

令和 3 年 5 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02838

研究課題名(和文) 骨髄異形成症候群や先天性造血障害を誘発するエンドソーム交通異常の解明

研究課題名(英文) Abnormal endosomal traffic induced by Samd9/9L causing myelodysplastic syndromes and inherited bone marrow failure

研究代表者

稲葉 俊哉 (Inaba, Toshiya)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号：60281292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：Samd9とSamd9L(以下、Samd9/9L)は、モノソミー7を伴う骨髄異形成症候群(MDS)の責任発がん抑制遺伝子であるが、その機能亢進型の点変異が先天性造血不全を主徴とするSamd9/9L症候群を引き起こす。申請者は、Crispr/CAS9法を用いてSamd9/9L症候群のモデルマウスを作製し、解析したところ、骨髄、腎臓、生殖器等で、サイトカイン受容体の取り込み異常や、リソソーム機能亢進による受容体破壊の亢進が生じていた。結果の詳細はJ. Clin. Invest.誌に報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髄異形成症候群(MDS)は、白血病と同程度の頻度であり、血液疾患として稀なものではないが、かつて「不応性貧血」とか「くすぶり型白血病」とか呼ばれていたことが端的に示すように、造血不全と腫瘍の両方の性格を持つ難治性疾患である。Samd9/9L遺伝子は、その欠損がMDSを発症することが知られていたが、今回その機能亢進が造血不全を引き起こすことがヒトとマウスで確認された。MDSという難解な疾患の本質に迫る手がかりを与える研究成果であり、海外の研究者からも大きな反響があった。

研究成果の概要(英文)：Samd9 and Samd9L (hereafter Samd9/9L) are leukemia- and MDS- suppressor genes on 7q. Recent studies have indicated that gain-of-function mutations cause multiple organ failure including inherited bone marrow failure syndromes that are now designated as "Samd9/9L syndrome". Using Crispr/Cas9 technology, we established and analyzed a mice model carrying one of the causing mutations. The endocytosis of ligand-bound growth factors, as well as transferrin receptors was perturbed in the bone marrow, testis and kidney. In addition, enhanced lysosome function promoted cytokine receptor metabolism.

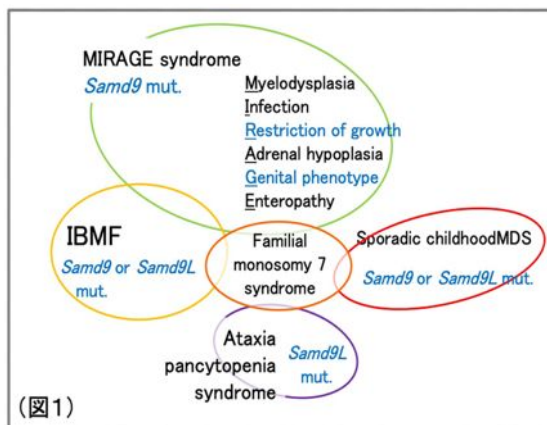
研究分野：血液学 分子生物学

キーワード：骨髄異形成症候群 造血不全 モノソミー7 サイトカイン

### 1. 研究開始当初の背景

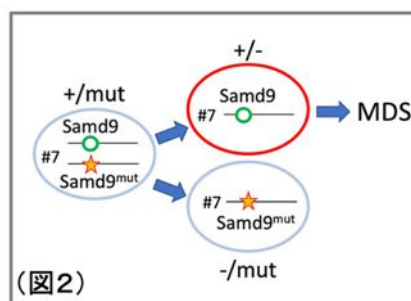
モノソミー7は骨髄性腫瘍で最も高頻度の染色体異常のひとつであるが、その発がんへの関与メカニズムは不明である。われわれは、小児の骨髄性腫瘍における共通微小欠損領域が7q21.3サブバンドにあることを見出し、その領域から関連遺伝子である *Samd9* および *Samd9L* (以下あわせて *Samd9/9L*) 遺伝子を単離した。続いて、*Samd9L* 遺伝子の欠損マウスを作製し、半数以上のヘテロおよびホモ欠損マウスが、MDSを発症することを見出したため(Nagamachi A, Inaba T, et al, Cancer Cell, 2013)、有力な7番染色体欠失の責任遺伝子候補であると考えた。(なお、ヒトと違い、マウスは *Samd9L* 遺伝子のみを有し、*Samd9* 遺伝子を持たない。)

ところが最近になって、*Samd9/9L* 遺伝子の機能亢進型変異が、多臓器先天異常を伴う造血不全を呈する新規の常染色体優性遺伝疾患(MIRAGE 症候群)や、汎血球減少を伴う小脳失調症(Ataxia pancytopenia)、先天性骨髄不全症候群(IBMF)、家族性モノソミー7症候群、孤発例の小児MDSなどにおいて多数報告され、新規疾患概念「*Samd9/9L* 症候群」として確立されるに至った(図1)。注目すべきことに、本症候群の乳幼児はモノソミー7を伴うMDSを高頻度に発症するが、通常と異なり、MDS細胞において常に変異側のアレルが欠失することから(図2)、変異遺伝子を失うことにより、*Samd9/9L* の機能亢進に起因する造血細胞の機能不全から回復する"revertant mosaicism"と呼ばれるメカニズムにより、発がんが促進されるという、過去に例のない、極めて複雑なメカニズムが考えられた(Inaba T, et al. Cancer Science 2021)。



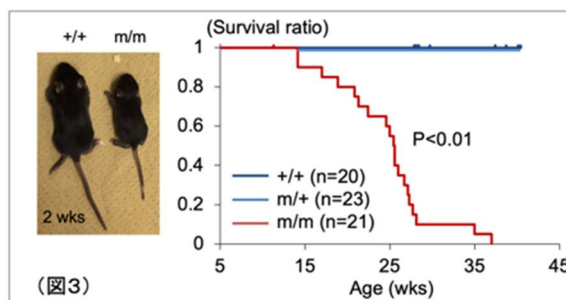
(図1)

もう一つ重要なことは、*Samd9/9L* がガンマ・インターフェロン ( $\text{IFN}\gamma$ )により、転写レベルで誘導されることである。実際に、マウス個体レベルでも、*Samd9L* はPOX族のウイルス感染防御に関与することが示されている。加えて、生化学的な検討では、*Samd9/9L* はエンドサイトーシスから初期エンドソームを経て、リソソームに至る、受容体代謝経路に関与しているデータが示されてきた。



(図2)

そこでわれわれは、Crispr/Cas9法を用いて、MIRAGE症候群の点変異(ヒト *Samd9*<sup>D769N</sup>)に対応するマウス *Samd9L*<sup>D764N</sup>を導入したマウスを作製したところ、そのホモ変異マウス(m/m)は、低体重、短命(図3)、貧血、B細胞減少、生殖器発達不全など、ヒト疾患と酷似した症状を示し、*Samd9/9L* 症候群のモデルマウスが得られた。



(図3)

### 2. 研究の目的

上述した、*Samd9/9L* 症候群の一亜型であるMIRAGE症候群のモデルマウスに加えて、以前作製し報告した *Samd9L* 遺伝子欠損マウス(Nagamachi A, Inaba T, et al, Cancer Cell, 2013)の造血能や諸臓器を精査することにより、*Samd9/9L* および変異 *Samd9/9L* 遺伝子の造血ならびに全身諸臓器における分子生物学的ならびに細胞生物学的な機能を解明する。得られたデータよりモノソミー7を伴うMDSの発症メカニズム解明へとつなげ、最終的には難解な疾患であるMDSの病態解明に発展させる。

### 3. 研究の方法

遺伝子改変マウスは、正常 *Samd9L*(+/+)に加え、*Samd9L*ヘテロ欠損(+/-)、ホモ欠損(-/-)、ヘテロ変異(m/+)、ホモ変異(m/m)マウスのほか、*Samd9L*変異・欠損(m/-)マウスを研究開始時まで樹立した。いずれもメンデルの法則に従って誕生したが、m/mマウスのみ、生直後より一見して体が小さく、活発ではあるが、全匹が半年以内に死亡した(図3)。それ以外のマウスは生後1年ごろまでは正常であるため(大半の+/-と-/-マウスは、それ以降にMDSを発症して死亡する) m/+マウスどうしと、+/-マウスどうしの掛け合わせにより、系統を維持した。

造血機能の検討は、(1)ex vivoで細胞系統ごとにトランスフェリン受容体やサイトカイン受

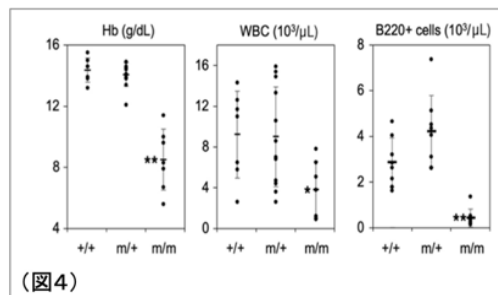
容体の取り込み速度の測定、(2) m/m、m/+マウスの骨髄移植による競合的骨髄再構築能の測定、(3) poly(I-C)腹腔内投与により、インターフェロンを誘導し、造血機能の観察などを行なった。

造血組織以外に、腎、精巣など異常の見られた臓器を採取し、通常の病理組織学的検索に加え、免疫化学染色、免疫蛍光染色などの形態学的検討を行なった。また、これらの臓器から樹立した初代培養細胞を用いて、サイトカイン受容体の代謝、インターフェロンに対する反応性の検討など、分子細胞レベルの検討を行った。

#### 4. 研究成果

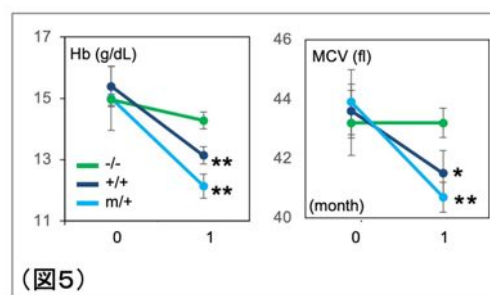
m/m マウスは体重が正常同胞の 60%程度で、貧血や生殖腺の異常など、MIRAGE 症候群と共通する症状を呈した。最も重度の症状を示したのは腎臓で、12 週ごろまでに嚢胞様変性をきたしたが、これはヒトでは報告されていない。一方で MIRAGE 症候群で特徴的な生直後の副腎皮質機能不全は見られなかった。これらの相違は、Samd9/9L 遺伝子発現パターンが、ヒトとマウスで大きく異なっており、ヒトでは胎児の副腎において Samd9 の発現が特段に高いのに対し、マウスでは生後の腎臓で Samd9L の発現が最高レベルに達することが原因であると考えられる。

m/m マウスは貧血と、B 細胞の顕著な減少による白血球減少を示した(図4)。貧血は小球性低色素性貧血で、離乳時に Hb が 8 (g/dL)程度であったものが、その後徐々に回復する点など、MIRAGE 症候群に類似した。血清鉄は正常で、単純な鉄欠乏性貧血は否定的であった。また、重篤な腎病変にもかかわらず、エリスロポエチン(Epo)は高値であった。一方、m/+マウスは貧血はなく、白血球も正常範囲であった。



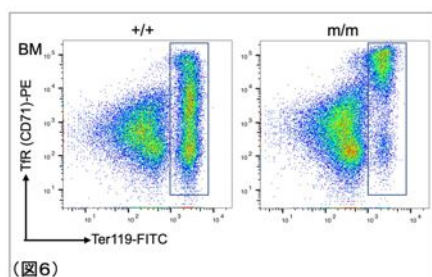
(図4)

MIRAGE 症候群では、繰り返すウイルス感染時に貧血の増悪が認められる。Samd9/9L がインターフェロンにより誘導される因子であることから、マウスモデルで貧血とインターフェロンの関連を検討した。インターフェロン誘導物質である poly(I-C)を腹腔内に投与すると、野生型マウス(+/+)では、1 月後に Hb や MCV の優位な低下が見られるが、Samd9L 欠失マウス(-/-)では貧血はないことから、インターフェロンは Samd9L を介して貧血を誘導することが判明した。さらに興味深いことには、末梢血データが正常範囲内のヘテロ変異マウス(m/+)において、Hb や MCV の低下がより顕著であることで、Samd9L の機能亢進が、貧血を増悪させることが示された。(図5)。

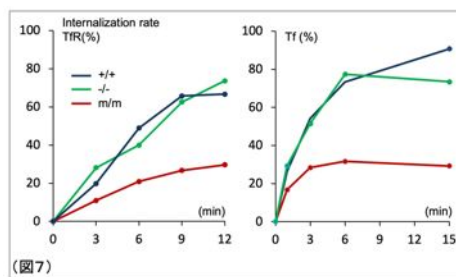


(図5)

以上の結果より、赤芽球細胞内の鉄欠乏が変異 Samd9/9L による貧血に関与することが示唆された。骨髄や脾細胞の FACS 解析では、Ter119 陽性の赤芽球表面トランスフェリン受容体(TfR)の高発現が見られた(図6)。そこで、TfR の取り込み低下による細胞内鉄欠乏を疑い、骨髄赤芽球で Tf 及び TfR の取り込み率を ex.vivo で測定したところ、いずれも正常(+/+)や Samd9L 欠損(-/-)マウス由来の赤芽球の半分以下に低下していることが判明した(図7)。加えて、m/m 赤芽球は Epo に対する反応性が低下しており、実際、骨髄における preCFU-e や CFU-E 画分などの赤芽球前駆細胞が減少していることが判明した。これらの結果より、m/m マウスの貧血の原因は、サイトカインに対する反応性の低下や鉄の取り込み低下など、受容体代謝異常とエンドソーム交通の制御異常に由来するものと考えられた。



(図6)

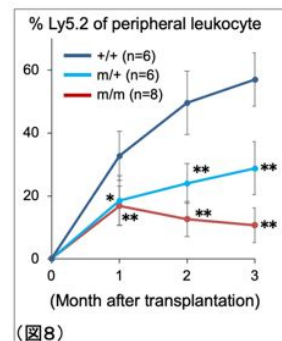


(図7)

"Revertant mosaicism"の機序による Samd9/9L 症候群からの高率かつ若年者の(5歳以下が多い)MDS 発症メカニズムの原因を探るため、競合的骨髄再構築能を検討した。すでに報告したように、Samd9L (-/-)や(+/-)骨髄細胞は、正常(+/+)骨髄細胞と比較して高い骨髄再構築能を有する(Cancer Cell, 2013)。このことは、正常人の骨髄細胞中のモノソミー7クローンの拡大を裏付ける所見として注目されてきた。



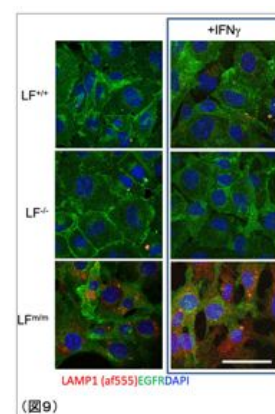
このデータとは対照的に、今回検討した m/m マウスの骨髄細胞や、末梢血液データが正常である m/+ マウスの骨髄細胞の再構築能は、正常マウス (+/+) に比較して顕著に低下していた (図 8)。これらのデータは、Samd9/9L 症候群の主症状である骨髄不全を説明するものであるが、それに加えて、Samd9/9L 症候群 (m/+) の骨髄中に出現したモノソミー 7 クローン (+/-) が、周辺の細胞 (m/+) との競合に打ち勝って急速な拡大を遂げ、幼少期に MDS を発症するメカニズムを示唆すると考えられる。さらに興味深いことは、Samd9/9L 症候群の患児が免疫不全 (マウスモデルでも図 4 に示したように B 細胞の著減が認められる) から、ウイルス感染を反復することである。感染時には IFN $\gamma$  が高値となることが想定されるが、それに対する感受性は (m/+) クローンで高く、 (+/-) や (-/-) クローンで低くなることが想定されるので (図 5)、モノソミー 7 クローンの増殖優位性は一層大きくなることが予想される。



(図 8)

結論として、増殖因子に対する (増殖にとって正の) 感受性と、炎症性サイトカインに対する (負の) 感受性の両面の差が、Samd9/9L やモノソミー 7 の骨髄性腫瘍発症促進の鍵であると考えた。

なお、腎臓や肺の初代培養細胞を主な材料に、非造血細胞の変性メカニズムを併せて検討した。m/m 細胞では、epidermal growth factor receptor (EGFR) に代表される増殖因子受容体の取り込み速度が上昇しており、リソソームが活性化して、受容体代謝が亢進していた。図 9 は初代培養肺線維芽細胞で、m/m 細胞がリソソームのマーカである lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1) を強く発現することを示す。こうした変化は、IFN $\gamma$  により増強された。実際、Samd9/9L は IFN $\gamma$  によって転写が促進されることが知られている。そこで、Samd9L (-/-) 細胞で IFN $\gamma$  に対する反応を解析したところ、受容体取り込みの亢進やリソソームの活性化は抑制されたことから、Samd9/9L の生理的機能のひとつは、IFN $\gamma$  の支配下において、ウイルス感染防御に関わるものと推測された。



(図 9)

詳細なデータと考察が、J. Clin. Invest. 誌 (2021) に掲載されているので、参照されたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Watanabe A, Inukai T, Kagami K, Abe M, Takagi M, Fukushima T, Fukushima H, Nanmoku T, Terui K, Ito T, Toki T, Ito E, Fujimura J, Goto H, Endo M, Look T, Kamps M, Minegishi M, Takita J, Inaba T, Takahashi H, Ohara A, Harama D, Shinohara T, Somazu S, Oshiro H, Akahane K, Goi K, Sugita K.	4. 巻 8
2. 論文標題 Resistance of t(17;19)-acute lymphoblastic leukemia cell lines to multiagents in induction therapy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Med.	6. 最初と最後の頁 5274-5288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.2356	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Nagamachi A, Kikuchi J, Kanai A, Furukawa Y, Inaba T.	4. 巻 105
2. 論文標題 Kinetics of cytokine receptor internalization under steady-state conditions affects growth of neighboring blood cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 e325-e327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2019.232959	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tsukamoto T, Nakahata S, Sato R, Kanai A, Nakano M, Chinen Y, Maegawa -Matsui S, Matsumura-Kimoto Y, Takimoto-Shimomura T, Mizuno Y, Kuwahara-Ota S, Kawaji Y, Taniwaki M, Inaba T, Tashiro K, Morishita K, Kuroda J.	4. 巻 17
2. 論文標題 BRD4-Regulated Molecular Targets in Mantle Cell Lymphoma: Insights into Targeted Therapeutic Approach.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Genomics Proteomics.	6. 最初と最後の頁 77-89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/cgp.20169	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shrestha R, Sakata-Yanagimoto M, Maie K, Oshima M, Ishihara M, Suehara Y, Fukumoto K, Nakajima-Takagi Y, Matsui H, Kato T, Muto H, Sakamoto T, Kusakabe M, Nannya Y, Makishima H, Ueno H, Saiki R, Ogawa S, Chiba K, Shiraishi Y, Miyano S, Mouly E, Bernard OA, Inaba T, Koseki H, Iwama A, Chiba S.	4. 巻 4
2. 論文標題 Molecular pathogenesis of progression to myeloid leukemia from TET-insufficient status.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood Adv.	6. 最初と最後の頁 845-854
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2019001324.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Abe Y, Yoshida M, Fujioka K, Kurosu Y, Ujiie R, Yanagi A, Tsuyama N, Miura T, Inaba T, Kamiya K, Sakai A.	4. 巻 59
2. 論文標題 Dose response curves for analyzing of dicentric chromosomes and chromosome translocations following doses of 1000 mGy or less, based on irradiated peripheral blood samples from five healthy individuals.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Rad. Res.	6. 最初と最後の頁 35-42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jrr/rrx052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue D, Fujino T, Sheridan P, Zhang YZ, Nagase R, Horikawa S, Li Z, Matsui H, Kanai A, Saika M, Yamaguchi R, Kozuka-Hata H, Kawabata KC, Yokoyama A, Goyama S, Inaba T, Imoto S, Miyano S, Xu M, Yang FC, Oyama M, Kitamura T.	4. 巻 32
2. 論文標題 A novel ASXL1-OGT axis plays roles in H3K4 methylation and tumor suppression in myeloid malignancies.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 1327-1337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-018-0083-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inaba T, Honda H, Matsui H.	4. 巻 131
2. 論文標題 The enigma of monosomy 7.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 2891-2898
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood-2017-12-822262	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inaba Toshiya, Nagamachi Akiko	4. 巻 112
2. 論文標題 Revertant somatic mosaicism as a cause of cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1383 ~ 1389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14852	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagamachi Akiko, Kanai Akinori, Nakamura Megumi, Okuda Hiroshi, Yokoyama Akihiko, Shinriki Satoru, Matsui Hirotaka, Inaba Toshiya	4. 巻 131
2. 論文標題 Multiorgan failure with abnormal receptor metabolism in mice mimicking Samd9/9L syndromes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI140147	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Akiko Nagamachi, Hirotaka Matsui, Satoru Shinriki, Akinori Kanai, Toshiya Inaba
2. 発表標題 The role of endosomal proteins, Samd9 and Samd9L, in hematopoiesis and myeloid diseases carrying monosomy 7.
3. 学会等名 日本癌学会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akiko Nagamachi, Hirotaka Matsui, Satoru Shinriki, Akinori Kanai, Toshiya Inaba
2. 発表標題 Regulation of receptor internalization by Samd9/Samd9L and their mutants
3. 学会等名 日本血液学会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲葉俊哉、長町安希子
2. 発表標題 モノソミー7：どこまでわかったか
3. 学会等名 日本血液学会 (教育講演) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長町安希子
2. 発表標題 Roles of Samd9/L in MDS associated with monosomy 7
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長町安希子
2. 発表標題 Samd9/Samd9L変異体による造血障害メカニズムの解明
3. 学会等名 日本血液学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	長町 安希子  (Nagamachi Akiko)  (20585153)	広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教   (15401)	
研究分担者	松井 啓隆  (Matsui Hirotaka)  (60379849)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授   (17401)	
研究分担者	金井 昭教  (Kanai Akinori)  (60549567)	広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教   (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件



8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------