

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09930

研究課題名(和文) 骨髄異形成症候群における治療ターゲットとしてのSALL4高発現の意義解析

研究課題名(英文) The role of SALL4 in myelodysplastic syndrome

研究代表者

立津 央 (Tatetsu, Hiro)

熊本大学・病院・講師

研究者番号：00433029

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄異形成症候群(MDS)は、未だ難治性血液疾患で、他の血液腫瘍(慢性白血病、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫等)と比較し、臨床応用されている分子標的薬剤が少なく、治癒には同種幹細胞移植を必要とする。今回、我々は、MDSに高発現を認めるSALL4に着目した。MDS骨髄の多数の抗体を用いたCyTOFによる解析では、正常骨髄と比べ、MDS骨髄においては、造血幹細胞を含むさまざまな細胞でタンパクレベルでの高発現を認めた。また、SALL4の高発現細胞は、予後不良因子であるP53も高発現しており、関連が示唆され、SALL4陽性細胞は治療のターゲットとなる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髄異形成症候群(MDS)は、未だ難治性血液疾患であり、治療法の開発が急務な疾患です。今回、私達は、さまざまな腫瘍に高発現を認めるSALL4に着目し、マスマイトメトリーやナノストリングの手法を用いて解析を行いました。正常骨髄と比べ、MDS骨髄においては、造血幹細胞を含むさまざまな細胞でタンパクレベルでのSALL4の高発現を認めました。また、SALL4の高発現細胞の一部は、予後不良因子であるP53も高発現していました。SALL4陽性細胞は、治療のターゲットとなる可能性が示唆され、今後、SALL4の機能解析をさらに進めるとともにSALL4をターゲットとした治療法の開発を進めたいと考えました。

研究成果の概要(英文)：Myelodysplastic syndrome (MDS) is a group of heterogeneous diseases characterized by cytologic dysplasia and refractory cytopenias as a result of ineffective hematopoiesis. Some MDS cases progress to acute myeloid leukemia (AML) with poor prognosis and short survival time. We have reported that oncofetal protein SALL4 can be used as a prognostic biomarker in MDS disease. In this study, we evaluated the expression of SALL4 using single-cell mass cytometry (CyTOF) and Nanostring nCounter. SALL4 was expressed in various MDS BM cells. P53, which is an adverse prognostic marker, positive cells were chiefly seen in SALL4 positive CD34+ cells, erythroid cells and part of myeloid cells. These results indicated that SALL4 could be a candidate of target for MDS therapy.

研究分野：血液内科

キーワード：骨髄異形成症候群 SALL4

## 1．研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndrome (MDS))は、遺伝子異常をもつクローン性造血幹細胞疾患で、造血細胞の異常な増殖とアポトーシスによる細胞死によって特徴づけられる多様性に富んだ難治性疾患である。30 から 40%の MDS 患者は、急性骨髄性白血病(acute myeloid leukemia(AML))を発症し、予後不良となる。2010 年以降、スプライシングやエピジェネティック関連遺伝子異常などの MDS の遺伝子異常が同定された(Yoshida et al, Nature. 2011 Sep 11;478(7367):64-9.)。

SALL4 は、癌胎児タンパクであり、ES 細胞の維持や分化に重要な転写因子である。ほとんどの体細胞で発現を認めないが、多くのがん細胞で発現上昇を認めることを報告してきた(Tatetsu et al. Gene. 2016 Jun 15;584(2):111-9.)。また、MDS や急性骨髄性白血病(AML)の中に SALL4 を高発現している患者を多く認め、その予後は不良であることが報告されている(Wang F et al. J Hematol Oncol. 6:73, 2013)。SALL4 は白血病細胞の生存に重要な働きをし、SALL4のトランスジェニックマウスはMDSからAMLを発症する (Ma Y et al Blood, 108:2726-35, 2006)。

MDS の平均発症年齢は、65 歳であり、今後の高齢化社会において、罹患頻度の増加が予想される一方、根本な治療薬はなく、治療薬の開発が急務と考えられる。SALL4 は、MDS/AML の病態に重要な働きをしており、治療ターゲットとなりうる可能性が考えられるが、その意義は未だ不明である。本研究は、SALL4 が治療ターゲットになりうるかを検討し、分子標的治療薬の開発することを最終的な目的としている。

## 2．研究の目的

- (1)MDS における造血細胞における SALL4 の発現パターンを RNA レベルだけでなく、タンパクレベルで確認し、遺伝子異常との関係について明らかにする。
- (2)MDS における SALL4 の発現の意義、同時に薬剤のターゲットになりうるかを明らかにする。

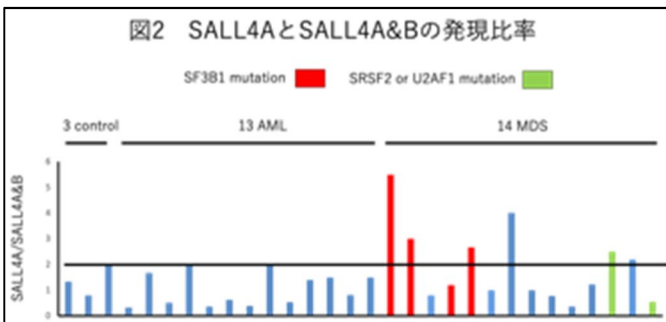
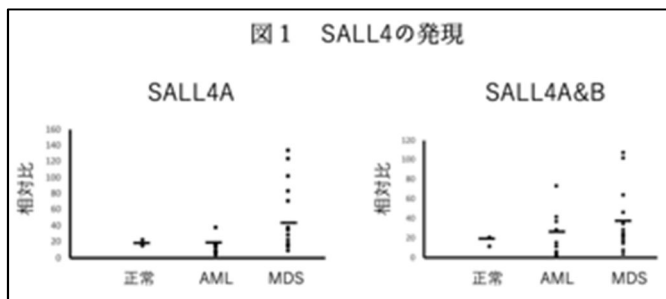
## 3．研究の方法

- (1) 米国との共同研究において MDS における SALL4 の解析を行うために共同研究でナノストリングテクノロジーを用い 2 つのプロープで SALL4 の発現解析を行なった。同時に下流のターゲットの可能性のある遺伝子発現解析も行なった。
- (2) MDS における SALL4 発現細胞を同定するため、CyTOF (マスマイトメーター) を用いて、発現解析を行なった。

## 4．研究成果

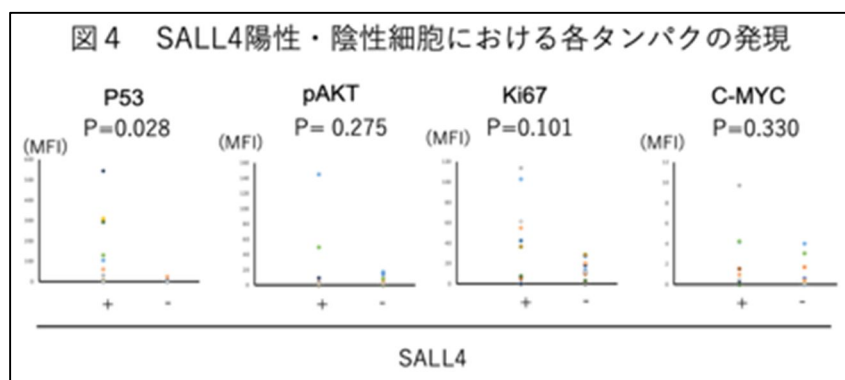
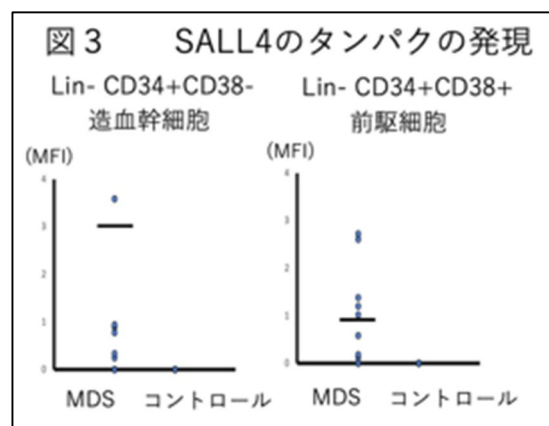
- (1) 本研究の申請時にも触れたが、2016 年 5 月までの所属していたボストンのブリガム アンドウィメンズ病院 (ハーバード大学医学部) 病理部で、MDS 患者サンプルを用い、遺伝子変異の解析と共に、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) から RNA を抽出し、ナノストリングテクノロジーを用い 2 つのプロープで SALL4 の解析を引き続き行なった。14 例の MDS 患者骨髄細胞における SSALL4 のスプライシングバリエーションである SALL4A と SALL4A&B の

発現レベルの検討において、多くの患者で正常骨髄と比較し、SALL4A高値を認めた(図1)。次に、SALL4A, SALL4Bの発現割合を比較したところ、MDSではAMLと比べ、6/13の症例でSALL4A優位の上昇を認めた(図2)。その半数で、SF3B1の遺伝子異常を認め、関連も示唆された。また、同時にSALL4のターゲットと考えられた17遺伝子(BCL2, Bmi1, CBLb, CCD1, CCD2, CHD1, CEBPa, EEF1B2, FAF2, GART, HOXA9, MYC, NAT10, PABPC4, PTEN, RNUX1)とSALL4の発現相関を4つのコントロール遺伝子



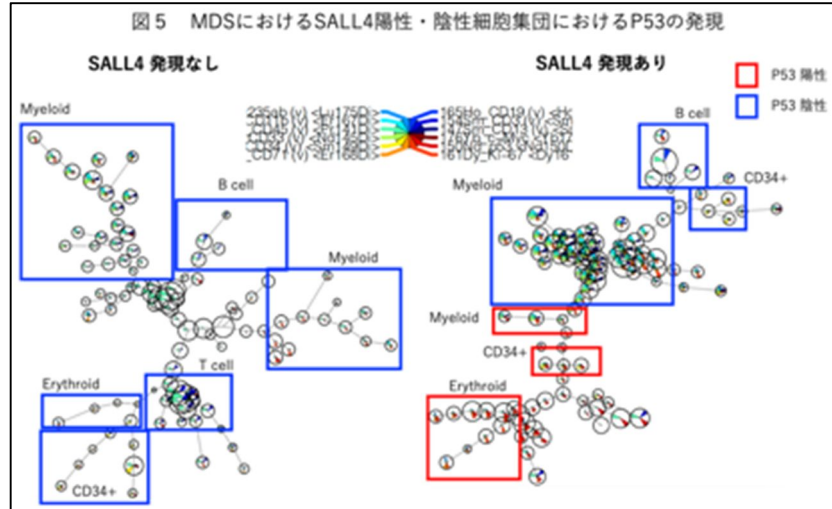
(RPL19, TBP, TUBB, GAPDH)において再解析したところ、MDSにおいては、SALL4A、SALL4Bにおいて、共通してNAT10との正の相関を認めた。NAT10は、ヒストンアセチル化タンパクであり、一方でRNAポリメラーゼIを促進し、p53のホメオスタシスの重要な制御因子であると報告されており(Tan TZ et al. EMBO Mol Med.5(7):1051-66, 2013; Liu X et al. EMBO Rep. 17(3):349-66, 2016) SALL4とp53発現との関連が示唆された。

(2) 骨髄中のSALL4発現細胞を同定するため、CyTOFを用いて、発現解析を行なった。細胞内タンパクの染色は、条件設定が非常に重要であるため、繰り返し、条件設定を行い解析に進んだ。条件設定後、10例のMDS骨髄、5例のコントロール骨髄を28種類の抗体を用い、造血幹細胞からどの分化段階の細胞が主にSALL4を発現しているのかを解析を行なった。SALL4は、コントロール骨髄では、赤芽球を除くほとんどのタンパクレベルでのSALL4検出が困難であった一方で、多くのMDS患者で、前駆細胞、造血幹細胞を含む多くの分画で、SALL4が発現タンパクレベルで高発現している患者



群があることを確認した(図3)。また、同時に重要な細胞内シグナルタンパクであるpAKT、Ki67、p53、C-MYCの発現解析を行なった。SALL4の高発現している造血幹細胞・前駆細胞、

前赤芽球は、予後不良因子であるP53も高発現しており、関連が示唆された(図4:造血幹細胞・前駆細胞)。TP53の遺伝子異常また、発現を認めるMDS患者は、MDSの予後不良因子と報告されている(Bejar R et al. N Engl J Med. 2011 Jun



30;364(26): 2496-506. McGraw KL et al. Haematologica. 2016 Aug;101(8):e320-3.)。我々は、以前にも免疫染色により骨髓全細胞においてSALL4とp53の相関があることを報告しており(Wang F. Oncogene. 35(47): 6087-6095, 2016)、今回、細胞分画レベルで、SALL4とP53の関連が初めて示された。さらに、CYTOFの解析手法であるFlowSOMを用いて解析を進めた結果でも同様に、SALL4陰性群と比較し、SALL4陽性細胞群の中のCD34陽性細胞(造血幹細胞・前駆細胞)、CD235陽性細胞(赤芽球系細胞)、一部の骨髓球分画にp53陽性細胞が、多く含まれていた(図5)。以上から、SALL4陽性細胞群は予後不良因子であるp53陽性細胞を含んでおり、治療のターゲットとなりえる可能性が示唆された。さらに遺伝子異常との関係を明らかにするために、同時に10例で全エクソーム解析を行なった。SF3B1などさまざまな既知の遺伝子異常を認めたが、SALL4との明らかな遺伝子異常との関係性は認めなかった。一方で、複雑核型の染色体異常がある群は、ややSALL4が高い傾向にあった。これらの結果から、MDSのSALL4の発現分布が造血細胞レベルで明らかになった。また、予後不良因子であるP53との関係性が示されたことから、治療のターゲットとなり得る可能性が示唆され、本研究は、今後のMDSにおけるSALL4のさらなる機能解析やSALL4をターゲットとした創薬の礎となったと考えた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiro Tatetsu	4. 巻 3
2. 論文標題 The Interplay between Transcription Factor SALL4 and Histone Modifiers in Hematopoietic Stem and Progenitor Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Immunology	6. 最初と最後の頁 26-30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.33696/immunology.3.073	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiro Tatetsu
2. 発表標題 Oncofetal protein SALL4 is highly expressed in myelodysplastic syndrome alongside with NAT10 and P53
3. 学会等名 American Society of Hematology（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
連携研究者	松岡 雅雄  (Matsuoka Masao)  (10244138)	熊本大学病院・血液・膠原病・感染症内科・教授    (17401)	
連携研究者	徳永 賢治  (Tokunaga Kenji)  (40771126)	熊本大学病院・血液・膠原病・感染症内科・助教    (17401)	
連携研究者	岩永 栄作  (Iwanaga Eisaku)  (90743675)	熊本大学病院・血液・膠原病・感染症内科・助教    (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Department of Pathology	Brigham and Women ' s Hospital	Harvard Medical School	
米国	Havard Stem Cell Institute		Harvard Medical School	