

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501256

研究課題名(和文)急性白血病発症における小胞輸送脱制御の意義

研究課題名(英文)Implication of deregulated vesicles' traffic in the occurrence of acute leukemia

研究代表者

佐竹 正延 (Satake, Masanobu)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：50178688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの骨髄異型性症候群(MDS)は、高齢者に発症する血液難病のひとつであり、白血病を続発することで難治となる。本研究では、細胞の恒常性を維持するのに必須な小胞輸送機能と、MDSとの関連につき探索した。取り上げた遺伝子は、研究代表者の発見したSMAP1遺伝子である。SMAP1欠損マウスは生後1年を経た高齢になると、その半数がMDSを発症した。またSMAP1欠損細胞では、トランスフェリンとc-Kit分子の輸送異常がみられた。以上により、SMAP1欠損マウスをヒトMDSのモデル・マウスとして確立し、小胞輸送の脱制御と、細胞増殖や発がんとの関連を実証することができた。

研究成果の概要(英文)：The formation of clathrin-coated vesicles is essential for intracellular membrane trafficking and is triggered by the ARF GTPases. We previously identified SMAP1 as an ARF GTPase-activating protein. We targeted Smap1 in mice and Smap1-deficient erythroblasts exhibited enhanced transferrin endocytosis. In addition, Smap1 deficiency impaired the sorting of internalized c-Kit from multivesicular bodies to lysosomes, resulting in accumulation of c-KIT that was accompanied by enhanced activation of ERK and increased cell growth. Interestingly, aged Smap1-deficient mice developed anemia associated with morphologically dysplastic cells of erythroid-myeloid lineage, which are abnormalities similar to myelodysplastic syndrome (MDS) in humans. Furthermore, some Smap1-deficient mice developed acute myeloid leukemia (AML) of various subtypes. Collectively, the deregulation of clathrin-dependent membrane trafficking is likely involved in the development of MDS and subsequent AML.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：小胞輸送 ArfGAP 骨髄異形成症候群 急性骨髄性白血病 遺伝子ターゲティング

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) ヒト白血病の分子細胞生物学と小胞輸送。

ヒト急性白血病の発症には、2ヒットの遺伝子異常が関与する。例えば急性骨髄性白血病で最も高頻度に見られる染色体異常である t(8;21) 転座では、転写因子をコードする Runx1 と MTG8 がキメラ遺伝子を形成する。しかしながらキメラ遺伝子の生成のみでは、白血病の発症には至らない。ヒト白血病サンプルにおいては、t(8;21) 転座の他に、増殖因子受容体である c-Kit や Flt-3 の点変異が同定されている。2段階ヒットにおいて、増殖因子受容体の異常は細胞増殖能を亢進させ、転写因子の異常は細胞分化を阻害する。その結果、未分化な細胞が増殖・蓄積するのが急性白血病の病態である。研究代表者(以下、代表者と略称する)は、Runx 遺伝子の発見以来、長年にわたり Runx1 による白血病発症のメカニズムを研究してきた。近年の成果としてはヒト白血病サンプルを用いた遺伝子発現プロファイル解析や、マイクロ RNA-27 による Runx1 の転写後制御などが挙げられる。

上記のように白血病の分野では主に、増殖因子受容体と転写因子が研究対象であったが、近年、小胞輸送の関連分子もまた注目を惹きつつある。急性リンパ芽球性白血病の原因遺伝子である MLL 転写因子は、複数のパートナー遺伝子とキメラ遺伝子を形成する。その中には EPS15, CALM, endophilin, SMAP1 など、小胞輸送関連分子が少なからず存在する。しかしながら白血病発症における小胞輸送の意義は、全く未知の領域であった。

### (2) ArfGAP から見た小胞輸送。

ホメオスタシスを維持するために細胞は、細胞膜タンパクのエンドサイトーシス、分泌タンパクのエクソサイトーシスのみならず、機能の異なる細胞内各小器官への膜タンパクの分配など、内外にわたって複雑で、しかも精緻な交通路を確保している。このシャトルの実態は、膜タンパクを積み荷とする小胞のやりとりである。供与膜から出芽が起こり、小胞が形成される過程は、Ras 関連の small GTPase である Arf、及び Arf の GTPase 活性化タンパクである ArfGAP によって調節されている。代表者の研究対象である SMAP1 遺伝子は ArfGAP をコードするが、SMAP1 の発見は、以下の点で注目を集めた。即ち、SMAP1 は細胞膜上のトランスフェリン受容体のクラスリン小胞へのエンドサイトーシスを調節すること、SMAP1 タンパクがクラスリンと直接に結合することを、ArfGAP として世界で初めて報告した。つまり、小胞形成の素課程の一端を明らかにした。その後、代表者はホモログである SMAP2 も発見し、こちらは初期エンドソーム・トランスゴルジネットワーク間の

輸送を調節することを解明した。

SMAP1, SMAP2 ともに、クラスリンに結合することが特徴であるが、代表者はその普遍妥当性につき、30 個の全 ArfGAP タンパクにつき検証した。その結果、ArfGAP はクラスリン結合モチーフを有するグループ(SMAP を含む)と、持たないグループに大別されることが判明した。そして従来の知見と照合すると、前者がクラスリン小胞の輸送に、後者が COP 小胞の輸送に関与していることと、見事に対応している。また、細胞内小器官を結ぶ各径路に、SMAP1,2 を含め、知られている Arf, ArfGAP を割り振ると、径路ごとに特有なパターンで、小胞構成要素(クラスリン、COP、アダプター)、Arf, ArfGAP が関与することもうかがえた。即ち、小胞輸送の径路特異性が保証される理由の一つは、この組み合わせに帰着できる。さらに、SMAP 遺伝子の進化系統についても調査し、酵母にまで保存されていることを見出し、SMAP が細胞の小胞輸送機能を支える、最も基本的な遺伝子の一つであることを明らかにした。

### (3) ヒト MDS、白血病と SMAP1 遺伝子。

上記のように、細胞生物学的な視点からの SMAP 研究が重要であるのは明らかとなったわけであるが、代表者はその病理学的意義の可能性についても興味を抱いた。そこで SMAP1 の個体レベルにおける機能を解明すべく、ノックアウト・マウスの作成を試みた。そして見出した表現型というのが、生後1年以上を経過した老化マウスの末梢血における貧血と、ハウエル・ジョリー小体を含む異型血球の出現であった。これらの所見は、本 SMAP1(-/-)マウスが、ヒトの骨髄異型性症候群(MDS)に対応する可能性を強く示唆している。ヒト MDS は老人性疾患として有名な疾患であり、しかも白血病を続発する。実際に本 SMAP1(-/-)マウスも白血病を発症した。これにより代表者の研究は、白血病発症における小胞輸送脱制御の意義という、新たな転回点に到達したことになる。

## 2. 研究の目的

ヒト白血病は増殖因子受容体と転写因子の2ヒットの遺伝子異常により発症するが、近年、小胞輸送調節分子の白血病発症への関与も注目されつつある。供与膜からの小胞形成過程は、small GTPase である Arf とその活性化タンパクである ArfGAP によって調節されており、SMAP1 遺伝子は ArfGAP をコードする。SMAP1 欠損マウスを作出したところ、ヒトの骨髄異型性症候群(MDS)に類似の表現型を呈し、さらに白血病を続発した。本研究では SMAP1 マウスを、MDS から白血病発症へといたるモデルとして確立し、SMAP1 の調節するエンドサイトーシス機能と、血球分化の異常・がん化との関連を分子レベルで解明

することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウスの作成。

SMAP1 遺伝子の第 1 エクソンをネオマイシン耐性遺伝子で置換するようなターゲティング・コンストラクトを作成し、ES 細胞にて遺伝子置換を行った。置換に成功した細胞クローンを、CD1 マウスの 8 細胞期胎仔に移植し、仮母親にて発生させ、キメラマウスを得た。次いで、C57BL マウスに 10 代以上、戻し交配を行い、その後解析に供した動物実験に関しては、東北大学動物実験委員会の審査を経て、許可されたものである。

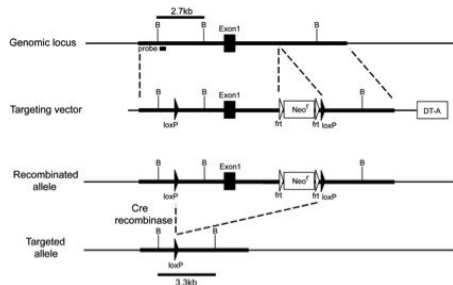


図 1 SMAP1 遺伝子の第 1 エクソンをネオマイシン耐性遺伝子で置換するターゲティング・コンストラクト。

#### (2) 細胞培養。

骨髄由来マスト細胞(BMMC)は、マウス骨髄細胞を IL-3 と SCF の存在下で培養することにより、得た。BMMC は、c-Kit を高発現しており、c-Kit のエンドサイトーシスと細胞内輸送、分解を見るのに適している。マウス胎仔線維芽細胞(MEF)は、16.5 日齢の胎仔より調整した。

#### (3) 小胞輸送を評価する系。

Alexa Fluor 488 を結合したトランスフェリンを用いて、エンドサイトーシスやサイクリングを測定した。c-Kit については、EYFP-c-Kit を細胞にトランスフェクトし、その細胞内輸送をモニターした。

(4) その他の細胞生物学・分子生物学的解析法は、一般的な標準に従った。

### 4. 研究成果

#### (1) SMAP1 は血球細胞、特に赤血球系統で高発現している。

野生型マウスの骨髄細胞を採取し、フローサイトメトリーにて各血球系統に分画して、RNA を調製した。RT-PCR にて SMAP1 転写産物の量を測定したところ、ほぼ全ての系統で発現を認めた。特に高発現が認められたのは、MEP 分画と Ter119+分画であった。即ち、SMAP1

は赤血球系統で、高発現していた。

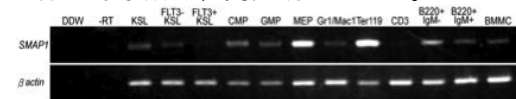


図 2 野生型マウス、骨髄細胞の各種分画における、SMAP1 転写産物の検出。

#### (2) SMAP1 欠損細胞では、活性化型 Arf が増加する。

マウス骨髄細胞からタンパクを調製してイムノプロットを行った。Arf6 の量は、野生型でも SMAP1 欠損細胞でも、同程度の発現であった。しかしながら、GST-GGA1 に結合している Arf6、即ち、GTP を結合している活性化型の Arf6 の量は、SMAP1 欠損細胞で劇的に増加していた。SMAP1 は、Arf6 を不活化するように作用する分子であるから、SMAP1 の欠損により、活性化型 Arf6 が増加したのは、理に適っている。

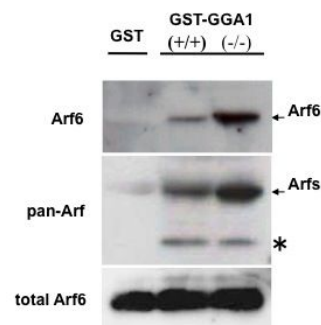


図 3 活性化型 Arf6 の定量。

#### (3) SMAP1 欠損細胞では、トランスフェリンのエンドサイトーシスが亢進する。

マウス骨髄細胞 Ter119+分画を用い、トランスフェリンの細胞内への取り込みを測定すると、SMAP1 欠損細胞では野生型より約 40%、亢進していた。同様の傾向は、MEF 細胞でもみられたことから、トランスフェリンのエンドサイトーシス亢進は、SMAP1 欠損細胞に普遍的な現象であると推測できる。なお、リサイクリングについては野生型、SMAP1 欠損細胞で同程度であった。

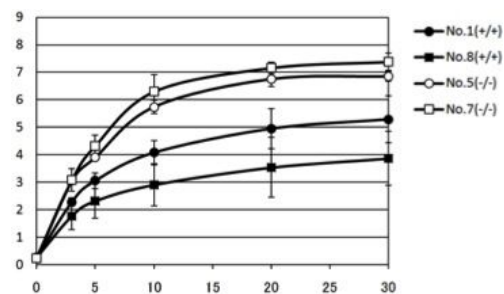


図 4 トランスフェリンのエンドサイトーシス。黒丸が野生型細胞、白丸が SMAP1 欠損細胞。

(4) SMAP1 欠損細胞では、細胞内に取り込ま

れた c-Kit の分解が、著しく遷延する。BMMC に SCF 添加し、c-Kit 分子の細胞内輸送動態を評価した。先ず、細胞内への取り込みについては、野生型と SMAP1 欠損細胞とで替りはなかった。この点は、上記のトランスフェリンのエンドサイトーシスの場合とは異なる。次に、いったん細胞内に取り込まれた c-Kit 分子は、野生型細胞の場合には、早期に分解され、消失した。それに対し SMAP1 欠損細胞の場合は、分解が遅れ、SCF 添加 60 分後でも残存しているのが認められた。

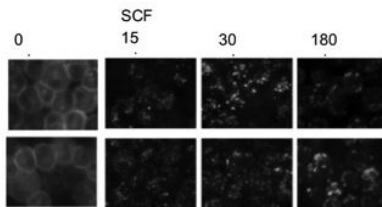


図 5 c-Kit の細胞内への取り込みと分解。  
上段は野生型細胞、下段は SMAP1 欠損細胞。

(5) SMAP1 欠損細胞では、増殖シグナルが亢進している。

SCF と結合した c-Kit 分子は、リン酸化とユビキチン化を受け、細胞内に取り込まれる。そして、アダプター分子である Grb 2 と会合し、シグナルを伝達し、ERK がリン酸化される。野生型細胞と比較し SMAP1 細胞では、c-Kit のリン酸化は変わらないものの、ユビキチン化、Grb 2 との会合、ERK のリン酸化のいずれもが、有意に亢進していた。したがって、細胞内に取り込まれ、いまだ分解されずにいる c-Kit 分子も、増殖シグナルを発信することが可能であることが示唆された。実際、細胞増殖能の指標である、トリチウム・チミジンの酸不溶性分画への取り込みが、SMAP1 欠損細胞では増大していた。

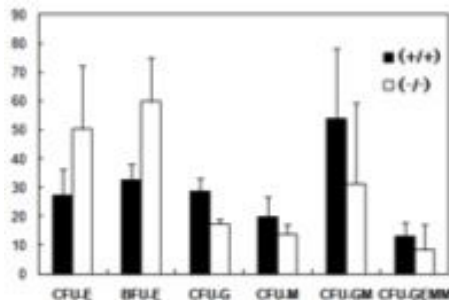


図 6 c-Kit 分子のリン酸化・ユビキチン化と、増殖シグナル

(6) SMAP1 欠損細胞では、c-Kit の MVB からライソゾームへの輸送が、傷害されている。MEF 細胞に EYFP-c-Kit を導入・発現させて、SCF 添加後の c-Kit の挙動を追跡した。細胞内小器官は、各種マーカーを用いて同定した。その結果、細胞内に取り込まれた c-Kit 分子は、初期エンドソームから multivesicular

body (MVB) には到達するものの、そこで貯留し、ライソゾームへの輸送が著しく傷害されていることが判明した。よって、分解が遅れるのは、ライソゾームに運ばれないからであった。このことは、SMAP1 分子が小胞形成を調節しているのは、MVB 上での過程であることを意味している。

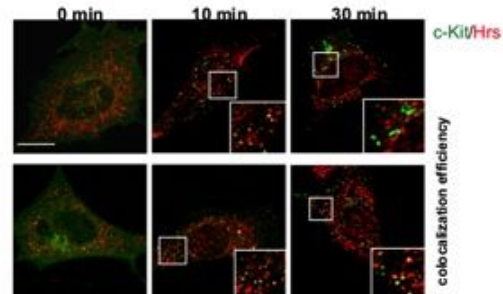


図 7 c-Kit 分子の MVB (Hrs が指標となる) からの輸送。上段は野生型細胞、下段は SMAP1 欠損細胞。

(7) 老齢の SMAP1 欠損マウスの半数が、MDS を発症する。

SMAP1 欠損マウスは、生後 1 年間は特に目立った変化を示さない。しかしながら、約 1 年を経過するころから、約半数のマウス個体が貧血を呈するようになる。このことは、末梢血の解析により判明した。貧血は、正染性・大球性貧血である。さらに末梢血には、野生型マウスでは決して見られない、各種の異型性血球が頻りに観察された。ハウエル・ジョリー小体、多染性赤血球、赤芽球、巨大血小板、過分節好中球などである。以上の所見は、ヒトの MDS の病理像と極めて類似しており、SMAP1 欠損マウスは MDS を発症したと結論された。

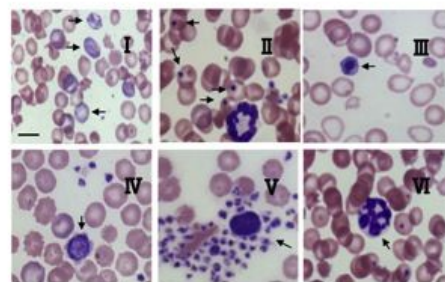


図 8 SMAP1 欠損マウスの末梢血スミア像。

(8) SMAP1 欠損マウスの骨髄・脾臓では、赤芽球系統の増殖亢進がみられる。

骨髄細胞、脾細胞を採取して、フローサイトメトリー解析を行った結果、赤芽球系統の細胞分画の割合と細胞数が、SMAP1 欠損マウスでは増加していた。骨髄細胞を用いて測定した CFU-C の値も、SMAP1 欠損では高く(約、1.5-2.0 倍)になっていた。したがって、骨髄・脾臓では赤芽球系統の細胞分画の増殖亢進が見られるのだが、それは分化の異常を伴う



ものであり、無効造血であり、最終的には貧血につながっているものと、推測された。

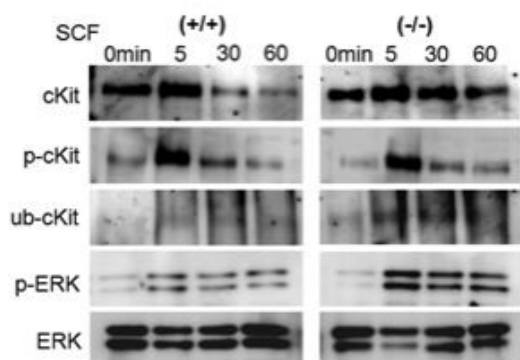


図 9 骨髓細胞を用いて測定した CFU-C。黒が野生型細胞、白が SMAP1 欠損細胞。

(9) MDS マウスの半数が、急性骨髄性白血病を発症する。

SMAP1 欠損マウスが老齢になると、MDS を発症することを上に述べたが、そのマウスのさらに半数に、白血病の発症が見られた。白血病のタイプは、骨髓・脾臓・末梢血のフローサイトメトリー解析の結果、急性骨髄性と診断された。さらに詳細にみると、白血病は赤白血病・単球性白血病などに分類できた。



図 10 SMAP1 欠損マウス (右) で見られた、急性白血病。肝臓と脾臓への腫瘍細胞の浸潤。左は野生型マウス。

(10) 結論、研究の意義

SMAP1 欠損マウスを、ヒト MDS のモデル・マウスとして確立することができた。この場合 SMAP1 欠損は、MDS 発症の直接の原因というより、素因を形成したといえる。また、本研究により、小胞輸送の脱制御と、細胞増殖や発がんとの関連を、マウス個体レベルで、初めて実証することができたと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Kon, S., Kobayashi, N. and **Satake, M.** Altered trafficking of mutated growth factor receptors and their associated molecules: implication for human cancers.

Cellular Logistics 2014.  
10.4161/cl.28461 査読有り

Funaki, T., Kon, S., Tanabe, K., Natsume, W., Sato, S., Shimizu, T., Yoshida, N., Wong, W.F., Ogura, A., Ogawa, T., Inoue, K., Ogonuki, N., Miki, H., Mochida, K., Endoh, K., Yomogida, K., Fukumoto, M., Horai, R., Iwakura, Y., Ito, C., Toshimori, K., Watanabe, T. and **Satake, M.**

The Arf GAP SMAP2 is necessary for organized vesicle budding from the trans-Golgi-network and subsequent acrosome formation in spermiogenesis. Mol. Biol. Cell 24: 2633-2644, 2013.

mbc.E13-05-0234v124/17/2633 査読有り

Kon, S., Minegishi, N., Tanabe, K., Watanabe, T., Funaki, T., Wong, W.F., Sakamoto, D., Higuchi, Y., Kiyonari, H., Asano, K., Iwakura, Y., Fukumoto, M., Osato, M., Sanada, M., Ogawa, S., Nakamura, T. and **Satake, M.** *Smip1* deficiency perturbs receptor trafficking and predisposes mice to myelodysplasia. J. Clin. Invest. 123: 1123-1137, 2013.

doi:10.1172/JCI63711 査読有り

Funaki, T., Kon, S., Ronn, R.E., Henmi, Y., Kobayashi, Y., Watanabe, T., Nakayama, K., Tanabe, K. and **Satake, M.**

Localization of SMAP2 to the TGN and its function in the regulation of TGN protein transport. Cell Struc. Func. 36:83-95, 2011.

<http://dx.doi.org/10.1247/csf.10022> 査読有り

[学会発表](計1件)

昆俊亮、他15名。「SMAP1 欠損による細胞内小胞輸送の異常と骨髄異型性症候群」第35回日本分子生物学会。福岡市、平成24年12月12日。

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐竹 正延 (SATAKE, MASANOBU)  
東北大学・加齢医学研究所・教授  
研究者番号: 50178688