

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590703

研究課題名(和文) ミオシン・スーパーファミリーの機能解析による血液疾患の分子病態解明

研究課題名(英文) Clarification of molecular pathogenesis of hematological diseases by analyzing functional role of myosin superfamily

研究代表者

宮崎 浩二 (Miyazaki, Koji)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：90261966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血液細胞における様々なミオシンの役割を研究し以下の知見を得た。1) ミオシンVIが非分泌型で核内に移行する。非分泌型が予後不良である病態の一部が示唆された。また予後とも関連した。2) T細胞受容体が細胞膜に発現するためにはII型ミオシンが重要で免疫シナプス安定化に関与すると示唆された。3) 急性骨髄性白血病における転写因子RUNX1の変異は分化抑制をきたすが、ミオシンIIBの発現を抑制するだけで巨核球への分化を回復できた。4) MYH9異常症で見られる尾部の点突然変異を有する分子は、尾部が伸展したままなのでフィラメント構造を作りやすいことがわかった。

研究成果の概要(英文)：We have shown the findings as follows. 1) myosinVI transferred into the nucleus from cytosol in non-secretion type of myeloma cells. This might be a possible mechanism how non-secretion type myeloma has a poor prognosis. 2) myosin II has an important role on CD3 expression on the plasma membrane and stabilization of immune synapse. 3) Knock-down of myosin IIB is enough to restore megakaryocyte differentiation in AML cells with RUNX1 mutation. 4) The tail mutations hampered the ATP-induced formation of folded conformation thus stabilizing the myosin aggregates.

研究分野：血液学

キーワード：血小板 細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

ミオシンは、アクチン線維上を動くモーター蛋白質である。近年、古典的ミオシン(II型ミオシン)重鎖が、遺伝性巨大血小板異常症の原因遺伝子(MYH9)であることが解明されたように(*Nat Genetics, 2000; Blood, 2000*)、ミオシンが非筋細胞の血液細胞においても、重要であることはいうまでもない。

一方、古典的ミオシン以外に、多くの非古典的ミオシン(unconventional myosin, 以下 UCM)がクローニングされて、全部で18クラスになり、「ミオシンスーパーファミリー」を構成している。これらのミオシンは、各々尾部に特異的な構造があり、機能の多様性を示唆する。また、多くは各臓器に広く発現しており、組織特異性を表現しつつ、細胞遊走、細胞分裂、細胞内膜輸送、貪食などの機能を、各々が協調しながら働いていると考えられる。しかしながら、これまでの研究は、モーター分子機構の解明が中心で、細胞生物学的研究は、まだ不明な点が多い(*Trends Cell Biol, 2009*)。天然型の UCM 変異マウスには、感覚異常以外に免疫異常も報告されている。血液細胞においても、II型ミオシンと同様に UCM が、分化、増殖に関わる様々な機能に重要な役割を果たしていることは疑う余地はない。

2. 研究の目的

われわれは、血液細胞におけるミオシンモーター蛋白質の機能や病態への関連について研究してきた。これまでの結果を受けて、以下の4項目に分けて研究を行う。これらの研究が、血液疾患の病態解明やさらには新規治療開発へつながることを期待したい。

- (1) ミオシン VI を介する骨髓腫細胞の非分泌型への形質転換の分子病態機序の解明
- (2) T細胞膜表面への CD3 タンパク発現および c-SMAC (central supramolecular activation cluster) 形成における II 型ミオシンの役割の解明と免疫シナプス安定化の機序の解明
- (3) 平滑筋型ミオシン軽鎖の発現および機能異常と血液細胞の形態異常との関連の解明
- (4) 血小板膜糖蛋白の clustering と II 型ミオシンとの関連、巨大血小板減少症の病態の解明

3. 研究の方法

(1) ミオシン VI を介する、骨髓腫細胞の非分泌型への形質転換の分子病態機序の解明
分泌型および非分泌型マウス骨髓腫細胞株両者において、共焦点顕微鏡および生化学的手法で細胞内局在の違いを明らかにする。さらに、ActinomycinD などの転写阻害剤による局在変化を観察する。また、GFP 標識ミオシン各ドメインの欠失変異体を発現させ局在決定部位の同定、さらにその制御機構を探る。分泌型と非分泌型細胞株の遺伝子発現パ

ターンの違いをマイクロアレイ法で解析し、発現量の変化する遺伝子を検索し、各治療薬剤に対する感受性との関連も検討する。

(2) T細胞膜表面への CD3 発現および c-SMAC(central supramolecular activation cluster)形成における II 型ミオシンの役割の解明と免疫シナプス安定化の機序の解明
正常 T細胞あるいは CD3 を細胞膜表面に発現する Jurkat (E6-1) 株にミオシン阻害剤 (Blebbistatin) や関連シグナルのキナーゼ阻害剤などを用いて CD3 の細胞膜発現レベル変化をフローサイトメータで、また細胞内局在を共焦点蛍光顕微鏡で観察解析する。また、CD3 の総発現量を Western blot で解析する。CD3 を細胞膜表面に発現できない Jurkat 野生株を、Ca イオノフォアやミオシン脱リン酸化酵素阻害剤 (オカダ酸など) でミオシンリン酸化を促しミオシンを活性化させて、CD3 の細胞膜表面への発現量の変化を生化学的、画像的に E6-1 株と比較、解析する。なお、ミオシンリン酸化は、抗リン酸化ミオシン軽鎖抗体で確認する。

(3) 平滑筋型ミオシン軽鎖 (MLY9) の発現および機能異常と血液細胞の形態異常との関連の解明

t(8;21)転座をもち RUNX1 転写活性が抑制されている Kasumi-1 細胞で、実際に MYL9 の発現レベルを解析する。さらに、MYL9 のリン酸化レベルをリン酸化特異的抗体を用いて、ウェスタンブロットや細胞免疫染色を行い、時空間的に解析する。MYL9 を多く発現している他の白血球細胞株との細胞骨格の異同を検討する。

(4) GPIIb/IIIa、GPIb/IX/V の clustering と II 型ミオシンとの関連および巨大血小板減少症の病態の解明

マウス ES cell を TP0 存在下で巨核球に分化誘導し proplatelet 形成を誘導させる実験系で、II 型ミオシン阻害剤や各種シグナル刺激剤、抑制剤を用いて proplatelet 形成への影響を観察する。またその際のシグナル伝達経路を抗リン酸化抗体などを用いて調べる。また、MYH 異常症で報告されている変異ミオシンをバキュロウイルスシステムで 6 量体として精製しその分子レベルの性質を解析する。

4. 研究成果

(1) 分泌型および非分泌型マウス骨髓腫細胞株を用いて、核内蛋白質とミオシン VI との局在を共焦点蛍光顕微鏡で観察した。分泌型では、ミオシン VI は微小管に沿った分泌顆粒に局在し、非分泌型になると核内に顆粒状に存在した。臨床検体でもばらつきはあるが、同様の傾向を得た。非分泌型は予後不良であるが、その機序の少なくとも一つにミオシン VI が関与している可能性が示唆された。したがって、この局在変化が予後不良因子のマーカーになりうる可能性がある。

次に、非分泌型におけるミオシンVIの細胞特に核内局在を検討した。核内にドット上に局在しスプライシオソームと共局在していた。また、GFP標識ミオシンVI尾部を強制発現させると細胞質の微小管系に局在し、頭部のみの発現では核内に局在した。非分泌型はなんらかの異常によりミオシンVI尾部が微小管系蛋白質と結合できなくなるものと思われる。ノコダゾール処理で微小管を破壊すると分泌型細胞のミオシンVIも細胞質から核内に移行したことは、このことを示唆した。

ミオシン頭部と尾部に分けてそれぞれに結合する蛋白質をyeast-two hybrid法でスクリーニングし、分泌型、非分泌型でスクリーニングで上がった蛋白質の違いを検討する予定である。また、骨髄腫の新規治療薬であるプロテオソーム阻害剤や免疫調節作用を有するレナリドミド等、さらにはHDAC阻害剤など新規薬剤への感受性との関連も検討したい。

(2) 3種類のJurkat由来細胞株(野生株、E6-1垂株、MYL9遺伝子導入株)をもちいて、さまざまな刺激による細胞表面のCD3の発現レベルの発現変化をフローサイトメーターで測定した。PMA刺激やカルシウムイオノフォアで野生株も細胞表面CD3発現が増加した。さらに、CD3の細胞表面発現に関わるシグナル伝達経路を特定するため、各種特異的キナーゼ阻害剤などを用いてCD3発現への影響を観察した。Myosin IIをリン酸化させる刺激でCD3の細胞膜への発現が回復すること、myosinIIの特異的阻害剤であるBlebbistatinにより抑制されることから、myosin IIの活性化が重要であることが分かった。また、健康人末梢血T細胞においてミオシンリン酸化が細胞膜表面に発現しているCD3の膜直下のミオシンリン酸化がリン酸化抗体で検出された。

(3) RUNX1変異によりその転写活性が抑制されている血液細胞株Kasumi-1はmyosinII重鎖(myh10)が発現し、軽鎖のMYL9発現レベルが低下していた。次に、RNA干渉によるmyh10発現抑制のため、myh10のsiRNAを発現ベクターに組み込みノックダウンした細胞株を作成したところ、あきらかに巨核球への分化が促された。すなわち多核巨大細胞になり細胞表面マーカー上も形態的にも巨核球系細胞であることが確かめられた。すなわち、RUNX1変異による分化抑制をmyh10の発現を抑制するだけで解除し巨核球への分化をもたらすことができることが分かった。MYL9の強制発現の系では、明らかな巨核球系への分化促進は見られなかった。ミオシン軽鎖よりも重鎖の方が巨核球系分化に重要であることが示唆された。

(4) マウスES細胞、分離巨核球を用いてproplatelet形成は、すべての細胞に促されるわけではなくせいぜい10-30%程度でみられる現象である。この効率を増やすことは抑制実

験に重要であるが、フィブロネクチンが亢進することがわかった。フィブロネクチンを用いると効率よくproplatelet形成を誘導できることがわかった。培養巨核球のproplatelet形成をMYL9発現レベルをRNA干渉や尾部のみの強制発現させるなどしてMYL9のリン酸化レベルとともに検討した。MYL9リン酸化を低下させるとproplateletは増加、伸張するが、枝分かれが少なくなった。

実際、その上流のRhoキナーゼを阻害すると同様にproplateletの増加、伸張が見られた。逆にMYL9のリン酸化を強制的に促進させるとproplateletは抑制された。また、微小管をノコダゾールで阻害するとproplateletは抑制された。微小管系とアクトミオシン系の細胞骨格タンパクが協同してバランスをとりながらproplateletを形成させており、非常に微妙なバランスで成り立っていることが分かった。次に、巨核球膜タンパク受容体は、アゴニスト刺激によりclusteringされるが、イメージングで捉える実験系は困難であった。一方、レクチン受容体は、レクチン添加によりclusteringを起こすことは蛍光顕微鏡でも比較的容易に観察された。しかもこのclusteringはミオシン阻害剤Blebbistatinにより抑制された。また、clusteringされたレクチン受容体の細胞膜直下のミオシンリン酸化が亢進しており、受容体のclusteringにミオシンリン酸化(活性化)が重要な役割を果たしていることが分かった。近年巨核球、血小板にclec2など多くのレクチン受容体が同定されておりこれらの刺激にもミオシンリン酸化が大きな役割を果たしていること示唆された。

次に、巨大血小板減少症の代表的な疾患であるMYH9異常症で同定されているMYH9の点突然変異(p.D1424H, p.E1841K)がミオシン分子に及ぼす影響を検討した。変異ミオシンを軽鎖も含めた全分子としてバキュロウイルス発現システムで発現生成し解析した。いずれの変異もミオシンATPase活性に影響を及ぼさなかったが、フィラメント形成は一旦起きると強いイオン環境下でもmonomerにならなかった。電子顕微鏡観察では、フィラメントは正常とは異なるもので、特にp.E1841K変異ミオシンでは正常より太かった。ミオシン分子濃度を薄くすると一分子での会合がロータリーシャドウ法で観察されるが、変異ミオシンの尾部はいずれも野生型のように丸まるのではなく伸展したままであった。また、伸展したままのミオシン分子は、お互いに凝集する傾向にあり、とくにp.E1841Kではお互いに粘着する傾向が強かった。とくに変異部位あたりで結合しているように見えた。

また、新たな先天性巨大血小板減少症の原因遺伝子として細胞骨格蛋白質アクチニンを同定した。アクチニン異常がアクトミオシン細胞骨格に及ぼす影響を調べた。アクチニン異常によりアクトミオシン細胞骨格系が壊れることが細胞内で観察された。このことが異常

ミオシンでみられる巨大血小板と同じ病態を形成していることが推察された。

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 8件)

1. Miyazaki K, Koike Y, Kunishima S, Ishii R, Danbara M, Horie R, Yatomi Y, Higashihara M. Immature Platelet Fraction Measurement is Influenced by Platelet Size and is a Useful Parameter for Discrimination of Macrothrombocytopenia. Hematology 査読有,(in press)DOI:10.1179/1607845415Y.00000000 21
2. Satoh T, Miyazaki K (2/13), Higashihara M (11/13), et al. Fcγ receptor IIB gene polymorphism in adult Japanese patients with primary immune thrombocytopenia. Blood. 査読有,122(1),2013,1991-1992. DOI:10.1182/blood-2013-05-501858.
3. Danbara M, Tadera N, Togano T, Katayama T, Aoki T, Miyazaki K, Higashihara M. Lenalidomide-induced acute lung injury in case of multiple myeloma. Int J Clin Pharmacol Ther. 査読有,51(6),2013,513-516. DOI:10.5414/CP201840.
4. Suzuki Y, Miyazaki K (7/12), et al. Incidence and clinical significance of aberrant T-cell marker expression on diffuse large B-cell lymphoma cells. Acta Hematol. 査読有,130(4), 2013, 230-237. DOI:10.1159/000348550.
5. Kunishima S, Okuno Y, Miyazaki K (9/20), et al. ACTN1 Mutations Cause Congenital Macrothrombocytopenia. Am J Hum Genet 査読有.93(3),2013,431-438. DOI:10.1016/j.ajhg.2013.01.015.
6. Aoki T, Miyazaki K, Katayama T, Watanabe M, Horie R, Danbara M, Higashihara M. Surface CD3 expression proceeds through both myosin regulatory light chain9 (MYL9)-dependent and MYL9-independent pathways in Jurkat cells. Journal of Smooth Muscle Research. 査読有 48,2012,137-147. DOI:http://doi.org/10.1540/jsmr.48.137

〔学会発表〕(計 7件)

1. 宮崎浩二, Tail mutation of MYH9 inhibits the disassembly of non-muscle myosin IIA. 欧州血液学会, 2015.6.12. オーストリア, ウィーン
2. 宮崎浩二, Detection of anti-thrombopoietin auto-antibody among immune thrombocytopenic patients. 欧州血液学会, 2014.6.13. イタリア, ミラノ

3. 宮崎浩二, IMPAIRED PROPLATELET FORMATION IN A NOVEL GLANZMANN VARIANT MACROTHROMBOCYTOPENIA. 欧州血液学会, 2013.6.14. スウェーデン, スtockホルム
4. 宮崎浩二, The Immature Platelet Fraction Is Sensitive to the Platelet Size and a Useful Parameter for Screening for Macrothrombocytopenia 米国血液学会年次総会, 2012.12.10. アメリカ合衆国, アトランタ

〔図書〕(計 0件)

〔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:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 浩二 (MIYAZAKI, Koji)
北里大学・医学部・講師
研究者番号: 90261966

(2) 研究分担者

東原 正明 (HIGASHIHARA, Masaaki)
北里大学・医学部・教授
研究者番号: 80165084

(3) 連携研究者

()

研究者番号: