

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08357

研究課題名（和文）Aza-dCによるMDS患者の貧血改善における翻訳調節機構の関与

研究課題名（英文）Involvement of the translation machinery in the improvement of anemia in myelodysplastic syndromes by Aza-dC

研究代表者

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：骨髄異形成症候群で汎用されるDNAメチル化阻害薬アザシチジンが、貧血を改善する作用機序の解明を試みた。Aza-dCで赤血球分化を誘導したK562細胞のトランスクリプトーム解析やメチル化DNA解析を、次世代シーケンサを用いて行った結果、翻訳伸長因子eEF1A2が標的遺伝子として同定された。eEF1A2欠損マウスを用いた骨髄移植実験や、網羅的オープンクロマチン解析(ATAC-seq法)の結果、造血系では関連遺伝子eEF1A1が主に機能しており、Aza-dCによる異所性のeEF1A2遺伝子の発現誘導が、貧血改善のメカニズムであることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は複雑なエピゲノム変動を伴うMDS細胞を用いた臨床側からのアプローチではなく、K562細胞株というシンプルな実験系で赤血球分化に標的を絞ったアプローチであり、得られた翻訳効率の関与という新しい知見と本研究での解析結果は、Azaの作用機序への理解をさらに進めるものであると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Accumulating evidence has demonstrated successful epigenetic therapy by targeting DNA demethylation with Aza/Aza-dC in MDS. However, the mechanism by which Aza/Aza-dC induces Hb synthesis is still largely unknown. To identify the direct targets of Aza-dC, we applied whole genome methylation and transcriptome analysis to K562 cells, in which Hb synthesis was significantly enhanced. This identified that a translational regulator, eEF1A2 was greatly induced by Aza-dC, coupled with significant DNA demethylation of the gene promoter. BMT assay using eEF1A2-deficient mice and ATAC-seq analysis, which identifies genome wide open chromatin regions revealed that the related eEF1A1 gene mainly contributes to hematopoiesis. These data indicated that the ectopic expression of eEF1A2 is a mechanism through which Aza-dC improves the anemia of MDS patients.

研究分野：血液内科学

キーワード：骨髄異形成症候群 アザシチジン

## 1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群(MDS)の治療では、急性白血病の治療で用いられるような高侵襲の化学療法の有効性は一般に低く、現下、根治が期待できるのは骨髄移植である。しかし、MDSの患者は高齢者が多いことから、骨髄移植の適応となる患者は多くないなど、しばしば治療法の選択に制限がかかる。こうした中で延命効果を期待でき、なおかつ頻回の輸血など、患者の負担が大きくトラブルをおこしがちな保存的治療を回避することのできる、低侵襲の治療法の開発が切望されている。

核酸アナログであるアザシチジン(商品名ビダーザ、以下 Aza-C)やデシタピン(以下 Aza-dC)は、骨髄性白血病治療薬の主力の座にあるシタラピン(Ara-C)と同じく、核酸合成阻害による抗白血病候補として開発されたが、臨床的に成功しなかった。ところが、低用量の投与でゲノムDNAの脱メチル化効果があることが明らかとなり、エピゲノム調整薬として一躍注目を浴びることになった。哺乳類のゲノムDNAでは、シトシン残基はしばしばメチル化されており、その程度は遺伝子発現に大きな影響を与える。細胞分裂に備えたDNA複製のたびに、新規に合成されたDNA鎖では新たなシトシンメチル化を行ってメチル化状態を維持しているが、Aza-dC/Cの投与により、メチル化酵素の活性が阻害され、脱メチル化効果が現れる。MDS患者にAza-dC/Cを投与すると、一般的に、一定の延命効果とともに輸血回数の減少などの効果が得られることから、日本ではビダーザが2011年から保険適応となり、広く使用されている。しかし、その効果は必ずしも確実ではなく、患者によっては骨髄抑制が強く出現し、病状が悪化することさえ稀ではない。

## 2. 研究の目的

MDS治療において、Aza-dC/Cが奏功する分子メカニズム、特に赤血球産生に対するAza-dC/Cの作用を解明することにより、投与症例の選別法や、他の抗がん剤、エピゲノム調整薬との併用療法の開発を進めるための基盤を提供する。

## 3. 研究の方法

[使用した細胞] K562細胞(理研細胞バンクより購入)は、慢性骨髄球性白血病(CML)の急性転化由来の細胞株で、赤芽球前駆細胞としての性質を持っており、Aza-dC/Cやsodium butyrate(NaB, HDAC阻害剤)を含む様々な刺激により顕著なヘモグロビン合成が起きることが古くより知られている。F-36P細胞(理研細胞バンクより購入)はMDS由来のgranulocyte macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF)またはInterleukin(IL)-3依存性細胞株であるが、Erythropoietin(Epo)存在下で赤芽球系への分化が見られる。臍帯血(日赤臍帯血バンクより購入)CD34陽性細胞の赤血球への分化培養実験は、秋田大学澤田先生の方法に基づいて実施した。臍帯血からビーズ法でCD34細胞を単離後、IL-3, Stem Cell Factor(SCF), Epoからなるサイトカインカクテルで7日間培養したのち、引き続きEpo単独で5日間培養を継続した。

[次世代シーケンサによる解析など] 網羅的トランスクリプトームは、イルミナ社の次世代シーケンサ(GA-x)を用いて行った。網羅的なプロモータのメチル化の評価は、メチル化シトシンを抗5-mCモノクローナル抗体で濃縮する、メチル化DNA免疫沈降法(MeDIP法)にて得られたサンプルを、GA-xを用いてシーケンスした。個々のプロモータのメチル化解析はバイサルファイト・シーケンス法にて、定法に従って行った。ATAC-seq解析は、イルミナ社の次世代シーケンサ(HiSeq 2500)を用いて行った。

[動物実験] *eEF1A2*遺伝子欠損マウスは、*eEF1A2*のプロモータ領域とfirst exonが欠失した自然突然変異マウスで、ジャクソン研究所から購入した(B6C3Fe a/a-Eef1a2<sup>wt</sup>/J, Stock no. 000182)。骨髄移植実験は、*eEF1A2*遺伝子ホモ欠損マウスまたは正常マウスの骨髄細胞 $1 \times 10^6$ 個を、致死量のガンマ線照射(9.5Gy)したLy5.1コンジェニックマウスに移植し、6ヶ月間定期的に採血を行い造血機能について検討した。

## 4. 研究成果

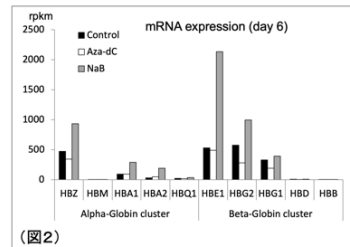
K562細胞をAza-dC(5 $\mu$ M)存在下で培養すると、ヘモグロビンが合成されて細胞ペレットは赤くなる(図1)。細胞内ヘモグロビン濃度は、投与6日後に、投与前の10倍以上の1細胞あたり200 pgに達した。増加したのはHbAに加えて、胎児型のHbE1, G1, G2, Zであり、成人型のHbBは上昇しなかった。一方、ヘム合成系では、律速段階で働くdelta-aminolevulinic acid synthase 2(ALAS2)の数百倍に及び顕著なmRNAの増加が見られた。しかしこのようなK562細胞内のヘモグロビン増加にもかかわらず、ヘモグロビン各鎖のmRNAの発現は、NaB刺激時にみられるような顕著な増加を見るところか、むしろ減弱する傾向さえあり(図2) Aza-dCによるヘモグロビン合成の増加には、転写後調節が関与していることが示唆された。



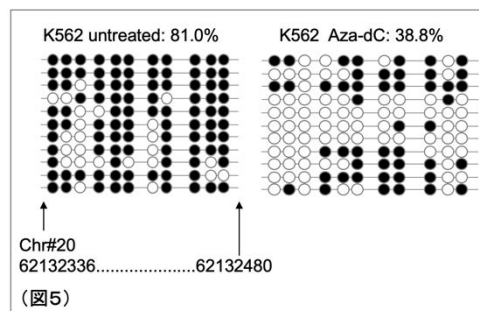
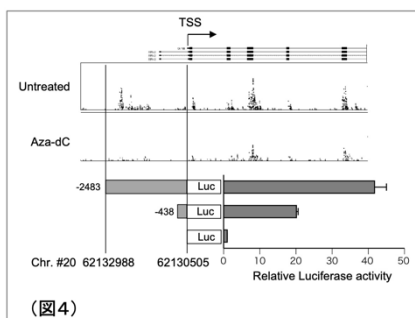
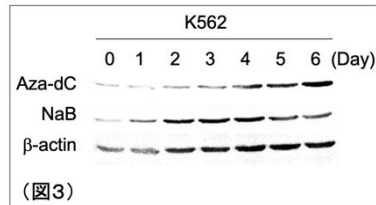
(図1)

そこで、次世代シーケンサを駆使して、Aza-dCの標的となる翻訳調節因子の同定を試みた。ま

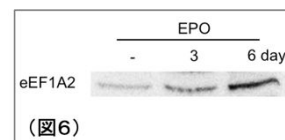
ず、K562 細胞のトランスクリプトーム解析により、Aza-dC 添加後 6 日の転写レベルが 2 倍以上に増加した 1,034 遺伝子を同定した。一方、MeDIPseq 法を用いて、転写開始点付近（プロモータ領域）のメチル化が有意に減少した 645 遺伝子を同定した。両者に含まれる 86 遺伝子の中から、翻訳調節に関与する遺伝子を探索し、eukaryotic translation elongation factor (eEF1A2) を候補として選択した。



eEF1A2 は、mRNA レベルが Aza-dC により 23.38 から 111.98 rpkm に増加し、ウエスタンブロット法による解析でも、発現増強が示された（図 3）。加えて、eEF1A2 は NaB によるヘモグロビン合成促進時の標的遺伝子であることが明らかになった。MeDIPseq 法による、*eEF1A2* 遺伝子のプロモータ領域の詳細な解析を行ったところ、ルシフェラーゼ法によるプロモータ活性の高い領域や、遺伝子本体（エクソン領域）の高度なメチル化が、Aza-dC 処理により著明に脱メチル化されていることが判明した（図 4）。個々のシトシン残基のメチル化状態を示すバイサルファイト法でも、プロモータ領域の顕著な脱メチル化が認められた（図 5）。

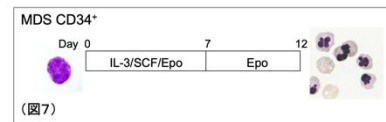


eEF1A2 蛋白がヘモグロビンの発現を増加させるかどうかを調べるため、RNA 干渉法 (shRNA) を用いて、eEF1A2 の発現が抑制された K562 細胞を樹立した。この細胞を Aza-dC 存在下で培養したところ、ヘモグロビン産生量が半分に以下に抑制された。以上の結果は、CML 由来の K562 細胞株で、Aza-dC による *eEF1A2* 遺伝子の脱メチル化が促進される結果、転写が促進され、eEF1A2 蛋白質の発現が増強されることにより、ヘモグロビンの合成が増加することを示している。



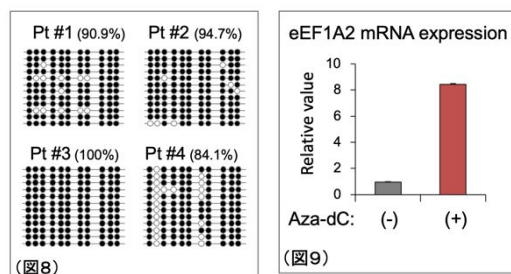
続いて、K562 細胞以外の腫瘍細胞の赤芽球系への分化過程における *eEF1A2* 遺伝子の関与を、MDS 由来の F-36P 細胞で検討した。F-36P 細胞は Epo によりヘモグロビンの合成が増強することが知られている。その過程における eEF1A2 蛋白質の発現をウエスタンブロット法で検討したところ、顕著な増加が認められた（図 6）。

このような、腫瘍細胞でのヘモグロビン発現増強過程で eEF1A2 発現が増強する現象が、生理的な赤芽球成熟段階で見られるか検討した。臍帯血から CD34 陽性細胞を単離し赤血球へと分化誘導したところ（「研究の方法」を参照）7 日目の CFU-E の段階で、*eEF1A2* 遺伝子の転写が 5 倍程度に誘導された。



以上の結果より、腫瘍細胞株および生理的な状況下で、eEF1A2 翻訳伸長因子がヘモグロビン合成に関与することが示唆された。そこで、Aza-dC を投与された MDS 患者の貧血改善に eEF1A2 の発現増強が関与しているか検討するために、MDS 患者骨髓細胞から CD34 陽性細胞を単離し、臍帯血と同様の手法で赤血球への分化を試みた。4 検体で、図 7 に示したように、異型性が強いものの、12 目までに脱核赤血球への分化が得られた。

これらの検体で、*eEF1A2* 遺伝子のプロモータ領域のメチル化をバイサルファイト法により評価したところ、顕著にメチル化を受けていることが判明した（図 8）。また、これらの細胞では、eEF1A2 の mRNA 発現増強が認められた（図 9）。これらの結果より、*eEF1A2* が、MDS に対する Aza-dC の標的遺伝子である可能性が示された。また、骨髓 CD34 陽性細胞のサイトカインによる赤血球への分化アッセイは、Aza-dC が有効である患者の選択法として有用である可能性が示された。



eEF1A2 には、アミノ酸レベルで 98% の高い相同性を有する eEF1A1 ホモログが存在し、A1/A2 の存在比は、臓器や発達段階により様々であること

が知られている。骨髄では eEF1A1 の mRNA や蛋白質発現レベルが eEF1A2 を凌駕していることから、eEF1A1 の役割が優勢であると考えられてきた。今回、赤芽球成熟段階における eEF1A2 の関与を示唆する所見が得られたことから、eEF1A2 の造血に対する役割の評価を試みた。eEF1A2 遺伝子ホモ欠損マウス（生後 4 週で致死）から、生後 25 日目に骨髄を採取し、致死量の放射線照射を受けた正常マウスに移植したところ、正常な造血が維持されたことから、eEF1A2 は造血に対し必須でないことが確認された。この結果は、造血細胞で eEF1A2 遺伝子のプロモータ領域が強いメチル化を受けていることと矛盾しない。

また今回、Aza-dC の標的遺伝子の同定を試みるにあたり、上記のメチル化解析とは別のアプローチとして、オープンクロマチン領域を特定する ATAC (Assay for Transposase-Accessible Chromatin)-seq を試みた。その結果、50 余の候補遺伝子を得たが、eEF1A2 はその中には含まれなかった。すなわち、eEF1A2 付近のクロマチンは不活性であることが示唆され、この結果も eEF1A2 が造血細胞にとって、本来的に役割が小さいことを示唆している。これらの結果より、Aza-dC は本来大きな役割を果たしていない遺伝子の、異所性の発現を誘導するものと考えられた。また、eEF1A2 の発現および機能の増強が、一部の MDS 患者でヘモグロビンの翻訳効率の改善につながるメカニズムの背景として、Aza-dC の効果が得られる MDS 患者の赤芽球では、eEF1A1 の機能低下が存在するのかもしれない。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Sera Yasuyuki, Nakata Yuichiro, Ueda Takeshi, Yamasaki Norimasa, Koide Shuhei, Kobayashi Hiroshi, Ikeda Ken-ichiro, Kobatake Kohei, Iwasaki Masayuki, Oda Hideaki, Wolff Linda, Kanai Akinori, Nagamachi Akiko (以下10名)	4. 巻 137
2. 論文標題 UTX maintains the functional integrity of the murine hematopoietic system by globally regulating aging-associated genes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 908 ~ 922
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2019001044	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

1. 著者名 Nagamachi Akiko, Kanai Akinori, Nakamura Megumi, Okuda Hiroshi, Yokoyama Akihiko, Shinriki Satoru, Matsui Hiroataka, Inaba Toshiya	4. 巻 131
2. 論文標題 Multiorgan failure with abnormal receptor metabolism in mice mimicking Samd9/9L syndromes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 e140147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI140147	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 -

1. 著者名 Inaba Toshiya, Nagamachi Akiko	4. 巻 112
2. 論文標題 Revertant somatic mosaicism as a cause of cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1383 ~ 1389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14852	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 -

1. 著者名 Watanabe Atsushi, Miyake Kunio, Nordlund Jessica, Syvanen Ann-Christine, van der Weyden Louise, Honda Hideaki, Yamasaki Norimasa, Nagamachi Akiko (以下19名)	4. 巻 136
2. 論文標題 Association of aberrant ASNS imprinting with asparaginase sensitivity and chromosomal abnormality in childhood BCP-ALL	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 2319 ~ 2333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2019004090	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

1. 著者名 Takahashi Norio, Misumi Munechika, Niwa Yasuharu, Murakami Hideko, Ohishi Waka, Inaba Toshiya, Nagamachi Akiko, Tanaka Satoshi, Braga Tanaka Ignacia, Suzuki Gen	4. 巻 193
2. 論文標題 Effects of Radiation on Blood Pressure and Body Weight in the Spontaneously Hypertensive Rat Model. Are Radiation Effects on Blood Pressure Affected by Genetic Background?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Radiation Research	6. 最初と最後の頁 552 ~ 552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1667/RR15536.1	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 -

1. 著者名 Takahashi Norio, Misumi Munechika, Murakami Hideko, Niwa Yasuharu, Ohishi Waka, Inaba Toshiya, Nagamachi Akiko, Suzuki Gen	4. 巻 61
2. 論文標題 Association between low doses of ionizing radiation, administered acutely or chronically, and time to onset of stroke in a rat model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 666 ~ 673
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jrr/rraa050	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 -

1. 著者名 Nagamachi Akiko, Kikuchi Jiro, Kanai Akinori, Furukawa Yusuke, Inaba Toshiya	4. 巻 105
2. 論文標題 Kinetics of cytokine receptor internalization under steady-state conditions affects growth of neighboring blood cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 e325 ~ e327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2019.232959	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 -

1. 著者名 Islam Shamima, Chuensirikulchai Kantinan, Khummuang Saichit, Keratibumrungpong Tanyaporn, Kongtawelert Prachya, Kasinrer Watchara, Hatano Sonoko, Nagamachi Akiko, Honda Hiroaki, Watanabe Hideto	4. 巻 87
2. 論文標題 Accumulation of versican facilitates wound healing: Implication of its initial ADAMTS-cleavage site	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Matrix Biology	6. 最初と最後の頁 77 ~ 93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.matbio.2019.10.006	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長町安希子
2. 発表標題 Abnormal endocytosis due to a Samd9L mutation causes bone marrow/multi-organ failure in mice mimicking MIRAGE syndrome
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長町安希子
2. 発表標題 Abnormal endocytosis due to a Samd9L mutation causes bone marrow/multi-organ failure in mice mimicking MIRAGE syndrome
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akiko Nagamachi
2. 発表標題 Regulation of receptor internalization by Samd9/Samd9L and their mutants
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長町安希子
2. 発表標題 The role of Samd9 and Samd9L in the early endocytotic pathway
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術総会
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
---------	---------