

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08395

研究課題名(和文)造血におけるSamd9/9L変異体の機能解析と新規ヒト様モデルマウスの作製

研究課題名(英文)Functional analysis of SAMD9/9L mutations in hematopoiesis and generation of a novel humanized SAMD9/9L mouse model

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：SAMD9とその相同遺伝子SAMD9Lは、7q欠失を伴う骨髄異形成症候群(MDS)の責任遺伝子のひとつだが、その機能亢進型の点変異は、先天性骨髄不全症を伴う先天性疾患であるSAMD9/9L症候群の原因となる。SAMD9/9L症候群のモデルマウスとして樹立した、Samd9L変異導入マウスの造血機能を検証した結果、Pro-B細胞以降のB細胞の分化障害によるリンパ球の著減と、造血幹細胞を含む未分化な造血細胞で細胞周期の亢進が認められた。加えて、造血幹細胞におけるTGFシグナル異常が判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SAMD9/9L症候群は2016年頃より提唱された新しい疾患概念で、現在は先天性骨髄不全症のカテゴリーの中でファンコニー貧血と並ぶ代表的疾患となったが、疾患原因となるSamd9/9L変異体の生化学的機能は未だ不明な状況にある。今回得られた結果は、症候群の発症メカニズム解明に向けた第一歩であり、加えて、SAMD9/9Lの機能亢進と機能低下による病態解析を通じて、造血幹細胞を中心とする造血系におけるTGFの機能に対する新たな知見となった。

研究成果の概要(英文)：Samd9 and Samd9L (Samd9/9L) are located in 7q and are genes responsible for 7q-/MDS. "Samd9/9L syndromes" are a currently established large subgroup of the inherited BM failure (IBMF) syndromes. Patients with Samd9/9L syndromes carry a gain-of-function mutation in the Samd9/9L genes. We established mice carrying a Samd9LD764N g/f mutation that exhibit IBMF. Evaluation of hematopoietic function in the Samd9L mutated mouse revealed significant reduction in lymphocytes due to differentiation defects of B cells from the Pro-B cell stage onward, along with accelerated cell cycle progression in hematopoietic stem cells. Furthermore, abnormalities in TGF signaling mediated by Samd9L mutations were identified in hematopoietic stem cells.

研究分野：血液内科学

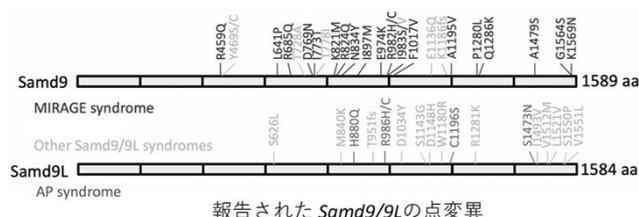
キーワード：骨髄異形成症候群 SAMD9/9L症候群

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インターフェロン誘導因子である、*SAMD9* 遺伝子とその関連遺伝子 *SAMD9L* (以下、*SAMD9/9L*) は、モノソミー7を伴う骨髄異形成症候群 (MDS) の責任遺伝子のひとつであるが、2016年頃より、*SAMD9/9L* の機能亢進型の変異が先天性骨髄機能不全症 (IBMF) を主徴とする疾患群で相次いで報告され、新規疾患概念「*SAMD9/9L* 症候群」として確立された。*SAMD9/9L* 症候群は、IBMFのみを呈する疾患 (家族性モノソミー7症候群や孤発例の小児 MDS など) と、IBMFに加えて多様な臓器の変性を伴う疾患 (MIRAGE 症候群: *SAMD9* に変異、Ataxia pancytopenia 症候群: *SAMD9L* に変異) に大別される。これら疾患群の最大の特徴は、乳幼児のモノソミー7を伴う MDS が高頻度に発症することで、その際、通常と異なり、すべての症例で常に変異側の染色体が脱落する。そのため、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って、発がん (MDS) が促進されるという、極めて複雑なメカニズムが考えられた (Inaba, Cancer Science 2021)。

報告された *SAMD9/9L* の点変異は、現在のところ機能欠損型ではなく機能亢進型変異と考えられているが、その変異体の詳細な機能については未だよく分かっていない。*SAMD9/9L* は分子量 180kDa に及ぶ大きなタンパク質であるが、他の蛋白質との類似性や機能モチーフに乏しく、局在も細胞質や核にびまん的に存在し、さらに報告された変異はアレル上の広範囲に 40ヶ所以上にわたるなど、変異体の機能を推測させる解決の糸口は少ない (右図)。



そこで変異体機能と *SAMD9L* 症候群の発症メカニズムを明らかにする目的で、MIRAGE 症候群の一亜型で報告された、*SAMD9*^{D769N} 変異に対応する *Samd9L*^{D764N} を導入したマウスを作製したところ、そのホモ変異 (*Samd9L*^{m/m}) マウスは、発育不全、短寿命、IBMFに加えて、精巣萎縮やリンパ球の著減など、ヒトの MIRAGE 症候群と共通する症状を呈し、*SAMD9/9L* 症候群のモデルマウスを得ることに成功した (Nagamachi, JCI, 2021)。*Samd9L*^{m/m} マウスの造血細胞では、トランスフェリンやサイトカイン受容体の細胞内取り込みの低下が見られ、一方、付着細胞は造血細胞と異なり、受容体取り込み速度の亢進やリソソームの顕著な活性化が見られるなどの知見が得られた。特に造血に関して興味深いことに、*Samd9L*^{m/m} マウス由来の造血幹細胞は、競合的骨髄移植再構築アッセイで、骨髄再構築能の著減が認められた。われわれのグループが以前に作製した *Samd9L* 遺伝子欠損マウスは、生後1年半以降の高齢になると、ホモ欠失、ヘテロ欠失マウスのいずれも同等に、高頻度に MDS/AML を発症するが (Nagamachi, Cancer Cell, 2013)、その造血幹細胞の特性として、*Samd9L*^{m/m} 細胞とは対照的に骨髄再構築能が亢進する。この *Samd9L* の欠失・変異によって生じる造血幹細胞の表現型の差異について、原因となる *Samd9L* 正常・変異体の機能とその分子メカニズムは不明である。

2. 研究の目的

本研究では、樹立した *SAMD9/9L* 症候群モデルマウスと *Samd9L* 欠損マウスの造血幹細胞の特性とリンパ球の分化能について、主にサイトカイン代謝能の視点から検証し、造血細胞における *Samd9/9L* 変異体の機能を明らかにする。造血幹細胞などの幼弱な造血細胞で解析を進めるためには、多数匹のマウスが必要となるが、*Samd9L*^{m/m} マウスは出生頻度が低いうえ生後半年前後で死亡するため、検討に十分な匹数のマウスを入手することは難しい。加えて *SAMD9/9L* は細胞増殖を強力に抑制することから、血液系の培養細胞に変異体を持続的に発現させる実験系の構築もまた困難である。そこで、東京理科大・伊川研究室との共同研究で、マウスの造血前駆細胞から人工白血球幹細胞である iLS 細胞を樹立し、*Samd9L* 変異体の生化学的機能について詳細な解析を試みる。

3. 研究の方法

(1) *Samd9L*^{m/m} マウスのリンパ球減少機序

Samd9L^{m/m} マウスの末梢血液では、赤血球と成熟赤芽球の減少に加え、特に B 細胞の著減が認められる。そこで *Samd9L*^{m/m} マウスおよび野生型マウスの骨髄と脾臓からリンパ球系細胞を単離し、各種抗体を用いてフローサイトメトリーにて、各分化段階の B 細胞の増減を確認する。さらに、幼若な B 細胞における受容体の細胞内取り込み能を SHIP assay にて検証する。

(2) *Samd9L*^{m/m} マウス造血幹細胞の特性についての検証

SAMD9/9L 正常・変異体の造血幹細胞の特性を調べるため、*Samd9L*^{m/m}、*Samd9L*^{-/-}、野生型マウス

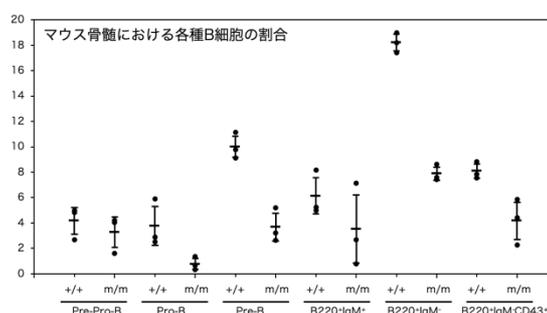
の骨髄内の造血幹細胞および造血前駆細胞の割合を、各種抗体を用いてフローサイトメトリーにて確認する。さらに、各分画細胞の細胞周期を検証するため、マウスにBrdU(1mg/匹)を8時間ごとに3回腹腔内投与したのち骨髄細胞を回収し、BrdU陽性率を確認する。また、マウスから単離したHSC分画細胞(Lin⁻Kit⁺Scal⁺CD34⁻Flt3⁻CD150⁺CD41⁻CD48⁻細胞)を、幹細胞性の保持に適した低酸素(1% O₂)・低サイトカイン(1.5ng/ml SCF, 1ng/ml TPO)の条件下で3日間短期培養したのちEdUを添加し、EdU陽性細胞の割合と、幹細胞性の保持状態について検証する。加えて、マウスから単離したLT-HSC(Lin⁻Kit⁺Scal⁺CD34⁻Flt3⁺細胞)のトランスクリプトーム解析を行い、RNA発現状態を確認する。

(3) iLS細胞の樹立と Samd9L 変異体機能の探索

Samd9L^{m/m}、Samd9L^{-/-}、野生型マウスからLSK細胞(Lin⁻Kit⁺Scal⁺)を単離し、E2Aの抑制因子であるID3を発現させることによって分化を停止させた、iLS細胞を樹立する。iLS細胞はタモキシフェンによって分化誘導・停止が制御されているため、タモキシフェン除去およびIL-3を添加したのち、各種抗体を用いて細胞の分化状態を検証する。また、iLS細胞にサイトカイン類やIFN、TGFなどの各種増殖因子を添加し、影響を与える因子を同定する。

4. 研究成果

マウス骨髄中の各分化段階のB細胞を確認したところ、Samd9L^{m/m}マウスでは、B220を発現するPre-Pro-B細胞は正常マウスと同程度に存在しているのに対し、Pro-B細胞以降のB細胞が顕著に減少しており、Pre-Pro-B細胞とPro-B細胞の間で分化障害が生じていることが分かった(右図)。また脾臓においても、骨髄と同様に、Samd9L^{m/m}マウスでは成熟したB細胞の著減が認められた。そこで発生初期の幼若なB細胞におけるIL-17受容体の細胞内取り込み能を検証したところ、Samd9L^{m/m}マウス・正常マウス間で大差はなく、成熟B細胞の減少に変異体による受容体取り込み異常の影響は見出せなかった。

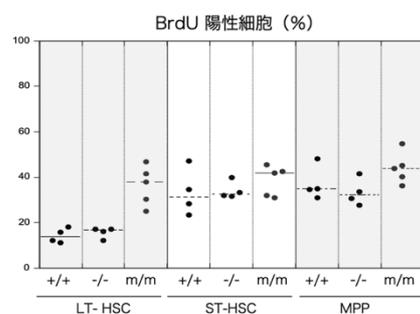


Samd9L^{-/-}、Samd9L^{m/m}、野生型マウスの造血幹細胞の特性について検証した。各マウスの造血幹細胞分画を確認したところ、マウス間で大きな差は認められなかった。しかしながら、マウス骨髄中の造血前駆細胞(Lin⁻Kit⁺Scal⁺)を単離し、増殖サイトカイン存在下で短期培養したところ、Samd9L^{-/-}マウス由来の細胞は、野生型マウスの細胞と比較して分化・増殖能が亢進しているのに対して、Samd9L^{m/m}由来の細胞は増殖能が低下していることに加え、リンパ球と赤芽球系細胞への分化が強く抑制されていた。

続いて造血幹細胞の動態を確認するため、造血幹細胞の細胞周期について確認した。Samd9L^{m/m}マウス由来の細胞は、Samd9L^{-/-}や野生型の細胞と比べて、特にLT-HSCやST-HSC/MPPなどの、造血幹細胞や造血前駆細胞でBrdU陽性細胞の割合が優位に増加しており、細胞周期の亢進が認められた(右図)。

単離したLT-HSCを、幹細胞性を保持しやすい条件下で培養し、EdU陽性細胞の割合と、幹細胞性の保持状態について確認したところ、BrdUの結果と同様に、培養後のSamd9L^{m/m}細胞はEdU陽性細胞が優位に増加し、さらにCD34の未分化な細胞の著減が認められたことから、分化しやすい傾向にあることが明らかになった。

そこで、LT-HSC細胞のトランスクリプトーム解析により細胞周期関連遺伝子の発現変化を確認すると、Samd9L^{m/m}細胞ではp53の発現減少に加えて、Cdk6の発現上昇が認められた。またTGFシグナル経路の下流因子で、静止期の維持に関わるHoxB5やNeo1、Egr1遺伝子の優位な発現低下が認められた。



マウスからiLS細胞を樹立し、Samd9L変異体の生化学的機能解析を試みた。樹立したiLS細胞は、SCF、IL-7、FLT-3-ligandとフィーダー細胞依存性の、多分化能を保持した幼若な造血細胞で、旺盛な増殖能を有しており、細胞株と同様に扱える。樹立したiLS細胞は、Samd9Lの発現を強く維持していた。iLS細胞に分化を誘導させたところ、Samd9L^{-/-}細胞はMac-1陽性のミエロイド系細胞への分化能が亢進しているのに対して、Samd9L^{m/m}細胞はミエロイド系およびB細胞への分化能の低下が見られるなど、マウス個体の造血細胞の表現型と同様の特徴を示した。

Samd9L^{m/m}マウスのLT-HSC細胞のトランスクリプトーム解析でTGFシグナル経路への異常が見られたことから、iLS細胞におけるTGFに対する反応性を確認したところ、TGFを添加したSamd9L^{m/m}iLS細胞は、Samd9L^{-/-}細胞や野生型細胞と比べて強い増殖抑制効果を示した。そこで、TGFを添加したiLS細胞のトランスクリプトーム解析を行ったところ、野生型とSamd9L^{-/-}細胞はTGF添加によるTGF誘導遺伝子群の発現上昇が確認できた。しかしながら、Samd9L^{m/m}細胞

では、TGF β 添加前の定常状態の段階で既に TGF β 誘導遺伝子群が高発現している、いわゆる TGF β シグナル亢進状態にあり、TGF β を添加しても遺伝子群の発現に大きな変動が生じないことが判明した。

マウスモデルを用いた本検討から、Samd9L 変異体は造血細胞において TGF β シグナルの混乱を誘引することが判明した。TGF β シグナルは幹細胞性を維持する重要な因子の一つであることから、TGF β シグナル異常による静止期の造血幹細胞の減少や機能低下が、SAMD9/9L 症候群の造血不全の原因である可能性が考えられた。現在、SAMD9/9L は骨髄造血に加えて、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おり、細胞・組織特異的な SAMD9/9L 変異体機能の解明が待たれる。今後は、すでに同定した SAMD9/9L の結合蛋白質とその蛋白複合体の解析や、クロマチン解析を中心とした検討等により、TGF β シグナル異常を引き起こす分子メカニズムを明らかにする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 S. Shinriki, M. Hirayama, A. Nagamachi, A. Yokoyama, T. Kawamura, A. Kanai, H. Kawai, J. Iwakiri, R. Liu Rin, M. Maeshiro, S. Tungalag, M. Tasaki, M. Ueda, K. Tomizawa, N. Kataoka, T. Ideue, Y. Suzuki, K. Asai, T. Tani, T. Inaba, H. Matsui.	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 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 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 -
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 Y. Sera, Y. Nakata, T. Ueda, N. Yamasaki, S. Koide, H. Kobayashi, K. Ikeda, K. Kobatake, M. Iwasaki, H. Oda, L. Wolff, A. Kanai, A. Nagamachi, T. Inaba, Y. Sotomaru, T. Ichinohe, M. Koizumi, Y. Miyakawa, Z. Honda, A. Iwama, T. Suda, K. Takubo, H. Honda	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 -

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 Nguyen Thao, Aida Tomomi, Iijima Yamashita Yuka, Tamai Minori, Nagamachi Akiko, Kagami Keiko, Komatsu Chiaki, Kasai Shin, Akahane Koshi, Goi Kumiko, Inaba Toshiya, Sanada Masashi, Inukai Takeshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Application of prime editing system to introduce TP53 R248Q hotspot mutation in acute lymphoblastic leukemia cell line	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cancer Science	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) 10.1111/cas.16162	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 Akiko Nagamachi, Akinori Kanai, Hiroataka Matsui, Satoru Shinriki, Tomokatsu Ikawa, Toshiya Inaba
2. 発表標題 Dysregulation of TGF-beta autocrine signals by a bone marrow failure-causative Samd9L mutant.
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akiko Nagamachi, Hiroataka Matsui, Akinori Kanai, Satoru Shinriki, and Toshiya Inaba
2. 発表標題 Involvement of IFN in the development of 7q-/MDS in patients with SAMD9/9L syndromes
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akiko Nagamachi, Hiroataka Matsui, Akinori Kanai, Satoru Shinriki, and Toshiya Inaba
2. 発表標題 Involvement of IFN in the development of 7q-/MDS in patients with SAMD9/9L syndromes
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akiko Nagamachi, Hiroataka Matsui, Akinori Kanai, Satoru Shinriki, Tomokatsu Ikawa and Toshiya Inaba
2. 発表標題 IBMf-causative Samd9/9L mutations increase cycling-HSC by disturbing TGF-beta signal transduction
3. 学会等名 第85回日本血液学会学術総会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------