

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770137

研究課題名（和文）

クラスリン小胞輸送の機能障害は造血器腫瘍の原因となる

研究課題名（英文）

Dysregulation of clathrin-dependent traffic causes hematopoietic neoplasm

研究代表者

昆 俊亮（Shunsuke Kon）

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：70506641

研究成果の概要（和文）：

老齢 *SMAP1* 欠損マウスの約半数は、骨髓系血液細胞の異形成を伴った貧血を呈し、この病態はヒトの重篤な血液疾患である骨髓異形成症候群（MDS）に対応していた。さらに、MDS を発症したマウスの一部では急性白血病への移行を認めた。種々の輸送実験を行った結果、*SMAP1* 欠損赤芽球ではトランスフェリンの取り込みが顕著に亢進していることを明らかにした。一方、*SMAP1* 欠損マスト細胞では *c-Kit* の取り込みには違いが認められなかったが、*c-Kit* の MVB からリソソームへの選別が阻害されていることを見出した。さらには、この *c-Kit* 分解遅延に伴って、活性化 ERK の増加ならびに細胞増殖が亢進していた。これらのことより、トランスフェリンや *c-Kit* に代表されるクラスリン輸送機構の脱制御が MDS ならびに AML の素因になりうることを世界で始めて実証した。

研究成果の概要（英文）：

Approximately 50% of aged *SMAP1*(-/-) mice developed anemia associated with morphologically dysplastic cells of erythroid-myeloid lineage, which are hematological abnormalities reminiscent of those seen in myelodysplastic syndrome (MDS) in humans. Furthermore, some *SMAP1*(-/-) mice developed acute myeloid leukemia (AML) of various subtypes. The transport analysis showed that transferrin endocytosis was enhanced in erythroblasts of *SMAP1*(-/-) mice. In mast cells cultured in stem cell factor, *SMAP1* deficiency did not affect the internalization of *c-Kit* but impaired the sorting of internalized *c-Kit* from multivesicular bodies to lysosomes, which caused the intracellular accumulation of undegraded *c-Kit* accompanied by a significant increase in ERK phosphorylation and cell growth activity. Collectively, these results provide the first evidence in a mouse model that the deregulation of clathrin-dependent membrane trafficking involving the transferrin receptor and *c-Kit* may be involved in the development of MDS and subsequent AML.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：細胞内小胞輸送、SMAP1、骨髄異形成症候群、白血病

1. 研究開始当初の背景

白血病を含む様々ながんにおいて、EPS15、Tsg101、intersectin、Hipl などのクラスリン輸送系で機能する分子の変異が同定されていた。SMAP1 に関して、マイクロサテライト不安定性を認める大腸がんの 73%で SMAP1 遺伝子の機能喪失型の変異が報告されており、これは SMAP1 分子ががん抑制遺伝子として働いていることを示唆するものであった。また、MLL 関連の急性骨髄性白血病に着目すると、SMAP1 をはじめ、CALM、endophilin2 等、やはりクラスリン小胞形成に必須な分子群が MLL の転座相手として同定されていた。これらの知見を統合すると、クラスリン小胞輸送の挙動異常ががん化と密接に関連していることを強く示唆するものであった。しかしながら、クラスリン小胞輸送系の機能異常がどのようにして細胞がん化につながるかという点に関して、細胞生物学的もしくは分子腫瘍学的な研究はほとんど進んでおらず、科学的根拠が乏しい状況が続いていた。そこで、研究代表者は個体レベルにおける SMAP1 機能、ひいては細胞内輸送と発がんとの関連を検討すべく、SMAP1 欠損マウスの作成を試みた。12 ヶ月齢以降の高齢 SMAP1 ノックアウトマウスが、高頻度に大球性貧血を呈し、血小板数も減少する傾向が見られた。さらに、末梢血のスメア像では、ハウエル・ジョリー小体、赤芽球の出現、過分節好中球、巨大血小板など、ヒト骨髄異形性症候群 (MDS) に特徴的な所見が認められた。ヒト MDS 細胞は、偶発的にアポトーシス抵抗性を獲得すると白血病に移行することが知られているが、SMAP1 欠損高齢マウスにおいても白血病の発症が確認され、白血病のタイプは多様であっ

た。従って本マウスモデルを用いることにより、それまで不明な点が多かった、クラスリン小胞輸送系と細胞増殖異常・発がんメカニズムを詳細に解明できると期待できた。

2. 研究の目的

本研究課題では、以下の 3 つを目的とした。

(1) SMAP1 欠損細胞を用いたレセプターエンドサイトーシスの評価

具体的には、トランスフェリン受容体、c-Kit という血球増殖・分化に重要とされる 2 つの因子に関して、そのクラスリン依存的な細胞内輸送の挙動を観察する。特に c-Kit に関しては、SMAP1 欠損細胞での c-Kit 分子の輸送異常が認められた場合、下流シグナルがどのような影響を受けるかを検討する。以上により、増殖因子受容体のクラスリン依存的な小胞輸送と、それに伴う増殖シグナル応答の様式を体系化する。

(2) SMAP1 欠損マウスの Mutagenesis 実験と MDS/白血病検体のシーケンス解析

マウス白血病ウイルスを用いた変異導入実験により、SMAP1 と協調的に白血化に作用する遺伝子をスクリーニングする。また、ヒト MDS ならびに急性白血病検体において、smap1 遺伝子座が感受性を有するか検討する。

(3) MLL-SMAP1 キメラがクラスリン輸送系に与える影響の検討

MLL-SMAP1 発現細胞におけるトランスフェリン受容体のエンドサイトーシスを評価し、これにより得られた所見に基づき、MLL 関連白血病発症に関して小胞輸送を包含する新規モデルを提唱する。

3. 研究の方法

(1) SMAP1 欠損細胞を用いたレセプターエンドサイトーシスの評価

トランスフェリンのエンドサイトーシスを評価するにあたって、その取り込み量が顕著である Ter119 陽性の赤芽球細胞に焦点をあてて観察した。具体的には、マウスより採取した赤芽球の細胞膜トランスフェリン受容体に、蛍光ラベルしたトランスフェリンを結合させ、細胞内へ取り込ませた。細胞膜に残留するトランスフェリンを除去することにより、細胞内へと選択的に輸送されたものの蛍光強度を FACS 測定した。この手法により、赤芽球におけるトランスフェリンのエンドサイトーシスならびにリサイクリングを定量化した。c-Kit エンドサイトーシスの測定には、成熟・分化した状態で c-Kit を高発現している骨髄由来の培養マスト細胞を用いた。c-Kit リガンドである SCF で一定時間処理し、細胞膜上の c-Kit 量を FACS 測定することにより、c-Kit の細胞内取り込み量を定量化した。これと平行して、c-Kit のリソソームへの輸送過程ならびに分解速度を計測した。さらには、リン酸化 c-Kit 量、ユビキチン化 c-Kit 量、c-Kit に会合した Grb2 量、活性化 ERK1/2 についても決定した。また、MEF 細胞を用いて同様にトランスフェリンならびに c-Kit の細胞内輸送を検討した。

(2) SMAP1 欠損マウスの Mutagenesis 実験と MDS/白血病検体のシーケンス解析

SMAP1 欠損マウスすべてが MDS/白血病の経過を辿らないことから、他の遺伝子に付加的に変異が入ることが、SMAP1 (-/-) と協調的に白血化させるのに必要であろうと推測できた。そこで、癌研究所、発がん研究部の中村卓郎博士と共同実験のもと、マウス白血病ウイルス (Molony 株) を新生仔マウスに感染させ、白血病を高頻度に誘導できるか検討した。

また、東京大学附属病院の小川誠司博士、及びシンガポール、分子細胞生物学研究所の大里元美博士と共同して、ヒト MDS/白血病検体について *smap1* 遺伝子配列のシーケンス解析を行った。

(3) MLL-SMAP1 キメラがクラスリン輸送系に与える影響の検討

培養細胞に MLL-SMAP1 を過剰発現させ、クラスリン依存的に細胞内に取り込まれるトランスフェリンのエンドサイトーシスを評価した。さらに、MLL-SMAP1 によるクラスリン輸送系の機能障害の作用機序を解明するために、MLL-SMAP1 キメラが SMAP1 もしくはクラスリンの細胞内局在にどのような影響を及ぼすかを免疫染色法により検討した。

4. 研究成果

(1) SMAP1 欠損細胞を用いたレセプターエンドサイトーシスの評価

まず始めに、マウス赤芽球を用いてトランスフェリンのエンドサイトーシスを評価したところ、SMAP1 (-/-) 細胞は (+/+) 細胞に比して、その細胞内への取り込みが亢進していた。一方、取り込まれたトランスフェリンのリサイクリングには全く影響が見られなかった (図1)。また、MEF 細胞においても

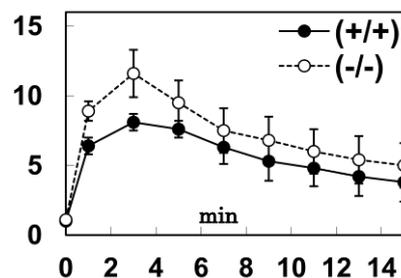


図1. トランスフェリンの細胞内強度変化

同様な実験を行ったところ、独立した2系統の SMAP1 (-/-) 細胞株でトランスフェリンの取り込みが亢進していることを FACS 解析ならびに顕微鏡観察により確認できた。小胞形成において、ARFGAP は正の働きを担っており、

言い換えれば ARFGAP が消失した状況では、小胞形成が進まないと考えられている。したがって、今回観察された現象は、当初予想していた結果とは異にした。そこで、この理由を複数種ある ARFGAP の代償機構によって説明できるのではないかという仮説のもと、さらに研究を展開した。その場合、第一の候補として SMAP1 のパラログである SMAP2 が挙げられたので、SMAP1/SMAP2 による機能的な重複を検討した。SMAP1(+/-) もしくは SMAP1(-/-) の MEF に SMAP2 に対する siRNA を導入して、トランスフェリンの取り込みを観察したところ、SMAP1(+/-) MEF では、正常に取り込みが行われていたのに対し、SMAP1(-/-) MEF では顕著にその取り込みが阻害されていた。このことから、SMAP1 が欠損された状況下において、SMAP2 がトランスフェリンの細胞内への取り込みを代償・さらには亢進させていることが分かった (図 2)。

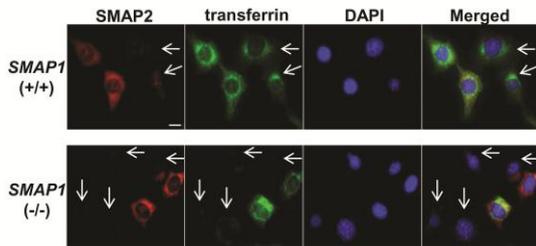


図 2. トランスフェリンの取り込みにおける SMAP2 の役割

一方、増殖因子受容体である c-Kit のエンドサイトーシスに違いは認められなかったが、SMAP1 欠損細胞で顕著にその分解が阻害されていることを見出した。そこで MEF 細胞を用いて、c-Kit の細胞内輸送を詳細に検討した結果、SMAP1 欠損細胞において c-Kit の multi-vesicular body (MVB) からリソソームへの輸送が著しく遅延していた。さらに、蓄積した c-Kit は下流のアダプター分子である Grb2 と会合した状態で存在しており、c-Kit の増殖シグナルが増大・継続していた (図 3)。

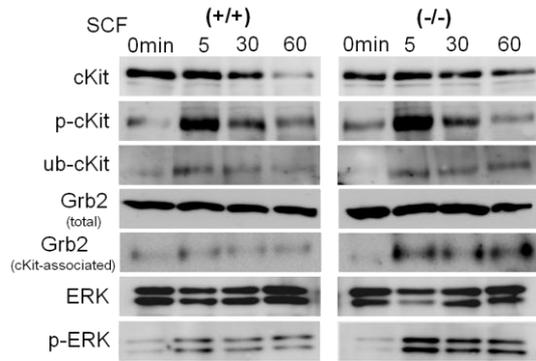


図 3. c-Kit 分解と下流シグナル

これらのことより、トランスフェリンや c-Kit の輸送異常に代表されるクラスリン輸送系の脱制御が素因となって、MDS ならびに白血病を引き起こすことを個体レベルで初めて実証することに成功した。

(2) SMAP1 欠損マウスの Mutagenesis 実験と MDS/白血病検体のシーケンス解析

マウス白血病ウイルス (Molony 株) の感染実験を行ったが、野生型と SMAP1 欠損マウスとで白血病の発症時期・発症種に違いが認められなかったため、協調遺伝子の探索を行えなかった。また、ヒト白血病細胞株 14 株、ヒト MDS 54 検体について、smap1 遺伝子翻訳領域のシーケンス解析を行ったが、当該領域の塩基配列変異は認められなかった。

(3) MLL-SMAP1 キメラがクラスリン輸送系に与える影響の検討

MLL-SMAP1 キメラを過剰発現させた COS7 細胞ではトランスフェリンのエンドサイトーシスが著しく阻害されることを見出した (図 4)。野生型 SMAP1 は通常細胞質に局在する

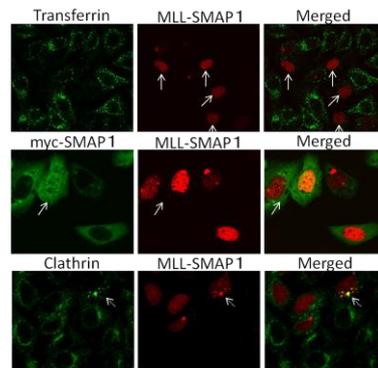


図 4. トランスフェリンの取り込みにおける MLL-SMAP1 キメラの影響

が、MLL-SMAP1 を発現している細胞では、核に局在するキメラとともに核に局在していた (図4)。従って MLL-SMAP1 キメラは野生型 SMAP1 を (おそらくは両者のダイマー形成を介して)、核移行させる効果があるものと推察された。続いて内在性クラスリンの局在を観察したところ、MLL-SMAP1 の凝集箇所にはクラスリンの集積像が認められた (図4)。また、SMAP1 内のクラスリン結合モチーフに変異を加えたキメラではこのような共局在は認められなかったことから、MLL-SMAP1 は SMAP1 由来のクラスリン結合モチーフを介して、クラスリンの局在を変化させていることが示された。これらの研究成果より、MLL-SMAP1 キメラによる白血病発症のメカニズムの1つとして、クラスリン小胞輸送の異常が寄与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

1. Kon, S., Minegishi, N., Tanabe, K., Watanabe, T., Funaki, T., Wong, WF., Sakamoto, D., Higuchi, Y., Kiyonari, H., Asano, K., Iwakura, Y., Fukumoto, M., Osato, M., Sanada, S., Ogawa, S., Nakamura, T and Satake, M. *Smap1* deficiency perturbs receptor trafficking and predisposes mice to myelodysplasia. *J. Clin. Invest.* 123:1123-1137, 2013 査読有 doi: 10.1172/JCI63711

[学会発表] (計2件)

1. 昆 俊亮、峯岸 直子、田邊 賢司、渡邊 利雄、船木 智、坂元 大輔、樋口 雄大、清成 寛、浅野 克敏、福本 学、真田 昌、小川 誠司、中村 卓郎、佐竹 正延 クラスリン小胞形成因子 SMAP1 の欠損は細胞内小胞輸送の異常をきたし、骨髄異型性症候群を誘引する 第35回分子生物学会年会 ワークショップ「メンブレントラフィックと疾患」、2012年12月11日～2012年12月14日、福岡
2. 昆 俊亮、船木 智、峯岸 直子、清成 寛、田邊 賢司、渡邊 利雄、中村 卓郎、佐竹 正延 Dysregulation of clathrin-dependent traffic

predisposes SMAP1-targeted mice to develop myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. 文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究『がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動』がん若手研究者ワークショップ、2011年8月31日～2011年9月3日、蓼科

[図書] (計1件)

1. 昆 俊亮 「クラスリン小胞形成因子 SMAP1 の欠損は細胞内小胞輸送の異常を来し、骨髄異形成症候群を誘引する」細胞工学 Vol32, p584-585, 2013

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

1. 造血器腫瘍の新たな発症機序の解明

—細胞内輸送との接点—

<http://www.idac.tohoku.ac.jp/ja/activities/info/news/20130225/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

昆 俊亮 (Shunsuke Kon)
東北大学・加齢医学研究科・助教
研究者番号：70506641

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：