

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390253

研究課題名(和文) 中心体成熟・維持メカニズムの機能不全が骨髄系腫瘍の発症・進展に果たす役割の解析

研究課題名(英文) Roles of impairment of centrosome maturation in leukemogenesis

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) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：病期の進行した骨髄異形成症候群(MDS)で広く認められる分裂像や核形態の異常の原因解明を試みた。われわれは、予後不良のMDSで高頻度にみられる7番染色体長腕欠失(-7/7q-)の責任遺伝子のひとつとして、Mikiを同定していたが、Miki蛋白質は、分裂期の中心体に存在して、前中期の進行に重要な役割を果たすことを解明し、Molecular Cell誌に発表した。ついで、初代培養細胞やMDS細胞等の造血細胞で分裂期実験系を確立し、MDSに見られる分裂異常の指標として、早期染色体脱凝集(PCD)が有用であり、その出現メカニズムの推定に至った。

研究成果の概要(英文)：During prometaphase, dense microtubule nucleation sites at centrosomes form robust spindles that align chromosomes promptly. Failure of centrosome maturation leaves chromosomes scattered, as seen in cancer cells, including myelodysplastic syndrome (MDS). We previously reported that the Miki (LOC253012) gene is frequently deleted in MDS patients, and that low levels of Miki are associated with abnormal mitosis. Here we demonstrate that Miki localizes to the Golgi apparatus and is poly (ADP-ribosyl)ated by tankyrase-1 during late G2 and prophase. PARsylated Miki then translocates to mitotic centrosomes and anchors CG-NAP, a large scaffold protein of the  $\gamma$ -tubulin ring complex. Due to impairment of microtubule aster formation, cells in which tankyrase-1, Miki, or CG-NAP expression is downregulated all show prometaphase disturbance, scattered and lagging chromosomes. Our data suggest that PARsylation of Miki by tankyrase-1 is a key initial event promoting prometaphase.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：中心体 分裂異常 骨髄系腫瘍 モノソミー7

## 1. 研究開始当初の背景

中心体は、微小管（マイクロチューブル）の形成・制御をおこなう細胞内小器官である。S 期に複製されて 2 個になった後、分裂期に中心体の周辺に局在する傍中心体物質 (PCM) が急速に増大する、「中心体成熟現象」がおきる。これにより、間期の微小管と比較して特段に強固な分裂紡錘系の形成・制御が可能となり、多数の巨大な染色体を 1 時間以内に移動させるという、細胞活動の中で最も華麗なイベントの司令塔として活躍する。しかし、分裂終了後に娘細胞に 1 個ずつ配分された中心体は急速に縮小し、間期の微小管の形成や機能維持など、比較的穏やかな役割に戻る。

がん細胞における中心体の異常は、数々の異常を中心に古くから研究されてきた。がん細胞では分裂期に中心体を 3 個以上持つ中心体過剰の頻度が高く、その結果、多核形成や染色体の不分離による染色体不安定性が惹起される。白血病でも中心体数と形態異常、予後との関連につき多くの研究がおこなわれてきた。

## 2. 研究の目的

本研究提案は、これら「数の異常」を取り扱う従来の研究とは一線を画し、中心体成熟現象にかかわる遺伝子異常の観点から、特に骨髄性腫瘍 (AML/MDS) の染色体不安定性や形態異常との関わりを解明するのが目的である。AML/MDS で高頻度に見られる遺伝子の欠失により発現が低下する中心体蛋白質の機能解析を通じて、中心体成熟・維持現象の不具合と、AML/MDS の形態異常や染色体不安定性との関連の解明を図るとともに、全く新しい発想に基づいた AML/MDS 治療薬開発に向けて、これらの蛋白質の機能を向上させ、分裂期進行を促す小分子化合物の同定を目指した研究を進める。

## 3. 研究の方法

AML/MDS に見られる分裂異常、核形態異常、染色体不安定性の主原因と考えられる中心体成熟・維持機能の低下をもたらすメカニズムを、特に CG-NAP, Miki, Rint-1, p24<sup>dynactin3</sup> の四遺伝子産物に焦点を当て、分子レベル、造血細胞レベル、マウス個体レベルで解明する。加えて平成 24 年度からは、分裂期の中心体機能を促進する小分子化合物の単離を目指す。

- (1) 分裂期の中心体における CG-NAP, Miki, Rint-1, p24<sup>dynactin3</sup> の生化学的な機能の詳細な解析
- (2) 造血細胞、特に AML や MDS 芽球の分裂異常や染色体不安定性の解析と、それに対する上記四蛋白質の関与の解析。
- (3) 遺伝子欠損マウスの作製と解析。加えて、かけ合わせによる複数遺伝子欠損効果の解析。
- (4) 中心体成熟・維持を司る蛋白質の機能を促進する小分子化合物の単離や、その効果の解析

## 4. 研究成果

われわれは、予後不良の MDS で高頻度に見られる 7 番染色体長腕欠失 (-7/7q-) の責任遺伝子のひとつとして、Miki を同定した。Miki 蛋白質は、分裂期の中心体に存在して、前中期の進行に重要な役割を果たすことを解明した。3 年間の計画期間中に、正常細胞や造血細胞での分裂制御解析実験系の確立や、前中期中心体のチューブリン核形成の詳細な解析を行った。前半の計画は順調に進み、これまでの成果をまとめて Molecular Cell 誌に発表した。分裂期制御の研究は、その大半が染色体数が 70 本前後の HeLa 細胞など、がん細胞を材料に分析されてきている。初代培養細胞や MDS 細胞等の造血細胞で分裂期実験系を確立することは、mitotic index が低いこ

と、遺伝子や siRNA の導入効率が低いこと、細胞分裂回数に限度があって、観察のタイミングがとりにくいことなど種々の問題があり、容易ではない。このため、後半では研究の進捗にやや遅れが生じたが、次につながる成果として、MDS に見られる分裂異常の指標として、早期染色体脱凝集 (premature chromosome decondensation, PCD) が有用であり、その出現メカニズムの推定に至った。今後、PCD の分子メカニズムの詳細を検討し、MDS における分裂異常の全容を明らかにしたい。

#### 5. [雑誌論文] (計 4 件)

1. Shi N, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, Zang Y, Kosaka K, Ozaka K, Okazaki A, Murakami E, Tsuge M, Abe H, Aikata H, Takahashi S, Ochi H, Tateno-Mukaidani C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, McPhee F, Gao M, Chayama K. Combination therapies with NS5A, NS3 and NS5B inhibitors on different genotypes of hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice. *Gut* 62: 1055-1061, 2013 査読有
2. Nagamachi A, Matsui H, Asou H, Ozaki Y, Aki D, Takubo K, Suda T, Nakamura T, Wolff L, Honda H, Inaba T. Haploinsufficiency of SAMD9L, an endosome fusion facilitator, causes myeloid malignancies in mice mimicking human diseases with monosomy 7. *Cancer Cell* 24: 305-317, 2013 査読有
3. Nagamachi A, Nakata Y, Ueda T, Yamasaki N, Ebihara Y, Tsuji K, Honda Zi, Takubo K, Suda T, Oda H, Inaba T, Honda H. Acquired deficiency of A20

results in rapid apoptosis, systemic inflammation, and abnormal hematopoietic stem cell function. *PLOS ONE* 9: e87425, 2014 査読有

4. Okuda H, Kawaguchi M, Kanai A, Matsui H, Kawamura T, Inaba T, Kitabayashi I, Yokoyama A. MLL fusion proteins link transcriptional coactivators to previously active CpG-rich promoters. *Nucleic Acids Res.* 42: 4241-4256, 2014 査読有

#### [学会発表] (計 6 件)

1. 造血器悪性腫瘍の発症・進展におけるエピゲノム異常の関与 松井啓隆  
日本放射線影響学会第 56 回大会 10 月 18-20 日 2013 ホテルクラウンパレス 青森
2. 次世代シーケンサーによる一塩基単位での 5 ハイドロキシメチルシトシンの解析法確立と造血器腫瘍での定量 松井啓隆 第 72 回日本癌学会学術総会 10 月 3-5, 2013 パシフィコ横浜
3. NF- $\kappa$ B に対するユビキチン修飾酵素 A20 はアポトーシスと炎症の抑制により成体造血の恒常性維持に重要な役割を果たす 長町安希子 第 72 回日本癌学会学術総会 10 月 3-5, 2013 パシフィコ横浜
4. Samd9L-deficient mice develop myeloid malignancies mimicking human diseases with Monosomy 7 Nagamachi A. 第 75 回日本血液学会 10 月 11-13, 2013 ロイトン札幌
5. Chromosomal instability due to

downregulation of Miki, a del(7q)-responsible gene product  
Ozaki Y. 第 75 回日本血液学会 10 月  
11-13,2013 ロイトン札幌

6. Haploinsufficiency of SAMD9L, an endosome fusion facilitator, in mice induces the development of myeloid malignancies mimicking human disease with monosomy 7. Matsui H. ASH December 7-10, 2013 New Orleans, USA

[図書] (計 0 件)

[産業財産権] 出願状況 (計 0 件)

[その他] ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

本田 浩章(Honda, Hiroaki)  
広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授  
研究者番号：40245064

松井 啓隆(Matsui, Hirotaka)  
広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授  
研究者番号：60379849

(3) 連携研究者 なし