

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591400

研究課題名(和文) 骨髄異形成症候群の血球機能不全に対する治療標的機構の解明

研究課題名(英文) Study of therapeutic targets that cause functional defects in blood cells from myelodysplastic syndrome patients

研究代表者

色摩 弥生 (Shikama, Yayoi)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40291562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：FOSは、細胞ストレスに伴う翻訳停止時に速やかに発現増加する早期反応遺伝子である。骨髄異形成症候群(MDS)患者の好中球における翻訳停止時のFOS mRNA増加率は、健常好中球の約半分にとどまり、FOS誘導過程の異常が示唆された。このFOS mRNA誘導不全は、FOS mRNAの合成能低下ではなく、FOS mRNAの不十分な安定化(=分解の抑制)によるものだった。一部の患者ではFOS mRNAを安定化するHuR蛋白が減少し、2/3の症例でFOS mRNAに結合する二つのmicroRNAの増加が検出された。HuR 及びmicroRNAの異常発現がFOS mRNA安定化不全の一因と考えられた。

研究成果の概要(英文)：FOS is an immediate early gene whose expression level is rapidly increased under translation arrest in the cells exposed to DNA-damaging stresses. We found that translation arrest-induced elevation of FOS mRNA was attenuated in neutrophils from myelodysplastic syndrome (MDS) patients. The aberrant FOS mRNA induction was not due to reduced transcriptional activity but insufficient mRNA stabilization. In some patients, the expression levels of HuR, an mRNA-binding protein that stabilizes FOS mRNA, was decreased compared to those in healthy controls. Further, two microRNAs targeting FOS mRNA were increased in two-third of the patients tested. Our study indicated that the aberrant expressions of HuR and microRNAs resulted in the attenuated FOS mRNA induction in MDS.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：血液内科学

キーワード：骨髄異形成症候群 FOS 好中球 RNA安定化 翻訳停止

## 1. 研究開始当初の背景

血球異形成(血球形態・機能の異常)と白血病への移行を特徴とする骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndromes; MDS)の患者の約5割は、白血球化せずに好中球の機能低下と減少に基づく重症感染症により死亡する。しかし、何故分化した好中球の機能や形態が異常を呈するのか、血球異形成成立の分子メカニズムは解明されていない。

申請者らは、MDS患者の好中球を対象にしてGranulocyte-macrophage colony-stimulating factor 受容体発現異常の解析を行う過程で、FOS mRNAの発現制御機構に何等かの異常があることを見出した。真核細胞はDNA障害性のストレスに曝されるとcap-dependentな翻訳を停止するが、FOSは翻訳停止時に速やかに発現誘導される早期反応遺伝子である。FOSの発現は、microRNAやmRNAの"AU-rich element (ARE)"あるいは"c-fos major protein-coding determinant of instability"に結合する蛋白群によって制御される。これらの制御分子は各々様々な細胞機能に関わっている。そこで、翻訳阻害下のFOS誘導異常のメカニズムを明かにすることにより、MDSにおける血球機能異常の成り立ちを解き明かす手掛りをつかみたいと考えた。

## 2. 研究の目的

MDS好中球におけるFOS発現制御異常のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) MDS患者及び年齢一致健常人から分離した好中球を翻訳阻害薬emetine、GM-CSF、LPSで刺激し、MDSにおいてどの刺激がFOS mRNA誘導不全が生じるか検討した。更に、各々の刺激がFOSを誘導するシグナル伝達経路を検討した。

(2) MDSにおけるFOS mRNA誘導不全がFOS転写の低下によるものか、FOS mRNAの安定化不全によるものか検討した。

(3) 健常好中球におけるFOS mRNAの安定化に関わるFOS mRNA結合蛋白の同定と定量を行った。更にそれらをMDSと健常血球で比較した。

## 4. 研究成果

(1) Emetine、GM-CSF、LPSはいずれもFOS mRNA inducerであるが、MDS血球でFOSの増加率に差を生じたのはemetineのみであった。GM-CSFによるFOS誘導はERK、LPSはp38 MAPKを介していたのに対し、emetineによるFOS誘導にはp38 MAPKの部分的な関与が認められた。

(2) EmetineによるFOS mRNA増加には、FOSの転写亢進とともに、FOS mRNA分解の抑制(=安定化)が関与していた。MDS血球では、FOS転写の増加は健常血球と同等

だったが、FOS mRNA安定化効果は健常血球に比べて有意に小さかった。更に、翻訳阻害時のFOS転写亢進は、p38 MAPK経路を介しており、p38 MAPKを阻害してもMDSにおけるFOS mRNA誘導不全に影響を与えなかった。以上よりMDS好中球では、FOS mRNAの安定化機構に異常があることが判った。

(3) ARE結合蛋白のうち、HuRが翻訳阻害時のFOS mRNA安定化に寄与することが判った。一部の患者では、健常血球と比べてHuR蛋白が減少しており、HuRの減少がFOS mRNA誘導不全の一因であることが示唆された。また、FOS mRNAを標的とするmicroRNAのうち、MDS好中球で増加しているものを二つ同定した。これらのmicroRNAを過剰発現した細胞ではFOS mRNAの安定化不全が認められ、microRNAの異常発現もMDSにおけるFOS mRNA誘導不全の一因と考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 8件)

1. Shikama Y, Feng X, Shichishima T, Ono T, Noji H, Ikeda K, Ogawa K, Takeishi Y, Kimura J. Impairment of FOS mRNA induction by a translation inhibitor puromycin in granulocytes from myelodysplastic syndrome patients. *Br J Haematol.* 154(4): 525-527, 2011.
2. Hu H, Shikama Y, Shichishima T, Ikeda K, Akutsu K, Ono T, Kimura H, Ogawa K, Noji H, Takeishi Y, Kimura J. Maturity-dependent fractionation of neutrophil progenitors: a new method to examine in vivo expression profiles of differentiation-regulating genes. *Exp Hematol.* 40: 675-681, 2012.
3. 色摩弥生. 分化制御因子の in vivo expression profile 解析のための好中球前駆細胞の分化段階別分画採取法. (総説) *日本薬理学会誌* 141: 90-94, 2012.
4. Feng X, Shikama Y, Shichishima T, Noji H, Ikeda K, Ogawa K, Kimura H, Takeishi Y, Kimura J. Impairment of FOS mRNA stabilization following translation arrest in granulocytes from myelodysplastic syndrome patients. *PLoS One.* 12;8(4):e61107, 2013.
5. Misaka S, Miyazaki N, Yatabe MS, Ono T, Shikama Y, Fukushima T, Kimura J. Pharmacokinetic and pharmacodynamic interaction of nadolol with itraconazole, rifampicin and grapefruit juice in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol.* 53: 738-745, 2013.
6. Ogata H, Yatabe M, Misaka S, Shikama Y, Sato S, Munakata M, Kimura J. Effect of oral L-arginine administration on exhaled nitric oxide (NO) concentration

in healthy volunteers. Fukushima J Med Sci. 59:43-48, 2013.

7. Hu H, Shikama Y, Shichishima T, Ikeda K, Akutsu K, Ono T, Kimura H, Ogawa K, Noji H, Takeishi Y, Kimura J. A new method for maturity-dependent fractionation of neutrophil progenitors applicable for the study of myelodysplastic syndromes. Biomark Res.2: 2, 2014
8. 色摩(亀岡)弥生. 好中球の遺伝子発現調節異常から探る病態～骨髄異形成症候群～. (総説) 福島医学会誌. 64: 1-10, 2014.

〔学会発表〕(計 11 件)

1. Feng X, Shikama Y, Kimura J. Mechanisms of immediate early gene FOS induction by emetine in human granulocytes. 第 62 回日本薬理学会北部会. 平成 23 年 9 月 29 日(仙台市).
2. Feng X, Shikama Y, Kimura J. p38 MAPK-mediated transcription and HuR-associated mRNA stabilization in FOS induction by emetine in human granulocytes. 第 34 回日本分子生物学会年会. 平成 23 年 12 月 16 日(横浜市).
3. Feng X, Shikama Y, Kimura J. FOS induction by emetine via p38 MAPK and RNA-binding protein HuR in human granulocytes. 第 85 回日本薬理学会年会. 平成 24 年 3 月 14 日(京都市).
4. Feng X, Shikama Y, Noji H, Shichishima T, Ikeda K, Ogawa K, Takeishi Y, Kimura J. Impairment of emetine-induced FOS mRNA stabilization in granulocytes from myelodysplastic syndrome patients. 第 63 回日本薬理学会北部会. 平成 24 年 9 月 14 日(新潟市).
5. Feng X, Shikama Y, Shichishima T, Noji H, Ikeda K, Ogawa K, Kimura H, Takeishi Y, Kimura J. Mechanisms of impaired FOS mRNA induction by emetine in granulocytes from myelodysplastic syndrome patients. 第 74 回日本血液学会学術集会. 平成 24 年 10 月 21 日(京都市).
6. Feng X, Shikama Y, Noji H, Shichishima T, Ikeda K, Ogawa K, Kimura H, Takeishi Y, Kimura J. Impairment of HuR-mediated FOS mRNA stabilization via AU-rich element-binding protein HuR in granulocytes from myelodysplastic syndrome patients. 福島医学会第 436 回学術研究集会. 平成 24 年 10 月 26 日(福島市).
7. Feng X, Shikama Y, Shichishima T, Noji H, Ikeda K, Ogawa K, Takeishi Y, Kimura J. Impairment of HuR-mediated FOS mRNA stabilization in granulocytes from

myelodysplastic syndrome patients. The 55<sup>th</sup> American Society of Hematology Annual Meeting. 平成 22 年 12 月 9 日 (Atlanta, GA, USA).

8. Feng X, Shikama Y, Noji H, Shichishima T, Ikeda K, Ogawa K, Kimura H, Shichishima T, Takeishi Y, Kimura J. Impairment of FOS mRNA stabilization following translation arrest in granulocytes from myelodysplastic syndromes. 第 86 回日本薬理学会年会. 平成 23 年 3 月 23 日(福岡市).
9. 色摩弥生、曹美婉、馮曉敏、安斎美智子、野地秀義、小川一英、木村秀夫、竹石恭知、木村純子. 骨髄異形成症候群患者好中球における FOS mRNA 安定化不全への miRNA の関与. 第 64 回日本薬理学会北部会. 平成 25 年 9 月 13 日(旭川市).
10. Shikama Y, Cao M, Feng X, Kimura H, Noji H, Ogawa K, Ikeda K, Shichishima T, Takeishi Y, Kimura J. 第 75 回日本血液学会学術集会. 平成 25 年 10 月 12 日(札幌市).
11. Shikama Y, Cao M, Anzai M, Feng X, Noji H, Kimura H, Ogawa K, Ikeda K, Takeishi Y, Kimura J. Involvement of microRNAs and an RNA-binding protein in impaired stabilization of FOS mRNA under translation arrest in myelodysplastic syndrome-derived neutrophils. 第 87 回日本薬理学会年会. 平成 26 年 3 月(仙台市).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

色摩 弥生 (SHIKAMA Yayoi)  
福島県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号： 40291562

(2) 研究分担者

七島 勉 (SHICHISHIMA Tsutomu)  
福島県立医科大学・医学部・博士研究員  
研究者番号： 10192105

野地 秀義 (NOJI Hideyoshi)  
福島県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号： 20347214

(3) 連携研究者

( なし )

研究者番号：