

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04857

研究課題名(和文) MDS(RAEB)の本態に迫るゲノム異常の同定と機能解析

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism through which MDS develops

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：7番染色体欠失の責任遺伝子候補であるSamd9およびSamd9L遺伝子(以下Samd9/Lと記載)は、初期エンドソーム蛋白質をコードする。近年Samd9/L遺伝子の機能獲得型変異が、造血不全を伴う優性遺伝疾患において多数報告された。そこでSamd9/L遺伝子の機能獲得型点変異を有するモデルマウスを作製し、その解析を行ったところ、低体重、貧血、生殖器発達不全などヒト疾患と酷似した表現型を示すマウスが得られた。そこで終生飼育を行い、注意深い観察を継続する一方、造血組織やそのほかの臓器を採取し、形態学的検討、およびこれらの臓器から樹立した初代培養細胞を用いて、分子細胞レベルの検討を継続中である。

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：血液学

キーワード：MDS RAEB モノソミー7

1. 研究開始当初の背景

モノソミー7は骨髄性腫瘍で高頻度に見られる染色体異常であるが、その共通微小欠損領域(7q21.3サブバンド)から我々が単離した *Samd9* および *Samd9L* 遺伝子(以下合わせて *Samd9/L* と記載)は、初期エンドソーム蛋白質をコードする。*Samd9L* 遺伝子のハプロ欠損マウスは MDS を高率に発症することから、7番染色体欠失の有力な責任遺伝子候補である。近年 *Samd9/L* 遺伝子の機能獲得型変異が、MIRAGE 症候群など造血不全を伴う優性遺伝疾患(多臓器先天異常)や、先天性骨髄不全症候群、家族性モノソミー7症候群、孤発例の小児 MDS において多数報告された。これらの乳幼児ではモノソミー7を伴う MDS を高頻度に発症するが、MDS 細胞において常に変異側のアレルが欠失することから、変異遺伝子を失うことにより *Samd9/L* の機能促進に起因する造血細胞の機能不全から回復する "revertant mosaicism" のメカニズムが提唱されている。このように *Samd9/L* の発現低下はヒトでもマウスでも腫瘍性の造血機能異常(MDS)を引き起こす一方、その機能更新はヒトで造血能低下を引き起こす。また、変異遺伝子を失うことにより MDS を発症する。

2. 研究の目的

Samd9/L および *Samd9/L* 変異遺伝子の造血における機能を精査し、モノソミー7を伴う MDS の発症メカニズム解明へとつなげ、最終的には難解な疾患である MDS の病態解明に発展させる。エンドソーム蛋白質である *Samd9/L* は、リガンド結合後のサイトカイン受容体の代謝異常を介して造血能を制御していると考えられてきた。この生化学的な機能が造血とその異常に果たす役割を個体レベルで精査する目的で、*Samd9/L* 遺伝子の機能獲得型点変異を有するモデルマウスを作製し、その解析を行うとともに、遺伝子改変マウスより得られた初代培養細胞などの材料を用いて、*Samd9/L* およびその変異体の造血における機能を解析する。

3. 研究の方法

遺伝子改変マウスの作製は、ES細胞において相同組換え法で遺伝子を操作するのが定法であるが、点変異を有するマウスをこの方法で作成すると時間と手間がかかり、確実性も劣るため、ゲノム編集法(Crisper/Cas9)法を用いた。すなわちマウス受精卵前核にクリスパーRNAとCas9蛋白質、トランスクリスパーRNA、変異を入れた1本鎖オリゴをマイクロインジェクションした。また、必要に応じ、すでに作製した *Samd9L* 欠損マウスを用いて比較対照を行なった。終生飼育を行い、注意深い観察を継続する一方、骨髄や胎仔肝などの造血組織やそのほか異常の見られた臓器を採取し、通常の病理組織学的検索とともに、免疫化学染色、免疫蛍光染色などの形態学的検討、およびこれらの臓器から樹立した初代

培養細胞を用いて、サイトカイン受容体の代謝など、分子細胞レベルの検討を行った。

4. 研究成果

Samd9/L 遺伝子の機能獲得型点変異を有するモデルマウスの作成には、かなりの労力と時間を割くことになったが、最終的にライン化することに成功した。マウスは体重が正常同胞の60%程度と低体重で、貧血や泌尿器・生殖腺の先天異常など、MIRAGE 症候群と共通する症状を呈した。変異マウスの貧血は小球性低色素性貧血で、離乳時に Hb 9 (g/dL)程度であったものが、その後徐々に回復する点など MIRAGE 症候群に酷似した。骨髄細胞の FACS 解析では、好塩基性赤芽球に相当する CD71hi/Ter119hi の段階で分化障害が認められた。単純な鉄欠乏性貧血や鉄吸収障害は考えにくく、エンドソーム機能異常によるトランスフェリン受容体の代謝異常、特にリサイクル異常に伴う鉄吸収障害を念頭に、胎仔肝や乳仔期骨髄を材料にさらなる解析を進めている。

一方、ビオチン標識を行なった表面サイトカイン受容体の解析により、*Samd9/L* がリガンド結合に引き続く受容体の取り込み後のエンドソーム交通の制御を通じて、受容体のライソソームでの分解やリサイクル効率を制御していることが判明した。*Samd9/L* は初期エンドソームの融合を促進する蛋白質である EEA1(early endosome antigen-1) と結合することがこれまでの検討で判明しているが、それぞれのタンパク質をバキュロウイルスを用いて作製し、生化学的な分析を試みた。*Samd9/L* も EEA1 も 150kDa を超える巨大な蛋白質であり、蛋白質精製に困難を伴ったが、Rab5 とともに最終的に十分量の蛋白質を得た。現在 Rab5 の GTP 結合型および GDP 結合型の存在下に両者の結合状態や、点変異の存在によってそれがどのように変化し、どのように病態につながるかについて詳細な分析を進めている。

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15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* 29: 847-857, 2015
2. Ueda T, Nagamachi A, Takubo K, Yamasaki N, Matsui H, Kanai A, Nakata

- Y, Ikeda K, Konuma T, Oda H, Wolff L, Honda ZI, Wu X, Helin K, Iwama A, Suda T, Inaba T, Honda H. Fbx110 overexpression in murine hematopoietic stem cells induces leukemia involving metabolic activation and upregulation of Nsg2. *Blood* 125: 3437-3446, 2015
3. Kosaka K, Imamura M, Hayes CN, Abe H, Hiraga N, Yoshimi S, Murakami E, Kawaoka T, Tsuge M, Aikata H, Miki D, Ochi H, Matsui H, Kanai A, Inaba T, Chayama K. Emergence of resistant variants detected by ultra-deep sequencing after asunaprevir and daclatasvir combination therapy in patients infected with hepatitis C virus genotype 1. *J Viral Hepat.* 22: 158-65, 2015
 4. Ueda T, Nakata Y, Nagamachi A, Yamasaki N, Kanai A, Sera Y, Sasaki M, Matsui H, Honda Z, Oda H, Wolff L, Inaba T, Honda H. Propagation of trimethylated H3K27 regulated by polycomb protein EED is required for embryogenesis, hematopoietic maintenance, and tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 113: 10370-10375, 2016
 5. Okubo H, Kushiyama A, Sakoda H, Nakatsu Y, Iizuka M, Taki N, Fujishiro M, Fukushima T, Kamata H, Nagamachi A, Inaba T, Nishimura F, Katagiri H, Asahara T, Yoshida Y, Chonan O, Encinas J, Asano T. Involvement of resistin-like molecule β in the development of methionine-choline deficient diet-induced non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Sci. Rep.* 6: 20157, 2016
 6. Kadono M, Kanai A, Nagamachi A, Shinriki S, Kawata J, Iwato K, Kyo T, Oshima K, Yokoyama A, Kawamura T, Nagase R, Inoue D, Kitamura T, Inaba T, Ichinohe T, Matsui H. Biological implications of somatic DDX41 p.R525H mutation in acute myeloid leukemia. *Exp Hematol.* 44: 745-754, 2016
 7. Sera Y, Yamasaki N, Oda H, Nagamachi A, Wolff L, Inukai T, Inaba T, Honda H. Identification of cooperative genes for E2A-PBX1 to develop acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Sci.* 107: 890-898, 2016
 8. Ikeda K, Ueda T, Yamasaki N, Nakata Y, Sera Y, Nagamachi A, Miyama T, Kobayashi H, Takubo K, Kanai A, Oda H, Wolff L, Honda Z, Ichinohe T, Matsubara A, Suda T, Inaba T, Honda H. Maintenance of the functional integrity of mouse hematopoiesis by EED and promotion of leukemogenesis by EED haploinsufficiency. *Sci. Rep.* 19(6): 29454, 2016
 9. Nakata Y, Ueda U, Nagamachi A, Yamasaki N, Ikeda K, Sera Y, Takubo K, Kanai A, Oda H, Sanada M, Ogawa S, Tsuji K, Ebihara Y, Wolff L, Honda Z, Suda T, Inaba T, Honda H. Acquired expression of CblQ367P in mice induces dysplastic myelopoiesis mimicking chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 129: 2148-2160, 2017
 10. Kojo S, Tanaka H, Endo T, Muroi S, Liu Y, Seo W, Tenno M, Kakugawa K, Naoe Y, Nair K, Moro K, Katsuragi Y, Kanai A, Inaba T, Egawa T, Venkatesh B, Minoda A, Kominami R, Taniuchi I. Priming of lineage-specifying genes by Bcl11b is required for lineage choice in post-selection thymocytes. *Nat. Commun.* 8: 702, 2017
 11. Sugino N, Kawahara M, Tatsumi G, Kanai A, Matsui H, Yamamoto R, Nagai Y, Fujii S, Shimazu S, Hishizawa M, Inaba T, Andoh A, Suzuki T, Takaori-Kondo A. A novel LSD1 inhibitor NCD38 ameliorates MDS-related leukemia with complex karyotype by attenuating leukemia programs via activating super-enhancers. *Leukemia* 31:2303-2314, 2017
 12. Abe Y, Yoshida M, Fujioka K, Kurosu Y, Ujiie R, Yanagi A, Tsuyama N, Miura T, Inaba T, Kamiya K, Sakai A. Dose-response curves for analyzing of dicentric chromosomes and chromosome translocations following doses of 1000 mGy or less, based on irradiated peripheral blood samples from five healthy individuals. *J. Rad. Res.* 59: 35-42, 2018
 13. Morita A, Takahashi I, Sasatani M, Aoki S, Wang B, Ariyasu S, Tanaka K,

Yamaguchi T, Sawa A, Nishi Y, Teraoka T, Ujita S, Kawate Y, Yanagawa C, Tanimoto K, Enomoto A, Neno M, Kamiya K, Nagata Y, Hosoi Y, Inaba T. A chemical modulator of p53 transactivation that acts as a radioprotective agonist. *Mol. Cancer Ther.* 17:432-442, 2018

14. Inoue D, Fujino T, Sheridan P, Zhang YZ, Nagase R, Horikawa S, Li Z, Matsui H, Kanai A, Saika M, Yamaguchi R, Kozuka-Hata H, Kawabata KC, Yokoyama A, Goyama S, Inaba T, Imoto S, Miyano S, Xu M, Yang FC, Oyama M, Kitamura T. A novel ASXL1-OGT axis plays roles in H3K4 methylation and tumor suppression in myeloid malignancies. *Leukemia*, *in press*
15. Inaba T, Honda H, Matsui H. The enigma of monosomy 7. *Blood*, *in press* (review)

[学会発表](計7件)

1. 長町安希子ほか MDS 責任遺伝子 Samd9/Samd9L のエンドサイトーシス経路における機能解析 日本血液学会総会 2017
2. Nagamachi A. et al. The role of Samd9 and Samd9L in the early endocytotic pathway. The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2017
3. Nagamachi A, Ozaki Y, Matsui H, Kanai A, Inaba T. Low Miki expression in myelodysplastic syndromes enhance the formation of polynuclear cell. 第78回日本血液学会学術総会 2016年10月14日 横浜市
4. Nagamachi A, Matsui H, Kanai A, Inaba T. eEF1A2 is a target gene of DNA demethylating agents for improving anemia of MDS. 第75回日本癌学会学術総会 2016年10月7日 横浜市
5. Nagamachi A, Matsui H, Kanai A, Inaba T. Low Miki expression in myelodysplastic syndromes results in polynuclear cell formation through decondensation of chromosomes in prolonged prometaphase. 第57回米国血液学会年次総会 2015年12月6日 オーランド(米国)
6. Nagamachi A, Matsui H, Kanai A, Inaba

T. eEF1A2 is a target gene of DNA demethylating agents for improving anemia of MDS. 第77回日本血液学会学術総会, 2015年10月17日 金沢市

7. Nagamachi A, Inaba T. Exploring haplo-insufficiency of multiple anti-oncogenes that facilitate malignant transformation. 第74回日本癌学会学術総会, 2015年10月9日 名古屋市

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

長町 安希子 (Nagamachi, Akiko)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教
研究者番号: 20585153

(3) 研究分担者

金井 昭教 (Kanai, Akinori)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教
研究者番号: 60549567