

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790912

研究課題名（和文） 7 番染色体長腕上にある白血病抑制遺伝子の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of candidate leukemia suppressor genes located on the long arm of chromosome 7

研究代表者

松井 啓隆 (MATSUI HIROTAKA)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授

研究者番号：60379849

研究成果の概要（和文）：7 番染色体長腕欠損による MDS/AML の責任遺伝子候補として単離した Samd9/Samd9L 遺伝子の機能解析を行った。Samd9L 遺伝子産物は一部が初期エンドソーム分画に局在し、Samd9L 遺伝子発現抑制細胞では、サイトカイン刺激後の初期エンドソームの融合が抑制される結果、エンドソーム分画に取り込まれたサイトカイン受容体の分解が低下し、エンドソーム分画に活性化された状態で蓄積するため、サイトカイン・シグナルの遷延が起こった。以上より Samd9/Samd9L は、初期エンドソームの融合促進を介してサイトカイン・シグナルを負に制御する因子であることが判明した。

研究成果の概要（英文）：We analyzed molecular functions of Samd9/Samd9L, genes isolated as candidate responsible genes for MDS/AML carrying monosomy 7/7q-. Samd9L protein was found to be partially localized at early endosomal fraction. In Samd9L-downregulated cells, the inhibition of fusion of early endosomes, which resulted in the accumulation of activated cytokine receptors in early endosomal fraction, caused prolongation of cytokine signals. Collectively, it became relevant that Samd9L negatively regulates cytokine signals through the promotion of the degradation of cytokine receptors by facilitating the fusion of early endosomes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：血液内科学

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：-7/7q- MDS, 初期エンドソーム

## 1. 研究開始当初の背景

われわれは、急性骨髄性白血病(AML)/骨髄異形成症候群(MDS)で高頻度に認められる 7 番染色体長腕欠損(7q-)の責任遺伝子候補として、3 つの遺伝子を単離した。3 つは Samd9, Samd9L, LOC253012 (Miki)遺伝子で、この

うち Samd9 と Samd9L はアミノ酸レベルで約 60%の相同性を有する。マウスは Samd9 遺伝子を欠くため、われわれは Samd9L 遺伝子欠損マウスを作製した。本マウスはメンデルの法則に従って正常に出生し当初は異常を呈さないが、約 2 年以上といった長期間の

観察後に、ホモ・ヘテロマウスが高頻度に MDS/AML を自然発症したことから、Samd9/Samd9L が 7q- の責任遺伝子として有望と考えた。

## 2. 研究の目的

そこでわれわれは、Samd9/Samd9L 遺伝子産物の機能解析に着手した。両遺伝子産物は約 160KDa の蛋白質で、N 末端側に SAM ドメインもしくはそれに類似した構造を有する以外に既知のドメイン構造は見られず、蛋白質構造からの機能推定は困難であった。このため Samd9/Samd9L と結合する蛋白質のスクリーニングを行ったところ、初期エンドソームに局在する Early endosomal antigen 1 (EEA1) と結合することを見出した。初期エンドソームは、リガンドと結合したサイトカイン受容体分子が細胞内に取り込まれる際（リガンド依存性エンドサイトーシス）、最初に形成される小胞であり、受容体分子はここから後期エンドソームをへて、リソソームと融合し分解されるか、あるいは細胞膜上に送り返され再利用される（リサイクリング）。Samd9L と EEA1 が結合すること、および Samd9L 抗体を用いた免疫蛍光染色での観察で Samd9L の初期エンドソームへの局在が見られたことから、申請者は Samd9/Samd9L がサイトカイン受容体の代謝を制御する可能性もあると考えた。そこで、Samd9L 発現を抑制した線維芽細胞を作製し PDGF で刺激したところ、PDGF 受容体分解が抑制され、サイトカイン・シグナル活性化が遷延することが判明した。そこで本研究では、Samd9/Samd9L がエンドソーム機能をいかに調節しサイトカイン・シグナルをコントロールするか、そして Samd9/Samd9L の発現抑制がどのように造血細胞の腫瘍化に関わるか解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

Samd9/Samd9L の機能を解析するため、Samd9L を標的とした shRNA 発現ベクターを構築した。本ベクターを線維芽細胞に導入し、Samd9L の発現を抑制した細胞を作成し、PDGF 刺激による PDGF 受容体の代謝を検討した。観察は、蛍光染色法による細胞内局在の確認、および(PDGF 受容体を含む)細胞表面たんぱく質をビオチン標識させたのちに PDGF 刺激し、細胞内に取り込まれた PDGF 受容体と細胞表面に残存する PDGF 受容体とをわけて定量可能とする手法を用いた。

また、Samd9L 遺伝子欠損マウスおよび対照細胞より骨髓を採取し、造血前駆細胞を単離して、サイトカインに対する感受性を下流のシグナル伝達因子のリン酸化で検討した。

これに加え、造血前駆細胞を用いたコロニー形成能の検討を行った。

一方、Samd9L 遺伝子欠損マウスの造血器悪性腫瘍発症への関与を確かめるため、新生児期マウスへのレトロウイルス感染による白血病発症実験、および骨髓移植モデルもちいた確認実験を行った。

## 4. 研究成果

Samd9/Samd9L によるエンドソーム機能制御の解明： Samd9L のサイトカイン・シグナル制御における機能を解析するため、shRNA により Samd9L の発現を抑制した線維芽細胞を作製した。この細胞で PDGF 刺激による PDGF 受容体の代謝を観察したところ、正常対照細胞では PDGF 刺激によって PDGF 受容体が細胞内エンドソーム分画に取り込まれ、後に速やかに後期エンドソーム/リソソームに移行して分解されるのに対し、Samd9L 発現抑制細胞では、PDGF 受容体の細胞内への取り込み(エンドサイトーシス)には異常がないものの、取り込まれた PDGF 受容体が初期エンドソーム分画に蓄積し、分解されないことがわかった。

この際、対照細胞では初期エンドソームどうしが互いに融合するのに対し、Samd9L 発現抑制細胞ではエンドソームの融合が阻害されるために、PDGF 受容体が活性化されたままの状態初期エンドソームに蓄積し、その結果サイトカイン・シグナル活性化が遷延することが判明した。

次に、マウス骨髓より造血前駆細胞を単離し、実験を行った。マウス造血前駆細胞は Samd9L を発現しており、線維芽細胞と同様にエンドソーム分画にその一部が局在することが確認された。続いて、本細胞を用いてサイトカインに対する反応性を観察した。Samd9L 遺伝子欠損マウス由来の造血前駆細胞は、野生型マウス由来の細胞に比し、サイトカイン・シグナルの遷延化が認められ、造血細胞を用いたコロニー・アッセイでは、Samd9L 遺伝子欠損マウス由来の造血細胞は 5 回以上のリプレーティング後もコロニーを再形成する能力を有することが判明した。

一方、これと並行して Samd9L 遺伝子欠損マウスを用いて白血病発症実験を行った。新生児期の本マウス、および対照マウスに骨髓球系腫瘍の発症を促すレトロウイルス MOL4070A を感染させたところ、Samd9L 遺伝子欠損マウス(ヘテロ/ホモマウス)では対照マウスよりも早期かつ高頻度に多彩な骨髓球系造血器悪性腫瘍を発症した。そこで、腫瘍細胞でのレトロウイルス挿入部位を inverse PCR 法により確認したところ、Samd9L 遺伝子欠損マウス特異的なレトロウイルス挿入部位として Evi-1, Fbxl10 遺伝子が特定された。また、Evi-1, Fbxl10 を過

剰発現させた造血細胞を用いた骨髄移植実験により、これら遺伝子の発現増加が Samd9L の発現低下と協調的に造血器悪性腫瘍の発症にかかわることが確認された。このうち Fbx110 遺伝子産物は、ヒストン H3K36 のメチル化を解除するエピゲノム修飾因子であり、Samd9L 遺伝子の欠損とエピゲノム変化との組み合わせがヒトにおいても重要であろうと推察された。

以上の研究結果、および Samd9L 遺伝子欠損マウス(ヘテロ/ホモマウス)が長期観察後に高率に MDS/AML を自然発症することから、Samd9/Samd9L は初期エンドソームの融合を促進してサイトカイン受容体の分解を進めることにより、サイトカイン・シグナルを負に制御する因子であることがわかった。また、Samd9/Samd9L 発現低下によるサイトカイン・シグナル制御の異常が、長期間にわたるエピゲノム変化や点突然変異の蓄積と協調的に MDS の発症にかかわっていると考えられた。

本研究成果をまとめた論文は投稿し、現在査読を受けている。

#### 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 4 件)

- ① 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. *Journal of Biological Chemistry* 286(7) 5589-5598, 2011 (査読有)
- ② Hiraga N, Imamura M, Abe H, Hayes CN, Kono T, Onishi M, Tsuge M, Takahashi S, Ochi H, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Tateno C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, Tanaka S, Chayama K. Rapid emergence of telaprevir resistant hepatitis C virus strain from wildtype clone in vivo. *Hepatology* 54(3) 781-788, 2011 (査読有)
- ③ 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* 131(7) 1428-1434, 2011 (査読有)
- ④ Hirose K, Inukai T, Kikuchi J, Furukawa Y, Ikawa T, Kawamoto H, Oram SH, Göttgens B, Kiyokawa N, Miyagawa Y, Okita H, Akahane K, Zhang X, Kuroda I, Honna H, Kagami K, Goi K, Kurosawa H, Look AT, 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(6) 962-970, 2010 (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

- ① Matsui H, Titan (Samd9L), a candidate -7/7q- responsible gene product, downregulates cytokine signals by facilitating formation of early endosome. 第53回米国血液学会年次総会 2011年12月12日, サンディエゴ(米国)
- ② Matsui H, Analysis of epigenetic alterations by 5-Azacytidine that induces erythroid differentiation using a next generation sequencer. 第73回日本血液学会学術集会 2011年10月15日, 名古屋市
- ③ Matsui H, Analysis of epigenetic changes by 5-Azacytidine that induces erythroid differentiation using a next generation sequencer. 第70回日本癌学会学術総会 2011年10月5日, 名古屋市
- ④ Matsui H, Development of myeloid neoplasia in mice deficient for *endosome fusion facilitator (eff)-2* gene that mimic human myeloid malignancies carrying monosomy 7. 第70回日本癌学会学術総会 (招待講演) 2011年10月3日, 名古屋市
- ⑤ Matsui H, Isolation and characterization of 7q- responsible genes that encode endosomal proteins. 第2回日本血液学会国際シンポジウム (招待講演) 2011年4月23日, 長崎市
- ⑥ Matsui H, 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, オーランド(米国)
- ⑦ 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, 京都市
- ⑧ Matsui H, 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, 横浜市
- ⑨ Matsui H, Titan (Samd9L), a candidate

-7/7q- responsible gene product, promotes degradation of cytokine receptors. 第69回  
日本癌学会総会 2010年9月23日, 大阪市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 啓隆 (MATSUI HIROTAKA)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授

研究者番号：60379849