

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390271

研究課題名(和文)

7番染色体長腕より単離したMDS/AML抑制遺伝子候補産物の機能解析

研究課題名(英文)

Functional analysis of candidate responsible genes for 7q deletion in MDS/AML

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

研究成果の概要(和文)：

骨髄系腫瘍に高頻度に見られる 7q 欠失の責任遺伝子候補として、われわれは *Miki*(*LOC253012*)、*Eff-1* (*Samd9*)、*Eff-2* (*Samd9L*) の三遺伝子を同定したので、当該遺伝子産物の機能解析を行った。その結果、*Miki* は中心体成熟の促進を通じて、分裂前中期を促進すること、*Eff-1* と *Eff-2* はエンドソームの融合に関与し、サイトカイン受容体の代謝を促進することが判明した。

研究成果の概要(英文)：

We analyzed functions of candidate responsible genes for 7q- that is frequently observed in myeloid malignancies. *Miki* (*LOC253012*) promote prometaphase in mitosis, whereas *Eff-1* (*Samd9*) and *Eff-2* (*Samd9L*) facilitate fusion of endosomes resulting in promotion of ligand-bound cytokine receptors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：血液学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：MDS, 骨髄性白血病, 7番染色体欠損, 発がん抑制遺伝子, 遺伝子欠損マウス, 分裂期異常, エンドソーム代謝

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病(AML)や骨髄異形成症候群(MDS)など、骨髄性腫瘍にモノソミー7や7番染色体長腕の欠失が高頻度にみられることは古く1960年代から認識されていた。この領域に骨髄前駆細胞の腫瘍化を抑制する遺伝子が存在するものと考えられ、その単離が試みられてきたが、欠失範囲が広くかつ曖昧で、責任遺伝子候補は杳として不明のままであった。われわれは、独自に開発した短プローブマイクロアレイ CGH 法により、小児

骨髄単球性白血病の症例から、7qの中でも特に高頻度に欠失する「ホットポイント」である7q22バンド近辺に共通微小欠失領域を見だし、その領域に座位する3遺伝子 *LOC253012*、*Samd9*、*Samd9L* を骨髄性腫瘍抑制遺伝子と考えた。なお、本研究で明らかになった三遺伝子産物の機能から、われわれはそれぞれの遺伝子を *Miki* (=mitotic kinetics inducer)、*Eff* (=endosome fusion facilitator) と命名した。

2. 研究の目的

われわれの発見した3遺伝子はほかの遺伝子との相同性がなく、機能を類推できるモチーフがなかった。このため、これらの遺伝子が骨髄性腫瘍の抑制遺伝子であるかを検討する目的で、三遺伝子産物の機能を解析した。

3. 研究の方法

定法に基づいて相同組み換え法による遺伝子破壊を行い、遺伝子欠損マウスを作成した。*Eff-1*遺伝子と*Eff-2*遺伝子はアミノ酸レベルで60%程度の相同性を持ち、共通のエクソン・イントロン構造を有する関連遺伝子であるが、マウスには*Eff-1*遺伝子が存在しないため、*Eff-2*欠損マウスを作成した。遺伝子発現の抑制はRNA干渉法を用いて行った。結合タンパク質の同定はTOF/TOF型質量解析器を用いた。

4. 研究成果

*Miki*欠損マウスは正常に誕生・発育し、長期に飼育したが骨髄性腫瘍など、特異的な表現型を示さなかった。しかし、ヒト細胞での*Miki*遺伝子発現の抑制は、特徴的かつ著明な分裂像の異常を来した。*Miki*は、間期にはゴルジ野に、分裂期には中心体や紡錘糸に局在する。*Miki*が高発現しており、分裂像や核形態が端正なHeLa細胞やK562細胞で*Miki*の発現を抑制すると、中心体の不明瞭化、紡錘糸張力の低下、多極化などの顕著な分裂異常が生じた。その結果、染色体が赤道面に整列せず、染色体散乱（コルヒチンミトーゼ）、染色体ロゼット形成、染色体が紡錘糸極に対し、同じ側に整列してしまうなど、顕著な染色体整列異常が生じた。このため、分裂細胞は後期に入れずに遅滞し、染色体早期脱凝集現象を生じて、二核・多核・小核細胞などMDSに特徴的な形態異常を生じた。これまで不明であった*Miki*の機能として、CG-NAPなど分裂期に必要な傍中心体物質（PCM）をゴルジ体から中心体に輸送するシステムの中でアダプターとして機能することが明らかとなった。たいへん興味深いことに*Miki*遺伝子とCG-NAP遺伝子は7q上で130Mb以内に近接しており、両者の発現低下が相まって分裂期進行に悪影響を及ぼしている可能性を含め研究を進めている。

*Eff-2*欠損マウス（ホモ、ヘテロ）はメンデルの法則に従って誕生し、1年半程度

の観察期間中、特に大きな異常は示さなかったが、その後高齢マウスの約半数がMDSなどの骨髄性腫瘍を発症した。質量解析器を用いた分析で、*Eff-2*は初期エンドソームに局在するEEA1（Early Endosome Antigen 1）と結合することが明らかとなった。免疫蛍光染色法でも、*Eff-2*は初期エンドソームでEEA1と共局在した。EEA1は初期エンドソームの融合と成熟を司り、結果として初期エンドソームからリソソームへの移行を促進する。*Eff-2*の抑制細胞ではリソソームの形成不良が生じる。リガンドと結合したサイトカイン受容体は細胞内に取り込まれ、初期エンドソームに局在するので、Titanの抑制はリガンドと結合した受容体の分解遅延をもたらし、受容体由来のシグナルを増強した。実際*Eff-2*抑制細胞ではサイトカイン刺激によるAktやRacの活性化などが遷延していた。また、*Eff-2*欠損マウスより単離した骨髄細胞は、メチルセルロース培地上で、特段の継代可能性を示すなど、サイトカインの過剰シグナルにより増殖能が亢進していることが判明した。この結果、われわれは*Eff*遺伝子は長く探し求められてきた7q欠失責任遺伝子である可能性が極めて高いものと考えた。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計12件）

査読のある原著論文のみ

1. Jiang, Q., Quaynor, B., Sun, A., Li, Q., Matsui, H., Honda, H., Inaba, T., Sprecher, E., Uitto, J. The Samd9L Gene: Transcriptional Regulation and Tissue-Specific Expression in Mouse Development. **J Invest Dermatol**, *in press*
2. Jin L., Tabe Y., Kimura S., Zhou Y., Kuroda J., Asou H., Inaba T., Konopleva M., Andreeff M., Miida T. Antiproliferative and proapoptotic activity of GUT-70 mediated through potent inhibition of Hsp90 in mantle cell lymphoma. **Br. J. Cancer** 104: 91-100, 2011
3. Ozaki Y., Matsui H., Nagamachi A., Asou H., Aki D., Inaba T. The dynactin complex maintains the integrity of metaphasic centrosomes to ensure transition to anaphase. **J. Biol. Chem** 286: 5589-5598, 2011
4. Okuya M., Kurosawa H., Kikuchi J.,

- Furukawa Y., Matsui H., Aki D., Matsunaga T., Inukai T., Goto H., Altura R. A., Sugita K., Arisaka O., Look A. T., Inaba T. Upregulation of survivin by the E2A-HLF chimera is indispensable for the survival of t(17;19)-positive leukemia cells. **J. Biol. Chem.** 285: 1850-1860, 2010
5. Yamasaki N., Miyazaki K., Nagamachi A., Koller R., Oda H., Miyazaki M., Sasaki T., Honda Z, Wolff L., Inaba T., Honda H. Identification of *Zfp521/ZNF521* as a cooperative gene for *E2A-HLF* to develop acute B-lineage leukemia. **Oncogene** 29: 1963-1975, 2010
 6. Akahane K., Inukai T., Inaba T., Kurosawa H., Look A.T., Kiyokawa N., Fujimoto J., Goto H., Endo M., Zhang X., Hirose K., Kuroda I., Honna H., Kagami J., Goi K., Nakazawa S., and Sugita K. Specific induction of CD33 expression by E2A-HLF: the first evidence for aberrant myeloid antigen expression in ALL by a fusion transcription factor. **Leukemia** 24:865-869, 2010
 7. Hirose K., Inukai T., Kikuchi J., Furukawa Y., Ikawa T., Kawamoto H., Oram S.H., Göttgens B., Kiyokawa N., Miyagawa Y., Okita H., Akahane K., Zhang X., Kuroda I., Honna H., Kagami K., Goi K., Kurosawa H., Look A.T., Matsui H., Inaba T., Sugita K. Aberrant induction of LMO2 by the E2A-HLF chimeric transcription factor and its implication in leukemogenesis of B-precursor ALL with t(17;19). **Blood** 116: 962-970, 2010
 8. Nagamachi A., Htun P.W., Ma F., Miyazaki K., Yamasaki N., Kanno M., Inaba T., Honda Z.I., Okuda T., Oda H., Tsuji K., Honda H. A 5' untranslated region containing the IRES element in the Runx1 gene is required for angiogenesis, hematopoiesis and leukemogenesis in a knock-in mouse model. **Dev Biol.** 345: 226-236, 2010
 9. Asou H., Matsui H., Ozaki Y., Nagamachi A., Nakamura M., Aki D., Inaba T. Identification of a common microdeletion cluster in 7q21.3 subband among patients with myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 383(2): 245-251, 2009
 10. Nagamachi A., Yamasaki N., Miyazaki K., Oda H., Miyazaki M., Honda Z-i., Kominami R., Inaba T., Honda H. Haploinsufficiency and acquired loss of *Bcl11b* and *H2AX* induced blast crisis of chronic myelogenous leukemia in a transgenic mouse model. **Cancer Sci.** 100: 1219-1226, 2009
 11. Aki D., Minoda Y., Yoshida H., Watanabe S., Yoshida R., Takaesu G., Chinen T., Inaba T., Hikida M., Kurosaki T., Saeki K., and Yoshimura A. Peptidoglycan and lipopolysaccharide activate PLC γ 2, leading to enhanced cytokine production in macrophages and dendritic cells. **Genes Cells.** 13: 199-208, 2008
 12. Watanabe-Okochi N., Kitaura J., Ono R., Harada H., Harada Y., Komeno Y., Nakajima H., Nosaka T., Inaba T., Kitamura T. AML1 mutations induced MDS and MDS/AML in a mouse BMT model. **Blood** 111: 4297-4308, 2008
- [学会発表] (計 32 件)
1. Matsui H., Nagamachi A, Ozaki Y, Asou H., Honda H., Inaba T. Titan (Samd9L), a candidate -7/7q- responsible gene product, downregulates cytokine signals by facilitating formation of early endosomes. 第 52 回米国血液学会総会 2010 年 12 月 6 日, 米国 オーランド
 2. 松井啓隆 7 番染色体長腕欠損による白血病発症メカニズム: 責任遺伝子の単離と機能解析 第 53 回放射線影響学会大会 (招待講演) 2010 年 10 月 20 日, 京都
 3. 松井啓隆, 長町安希子, 尾崎佑子, 麻生博也, 本田浩章, 稲葉俊哉 Titan (Samd9L), a candidate 7q- responsible gene product, promotes degradation of cytokine receptors. 第 72 回日本血液学会総会 2010 年 9 月 24 日, 横浜
 4. 松井啓隆, 長町安希子, 尾崎佑子, 麻生博也, 本田浩章, 稲葉俊哉 Titan (Samd9L), a candidate 7q- responsible gene product, promotes degradation of cytokine receptors. 第 69 回日本癌学会総会 2010 年 9 月 23 日, 大阪
 5. 尾崎佑子, 松井啓隆, 安藝大輔, 長町安希子, 稲葉俊哉 放射線誘発白血病の関連遺伝子 Miki/CG-NAP の分裂期中心体における機能 第 51 回原子爆弾後障害研究会 2010 年 6 月 6 日 長崎
 6. 長町安希子, 松井啓隆, 安藝大輔, 尾崎佑子, 麻生博也, 山崎憲政, 小田秀明, 稲葉俊哉, 本田浩章 7q-欠損白血病における Evil, Fbx110 の関与 第 51 回原子爆弾後障害研究会 2010 年 6 月 6 日 長崎
 7. 松井啓隆, 長町安希子, 尾崎佑子, 安藝大輔, 麻生博也, 本田浩章, 稲葉俊哉 7q 欠失責任遺伝子候補 *Titan* によるサイトカイン受容体分解制御 第 51 回原子

- 爆弾後障害研究会 2010年6月6日 長崎
8. 松井啓隆, 長町安希子, 尾崎佑子, 安藝大輔, 麻生博也, 本田浩章, 稲葉俊哉 7q欠失責任遺伝子候補Titanはアクチンリモデリングを制御する 第67回日本癌学会学術総会 2009年10月29日, 名古屋
 9. 松井啓隆, 長町安希子, 尾崎佑子, 安藝大輔, 麻生博也, 本田浩章, 稲葉俊哉 7q欠失責任遺伝子候補Titanの機能解析: アクチンリモデリング活性化と古典的 wnt 経路抑制による造血細胞制御 第71回日本血液学会学術集会 2009年10月24日, 京都
 10. 長町安希子, 松井啓隆, 安藝大輔, 尾崎佑子, 麻生博也, 宮崎和子, 山崎憲政, 小田秀明, 稲葉俊哉, 本田浩章 ヒストン脱メチル化酵素 Fbx110 の7q-AML/MDS 発症過程への関与 第71回日本血液学会学術集会 国立京都国際会館 平成21年10月24日, 京都
 11. 松井啓隆, 長町安希子, 尾崎佑子, 安藝大輔, 麻生博也, 本田浩章, 稲葉俊哉 7q欠失責任遺伝子候補Titanの機能解析: アクチンリモデリング活性化と古典的 wnt 経路抑制による造血細胞制御 第71回日本血液学会学術集会 2009年10月24日, 京都
 12. Yoshida, N., Sakai, A., Nitta, H., Okikawa, Y., Arihiro, K., Oda, M., Nishisaka, T., Fujiwara, M., Katayama, Y., Asaoku, H., Masunari, T., Matsui, H., Kimura, A. Level of sIL-2R depends on number of CD25 positive neoplastic cell and MMP-9 positive macrophage. 第71回日本血液学会学術集会 2009年10月24日, 京都
 13. 尾崎佑子, 松井啓隆, 安藝大輔, 長町安希子, 麻生博也, 稲葉俊哉 MDS 細胞の異型性の原因となる, ゴルジ体から中心へのタンパク輸送システム障害の解析 第71回日本血液学会学術集会 2009年10月22日, 京都
 14. 安藝大輔, 長町安希子, 尾崎佑子, 松井啓隆, 麻生博也, 稲葉俊哉 新規白血病抑制因子 Miki の EGF 受容体輸送への関与 第82回日本生化学会大会 2009年10月22日, 神戸
 15. 松井啓隆, 長町安希子, 尾崎佑子, 安藝大輔, 麻生博也, 本田浩章, 稲葉俊哉 7q欠失責任遺伝子候補Titanの機能解析: アクチンリモデリング活性化, および古典的 wnt 経路の抑制による造血細胞の制御 第68回日本癌学会学術総会 2009年10月1日, 横浜
 16. 長町安希子, 松井啓隆, 安藝大輔, 尾崎佑子, 麻生博也, 宮崎和子, 山崎憲政, 小田秀明, 稲葉俊哉, 本田浩章 ヒストン脱メチル化酵素 Fbx110 の7q-AML/MDS 発症過程への関与 第68回日本癌学会学術総会 2009年10月1日, 横浜
 17. 安藝大輔, 竹村幸敏, 長町安希子, 尾崎佑子, 松井啓隆, 麻生博也, 稲葉俊哉, 本田浩章 白血病責任遺伝子 Miki による細胞内小胞輸送の制御 第50回原子爆弾後障害研究会 2009年6月7日 広島
 18. 松井啓隆, 長町安希子, 尾崎佑子, 安藝大輔, 麻生博也, 稲葉俊哉, 本田浩章 7q欠失責任遺伝子候補 Titan はアクチンリモデリングを制御する 第50回原子爆弾後障害研究会 2009年6月7日, 広島
 19. 尾崎佑子, 松井啓隆, 安藝大輔, 長町安希子, 麻生博也, 稲葉俊哉 中心体成熟を促進する Tankyrase-1/Miki/CG-NAP 複合体の同定と機能解析 第50回原子爆弾後障害研究会 2009年6月7日, 広島
 20. 安藝大輔, 竹村幸敏, 長町安希子, 本田浩章, 尾崎佑子, 松井啓隆, 麻生博也, 稲葉俊哉 白血病責任遺伝子 MIKI による細胞内小胞輸送の制御 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 2008年12月12日, 神戸
 21. 尾崎佑子, 松井啓隆, 長町安希子, 麻生博也, 稲葉俊哉 中心体成熟を促進する Tankyrase1/Miki/CG-NAP 複合体の同定と機能解析 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 2008年12月9日, 神戸
 22. Asou H., Ozaki Y., Nagamachi, A., Aki D., Matsui H., Inaba T. Identification of two 7q genes encoding centrosomal proteins as myeloid tumor-suppressor candidates. The 50th Annual Meeting of American Society of Hematology, December 8, 2008, Moscone Center, San Francisco, CA.
 23. Nagamachi A., Asou H., Matsui H., Ozaki Y., Aki D., Miyazaki K., Yamasaki N., Miyazaki M., Wolff L., Koller R., Oda H., Inaba T., Honda H. Haploinsufficiency and deficiency of a 7q gene Titan (Samd9L) predispose leukemia development in cooperation with deregulated expression of a transcription factor, Evil, or a histone demethylase, Fbx110. The 50th Annual Meeting of American Society of

- Hematology, December 7, 2008, San Francisco, CA.
24. 麻生博也, 尾崎佑子, 長町安希子, 安藝大輔, 松井啓隆, 稲葉俊哉 分裂異常を修正し, 染色体不安定性を改善する MDS 治療薬の開発に向けて 第 67 回日本癌学会学術総会 2008 年 10 月 29 日, 名古屋
 25. 谷ヶ崎博, 高橋義行, 麻生博也, 稲葉俊哉, 小島勢二 若年型骨髄単球性白血病の発症に関与するモノソミー7 関連腫瘍抑制遺伝子の解析 第 70 回日本臨床血液学会総会 2008 年 10 月 12 日, 京都
 26. 長町安希子, 麻生博也, 松井啓隆, 安藝大輔, 尾崎佑子, 宮崎和子, 山崎憲政, 小田秀明, 稲葉俊哉, 本田浩章 7q- 候補遺伝子 TITAN の欠失は TGF β 経路抑制やエピジェネティック変化と協調して白血病に関する 第 70 回日本臨床血液学会総会 2008 年 10 月 11 日, 京都
 27. 松井啓隆, 長町安希子, 尾崎佑子, 安藝大輔, 麻生博也, 本田浩章, 稲葉俊哉 7q 欠失責任遺伝子候補 Titan はアクチンリモデリングを制御する 第 70 回日本臨床血液学会総会 2008 年 10 月 11 日, 京都
 28. 麻生博也, 尾崎佑子, 安藝大輔, 長町安希子, 松井啓隆, 稲葉俊哉 中心体構造蛋白質 CG-NAP をコードをする遺伝子は新たな 7q 欠失責任遺伝子候補である 第 70 回日本臨床血液学会総会 2008 年 10 月 11 日, 京都
 29. 黒澤秀光, 奥谷真由子, 菊地次郎, 古川雄祐, 犬飼岳史, 安藝大輔, 松井啓隆, 稲葉俊哉 17;19 転座型 ALL における caspase 非依存性細胞死の抑制 第 70 回日本臨床血液学会総会 2008 年 10 月 11 日, 京都
 30. 麻生博也, 松井啓隆, 尾崎佑子, 長町安希子, 安藝大輔, 大杉美穂, 稲葉俊哉 中心体成熟不全と白血病・骨髄異形成症候群 日本細胞生物学会ワークショップ 2008 年 6 月 29 日 横浜
 31. 尾崎佑子, 松井啓隆, 安藝大輔, 長町安希子, 麻生博也, 稲葉俊哉 放射線誘発白血病の原因遺伝子候補 CG-NAP の機能解析 第 49 回原子爆弾後障害研究会 2008 年 6 月 8 日, 長崎
 32. 長町安希子, 麻生博也, 松井啓隆, 宮崎和子, 山崎憲政, 稲葉俊哉, 本田浩章 レトロウイルスを用いた TITAN ノックアウトマウスにおける白血病発症機構の解析 第 49 回原子爆弾後障害研究会 2008 年 6 月 8 日, 長崎

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

本田 浩章 (HONDA HIROAKI)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授
研究者番号: 40245064
(H20→H21)
松井 啓隆 (MATSUI HIROTAKA)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教
研究者番号: 60379849

麻生 博也 (ASOU HIROYA)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授
研究者番号: 60243614
(H20→H21)
安藝 大輔 (AKI DAISUKE)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教
研究者番号: 50420500
(H20→H21)
宮崎 和子 (MIYAZAKI KAZUKO)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教
研究者番号: 00311811
(H20→H21)

(3) 連携研究者

()

研究者番号: