

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06973

研究課題名（和文）20番染色体長腕より同定した骨髄異形成症候群疾患関連候補遺伝子群の解析

研究課題名（英文）Molecular analyses of candidate genes involved in myelodysplastic syndromes

研究代表者

志関 雅幸（Shiseki, Masayuki）

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90260314

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：難治性疾患である骨髄異形成症候群（MDS）の分子病態の解明を目指し、高頻度で見られる20番染色体長腕欠失を手掛かりに、同部位にMDS疾患関連遺伝子が存在するとの仮定のもと、その同定及び解析を目指した。発現低下の臨床的意義が明らかになった遺伝子（PTPN1、BCAS4）に関してその生物学的意義を検討した。両遺伝子に関して強制発現および発現遮断の実験により、発現低下が骨髄系腫瘍細胞の増殖促進をもたらすことを示した。PTPN1がコードする蛋白チロシンホスファターゼ（PTP-1B）はJAK2シグナル伝達経路において細胞増殖に關与するSTAT5を脱リン酸化することによりその機能を抑制することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髄異形成症候群は高齢者に多く、また有効な治療法に乏しい難治性疾患である。本症候群は不均一な疾患であり、分子病態も複雑である。本研究は骨髄異形成症候群で高頻度に見られる20番染色体長腕欠失を手掛かりに、疾患関連遺伝子候補を同定し、その臨床的意義を検討した。その結果をもとに、PTPN1とBCAS4の発現低下の臨床的意義を明らかにした。さらに細胞および分子生物学的検討により、これらの遺伝子の発現低下がもたらす生物学的意義を明らかにした。本研究により、本症候群の分子病態の一部が明らかにされたと考える。さらに研究成果が新規治療法開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：We tried to identify and characterize candidate genes involved in molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes (MDS) development from common deleted lesion of del(20q) which is frequently observed in MDS. We identify two genes, PTPN1 and BCAS4, as candidate genes. Reduced expression of these genes was associated with inferior survival of the patients. We explored biological significance of these genes in myeloid neoplasms, including MDS. Overexpression and knock-down experiments showed that these genes negatively regulate cell growth in myeloid tumor cells. Molecular biological analyses showed that PTPN1 suppresses expression of CyclinD1 and BCL-xL via decreased phosphorylation of tyrosine residues of STAT5, indicating that PTPN1 negatively controls cell growth by its phosphatase activity. Overexpression of BCAS4 results in cell cycle arrest at G1/S, and decreased cell growth on K562 and SKM-1 cell lines.

研究分野：分子病態

キーワード：骨髄異形成症候群 20番染色体長腕欠失

### 1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群は有効な治療法に乏しい難治性疾患である。高齢者に多く、今後さらに増加が予想される。有効な新規治療法の開発のためにも、その分子病態解明は非常に重要である。近年のゲノムの網羅的解析により骨髄異形成症候群の分子病態解明は進歩しつつある。しかし、一方で極めて多くの遺伝子異常同定され、骨髄異形成症候群の分子病態の複雑性を示している。20番染色体長腕欠失は骨髄異形成症候群患者の 5-10%にみられる染色体異常であり、共通欠失領域に骨髄異形成症候群の疾患関連候補遺伝子を同定し、その臨床的、生物学的意義を明らかにしていく。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、難治性疾患である骨髄異形成症候群 (MDS) の分子病態を明らかにすることである。特に、我々は MDS に高頻度で見られる 20 番染色体長腕欠失に注目し、共通欠失領域に存在する遺伝子の中に疾患関連遺伝子があることを想定し、その同定、機能解析を行うことで MDS の分子病態解明に寄与し、新規治療法の開発につなげたいと考えている。

### 3. 研究の方法

#### 3.2 遺伝子の解析

研究戦略の概略を図 1 に示す。共通欠失領域内に存在する遺伝子のうち、これまでの報告からがん抑制遺伝子候補と考えられる遺伝子、あるいは造血器腫瘍における意義が想定される遺伝子を含む 32 遺伝子についてまず優先的に解析した。変異解析を実施、続いて発現解析を実施した。その中で、骨髄異形成症候群症例で有意に発現低下が認められ、かつ発現低下と臨床的意義 (臨床病型との関連、生存期間との関係) が認められた 2 つの遺伝子 (PTPN1, BCAS4) について、その発現低下の生物学的意義の検討を行うこととした。具体的には、各遺伝子の調節可能な発現ベクターを構築し、骨髄系腫瘍由来細胞株 (K562)、骨髄異形成症候群由来細胞株 (SKM-1) などに遺伝子導入を行い過剰発現の細胞生物学的、分子生物学的効果を検討した。さらに siRNA を用いた発現遮断実験を実施し、同様の検討を行った。

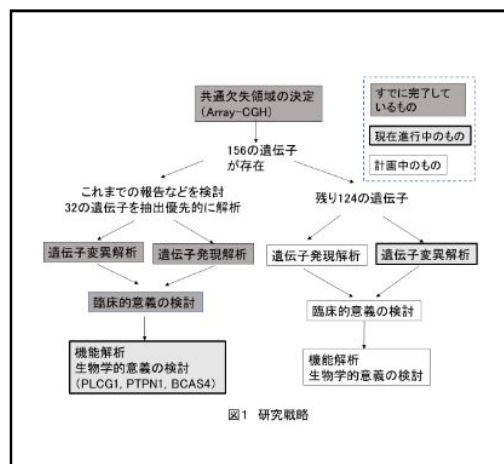


図1 研究戦略

#### 残りの遺伝子の遺伝子変異および発現解析

未解析の遺伝子群に関して、さらに層別化を行い、造血細胞の分化増殖に關与するあるいは固形腫瘍の発生進展に關与する遺伝子を選択し、変異の有無および発現に關して臨床検体を用いて検討を行い、臨床的意義の検討を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) PTPN1 発現低下の生物学的意義

テトラサイクリンにより発現が誘導される発現ベクターシステムをもちいて、K562 細胞に PTPN1 遺伝子導入を行い強制発現系を構築し実験を実施した。その結果から、PTPN1 強制発現により、細胞増殖は抑制され、形態的には細胞の分化傾向およびアポトーシスが誘導された (図 2)。フローサイトメトリーを用いた細胞周期解析では G1 期が増加し S 期が減少した (図 3)。また subG1 population の増加が認められた。このことから PTPN1 は骨髄系腫瘍において細胞周期で G1/S 停止を誘導し、増殖を抑制することが示された。またアポトーシスを誘導することが示唆された。PTPN1 遺伝子は蛋白チロシン脱リン酸化酵素の一つである PTP-1B をコードする。蛋白チロシンホスファターゼはチロシンキナーゼの作用と拮抗し、基質蛋白のチロシン残基脱リン酸化により、基質蛋白の機能を調節する。チロシンキナーゼの多くが基質となる蛋白

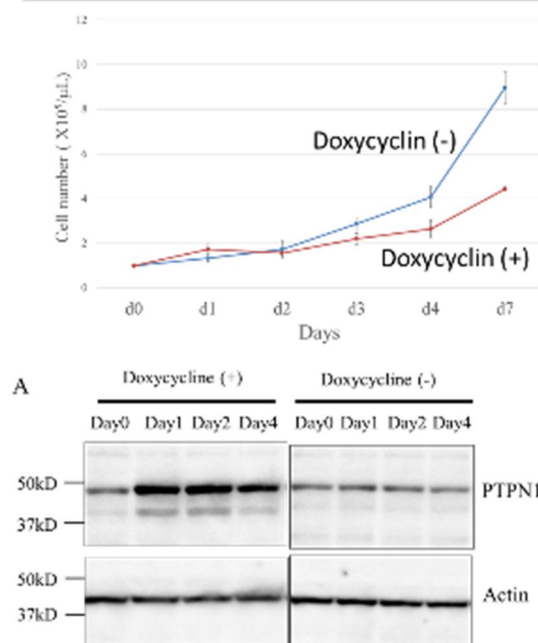


図2 PTP-1B過剰発現によりK562増殖を抑制

の活性化を通じて、細胞増殖を促進する作用を持ち、その機能異常はがん化と関連することから、がん遺

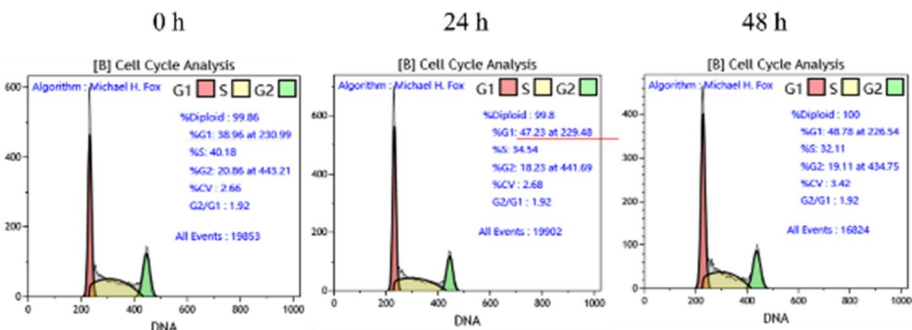


図3 PTP-1B強制発現と細胞周期変化

伝子として分類される。一方で、その作用に拮抗する蛋白チロシンホスファターゼはがん抑制遺伝子として機能することが考えられる。PTP-1Bは、インスリンシグナル伝達経路に関与することが知られ、チロシンキナーゼと拮抗することで、その作用を制御することが知られている。様々な基質が存在するが、その一つがSTAT5である。STAT5は正常造血および造血系腫瘍における細胞増殖・分化に重要な役割を果たす。今回 JAK2-STAT5 経路に注目

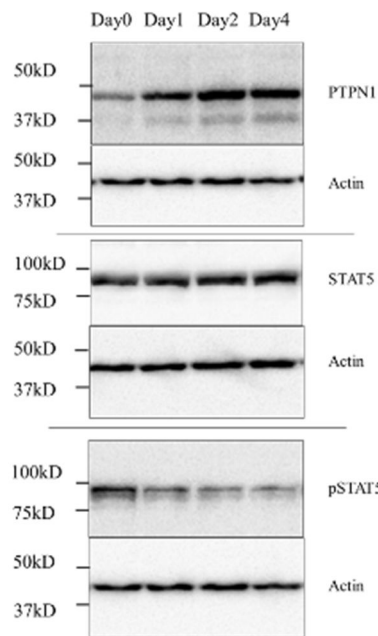


図4 PTP-1B過剰発現によりSTAT5リン酸化を抑制

して解析を進めた。その結果 PTPN1 の強制発現は STAT5 のリン酸化抑制をもたらすことが示された (図4)。STAT5 は転写因子であり、リン酸化により活性化される。活性化された STAT5 により発現誘導される遺伝子群には、細胞周期に対して促進的に働く CyclinD1, 抗アポトーシス分子 BCL-xL が含まれるが、PTP-1B の過剰発現により、これらの分子の発現レベルが低下することを示した (図5)。以上の結果から、PTP-1B は STAT5 の脱リン酸化を介してその機能を抑制し、下流にある細胞増殖に関与する遺伝子群の発現レベルを低下させることが示唆された。一方、JAK2 の下流遺伝子群のうち、STAT5 を介さない経路により調節されている赤芽球系などの分化に関与する遺伝子群 (GATA1, EPOR, HBB) については発現レベルがむしろ亢進していることが示された (図6)。これらの結果から PTP-1B の発現低下は、骨髓系腫瘍の増殖亢進、分化異常にかかわることが示唆された。RNAi を用いた PTP-1B の発現遮断実験では、逆に STAT5 のリン酸化亢進が認められ、下流遺伝子群の発現上昇が認められた。

## (2) BCAS4 遺伝子発現低下の生物学的意義

PTPN1 と同様、BCAS4 は骨髓異形成症候群症例で発現が低下しており、その発現低下の臨床的意義が示された。BCAS4 低発現と生存期間が良くないこととの関連が示された。これまでの研究から BCAS4 遺伝子異常と乳がんとの関連が示されているが、その機能は十分に解析されていない。BCAS4 がコードする蛋白は、その構造上の特徴から、cappuccino ファミリーに属すると想定されている。

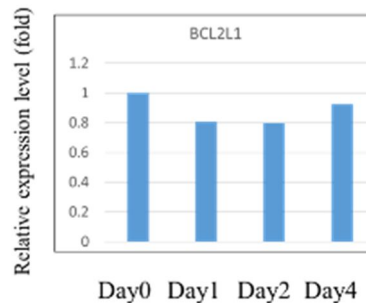
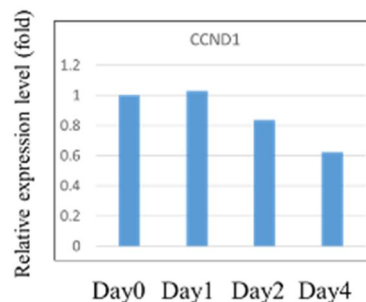


図5 PTP-1Bによって発現が抑制される遺伝子

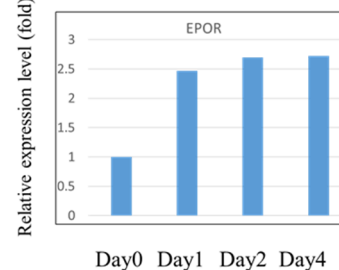
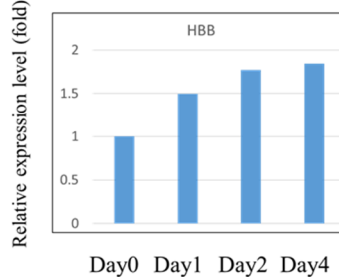
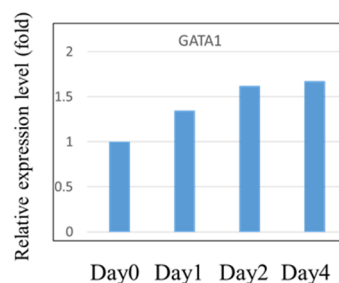


図6 PTP-1Bによる発現が亢進する遺伝子群

lysosome の生成に関与し、細胞内輸送とも関連するとされている。正常造血および造血器腫瘍における具体的な役割は不明である。BCAS4 の機能解析のため、低分子化合物 cumate で発現誘導ができる PiggyBac 発現ベクターシステムを用いた。強制発現ベクターを構築し、K562 および SKM1 細胞株に遺伝子導入を行った。強制発現により、細胞増殖の抑制が認められた(図7)。また、細胞周期解析では、BCAS4 強制発現により、G1 期細胞割合増加と S 期細胞割合減少が認められた(図8)。BCAS4 強制発現は G1/S での細胞周期停止をもたらし、細胞増殖を抑制する可能性が示唆された。一方で、subG1 population の増加は目立たず、アポトーシス誘導は、明らかではなかった。細胞周期制御に関連する分子の発現レベルを検討したところ、サイクリン D1 発現レベル上昇が認められた。現時点では、BCAS4 の増殖抑制効果に関する詳細な分子生物学的解析は終了しておらず、解析を継続する予定である。

### (3) 残り 124 遺伝子に関する解析 変異解析

次世代シーケンサーを用いて、全エクソン解析を行い 124 遺伝子のコーディング領域を中心に解析を行った。20 番染色体長腕欠失をもつ症例から得られた、骨髓臨床検体を用いて解析を行った。変異が認められた症例に関しては、サンガー法を用いて MDS120 症例の臨床検体で、同一変異が認められるかを調べたが、recurrent な変異は認められなかった。

### 発現解析

まず、124 遺伝子のうち、これまでの報告から造血との関連が示されている遺伝子、ならびに固形腫瘍の発生・進展に関連することが示唆されている遺伝子に関して解析することとした。47 遺伝子について解析した。その結果、20 の遺伝子の発現が、del 20q を伴う症例で低下しており、さらに 4 つの遺伝子 (TTI1, TOX2, SDC4, CD40) では、del (20q) を伴わない症例でも、発現低下が認められた。発現低下がみられた遺伝子に関して、その臨床的意義を検討したが、病型、予後、治療反応性などとの関連は、認められなかった。今後は、残りの遺伝子、さらには non-coding RNA 遺伝子に関して検討を進めていく計画としている。

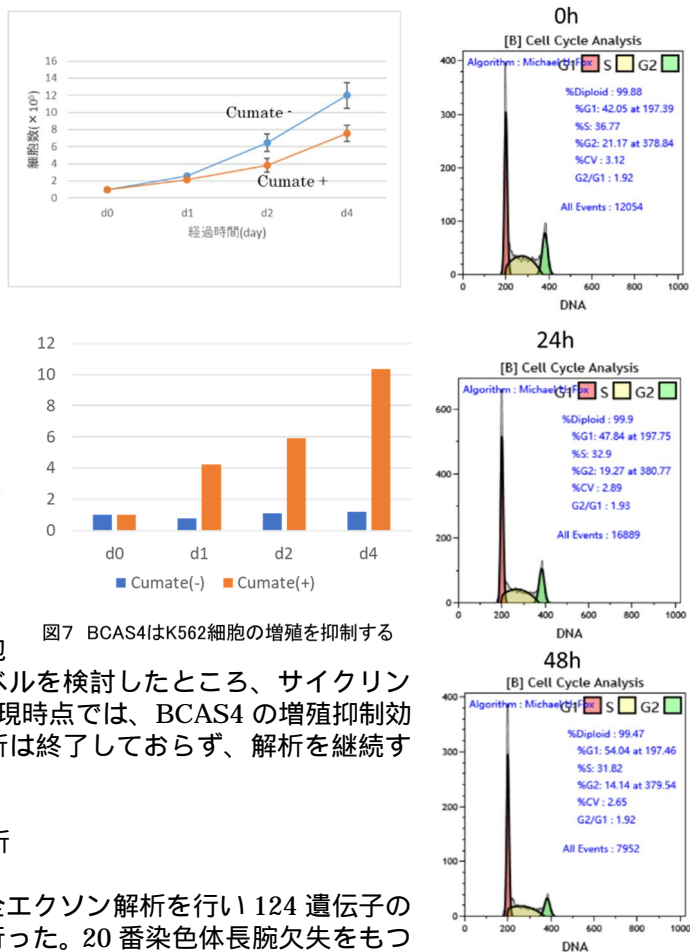


図7 BCAS4はK562細胞の増殖を抑制する

図8 BCAS4強制発現と細胞周期

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shiseki M, Ishii M, Okada M, Ohwashi M, Wang YH, Osanai S, Yoshinaga K, Mori N, Motoji T, Tanaka J.	4. 巻 84
2. 論文標題 Expression analysis of genes located within the common deleted region of del(20q) in patients with myelodysplastic syndromes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Leukemia Research	6. 最初と最後の頁 106175-1 ~ -5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.leukres.2019.106175	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shiseki M, Ishii M, Miyazaki M, Osanai S, Wang YH, Yoshinaga K, Mori N, Tanaka J.	4. 巻 9
2. 論文標題 Reduced PLCG1 expression is associated with inferior survival for myelodysplastic syndromes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 460-468
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cam4.2717.	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Masayuki Shiseki, Mayuko Ishii, Mari Ohwashi, Kentaro Yoshinaga, Naoki Mori, Junji Tanaka.
2. 発表標題 Overexpression of protein tyrosine phosphatase non-receptor type1 causes STAT5 dephosphorylation, resulting in suppression of cell growth signal in K562 human leukemia cells
3. 学会等名 第24回欧州血液学会総会（24th European Hematology Association Congress）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masayuki Shiseki, Mayuko Ishii, Mari Miyazaki, Kentaro Yoshinaga, Naoki Mori, Junji Tanaka
2. 発表標題 Prognostic significance of reduced BCAS4 expression in bone marrow cells of patients with myelodysplastic syndromes
3. 学会等名 第61回米国血液学会総会（61st American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masayuki Shiseki
2. 発表標題 CLINICAL SIGNIFICANCE OF REDUCED EXPRESSION OF THE GENES LOCATED WITHIN COMMON DELETED REGION OF DEL(20Q) IN PATIENTS WITH MYELODYSPLASTIC SYNDROMES
3. 学会等名 第23回欧州血液学会【ストックホルム】(国際学会)
4. 発表年 2018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

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