慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	骨髄異形成症候群(5q-症候群)発症におけるATOX1遺伝子の役割
Sub Title	A role for ATOX1 in 5q- syndrome
Author	中島, 秀明(Nakajima, Hideaki) 岡本, 真一郎(Okamoto, Shinichiro)
Publisher	
Publication year	2014
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2013.)
JaLC DOI	
Abstract	5q-症候群は染色体5q33領域の欠失を特徴とする骨髄異形成症候群(MDS)の亜型であるが、その責任遺伝子の詳細は不明である。本研究は5q33領域に存在するATOX1という銅シャペロン遺伝子に注目し、HSCの恒常性維持や5q-症候群発症における役割を明らかにする目的で行った。 ATOX1ノックアウトマウスの造血幹細胞 (HSC)・各種造血前駆細胞分画を解析すると、骨髄中の各細胞の頻度は野生型マウスと変わらず、またHSCの長期骨髄再建能・自己複製能にも異常がないことが判明した。以上から、ATOX1はHSC機能や血球分化に必須ではなく、5q-症候群への関与も限定的であることが示唆された。 5q- syndrome is a subtype of myelodysplastic syndrome characterized by a deletion of chromosome 5q33. To elucidate molecular pathogenesis of 5q- syndrome, we focused on ATOX1, a cupper chaperone located in the common deleted region of 5q33. Frequencies of hematopoietic stem cells (HSCs), multipotent hematopoietic progenitors, and lineage-committed progenitors in the bone marrow were normal in ATOX1-/- mice, and ATOX1-/- HSCs maintained normal self-renewal and long-term repopulating capacities. These results suggest that ATOX1 is not essential for HSC function and hematopoietic differentiation, and that ATOX1 has little, if any, roles in 5q-syndrome.
Notes	研究種目：挑戦的萌芽研究 研究期間：2012～2013 課題番号：24659467 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
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_24659467seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　 ５ 月 ２７ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2012～2013
課題番号：２４６５９４６７

研究課題名（和文）骨髄異形成症候群（５ｑ－症候群）発症におけるＡＴＯＸ１遺伝子の役割

研究課題名（英文）A role for ATOX1 in 5q- syndrome

研究代表者
中島　秀明（Nakajima, Hideaki）

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：３０２１７７２３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,800,000円、（間接経費）　　840,000円

研究成果の概要（和文）：　5q-症候群は染色体5q33領域の欠失を特徴とする骨髄異形成症候群（MDS）の亜型であるが、その責任遺伝子の詳細は不明である。本研究は5q33領域に存在するATOX1という銅シャペロン遺伝子に注目し、HSCの恒常性維持や5q-症候群発症における役割を明らかにする目的で行った。
　ATOX1ノックアウトマウスの造血幹細胞（HSC）・各種造血前駆細胞分画を解析すると、骨髄中の各細胞の頻度は野生型マウスと変わらず、またHSCの長期骨髄再建能・自己複製能にも異常がないことが判明した。以上から、ATOX1はHSC機能や血球分化に必須ではなく、5q-症候群への関与も限定的であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：5q- syndrome is a subtype of myelodysplastic syndrome characterized by a deletion of chromosome 5q33. To elucidate molecular pathogenesis of 5q- syndrome, we focused on ATOX1, a cupper chaperone located in the common deleted region of 5q33. Frequencies of hematopoietic stem cells (HSCs), multipotent hematopoietic progenitors, and lineage-committed progenitors in the bone marrow were normal in ATOX1-/- mice, and ATOX1-/- HSCs maintained normal self-renewal and long-term repopulating capacities. These results suggest that ATOX1 is not essential for HSC function and hematopoietic differentiation, and that ATOX1 has little, if any, roles in 5q- syndrome.

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：5q-症候群　骨髄異形成症候群　ATOX1　造血幹細胞

１．研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群（MDS）は、造血幹細胞（HSC）に遺伝子異常が蓄積することにより発症するクローン性造血器腫瘍である。MDS における遺伝子異常は HSC の自己複製能亢進・クローン増幅と血球分化異常を誘発し、血球減少を主体とした多彩な臨床症状を引き起こす。５番染色体長腕（5q）は MDS で高頻度に欠失を認める領域で、ここには造血制御に関わる重要な遺伝子が存在すると考えられてきた。5q-症候群は 5q33 の欠失を特徴とする MDS の一亜型であり、大球性貧血と血小板増多、巨核球の異形成を特徴とする。5q33 領域には約４０個の遺伝子が存在するが、遺伝子欠損マウスや shRNA によるノックダウンの解析から、それら遺伝子のうち RPS14, miR145, miR146a が 5q-症候群の責任遺伝子であることが明らかにされている。RPS14 遺伝子はリボソームのプロセッシングに重要な遺伝子であるが、これを欠失したマウスは赤芽球分化異常と大球性貧血をきたすことが報告された。また、miR145, miR146a は 5q-症候群患者の CD34 陽性細胞中で発現が低下しており、これら遺伝子のノックダウンでは血小板増多と巨核球異形成が生じる。しかしながら、これら遺伝子の欠失は 5q-症候群に類似した血球分化異常を再現するものの、もう一つの重要な表現型である自己複製能亢進やクローン増幅を十分に説明できるものではない。したがって、5q33 領域に存在する RPS14, miR145, miR146a 以外の遺伝子が、5q-症候群のクローン増幅に関与している可能性が強く示唆されている。

ATOX1は細胞内の銅輸送に関与する、銅シャペロン蛋白質である。銅は生体機能に必須の稀少元素であり、細胞増殖、細胞内呼吸、活性酸素除去、組織修復、血管新生など多彩な生命現象に関与している。ATOX1は細胞内の銅イオンを結合し細胞外へ分泌する働きをもつが、近年銅結合型のATOX1は転写因子としても機能しCyclin D1やSOD3遺伝子の転写を制御することが報告された。このようにATOX1は単なる銅シャペロンとしてだけでなく、様々な分子機能をもつことが明らかにされつつある。ヒトATOX1遺伝子は5q-症候群の共通欠失領域である5q33に存在し、さらに5q-症候群患者の骨髄単核球ではATOX1の発現が恒常的に低下していることが報告されている。

以上のことから、ATIX1はHSC機能に重要な役割を果たし、5q-症候群の病態形成に関わっていることが示唆された。

２．研究の目的

本研究は、ATOX1 が HSC の自己複製・多分化能などの恒常性維持に果たしている役割を明らかにすると同時に、ATOX1 遺伝子のヘテロ欠損が 5q-症候群や 5q 欠失を伴う MDS の病態形成、特にクローン増幅にどのように関与しているかを解明することを目的として行った。これにより、HSC 機能制御の分子メカニズムの詳細を明らかにするだけでなく、ATOX1 やその下流因子を標的とした MDS の新規治療薬開発へつなげることを目指し研究を行った。

３．研究の方法

(1) ATOX1 ノックアウトマウスの造血幹細胞（HSC）・造血前駆細胞（HPC）分画と血球分化パターンの解析

① ATOX1 ノックアウトマウス・野生型マウスの骨髄単核球を採取し、HSC 分画（$CD34^-Flt3^-KSL$, $CD150^+KSL$）、HPC 分画（$CD34^+Flt3^-KSL$, $CD34^+Flt3^+KSL$）、common myeloid progenitor (CMP)、granulocyte monocyte progenitor (GMP), megakaryocyte-erythroid progenitor (MEP)分画の割合をフローサイトメトリーで解析する。

② ATOX1 ノックアウトマウス・野生型マウスの末梢血、脾臓細胞、胸腺細胞を採取し、好中球・リンパ球などの成熟血球分画の割合を、FACS により解析する。

③ 上記の解析を、生後８，２０，４０週齢のマウスについて行い、週齢による HSC/HPC 分画および前駆細胞分画の割合、血球分化パターンの変化を明らかにする。

(2) ATOX1 ノックアウト HSC の長期骨髄再建能・自己複製能の解析

① $ATOX1^{-/-}$, $ATOX1^{+/-}$マウス,野生型マウスから、HSC（$CD34^-KSL$, $CD150^+KSL$）分画を FACS によりソーティングする。

② ソーティングした細胞を 2×10^5 個の競合細胞（competitor; Ly5.1/5.2）と mix し、致死量放射線照射（950rad）したレシピエントマウス（Ly5.1）へ経静脈的に移植する。

③ 移植後４，８，１２週にレシピエントマウスの採血を行い、ドナー細胞のキメリズムならびに３系統（好中球・B 細胞・T 細胞）への分化を FACS で解析、$ATOX1^{-/-}$, $ATOX1^{+/-}$, $ATOX1^{+/+}$ HSC の長期骨髄再建能と多分化能を判定する。

④ １次移植したマウスから骨髄細胞を採

取し、2 x 10^6 個の細胞を致死量放射線照射したレシピエントマウスに２次移植する。移植後４，８，１２週にレシピエントマウスの採血を行い、ドナー細胞のキメリズムならびに３系統（好中球・B 細胞・T 細胞）への分化を FACS で解析する。

⑤ ４と同様に２次移植したマウスから骨髄細胞を採取し、新しいレシピエントマウスに３次移植、経時的にキメリズム解析を行う。以上より、ATOX1$^{-/-}$, ATOX1$^{+/-}$, ATOX1$^{+/+}$ HSC の自己複製能を判定する。

４．研究成果

まずATOX1ノックアウトマウスの造血幹細胞（HSC）・造血前駆細胞（HPC）分画と血球分化パターンの解析を行ったところ、ATOX1ノックアウトマウス骨髄のHSC分画（CD34-Flt3-KSL, CD150+KSL），HPC分画（CD34+Flt3-KSL, CD34+Flt3+KSL），各種前駆細胞分画の割合は、野生型と比較して有意な差は認められないことが明らかとなった。また同様に、骨髄共通骨髄前駆細胞、共通リンパ系前駆細胞分画や末梢血成熟好中球・単球・リンパ球分画にも差がないことが明らかとなった。

続いてATOX1ノックアウトマウスのHSC機能について検討を加えた。ATOX1ノックアウトマウス骨髄からFACSを用いてHSC（CD34-Flt3-KSL, CD150+KSL細胞）を精製し競合細胞とともにレシピエントマウスに移植、経時的に末梢血のドナーキメリズムを測定することで長期骨髄再建能を検討した。また生着した骨髄細胞を継代移植することで、HSCの自己複製能を検討した。この結果、ATOX1ノックアウトマウス由来HSCと野生型HSCでは、長期骨髄再建能・自己複製能に差は見られないことが判明した。

以上から、ATOX1 欠失により骨髄・末梢血の各血球分画には異常を来さないこと、ATOX1 欠失は HSC 機能に影響を与えないことが明らかとなった。

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６件）

(1) Sakurai M, Kunimoto H, Watanabe N, Fukuchi Y, Yuasa S, Yamazaki S, Nishimura T, Sadahira K, Fukuda K, Okano H, Nakauchi H, Morita Y, Matsumura I, Kudo K, Ito E, Ebihara Y, Tsuji K, Harada Y, Harada H, Okamoto S, Nakajima H: Impaired hematopoietic differentiation of *RUNX1*-mutated induced pluripotent stem cells derived from FPD/AML patients. Leukemia（査読有）, 2014 Apr 15. doi: 10.1038/leu.2014.136.

(2) Kunimoto H, Fukuchi Y, Sakurai M, Takubo K, Okamoto S, Nakajima H: *Tet2*-mutated myeloid progenitors possess aberrant *in vitro* self-renewal capacity. Blood（査読有）, 123:2897-9, 2014.

(3) Ono R, Masuya M, Nakajima H, Enomoto Y, Miyata E, Nakamura A, Ishii S, Suzuki K, Shibata-Minoshima F, Katayama N, Kitamura T, Nosaka T.: Plzf drives MLL-fusion-mediated leukemogenesis specifically in long term hematopoietic stem cells. Blood（査読有）, 122:1271-83, 2013

(4) Kunimoto H, Fukuchi Y, Sakurai M, Sadahira K, Ikeda Y, Okamoto S, Nakajima H: *Tet2* disruption leads to enhanced self-renewal and altered differentiation of fetal liver hematopoietic stem cells. Scientific Reports（査読有）, 2:273, 2012.

(5) Sadahira K, Fukuchi Y, Kunimono H, Sakurai M, Ikeda Y, Okamoto S, Nakajima H: Direct reprogramming of terminally differentiated B cells into erythroid lineage. FEBS Letters（査読有）, 586:3645-52, 2012

(6) Goto-Koshino Y, Fukuchi Y, Shibata F, Abe D, Kuroda K, Okamoto S, Kitamura T, Nakajima H: Robo4 plays a role in bone marrow homing and mobilization, but is not essential in the long-term repopulating capacity of hematopoietic stem cells. PLOS ONE（査読有）, 7:e50849, 2012

〔学会発表〕（計７件）

(1) Akihide Yoshimi, Takashi Toya,

Masahiro Nakagawa, Masahito Kawazu, Yasuhito Nannya, Motoshi Ichikawa, Shunya Arai, Hironori Harada, Kensuke Usuki, Yasuhide Hayashi, Etsuro Ito, Keita Kirito, Hideaki Nakajima, Hiroyuki Mano, Mineo Kurokawa: The Genetic Landscape of FPD/AML Revealed CDC25C Mutation as a Driver that Promotes Malignant Transformation. 55th Annual Meeting of American Society of Hematology, Simultaneous Session. 平成25年12月9日（米国、ニューオーリンズ）

(2) Eri Matsuki, Taku Kikuchi, Norisato Hashimoto, Shunsuke Souma, Sumiko Kohashi, Takaaki Toyama, Masatoshi Sakurai, Daiki Karigane, Daichi Abe, Takayuki Shimizu, Kenji Yokoyama, Hideaki Nakajima, Shinichiro Okamoto: Chemo-Immunotherapy With Hyper-CVAD/MA and Rituximab For B-Cell Lymphomas Leads To Prolonged Immune Suppression Compared To Conventional Treatment With R-CHOP. 55th Annual Meeting of American Society of Hematology, Poster Session. 平成25年12月9日（米国、ニューオーリンズ）

(3) Masatoshi Sakurai, Hiroyoshi Kunimoto, Naohide Watanabe, Yumi Fukuchi, Shinsuke Yuasa, Keiichi Fukuda, Satoshi Yamazaki, Hiromitsu Nakauchi, Yasuhiro Ebihara, Koichiro Tsuji, Etsuro Ito, Yuka Harada, Hironori Harada, Shinichiro Okamoto, Hideaki Nakajima: Impaired emergence of hematopoietic progenitors and defective megakaryocyte differentiation from FPD/AML-derived induced pluripotent stem cells. EMBO Workshop-RUNX transcription factors in development and disease. 平成25年6月17日（ドイツ、Wilsede）

(4) Masatoshi Sakurai, Hiroyoshi Kunimoto, Naohide Watanabe, Yumi Fukuchi, Ken Sadahira, Shinsuke Yuasa, Keiichi Fukuda, Satoshi Yamazaki, Hiromitsu Nakauchi, Yasuhiro Ebihara, Koichiro Tsuji, Etsuro Ito, Yuka Harada, Hironori Harada, Shinichiro Okamoto, Hideaki Nakajima: Impaired hematopoietic differentiation of iPSCs derived from patients with FPD/AML. 54th Annual Meeting of American Society of Hematology, Simultaneous Session. 平成24年12月10日（米国、アトランタ）

(5) Hiroyoshi Kunimoto, Yumi Fukuchi, Masatoshi Sakurai, Daichi Abe, Ken Sadahira, Yasuo Ikeda, Shinichiro Okamoto, Hideaki Nakajima: *Tet2* Uniquely Regulates Self-Renewal and Long Term Repopulating Capacity of Fetal Liver and Bone Marrow Hematopoietic Stem Cells. 54th Annual Meeting of American Society of Hematology. 平成24年12月10日（米国、アトランタ）

(6) Ken Sadahira, Yumi Fukuchi, Hiroyoshi Kunimoto, Masatoshi Sakurai, Shinichiro Okamoto, Hideaki Nakajima: Reprogramming of mature B cells into erythroid lineage. 10th Annual Meeting of International Society of Stem Cell Research,平成24年6月15日（横浜）

(7) Hiroyoshi Kunimoto, Yumi Fukuchi , Masatoshi Sakurai, Ken Sadahira, Yasuo Ikeda, Shinichiro Okamoto, Hideaki Nakajima: Disruption of *Tet2* leads to enhanced self-renewal and competitive repopulating capacity of fetal liver hematopoietic stem cells. 10th Annual Meeting of International Society of Stem Cell Research,平成24年6月15日（横浜）

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

６．研究組織

(1)研究代表者
中島　秀明（Hideaki Nakajima）
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：30217723

(2)研究分担者
岡本　真一郎（Shinichiro Okamoto）
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：50160718

(3)連携研究者
なし