

厚生科学研究費補助金

厚生省ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業

臨床応用をめざした造血器腫瘍原因遺伝子の単離と
疾患モデルマウスの作成

平成10年度研究業績報告書

(平成10年度～平成12年度)

主任研究者

金倉 譲

緒 言

近年の分子生物学の進歩にはめざましいものがあり、この10年の間に癌の基礎研究は著しく進展した。数多くの癌遺伝子、癌抑制遺伝子が単離されたことはいままでもなく、これらの分子の正常細胞における本来の役割についても詳細に明らかにされてきた。造血器腫瘍の分野においても、各種の造血因子がクローニングされ、実際に広く臨床応用され、その有用性が評価されている。また、造血幹細胞の機能及び性状をより確実に評価することが可能となったため、末梢血幹細胞移植術などの治療法が造血器腫瘍の分野のみでなく、固形腫瘍も含めた悪性腫瘍に対する治療法として広く行われるようになってきている。更に、*in vitro*における造血幹細胞の増幅や造血幹細胞への遺伝子導入といった長年の課題も現在の研究の進展状況からすると必ずや近い将来克服されると考えられる。

一方、造血器腫瘍自身に対する治療法がどれだけ進歩したかという点、残念ながらそれほど大きな進展はなかったといわざるを得ない。従来同様、多くの患者に対してそれぞれの病型に対応した治療プロトコールが割り振られ、画一的な治療が行われているのが現状である。患者の腫瘍細胞はおそらくそれぞれ異なった発癌機構のもとに腫瘍化していると考えられ、本来であれば、個々の患者に対して各々の発癌機構に立脚した治療を行うことがベストであることはいままでもない。21世紀には、悪性腫瘍の治療の主体は遺伝子治療に移行していくと考えられるが、そのためにも個々の患者における発癌機構を容易に解明できるシステムの確立が急務である。

本研究事業では、個々の造血器腫瘍症例における腫瘍化の原因遺伝子を容易に単離することのできるシステムの確率をめざし、将来の悪性腫瘍の治療の基盤となりうる研究を行いたい。

平成11年3月31日

主任研究者

金倉 讓

研究者及び研究事業の分担

| 研究者名 | 分担する研究項目 | 所属施設 | 職名 | 専攻科目 |
|----------------|---|---|----|-------|
| 【主任研究者】 | | | | |
| 金倉 譲 | 研究全般の総括 造血器腫瘍の原因遺伝子の クローニング | 大阪大学医学部 バイオメディカル 教育センター、 血液・腫瘍内科学 研究部 | 教授 | 血液内科学 |
| 【分担研究者】 | | | | |
| 北村幸彦 | 造血器腫瘍の病理・病態解析 | 大阪大学医学部 病理学講座 | 教授 | 病理学 |
| 竹田潤二 | トランスジェニックマウス、 ターゲティングマウス などの疾患モデルマウスの作成 | 大阪大学医学部 環境医学講座 | 教授 | 血液病態学 |

平成10年度年次総括

主任研究者 金倉 譲

大阪大学医学部バイオメディカル教育センター
血液・腫瘍内科学研究部

臨床応用をめざした造血器腫瘍原因遺伝子の単離と疾患モデルマウスの作成

研究目的・方法

我々は、本研究プロジェクトにおいて、retrovirusを用いたfunctional cloning systemで造血器腫瘍患者の腫瘍細胞から癌遺伝子をクローニングすることを目的としている。具体的には、マウスのIL-3依存性細胞株Ba/F3に造血器腫瘍細胞より作成したretrovirusの発現ライブラリーを感染させ、IL-3非依存下でも増殖を可能にする遺伝子を単離するという方法である。更に、クローニングされた遺伝子を用いて、分担研究者の竹田らがトランスジェニックマウスやターゲティングマウスを作成し、その分子のin vivoでの機能についても解析する計画である。また、分担研究者の北村らは、造血器腫瘍細胞の病理・病態解析を行うと共に、竹田らによって作成されたマウスの病理学的な解析も行う予定である。

進展状況

1. retrovirusの発現クローニングシステムについて

本年度は、基礎検討として種々のretrovirusを用いてより効率の良い感染システムの確立を試みた。GFPの発現で評価した結果、Ba/F3細胞に極めて高い効率(約95%)で感染可能であることを確認し

た。現在、発現ライブラリーを感染させクローンを選択中である。

2. 疾患モデルマウスの作成について

分担研究者の武田らは、Cre-loxP systemを用いて血液系だけで遺伝子を破壊するシステムの構築に成功し、このシステムを用いてPNHのモデルマウスを作製した。

3. 造血器腫瘍の病理・病態解析について

分担研究者の北村らは、幹細胞増殖刺激因子受容体c-kitの活性型点突然変異が造血器腫瘍のみでなく消化管の間葉系腫瘍の原因となること、家族性の消化管の間葉系腫瘍がgerm lineにおけるc-kitの活性型点突然変異に起因することを明らかにした。

総括

本年度は、3年計画の1年目であり、ほとんどの研究が基礎的検討を中心として行われた。目的とする癌遺伝子の単離はできていないが、現在、当初の計画どおりに研究は進展していると考えられる。

I 平成10年度年次総括報告

主任研究者 金倉 讓

大阪大学医学部バイオメディカル教育センター
血液・腫瘍内科学研究部

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
総括研究報告書

臨床応用をめざした造血器腫瘍原因遺伝子の単離と疾患モデルマウスの作成

主任研究者 金倉 謙 大阪大学医学部バイオメディカル教育センター
血液・腫瘍内科学研究部 教授

研究要旨

近年の分子生物学の進歩により造血器腫瘍の分野においても多くの癌遺伝子が単離されてきた。しかし、一部の例外的な疾患を除いて、実際の症例の多くにおいてどのような遺伝子異常が原因となり腫瘍化がおこるのかについては明らかではない。本研究においては造血器腫瘍の個々の症例の腫瘍細胞からその原因遺伝子をretrovirusの発現クローニングシステムを用いて単離し、これらの分子の*n vivo*における機能をトランスジェニックマウスやターゲティングマウスを作成し詳細に解析する計画である。

分担研究者 北村幸彦
(大阪大学医学部
病理学講座、教授)
竹田潤二
(大阪大学医学部
環境医学講座、教授)

systemを用いて造血器腫瘍患者の腫瘍細胞から癌遺伝子を直接的にクローニングし、その機能についての解析を行うことを目的としている。

A. 研究目的

従来、造血器腫瘍における新規癌遺伝子のクローニングは、染色体転座部位の近傍に存在する遺伝子をポジショナルクローニングするという方法がとられてきた。また同様に癌抑制遺伝子のクローニングについても染色体欠失部位に存在する遺伝子を検索するという方法が用いられてきた。しかし、いずれの方法も、特定の染色体異常が検出された場合にのみ解析が可能で、染色体異常が検出できない症例や複雑すぎる染色体異常を有する症例は解析不可能であった。我々は、本研究プロジェクトにおいて、retrovirusを用いたfunctional cloning

B. 研究方法

我々は、本研究において造血細胞に対し極めて効率よく遺伝子導入を行うことが可能なretrovirusの感染システムを用いて個々の造血器腫瘍の患者腫瘍細胞よりその原因遺伝子をクローニングする計画である。具体的には、1. 造血器腫瘍細胞よりcDNAライブラリーを作成し、retrovirusの発現ベクターにsubcloningする。2. マウスのIL-3依存性細胞株Ba/F3にretrovirusの発現ライブラリーを感染させる。3. IL-3非依存下でも増殖可能なクローンを獲得する。4. 獲得したクローンのcDNAあるいはgenomic DNAをtemplateにしretrovirusのベクター部分をprimerとしてPCRを行い、組み込まれたcDNAを回収する。こ

の方法により造血因子非依存性の増殖をもたらす腫瘍化遺伝子のクローニングを試みる計画である。更に、これらクローニングされた遺伝子を用いて、分担研究者の竹田らがトランスジェニックマウスやCre-loxP systemを用いたコンディショナルなターゲティングマウスを作成することにより、その分子のin vivoでの機能についても詳細に解析する計画である。また、分担研究者の北村らは、造血器腫瘍細胞の病理・病態解析を行うと共に、竹田らによって作成されたマウスの病理学的な解析も行う予定である。

C. 研究結果

1. retrovirusの発現クローニングシステムについて

本年度は、基礎検討として種々のretrovirus、いくつかの造血因子依存性細胞株を用いてより効率の良い感染システムの確立を試みた。GFPの発現によってその感染効率を評価した結果、pMX由来のretrovirusをBa/F3細胞に感染させた場合、極めて高い感染効率(約95%)であることを確認した。現在、8例の患者の発現ライブラリーをこのretrovirusを用いてBa/F3細胞に感染させクローンを選択中である。

2. 造血系細胞の増殖機構についての検討

ヒトのIL-3依存性細胞株-36Pにdominant-negative(dn)型変異STAT1、3、5あるいはdn-rasをinducibleに発現させることによりIL-3によって誘導される増殖にはSTAT5とrasが関与していることを明らかにした(Mol. Cell. Biol.18: 4282, 1998)。サイクリンD1は細胞周期制御分子の一つであるが、mantle zoneの悪性リンパ腫などにおいては、過剰発現していることが

報告されている。サイクリンD1の発現制御機構を明らかにするためにサイクリンD1プロモーターを用いてluciferase assayを行った結果、IL-3などの造血因子によって活性化されたSTAT5がrasのシグナルと協調してサイクリンD1プロモーターを活性化することを明らかにした(EMBO J 18:1367, 1999)。

3. 疾患モデルマウスの作成について

多くの遺伝子のノックアウトマウスは胎生致死であり、血液系だけで遺伝子を破壊するシステムを開発する必要がある。分担研究者の武田らは、そのシステムを構築するためPNHのモデルマウスを作製した。まず、PNHの原因遺伝子であるPIG-AをloxP配列で挟みこんだマウスと、Creリコンビネースを胎生初期より発現しているマウスを交配した。そのマウスは致死だったので、胎仔より肝細胞を取り出し、致死量照射したレシピエントマウスに移入した。この手法により血液系だけで遺伝子破壊が起きたマウスを構築することに成功した。このシステムは、一般化することが可能であり、今後致死性が認められる遺伝子の機能解析に有効と考えられる。

4. 造血器腫瘍の病理・病態解析

分担研究者の北村らは幹細胞因子の受容体c-kitが消化管のカハールのペースメーカー細胞に発現しており、その活性型点突然変異が造血器腫瘍のみでなく消化管の間葉系腫瘍の原因となること(Science 279: 577, 1998)、また、家族性の消化管の間葉系腫瘍がgerm lineにおけるc-kitの活性型点突然変異に起因することを明らかにした(Nat. Genet. 19: 323, 1998)。

D. 考察

本システムの確立により個々の症例において腫瘍化遺伝子のクローニングが行われれば、各々の腫瘍細胞特有の増殖機構を明らかにすることが可能となり、病態の解明及び治療法の選択においても極めて有用な手がかりになると期待される。また、原因遺伝子を同定することにより、将来的には、同定された原因遺伝子をtargetとしてリボザイムなどを用いた遺伝子治療を行うことも可能になると考えられる。以上のように、本研究は個々の症例の腫瘍化機構を分子レベルで解明することにより、その腫瘍化機構に対応したより有効な治療法を確立するための基盤になる研究と考えられる。

E. 結論

本年度は、3年計画の1年目であり、ほとんどの研究が基礎的検討を中心として行われた。まだ目的とする癌遺伝子は単離できていないが、現在、Ba/F3細胞にいくつかの発現ライブラリーを感染させており、造血因子非依存性に増殖するクローンを選択中である。本システムはすべての症例を解析の対象にすることが可能であり、実験系の確立の後には腫瘍化遺伝子の単離が比較的容易に行えると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

英文

1. Hirota, S., Isozaki, K., Moriyama, Y., Hashimoto, K., Nishida, T., Ishiguro, S., Kawano, K., Hanada, M., Kurata, A., Takeda, M., Muhammad, T. G., Matsuzawa, Y., Kanakura, Y., Shinomura, Y., and Kitamura, Y. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science*, 279: 577-80, 1998.
2. Nishida, T., Hirota, S., Taniguchi, M., Hashimoto, K., Isozaki, K., Nakamura, H., Kanakura, Y., Tanaka, T., Takabayashi, A., Matsuda, H., and Kitamura, Y. Familial gastrointestinal stromal tumours with germline mutation of the KIT gene. *Nat. Genet.*, 19: 323-324, 1998.
3. Matsumura, I., Nakajima, K., Wakao, H., Hattori, S., Hashimoto, K., Sugahara, H., Kato, T., Miyazaki, H., Hirano, T., and Kanakura, Y. Involvement of prolonged ras activation in thrombopoietin-induced megakaryocytic differentiation of a human factor-dependent hematopoietic cell line. *Mol. Cell. Biol.*, 18: 4282-90, 1998.
4. Yokota, T., Oritani, K., Mitsui, H., Aoyama, K., Ishikawa, J., Sugahara, H., Matsumura, I., Tsai, S., Tomiyama, Y., Kanakura, Y., and Matsuzawa, Y. Growth-supporting activities of fibronectin on hematopoietic stem/progenitor cells in vitro and in vivo: structural requirement for

fibronectin activities of CS1 and cell-binding domains. *Blood*, 91:3263-3272, 1998.

5. Okajima, Y., Matsumura, I., Nishiura, T., Hashimoto, K., Yoshida, H., Ishikawa, J., Wakao, H., Yoshimura, A., Kanakura, Y., Tomiyama, Y., and Matsuzawa, Y. Insulin-like growth factor-I augments erythropoietin-induced proliferation through enhanced tyrosine phosphorylation of STAT5. *J. Biol. Chem.*, 273: 22877-22883, 1998.

6. Kim, D.K., Morii, E., Ogihara, H., Hashimoto, K., Oritani, K., Lee, Y.M., Jippo, T., Adachi, S., Kanakura, Y., and Kitamura, Y. Impaired expression of integrin alpha-4 subunit in cultured mast cells derived from mutant mice of mi/mi genotype. *Blood*, 92: 1973-1980, 1998.

7. Tadokoro, S., Tomiyama, Y., Honda, S., Arai, M., Yamamoto, N., Shiraga, M., Kosugi, S., Kanakura, Y., Kurata, Y., and Matsuzawa, Y. A Gln747-->Pro substitution in the IIB subunit is responsible for a moderate IIBbeta3 deficiency in Glanzmann thrombasthenia. *Blood*, 92: 2750-2758, 1998.

8. Shiraga, M., Tomiyama, Y., Honda, S., Suzuki, H., Kosugi, S., Tadokoro, S., Kanakura, Y., Tanoue, K., Kurata, Y., and Matsuzawa, Y. Involvement of Na⁺/Ca²⁺ exchanger in inside-out signaling through the platelet integrin IIBbeta3. *Blood*, 92: 3710-3720, 1998

9. Ogawa, M., Nishiura, T., Yoshimura, M., Horikawa, Y., Yoshida, H., Okajima, Y., Matsumura, I., Ishikawa, J., Nakao, H., Tomiyama, Y., Kanayama, Y., Kanakura, Y., and Matsuzawa, Y. Decreased NO-mediated NK activation in chronic fatigue syndrome. *Eur. J. Clin. Invest.*, 28:937-943, 1998.

10. Yoshida, H., Nishiura, T., Karasuno, T., Matsumura, I., Ishikawa, J., Yoshimura, M., Yokota, T., Okajima, Y., Ogawa, M., Kanakura, Y., Tomiyama, Y., and Matsuzawa, Y. Effect of the interaction between fibronectin and VLA-4 on the proliferation of human B cells, especially a novel human B-cell line, OPM3. *Brit. J. Haematol.*, 103:804-812, 1998.

11. Yoshimura, M., Ihara, Y., Nishiura, T., Okajima, Y., Ogawa, M., Yoshida, H., Suzuki, M., Yamamura, K., Kanakura, Y., Matsuzawa, Y., and Taniguchi, N. Bisecting GlcNAc structure is implicated in suppression of stroma-dependent haemopoiesis in transgenic mice expressing N-acetylglucosaminyltransferase III. *Biochem. J.*, 331: 733-742, 1998.

12. Mizuki, M., Ueda, S., Tagawa, S., Shibayama, H., Nishimori, Y., Shibano, M., Asada, H., Tanaka, M., Nagata, S., Koudera, U., Suzuki, K., Machii, T., Ohsawa, M., Aozasa, K., Kitani, T., and Kanakura, Y. Natural killer cell-derived large granular lymphocyte lymphoma of lung developed in a patient with hypersensitivity to mosquito bites and reactivated Epstein-Barr virus infection. *Am. J. Hematol.*, 59: 309-315, 1998

13. Nojima, J., Suehisa, E., Kuratsune, H., Machii, T., Toku, M., Tada, H., Yamaguti, K., Koike, T., Kanakura, Y., Kitani, T., and Amino, N. High prevalence of thrombocytopenia in SLE patients with a high level of anticardiolipin antibodies combined with lupus anticoagulant. *Am. J. Hematol.*, 58: 55-60, 1998.

14. Matsumura, I., Kitamura, T., Wakao, H., Tanaka, H., Hashimoto, K., Albanese, C., Downward, J., Pestell, R.G., and Kanakura, Y. Transcriptional regulation of cyclin D1 promoter by STAT5: its involvement in cytokine-dependent growth of hematopoietic cells. *EMBO J.*, 18:1367-1377, 1999.

15. Oritani, K., Tomiyama, Y., Kincade, P. W., Aoyama, K., Yokota, T., Matsumura, I., Kanakura, Y., Nakajima, K., Hirano, T., Matsuzawa, Y. Both Stat3-activation and Stat3-independent BCL2 downregulation are important for interleukin-6-induced apoptosis of 1A9-M cells. *Blood*, 93:1346-1354, 1999.

16. Tsujimura, T., Hashimoto, K., Kitayama, H., Ikeda, H., Sugahara, H., Matsumura, I., Kaisho, T., Terada, N., Kitamura, Y., Kanakura, Y. Activating mutation in the catalytic domain of c-kit elicits hematopoietic transformation by receptor self-association not at the ligand-induced dimerization site. *Blood*, 93 :1319-1329, 1999.

17. Matsumura, I. and Kanakura, Y.

Functional roles of TPO-c-mpl system in essential thrombocythemia (a review). *Leukemia Lymphoma*, 32:351-358, 1999.

和文

1. 金倉 謙 : c-kit受容体変異と疾患。最新医学 53:166-171, 1998

2. 金倉 謙 : 造血幹細胞の性状。日本内科学会雑誌 87:3-8, 1998

3. 金倉 謙 : 骨髄異形成症候群の治療法／その2。臨床科学 34:1094-1095, 1998

4. 金倉 謙、北山 等、池田弘和、松村 到 : 癌遺伝子とシグナル伝達 SCFとc-kit。現代医療 30:63-67, 1998

5. 金倉 謙、北山 等、池田弘和 : 幹細胞増殖因子受容体c-kitの活性化変異と造血器腫瘍。腫瘍マーカー研究会誌 13:19-20, 1998

6. 金倉 謙、西村純一、池田弘和、松村 到 : 血液疾患の遺伝子学。最新医学 53:134-146, 1998

7. 倉恒弘彦、金倉 謙 : 自己免疫性溶血性貧血(AIHA)。今月の治療 6:26-28, 1998

8. 水木満佐央、金倉 謙 : 小型非切れ込み細胞、非Burkitt型悪性リンパ腫。日本臨床別冊 領域別症候群シリーズ No. 22, p173-p176, 1998

9. 池田弘和、金倉 謙 : c-kitレセプター。臨床免疫 30:38-44, 1998

10. 西村純一、金倉 謙：PNH（発作性夜間血色素尿症）－GPIアンカー型蛋白質の異常と発作性夜間血色素尿症－。医学のあゆみ 187:1031-1036, 1998

11. 北山 等、金倉 謙：癌治療の最新医療情報（11）－悪性リンパ腫－ Practical Oncology 11:20-22, 1998

2. 学会発表

1. Nishimura, J., Phillips, K.L., Ware, R.E., Hall, S., Howard, T.A., Wilson, L., Gentry, T.L., Shibano, M., Machii, T., Kitani, T., Kanakura, Y., Takeda, J., Gilboa, E., Kinoshita, T., Rosse, W.F., and Smith, C.A. Efficient retrovirus-mediated PIG-A gene transfer and stable restoration of GPI-AP expression in cells with PNH phenotype (oral). ISH-EHA Combined Haematology Congress, Amsterdam, Netherlands, July 4-8, 1998

2. Kanakura, Y. Constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase in hematological malignancy (oral). 5th Sino-Japan Joint Symposium on Hematology, Yichang, China, October 28, 1998

3. Nishimura, J., Phillips, K.L., Ware, R.E., Hall, S., Howard, T.A., Wilson, L., Gentry, T.L., Shibano, M., Machii, T., Kanakura, Y., Takeda, J., Gilboa, E., Rosse, W.F., and Kinoshita, T. Efficient retrovirus-mediated PIG-A gene transfer and stable restoration of GPI-AP expression in cells with PNH phenotype (poster). The 40th ASH meeting, Miami Beach, Florida, December 4-8, 1998

4. Ikeda, H., Tsujimura, T., Hashimoto, K., Kitayama, H., Sugahara, H., Matsumura, I., Machii, T., Kitamura, Y., and Kanakura, Y. Constitutively activating mutations in the catalytic domain of c-kit receptor tyrosine kinase mediates oncogenic signaling by receptor self-association not at the extracellular domain. The 40th ASH meeting, Miami Beach, Florida, December 4-8, 1998

5. Matsumura, I., Kitamura, T., Albanesce, C., Pestell, R.G., and Kanakura, Y. STAT5 mediates cytokine-dependent growth through transcriptional regulation of cyclin D1. The 40th ASH meeting, Miami Beach, Florida, December 4-8, 1998

6. 松村 到、金倉 謙：造血におけるシグナル伝達とその破綻。日本血液学会総会、シンポジウム、1998

7. 西村純一、竹田潤二、芝野 賢、待井隆志、金倉 謙、木下タロウ：レトロウイルスベクターを用いたPIG-A遺伝子のPNH型細胞への導入によるGPI-AP型蛋白質発現の回復。日本血液学会総会、ワークショップ、1998

8. 岡島 裕、松村 到、西浦哲雄、若尾宏、金倉 謙、富山佳昭、松沢佑次：ヒト赤白血病株F-36PにおけるEPO依存性増殖に対するInsulin-like Growth Factor-Iの協調作用。日本血液学会総会、ワークショップ、1998

9. 水木満佐央、巽 英二、田川進一、平井 学、待井隆志、金倉 謙：CD4+CD8+double positive T-ALL/LBLにおける

CD8 subunitsの解析。日本血液学会総会、ポスター、1998

10. 山口充洋、待井隆志、芝野 賢、金倉 謙、谷脇雅史、神林裕行、松田信：慢性多クローン性Bリンパ球増多症 (Hairy B-cell lymphoproliferative disorder) におけるB cell cloneの検出。日本血液学会総会、ポスター、1998

11. 横田貴史、織谷健司、三井秀紀、青山圭介、石河 淳、菅原浩之、松村 到、富山佳昭、金倉 謙、松沢佑次：Integrin/Fibronectin系による造血幹細胞増殖促進作用。日本血液学会総会、ポスター、1998

12. 田川進一、橋本幸蔵、平井 学、日吉基文、巽 典之、水木満佐央、金倉 謙：LGL白血病とテロメラーゼ活性。日本血液学会総会、ポスター、1998

13. 橋本光司、辻村 亮、金倉 謙、北村幸彦：c-kitレセプター・チロシンキナーゼの構成的な活性化機構—チロシン719の重要性—。日本血液学会総会、ポスター、1998

14. 織谷健司、横田貴史、青山圭介、松村 到、金倉 謙、富山佳昭、松沢佑次：Bリンパ球に対するMatrix glycoprotein SC1/ECM2の増殖促進作用。日本血液学会総会、ポスター、1998

15. 西村純一、木下タロウ、竹田潤二、芝野 賢、待井隆志、金倉 謙：レトロウイルスベクターを用いたPIG-A遺伝子のPNH型細胞への導入によるGPI型蛋白発現の回復。日本内科学会総会、ポスタ

ー、1998

16. 西村純一、竹田潤二、芝野 賢、待井隆志、金倉 謙、木下タロウ：レトロウイルスベクターによるDAF/CD59欠損細胞の治療。補体シンポジウム、口演、1998

17. 松村 到、金倉 謙：サイトカインによる分化増殖制御シグナル。臨床血液学会総会、シンポジウム、1998

18. 高井恵美、山口充洋、水木満佐央、山口浩二、西村純一、柴山浩彦、待井隆志、金倉 謙：Deoxycorformycin治療後、高度のCD4+T細胞減少を来たし、large cell leukemiaを合併、Righter症候群様の転化が疑われたhairy cell leukemia。臨床血液学会総会、ポスター、1998

19. 松村 到、金倉 謙：STAT5を介する細胞増殖機構の解析。血液幹細胞シンポジウム、口演、1998

20. 松村 到、池田弘和、北山 等、金倉 謙：トロンボポエチンによる増殖・分化誘導機構の解析。日本癌学会総会、ポスター、1998

21. 金倉 謙：造血幹細胞とTPO/c-mplシステム。日本血栓止血学会学術集会、セミナー、1998

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅱ 平成10年度年次分担報告

分担研究者 北村 幸彦

大阪大学医学部病理学講座

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
分担研究報告書

造血器腫瘍の病理・病態解析

一家族性に生じたc-kit癌原遺伝子の機能獲得性突然変異一

分担研究者 北村 幸彦 大阪大学医学部病理学講座 教授

研究要旨

c-kit癌原遺伝子の傍細胞膜領域で機能獲得性突然変異が胚細胞性におこった家系を発見した。この家系中のc-kit突然変異を持つ構成員では消化管ストローマ細胞腫瘍が多発したが白血病の発症はみなかった。

A. 研究目的

c-kit癌原遺伝子は造血幹細胞の増殖・分化に必要であり、c-kitの機能喪失性突然変異遺伝子を2個持つマウスの造血幹細胞は、脾臓に肉眼的造血細胞コロニーを形成できない。一方c-kitの機能獲得性はマスト細胞とカハール介在細胞の腫瘍をひきおこす。もしマスト細胞腫瘍あるいはカハール介在細胞の腫瘍である消化管ストローマ細胞腫瘍(Gastrointestinal stromal tumor GIST)が遺伝的に発生する家系がみつかるなら、ヒトにおけるc-kit遺伝子の機能獲得性突然変異の生物学的意義に新しい知見を加えると考え、そのような家系の検索を行った。

B. 研究方法

c-kitの機能獲得性突然変異はそのおこる部位により2種類の異なる腫瘍をひきおこす。チロシンキナーゼ領域の突然変異はマスト細胞腫瘍を、傍細胞膜領域の突然変異はGISTをひきおこす。このうちマスト細胞腫瘍の方はきわめて稀で、1年に検索できる患者は数名以下であり、当然家族性の発生例を短期間でみつけることができない。それに反してGISTはか

なり頻繁にみられる腫瘍であり、大阪で1年に検索しうる患者は100例をこえる。そこでGISTに焦点をしばって考えることにした。c-kitの機能獲得性突然変異が胚細胞性におこったとすると、すべてのカハール介在細胞でこの突然変異が存在するわけだから、当然GISTは多発するであろう。さらに多発性GISTが同一家系内で常染色体性且つ優性にみられることになるはずである。そのような家系で発生したGISTおよび家系の構成員から採取した白血球のc-kit遺伝子について分子生物学的検索を行うことにした。

C. 研究結果

幸運にもGISTを多発する60才の女性を発見した。この女性は2回にわたり腸閉塞をおこし外科手術をうけているが、手術時にGISTの多発がみつかったものである。この女性の家系調査を行うと父と兄が腸閉塞で死亡していた。また甥の一人も腸閉塞をおこして手術され、手術時に多発性GISTが発見されている。さらに姪の一人は多発したGISTの1つの腹腔内播種により死亡

した。

次に60才女性とその甥の手術時に採取したGISTのパラフィンブロックから、DNAを抽出し、c-kitの傍細胞膜領域をコードしているエクソン11の塩基配列を決定すると、2個連続して存在するバリンをコードするコドン（コドン559と560, GTTGTT）のうち一方のコドンが欠失していた。また60才女性とGISTをもつ甥、さらにその甥の娘の一人の白血球のc-kitではやはり同じバリンの欠失がみられたが、他のGISTを持たない家系の構成員から得た白血球にはこの異常はみられなかった。

傍細胞領域のバリンを欠失させたc-kitのcDNAをヒトの293T細胞にトランスフェクションすると、発現したc-kitレセプターチロシンキナーゼでは、リガンドであるstem cell factor (SCF)が存在しなくてもチロシンのリン酸化とキナーゼの活性化がみとめられた。さらに変異c-kitの生物活性をしらべるため、変異c-kitのcDNAをIL-3依存性のVa/F3細胞株に導入した。変異c-kitを発現しているVa/F3細胞はSCFとIL-3が存在しなくても自律的に増殖し、ヌードマウスに移植すると腫瘍を形成して宿主をたおした。

D. 考察

c-kitの傍細胞領域の機能獲得性突然変異が胚細胞性におこるとGISTが家族性に多発した。しかし今回しらべた家系中に白血病の発生はみとめられなかった。文献的に検索するとアメリカで家族性にGISTが多発し、GISTを持つ患者では良性のマスト細胞腫瘍である色素性蕁麻疹がみられ、中には色素性蕁麻疹から悪性のマスト細胞増殖症に進

展した家系が記載されている。この家系もでc-kitの機能獲得性突然変異が胚細胞性におこっているのではないかと考えられる。しかもGISTとマスト細胞腫瘍の両方がみられるところから、c-kitのどのような突然変異なのか興味もたれる。

E. 結論

我々はc-kitの傍細胞膜領域に機能獲得性突然変異を持つ家系を発見した。この家系ではGISTは多発したが白血病の発生はみられなかった。

F. 研究発表

1. Hirota, S., Isozaki, K., Moriyama, Y., Hashimoto, K., Nishida, T., Ishiguro, S., Kawano, K., Hanada, M., Kurata, A., Takeda, M., Tunio, G.M., Matsuzawa, Y., Kanakura, Y., Shinomura, Y., and Kitamura, Y. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science*, 279:577-580, 1998.
2. Nishida, T., Hirota, S., Taniguchi, M., Hashimoto, K., Isozaki, K., Nakamura, H., Kanakura, Y., Tanaka, T., Takebayashi, A., Matsuda, H., and Kitamura, Y. Familial gastrointestinal stromal tumors with germ line mutation of KIT. *Nature Genet.*, 19: 323-324, 1998.
3. Ito, A., Morii, E., Maeyama, E., Jippo, T., Kim, D.K., Lee, Y.M., Ogihara, H., Hashimoto, K., Kitamura, Y., and Nojima, H. Systematic method to obtain novel genes that are regulated by mi transcription factor (MITF): impaired expression of granzyme B and tryptophan

- hydroxylase in mi/mi cultured mast cells. *Blood*, 91:3210-3221, 1998.
4. Tachibana, K., Hirota, S., Iizaka, H., Yoshida, H., Kawabata, K., Kataoka, Y., Kitamura, Y., Matsushima, K., Yoshida, N., Nishikawa, S.I., Kishimoto, T., and Nagasawa, T. A chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature*, 393:591-594, 1998.
 5. Sato, M., Morii, E., Komori, T., Kawahata, H., Suigimoto, M., Terai, K., Shimizu, H., Yasui, T., Ogihara, H., Yasui, N., Oshi, T., Kitamura, Y., Ito, Y., and Nomura, S. Transcriptional regulation of osteopontin gene in vivo by PEBP2aA/CBAF, and ETS1 in the skeletal tissues. *Oncogene*, 17:1517-1525, 1998.
 6. Tsukamoto, Y., Kuwabara, K., Hirota, S., Kawano, K., Yoshikawa, K., Ozawa, K., Kobayashi, T., Yanagi, H., Stern, D.M., Toyama, M., Kitamura, Y., and Ogawa, S. Expression of 150KDa oxygen-regulated protein (ORP150) in human breast cancer. *Lab Invest.*, 78:699-706, 1998.
 7. Kim, D.K., Morii, E., Ogihara, H., Hashimoto, K., Oritani, K., Lee, Y.M., Jippo, T., Adachi, S., Kanakura, Y., and Kitamura, Y. Impaired expression of integrin alpha-4 subunit in cultured mast cells derived from mutant mice of mi/mi genotype. *Blood*, 92:1973-1980, 1998.
 8. Lee, Y.M., Jippo, T., Kim, D.K., Katsu, Y., Tsujino, K., Morii, E., Kim, H.M., Nawa, T., and Kitamura, Y. Alteration of protease expression phenotype of mouse peritoneal mast cells by changing the microenvironment demonstrated by in situ hybridization histochemistry. *Am. J. Pathol.*, 153:931-936, 1998.
 9. Berin, M.C., Kiliann, A.J., Yang, P.C., Groot, J.A., Kitamura, Y., and Perdue, M.H. The influence of mast cells on pathways of transepithelial antigen transport in rat intestine. *J. Immunol.*, 161:2561-2566, 1998.
 10. Nakahara, M., Isozaki, K., Hirota, S., Miyagawa, J., Hase-Sawada, N., Taniguchi, M., Nishida, T., Nakayama, S., Kitamura, Y., Shinomura, Y., and Matsuda, Y. A novel gain-of-function mutation of c-kit in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology*, 115:1090-1095, 1998.
 11. Ito, A., Morii, E., Kim, D.K., Kataoka, T.R., Jippo, T., Maeyama, K., Nojima, H., and Kitamura, Y. Inhibitory effect of the transcription factor encoded by the mi mutant allele in cultured mast cells of mice. *Blood*, 93:1189-1196, 1999.
 12. Tsujimura, T., Hashimoto, K., Kitayama, H., Ikeda, H., Sugahara, H., Matsumura, I., Kaisho, T., Terada, N., Kitamura, Y., and Kanakura, Y. Activating mutation in the catalytic domain of c-kit elicits hematopoietic transformation by receptor self-association not at the ligand-induced dimerization site. *Blood*, 93:1319-1329, 1999.

13. Jippo T, Lee YM, Katsu Y, Tsujino K, Morii, E., Kim, D.K., and Kitamura, Y.
Deficient transcription of mouse mast cell protease 4 gene in mutant mice of mi/mi genotype. *Blood*, 93:1942-1950, 1999.

14. Ogihara, H., Kanno, T., Morii, E., Kim, D.K., Lee, Y.M., Sato, M., Kim, W.Y., Nomura, S., Ito, Y., and Kitamura, Y.
Synergy of PEB2/CBF with mi transcription factor (MITF) for transcription of mouse mast cell protease 6 gene. *Oncogene*, in press.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Ⅲ 平成10年度年次分担報告

分担研究者 竹田 潤二

大阪大学医学部環境医学講座

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
分担研究報告書

トランスジェニックマウス、ターゲティングマウスなどの疾患モデルマウスの作成
—血液系だけで遺伝子欠損がみられる疾患モデルマウスの樹立—

分担研究者 竹田 潤二 大阪大学医学部環境医学講座 教授

研究要旨

多くの遺伝子はノックアウトした結果、胎生致死であることが判明し、血液系で遺伝子機能を解析するためには血液系だけで遺伝子を破壊するシステムを開発する必要がある。今年、そのシステムを構築するため血液幹細胞の疾患であるPNHのモデルマウスを作製した。まず、PNHの原因遺伝子であるPIG-AをloxP配列で挟みこんだマウスと、Creリコンビネースを胎生初期より発現しているマウスを交配した。そのマウスは致死だったので、胎仔より肝細胞を取り出し、致死量照射したレシピエントマウスに移入した。この手法で血液系だけで遺伝子破壊が起きたマウスの構築することに成功した。このシステムは、一般化できると考えられるので、今後致死性が認められる遺伝子の機能解析に非常に有効であると考えられる。

A. 研究目的

胚性幹細胞（ES細胞）を利用し遺伝子破壊マウスを作製する技術は、生体内で遺伝子機能を解析できるシステムとして1990年代になり汎用されている。しかし、従来の遺伝子破壊法で生命現象に不可欠な遺伝子の欠損個体を作製すると、致死が表現型として観察されることが多く、生体内での遺伝子機能の検討が不可能である例が散見されるようになった。Cre/loxPシステムを利用したコンディショナルジーンノックアウトは、組織特異的な遺伝子破壊が達成できる手法として注目を浴びている。標的シーケンス（loxP）を認識するCreリコンビネース発現法は、Cre transgenic mouseを利用した内在性に発現させる方法が考えられるが、血液系特異的に遺伝子破壊を達成するためには血液幹細胞特異的プロモーターが必要

になる。血液幹細胞特異的プロモーターが報告されていない現在、血液系特異的な遺伝子破壊は単純な交配では達成できない。そこで本研究では、Creリコンビネースを発生初期から発現させ、その後、Creリコンビネースを発現したマウスの胎仔肝細胞を致死量の放射線照射した別のマウスに移入し、血液系特異的な遺伝子破壊をすることを目的とした。

B. 研究方法

標的シーケンスloxPをもつ遺伝子は、X染色体上に存在するPig-a遺伝子を選択し、マウスを樹立した(Pig-afox)。Pig-a遺伝子はGPI-アンカー型膜蛋白質の生合成に関与しているので、その欠損により膜表面のGPI-アンカー型膜蛋白質が発現不全に陥るので簡単