

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02948

研究課題名(和文) Samd9/9L症候群とIFNシグナルから迫るMDS発症の分子メカニズム

研究課題名(英文) Molecular mechanisms through which SAMD9/9L mutants cause bone marrow failure

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：Samd9とSamd9L(以下、Samd9/9L)は、モノソミー7を伴う骨髄異形成症候群(MDS)の責任発がん抑制遺伝子であるが、その機能亢進型の点変異が先天性造血不全を主徴とするSamd9/9L症候群を引き起こす。申請者がかねてSamd9L欠損マウスと点変異マウスを作成し、それぞれがヒトMDSとSamd9/9L症候群のモデルマウスとして有用であることを報告してきた。本研究では、これらのマウスから得た造血細胞を解析し、SAMD9/9Lが極めて特異なメカニズムでTGFβシグナルを攪乱させることがヒト疾患の原因であることを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髄異形成症候群(MDS)は、かつて「不応性貧血」「くすぶり型白血病」と呼ばれていたことが端的に示すように、造血不全(貧血)と腫瘍の両方の性格を持つ難治性疾患である。SAMD9/9L遺伝子は、その欠損がMDSの原因となると同時に、その機能亢進が造血不全を引き起こすことがヒトとマウスで確認されている上、造血系以外のさまざまな臓器の発生過程、さらにはPOXウイルス防御にも大きな役割を果たす。SAMD9/9Lの生化学的機能は十分に解明されていない中で、TGFβシグナルに対する未知の干渉経路が明らかとなり、上記疾患の治療に発展しうる成果である。

研究成果の概要(英文)：Samd9 and Samd9L (hereafter referred to as Samd9/9L) are genes known to suppress AML and myelodysplastic syndromes (MDS) located on chromosome 7q. Recent studies have revealed that gain-of-function mutations in SAMD9/9L lead to multiple organ failure, including inherited bone marrow failure syndromes now designated as "SAMD9/9L syndromes". Through our research, we have developed mouse models lacking the Samd9L gene or carrying a mutated Samd9L, which accurately mimic 7q-AML/MDS or SAMD9/9L syndromes. In this study, we investigated hematopoietic cells isolated from these mice and discovered that the mutated Samd9L disturbs TGFβ signaling pathways through previously unidentified mechanisms, contributing to the development of SAMD9/9L-related human diseases.

研究分野：血液学 分子生物学

キーワード：SAMD9/SAMD9L症候群 骨髄異形成症候群 モノソミー7 先天性造血不全症候群 TGFβ

1. 研究開始当初の背景

モノソミー7は骨髄性腫瘍で最も高頻度の染色体異常のひとつである。その発がんへの関与メカニズムは長く不明であったが、今世紀に入り7q上に優性形質(片アレルの欠失のみで機能喪失)の発がん抑制遺伝子が多数存在することがわかり、大領域欠損による新たな発がんメカニズムが確立された(Inaba, Blood, 2017)。その端緒となったのが、小児骨髄性腫瘍における微小欠失領域(7q21.3サブバンド)からわれわれが単離した*SAMD9*および*SAMD9L*(60%のアミノ酸相同性を持つ関連遺伝子、以下あわせて*SAMD9/9L*)遺伝子である。*Samd9L*遺伝子の欠損マウスは、ヘテロおよびホモ欠失マウスのいずれもが同等に、半数以上でMDSを発症する(Nagamachi, Cancer Cell, 2013)。

その後2016年になって、*SAMD9/9L*遺伝子の機能亢進型変異が、副腎や生殖器など多臓器先天異常を伴う造血不全を呈する新規の常染色体優性遺伝疾患(MIRAGE症候群)や、汎血球減少を伴う小脳失調症(Ataxia pancytopenia)、先天性骨髄不全症候群(IBMF)、家族性モノソミー7症候群、孤発例の小児MDSなどにおいて多数報告され、新規疾患概念「*SAMD9/9L*症候群」として確立されるに至った(図1)。*SAMD9/9L*症候群はIBMFのカテゴリーの中でいまやFancony貧血を超えて最も高頻度の疾患である。注目すべきことに、本症候群の乳幼児はモノソミー7を伴うMDSを高頻度に発症するが、通常と異なり、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(図2)、変異遺伝子を失うことにより、*SAMD9/9L*の機能亢進に起因する造血細胞の機能不全から回復する"revertant mosaicism"と呼ばれるメカニズムにより、発がんが促進されるという、過去に例のない、極めて複雑なメカニズムが考えられた(Inaba, Cancer Science 2021)。

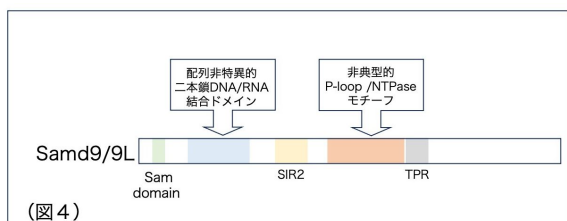
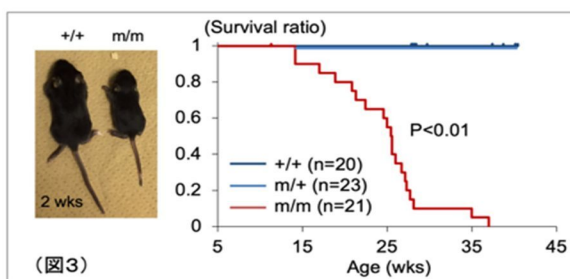
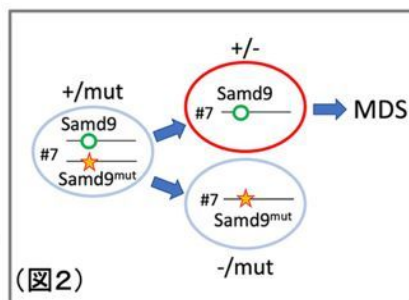
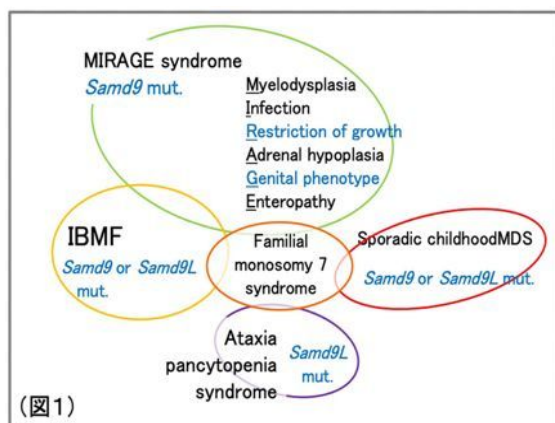
そこでわれわれは、CRISPR/CAS9法を用いて、MIRAGE症候群の点変異(*SAMD9*^{D769N})に対応する*Samd9L*^{D764N}を導入したマウスを作製したところ、そのホモ変異マウス(m/m)は、低体重、短命(図3)、貧血、B細胞減少、生殖器発達不全など、ヒト疾患と酷似した症状を示し、*SAMD9/9L*症候群のモデルマウスが得られた(Nagamachi, JCI, 2021)。造血に関してとりわけ重要と考えられるのは、競合的骨髄再構築アッセイの結果で、正常骨髄細胞に対し*Samd9L*欠損骨髄細胞は再構築能が亢進しているのとは対照的に、変異を持つ骨髄細胞では再構築能が著明に減弱していた。

このように*SAMD9/9L*は発がん抑制以外にも、骨髄造血や小脳・生殖器などの組織維持、副腎・腎臓などの発生制御、POX族ウイルスの細胞内感染防御など多彩な機能を持つことが明らかになっている。

*SAMD9/9L*は分子量180kDaに及ぶ大きなタンパク質であり、これまでに多くの研究者により様々な分析が行われてきた。N末側のタンパク質結合に関わるSAMドメインに続いて、配列非特異的な二重鎖DNA/RNA結合能を持つドメイン(主に細胞内ウイルス感染防御に関与すると想定される)さらにタンパク質中央部にはATPase活性を持つと予想される部位が存在する(図4)。

その生化学的・生物学的機能としてわれわれは、上述した*SAMD9/9L*症候群の一亜型であるMIRAGE症候群のモデルマウスに加えて、以前作製した*Samd9L*遺伝子欠損マウス(Nagamachi, Cancer Cell, 2013)の長期造血能や諸臓器を精査することにより、*Samd9L*が受容体取り込み制御やエンドソーム交通制御に関わることを示し、欠損時の発癌や変異体の造血不全との関連を

論じてきた。一方で海外の研究グループなどからは、SAMD9/9L 過剰発現による増殖抑制も、発がん抑制機能との関わりからしばしば議論されてきた。



2. 研究の目的

SAMD9/9L の造血能維持メカニズムを、長期造血幹細胞(LT-HSC)における役割に焦点を当てて解析し、SAMD9/9L の生化学的機能を解明する。

3. 研究の方法

マウスは Samd9L ホモ変異(m/m)マウスに加え、Samd9L ホモ欠損(-/-)マウスと正常マウス (+/+) を用いた。いずれもメンデルの法則に従って誕生したが、(m/m)マウスのみ、生直後より一見して小型で、活発ではあるが、腎臓の変性が進み全匹が半年以内に死亡した(図3)。それ以外のマウスは生後1年ごろまでは正常であるため(大半の+/-と-/-マウスは、それ以降に MDS を発症して死亡する)、m/+マウスどうしと、+/-マウスどうしの掛け合わせにより、系統を維持した。

iLS 細胞の樹立は東京理科大の伊川研究室との共同研究で行った。iLS 細胞についての詳細は研究成果で述べた。

LT-HSC の分離はフローサイトメトリー (FACS) を用いて、Lin⁻cKit⁺Scal⁺CD34⁻Flt3⁺細胞を単離した。

4. 研究成果

マウスに BrdU を静注し、翌日骨髄から LT-HSC を分離して BrdU 陽性細胞を測定したところ、LT-HSC(m/m)では陽性細胞の比率が(+/+)や(-/-)細胞に比較して倍増していた。上述したように LT-HSC(m/m)は(+/+)や(-/-)と比較して競合的骨髄再構築能が著しく低下している。したがって LT-HSC(m/m)が静止期ではなく "cycling" であることにより、LT-HSC の枯渇を招くことがその原因であると推測された。

そこで、LT-HSC のトランスクリプトーム解析を行った。単離直後は (+/+)、(-/-)、(m/m)ともに TGFb のシグナルを反映している指標として重要な Smad7 の発現が高く、サイトカインカクテル(SCF+TPO)による短期培養後は速やかに発現が減弱した。しかし、培養液中に TGFb を添加すると Smad7 は高発現を維持した。このことにより LT-HSC が存在する骨髄造血環境中のニッチには、造血支持細胞によって分泌される TGFb が高濃度に保たれていると考えられる。

TGFb は Cdkn1c (p57)、HoxB5、Neo1、Egr 1 などの標的因子の発現を促進する一方、Cdk6 の発現を抑制して、LT-HSC を静止期に留めることが知られている。LT-HSC(m/m)での前 4 者遺伝子の発現レベルは、LT-HSC(+/+)や LT-HSC(-/-)に比較して顕著に減少する一方、Cdk6 の発現が増加していることが明らかとなった。これらのデータから、高濃度の TGFb に対する LT-HSC(m/m)の反応性が低下していることが、LT-HSC(m/m)が "cycling" であり、ひいては骨髄再構築能が低下する原因と考えられた。

変異 Samd9L が TGFb の反応性を制御するメカニズムとして、細胞外マトリックスによる TGFb 前駆体の分解プロセスから始まり、受容体との結合、Smad2/3 リン酸化プロセスと核内への移行、標的遺伝子の転写調節、生成された標的遺伝子 mRNA の半減期調節など、様々なプロセスが考えられる。これらのシグナル伝達経路の詳細な解析を行うのに、得られる細胞数に限りがある LT-HSC を用いることは現実的ではない。

解析材料を得るために、(+/+)、(-/-)および(m/m)マウス骨髄細胞から、SCF (stem cell factor)/IL-7/Flt-3ligand 依存性の未分化造血 iLS 細胞を樹立した。iLS 細胞は、骨髄細胞にレトロウイルスを用いて E2A の抑制因子である ID3 を発現させることにより、分化を停止させた造血前駆細胞であり、上記増殖因子カクテルと胸腺上皮細胞由来の TSt-4 フィーダー細胞存在下に旺盛に増殖した。iLS(+/+)、(-/-)、(m/m)細胞間で上記の増殖因子感受性に大差はなかったが、TGFb の増殖抑制効果は(m/m)細胞で亢進していた。そこで次世代シーケンサによるトランスクリプトーム解析を行ったところ、(m/m)細胞でのみ TGFb 非添加時に TGFb 標的遺伝子の高発現が見られる一方、TGFb 添加時に発現がむしろ減弱する特異な所見を得た。

SAMD9/9L は受容体取り込みやエンドソーム交通調節に関与しているので、iLS 細胞を用いて TGFb 受容体取り込みなどの検討を行ったが、ポジティブな結果は得られなかった。TGFb のシグナル伝達経路で中心的な役割を果たす Smad2/3 は、iLS(+/+)、(-/-)、(m/m)細胞ともに TGFb 添

加前は主に細胞質に局在し、リン酸化 Smad2/3 はほとんど検出されなかったが、TGFb 添加 1 時間後には核に局在する著明なリン酸化 Smad2/3 が観察された。これらは、従来の報告通りの教科書的な所見であり、(m/m)細胞で細胞外での TGFb 前駆体の分解、活性 TGFb の受容体との結合、Smad2/3 リン酸化プロセスと核内への移行などに異常がないことを示している。

そこで転写調節を検討した。TGFb シグナルは細胞質で Smad2/3 をリン酸化し、核内移行したリン酸化 Smad2/3 が転写活性複合体を形成して標的遺伝子の転写を促進することが一般的理解である。これは間違いではないが、正確ではない。実際には、Smad2/3 はリン酸化の有無と無関係に同等の速度で核内に移行している。しかし、非リン酸化 Smad2/3 は比較的早く汲み出される結果、細胞質に多く存在するが、核内にも相当量の非リン酸化 Smad2/3 が存在している。一方、リン酸化 Smad2/3 は脱リン酸化されてから汲み出されるため、結果としてほとんどが核内に局在する。

われわれは、(m/m)細胞では非リン酸化 Smad2/3 が TGFb による標的遺伝子の発現に關与する可能性を考えた。荒唐無稽に思えるが、Smad2/3 の DNA 結合特異性は非リン酸化 Smad2/3 を中心に検討されてきた歴史があり、少なくとも試験管内では非リン酸化 Smad2/3 が DNA 結合能力を持つことは周知の事実である。ChIP-qPCR 法を用いて、リン酸化 Smad2/3 がプロモータ領域内の TGFb-responsive element (TRE) に結合していることが報告されている複数の TGFb 標的遺伝子の解析をおこなったところ、(m/m)細胞においてのみ、TGFb 非添加時に非リン酸化 Smad2/3 の結合が検出された。この結果は、Samd9L 変異体が非リン酸化 Smad2/3 を活性化し、TGFb 標的遺伝子の転写を促進するという、これまで報告されていないメカニズムで TGFb シグナル経路を攪乱していることを示している。

現在 Samd9L 変異体が非リン酸化 Smad2/3 を核内で如何にして活性化するか、その分子メカニズムを検討しており、その概略が明らかになってきた。これらのデータをまとめて論文を執筆中である。競争者との関係もあり、研究成果に関してデータを詳述できなかった点をご容赦いただきたい。1~2 年以内に論文が出せると思うので、お待ちいただきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Komata Yosuke, Kanai Akinori, Maeda Takahiro, Inaba Toshiya, Yokoyama Akihiko	4. 巻 14
2. 論文標題 MOZ/ENL complex is a recruiting factor of leukemic AF10 fusion proteins	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1979-1995
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-37712-5	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 Tungalag Saruul, Shinriki Satoru, Hirayama Mayumi, Nagamachi Akiko, Kanai Akinori, Inaba Toshiya, Matsui Hirotaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Ribosome profiling analysis reveals the roles of DDX41 in translational regulation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-023-03558-2	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 長町 安希子、稲葉 俊哉	4. 巻 63
2. 論文標題 ゲノム編集技術を応用した血液疾患マウスモデル	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 1551～1557
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11406/rinketsu.63.1551	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 Shinriki Satoru, ..., Inaba Toshiya, Matsui Hirotaka	4. 巻 36
2. 論文標題 DDX41 coordinates RNA splicing and transcriptional elongation to prevent DNA replication stress in hematopoietic cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 2605～2620
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41375-022-01708-9	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 Isobe Tomoya, ..., Kanai Akinori, Inaba Toshiya, Takita Junko	4. 巻 13
2. 論文標題 Multi-omics analysis defines highly refractory RAS burdened immature subgroup of infant acute lymphoblastic leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-32266-4	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 Tanaka Atsushi, Inaba Toshiya, Inoue Daichi	4. 巻 140
2. 論文標題 Aberrant <i>EVI1</i> splicing contributes to <i>EVI1</i> -rearranged leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 875 ~ 888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2021015325	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 Sato Hidetoshi, Ochi Shintaro, Mizuno Kosuke, Saga Yutaka, Ujita Shohei, Toyoda Miyu, Nishiyama Yuichi, Tada Kasumi, Matsushita Yosuke, Deguchi Yuichi, Suzuki Keiji, Tanaka Yoshimasa, Ueda Hiroshi, Inaba Toshiya, Hosoi Yoshio, Morita Akinori, Aoki Shin	4. 巻 67
2. 論文標題 Design, synthesis and biological evaluation of 2-pyrrolone derivatives as radioprotectors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 116764 ~ 116764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2022.116764	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 Tamai Minori, Kasai Shin, Akahane Koshi, Thu Thao Nguyen, Kagami Keiko, Komatsu Chiaki, Abe Masako, Watanabe Atsushi, Goi Kumiko, Miyake Kunio, Inaba Toshiya, Takita Junko, Goto Hiroaki, Minegishi Masayoshi, Iwamoto Shotaro, Sugita Kanji, Inukai Takeshi	4. 巻 218
2. 論文標題 Glucocorticoid receptor gene mutations confer glucocorticoid resistance in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 106068 ~ 106068
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jsmb.2022.106068	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, 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 -
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 Morita Akinori, Ochi Shintaro, Satoh Hidetoshi, Ujita Shohei, Matsushita Yosuke, Tada Kasumi, Toyoda Mihiro, Nishiyama Yuichi, Mizuno Kosuke, Deguchi Yuichi, Suzuki Keiji, Tanaka Yoshimasa, Ueda Hiroshi, Inaba Toshiya, Hosoi Yoshio, Aoki Shin	4. 巻 11
2. 論文標題 A Novel RNA Synthesis Inhibitor, STK160830, Has Negligible DNA-Intercalating Activity for Triggering A p53 Response, and Can Inhibit p53-Dependent Apoptosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/life11101087	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 無
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 -

〔学会発表〕 計1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 骨髄機能低下をもたらすSamd9/9L変異体によるTGFβシグナル攪乱と静止期造血幹細胞の減少
3. 学会等名 日本血液学会総会
4. 発表年 2023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
研究 分担者	長町 安希子 (NAGAMACHI Akiko) (20585153)	広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教 (15401)	
研究 分担者	金井 昭教 (KANAI Hiroaki) (60549567)	東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任准教授 (12601)	
研究 分担者	松井 啓隆 (MATSUI Hirotaka) (60379849)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授 (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
---------	---------