

サラセミアのmicroRNA異常

梅村, 創
九州大学大学院医学研究院保健学部門検査技術科学分野

Svasti, Saovaros
Thalassemia Research Center, Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University :
Associate Professor

<https://doi.org/10.15017/1498400>

出版情報：福岡醫學雜誌. 106 (2), pp.23-32, 2015-02-25. 福岡医学会
バージョン：
権利関係：

総 説

サラセミアの microRNA 異常

¹⁾九州大学大学院医学研究院保健学部門 検査技術科学分野

²⁾マヒドン大学 分子バイオサイエンス研究所 サラセミア研究センター

梅 村 創¹⁾, Saovaros Svasti²⁾

はじめに

生体の働きは、遺伝子の発現によりタンパク質が合成されて支えられている。その異常を捉えることは、遺伝性疾患や後天的な遺伝子異常で引き起こされる腫瘍のみならず様々な病態を的確に診断し最適の治療法を選択できることを可能にした。さらに、多くの遺伝子の発現が細胞内や様々な体液中に存在する microRNA (miRNA) により調節されていることが明らかになってきた¹⁾²⁾。miRNA は個体発生、細胞増殖・分化、アポトーシス、腫瘍化に関与していること、腫瘍や心血管疾患、代謝疾患などで病態特異的に変化していることが報告され、新世代のバイオマーカーや治療法として注目されている³⁾。

サラセミア (地中海貧血) は全世界で罹患者が最も多い遺伝性疾患の一つであり、主に熱帯・亜熱帯地域に居住している人々が高率に罹患している先天性貧血である⁴⁾⁵⁾。毎年 6 万人の重症型サラセミアの新生児が出生している。死産、流産が多い上に、出生しても重度の鉄過剰症、輸血依存性貧血となり熱帯・亜熱帯地域の国民の健康を著しく損ねている。サラセミアを代表とするヘモグロビンの合成や構造異常は、1970 年代に分子診断が導入されて臨床応用された初めての疾患であるが、治療は生涯にわたる赤血球輸血と鉄過剰症の予防のための徐鉄療法に依存しており、分子レベルの決定的な根治療法は未だ開発されるに至っていない。

我々は過去 10 年間、タイ国マヒドン大学など ASEAN 諸国の大学との共同研究として、いわばアジア保健学の課題の一つであるサラセミアの miRNA を解析し、新たなバイオマーカー・治療法の開発を試みてきた。本稿では、サラセミアを概説し miRNA 解析の有効性について紹介する。

1. サラセミア

赤血球の主成分であり酸素運搬を担っているヘモグロビン (hemoglobin, Hb) の遺伝性疾患は、人の遺伝性疾患のなかでも罹患率が最も高いものの一つである⁶⁾ (図 1)。全世界で年間約 300 万人の罹患児が出生している。サラセミアでは、Hb を構成する α -グロビンまたは β -グロビン遺伝子の異常により、それぞれ α -サラセミア、 β -サラセミアを発症する (図 2)。 β -グロビン遺伝子の発現が欠失したものを β^0 -サラセミア、正常の β -グロビン蛋白の発現量が低下しているものを β^+ -サラセミアと分類する⁴⁾⁵⁾。 β -サラセミアを罹患した年間新生児は約 40 万人と推定されている。 β -サラセミアは、世界保健機関 (World Health Organization : WHO) による区域別出生数調査では東南アジアと東地中海に最も多く、東南アジアとの交流が盛んになるわが国にとっては大変身近な疾患である⁶⁾ (図 3)。 β -サラセミアには 200 種以上の異なる遺伝子型があるとされるが、いずれも、グロビン遺伝子の転写、RNA プロセッシング、mRNA からグロビン蛋白への翻訳を障害する突然変異である。点突然変異は遺伝子そのものか、その近

Tsukuru UMEMURA¹⁾ and Saovaros Svasti²⁾

¹⁾Department of Health Sciences, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

²⁾Thalassemia Research Center, Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Thailand
Dysregulation of microRNA in Thalassemia

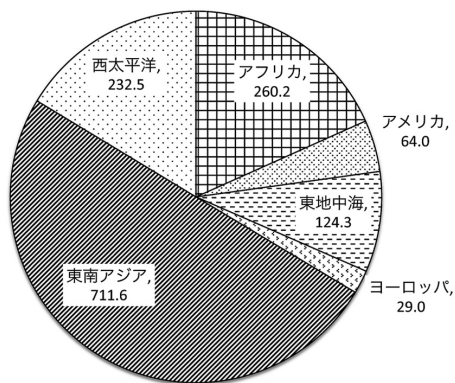


図1 Hb異常症の区域別人口 (2003)
 数値は百万人, 対象疾患は Hb S, Hb C, Hb E, Hb D etc. β -サラセミア, α^0 -サラセミア. (Modell & Darlison, 2008 より)

表1 主な異常ヘモグロビン症の年間出生数

| 疾患 | 年間出生数 |
|---|---------|
| β -thalassemia major | 22,989 |
| HbE/ β -thalassemia | 19,128 |
| HbH disease | 9,568 |
| Hb Bart hydrops (α^0/α^0) | 5,183 |
| SS disease | 217,331 |
| S/ β -thalassemia | 11,074 |
| SC disease | 54,736 |

SS: sickle cell anemia, SC: sickle cell
 (Weatherall, 2010 より)

第11番染色体

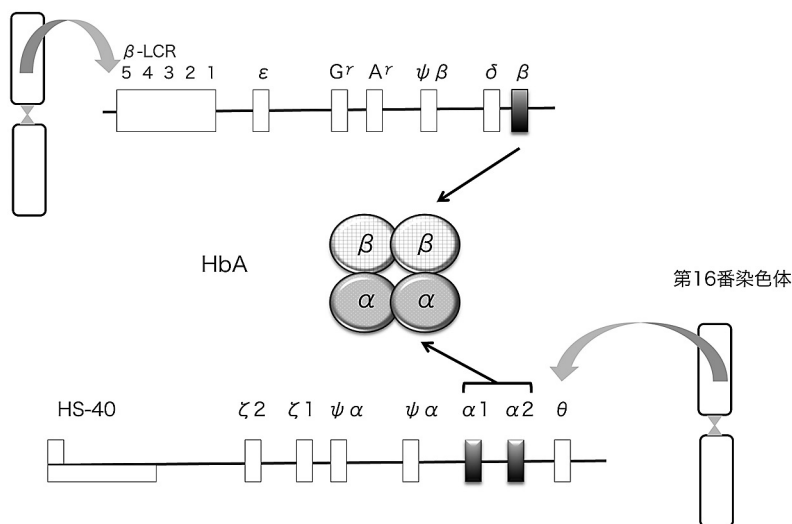


図2 ヘモグロビンの合成経路 (Higgs et al. 2012 より改変⁴⁾)

傍で発生している。グロビン遺伝子の欠損も報告されている。これらの遺伝子型の中でも高頻度に見られるのは数種類である。サラセミア病態の発症にはグロビン遺伝子の突然変異によるグロビン蛋白の異常も関与する。たとえば、2つの β -グロビン遺伝子の一方のみが異常であるヘテロ型 β -サラセミアに、もう一方のアレルにHbE異常を持った場合 (HbE-thalassemia), 重症のサラセミアとなることが多い⁷⁾ (表1)。その他、グロビン遺伝子は正常であるが、その調節領域の異常により発症する例がある。一方、 β -グロビン遺伝子異常と同時に γ -グロビン遺伝子発現を亢進させる遺伝子異常が存在すると、胎児Hb ($\alpha_2\beta_2$) が形成され過剰の α -グロビンが減ることにより貧血を軽症化させる。

サラセミアは全世界で罹患者が最も多い遺伝性疾患であり人口の1.5%は β -サラセミアの保因者と推定されている。主に熱帯・亜熱帯地域に居住している人々が高率に重症型に罹患している先天性貧血である。具体的には、地中海地方、アフリカ、中東、インド、東南アジア、中国南部などに重症型の罹患者率が高く、マラリア感染症の流行地と重なっていることはよく知られている⁶⁾。毎年6万人の重症型サラセミアの新生児が出生しており、さらに死産、流産が多い上に、出生しても重度の鉄過剰症、輸血依存性貧血となり熱帯・亜熱帯地域の国民の健康を著しく損ねている。Hb異常症全体で最も多いのは鎌状赤血球症 (SS disease と SC disease) であり、 β -サラセミア、HbE/ β -サラセミアがあわせてその4分の1の頻度で

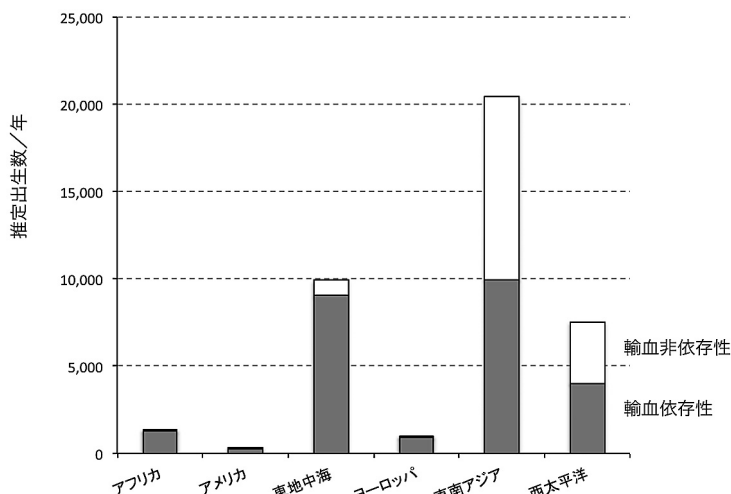


図3 WHOによる区域別β-サラセミア推定年間出生数 (Modell & Darlison, 2008より)

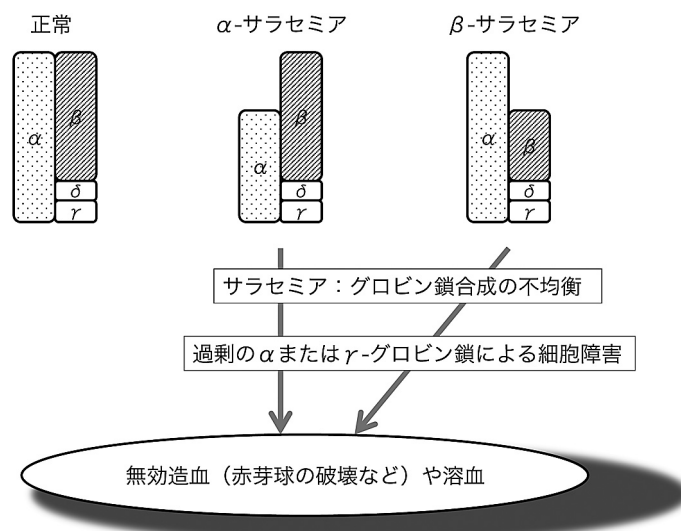


図4 サラセミアの病態

見られる。The Thalassemia International Federationによれば、少なくとも20万人のサラセミア患者が登録され治療を受けている。サラセミアを代表とするヘモグロビンの合成や構造異常症は、ヒトの疾患としては初めて遺伝子病として同定された。しかし、治療は未だに生涯にわたる赤血球輸血、無効造血と頻回の輸血による鉄過剰症の予防に依存しているのみで、分子レベルの決定的な根治療法は未だ開発されるに至っていない。近年では、流行地の国々の急速な発展が罹患者の全世界への移動をもたらし、もはや限られた地域の遺伝疾患ではなくなりつつある。サラセミアの予防とコントロールは世界的に共通した重要な課題である。

正常造血ではα-グロビンとβ-グロビンの産生量は1:1とバランスがとれている。β-グロビン遺伝子は第11番染色体上に位置し、1つのβ-グロビン遺伝子のみ異常となっても治療の対象になるほどの症状は生じない(β-サラセミア保因者)。2つのアレルが異常を持った場合に貧血が生じる。β-サラセミアではβ-グロビンが十分量産生されないためα/β比が1以上となり、赤血球内に過剰のα-グロブリンが存在することになる。過剰のα-グロブリンは細胞内で沈殿して赤芽球を破壊し、結果として骨髄内の無効造血を生じる(図4)。そのため、小球性低色素性貧血、脾腫、赤芽球過形成骨髄とそれによる骨変形・破

壊, 基礎代謝亢進, 鉄過剰症が合併する. これらは複数の臓器に障害を引き起こす⁴⁾⁵⁾. 遺伝子型と臨床像が一致しないことも観察される. たとえば, 同じ遺伝子異常をもちながらある症例は輸血依存性の重症型であるのに, 他の症例では輸血を必要としない軽い臨床像を呈することもある. まだ解析できていない遺伝子異常が介在している可能性があり, 将来的には重症型も治療により軽症型へと変化させることが可能かもしれない. 臨床像を修飾するもので明らかにされているものとして, α -サラセミアの合併を挙げることができる. β -サラセミアの遺伝子異常に α -サラセミアが合併することでグロブリン産生比が1:1に近づき過剰の α 鎖が減少することで臨床像が軽症化する. 次に挙げられる病態としては, γ -グロブリン産生過剰状態の合併である. γ -グロブリン鎖は β -グロブリンの代わりに α 鎖と結合し胎児ヘモグロビン (HbF) を形成して安定化する. 一方, 先述の HbE などの異常 Hb 症の合併でも臨床像が重症化することもある. その他にも, ビリルビン代謝に関与する UGT1, 鉄代謝に関与する HFE, 骨代謝関連遺伝子としてのビタミン D 受容体遺伝子やエストロゲン受容体遺伝子, 心機能に影響を持つ APOE ϵ 4 などの関与が知られている⁴⁾⁸⁾⁹⁾. 我々は, posttranscriptional な遺伝子発現調節を担う miRNA がサラセミア病態の修飾因子である, との仮説に基づき研究を進めている.

2. microRNA (miRNA)

【microRNA の生成】

miRNA の遺伝子はゲノムの非コード領域に位置している. 複数の miRNA がごく近傍に位置しゲノム上にクラスターを形成している場合も多い. miRNA の転写は, 転写因子によりコントロールされている. miRNA または miRNA クラスターは, やや長い前駆体として生成される (primary miRNA : pri-miRNA) (図 5). pri-miRNA は, 核内に存在する RNA 分解酵素, DROSHA により個々の miRNA 前駆体として切り出される. 切り出された miRNA は stem and loop 構造を持っており precursor miRNA (pre-miRNA)

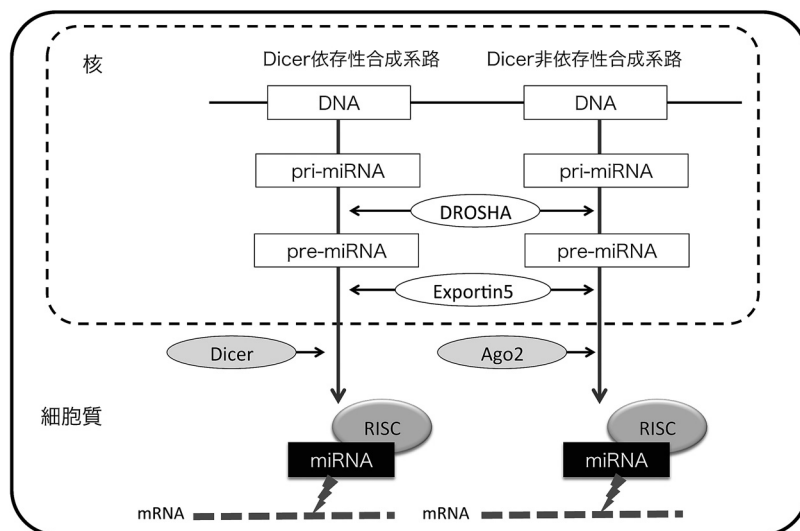


図 5 miRNA の合成経路

miRNA はゲノムから pri-miRNA (primary miRNA) として転写され, 核内の RNA 分解酵素, DROSHA により切断され, より短い pre-miRNA (precursor miRNA) となる. pre-miRNA は核内蛋白である Exportin5 により細胞質へ運搬される. 多くの pre-miRNA は細胞質内に存在する Dicer により短い 2 重鎖 RNA となる (Dicer 依存性合成経路: canonical pathway). miR-451 などごく一部の miRNA は, 細胞質内の Ago2 (Argonaute2) により 2 重鎖 RNA となる (Dicer 非依存性合成経路: non-canonical pathway). いずれの経路においてもアンチセンス鎖が成熟 miRNA となり, 細胞内の蛋白複合体, RISC (RNA-induced silencing complex) に結合して標的 mRNA を切断または翻訳阻害により抑制的に制御する.

と呼ばれる。pre-miRNA は核内に存在する exportin5 蛋白と結合し細胞質へと運ばれる。pre-miRNA は、細胞質内で RNA 分解酵素、Dicer の作用を受け stem and loop 構造から loop 構造を切りとられ、stem 構造を形成していた 2 重鎖 RNA が分離する。アンチセンス鎖は、細胞質に存在する RISC 複合体 (RNA-induced silencing complex) と結合し、成熟した miRNA として機能する³⁾¹⁰⁾。センス鎖は不安定であり急速に分解され細胞から消失すると考えられていたが、アンチセンス鎖由来の miRNA (-3p) とは別の標的遺伝子を認識する miRNA でもあり、miRNA の名称の末尾に -5p をつけて標記することとなった。RISC 蛋白と結合した成熟 miRNA は、配列特異的に標的 messenger RNA (mRNA) の 3' -untranslated region (3' -UTR) 領域に結合する。miRNA の配列のなかでも、標的 mRNA を認識する際重要な配列は 7-8 個の塩基で構成され seed 領域と呼ばれている。その前後に 1 ないし 2 塩基の標的とのミスマッチ配列が存在し、標的 mRNA と結合した際にバルジを形成する。バルジの存在は、より多くの mRNA の塩基配列を認識し標的とすることを可能としている¹¹⁾¹²⁾。一つの miRNA の標的遺伝子は 200~400 種類の標的 mRNA を持つと想定される。それぞれの miRNA の標的遺伝子については、Target Scan (www.targetscan.org) などで検索できる。一方、単一の遺伝子には数個の miRNA 結合部位が存在している。従って、miRNA と標的遺伝子は相互に複雑な制御ネットワークを形成している。標的 mRNA の 3' -UTR と結合した miRNA は、mRNA を分解したり、mRNA からの翻訳を阻害することで標的遺伝子の発現を抑制的に調節している¹⁾²⁾。最新の miRNA のデータベースは、miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/>) で確認できる。2014 年の最新版 (v.21) では、2603 種のヒト mature miRNA が登録されている。それぞれの miRNA は miR という略号に数字を付してネーミングされる。

【造血機構の制御】

in silico 解析によると、ゲノム上の遺伝子の約 60% は miRNA の標的と考えられ、動物モデルにおける miRNA 合成に関与している酵素のノックアウトは致死的である。動物モデルにおける研究で、骨髄移植による造血の再構築は Dicer のノックアウトにより障害されること、RISC 複合体の重要な成分である Argonaute2 (Ago2) のノックアウトは B リンパ球、赤血球産生を抑制してしまうこと、などから miRNA が造血機能にも不可欠の遺伝子であることは明らかである¹¹⁾¹³⁾。ヒト CD34 陽性造血細胞では 33 種類の miRNA が高発現している。幹細胞レベルで発現している miRNA プロフィールは、それぞれの細胞系統特異的な発現プロフィールへと変化する。miR-150 はリンパ系細胞の分化過程で、miR-146 は T リンパ系で高発現している。miR-223 の発現は転写因子である PU.1, C/EBP β , や NFI-A, C/EBP α で調節されており、顆粒球産生機構に関与していることが判明している。その他、顆粒球・単球系造血では miR-21, miR-196b, miR-424, miR-17-5p/20a/106a などの関与が報告されている。慢性リンパ性白血病では、miR-15, miR-16 の異常のため標的遺伝子である BCL-2 が高発現し発症すると考えられる¹⁴⁾¹⁵⁾。

【赤血球産生に関与する miRNA】

赤芽球系造血に関与する miRNA として、c-kit 遺伝子を標的とする miR-221/222, LMO2 遺伝子を標的とする miR-223, activin 受容体遺伝子を標的とする miR-24, myb 遺伝子を標的とする miR-150, トランスフェリン受容体遺伝子を標的とする miR-320, ヘモグロビンスイッチングや低酸素への反応に関与する miR-210, などがあげられる¹³⁾¹⁶⁾¹⁷⁾。しかし、これらの miRNA は必ずしも赤芽球系造血特異的ではない。

一方、miR-451 は赤血球系細胞で特異的に高発現している miRNA である。ゼブラフィッシュやマウスでは、miR-451 のノックアウトで成熟赤血球の産生が阻害され、重症の貧血が出現する^{17)~20)}。我々の観察では、ヒト赤芽球系前駆細胞の分化成熟過程で、miR-451 が約 250 倍 up-regulate されることを報告した²¹⁾。一方では細胞増殖に関与する miR-155 は著明に down-regulate され、miR-451 と miR-155 の相対発現量は赤芽球系分化のステップを反映すると考えられた²¹⁾ (図 6)。循環赤血球は miR-451 を顆粒球に比し約 1 万倍豊富に含有しておりその生理的機能が注目される。miR-451 が後期赤芽球系造血に必須であることは、前述のノックアウト動物の結果や、in vitro での赤芽球系分化誘導実験で明らかであるが、赤

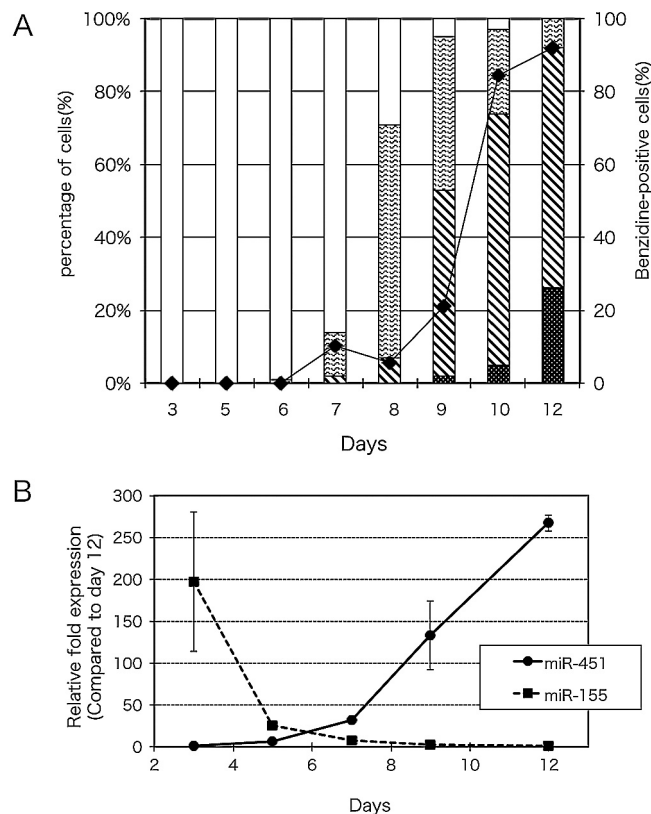


図6 正常ヒト赤芽球系前駆細胞の分化に特異的に発現する miR-451

A: 赤芽球系前駆細胞の形態学的成熟.

□ 未分化細胞, ▨ 好塩基性赤芽球, ▩ 多染性赤芽球, ■ 正染性赤芽球, ◆—◆ ベンチジン陽性細胞

B: miRNA の発現

miR-451 は day 3 発現量に対する相対発現量, miR-155 は day 12 発現量に対する相対発現量を示す. (Masaki et al., 2007 より)

芽球系細胞におけるその標的遺伝子は未だ明らかではない. 最も知られた miR-451 の標的遺伝子は YWHAZ (14-3-3- ζ) である. YWHAZ は, 酸化機構に関わっている分子であり, miR-451 は YWHAZ の発現を調節することで赤芽球系細胞の酸化還元システムに関与している可能性がある²²⁾.

3. サラセミアでの miRNA 異常

サラセミアなど Hb 異常症は遺伝子異常による疾患群であり, 遺伝子発現調節に関わる miRNA の発現異常も報告されている. 鎌状赤血球症では赤血球内 miR-320 量が正常者赤血球より低下しており, 標的であるトランスフェリン受容体遺伝子の高発現を生じることが, 赤芽球系造血充進のメカニズムの一つと示唆された²³⁾. 同じく鎌状赤血球症赤血球内の miR-451 量と miR-223 量が正常者より著明に増加していることも報告されている. 増加した miR-451 はマラリア原虫の *Plasmodium falciparum* の増殖を抑制すると報告され, 鎌状赤血球症が持つ重症マラリアへの耐性機序の一つではないかと推測される²³⁾. サラセミアの赤芽球系細胞では miR-210 の発現が γ -グロビン発現の充進と相関しており, miR-210 は胎児ヘモグロビン (HbF) の発現調節機構に関与している可能性がある²⁴⁾.

我々は, グロビン遺伝子異常による先天性貧血である β -サラセミアでは, 早期の赤芽球系分化段階で miR-451 の発現が充進していることを明らかにした²⁵⁾ (図7). 後期の赤芽球系造血に必須の miR-451 がなぜ早期の前駆細胞レベルで高発現しているのか, その生物学的意義は未だ明らかでないが, 後期の赤芽

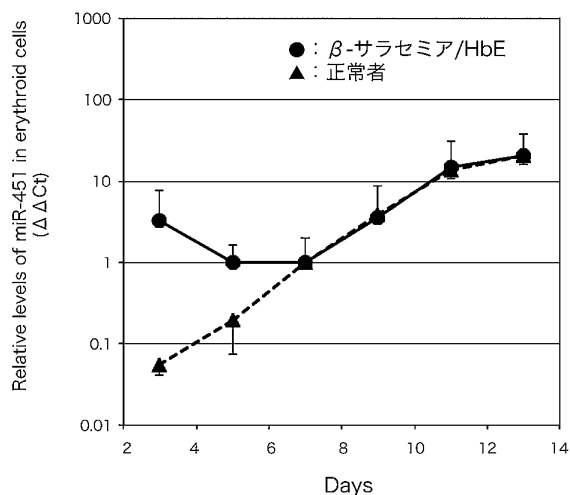


図7 β-サラセミア/HbE 症の赤芽球系分化における miR-451 発現異常 day 7 における発現量に対する相対発現量を示す. (Svasti et al., 2010 より)

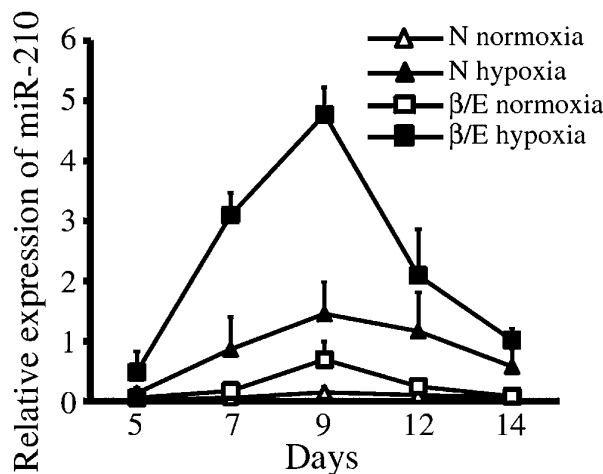


図8 低酸素培養での miR-210 発現亢進 正常者および β/E サラセミア症例の赤芽球系前駆細胞培養系で miR-210 の発現を RT-qPCR で解析した. let-7 miRNA に対する相対発現量を示す. (Sarukul et al., 2013 より)

球系造血に必須である miR-451 の異常は、赤芽球の崩壊が亢進する β-サラセミアの病態に関与していると示唆され、サラセミアの新しいバイオマーカー開発や新規治療への応用が期待される。

miR-210 は低酸素で発現する miRNA であり、細胞を低酸素状況に適応させ生存可能にしている²⁶⁾。その発現は HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) で誘導されている。一方、ミトラマイシンで分化誘導された白血病株化細胞、K562 で γ-グロビンの発現と相関して miR-210 の発現が生じる²⁴⁾。マウスの赤芽球系造血の過程でも miR-210 発現が誘導される。これらのことから、miR-210 は赤芽球系造血において発現しており、低酸素状態で発現が増強する重要な分子である。我々は、赤芽球の崩壊による無効造血と貧血による慢性の低酸素状況にあるサラセミアの赤芽球前駆細胞での miR-210 発現を解析した²⁷⁾。サラセミアにおける赤芽球系分化過程での miR-210 発現は、正常者より 4.9 倍 up-regulate され、低酸素培養下ではこの up-regulation はより増強した (図 8)。anti-miR-210 処理による miR-210 の発現を阻害すると、細胞増殖、α、β、γ-グロビン発現が低下した。これらの結果より、miR-210 発現は、サラセミアにおける赤芽球系造血亢進のメカニズムの一つと考えられた。

miRNA は遺伝子発現の調節因子であり、多くの病態では反応性変化を示していると考えられる一方で、染色体異常により生じた miRNA の切断、欠損が第一義的な遺伝子異常となり発症する慢性リンパ性白血病のように、miRNA それ自体の異常による病態も存在する。サラセミアにおいて同じ遺伝子型を持ちながら臨床像、重症度が異なる症例で、グロビン遺伝子異常への付加的遺伝子異常として miRNA 以上が関与している可能性があり、今後、サラセミアにおけるさらなる miRNA 解析がより深い病態把握を可能にすると期待される。

【バイオマーカーとしての miRNA】

miRNA は細胞から放出され、細胞外 miRNA として細胞間相互作用に関与したり、排泄されている。したがって、血液をはじめ尿、便、などほぼ全ての体液で miRNA は検出される。これらは、極めて安定した分子として存在し、様々な病態を反映したり疾患特異的なプロフィールを持って変動することから新世代のバイオマーカーとして注目されている²⁸⁾²⁹⁾。なかでも血漿 miRNA は比較的少ない侵襲で測定できることからバイオマーカーとしての解析が進んでいる³⁰⁾³¹⁾。赤芽球系細胞に特異的に発現している miR-451 と、未分化な造血細胞に発現している miR-155 の解析から²¹⁾、赤芽球が崩壊する無効造血では、血漿 miR-451 と miR-155 が上昇し、一方、成熟血球が崩壊する溶血性貧血では血漿 miR-451 のみが上昇

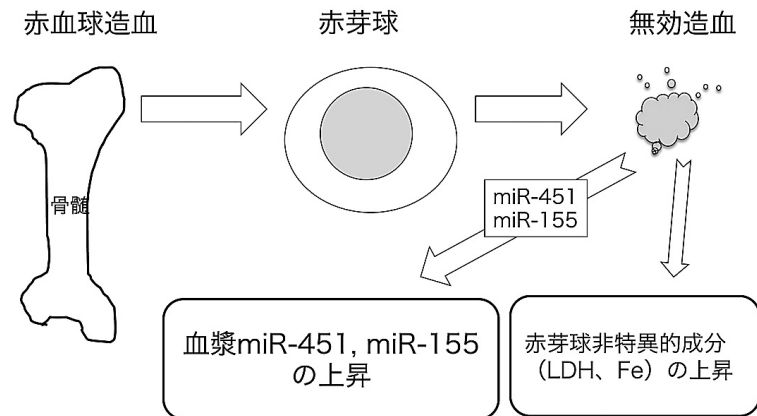


図9 無効造血のバイオマーカーとしての miRNA
 β -サラセミア等の病態で生じる無効造血では、骨髓中で赤芽球が崩壊する。赤芽球系細胞特異的な miR-451 と共に、赤芽球では発現しているが成熟赤血球には存在しない miR-155 が血漿中へ放出される。

すると予測し、サラセミア患者血漿で、miR-451 と miR-155 が有意の相関を持って上昇していることを確認した（日本血液学会発表，論文投稿中）（図9）。血漿中の miRNA は、exosome, microparticle (MP), アポトーシス小体などの小胞内 miRNA として、また、HDL 結合 miRNA, Ago2 結合 miRNA として存在している³⁰⁾³²⁾³³⁾。これらは安定な miRNA として運搬されており、室温や冷凍保存で長期間安定であり、バイオマーカーとして優れている³⁰⁾。一方、血漿 miRNA 測定法に関してはまだ標準化が進んでおらず、施設間はもとより世界的なデータを比較することが難しい。preanalytical な項目としては、血漿か血清か、採血法、血漿（血清）分離法、保存法、miRNA 抽出法、の統一、analytical な項目としては、miRNA 抽出法、増幅法、内部コントロール、基準値、などの統一が喫緊の課題である³⁴⁾³⁵⁾。

【治療薬としての可能性】

腫瘍においては特定の遺伝子異常が腫瘍病型決定に関与しており、遺伝子異常の同定は診断と治療方針決定、予後推定に重要であることを示してきた。慢性リンパ性白血病では miR-15, miR-16 の欠損、不活化があり白血病化機構の重要なイベントである。このような直接的な miRNA 異常が無い場合でも遺伝子発現の制御分子である miRNA は、遺伝子異常で生じる病態の新しい治療薬として大きな可能性を示している³⁶⁾。サラセミアでは、 α -グロビンと β -グロビンの産生に不均衡が生じて病態が発症するので、例えば β -サラセミアでは、 α -グロビン鎖の合成を抑制する miRNA は治療薬としての可能性を持つ。今後のさらなる基礎研究が有効な miRNA 治療薬を産み出すことが期待される。

おわりに

サラセミアは熱帯地域、亜熱帯地域に分布する遺伝性の貧血疾患である。特に東南アジア地域では罹患率が高く、この地域の人々の健康な社会生活に重大な影響を持っている。近年のアジア・アフリカ諸国の文化的・経済的発展に伴う人々の交流の増大により、サラセミアは世界へと広がりつつある。遺伝疾患として最も早くから解析されていたサラセミアに、現代では miRNA 解析による新たなアプローチが加わっている。より感受性と特異性が高い安定した miRNA 解析が確立され、新規治療法開発への突破口となることを期待したい。

謝辞

本総説の研究テーマの遂行に貢献いただいた研究室の多くの方々（眞寄志津佳，澁田樹，塩津弘倫，藤崎恵，田中由香，内田沙織，原田靖子，弘田幸子，榎本麻里，黒木千恵理，田島将太郎，白濱早紀，弘津

真由子, 上田沙保里, 小林唯一希, 竹内久琴, 古賀美咲, 中村優里), 九州大学大学院医学研究院の諸先生方 (原田実根, 原寿郎, 牟田耕一郎, 杉山大介, 安部康信, 白土基明), およびタイ国マヒドン大学の諸先生方 (Suthat Fucharoen, Pranee Winchagoon, Orawan Sarakul, Amporn Leecharoenkiat, Kanitta Surinoun, Supat Chamnanchanunt) へ深謝申し上げます (敬称は略させていただきました). 研究は, 日本学術振興会 (JSPS) の研究教育拠点事業 (2006-2011), 東アジア諸国若手血液学者育成プログラム若手研究者招へい事業 (2009-2011 および 2011), および The National Research Council of Thailand より一部支援されました.

参 考 文 献

- 1) Bartel DP : MicroRNAs : Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 116 : 281-297, 2004.
- 2) Ambros V : The functions of animal microRNAs. *Nature* 431 : 350-355, 2004.
- 3) Siomi H and Siomi MC : Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Mol Cell*. 38 : 323-332, 2010.
- 4) Higgs DR, Engel JD and Stamatoyannopoulos G : Thalassemia. *Lancet* 379 : 373-383, 2012.
- 5) Weatherall DJ. The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden. *Blood* 115 : 4331-4336, 2010.
- 6) Modell B and Darlison M : Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bulletin of the World Health Organization* 86 : 480-487, 2008.
- 7) Old JM : Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders. *Blood Reviews* 17 : 43-53, 2003.
- 8) Weatherall DJ : Phenotype-genotype relationships in monogenic disease : Lessons from the thalassemias. *Nature Rev Genetics* 2 : 245-255, 2001.
- 9) Thein AL : Genetic modifiers of β -thalassemia. *Hematologica* 90 : 649-660, 2005.
- 10) Kim VN, Han J and Siomi MC : Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Rev*. 10 : 126-139, 2009.
- 11) Shalgi R, Lieber D, Oren M and Pilpel Y : Global and local architecture of the mammalian microRNA-transcription factor regulatory network. *PLoS Computational Biology* 3 : e131, 2007.
- 12) Yousef M, Showe L and Showe M : A study of microRNAs in silico and in vivo : bioinformatics approaches to microRNA discovery and target identification. *FEBS Journal* 276 : 2150-2156, 2009.
- 13) Navarro F and Lieberman J : Small RNAs Guide Hematopoietic Cell Differentiation and Function. *J. Immunol.* 184 : 5939-5947, 2010.
- 14) Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M and Croce CM : Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101 : 2999-3004, 2004.
- 15) Iorio MV and Croce CM : MicroRNA dysregulation in cancer : diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Molecular Medicine* 4 : 1-17, 2012.
- 16) Zhan M, Miller CP, Papayannopoulou Th, Stamatoyannopoulos G and Song C-Z : MicroRNA expression dynamics during murine and human erythroid differentiation. *Exp. Hematol.* 35 : 1015-1025, 2007.
- 17) Lawrie CH : microRNA expression in erythropoiesis and erythroid disorders. *Br J Haematol.* 150 : 144-151, 2010.
- 18) Pase L, Layton JE, Kloosterman, Carradice D, Waterhouse PM and Lieschke GL : miR-451 regulates zebrafish erythroid maturation in vivo via its target *gata2*. *Blood* 113 : 1794-1804, 2009.
- 19) Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MW and Hannon GJ : A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* 465 : 584-9, 2010.
- 20) Papapetrou EP, Korkola JE and Sadelain M : A Genetic Strategy for Single and Combinatorial Analysis of miRNA Function in Mammalian Hematopoietic Stem Cells. *STEM CELLS* 28 : 287-296, 2010.
- 21) Masaki S, Ohtsuka R, Abe Y, Muta K and Umemura T : Expression patterns of microRNAs 155 and 451 during normal human erythropoiesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 364 : 509-514, 2007.
- 22) Yu D, dos Santos CO, Zhao G, Jiang J, Amigo JD, Khandros E, Dore LC, Yao Y, D'Souza J, Zhang Z, Ghaffari S, Choi J, Friend S, Tong W, Orange JS, Paw BH and Weiss MJ : miR-451 protects against erythroid oxidant stress by repressing 14-3-3 ζ . *Genes Dev.* 24 : 1620-1633, 2010.
- 23) LaMonte G, Philip N, Reardon J, Lacsina JR, Majoros W, Chapman L, Thornburg CD, Telen MJ, Ohler U, Nicchitta CV, Haystead T and Chi J-T : Translocation of sickle cell erythrocyte microRNAs into Plasmodium

- falciparum inhibits parasite translation and contributes to malaria resistance. *CellHost & Microbe* 12 : 187-199, 2012.
- 24) Bianchi N, Zuccato C, Lampronti I, Borgatti M and Gambari R : Expression of miR-210 during erythroid differentiation and induction of γ -globin gene expression. *BMB Rep.* 42 : 493-499, 2009.
- 25]** Svasti S, Masaki S, Penglong T, Abe Y, Winchagoon P, Fucharoen S and Umemura T : Expression of microRNA-451 in normal and thalassemic erythropoiesis. *Ann Hematol.* 89 : 953-958, 2010.
- 26) Yoshioka Y, Kosaka N, Ochiya T and Kato T : Micromanaging iron homeostasis : Hypoxia-inducible miR-210 suppresses iron homeostasis-related proteins. *JBC* 287 : 34110-34119, 2012.
- 27]** Sarakul O, Vattanaviboon P, Tanaka Y, Fucharoen S, Abe Y, Svasti S and Umemura T : Enhanced erythroid cell differentiation in hypoxic condition is in part contributed by miR-210. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 51 : 98-103, 2013.
- 28) 梅村 創 : microRNA バイオマーカーとしての意義. *日本臨床検査自動化学会誌* 34 : 267-274, 2009.
- 29) Blondal T, Nielsen SJ, Baker A, Andreasen D, Mouritzen P, Teilum MW and Dahlsveen IK : Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods* 59 : S1-S6, 2013.
- 30) Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB and Tewari M : Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105 : 10513-10518, 2008.
- 31) Zampetaki A, Willeit P, Drozdov I, Kiechl S and Mayr M : Profiling of circulating microRNAs : from single biomarkers to re-wired networks. *Cardiovascular Research* 93 : 555-562, 2012.
- 32) Reid G, Kirschner MB and van Zandwijk N : Circulating microRNAs : Association with disease and potential use as biomarkers. *Oncology Hematology* 80 : 193-208, 2010.
- 33) Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD and Remaley AT : MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature Cell Biology* 13 : 423-433, 2011.
- 34) McDonald JS, Milosevic D, Reddi HV, Grebe SK and Algeciras-Schimmich A : Analysis of circulating microRNA : Preanalytical and analytical challenges. *Clin Chem* 57 : 833-840, 2011.
- 35) Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, Nolte-'t Hoen EN, Piper MG, Sivaraman S, Skog J, Théry C, Wauben MH and Hochberg F : Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *Journal of Extracellular Vesicles* 2 : 20360, 2013.
- 36) Ling H, Fabbri M and Calin GA : MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nature Rev.* 12 : 847-865, 2013.

(参考文献のうち、数字がゴシック体で表示されているものについては、著者により重要なものと指定された分です.)