

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2010～2014

課題番号：22118005

研究課題名(和文) MDS原因遺伝子の同定と解析を通じた細胞分化制御システムの解明

研究課題名(英文) Identification of genes involved in the development of MDS as a tool of elucidation of hematopoiesis.

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) 128,000,000円

研究成果の概要(和文)：造血細胞の分化メカニズムを解明するため、その異常が生じる疾患である骨髄異形成症候群(MDS)の三原因遺伝子を、疾患特異的な染色体異常である7番染色体長腕(7q)から単離した。エンドソーム蛋白質をコードするSamd9/Samd9Lは、片アレル欠損でも両アレル欠損でもほとんど同じ経過で、老齢マウスにMDSを発症した。一方、Mikiは分裂期中心体に存在し、その発現低下で分裂前中期の延長と、MDSに非常に高頻度にみられる形態異常に酷似した核形態異常を生じた。両遺伝子の片アレル欠失が、MDS発症を促進していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To elucidate mechanisms through which a hematopoietic stem cell differentiates to mature blood cells, myelodysplastic syndromes (MDS) may be a good material. We identified three responsible genes for the deletion of the long arm of chromosome 7, which is most frequently observed as a non-random chromosome abnormality in patients with MDS. Both the homo- and hetero-deficient mice of Samd9/Samd9L genes, which encode endosome proteins developed MDS at their advanced age, mimics human diseases. Lack of Miki, which encodes a centrosome protein prolongs prometaphase, resulting in abnormal morphology of nuclei, which strikingly resembles those routinely observed in bone marrow preparations of MDS patients. Those three genes located in chromosome 7 were considered to be responsible for the development of MDS.

研究分野：血液

キーワード：MDS モノソミー7 片アレル欠失不全 分裂期制御 エンドソーム蛋白質 Samd9 Samd9L Miki

## 1. 研究開始当初の背景

1 個の幹細胞から 3 系統の血球細胞が作られる過程において、多くの決定過程があり、それを制御する転写因子や様々なエピゲノム調整因子などが見いだされてきた。それらの中には、白血病の原因遺伝子として単離されたものも少なくない。骨髄異形成症候群 (MDS) は高率に白血化するため、前白血病状態としての性格が重視されがちであるが、疾患の本態は、造血分化の過程で異常が生じ、「MDS 風の」分化が進行すること、その際に産生される血球が本来の機能を失っていることである。従って、MDS での分化異常を解析することにより、その鏡像として正常血球の分化メカニズムが浮き彫りになると考えられる。こうした研究で古典的な手法として用いられるのは、染色体転座や欠失など、疾患特異的な染色体異常を手がかりとするものである。

## 2. 研究の目的

MDS の原因として発見されている遺伝子異常の多くは白血病と共通であり、前白血病状態としての MDS と関連していると思われる。そこで、MDS に比較的特異的な 7 番染色体長腕欠失 (7q-) の責任遺伝子同定と機能解析を行なうことにより、血球の分化を決定する因子の同定を試みた。

## 3. 研究の方法

われわれは以前の研究から、小児白血病 (若年性慢性骨髄単球性白血病、JMML) の解析から 7q21.3 サブバンドに微小欠失領域を同定していたので、本領域に座位する遺伝子の欠失マウスを作成し、その表現型を解析する。また、マウスが MDS を発症した場合には、当該遺伝子の機能を細胞生物学的な方法を用いて解明する。

## 4. 研究成果

すでに同定していた微小欠失領域に含まれるこの領域にはデータベース上、三つの遺伝

子 (*Samd9*, *Samd9L*, *LOC253012 = Miki*) が存在したが、発見当時はいずれも過去に本格的な研究の対象となっていないものであった。また、これらの遺伝子は脊椎動物にのみ存在し、機能を推測させる既知モチーフがなかった。遺伝子改変マウスの長期にわたる観察などさまざまな検討の結果、われわれは、これら三つの遺伝子は全て MDS の発症を抑制する機能があるという結論に至った。

*Samd9* と *Samd9-like (Samd9L)* は 60% のアミノ酸相同性を持つ蛋白質をコードする関連遺伝子であって、いずれもエンドソームに局在する。哺乳類ではほとんどの種が *Samd9* と *Samd9L* の双方の遺伝子を持つが、マウスは *Samd9* 遺伝子を欠き、逆にウシは *Samd9L* 遺伝子を欠くなど両遺伝子産物の機能は明らかに相補性を持っている。

*Samd9L* 遺伝子の欠損マウスの解析で特に注目すべき点は、*Samd9L* 遺伝子の片アレル欠失細胞では、調べた全ての細胞で健全マウスと比較して 30~50% 程度の mRNA および蛋白質発現があるにもかかわらず、以下に述べるような、ほとんど同一の表現型を示すことであり、片アレル欠失不全による発病メカニズムを強く支持するものであった。すなわち、欠失マウスは、正常に誕生し発育するが、最終的に 60% を越える欠失マウスが生後 1 年半頃 (ヒトの 40~50 歳くらいに相当) から典型的な MDS を発症し、貧血などで死亡した。

*Samd9/Samd9L* の細胞内での機能は、エンドソームの融合を促進することである。*Samd9L* の減少によって、エンドソームからライソソームへの移行に支障が生じ、リガンド結合後のサイトカイン受容体の代謝が遅延し、サイトカインシグナルが増強する。この結果、生後 2~3 月の若年マウスで、造血前駆細胞の生体内での骨髄再構築能やコロニー形成能が亢進した。

サイトカインシグナルの増強は、白血病や骨髄増殖性疾患を念頭に置いた時には理解

しやすいが、実際には、欠失マウスのごく一部が AML や MPD を発症するものの、大半は典型的な MDS を発症するのであって、この点疾患と結びついてこない。そこで、実際に MDS を発症する生後約 2 年の老齢マウス (ヒトの 60 歳に相当) の骨髄細胞を用いて、コロニー形成能の検討を行った。その結果、健康高齢マウスでも、*Samd9L* 欠失細胞は同月齢の野生型細胞に比較してコロニー形成能は顕著に高い (もちろん若年マウスよりは少なく 30% 程度)。ところが MDS 発症後の (高齢) マウスのコロニー形成能は、健康高齢 *Samd9L*<sup>+/+</sup> 細胞以下に低下した。この結果は、*Samd9L*<sup>+/+</sup> マウスが MDS を発症するには「単なる老化以外の付加的異常」が必要であることを示唆している。しかし、それ(ら)は細胞の生存にとってはむしろ不利であり、*Samd9L*<sup>+/+</sup> 細胞に生じた場合には細胞は死滅してしまう。*Samd9L* 遺伝子の欠失は、このような「致死性」の MDS 発症因子の変異が生じた幹細胞の生存を可能とし、遺伝子変異が同一幹細胞内に蓄積することを助けているのではないかと考えている。

JMML 患者の 7q21.3 サブバンド上に発見された微小欠失領域上には、もうひとつ *Miki* (mitotic kinetics regulator) 遺伝子が存在した。*Miki* は間期にゴルジ体、分裂期に中心体やそれから伸びる紡錘系に局在する。*Miki* はモノソミー 7 の細胞株では検出できないレベルまで発現が低下していることから、片アレル欠失でも発現の残る *Samd9/Samd9L* とは違った機序で片アレル欠失不全を起こす遺伝子である。*Miki* は、分裂期の中心体で CG-NAP とよばれる構造蛋白質と複合体を作り、紡錘系合成の足場蛋白質 (ガンマチューブリン環状複合体、 $\gamma$ -TuRC) を形成するが、大変興味深いことに CG-NAP 遺伝子も 7q21 バンド上にあり、モノソミー 7 の細胞株では発現レベルが非常に低い。

*Miki* や CG-NAP の発現抑制は、 $\gamma$ -TuRC を含

む傍中心体物質 (PCM) の著減をもたらし、その結果紡錘系が脆弱となって染色体整列が混乱し、前中期は大きく混乱する。染色体整列不良や染色体遅延 (ラギング) が頻繁に見られ、中期に入れない前中期停止の様相を呈する。その結果として多くの細胞がアポトーシスを起こすが、染色体が分離しないまま脱凝集を起こす細胞もあり、MDS でよく見かける大小不同の多核細胞や微小核を造血細胞で人工的に作り出すことが可能である。

モノソミー 7 を伴う MDS では多核細胞や微小核の頻度が高いことは以前から知られており、*Miki* や CG-NAP の片アレル欠失不全が、この知見と密接に関連するものと考えている。実際、モノソミー 7 の MDS 患者の骨髄像や細胞株では、分裂前中期の細胞が分裂中期の細胞に比べて顕著に多い。

このように、-7/7q- の責任遺伝子として *Samd9*, *Samd9L*, *Miki*, CG-NAP の 4 遺伝子が単離されたが、もとよりこれで終わりではないと考えられる。実際、7q の長腕末端側には、MDS や AML で点突然変異が高頻度に見られる *ezh2* が存在する (片アレル欠失不全で MDS を促進するかどうかは明確ではない) し、ほかに候補とされる遺伝子が提唱されている。このような遺伝子の片アレルの欠落によって、-7/7q- は総体として MDS の発症や進展に寄与しているのであろう。

## 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 17 件)

1. Inoue D, Kitaura J, Matsui H, Hou H-A, Chou W-C, Nagamachi A, Kawabata K, Togami K, Nagase R, Horikawa S, Saika M, Micol J-B, Hayashi Y, Harada Y, Harada H, Inaba T, Tien H-F, Abdel-Wahab O, Kitamura T. *SETBP1* mutations drive leukemic transformation in *ASXL1*-mutated MDS. *Leukemia*, *in press* 査読有
2. Morita A, Ariyasu S, Wang B, Asanuma T,

- Onoda T, Sawa T, Tanaka K, Takahashi I, Togami S, Neno M, Inaba T, Aoki S. AS-2, a novel inhibitor of p53-dependent apoptosis, prevents apoptotic mitochondrial dysfunction in a transcription-independent manner and protects mice from a lethal dose of ionizing radiation. *BBRC* 450: 1498–1504, 2014 査読有
3. Sashida G, Harada H, Matsui H, Oshima M, Yui M, Harada Y, Tanaka S, Mochizuki-Kashio M, Wang C, Saraya A, Muto T, Hayashi Y, Suzuki K, Nakajima H, Inaba T, Koseki H, Huang G, Kitamura T, Iwama A. Ezh2 loss promotes development of myelodysplastic syndrome but attenuates its predisposition to leukaemic transformation. *Nature communications* 5:4177, 2014 査読有
  4. Yamakawa N, Okuyama K, Ogata J, Kanai A, Helwak A, Takamatsu M, Imadome K, Takakura K, Chanda B, Kurosaki N, Yamamoto H, Ando K, Matsui H, Inaba T, Kotani A. Novel functional small RNAs are selectively loaded onto mammalian Ago1. *Nucleic Acids Res.* 42: 5289-5301, 2014 査読有
  5. Okuda H, Kawaguchi M, Kanai A, Matsui H, Kawamura T, Inaba T, Kitabayashi I, Yokoyama A. MLL fusion proteins link transcriptional coactivators to previously active CpG-rich promoters. *Nucleic Acids Res.* 42:4241-4256, 2014 査読有
  6. Nagamachi A, Nakata Y, Ueda T, Yamasaki N, Ebihara Y, Tsuji K, Honda Zi, Takubo K, Suda T, Oda H, Inaba T, Honda H. Acquired deficiency of A20 results in rapid apoptosis, systemic inflammation, and abnormal hematopoietic stem cell function. *PLOS ONE*, 9 e8742, 2014 査読有
  7. Nagamachi A, Matsui H, Asou H, Ozaki Y, Aki D, Kanai A, Takubo K, Suda T, Nakamura T, Wolff L, Honda H, Inaba T. Haploinsufficiency of SAMD9L, an endosome fusion facilitator, causes myeloid malignancies in mice mimicking human diseases with monosomy 7. *Cancer Cell* 24: 305-317, 2013 査読有
  8. Kobayashi Y, Matsui H, Kanai A, Tsumura M, Okada S, Miki M, Nakamura K, Kunishima S, Inaba T, Kobayashi M. Identification of integrin  $\beta 3$  L718P mutation in a pedigree with autosomal dominant thrombocytopenia accompanied by anisocytosis. *Br J. Haematol* 160: 521-529, 2013 査読有
  9. Nemoto A, Inukai T, Uno K, Kiyokawa N, Miyagawa Y, Takahashi K, Sato H, Akahane K, Hirose K, Honna-Oshiro H, Goi K, Kagami K, Nakazawa S, Fujimoto J, Inaba T, Sugita K. Diverse underlying proliferation response to growth factors in imatinib-treated Philadelphia chromosome positive leukemias. *Leukemia Res.* 37: 93-101, 2013 査読有
  10. Nakatsu Y, Otani Y, Sakoda H, Zhang J, Guo Y, Okubo H, Kushiyama A, Fujishiro M, Kikuch T, Fukushima T, Ohno H, Tsuchiya Y, Kamata H, Nagamachi A, Inaba T, Nishimura F, Katagiri H, Takahashi S, Kurihara H, Uchida T, Asano T. Role of Pin1 protein in the pathogenesis of non- alcoholic steatohepatitis in a rodent model. *J Biol Chem.* 287: 44526-44535, 2012 査読有
  11. Ozaki Y, Matsui H, Asou H, Nagamachi A, Aki D, Honda H, Yasunaga S, Takihara Y, Yamamoto T, Izumi S, Ohsugi M, Inaba T. Poly-ADP ribosylation of Miki by tankyrase-1 promotes centrosome maturation. *Mol. Cell* 47: 694-706, 2012 査読有
  12. Ueda T, Sanada M, Matsui H, Yamasaki N, Honda Zi, Shih LY, Mori H, Inaba T, Ogawa S, and Honda H. EED mutants impair polycomb repressive complex 2 in myelodysplastic syndrome and related neoplasms. *Leukemia* 26: 2557-2560, 2012 査読有
  13. Li Q, Guo H, Matsui H, Honda H, Inaba T, Sundberg JP, Sprecher E, Uitto J. Mouse Samd9l is not a functional paralogue of the

human SAMD9, the gene mutated in normophosphataemic familial tumoral calcinosis. (letter) Exp. Dermatol. 21: 535-561, 2012 査読有

14. Zhang X, Inukai T, Hirose K, Akahane K, Kuroda I, Honna-Oshiro H, Kagami K, Goi K, Nakamura K, Kobayashi M, Endo M, Yagita H, Kurosawa H, Look AT, Honda H, Inaba T, Nakazawa S, Sugita K. Oncogenic Fusion E2A-HLF Sensitizes t(17;19)-positive Acute Lymphoblastic Leukemia to TRAIL-Mediated Apoptosis by Upregulating the Expression of Death Receptors. Leukemia 26: 2483-2493, 2012 査読有
15. Shi L, Fujioka K, Sun J, Kinomura A, Inaba T, Ikura T, Ohtaki M, Yoshida M, Kodama Y, Livingston GK, Kamiya K, Tashiro S. A modified system for analyzing ionizing radiation-induced chromosome abnormalities. Radiat Res. 177: 533-538, 2012 査読有
16. 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: 1428-1434, 2011 査読有
17. 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 査読有

〔学会発表〕(計5件)

1. 長町安希子 Roles of translational machinery in epigenetic therapy in MDS. 第73回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜 2014年9月25日~27日
2. Nagamachi A., Matsui H., Kanai A., Inaba T. Roles of translational machinery in epigenetic therapy in MDS. 第76回日本血液学会学術集

会 大阪国際会議場 2014年10月31日~11月2日

3. Ikeda K., Ueda T., Nagamachi A., Yamasaki N., Nakata Y., Inaba T., Honda H. EED, a subunit of PRC2, plays an essential role in maintenance of adult hematopoietic stem cells. 第76回日本血液学会学術集会 大阪国際会議場 2014年10月31日~11月2日
4. Ueda T., Nagamachi A., Nakata Y., Yamasaki N., Inaba T., Honda H. Role of Fbx110, a histone demethylase, in MLL-AF9-induced leukemia. 第76回日本血液学会学術集会 大阪国際会議場 2014年10月31日~11月2日
5. Nakata Y., Ueda T., Nagamachi A., Wolff L., Ogawa S., Inaba T., Honda H. Generation and analysis of a novel mouse model for chronic myelomonocyte leukemia (CMML) with acquired expression of c-CBLQ367P. 第56回アメリカ血液学会 2014年12月4日~9日 サンフランシスコ USA

〔図書〕(計1件)

骨髄異形成症候群(MDS)の基礎と臨床 朝長万左男 編著 医薬ジャーナル社 2015年

〔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:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等 なし

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 なし

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし

( )

研究者番号：