行っている。この解析にて *SF3B1* 変異が認められない、後天性鉄芽球性貧血の RCMD with ring sideroblast(RCMD-RS)の一症例で、先天性鉄芽球性貧血の原因遺伝子である *ALAS2* の生殖細胞変異と後天性のがん遺伝子である *TET2* の体細胞変異が認められた。*TET2* は TET ファミリー(*TET1*、*TET2*、*TET3*)に属し、DNA の 5-メチルシトシン (5-methylcytosine: 5mC)を 5-ヒドロキシメチルシトシン(5-hydroxymethylcytosine : 5hmC)に変換し、DNA の脱メチル化に作用する。また、その酵素活性は二価鉄と α -ケトグルタル酸(α -ketoglutarate: α -KG)依存性に作用することが知られている¹⁸⁻²²。一方、DNA のメチル化については、DNA メチル化修飾酵素である DNA methyltransferase 1(DNMT1), DNMT3A, DNMT3B がシトシンをメチルシトシンに変換することで、転写因子との結合を阻害することにより遺伝子発現を制御されるとされる²³⁻²⁵。*TET2*変異は、急性骨髄性白血病(acute myeloid leukemia : AML)²⁶、MDS、骨髄増殖性腫瘍(myeloproliferative neoplasms : MPN)、慢性骨髄単球性白血病(chronic myelomonocytic leukemia : CMML)等の骨髄系腫瘍^{27,28}、また血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫(angioimmunoblastic T cell lymphoma : AITL)等のリンパ系腫瘍²⁹においても幅広く同定されている。さらに、*TET2*変異は MDS において最も多く認められる遺伝子変異であり、MDS-RS 症例でもその変異は同定されている

27,30,31。造血器腫瘍で認められる *TET2* 変異の多くはナンセンスまたはフレームシフト変異による早期終始コドンを伴った C 末端側の欠損、または C 末端側の酵素活性を担うドメインのミスセンス変異による機能欠損型変異である^{32,33}。これらの *TET2* 変異により *TET2* の酵素活性が低下すると、5hmC 量が低下し、脱メチル化が抑制されメチル化が集積する方向に働くと考えられており、このエピゲノム制御の異常は造血器腫瘍発症に強く関与するとされている。

鉄芽球性貧血は先天性、後天性ともにミトコンドリアでの過剰な鉄の蓄積による環状鉄芽球の出現が特徴であり、生体内、特に赤血球系細胞において鉄代謝が大きく変化していることが考えられる。今回の遺伝子解析にて RCMD-RS 症例で *TET2* 遺伝子変異が同定され、また過去の報告でも後天性鉄芽球性貧血症例でその変異が確認されていることを考慮すると、*TET2* 遺伝子の作用は鉄代謝にも何らかの影響を与えている可能性があると考えられた。

TET2 遺伝子はこれまでに *Tet2* ノックアウトマウスやノックダウンマウスが作成され、機能解析がなされている。これらのマウスでは、骨髄において造血幹細胞、前駆細胞が増加し、自己複製能の亢進や分化異常が認められる^{29,34-36}。また、長期的な観察では、髄外造血を起こし、MPN や MDS の病態を呈するケース^{34,35}、またリンパ腫を発症するケースもあり²⁹、生体内における *Tet2* の機能低下がもたらす多様な表現型が観察されている。しかしながら、赤血球造血については *TET2* が赤血球系細胞の分化にも関与し、その作用低下は分化を阻害する、という報告³⁷があるものの、

生体内、特に赤血球系細胞での **TET2** のヘム、鉄代謝における機能という観点では、これまでに詳細な検討はされていない。本研究では、**TET2** が赤血球造血や鉄代謝に関与し、その変異が鉄芽球性貧血の病態形成においても何らかの影響を及ぼす可能性がある、との仮説を立て研究を進めることとした。

3. 研究目的

本研究では、TET2 遺伝子の赤血球系細胞におけるヘム合成や鉄代謝への関与を解析し、TET2 遺伝子が鉄芽球性貧血の発症や病態形成に寄与しているか検討することを目的とした。

4. 研究方法

ゲノム DNA エクソンシーケンス解析

原因遺伝子が不明である先天性鉄芽球性貧血患者及び血縁者の末梢血を用いて全エクソンシーケンス解析を施行した。ヒトの末梢血はヘルシンキ宣言を遵守しインフォームドコンセントを得て採取した。研究での使用は東北大学の倫理委員会によって承認された。

シーケンス解析

RCMD-RS 患者の末梢血、健常人の末梢血を用いてダイレクトシーケンス解析を行った。また、RCMD-RS 患者の大腸切片を pGEM™-T Easy Vector (Promega, WI, USA) にサブクローニングし、シーケンス解析を行った。シーケンス解析は Takara (Takara Bio, Inc., Shiga, Japan) に依頼した。ヒトの末梢血、大腸切片はヘルシンキ宣言を遵守しインフォームドコンセントを得て採取した。研究での使用は東北大学の倫理委員会によって承認された。

細胞培養

細胞は 37 °C、5 %CO₂ 濃度のインキュベーターで培養した。ヒト胎児腎細胞由来細胞株 HEK293T は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) から購入し、10 %ウシ胎児血清 (Biowest, Miami, FL, USA)、1 %ペニシリンーストレプ

トマイシン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma) で培養した。

変異型 TET2 強制発現ベクターの作成

HaloTag 付き TET2 発現ベクター (pFN21AB9898; Kazusa DNA Res. Inst. Kisarazu, Japan) を鋳型として Quik Change Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) を使用し変異型 TET2 強制発現ベクターを作成した。使用したプライマー配列は表 1 の通りである。コントロールベクター(pFN21A)、野生型 TET2 発現ベクター(pFN21A-野生型 TET2)、変異型 TET2 発現ベクター(pFN21A-変異型 TET2)を用いて、FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega, WI, USA) を使用し HEK293T 細胞に遺伝子導入した。24 時間後に細胞を回収し、ウェスタンブロッティングと 5-hmc の測定を行った。

5-hmc の測定

pFN21A、pFN21A-野生型 TET2、pFN21A-変異型 TET2 の各ベクターを用いて遺伝子導入した HEK293T 細胞を回収し、5-Hydroxymethylcytosine DNA ELISA kit (Enzo Life Sciences Inc., New York, USA) を用いて、添付のプロトコールに従い 5-hmc を enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 法で測定した。

マウス

C57BL/6J 系統の遺伝的背景である野生型マウスを日本クレア株式会社 (CLEA Inc., Tokyo, Japan)より購入した。Tet2 ノックダウンマウスは gene trap 法により、トラッピングベクターが Tet2 遺伝子の第 2 イントロンに挿入された Ayu17-449 マウス^{38,39}を使用した。Tet2 ノックダウンマウスは宮崎大学内科学講座消化器血液学分野、下田和哉先生より供与された。野生型、Tet2 ノックダウンマウスは、東北大学医学系研究科付属動物実験施設で維持した。全ての動物実験は東北大学によって許可された遺伝子組み換え実験計画および動物実験計画に基づいて行われた。

末梢血検査

マウス尾の先端を 0.5cm 程切断し、血液を滴下させマウス末梢血を採取した。動物用自動血球計数装置 (LC-152; Horiba, Ltd., Kyoto, Japan)にて、白血球数(white blood cell : WBC)、赤血球数(red blood cell : RBC)、ヘモグロビン濃度(hemoglobin : Hb)、ヘマトクリット(hematocrit : Ht)、平均赤血球容積(mean corpuscular : MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量(mean corpuscular hemoglobin : MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(mean corpuscular hemoglobin concentration : MCHC)、血小板数(platelet : Plt)を測定した。

生化学検査

頸静脈採血にてマウスの末梢血を採取した。4°Cで1時間静置した後、1200×g、10分間、4°Cで遠心し、上清を血清として分離した。オリエンタル酵母工業株式会社 (Oriental Yeast Co., Ltd. Tokyo, Japan) に依頼し、血清鉄、不飽和鉄結合能 (unsaturated iron binding capacity : UIBC)、総鉄結合能 (total iron binding capacity : TIBC) を測定した。いずれも直接比色法にて測定された。また、同様に分離した血清で血清フェリチンを Ferritin (FTL) Mouse ELISA Kit (Abcam, Cambridge, UK) を使用し、添付のプロトコールに従い測定した。

マウス骨髄細胞の採取

全ての操作を氷上にて行った。大腿骨および脛骨を摘出後、リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate Buffered Saline : PBS) に5%ウシ胎児血清を添加して調製した溶液が入ったシャーレにとり、23Gの注射針を装着した10mlシリンジ (Terumo, Tokyo, Japan) で骨髄を骨より洗い流し、細胞懸濁液にした。凝集細胞塊などを取り除くため、70 μ mセルストレイナー (Becton Dickinson : BD, Franklin Lakes, NJ, USA) に通し、骨髄細胞とした。

マウス骨髄 Ter119 陽性細胞の分離

マウスから骨髄細胞を15ml tube に採取し、300×g、10分間、4°Cで遠心した。上清を除去し、MACS Buffer (PBS、0.5%ウシ胎児血清、EDTA) で懸濁し、抗 Ter119

マイクロビーズ (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA)を添加して 15 分間、4°Cで静置した。その後、MACS Buffer 1ml で懸濁し、300×g、10 分間、4°Cで遠心した。上清を除去後、MACS Buffer 500 μl で懸濁し、40 μm セルストレイナー(BD)を通して、MultiStand に設置した LS カラム(Miltenyi Biotec)へ添加した。カラムを MACS Buffer 3ml で 3 回洗浄後、LS カラムを外し MACS Buffer 5ml を加えてシリンジで 15ml tube に押し出し Ter119 陽性細胞を得た。

プラスミド作成

リアルタイム PCR における対象遺伝子の転写量を定量的に測定するため、その標準となるプラスミドを作成した。PCR 反応により目的遺伝子の DNA 断片を作成し pGEM™-T Easy Vector (Promega)にクローニングした。

定量リアルタイム PCR

メッセンジャーRNA (messenger RNA : mRNA)を含む全 RNA は、NucleoSpin RNA XS (Takara)を用いて添付のプロトコールに従い抽出した。相補的 DNA (complementary DNA : cDNA)は ReverTra Ace qPCR RT Kit (Toyobo, Osaka, Japan)を用いて合成した。リアルタイム PCR は、Quantitect SYBR Green PCR master mix (QIAGEN, Valencia, CA, USA)を使用し、C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)上の CFX96 Real-Time system で測定

した。それぞれの転写量は、プラスミドコピー数で標準化し *18S* の mRNA 量で内部補正した。使用したプライマー配列は表 1 の通りである。

DNA メチル化解析

野生型、*Tet2*^{trap/+}、*Tet2*^{trap/trap} マウスの骨髄 Ter119 陽性細胞から NucleoSpin Tissue (Takara) を用いて、添付のプロトコールに従い DNA を抽出した。Methyl-CpG binding domain protein2 (MBD2) と磁気ビーズを利用した EpiXplore Methylated DNA Enrichment Kit (Takara) を用いて、添付のプロトコールに従い、DNA からさらにメチル化 DNA のみを濃縮させた。メチル化 DNA を用いて、定量リアルタイム PCR を施行した。SYBR Premix Ex Taq GC (Takara) を使用し、C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 上の CFX96 Real-Time system で測定した。各遺伝子の DNA メチル化レベルは、*Actb* 遺伝子のプロモーター部位の DNA メチル化レベルで補正した。使用したプライマー配列は表 1 の通りである。

ヘム濃度測定

野生型、*Tet2*^{trap/+}、*Tet2*^{trap/trap} マウスの骨髄 Ter119 陽性細胞を 1.5ml tube に 1×10^6 個/tube となるように回収し、遠心後上清を除去し、ペレットを液体窒素で凍結させ、測定用サンプルとした。ヘミン標準液を調製するため、まず 1mg/ml ヘミン

(Sigma)を 40%DMSO (Sigma)で希釈し 0、0.2、2、10、20、50ng/ μ l の濃度で調製した。段階希釈したヘミン調製液、各 5 μ l を 500 μ l の 2M シュウ酸 (Sigma)に懸濁し、0、1、10、50、100、250ng/tube の濃度で調製し、検量線サンプルとした。同様に測定用サンプルについても 500 μ l の 2M シュウ酸で懸濁して調製した。検量線サンプルと測定用サンプルは 100°Cで 30 分間熱処理を行い、ヘム鉄とプロトポルフィリンIXを分離した。その後、分光蛍光高度計 RF-5300PC (Shimadzu Co., Ltd. Kyoto, Japan)で励起光 400nm、蛍光 662nm にて吸光度を測定し、プロトポルフィリンIXの濃度を測定した。また、同様に熱処理を行わなかった測定用サンプルの吸光度も測定し、ヘム鉄から分離した以外の内在性のプロトポルフィリンIXの濃度と考え、熱処理後の測定用サンプルの測定値から引き、その値をヘム濃度として算出した⁴⁰。

ウェスタンブロッティング

細胞は、 1×10^7 個/ml になるようドデシル硫酸ナトリウム (SDS)サンプルバッファー(25mM Tris、pH 6.8、2% β -メルカプトエタノール、3% SDS、0.0005%ブロモフェノールブルー、5%グリコゲン)で溶解し 100°Cで 10 分間加熱処理した。 1×10^5 細胞分のサンプルをポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、蛋白質を Polyvinylidene fluoride (PDVF)膜 (Hybond-P、GE Healthcare)に転写し、一次抗体と室温で 1 時間、または 4°C で 1 晩反応させた。その後、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP: horse radish peroxidase)結合二次抗体と室温で反応させ、蛍光強度は、ECL-Prime (GE

Healthcare, Uppsala, Sweden)、CL-X Posure™Film (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて半定量的に測定した。

Prussian blue 染色

サイトスピンにて作成し急速に乾燥させた標本を 5 分間ホルマリン固定し、1 時間以上乾燥させた。その後 4%フェロシアン化カリウム溶液 (Sigma)と 1.2 mol/L 塩酸 (Sigma)を同量混合して鉄染色溶液を作成し標本に載せ、湿潤箱で 1 時間静置した。水道水で洗浄した後、50ml の MilliQ 水に 1ml のパラロザニリン溶液 (Sigma)を加えて調製した染色液を標本に載せ、5 分間静置し水道水で洗浄した。

抗体

TET2 (ab94580)は Abcam から、HaloTag (G9281)は Promega から、Mitochondrial ferritin (M-60)、goat anti-rabbit IgG HRP (sc-2004)、goat anti-mouse IgG HRP (sc-2005)は、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)から、 α -tubulin (CP06)は、Calbiochem (Darmstadt, Germany)からそれぞれ購入した。FITC (Fluorescein isothiocyanate)-labeled CD71、PE (Phycoerythrin)-labeled TER-119/Erythroid cells は BD Bioscience (BD Biosciences, Bedford, MA, USA)から購入した。

フローサイトメトリー

マウスから骨髄細胞を採取し、FITC 標識抗 CD71 抗体、PE 標識抗 Ter119 抗体で染色後、蛍光強度は BD Canto II (BD)を用いて測定した。ソーティングは、FACS Aria II (BD)を用いて行った。結果は FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA)を用いて解析した。

統計解析

統計解析には Student の t 検定 (両側検定)を用いた。P 値が 0.05 未満を統計学的有意とした。

5. 研究結果

先天性鉄芽球性貧血の新規原因遺伝子候補の同定

初めに既知の原因遺伝子に変異が認められなかった先天性鉄芽球性貧血患者の家系について全エクソンシーケンス解析を行い、原因遺伝子の同定を試みた。シノニマス(サイレント)変異、in house 一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism : SNP) に登録されているもの、dbSNP131 に登録されているものを除外し、ミトコンドリアの機能及びヘム・鉄代謝への関連が示唆される遺伝子から候補遺伝子を抽出した。その結果、解析した 7 家系のうち 3 家系で新たな候補遺伝子が同定された。家系 1 から同定された遺伝子は *APEX2* 遺伝子⁴¹ で 1160 番目のグアニンがチミンに変換し 387 番目のセリンがイソロイシンになるミスセンス変異が認められた(図 1A)。家系 5 からは *NDUFV1* 遺伝子⁴² で、736 番目のチミンがシトシンに変換し 246 番目のアルギニンがシステインになるミスセンス変異であった(図 2A)。家系 6 からは *SLC39A8* 遺伝子⁴³ で 79 番目のシトシンがアデニンに変換し 27 番目のロイシンがイソロイシンになるミスセンス変異であった(図 3A)。*APEX2* はミトコンドリアに局在し、DNA の塩基除去修復機構に関与する^{44,45}。*NDUFV1* は電子伝達系の呼吸鎖 I を構成しておりミトコンドリア病の原因遺伝子の一つである^{46,47}。*SLC39A8* は亜鉛輸送体に属する遺伝子で鉄を含む二価の金属トランスポーターである³⁹。いずれもミトコンドリアの機能及び鉄代謝への関連が報告されている遺伝子で、今後変異による機能変化について確認が必要である。

後天性鉄芽球性貧血 RCMD-RS 症例で認められた *ALAS2* と *TET2* の複合変異

後天性鉄芽球性貧血患者についても、全エクソンシーケンス解析を施行したところ、MDS-RS で認められる主要な変異遺伝子である、*SF3B1* 遺伝子に変異が認められない RCMD-RS 症例において、先天性鉄芽球性貧血の原因遺伝子である *ALAS2* 遺伝子のヘテロ変異と *TET2* 遺伝子のヘテロ変異を有する症例が認められた。*ALAS2* 変異は 503 番目のグアニンがアデニンに変換し 170 番目のアルギニンがヒスチジンになるミスセンス変異であり(図 4A)、*TET2* 変異は 4393 番目のシトシンがチミンに変換し 1465 番目のアルギニンが終止コドンになるナンセンス変異であった(図 4B)。シーケンス解析の結果、*ALAS2* 変異は生殖細胞変異(図 4A)、*TET2* 変異は体細胞変異であった(図 4B)。

RCMD-RS で認められた *TET2* 変異は機能低下型変異である。

ALAS2 のヘテロ変異のみでは通常鉄芽球性貧血は発症しないと考えられており、*TET2* 変異が赤血球系細胞における鉄代謝に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられる。本症例で認められた *TET2* 変異は、C 末端側の酵素活性を担うドメイン中の変異であり(図 6A)、AML で既に報告されているが³²、変異による機能変化についての検討はなされていない。そこでまず、この *TET2* 変異による機能変化について *in vitro* で検討した。pFN21A、pFN21A-野生型 *TET2*、pFN21A-変異型 *TET2* の 3 つのベクターをそれぞれ HEK293T 細胞に感染させ、24 時間後に細胞を回収し、抗

HaloTag 抗体、抗 TET2 抗体を使用し、ウエスタンブロッティングにてタンパクの発現を確認した。結果は予想通り pFN21A-変異型 TET2 サンプルでは pFN21A-野生型 TET2 サンプルに比べ、早期ストップコドンの影響でサイズの小さいタンパクの発現が認められた(図 6B、6C)。また、遺伝子導入後の HEK293T 細胞を用いて、5 - hmc の発現を ELISA 法で測定した。その結果、pFN21A-変異型 TET2 サンプルでは pFN21A-野生型 TET2 サンプルに比べ有意に 5 - hmc の発現が低下しており(図 6D)、今回認められた *TET2* 変異は、TET2 の酵素活性を低下させる機能低下型変異であることが分かった。

赤血球系細胞の分化過程における Tet2 遺伝子の発現変化

野生型マウスの骨髄細胞をフローサイトメトリーにて赤血球系細胞の表面マーカーであるトランスフェリン受容体(Transferrin receptor: CD71)と Ter119 で展開し、赤血球系細胞の分化段階を I から IV の 4 つの分画に分け、各分画にてソーティングを施行した(図 7A)。各分画について、I は CD71^{high}Ter119^{med}(前赤芽球)、II は CD71^{high}Ter119^{high}(好塩基性赤芽球)、III は CD71^{med}Ter119^{high}(好塩基性から多染性赤芽球)、IV は CD71^{low}Ter119^{high}(正染性赤芽球)を示す⁴⁸。赤血球系細胞 I から IV の各分画の細胞を使用し定量リアルタイム PCR を施行すると、*Tet2* mRNA の発現は赤血球系細胞分画 I で高値であり、以降は発現が低下した(図 7B)。ただし、赤血球系細胞分画 II、III では I と比較すると *Tet2* の発現は低下するものの、分化後期でも一

定レベルの発現は保たれていることが分かった。また、 β -globin、*Hmox-1* は赤血球分化に伴い発現が上昇していることを確認した(図 7B)。

Tet2 ノックダウンマウスにおける血球計数と鉄関連データの変化

次に Tet2 遺伝子改変マウスを用いて、Tet2 の赤血球造血における機能を明らかにすることとした。初めに 16 週齢マウスの血球計数を解析したところ、Tet2 ノックダウンマウスは野生型マウスと比べて赤血球数、ヘモグロビン値の低下を認め軽度の貧血を呈した。平均赤血球容積値(MCV)は野生型マウスと差は認められなかったが、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)は低下しており Tet2 ノックダウンマウスは低色素性貧血の傾向を認めた。白血球数は既知の報告³⁸と同様に Tet2 ノックダウンマウスで有意に増加していた。また、Tet2 ノックダウンマウスでは血清鉄、血清フェリチンが増加し、特に Tet2^{trap/trap} マウスでは不飽和鉄結合能も低下していることから鉄過剰状態となり何らかの鉄代謝異常を示す結果と考えられた(表 3)。

Tet2 ノックダウンマウス骨髄における赤血球系細胞数の変化

野生型、Tet2^{trap/+}、Tet2^{trap/trap} マウスの骨髄細胞をフローサイトメトリーにて CD71 と Ter119 で展開し、赤血球系細胞分画 I から IV に分けた。Tet2 ノックダウンマウスの赤血球系細胞では、I、II 期の前期赤芽球系細胞の割合は野生型マウスとほぼ変わらないが、III 期以降の後期赤芽球系細胞数が低下する傾向を認めた(図 8A、8B)。こ

の結果は TET2 作用の低下は赤血球分化、特に後期赤芽球系細胞の分化に影響を与え、TET2 が赤血球の分化にも関与する³⁷ という報告を支持するものと考えられた。

Tet2 ノックダウンマウスの赤血球系細胞における *Hmox-1*、*Fech*、*Abcb7*、*Sf3b1* の発現

骨髄 Ter119 陽性細胞を用いた定量リアルタイム PCR にて、Tet2 ノックダウンマウスでは赤血球系細胞においても *Tet2* が低下していることを確認した(図 9A)。次に、ヘム合成や鉄代謝に関わる遺伝子の発現を確認したところ、Tet2 ノックダウンマウスでは *Hmox-1*、*Fech* の発現低下を認めた(図 9C、9E)。HMOX-1 はヘム分解酵素であり⁴⁹、また、*Hmox-1* の発現はヘム量に依存して発現が変化することが報告されており⁵⁰、Tet2 ノックダウンマウスでヘム合成量が低下している可能性が考えられた。

FECH は protoporphyrin IX (PPIX) に二価鉄を挿入するヘム合成の最終段階を担う遺伝子であることから⁵¹、Tet2 ノックダウンマウスでは *Fech* の発現低下によりヘム合成が阻害され、*Hmox-1* の発現が低下した可能性が考えられた。また、*Fech* の発現との関連性が考慮される遺伝子の発現変化として、mitochondrial iron transporter 1 (*Mfrn1*)、ATP-binding cassette, sub-family B, member 10 (*Abcb10*) の発現が Tet2^{trap/trap} マウスで上昇していた(図 9L、9M)。Fech は赤血球系細胞のヘム合成において、Mfrn1、Abcb10 とオリゴマー複合体を形成していることが報告されている⁵²。これらの結果から *Fech* の発現低下が、*Mfrn1*、*Abcb10* の発現にも何らかの影響

を与えている可能性が考えられた。

加えて、Tet2 ノックダウンマウスでは、ATP - binding cassette, subfamily B, member 7(*Abcb7*)、*Sf3b1* の発現が低下していた(図 9G、9H)。ABCB7 は先天性鉄芽球性貧血の原因遺伝子の一つで^{9,53}、鉄 - 硫黄クラスターのミトコンドリアからの排出を担うトランスポーターである⁵⁴⁻⁵⁶。ABCB7 の機能低下は、鉄・硫黄クラスターの障害を招き、鉄の利用障害からヘム合成を阻害する可能性が考えられている⁵⁷。よって、Tet2 ノックダウンマウスにおける *Abcb7* の発現低下も、Tet2 ノックダウンマウスにおけるヘム合成障害に関与する一つの因子である可能性が考えられた。

また、Tet2 ノックダウンマウスでは、赤血球系細胞内で鉄動態に関与する遺伝子である Transferrin receptor 1(*TfR1*)、STEAP family member 3(*Steap3*)、divalent metal transporter 1(*Dmt1*) の発現は上昇していた(図 9I、9J、9K)。血清中の鉄は三価鉄の形でトランスフェリン(Tf)に結合して運ばれ、*TfR1* を介して細胞内に取り込まれる^{58,59}。*Steap3* は *TfR1* を介しエンドサイトーシスにて取り込まれた三価鉄を二価鉄に還元する^{60,61}。*Dmt1* はエンドソーム内から細胞質への鉄の排出に関わる遺伝子で、ミトコンドリアへの二価鉄の供給を行う^{62,63}。Tet2 ノックダウンマウスでは *TfR1*、*Steap3*、*Dmt1* の発現が上昇しており、赤血球系細胞で鉄が過剰になり、鉄動態が変化していることが推測された。

一方、赤血球分化に必須である *Gata1*^{64,65} やヘム合成に必要なグリシンのミトコンドリアへの輸送を担う solute carrier family 25, member 38(*Slc25a38*)¹¹ については

Tet2 ノックダウンマウスにおいて変化は認められなかった(図 9D、9F)。

Tet2 ノックダウンマウスの赤血球系細胞における鉄芽球性貧血関連遺伝子プロモーター領域のメチル化解析

Ter119 陽性細胞を用いた定量リアルタイム PCR の結果より Tet2 ノックダウンマウスで発現が低下していた *Fech*、*Abcb7*、*Sf3b1* の 3 遺伝子についてプロモーター部位の CpG 配列におけるメチル化について検討した。マウス骨髄 Ter119 陽性細胞の DNA からさらにメチル化された DNA のみを濃縮させ、各遺伝子のプロモーター部位の CpG 配列で作製したプライマーを用いて定量 PCR を施行した。Tet2 ノックダウンマウスでは野生型マウスに比べ、いずれの遺伝子の CpG 配列もよりメチル化されている傾向を認めた(図 10A、10B、10C)。この結果より、Tet2 ノックダウンマウスの Ter119 陽性細胞における *Fech*、*Abcb7*、*Sf3b1* の mRNA レベルでの発現低下には、各遺伝子のプロモーター部位の CpG 配列のより高度なメチル化が関与していることが示唆された。

Tet2 ノックダウンマウスの赤血球系細胞におけるヘム濃度

Tet2^{trap/trap} マウスの骨髄 Ter119 陽性細胞では、野生型マウスと比較してヘム濃度が低下していた(図 11)。これは Tet2 ノックダウンマウスの末梢血でヘモグロビン値が低下していた(表 3)ことや、骨髄 Ter119 陽性細胞を用いた定量リアルタイム PCR で

Hmox-1 mRNA の発現が低下していた(図 9C)ことと矛盾しない結果であった。

Tet2 ノックダウンマウスの赤血球系細胞におけるミトコンドリアフェリチンの発現

ミトコンドリアフェリチンは、ミトコンドリアにおける鉄貯蔵に関わる遺伝子であり、その発現は、鉄芽球性貧血の鉄芽球細胞で増加していることが報告されている⁶⁶⁻⁶⁸。また、マウスにおいても発現が認められている⁶⁹。マウスの骨髄 Ter119 陽性細胞を用いてウエスタンブロッティングを施行しミトコンドリアフェリチンのタンパク発現量を検討した所、野生型マウスと比較し、Tet2 ノックダウンマウスでより発現が増加し、Tet2^{trap/trap} マウスではその傾向が顕著であった(図 12)。この結果より、Tet2 ノックダウンマウスの骨髄中の赤血球系細胞のミトコンドリアにて鉄が蓄積する傾向にあることが示唆された。

Tet2 ノックダウンマウスの骨髄における鉄芽球比率

野生型、Tet2^{trap/+}、Tet2^{trap/trap} マウスの骨髄細胞にて標本を作製し Prussian blue 染色にて鉄芽球細胞をカウントした。鉄芽球は International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome(IWGM-MDS)⁷⁰にて提唱されている定義に基づいて分類した。type1 は細胞内に鉄顆粒を 5 個未満認める、type2 は鉄顆粒が 5 個以上あるが分布が核周囲にはない、type3 は鉄顆粒が 5 個以上あり核周囲 1/3 以上を占めるとし、type3 を環状鉄芽球とした。Tet2 ノックダウンマウスでの明らかな

環状鉄芽球の増加は認められなかったが、type1 の鉄芽球は野生型マウスと比較し増加していた(表 4)。Tet2^{trap/trap} マウスの骨髄で認められた type1、2、3 の代表的な鉄芽球を示す(図 13)。

6. 考察

今回の研究で赤血球系細胞における **TET2** の機能低下が、ヘム合成障害および鉄利用障害による鉄過剰の病態を引き起こすことが明らかとなった。**TET2** が赤血球系細胞におけるヘム合成や鉄代謝に関わることを示した研究は本研究が初めてである。

Tet2 ノックダウンマウスで認められた、鉄過剰の所見や赤血球系細胞における一連のヘム、鉄代謝の変化は後天性鉄芽球性貧血の病態との関連性を示唆するものである。

MDS-RS では *SF3B1* 等のスプライシングに関与する遺伝子変異が高頻度で認められるが¹⁵⁻¹⁷、現在のところ具体的な発症のメカニズムについては明らかになっていない。**TET2** 変異は造血器腫瘍、特に骨髄系腫瘍で多く認められることが報告されており、**MDS** でも高率に認められる²⁶⁻²⁸。しかし、現在までのところ、**MDS-RS** 症例で **TET2** 変異が多く認められるといった報告はない。一方、**TET2** 変異が認められる造血器腫瘍の臨床像については、高齢者に多く認められ、**AML** では白血球数や骨髄芽球の数は増加する傾向にあるが、ヘモグロビン値や血小板数については、変異を認めない症例と比べ差がないとされる^{32,33}。今回の解析では **Tet2** ノックダウンマウスの血液学的データの検討も行ったが、**Tet2** ノックダウンマウスでは白血球数の増加を認め、貧血も軽度にとどまっていた(表 3)。さらに **Tet2** ノックダウンマウスの骨髄にて明らかな環状鉄芽球の増加は認めなかったことから、**TET2** 変異のみで鉄芽球性貧血の発症に至るということは考えづらい。しかし、**MDS** は無効造血や定期的な輸血により鉄負荷のかかる症例が多く、これらの症例においては **TET2** 変異による鉄代謝異

常の影響が出やすくなる可能性がある。実際に、*Tet2* ノックダウンマウスの骨髄では *type1* の鉄芽球は増加しており(表 4)、また鉄貯蔵蛋白質であるミトコンドリアフェリチンの発現も増加していることから(図 12)、*Tet2* ノックダウンマウスでは鉄利用障害により鉄過剰になっていることが示唆された。これらの結果より、今回シーケンス解析を施行した RCMD-RS 症例にて鉄芽球性貧血の発症に至った原因については、*TET2*変異に加えて *ALAS2*変異のヘテロ変異を有していた点を考慮せざるを得ない。通常 *ALAS2*のヘテロ変異のみでは鉄芽球性貧血の発症には至らないと考えられており 4、また、単純な *TET2*変異のみでは鉄過剰状態にとどまるということを考えると、本症例においては二つの遺伝子変異が相加的に影響し鉄芽球性貧血の発症に至ったと推測することができる。この可能性を証明するために、*Alas2* ヘテロノックアウトマウスと *Tet2* ノックダウンマウスを掛け合わせ、その骨髄を評価したが、鉄芽球の増加は認められなかった(結果未発表)。この原因の一つとしては、*Alas2* ヘテロノックアウトマウスでは、*lyonization* によって *Alas2* ノックアウトアレルが活性化した赤血球系細胞は分化できず、正常アレルが活性化した赤血球系細胞のみが存在していたためと考えられる。今後、遺伝子編集により *Alas2*変異を導入したマウスを作成し検証する予定である。

TET2 の造血に関する機能解析では、*Tet2* ノックアウトマウスの骨髄で LSK(Lin⁻c-Kit⁺Sca1⁺)、LK(Lin⁻c-Kit⁺Sca1⁻)細胞など造血幹細胞、前駆細胞の増加を認め、*Tet2* ノックアウトマウス由来の LSK 細胞ではコロニーアッセイで自己複製能

の亢進を認めることが報告されている³⁴。また、*in vitro*において Tet2 ノックアウトマウス由来の LSK 細胞では、単球、マクロファージ系への分化が促進される³⁶など、TET2 が造血幹細胞の維持や分化に重要な役割を果たしていることが示されている。その他、Tet2 ノックアウトマウスでリンパ球の分化異常が認められるといった報告もあり²⁹、TET2 が骨髄球系、リンパ球系細胞の正常な分化に関与していることが明らかになっている。TET2 の赤血球造血に関する機能については、健常人由来の CD34 陽性細胞で TET2 の発現を低下させると、CFU - G/GM のコロニー数が増加する一方で、BFU-E の数とサイズが減少したとの報告がある³⁷。本研究でも Tet2 ノックダウンマウスの骨髄細胞にて野生型マウスと比較し、後期赤芽球系細胞の数が減少する傾向を認め(図 8A、8B)、Tet2 ノックダウンマウスの骨髄で赤血球の分化が阻害されていることが示唆され、TET2 遺伝子が赤血球の分化に関与していることが示された。

また、今回の解析では Tet2 ノックダウンマウス赤血球系細胞でヘム合成や鉄動態に関する遺伝子の発現が変化している事が明らかとなった。発現が低下していた遺伝子は *Hmox-1*(図 9C)、*Fech*(図 9E)、*Abcb7*(図 9G)、*Sf3b1*(図 9H)、発現が上昇していた遺伝子は *TfR1*(図 9I)、*Steap3*(図 9J)、*Dmt1*(図 9K)、*Mfrn1*(図 9L)、*Abcb10*(図 9M)であった。FECH はヘム合成の最終段階を担う遺伝子であり、ヘム合成に直接影響を与えるため、Tet2 ノックダウンマウスでの *Fech* の発現低下はヘム合成障害の一因となりうる。実際に Tet2 ノックダウンマウスでの赤血球系細胞ではヘム量が低下しており(図 11)、このヘム量の低下が *Hmox-1* の発現低下を誘導しているものと考え

えられる。Tet2 ノックダウンマウスで発現が低下していた *Abcb7* は、鉄・硫黄クラスターのミトコンドリアから細胞質への輸送を担う遺伝子であり、その変異により先天性鉄芽球性貧血が発症することが明らかとなっている。また、SF3B1 については鉄動態における機能は明らかになっていないが、MDS-RS の 80% 近くに変異が認められ、その発症に深く関与していることが示唆されている遺伝子である。in vitro の解析で SF3B1 の発現低下が ABCB7 の発現低下を招くという報告もあり、SF3B1 の作用低下によるスプライシング異常が ABCB7 の発現低下に関係しているのではないかと考えられている⁵³。今回の定量リアルタイム PCR の結果でもこの 2 つの遺伝子はともに低下しており、相互に関係している可能性が示唆された。さらに、*Abcb7* と *Fech* が赤血球系細胞でのヘム合成において、パラレルに発現が変動するとの報告もあるが⁷¹、Tet2 ノックダウンマウスでは *Abcb7* と *Fech* の発現はともに低下しており、ヘム合成系に関与するこの 2 つの遺伝子発現についても相互に関わりがある可能性が示唆された。また、ヘム合成に利用される鉄動態については、まず血清中の鉄が三価鉄の形態でトランスフェリンと結合し輸送され、TfR1 を介してエンドサイトーシスの機構で赤血球系細胞内に取り込まれる。TfR1、またエンドソーム内で三価鉄を還元する酵素である Steap3、エンドソーム内から細胞質に二価鉄を輸送する Dmt1 はいずれも、Tet2^{trap/trap} マウスで発現が上昇していたことから、Tet2 ノックダウンマウスの赤血球系細胞内では鉄輸送に関わる一連の遺伝子の発現が変化し、結果的に鉄が多く供給され過剰になることが考えられた。このように Tet2 ノックダウンマウス

ではヘム合成や鉄代謝に関わる多くの遺伝子の発現が変化していることが示された。これは、TET2 遺伝子がヘム合成や鉄代謝に幅広く関与していることを示唆する結果であった。

この一連の遺伝子の発現変化について、本研究では TET2 の DNA の脱メチル化作用に着目した。Tet2 ノックダウンマウスで発現が低下していた *Fech*、*Abcb7*、*Sf3b1* の 3 遺伝子についてプロモーター領域のメチル化の解析を行ったところ、3 遺伝子ともプロモーター部位の CpG 配列において、野生型マウスより Tet2 ノックダウンマウスでは高度にメチル化されていた。これは、TET2 の作用低下によりプロモーター部位でメチル化が集積され、遺伝子の発現低下をもたらしたと考えられ、遺伝子の発現低下は Tet2 の直接的な作用であることが示唆された。これまで癌細胞ではがん抑制遺伝子をはじめ多くの遺伝子がメチル化の影響を受けていることが報告されている^{72,73}。今回の解析結果より、生体内の TET2 によるメチル化、脱メチル化制御機構は、腫瘍関連遺伝子のみならず、ヘム合成や鉄代謝といった領域にも及ぶ可能性があると考えられた。このメチル化の傾向が特定の遺伝子に起きている理由については現時点では明らかではなく、今後の解析が必要であるが、ヘム合成や鉄代謝機構についてメチル化、脱メチル化によるエピジェネティックな遺伝子制御が関与しているという点は重要な知見であると考えられる。

7. 結論

本研究から TET2 の作用低下は生体内でヘム合成障害や鉄過剰を引き起こすことが示された。これは TET2 が赤血球分化だけでなく、赤血球造血においても重要な役割を持つという新たな機能の一面を示唆する結果となった。そして、生体内での TET2 の作用低下は赤血球系細胞での正常なヘム合成や鉄動態を変化させ、後天性鉄芽球性貧血の病態形成に関与している可能性が示唆された。

8. 文献

1. Alcindor T, Bridges KR. Sideroblastic anaemias. *Br J Haematol.* 2002;116(4):733-743.
2. Malcovati L, Cazzola M. Refractory anemia with ring sideroblasts. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2013;26(4):377-385.
3. Cazzola M, Invernizzi R. Ring sideroblasts and sideroblastic anemias. *Haematologica.* 2011;96(6):789-792.
4. Harigae H, Furuyama K. Hereditary sideroblastic anemia: pathophysiology and gene mutations. *Int J Hematol.* 2010;92(3):425-431.
5. Cotter PD, Rucknagel DL, Bishop DF. X-linked sideroblastic anemia: identification of the mutation in the erythroid-specific delta-aminolevulinate synthase gene (ALAS2) in the original family described by Cooley. *Blood.* 1994;84(11):3915-3924.
6. Harigae H, Suwabe N, Weinstock PH, et al. Deficient heme and globin synthesis in embryonic stem cells lacking the erythroid-specific delta-aminolevulinate synthase gene. *Blood.* 1998;91(3):798-805.
7. Ohba R, Furuyama K, Yoshida K, et al. Clinical and genetic characteristics of congenital sideroblastic anemia: comparison with myelodysplastic syndrome with ring sideroblast (MDS-RS). *Ann Hematol.* 2013;92(1):1-9.

8. Camaschella C, Campanella A, De Falco L, et al. The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload. *Blood*. 2007;110(4):1353-1358.
9. Allikmets R, Raskind WH, Hutchinson A, Schueck ND, Dean M, Koeller DM. Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A). *Hum Mol Genet*. 1999;8(5):743-749.
10. Pearson HA, Lobel JS, Kocoshis SA, et al. A new syndrome of refractory sideroblastic anemia with vacuolization of marrow precursors and exocrine pancreatic dysfunction. *J Pediatr*. 1979;95(6):976-984.
11. Guernsey DL, Jiang H, Campagna DR, et al. Mutations in mitochondrial carrier family gene SLC25A38 cause nonsyndromic autosomal recessive congenital sideroblastic anemia. *Nat Genet*. 2009;41(6):651-653.
12. Bykhovskaya Y, Casas K, Mengesha E, Inbal A, Fischel-Ghodsian N. Missense mutation in pseudouridine synthase 1 (PUS1) causes mitochondrial myopathy and sideroblastic anemia (MLASA). *Am J Hum Genet*. 2004;74(6):1303-1308.
13. Bergmann AK, Campagna DR, McLoughlin EM, et al. Systematic molecular genetic analysis of congenital sideroblastic anemia: evidence for genetic

heterogeneity and identification of novel mutations. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;54(2):273-278.

14. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002;100(7):2292-2302.

15. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boulton J, et al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N Engl J Med*. 2011;365(15):1384-1395.

16. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011;478(7367):64-69.

17. Visconte V, Makishima H, Jankowska A, et al. SF3B1, a splicing factor is frequently mutated in refractory anemia with ring sideroblasts. *Leukemia*. 2012;26(3):542-545.

18. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. 2009;324(5929):930-935.

19. Ko M, Huang Y, Jankowska AM, et al. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature*. 2010;468(7325):839-843.

20. Koh KP, Yabuuchi A, Rao S, et al. Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse

embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2011;8(2):200-213.

21. Ponnaluri VK, Maciejewski JP, Mukherji M. A mechanistic overview of TET-mediated 5-methylcytosine oxidation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;436(2):115-120.

22. Solary E, Bernard OA, Tefferi A, Fuks F, Vainchenker W. The Ten-Eleven Translocation-2 (TET2) gene in hematopoiesis and hematopoietic diseases. *Leukemia*. 2014;28(3):485-496.

23. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999;99(3):247-257.

24. Jones PA, Liang G. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat Rev Genet*. 2009;10(11):805-811.

25. Chen T, Hevi S, Gay F, et al. Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells. *Nat Genet*. 2007;39(3):391-396.

26. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*. 2010;18(6):553-567.

27. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*. 2009;360(22):2289-2301.

28. Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet.* 2009;41(7):838-842.
29. Quivoron C, Couronné L, Della Valle V, et al. TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell.* 2011;20(1):25-38.
30. Malcovati L, Papaemmanuil E, Ambaglio I, et al. Driver somatic mutations identify distinct disease entities within myeloid neoplasms with myelodysplasia. *Blood.* 2014;124(9):1513-1521.
31. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 2014;28(2):241-247.
32. Chou WC, Chou SC, Liu CY, et al. TET2 mutation is an unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics. *Blood.* 2011;118(14):3803-3810.
33. Metzeler KH, Maharry K, Radmacher MD, et al. TET2 mutations improve the new European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol.* 2011;29(10):1373-1381.
34. Moran-Crusio K, Reavie L, Shih A, et al. Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell.* 2011;20(1):11-24.

35. Li Z, Cai X, Cai CL, et al. Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies. *Blood*. 2011;118(17):4509-4518.
36. Ko M, Bandukwala HS, An J, et al. Ten-Eleven-Translocation 2 (TET2) negatively regulates homeostasis and differentiation of hematopoietic stem cells in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(35):14566-14571.
37. Pronier E, Almire C, Mokrani H, et al. Inhibition of TET2-mediated conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine disturbs erythroid and granulomonocytic differentiation of human hematopoietic progenitors. *Blood*. 2011;118(9):2551-2555.
38. Shide K, Kameda T, Shimoda H, et al. TET2 is essential for survival and hematopoietic stem cell homeostasis. *Leukemia*. 2012;26(10):2216-2223.
39. Tang H, Araki K, Li Z, Yamamura K. Characterization of Ayu17-449 gene expression and resultant kidney pathology in a knockout mouse model. *Transgenic Res*. 2008;17(4):599-608.
40. Fujiwara T, Alqadi YW, Okitsu Y, et al. Role of transcriptional corepressor ETO2 in erythroid cells. *Exp Hematol*. 2013;41(3):303-315.e301.
41. Hadi MZ, Wilson DM. Second human protein with homology to the Escherichia coli abasic endonuclease exonuclease III. *Environ Mol Mutagen*.

2000;36(4):312-324.

42. Ali ST, Duncan AM, Schappert K, et al. Chromosomal localization of the human gene encoding the 51-kDa subunit of mitochondrial complex I (NDUFV1) to 11q13. *Genomics*. 1993;18(2):435-439.

43. Dalton TP, He L, Wang B, et al. Identification of mouse SLC39A8 as the transporter responsible for cadmium-induced toxicity in the testis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(9):3401-3406.

44. Demple B, Herman T, Chen DS. Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: definition of a family of DNA repair enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(24):11450-11454.

45. Memisoglu A, Samson L. Base excision repair in yeast and mammals. *Mutat Res*. 2000;451(1-2):39-51.

46. Bénit P, Chretien D, Kadhom N, et al. Large-scale deletion and point mutations of the nuclear NDUFV1 and NDUF51 genes in mitochondrial complex I deficiency. *Am J Hum Genet*. 2001;68(6):1344-1352.

47. Marin SE, Mesterman R, Robinson B, Rodenburg RJ, Smeitink J, Tarnopolsky MA. Leigh syndrome associated with mitochondrial complex I deficiency due to novel mutations in NDUFV1 and NDUF52. *Gene*. 2013;516(1):162-167.

48. Socolovsky M, Nam H, Fleming MD, Haase VH, Brugnara C, Lodish HF. Ineffective erythropoiesis in *Stat5a*^(-/-)*5b*^(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood*. 2001;98(12):3261-3273.
49. Maines MD. The heme oxygenase system: update 2005. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7(11-12):1761-1766.
50. Garcia-Santos D, Schranzhofer M, Horvathova M, et al. Heme oxygenase 1 is expressed in murine erythroid cells where it controls the level of regulatory heme. *Blood*. 2014;123(14):2269-2277.
51. Ajioka RS, Phillips JD, Kushner JP. Biosynthesis of heme in mammals. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1763(7):723-736.
52. Chen W, Dailey HA, Paw BH. Ferrochelatase forms an oligomeric complex with mitoferrin-1 and Abcb10 for erythroid heme biosynthesis. *Blood*. 2010;116(4):628-630.
53. Nikpour M, Scharenberg C, Liu A, et al. The transporter ABCB7 is a mediator of the phenotype of acquired refractory anemia with ring sideroblasts. *Leukemia*. 2013;27(4):889-896.
54. Shimada Y, Okuno S, Kawai A, et al. Cloning and chromosomal mapping of a novel ABC transporter gene (*hABC7*), a candidate for X-linked sideroblastic anemia with spinocerebellar ataxia. *J Hum Genet*. 1998;43(2):115-122.

55. Kispal G, Csere P, Prohl C, Lill R. The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J.* 1999;18(14):3981-3989.
56. Lill R, Kispal G. Mitochondrial ABC transporters. *Res Microbiol.* 2001;152(3-4):331-340.
57. Pondarre C, Campagna DR, Antiochos B, Sikorski L, Mulhern H, Fleming MD. Abcb7, the gene responsible for X-linked sideroblastic anemia with ataxia, is essential for hematopoiesis. *Blood.* 2007;109(8):3567-3569.
58. Kühn LC, McClelland A, Ruddle FH. Gene transfer, expression, and molecular cloning of the human transferrin receptor gene. *Cell.* 1984;37(1):95-103.
59. Schneider C, Owen MJ, Banville D, Williams JG. Primary structure of human transferrin receptor deduced from the mRNA sequence. *Nature.* 1984;311(5987):675-678.
60. Ohgami RS, Campagna DR, Greer EL, et al. Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat Genet.* 2005;37(11):1264-1269.
61. Ohgami RS, Campagna DR, McDonald A, Fleming MD. The Steap proteins are metalloreductases. *Blood.* 2006;108(4):1388-1394.
62. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, et al. Cloning and characterization

of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*. 1997;388(6641):482-488.

63. Lam-Yuk-Tseung S, Gros P. Distinct targeting and recycling properties of two isoforms of the iron transporter DMT1 (NRAMP2, Slc11A2). *Biochemistry*. 2006;45(7):2294-2301.

64. Tsai SF, Martin DI, Zon LI, D'Andrea AD, Wong GG, Orkin SH. Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. *Nature*. 1989;339(6224):446-451.

65. Ferreira R, Ohneda K, Yamamoto M, Philipsen S. GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Mol Cell Biol*. 2005;25(4):1215-1227.

66. Levi S, Arosio P. Mitochondrial ferritin. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(10):1887-1889.

67. Drysdale J, Arosio P, Invernizzi R, et al. Mitochondrial ferritin: a new player in iron metabolism. *Blood Cells Mol Dis*. 2002;29(3):376-383.

68. Cazzola M, Invernizzi R, Bergamaschi G, et al. Mitochondrial ferritin expression in erythroid cells from patients with sideroblastic anemia. *Blood*. 2003;101(5):1996-2000.

69. Santambrogio P, Biasiotto G, Sanvito F, Olivieri S, Arosio P, Levi S.

Mitochondrial ferritin expression in adult mouse tissues. *J Histochem Cytochem.* 2007;55(11):1129-1137.

70. Mufti GJ, Bennett JM, Goasguen J, et al. Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. *Haematologica.* 2008;93(11):1712-1717.

71. Taketani S, Kakimoto K, Ueta H, Masaki R, Furukawa T. Involvement of ABC7 in the biosynthesis of heme in erythroid cells: interaction of ABC7 with ferrochelatase. *Blood.* 2003;101(8):3274-3280.

72. Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylation. *Hum Mol Genet.* 2007;16 Spec No 1:R50-59.

73. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med.* 2003;349(21):2042-2054.

9. 表

表 1. 本研究で用いたプライマー

Primers	Direction	Sequence (5'→3')	Assay
<i>Tet2</i>	Forward	TCTCAGGAGTCACTGCATGTTT	RT-qPCR
	Reverse	TTAGCTCCGACTTCTCGATTG	
<i>Hmox-1</i>	Forward	AAGAGGCTAAGACCGCTTC	
	Reverse	GCATAAATCCCCTGCCCAC	
<i>β-Globin</i>	Forward	TTTAACGATGGCCTGAATCACTT	
	Reverse	CAGCACAATCACGATCATATTGC	
<i>Alas2</i>	Forward	CCATCTTAAGGCAACCAAGGC	
	Reverse	ACAGCATGAAAGGACAATGGC	
<i>Gata1</i>	Forward	GGCCCAAGAAGCGAATGATT	
	Reverse	GGTTCACCTGATGGAGCTTGA	
<i>Fech</i>	Forward	TGGAGCACAATCGACAGGTG	
	Reverse	AACAGACATCGGCAGGGAGT	
<i>Mfrn1</i>	Forward	CATGACAGCGGGAGCGAT	
	Reverse	GGCTTTGGGATCTGGATTCA	
<i>Abcb7</i>	Forward	TTACAAGATGTGAGCCTGGAAA	
	Reverse	TTTGCGACTGCATATACTTCCTC	
<i>Sf3b1</i>	Forward	CAACACAGAATGGCTTTGGATA	
	Reverse	TCCTGTACTGCTCAGCTTCATC	
<i>Slc25a38</i>	Forward	GTGGTTCGCACAGAAAGTCTC	
	Reverse	GAAGAATACAGGGTGCCAAAGT	
<i>Tfr1</i>	Forward	GAGGGTTATGTGGCATTTCAGTA	
	Reverse	ATTTCCCCTGCTCTAACAATCA	
<i>Dmt1</i>	Forward	GAATCTGATTTGCAGTCTGGAG	
	Reverse	ACGGTGACATACTTCAGCAAGA	
<i>Steap3</i>	Forward	GCCAGTCTAACGCTGAGTACCT	
	Reverse	GCTTCTGGCTGATCACTGC	
<i>Abcb10</i>	Forward	GAGATGACGGAAGTGGAGAAGT	
	Reverse	TTTGTACAGGACAGACAGCACA	
18S	Forward	CGCCGCTAGAGGTGAAATTCT	
	Reverse	CGAACCTCCGACTTTCGTTCT	
<i>Fech</i>	Forward	AGAAGGTGGAAGCTGCAACT	methylation qPCR
	Reverse	GTTCCAGTTTCGACCAGGTTG	

<i>Abcb7</i>	Forward	TTCTCTCTTAGCGTTGCCAGAT
	Reverse	TCGAATGGCAGACAAGATAGGG
<i>Sf3b1</i>	Forward	ATTTTGTCCACTCGAACACACA
	Reverse	TAGGTGGCAGTTGAAGTACGTG
<i>Actb-pro</i>	Forward	CCCAACACACCTAGCAAATTAGAACCAC
	Reverse	CCTGGATTGAATGGACAGAGAGTCACT
変異 <i>Tet2</i>	Forward	AGCCAGTCAAGACTTGCTGACAAAGGAAA CTAGAAG
	Reverse	CTTCTAGTTTCCTTTGTCAGCAAGTCTTGA CTGGCT

表 2. 全エクソンシーケンス解析を施行した先天性鉄芽球性貧血患者及び家系一覧

家系	No.		性別	
1	1	患者	男	鉄芽球性貧血
	2	父親	男	健常
	3	母親	女	健常
	4	兄	男	健常
	5	妹	女	健常
2	6	患者	男	鉄芽球性貧血
	7	妹	女	鉄芽球性貧血
3	8	患者	男	鉄芽球性貧血
	9	母の従兄弟	男	鉄芽球性貧血
	10	母の従兄弟	女	鉄芽球性貧血
4	11	患者	男	鉄芽球性貧血
	12	父親	男	健常
	13	母親	女	健常
5	14	患者	女	鉄芽球性貧血
	15	姉	女	鉄芽球性貧血
6	16	患者	男	鉄芽球性貧血
	17	母親	女	健常
7	18	患者	女	鉄芽球性貧血
	19	父親	男	健常
	20	母親	女	健常

原因遺伝子が不明である先天性鉄芽球性貧血患者及びその血縁者にて、ゲノム DNA における全エクソンシーケンス解析を施行した家系一覧を示した。7 家系のうち 3 家系からそれぞれ新規原因遺伝子の候補を挙げた。家系 1 からは *APEX2* 遺伝子、家系 5 からは *NDUFV1* 遺伝子、家系 6 からは *SLC39A8* 遺伝子を抽出した。

表 3. 野生型、Tet2^{trap/+}、Tet2^{trap/trap} マウスにおける血球計数と鉄関連データ

	WT			Tet2 ^{trap/+}			Tet2 ^{trap/trap}		
WBC, / μ L ^{†‡}	8800.0	±	2696	13450.0	±	2732	14325.0	±	2964
RBC, $\times 10^4$ / μ L [†]	834.1	±	74.9	774.3	±	39.5	745.4	±	50.8
HGB, g/dL ^{†‡*}	14.5	±	1.1	13.2	±	0.6	12.2	±	0.8
HCT, % ^{†‡}	38.3	±	3.4	35.7	±	1.8	34.5	±	2.4
MCV, fL	46.0	±	1.1	45.1	±	1.0	46.3	±	1.7
MCH, pg ^{‡*}	17.4	±	0.7	17.1	±	0.5	16.4	±	0.7
MCHC, g/dL ^{†*}	37.8	±	1	37.9	±	1	35.6	±	1
PLT, $\times 10^4$ / μ L	80.1	±	18.7	74.7	±	19.1	77.0	±	19.3
Fe, μ g/dL ^{†‡}	131.3	±	15.9	148.1	±	13.6	160.1	±	20.3
UIBC, μ g/dL [†]	270.0	±	20.4	251.6	±	24.9	207.9	±	53.0
TIBC, μ g/dL	401.3	±	28.5	399.8	±	28.9	368.0	±	46.9
Ferritin, ng/ml ^{†‡*}	104.7	±	42.4	171.6	±	89.5	329.6	±	199.2

16 週齢の野生型マウス($n=8$ 、mean \pm SD)、Tet2^{trap/+}マウス($n=8$ 、mean \pm SD)、Tet2^{trap/trap} マウス($n=8$ 、mean \pm SD)の末梢血の血算値を自動血球計数装置で測定した。また、末梢血の血清を用いて鉄関連マーカーを測定した。†, $P < 0.05$ WT vs Tet2^{trap/+}、‡, $P < 0.05$ WT vs Tet2^{trap/trap}、*, $P < 0.05$ Tet2^{trap/+} vs Tet2^{trap/trap}。

Tet2 ノックダウンマウスでは軽度の貧血を認め、また、血清鉄、血清フェリチンが上昇していた。

表 4. 野生型、Tet2^{trap/+}、Tet2^{trap/trap} マウス骨髄中における鉄芽球の割合

	WT		Tet2 ^{trap/+}			Tet2 ^{trap/trap}			
Type1, % ^{†‡*}	0.14	±	0.16	0.58	±	0.49	1.68	±	1.02
Type2, % [‡]	0.02	±	0.06	0.12	±	0.19	0.22	±	0.22
Type3, %	0.00	±	0.00	0.02	±	0.06	0.04	±	0.08

16 週齢野生型マウス ($n=5$ 、mean \pm SD)、Tet2^{trap/+}マウス ($n=5$ 、mean \pm SD)、Tet2^{trap/trap} マウス ($n=5$ 、mean \pm SD) の骨髄細胞のサイトスピン標本で Prussian blue 染色を施行し、赤芽球系細胞 500 個中の鉄芽球の割合をカウントした。†, $P < 0.05$ WT vs Tet2^{trap/+}、‡, $P < 0.05$ WT vs Tet2^{trap/trap}、*, $P < 0.05$ Tet2^{trap/+} vs Tet2^{trap/trap}。

Tet2 ノックダウンマウスにて明らかな環状鉄芽球の増加は認められなかったが、Tet2 ノックダウンマウス、特に Tet2^{trap/trap} マウスでは type1 の鉄芽球が増加していた。

10. 図

図 1. 先天性鉄芽球性貧血症例で認められた *APEX2* 遺伝子変異の検討

表 2 で示した家系一覧のうち、全エクソンシーケンス解析の結果、家系 1 からは *APEX2* 遺伝子を先天性鉄芽球性貧血の新規原因遺伝子の候補とした。

(A) *APEX2* 遺伝子のシーケンス解析の結果を示した。

(B) 患者の先天性鉄芽球性貧血診断時の血液学的データ、骨髓に占める環状鉄芽球の割合を示した。

図 2. 先天性鉄芽球性貧血症例で認められた *NDUFV1* 遺伝子変異の検討

表 2 で示した家系一覧のうち、全エクソンシーケンス解析の結果、家系 5 からは *NDUFV1* 遺伝子を先天性鉄芽球性貧血の新規原因遺伝子の候補とした。

(A) *NDUFV1* 遺伝子のシーケンス解析の結果を示した。

(B) 患者の先天性鉄芽球性貧血診断時の血液学的データ、骨髓に占める環状鉄芽球の割合を示した。

図 3. 先天性鉄芽球性貧血症例で認められた *SLC39A8* 遺伝子変異の検討

表 2 で示した家系一覧のうち、全エクソンシーケンス解析の結果、家系 6 からは *SLC39A8* 遺伝子を先天性鉄芽球性貧血の新規原因遺伝子の候補とした。

(A) *SLC39A8* 遺伝子のシーケンス解析の結果を示した。

(B) 患者の先天性鉄芽球性貧血診断時の血液学的データ、骨髄に占める環状鉄芽球の割合を示した。

図 4. RCMD-RS 症例で認められた *ALAS2* 変異、*TET2* 変異の検討

(A) RCMD-RS 患者の末梢血、健常人の末梢血を用いて施行した *TET2* 遺伝子のダイレクトシーケンス解析の結果を示した。

(B) RCMD-RS 患者の末梢血、健常人の末梢血を用いて施行した *ALAS2* 遺伝子のダイレクトシーケンス解析の結果を示した。

(C) RCMD-RS 患者の先天性鉄芽球性貧血診断時の血液学的データ、骨髄に占める環状鉄芽球の割合を示した。

図 5. DNA のメチル化、脱メチル化機構

DNA のメチル化、脱メチル化機構に関する内容を模式的に示した。DNA のメチル化では、DNMT1, DNMT3A, DNMT3B により、ゲノム上の CpG 配列のうち、シトシン(C)の 5 位の炭素にメチル基が付加され 5 メチルシトシン(5mC)に変換される。続いて、脱メチル化では TET 遺伝子群により DNA の 5mC のメチル基がヒドロキシル化され 5-ヒドロキシメチルシトシン(5hmC)が合成される。

図 6. *TET2* 変異は機能低下型変異である。

- (A) RCMD-RS 症例で認められた *TET2* 変異箇所について模式的に示した。
- (B) pFN21A、pFN21A-野生型 *TET2*、pFN21A-変異型 *TET2* から遺伝子導入した HEK293T 細胞サンプルで、抗 HaloTag 抗体でウェスタンブロッティングを施行した。ウェスタンブロッティングの内部補正には α -tubulin を用いた。
- (C) (B)と同様のサンプルを使用し、抗 *TET2* 抗体でウェスタンブロッティングを施行した。ウェスタンブロッティングの内部補正には α -tubulin を用いた。
- (D) 変異 *TET2* の酵素活性を評価するため、5-hmc を測定した。
- 2 回の独立した実験を行い、平均と標準偏差をデータとして示した。

図 7. マウス骨髄における赤血球系細胞分化に伴う *Tet2* の発現様式の変化

- (A) 16 週齢の野生型マウスから骨髄を採取し抗 CD71 抗体および抗 Ter119 抗体で染色し、フローサイトメトリーで展開後、赤血球系細胞の分画を I ~IV に区分し、それぞれの分画からソーティングを施行した。
- (B) *Tet2*、 β -globin、*Hmox-1* の定量リアルタイム PCR。mRNA の内部補正には *18S* を用いた ($n=3$ 、mean \pm SD)。*, $P<0.05$ 。

図 8. *Tet2* ノックダウンマウスの骨髄では III、IV 期の後期赤芽球系細胞が低下する傾向が認められる。

- (A) 16 週齢の野生型マウス、*Tet2*^{trap/+}マウス、*Tet2*^{trap/trap}マウスから骨髄を採取し、

抗 CD71 抗体および抗 Ter119 抗体で染色し、フローサイトメトリーで展開した。それぞれ $n=3$ で施行し、代表的な個体のフローサイトメトリーの展開図を示した。

(B) (A)での赤血球系細胞の I ~IVの各分画の割合をもとに、総骨髄細胞数から分画毎の細胞数を算出した。($n=3$, mean \pm SD) * $P<0.05$ 。

図 9. Tet2 ノックダウンマウスの骨髄 Ter119 陽性細胞では *Hmox-1*、*Fech*、*Abcb7*、*Sf3b1* 遺伝子の発現が低下する。

野生型マウス、Tet2^{trap/+}マウス、Tet2^{trap/trap}マウスの骨髄 Ter119 陽性細胞におけるヘム合成や鉄代謝に関与する遺伝子の定量リアルタイム PCR。mRNA の内部補正には *18S* を用いた ($n=7$, mean \pm SD)。*, $P<0.05$ 。

図 10. Tet2 ノックダウンマウスの骨髄 Ter119 陽性細胞では *Fech*、*Abcb7*、*Sf3b1* 遺伝子 DNA の CpG 領域はよりメチル化されている。

野生型マウス、Tet2^{trap/+}マウス、Tet2^{trap/trap}マウスの骨髄 Ter119 陽性細胞のメチル化 DNA を用いて施行した定量 PCR。図 9 で発現が低下していた *Fech*、*Abcb7*、*Sf3b1* 遺伝子のプロモーター領域内の CpG 配列でプライマーを設計した。内部補正には *Actb* 遺伝子のプロモーター部位の DNA メチル化レベルを用いた ($n=4$, mean \pm SD)。*, $P<0.05$ 。

図 11. Tet2^{trap/trap} マウスの骨髄 Ter119 陽性細胞では野生型マウスと比べヘム濃度が低下している。

野生型マウス、Tet2^{trap/+}マウス、Tet2^{trap/trap} マウスの骨髄 Ter119 陽性細胞のヘム濃度を測定した。(n=3、mean±SD)。*,*P*<0.05。

図 12. Tet2 ノックダウンマウスの骨髄 Ter119 陽性細胞ではミトコンドリアフェリチンの発現が増加する。

野生型マウス、Tet2^{trap/+}マウス、Tet2^{trap/trap} マウスについて、それぞれ Ter119 陽性細胞で 3 個体ずつサンプルを作製し、代表的な 1 個体を示す。ウェスタンブロッティングの内部補正には α -tubulin を用いた。

図 13. Tet2^{trap/trap} マウス骨髄細胞におけるサイトスピン、鉄染色像

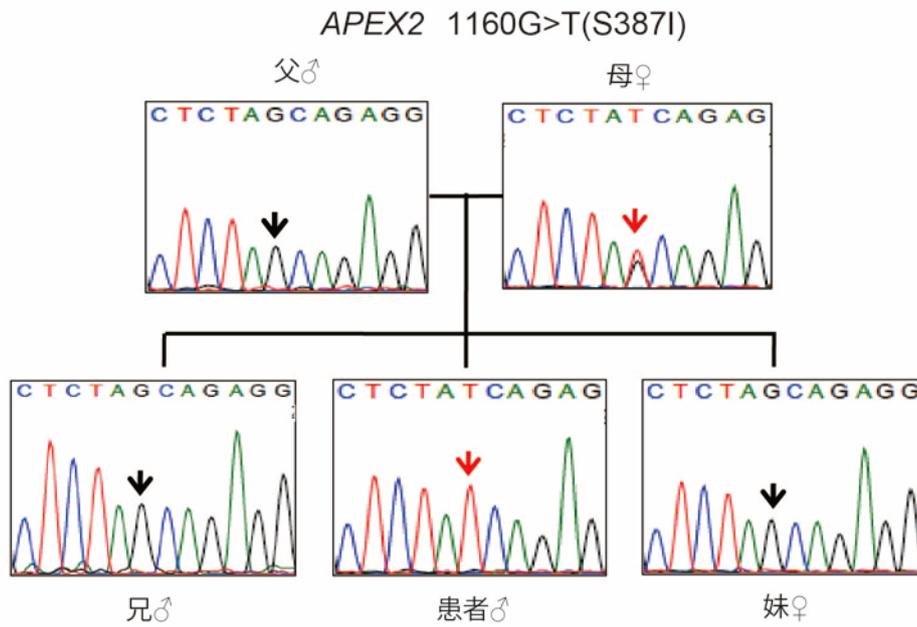
Tet2^{trap/trap} マウス骨髄細胞で認められた代表的な鉄芽球 type1、2、3 の鏡検像を示した。

図 14. 赤血球系細胞での TET2 機能低下がもたらすヘム・鉄代謝機構への関与

今回の解析で示された、赤血球系細胞における TET2 機能低下が作用しうる、ヘム・鉄代謝機構への関与を模式的に示した。

図 1

A

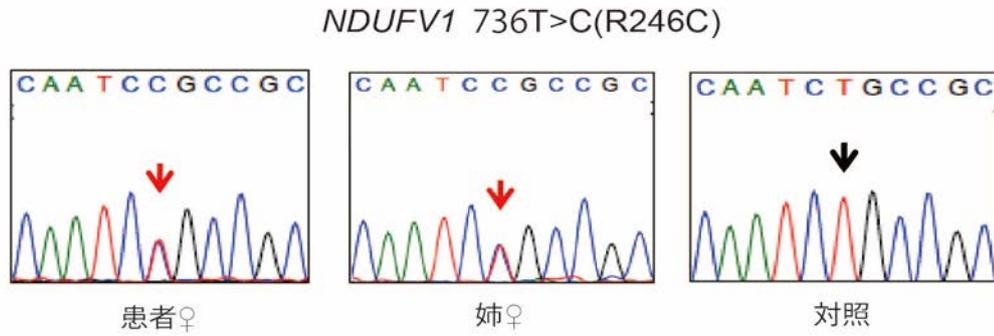


B

Parameter	<i>APEX2</i> 変異患者
WBC, / μ L	6300
RBC, $\times 10^4$ / μ L	384
HGB, g/dL	9.3
HCT, %	31.5
MCV, fL	82
MCH, pg	29.5
MCHC, g/dL	24.2
PLT, $\times 10^4$ / μ L	14.8
Fe, μ g/dL	200
TIBC, μ g/dL	237
Ferritin, ng/ml	910
骨髓中に占めるRS割合, %	29.5

図 2

A

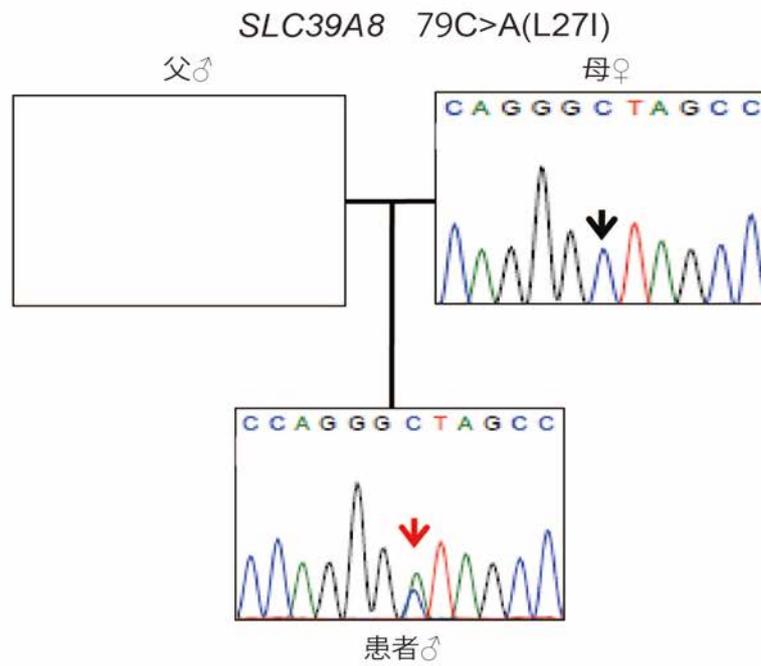


B

Parameter	<i>NDUFV1</i> 変異患者
WBC, / μ L	5090
RBC, $\times 10^4$ / μ L	317
HGB, g/dL	9.3
HCT, %	30.5
MCV, fL	96.2
MCH, pg	29.3
MCHC, g/dL	30.5
PLT, $\times 10^4$ / μ L	26.3
Fe, μ g/dL	23
UIBC, μ g/dL	361
TIBC, μ g/dL	384
Ferritin, ng/ml	12
骨髓中に占めるRS割合, %	76

図 3

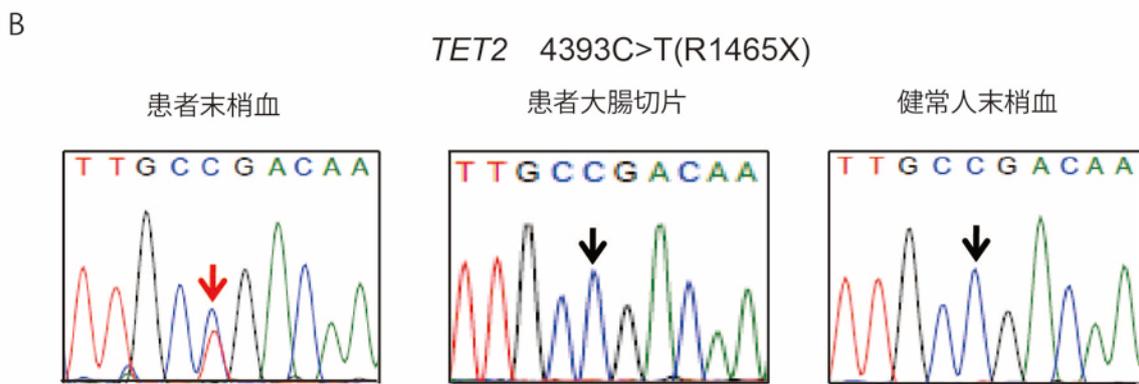
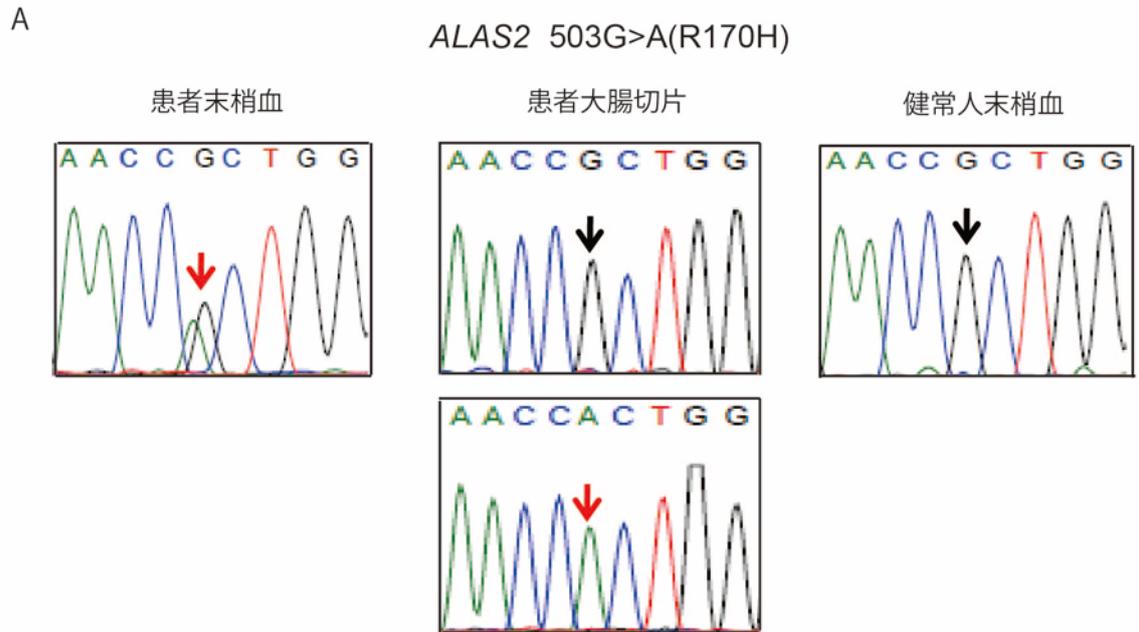
A



B

Parameter	SLC39A8変異患者
WBC, / μ L	7200
RBC, $\times 10^4$ / μ L	190
HGB, g/dL	5.6
HCT, %	16.8
MCV, fL	88.3
MCH, pg	29.7
MCHC, g/dL	33.6
PLT, $\times 10^4$ / μ L	58.4
Fe, μ g/dL	177
UIBC, μ g/dL	115
TIBC, μ g/dL	292
Ferritin, ng/ml	307.3
骨髓中に占めるRS割合, %	43

図 4



C

Parameter	TET2変異患者
WBC, / μ L	6200
RBC, $\times 10^4$ / μ L	216
HGB, g/dL	6.1
HCT, %	18.8
MCV, fL	87.1
MCH, pg	28.2
MCHC, g/dL	32.4
PLT, $\times 10^4$ / μ L	19.8
Fe, μ g/dL	184
TIBC, μ g/dL	237
Ferritin, ng/ml	377
骨髓中に占めるRS割合, %	20

图 5

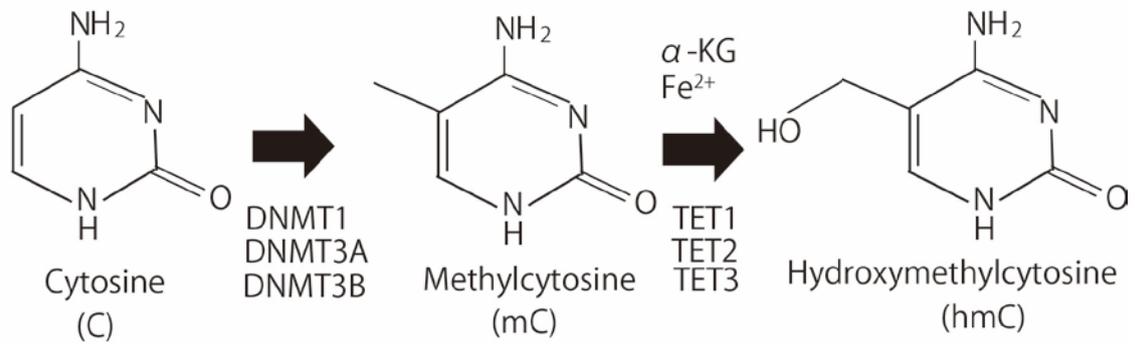


図 6

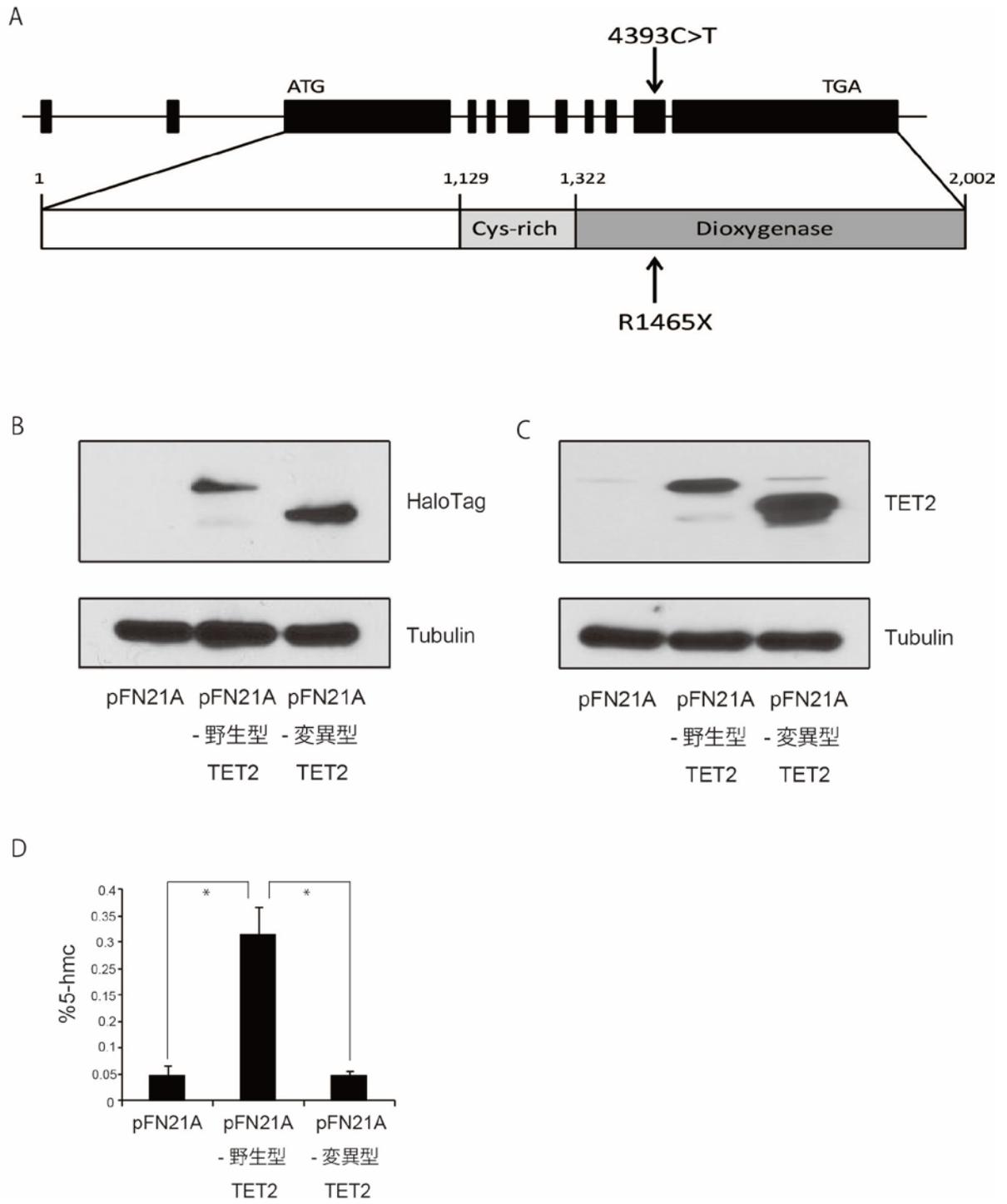
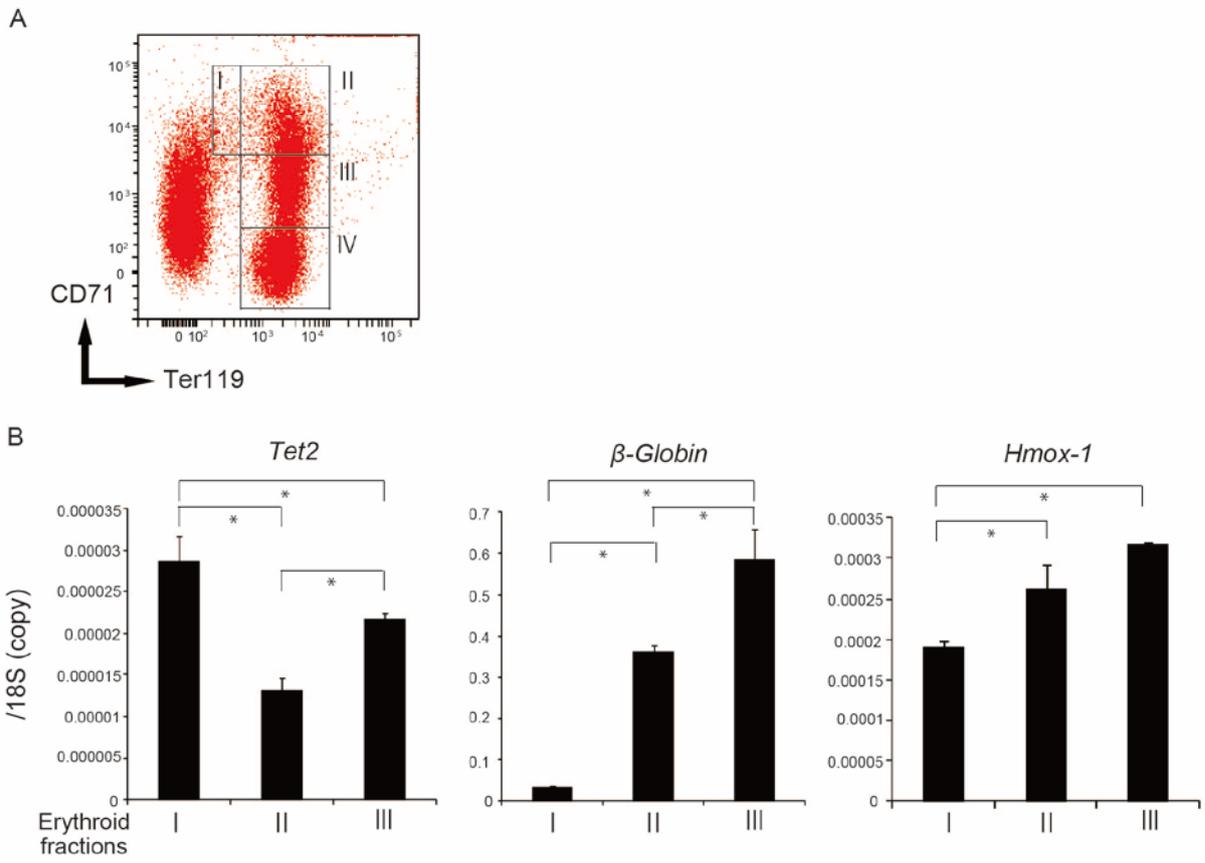
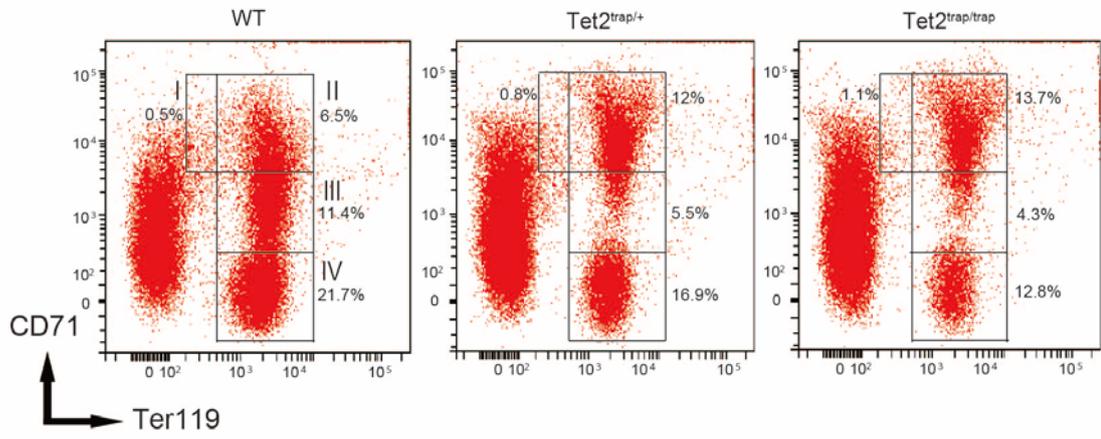


图 7

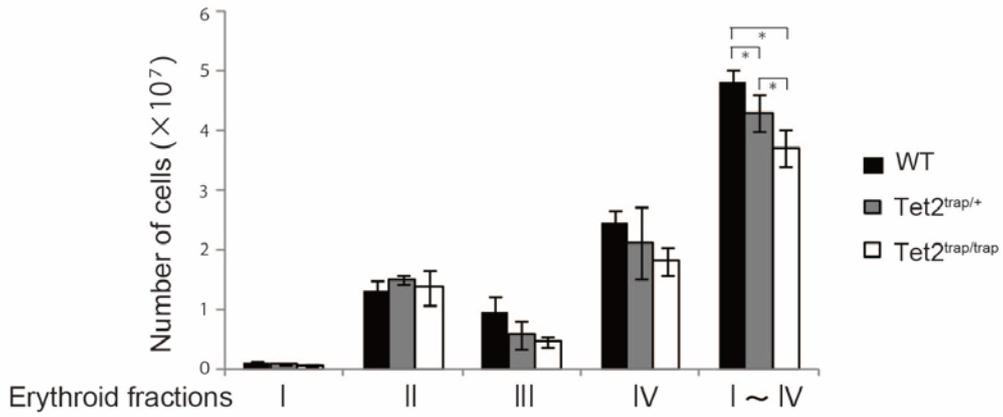


8

A



B



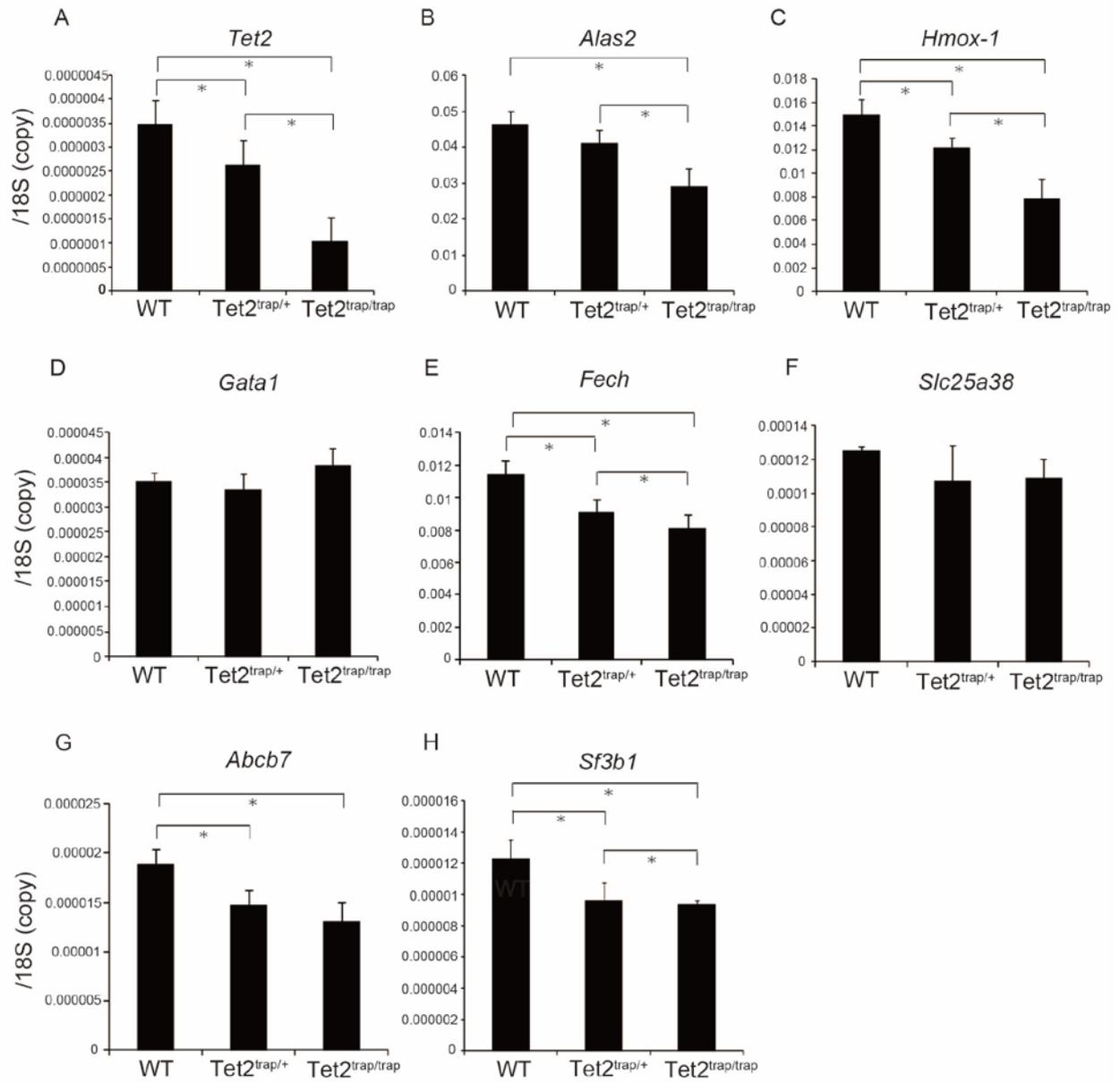
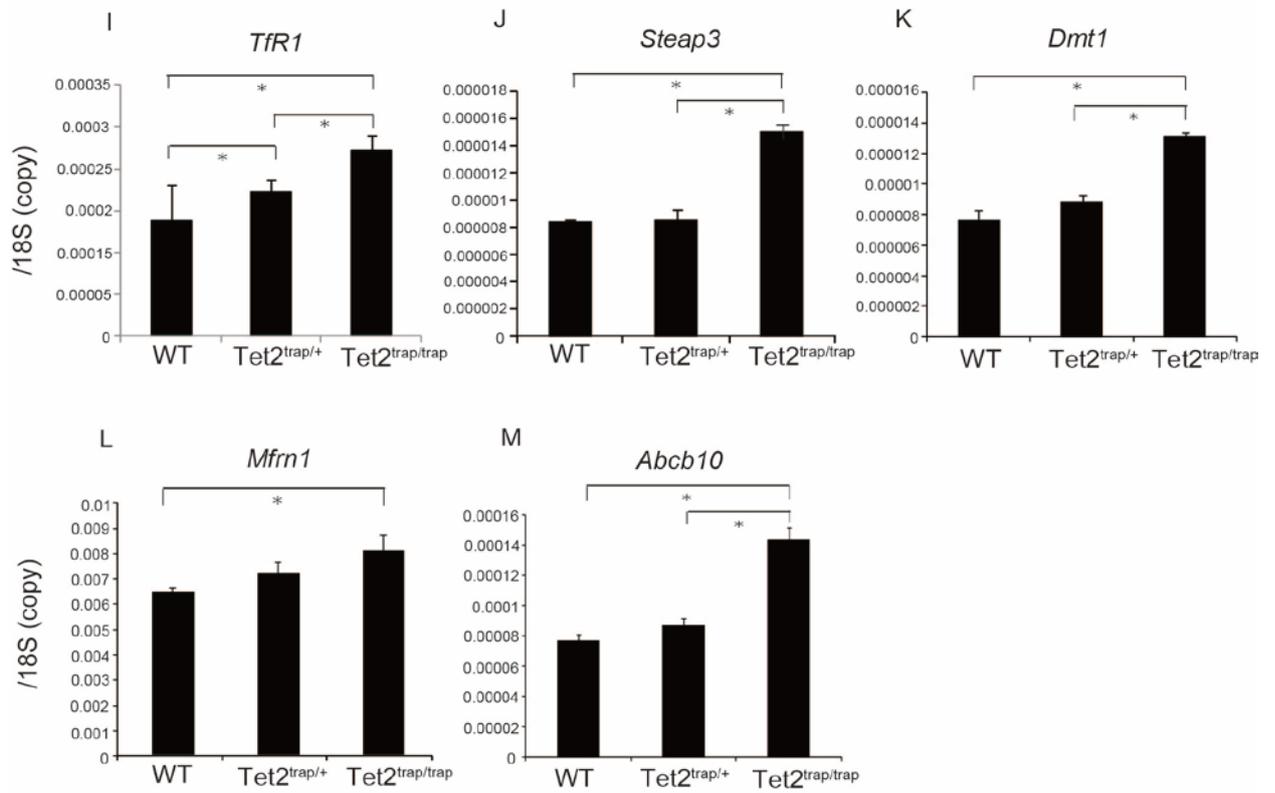
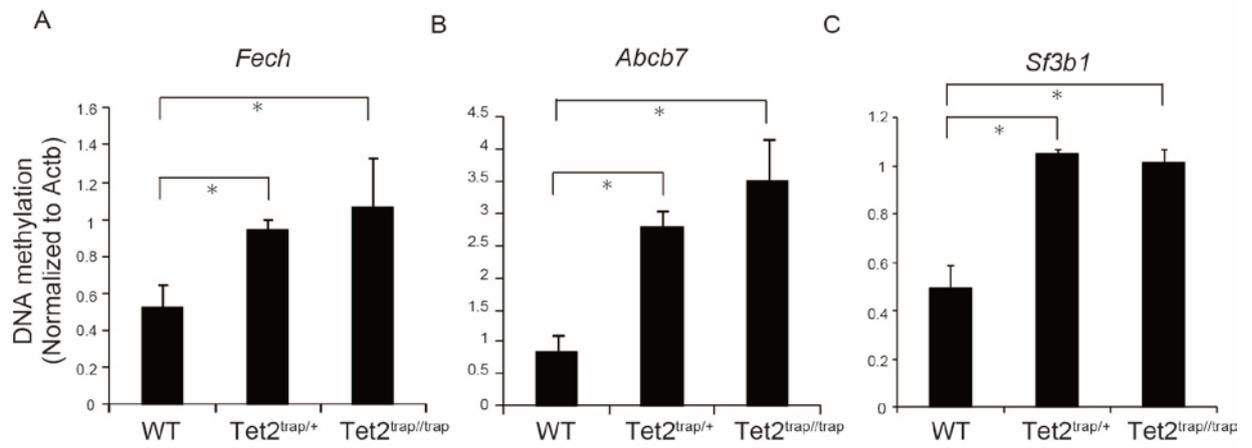


図9 続き



10



☒ 11

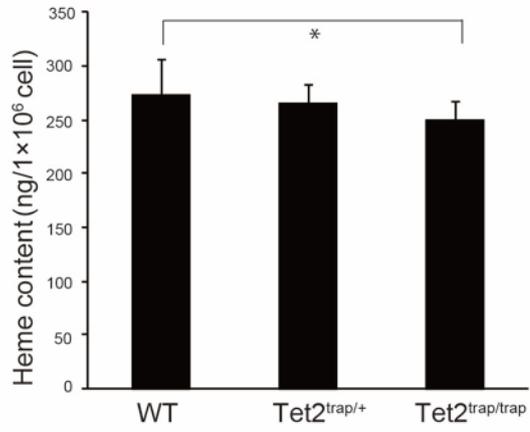


图 12

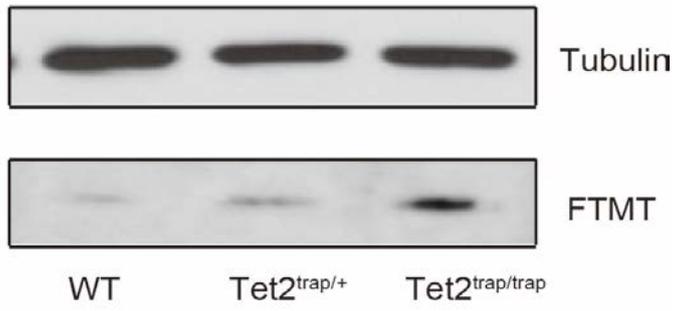
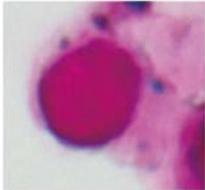
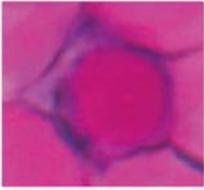


图 13

type1 RS



type2 RS



type3 RS

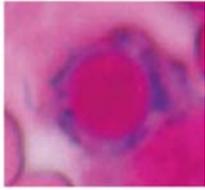
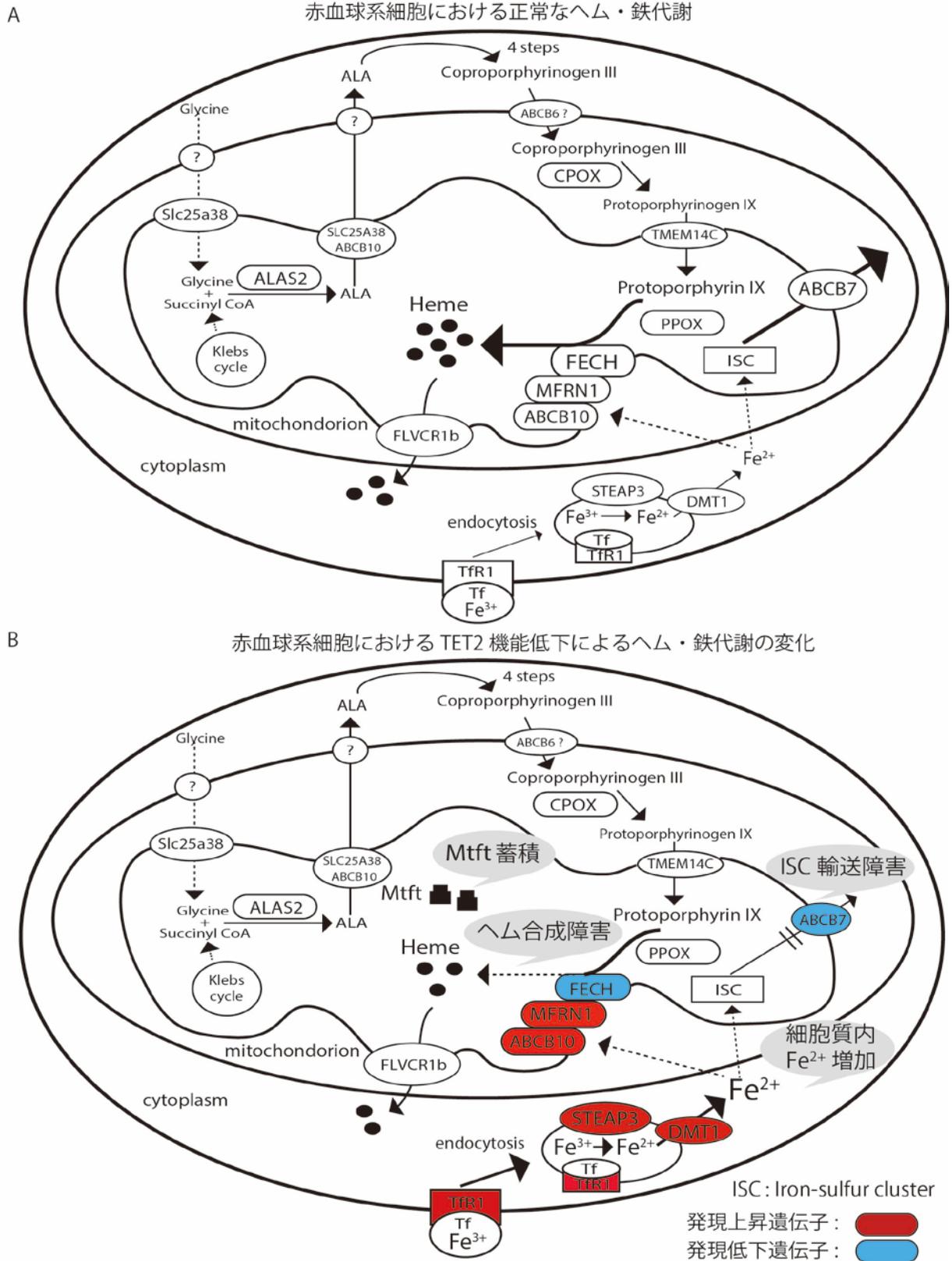


図 14



11. 基礎論文

Kyoko inokura, Tohru Fujiwara, Yoko Okitsu, Noriko Fukuhara, Yasushi Onishi,
Kenichi Ishizawa, Kazuya Shimoda, Hideo Harigae : Impact of TET2 Deficiency
on Iron Metabolism in Erythroblasts : a Potential Link to Ring Sideroblast
Formation. (投稿中)

12. 謝辞

本研究の機会を与えて頂き、丁寧な御指導を賜りました張替秀郎先生（東北大学大学院医学系研究科内科病態学血液・免疫病学分野）に厚く御礼申し上げます。また、研究を遂行するにあたり、多くのアドバイスをくださり、最後まで熱心に御指導して頂きました藤原亨先生（血液・免疫病学分野／血液分子治療学）に心より感謝申し上げます。先生方の御指導のもと、本研究テーマに取り組めましたことは大変有意義であり、大学院の研究生活では多くのことを学ばせて頂きました。

また、本研究に Tet2 遺伝子改変マウスをご提供下さいました、下田和哉先生（宮崎大学内科学講座消化器血液学分野）に厚く御礼申し上げます。