

造血クローン性解析のための新規
methylation-specific PCR for the human
androgen-receptor gene (HUMARA-MSP)
法の開発

村手 隆 (名古屋大学医学部保健学科)
木下 朝博、浅野 治彦、青木恵津子
(名古屋大学医学部第一内科)
内田 俊樹 (名古屋第2日本赤十字病院)
大橋 春彦 (国立名古屋病院)

[はじめに]

ヒトアンドロジェンレセプター遺伝子 (HUMARA) はX染色体に存在し、第一エクソンに多型性 (polymorphism) のある CAG の繰り返し配列 (STR) が存在する。また HUMARA 遺伝子の5' 側プロモーター領域には多くの CpG 配列、CpG islands が存在する¹⁾。この polymorphic STR 近くの HpaII 及び HhaI site のメチル化はX染色体の不活化と相関することが、これまでに明らかにされている²⁾。この性質により、父方及び母方由来のX染色体のメチル化パターンを同定することが可能で³⁾、PCR を利用した HUMARA assay が開発されてきた。この HUMARA assay はメチル化感受性酵素により遺伝子の活性化 (非メチル化)、不活化 (メチル化) を鑑別するものであるが、一方シトシンの bisulfate による化学的修飾も非メチル化、メチル化を鑑別するのに有効である⁴⁾。sodium bisulfate により非メチル化シトシンはウラシルに変換されるが、メチル化シトシンは影響されないため、この二つの領域でシーケンスに差異が出来る。このメチル化、非メチル化それぞれに特異的なプライマーを用いた PCR 増幅により、この STR の数に多型のある父方、母方由来のアレルのメチル化を識別できることが予想される^{5,6)}。今回我々は骨髄異形成症候群をはじめとする造血障害のクローン性解析の応用をめざして、methylation-specific PCR for the human androgen-receptor gene (HUMARA-MSP) 法を開発した⁷⁾。

[対象と方法]

対象：11例の健康女性、5例の女性 MDS 患者及び1例の再生不良性貧血患者より骨髄ないし末梢血を本人の同意のもと採取した。多核白血球、単核球およびTリンパ球を分画し DNA を抽出した。DNA は HhaI により消化後、polymorphic CAG repeats 近くの各々のプライマーにて増幅後、11% polyacrylamide gel にて電気泳動し、エチジウムブロマイドにて染色し、写真撮影した。

方法：DNA の sodium bisulfate による化学修飾は CpG Genome DNA Modification Kit (Intergen) を用いた。センスプライマー (Us2 and Ms2) はX染色体不活化と DNA メチル化が相関する2つの HhaI site と1つの HpaII site に一致した箇所を設定した (図1及び表1)。アンチセンスプライマーは CpG のない部分から作成した。95度、5分間熱変性してから PCR を hot start にて開始した。HUMARA-MSP 法の半定量性の検討には2つの異なったクローン性を示す EB virus で不死化させた lymphoblastoid cell line DNA を用いた。p15INK4B のメチル化の状態は Herman ら⁸⁾、Quesnel ら⁹⁾の方法によって行った。

[結果と考察]

図1b に本測定系で予測される結果の模式図を示す。従来の HUMARA 法での問題点は、メチル化感受性酵素での消化が不完全の場合解釈が困難となること、メチル化の程度の定量性には使えないことであった。新しい HUMARA-MSP 法では非メチル化プライマー (U primer) による PCR product はメチル化プライマーによる PCR product とは異なった位置にバンドとして認められるので、単クローン性を示す検体の場合は、図1b に示すようにはっきりとしたパターンの差異として認識される。HUMARA 法の定量性の欠如という点についても、異なったクローン性を示す DNA を混合し、そのサンプルで HUMARA-MSP を行い一定の定量性を証明した。非修飾 DNA では U primer 及び M-primer とも PCR がかからないことより、DNA の不完全な bisulfate 修飾 がデータに影響する可能性も否定された。

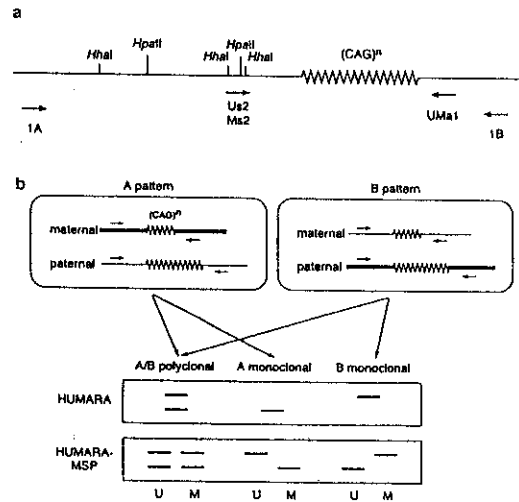


図1 (a) ヒトアンドロゲンレセプターの第一エクソンの polymorphic CAG repeat を含む部位の模式図 と (b) HUMARA ならびに HUMARA-MSP assay での典型的結果
 父方および母方由来のX 染色体のCAG repeat を波線で示し、活性化されている側のX 染色体を細い線で、メチル化により不活化されているX 染色体を太い線で示す。U は非メチル化 DNA に特異的なプライマー、M はメチル化 DNA に特異的なプライマーを示す。

表1 PCR プライマーと PCR の条件

Assay	Primer set	Primer sequences	PCR condition				
			Denature	Annealing	Extension	Cycle	5% DMSO
HUMARA-MSP	U Us2	GGTGTGTGAGTGTAGTATTTTTGGT	95°C, 45 s	55°C, 45 s	72°C, 1 min	40	(-)
	M Ms2	TAAAAAAAACCATCCTCACC	95°C, 45 s	55°C, 45 s	72°C, 1 min	40	(-)
semi-nested HUMARA-MSP	U Us1	TTAGAATTGTTTGTAGAGTGTGT	95°C, 45 s	55°C, 45 s	72°C, 1 min	35	(-)
	M Ms1	TTGTGTTAGAGCGTGGC	95°C, 45 s	55°C, 45 s	72°C, 1 min	35	(-)
HUMARA	U Us1	TTAGAATTGTTTGTAGAGTGTGT	95°C, 45 s	55°C, 45 s	72°C, 1 min	35	(-)
	M Ms1	TTGTGTTAGAGCGTGGC	95°C, 45 s	55°C, 45 s	72°C, 1 min	35	(-)
	1A	TAGGTGGAAGATTCAGCCAAGC	94°C, 30 s	55°C, 30 s	72°C, 30 s	35	(-)
	1B	TGTGAAGGTGCTGTTCCCTC	95°C, 45 s	60°C, 45 s	72°C, 1 min	40	(+)
p15-MSP	U p15Ua	TGTGATGTGTTGATTTGTTGGT	95°C, 45 s	60°C, 45 s	72°C, 1 min	40	(+)
	M p15Ma	CGTATCAATAACCGAACCAGCA	95°C, 45 s	60°C, 45 s	72°C, 1 min	40	(+)

(-) and (+) in 5% DMSO column denote exclusion and inclusion of 5% DMSO in PCR buffers, respectively.

そのほかの HUMARA-MSP 法の利点としては、従来の HUMARA 法よりも少ないサンプルではっきりとしたバンドを検出できること、HUMARA 法はメチル化制限酵素の制限酵素部位に依存しているが、MSP 法は制限酵素部位には制限されず、他の遺伝子にも同様の応用が可能であることなどである。実際に我々は MDS 患者について HUMARA-MSP 法のほか、ガン抑制遺伝子 p15 遺伝子についても p15-MSP を行い、クローン性と p15 の不活化を同時評価して臨床病態の変化の評価に有用であることを経験している。以上述べた如く HUMARA-MSP assay はその単純性、高感度及び広い応用性によりきわめて有用と考えられ

た。

[文献]

1. Kuiper GGJM, et al, J Mol Endocrinol 2, 1-4, 1989
2. Edwards A, et al, Genomics 12, 241-253, 1989
3. Allen RC, et al, Am J Hum Genet 51, 1229-1239, 1992
4. Wang RYH, et al, Nucleic Acids Res 8, 4774-4790, 1980
5. Clark SJ, et al, Nucleic Acids Res 22, 2990-2997, 1994
6. Herman JG, et al, Proc Natl Acad Sci USA 93, 9821-9826, 1996
7. Uchida T, et al, Leukemia 14, 207-211, 2000

再生不良性貧血患者における Th1/Th2 バランス異常の検討

寺村 正尚、岩部 弘治、溝口 秀昭

(東京女子医科大学血液内科)

[はじめに]

ヘルパーT細胞は産生するサイトカインの種類により、I型ヘルパーT (Th1) 細胞とII型ヘルパーT (Th2) 細胞に大別される。Th1優位の免疫応答は細胞性免疫を増強し、Th2優位の免疫応答は液性免疫を増強する^{1,2)}。最近、自己免疫疾患の発症、病態にTh1とTh2のバランスの異常が関与していることが明らかになってきた。例えば、I型糖尿病、慢性関節リウマチなどの臓器特異的自己免疫疾患ではTh1優位のバランスが、SLEなどの全身性自己免疫疾患ではTh2優位のバランスが、その発症に大きく関与していることが明らかにされている。そこで、今回、自己免疫学的機序が主な病因と考えられる再生不良性貧血においてTh1/Th2 バランスの異常が存在するかについて検討した。

[対象と方法]

1. 対象

健常人13例および再生不良性貧血患者13例。健常人については問診にて感染症、アレルギー疾患の合併のないことを確認した例について検討した。検討時に同時採血した血液にて、肝機能障害、腎機能障害、高 γ グロブリン血症を認めないこと、血球数、CRP、IgE がいずれも正常であることを確認した。

再生不良性貧血患者については治療前の症例あるいは治療歴があってもその影響がないと考えられる症例を対象とした。

2. Th1、Th2 細胞の測定

FASTIMUNE サイトカインシステムを用いた。全血に brefeldin 存在下でPMA、ionomycinを添加し培養後、PerCP 標識抗 CD4 抗体、FITC 標識抗 IFN- γ 抗体、PE 標識抗 IL-4 抗体を添加し、フロ

ーサイトメトリーを用いて解析した。CD4 陽性細胞で IFN- γ 産生細胞を Th1 細胞、IL-4 産生細胞を Th2 細胞とした。

[結果]

1. 健常人 (コントロール) 13例の末梢血液中のTh1細胞は $20.62\% \pm 4.87$ (mean \pm SD ; range 14.17% - 33.09%)、Th2細胞は、 $2.93 \pm 0.81\%$ (mean \pm SD ; range 1.71% - 4.56%)、Th1/Th2は 7.63 ± 2.95 (mean \pm SD ; range 3.72 - 14.44) であった。

2. 再生不良性貧血患者13例の末梢血液中のTh1細胞は、 $21.49 \pm 14.93\%$ (mean \pm SD ; range 4.67% - 49.05%)、Th2細胞は、 $1.99 \pm 0.97\%$ (mean \pm SD ; range 0.13% - 3.31%)、Th1/Th2は 13.18 ± 9.30 (mean \pm SD ; range 5.69 - 35.92) であった。再生不良性貧血患者では健常人に比しTh2の有意な低下およびTh1/Th2の有意な上昇を認めた。健常人を基準とすると再生不良性貧血患者では、Th1の増加が3例に、Th2の低下が6例に、Th1/Th2の上昇が5例に認められた。健常人および再生不良性貧血患者のTh1、Th2の割合、Th1/Th2比を図に示す。

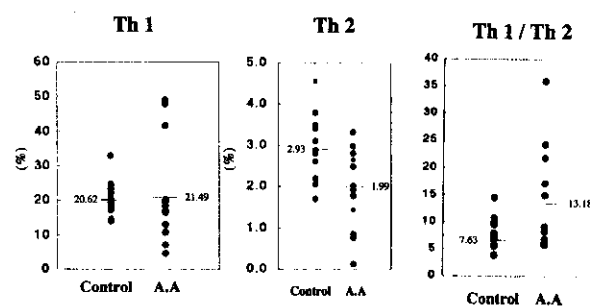


図 再生不良性貧血患者の Th1、Th2、Th1/Th2
Control : 健常人
A.A : 再生不良性貧血

[考察]

再生不良性貧血患者では、Th2の比率が有意に低下しており、Th1/Th2バランスがTh1優位に偏っている症例がみられることが明らかになった。この結果は、本症の発症あるいは病態にTh1の優位性が関与していることを示唆するものと考えら

れる。また、今後、サイトカイン、あるいは抗サイトカイン抗体などの投与により、Th1/Th2バランスを制御することにより、再生不良性貧血の治療が可能である可能性も考えられる。

[結論]

再生不良性貧血患者では Th1/Th2バランスが Th1優位に偏っており、本症の発症や病態に関与していることが示唆される。

[文献]

1. Mosmann TR, et al, Ann Rev Immunol 7, 145, 1989
2. Abbas AK, et al, Nature 383, 787, 1996

新規赤血球特異的 RING フィンガー 蛋白 HERF1 の分子生物学的役割

木村 昭郎、原田 浩徳

(広島大学原爆放射能医学研究所

血液内科)

原田 結花 (広島大学医学部付属病院輸血部)

[はじめに]

AML1 遺伝子は21番染色体に局在し、白血病・骨髄異形成症候群に最も高頻度に関与する転写因子であり、造血幹細胞の発生・分化制御に深く関わっている。AML1 欠損マウスでは、卵黄嚢での一次(胚型赤血球)造血に異常を認めないが、AGM 領域・胎仔肝における二次(成体型)造血は完全に欠損している。すなわち、AML1 は二次造血の発生母体である AGM 領域での造血幹細胞の分化・増殖に必須の役割を担っているものと思われる。また、8;21 転座型白血病の AML1/ETO 融合遺伝子を導入したマウスでは胎仔肝において形態異常を示す多系統コロニー形成の増加や自己再生能力の増加した造血幹細胞を認めることから、融合遺伝子産物が初期の白血病化に働くものと示唆されている。AML1 によって転写調節を受けている遺伝子群(標的遺伝子)は、二次造血の造血幹細胞の分化・増殖に必須と考えられる。AML1 遺伝子の標的遺伝子は多く同定されてはいるものの、造血幹細胞に対して必要不可欠なものは不明である。AML1 遺伝子の標的遺伝子群を明らかにすることは AML1/ETO を含めた融合遺伝子産物等による白血病発症機構を解明する上でもきわめて重要である。今回我々は AML1 遺伝子の新規標的遺伝子として HERF1 (hematopoietic RING finger 1) をクローニングし、その生物学的役割について検討を行った²⁾。

[対象と方法]

1. AML1 の両方の対立遺伝子座とも欠損した(AML1^{-/-})マウス胚性幹(ES)細胞と野生型(WT)細胞をメチルセルロース下で7日間培養し、

embryoid bodies (EBs) に分化させ、RNA を回収した。WT-EBs をテスター、AML1^{-/-}-EBs をドライバーとして、Representational difference analysis (RDA) を行った。得られた断片を用い、マウス脾臓ライブラリーをスクリーニングしてHERF1遺伝子をクローニングした。

2. 胎生期・成体マウスならびに各種白血病細胞株での HERF1 の発現パターンを Northern Blot 法および In situ hybridization 法により検索した。

3. sense HERF1 または antisense HERF1 cDNA を組み込んだテトラサイクリン制御性発現システムをマウス赤白血病細胞株(MEL)に導入し、MEL細胞の分化に及ぼす影響を検討した。

4. GST 融合 HERF1 蛋白でウサギを免疫して、ポリクローナル抗体を得た。HERF1 蛋白の発現を Western Blot 法で解析した。

[結果]

1. WT-EBs は培養開始6日目までは一次造血のみからなっているが、7日目以降は二次造血に移行していった。一方、AML1^{-/-}-EBs では7日目以降でも二次造血細胞が認められなかった。そこで、7日目の EBs を用いて RDA を行い、完全長2.2kb の新規 cDNA、HERF1 をクローニングした。HERF1 蛋白は489アミノ酸より成り、N末端に RING finger ドメイン(R)、次いでB-box (B)、 α -herical coiled-coil ドメイン(C-C)そしてC末端に ret finger protein (RFP) ドメイン(R)を有する RING finger protein ファミリーのメンバーであった(図1)。4つの機能ドメインを有するサブファ

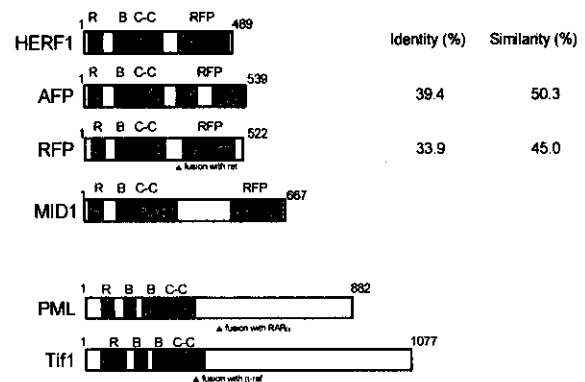


図1 HERF1と他のRING finger family蛋白の構造

ミラーとして、acid finger protein (AFP)、oncoprotein Ret とキメラ蛋白を形成するRFP、さらにその変異により Opitz/BBB 症候群を来すmidline 1 (MID1) がある。また RBCC ドメインを有するサブファミリーには、15;17転座型白血病にみられる RAR α とキメラ蛋白を成す PML、化学物質誘発肝癌において B-raf と融合する TIF1 α などがある。

2. HERF1 が発現する組織・細胞を検討した (図2)。成体において発現が認められたのは、造血組織である脾臓・骨髄のみであった。また、リンパ節・胸腺や末梢血には発現していなかった。胎仔期での発現は、二次造血が始まる胎生11日目に初めて見られ、以後増強していったが、AML1 欠損マウスやドミナントネガティブ変異体である AML1/ETO ノックインマウスでは、その発現は欠失していた。正常マウス胎仔 (胎生15日) の in situ hybridization でも、造血組織である胎仔肝に

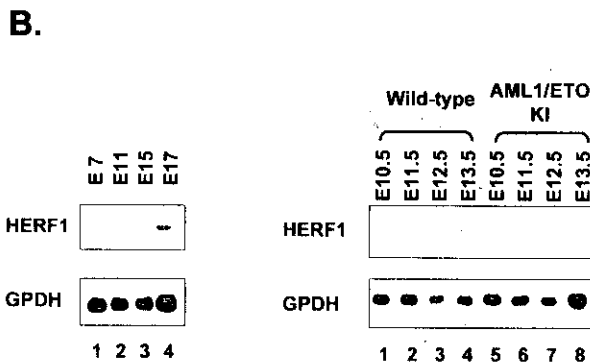
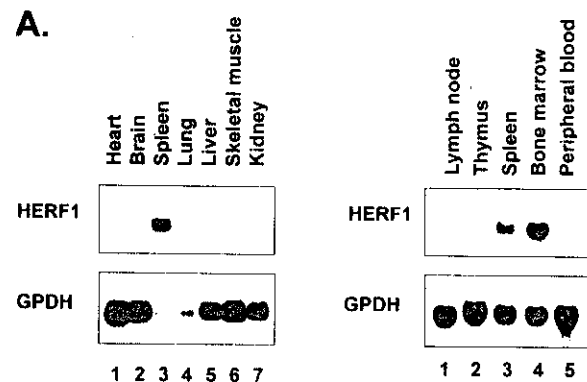


図2 マウス成体および胎児期におけるHERF1の発現様式

発現が限局していた。そこで、どの血球系に発現しているかをマウス白血病細胞株 (T細胞、B細胞、骨髄球、赤芽球、繊維芽細胞、肥満細胞) で検討したところ、唯一赤白血病細胞株 (MEL) のみに認められた。MEL 細胞は DMSO 刺激により分化し、 β -globin の発現が増強する。HERF1 も DMSO 刺激によって12時間後より発現が増加し、8日後には30倍にも達した。このことから HERF1 は赤芽球系の分化に関与していることが示唆された。

3. HERF1 の赤芽球分化における役割を検討するため、MEL 細胞に anti-sense および sense HERF1 の発現誘導系を作成した。この系において目的遺伝子は、テトラサイクリン (tet) 存在下では発現せず、非存在下で誘導される。まず anti-sense HERF1 誘導系では、tet 存在下での DMSO 刺激により β -globin の発現が増強する。一方 tet 非存在下では、anti-sense HERF1 が発現し、DMSO 刺激しても内在性 HERF1 が発現せず、 β -globin の発現も著明に抑制され、形態的にも分化は全く見られなかった (図3)。抗 HERF1 ポリクローナル抗

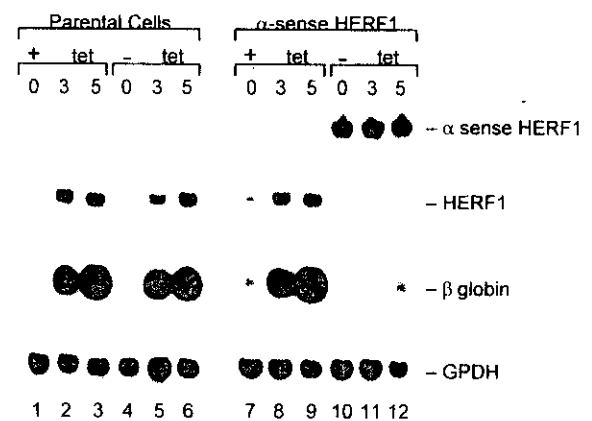


図3 antisense HERF1によるDMSO刺激MEL細胞の分化抑制

体を使った Western Blot 法でも内在性 HERF1 蛋白は検出できなかった。次に sense HERF1 誘導系では、tet 非存在下で HERF1 遺伝子および蛋白が発現し、 β -globin 発現が軽度増強した (図4)。形態的にも分化促進が見られ、ベンチジン陽性細胞も増加した。以上より HERF1 は赤芽球系の分化に必要な因子であると考えられる。

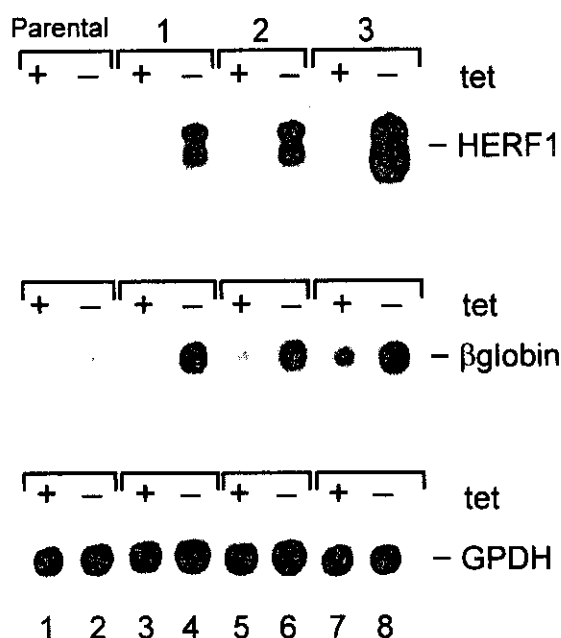


図4 HERF1の強制発現によるMEL細胞の分化促進

[考察・結論]

1. 赤血球特異的な新規遺伝子 HERF1 を同定した。HERF1 は赤血球の分化と共に発現が増強しており、その発現を抑制すると分化が阻害されることから、赤芽球系の分化に重要な働きをしていることが示唆された。現在のところ、どのような機序で赤血球分化を調節しているかは不明である。多

くの RING finger family が蛋白-蛋白相互作用を介して生物学的機能を表現するが、HERF1も RBCC ドメインのみならず蛋白結合能のある RFP ドメインをも有しており、その結合パートナーの同定が機能解析の一助となると考えられる。

2. 同じ RBCC-RFP ファミリーである MID1 の変異により Opitz 症候群 (過隔離症、尿道下裂、口唇裂や口蓋裂) を来することが知られている。また RFP, PML, TIF1 α はその融合蛋白により腫瘍発生を認める。これらのことから HERF1 遺伝子の変異等により赤血球系疾患を来す可能性が示唆される。今後、ヒト HERF1 を同定し、赤白血病、MDS、再生不良性貧血等の赤血球系疾患での変異等の検討が必要である。

3. AML1 の下流遺伝子として HERF1 をクローニングしたが、AML1 の直接標的遺伝子であるかどうかは不明である。今後 HERF1 のプロモーター・エンハンサー調節領域を解析することにより明らかにできると考えられる。

[参考文献]

1. Okuda T, et al, Cell 84, 321-330, 1996.
2. Harada H, et al, Biol 19, 3808-3815, 1999.

Ⅲ 不応性貧血

SCF による Fas-Fas-L 誘導アポトーシスの解除機構

澤田 賢一、西尾 充史、小泉 和輝
遠藤 知之、小池 隆夫

(北海道大学医学部、第二内科)

小田 淳、藤原 満博、池淵 研二

池田 久實 (北海道赤十字血液センター)

[はじめに]

ヒトの造血系では Fas/Fas リガンドシステムや、TNF- α 、IFN γ などの death domain を介したアポトーシスにより、造血調節がなされていることが知られており、この機構の破綻が各種の疾患を引き起こすことが考えられる。一方で stem cell factor (SCF) や erythropoietin (EPO) などの造血因子は血球の分化・増殖に働くとともに、その存在がアポトーシス回避に働くことが報告されている。我々はこれまで、SCF が骨髄異形成症候群 (MDS) 患者の芽球増殖に重要な役割を果たすことを報告してきた。今回、ヒト赤芽球系前駆細胞を用いて、Fas を介した細胞死の SCF による拮抗とその細胞内メカニズムについて検討した。

[対象と方法]

純化ヒト CD34+ 細胞を EPO、SCF 及び IL-3 とともに液体培養し、赤芽球系への分化・増殖誘導を行った。7日目に細胞を回収し CFU-E に相当する細胞を得た (Day7細胞)。コロニー形成法と液体培養には無血清培地を用い、免疫沈降・ゲル電気泳動・western blotting は既報 (BLOOD, 94 : 1568, 1999) のごとく行った。DNA 断片化は Cell Death Detection ELISATM™を用いた。Caspase 8 および Caspase 3 活性にはそれぞれ FLICE/Caspase-8 Colorimetric Protease Assay Kit と CPP32/Caspase 3 Colorimetric Protease Assay Kit (MBL, Nagoya) を用いた。

[結果]

1. SCF は生理的濃度で抗 Fas 抗体 (CH11) によ

る赤芽球コロニー形成抑制を濃度依存性に解除した (図1)。その効果は、生理的濃度の 1ng/mL から認められた。

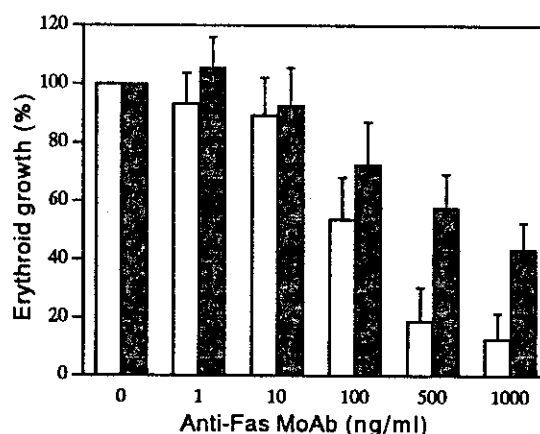


図1 Day7細胞の赤芽球コロニー形成におけるCH11の効果 (半固形培地: 7日間) □ CH11単独 ■ CH11+ SCF

2. SCF による CH11誘導コロニー形成抑制の解除が、SCF による細胞表面のFas (CD95) の down regulation によるものではないことを示すため、Day7細胞を EPO または EPO+SCF と6時間培養し、前後の表面形質を検討した。Fas の発現に変化を認めなかった。

3. SCF による CH11誘導赤芽球コロニー形成抑制の解除が apoptosis の抑制に起因すると推定して以下の検討を行った。CH11による DNA 断片化は時間依存性であり、培養6時間後から認められた。SCF はこの増加を部分的に抑制した。また、Caspase 8 と caspase3の活性上昇は培養4時間後から認められ、SCF による部分的抑制が認められた。

5. SCF による生存シグナルを検討するため種々の阻害剤を用いて検討した。その結果、Src family kinase の特異的拮抗剤 PP2によって、CH11によるコロニー形成能抑制に拮抗する SCF の効果が完全に抑制された。一方、PP2もしくはその非活性型 analog PP3は EPO もしくは EPO+SCF で誘導した赤芽球コロニー形成を抑制しなかった。非活性型 analog PP3にこの働きを認めなかった (図2)。PP2は SCF による CH11誘導 DNA 断片化の解除を完全に阻止した。

[考案・結論]

骨髓異形成症候群 (MDS) 患者の芽球増殖には SCF が中心的役割を果たし、無効造血には apoptosis が関与していると考えられるが、これらの現象を司る機序については不明である。今回、ヒト赤芽球系前駆細胞を用いて、Fas を介した細胞死とその SCF による拮抗メカニズムについて検討を進めた。今回の報告で、SCF は CH11 によって誘導されるアポトーシスを解除すること、さらにこの解除は細胞表面上の現象ではなく、Src family kinase を介する細胞内の情報伝達経路に依存していることを示した。本検討は、赤芽球系の造血において、Fas を介する細胞死のシグナルに対して、SCF が生存シグナルとして働いているとの新しい作用を示すものであるが、同時に、赤芽球系のみならず種々の細胞の造血制御に深く関わっている可能性を示唆すると考えられる。

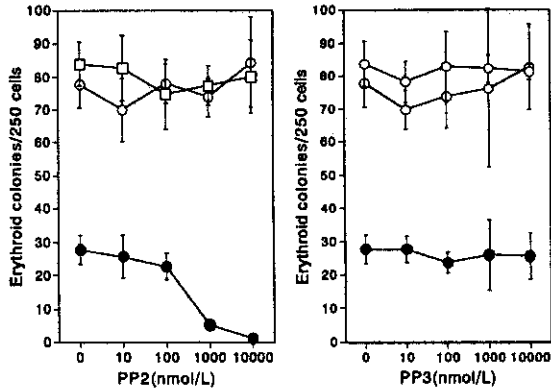


図2 CH11によるコロニー形成能抑制に拮抗するSCF に対するPP2・PP3の効果。EPO (○), EPO+100ng/ml SCF (□), EPO+SCF+CH11 (●)

6. Day7細胞を SCF を除いた EPO 含有無血清培地で12時間培養し、SCF/EPO による Src family kinase (Lyn) のリン酸化と enolase 活性を測定した。

SCF で処理12分後に enolase 活性の上昇を認めた (図3A)。SCF+EPO による enolase 活性の上昇はより顕著であった (図3B)。

[参考文献]

1. Oda A, Sawada K, Ikeda, Y, et al, Blood 92, 443-451, 1998
2. Haseyama, Y. Sawada K, Oda A, et al, Blood 94, 1568-1577, 1999



図3A Lyn kinase assay.

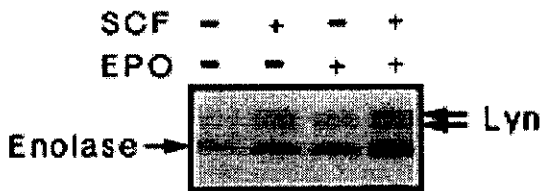


図3B Lyn kinase assay.

不応性貧血症例登録の再開のための 調査票の改訂

内山 卓、石川 隆之

(京都大学血液病態学)

通山 薫 (京都大学検査部)

【はじめに】

【不応性貧血分科会】では1984、1987、1989、1993、1997年と5次にわたり全国調査を行い、1002例の登録を得ることができた。これを用いて日本における骨髓異形成症候群の病態と予後に関する詳細な検討がなされ、白血病化と非白血病死亡のリスクファクターの検討、FAB分類を一部修正した独自の骨髓異形成症候群の診断基準の提唱、予後の観点より検討した狭義の不応性貧血の細分化の提案、長期生存例の検討等を報告してきた。比較的新しい疾患概念である骨髓異形成症候群がすみやかに臨床家に受け入れられるうえで全国調査とその報告の果たした役割は大きかったと推測される。

近年 International MDS Risk Analysis Workshop により骨髓異形成症候群患者の初診時所見から白血病化の危険性ならびに生存期間を予測する International Prognostic Scoring System (IPSS) が提唱された。平成6年の特発性造血障害調査班で小熊、吉田らが報告した生存および白血病化の危険度分類との最大の相違点は IPSS においては骨髓細胞の染色体異常を予後判定の重要な資料としている点にある。複雑型染色体異常を認める患者は予後が不良であることは同じく平成6年の特発性造血障害調査班で外山らも報告しており、染色体異常の有無だけでなく、核型別に score value を定め他の予後因子と組み合わせる IPSS の妥当性を日本人患者において検証することは有意義である。

その他不応性貧血の発症もしくは病態における免疫異常の関与や、重複癌等の併発症の頻度の調査、骨髓増殖性疾患や再生不良性貧血との接点の明確化、生存に関する危険度別に層別化された標

準的治療作成のための基礎資料の要望等、1984年に調査票を作成した時と比べより多彩な内容が求められるに至った。

このような状況を踏まえて、今回調査票の形式を現在の要望にあわせられるものに改訂し、新規発症例の集積を始める。

本年度においては調査票に残す項目と新たに加えるべき項目を吟味し、議論を経た上で新たな調査票の作成を行い、来年度の調査にそなえた。

【対象と方法】

1997年秋までに登録された不応性貧血患者102例のデータベースをもとに、継続する項目を選択し、新たに加えるべき項目の検討を行った。

【結果と考察】

1002例の調査票のうち半数以上で欠失値となっていた項目として、CFU-Mix、⁵¹Cr(T/2)、BFU-E、CFU-E、HbF、尿ムラミダーゼ、CFU-C、RCITR、PITR、⁵⁹Fe util.、血清ムラミダーゼ、PIDI、MPO (-) 好中球 (%) が挙げられる。これらは現在検査が困難もしくは本疾患における検査の重要性が低下したものと判断し、新規調査票から削除することとした。一方1997年度全国実態調査報告によれば生存に対する予後因子として性、フェリチン、末梢血芽球・前骨髓球・後骨髓球・好中球、好中球核異常、好中球顆粒異常、骨髓の赤芽球・芽球、小型巨核球が挙げられている。また今回新たに長期生存に関与する因子の検討を行い、血清LDH、血清ビタミンB12、NAPスコア、末梢血中の巨核球の出現も単変量ながら長期生存と相関の見られることを見出した。これらの項目は今後も残すべきと思われる。T-Bil、I-Bil、血清ハプトグロビンは予後との相関は明らかでないが、溶血の指標となり、病態把握に有用と考えられる。PAS陽性赤芽球の存在は当班の検討では生存に負の影響を与える因子であるが、1%以上陽性との回答は1002例中72例に過ぎず、陽性率を定量化することの意義に疑問がもたれ、PAS陽性赤芽球あり/なしと定性化するのみで十分と思われる。また末梢血液像では単球と未熟単球の項が、骨髓像で単球

型、単芽球、前単球の項があるが、実際の調査票で末梢血未熟単球の割合を0.1%以上記載されたものは21例、骨髓像で単芽球もしくは前単球の割合を0.1%以上記載されたものも97例に過ぎず、多くの調査票ではこれらをまとめて単球として報告しているものと推測される。標本の central review を行っていないため両者の客観的な鑑別ができないことを考えあわせてもこれらを分離して記載する意義は低い。骨髓像でのその他の項目は予後の推定には関与が認められず、病態把握の意義も乏しいため削除する。

一方新規に追加する必要がある項目としては IPSS の算定に必要な染色体に関する情報、および治療内容／治療の反応性に関するものが挙げられる。免疫異常、重複癌といった併発症や、他の悪性疾患等の既往歴の情報も必要であろう。

[結論]

今年度は来年度に行う実態調査の準備として調査票の見直しを行った。現在までに明らかにされたこと、今後明らかにしていくべき内容を念頭に、現在のニーズにあわせた形への変更が必要である。

[文献]

1. 吉田弥太郎他；1997年度不応性貧血全国調査. 平成9年報告書 29, 1998
2. Oguma S, et al, Leuk. Res. 19, 219, 1995.
3. Greenberg P, et al, Blood 89, 2079, 1997.

MDS 長期生存例の調査 (第一報)

通山 薫 (京都大学検査部)

内山 卓、石川 隆之

(京都大学血液病態学)

[はじめに]

骨髄異形成症候群 (MDS) は一般に生命予後不良の造血障害であるが、ときに長期生存例に遭遇する、もしくは何らかの治療が奏功して長期安定を得ることがある。これらの長期生存に関わる要因を明らかにする目的で、1997年秋までに本班に登録された1002例につきレトロスペクティブな調査・解析を開始した。今回いくつかの要因を提示するが、今後さらに検討を予定している。

[対象と方法]

1997年秋までに本班に登録された MDS 患者 1002例のデータベースをもとに、種々の条件を設定して長期生存に関連する項目の抽出を試み、項目によって有意差検定を行った。

[結果]

表1に要点をまとめた。5年 (1800日) を経た時点で生死が確認されているのは666例であるが、5年以上生存が確認されたのは129例 (19%) で、

表1 5年以上生存例と5年以内死亡例の比較

	5年以上生存例	5年以内死亡例
症例数	129例 (19%)	537例 (81%)
年齢中央値	52歳	63歳 (p=10 ⁻⁸)
性別 (男/女)	70/59	370/167
FAB 病型		
RA	82例	133例
RARS	26例	36例
RAEB	16例	234例
RAEB-t	2例	89例
CMML	3例	45例
染色体異常 (有/無)	34/54	231/160 (p=0.0002)
NAP スコア	260 (97例)	223 (338例) (p=0.002)
LDH (IU/L)	321	407 (p=10 ⁻⁸)
血中 VB12 濃度 (pg/mL)	1181 (83例)	2019 (326例) (p=0.002)
末梢血中 Blast 出現	4例	209例 (p=10 ⁻¹⁵)
末梢血中巨核球 (有/無/不明)	0/103/26	40/397/100 (p=0.0015)
骨髄中 Blast (%)	2.6%	7.6% (p=10 ⁻²⁵)
白血病移行 (有/無)	12/117	242/295

年齢15~85歳 (中央値52歳)、病型はRA 82例、RARS 26例、RAEB 16例、RAEB-t 2例、CMML 3例であった。一方5年以内に死亡した症例は537例 (81%) で、年齢15~88歳 (中央値63歳)、病型はRA 133例、RARS 36例、RAEB 234例、RAEB-t 89例、CMML 45例であった。年齢構成は5年以内死亡例で有意に高年齢であった。

染色体異常の有/無は5年以上生存例では34例/54例であったのに対して、5年以内死亡例では231例/160例であった (p=0.0002)。NAP スコアは5年以上生存例で有意に高値であった。血清 LDH 値は range 幅が広いながらも5年以内死亡例で有意に高値であり (p=10⁻⁸)、これはビリルビン上昇など溶血所見と無関係であった。血中ビタミンB12濃度も非常に range 幅が広いが、5年以内死亡例で有意に高値であったが (図1参照)、骨髄有核細胞数との相関はなかった。

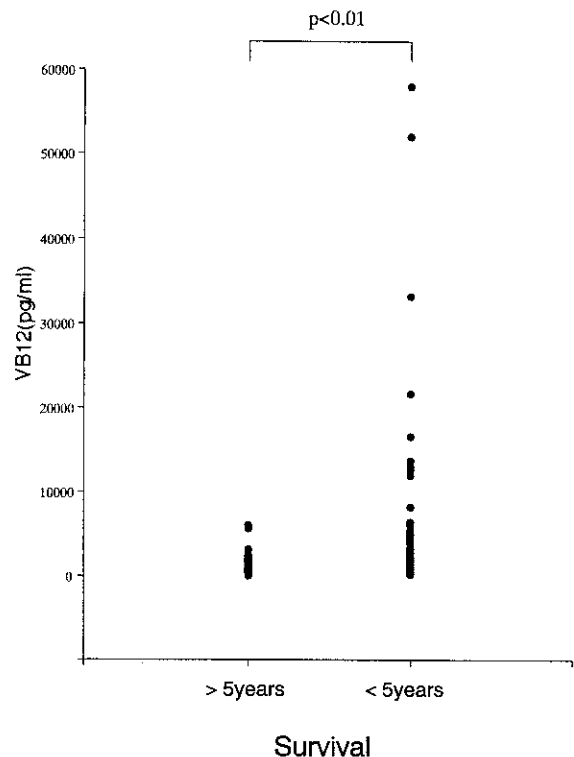


図1 血清ビタミンB12濃度と5年生存との関係

初診時末梢血中の芽球出現は5年以上生存例では129例中わずか4例であったのに対し、5年以内死亡例では537例中209例に見られた (p=10⁻¹⁵)。7年以上生存70例では1例も芽球出現例はなかった。末梢血中の巨核球は5年以上生存例では1例も出現

しなかったのに対し、5年以内死亡例では40例に見られた ($p=0.0015$)。骨髓中の芽球割合は両群で有意差があった ($p=10^{-25}$)。

Low-risk MDS と総称される RA および RARS にしぼって、5年以上生存例と5年以内死亡例を抽出し同様の検討を行ったところ、やはり年齢、染色体異常の有無に加えて、血中ビタミンB12濃度についても予後との相関が示された。

[考案]

MDS の生命予後は白血病化の如何にかかわらず不良であり、本研究班の1997年度全国実態調査報告では5年生存率二十数%とされている。本研究班に基づく過去の報告としては、長期生存者の特徴に若年者であること、血球減少が軽度、骨髓染色体異常がないことが挙げられている¹⁾。また1997年度全国実態調査報告の中で、全生存に対する予後不良因子(既登録1002例における解析)として男性であること、フェリチン高値、末梢血中に芽球、前骨髓球または後骨髓球が存在、末梢血好中球減少、骨髓赤芽球減少、骨髓中芽球高値(3.2%以上)、好中球核異常、好中球顆粒異常、小型巨核球、骨髓染色体異常があることが示された²⁾。

今回は同じデータベースからではあるが、5年

以上生存が確認された129例と5年以内に死亡した537例についての比較検討を行い、長期生存に関連する要因の抽出を試みた。患者年齢と MDS 病型には既に偏りがあり、また性別・染色体異常の有無・末梢血中および骨髓中の芽球増加が予後を左右するのは既報告の通りである。加えて今回血清 LDH 高値、ビタミンB12高値、一部 NAP スコアが予後不良因子として挙げられた。LDH 高値は腫瘍量を反映している可能性はあるが、一方ビリルビン値とは相関せず、溶血の程度とは関連しないと考えられた。ビタミンB12高値は骨髓増殖性疾患との関連を想起させるが、骨髓有核細胞数とは相関せず、その意義は不明である。症例によってはビタミン剤服用の影響も否定できない。末梢血中巨核球の存在は骨髓破壊性病変か髓外造血を示唆するが、5年以上生存例には1例も見つからなかった。

長期生存に対して正にあるいは負に関連する要因につき、プロスペクティブな見方も含めて今後さらに検討が必要である。

[文献]

1. Yoshida, Y, et al, New Engl. J Med 325, 662, 1991
2. 吉田弥太郎他：1997年度不応性貧血全国実態調査. 平成9報告書 29, 1998

MS-5共培養系を用いたMDSにおける赤芽球系無効造血機構の解析

別所 正美、矢ヶ崎史治、伊藤 善啓
松田 晃 (埼玉医科大学、第1内科)

【はじめに】

骨髄異形成症候群 (MDS) は骨髄過形成にもかかわらず汎血球減少を示す無効造血という病態によって特徴づけられる疾患群である。近年、MDS 無効造血の原因がアポトーシスによる細胞死であることが明らかになり、その機序として TNF α や INF γ 等の炎症性サイトカインにより FAS、FAS-L の発現が誘導される可能性¹⁾や、赤芽球系では EPOR 下流のシグナル伝達系の異常を認めること²⁾等が報告されてきた。しかしながら MDS における造血は正常クローンの混在する不均一な状態であること、幹細胞レベルから造血3系統の分化成熟段階におけるアポトーシス機構が検討されていないことなどから、無効造血機構の解明には *in vivo* の状態を再現可能な培養系での詳細な検討が必要と考えられる。今回我々はマウスストローマ細胞株 MS-5を用いた共培養系が MDS 赤芽球コロニー形成を支持することを FISH 法によるクロナリテー解析にて見出し、同培養系を用いて MDS における赤芽球無効造血機構を解析した。

【対象と方法】

対象患者の血液所見、染色体異常を表1に示す。患者及び健常者の同意を得て採取した、骨髄有核細胞 2×10^5 個 (マクロファージ除去後)、磁気ビーズ法により純化した CD34陽性細胞 2×10^3 個をサイトカイン添加メチルセルロース培地にて MS-5と14日間共培養し、非共培養群とコロニー形成能を比較した。各コロニーをスライド上に直接固定し間期核 FISH 解析を行い、また pool した細胞を annexin-V FITC を用いた FACS による早期アポトーシス細胞の検出と RT-PCR 法による遺伝子解析に用いた。FISH 法による染色体欠失の判定

には signal 陽性率50%以上で80%以上の細胞に同一の所見を認めたコロニーのみを用いた。

表1 対象症例

CASE	age/sex	karyotype	hemogram
1 RARS	42F	46,XX,20q- [16]/46,XX[4]	WBC 4270/ul Hb 9.3g/dl Pit 18×10^4 /ul
2 RA	35F	46,XX,20q-[20]	WBC 2540/ul Hb 12.5g/dl Pit 12×10^4 /ul
3 RA	32M	46,XY,20p-q- [23]/46,XX[2]	WBC 2540/ul Hb 6.9g/dl Pit 12×10^4 /ul
4 RAEB	56M	46,XY,7q-,20q- [16]/46,XX[4]	WBC 5830/ul Hb 12.5g/dl Pit 29×10^4 /ul
5 RA	69M	46,XX,13q-[20]	WBC 3710/ul Hb 6.4g/dl Pit 0.7×10^4 /ul

【結果】

RARS 例では MS-5との共培養により大小2群の BFU-E コロニーを認め、小 (BFU-ES: 直径 $120 \mu\text{m}$ 以下) が大 (BFU-EL) に比して多かった (図1)。

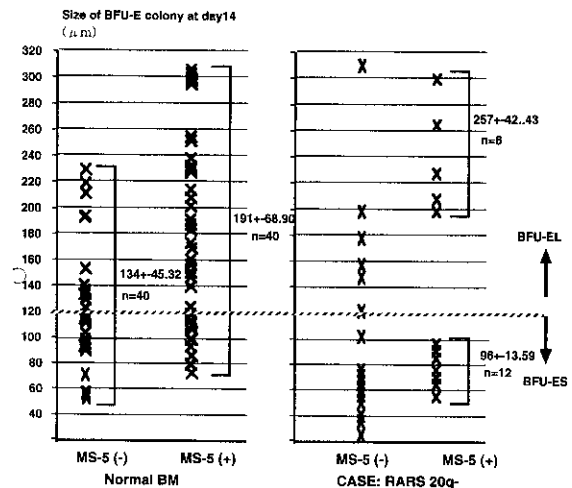


図1 BFU-E コロニーサイズの分布

EL と ES の構成比は CD34陽性細胞を用いても影響を受けず、ES、EL は同一の成熟段階にある前駆細胞と考えられた (図2)。すべての症例で ES/EL 比は1.2以上で、BFU-ES コロニー形成能は MS-5との共培養により1.8~7.4倍に高められたが、MS-5との共培養は CFU-GM コロニー形成能には影響を与えなかった (図3)。FISH 法による解析では全ての症例で BFU-ES は染色体異常を有したが、BFU-EL、CFU-GM の染色体異常の保有

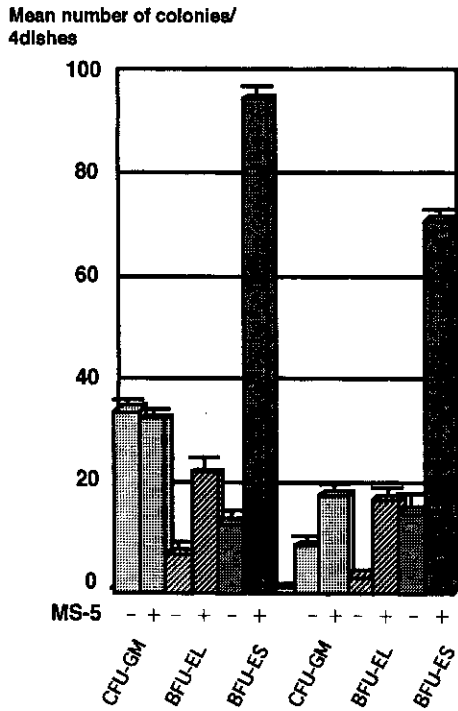


図2 RARS例におけるCD34陽性細胞を用いたコロニー形成

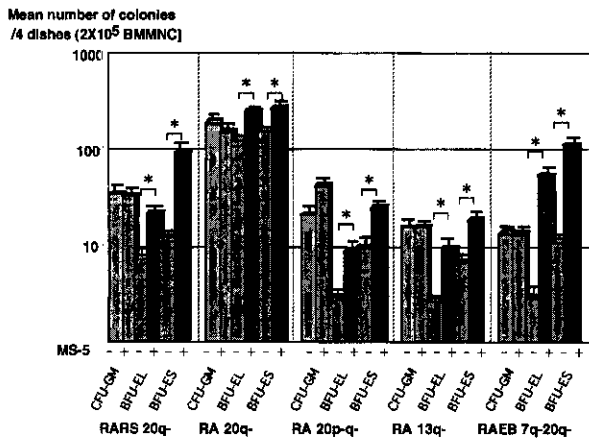


図3 各症例のコロニー形成 (* : P < 0.05)

率はヘテロな傾向を示した(図4)。BFU-ESコロニー構成細胞のアポトーシス比率は40-50%であった(表2)。RT-PCR法によりBFU-ESでは*BCL-XL*の発現が低下していることが示唆された(図5)。

[考察・結論]

本培養系はMDS由来BFU-Eコロニー形成を支持することが示された。染色体やアポトーシスの解析などからBFU-ESがMDS赤芽球クローン性

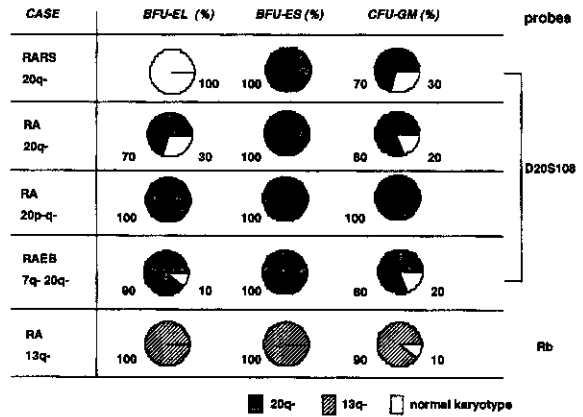


図4 間期核 FISH 解析結果 (各々10-20コロニーを解析)

表2 コロニー構成細胞中の早期アポトーシス比率 (%)

	BFU-EL	BFU-ES	CFU-GM
RARS 20q-	21.8	44.7	8.96
RA 20q-	47.3	40	12.7
RA 20p-q-	n.d.	n.d.	n.d.
RAEB 7q-20q-	29.8	48.6	17.3
RA 13q-	16.8	42.3	24.6
NBM	13.4 +/- 1.2	8.0 +/- 2.4	11.0

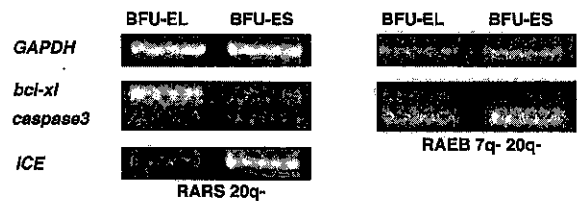


図5 RT-PCR法によるアポトーシス関連遺伝子の解析

造血を反映すると考えられた。本培養系はMDSにおける無効造血機構の解明や新規貧血治療薬の開発に有用と考えられる。

[参考文献]

1. Gupta P, et al, Leukemia 13, 44, 1999
2. Hoefsloot LH, et al, Blood 89, 1690, 1997

骨髓異形成症候群におけるAML1遺伝子異常の解析

平井 久丸、今井 陽一、黒川 峰夫
(東京大学医学部, 血液・腫瘍内科)

[はじめに]

AML1 遺伝子は種々の転座型白血病において切断を受けて融合蛋白質を形成し、白血病発症に深く関与することが知られている。さらに最近では、急性骨髄性白血病 (AML) 症例の一部および AML に移行する遺伝性血小板減少症の症例において AML1 の変異が見いだされることが報告された。今回我々は、前白血病状態である骨髓異形成症候群 (MDS) の発症における AML1 の役割を調べるために、MDS の症例において AML1 遺伝子の変異を検討した。さらに遺伝子変異により形成される変異体の機能解析を行った。

[対象と方法]

MDS の37症例を対象に AML1 の runt ドメインをコードする領域で reverse transcriptase-polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (RT-PCR-SSCP) 法を用いて遺伝子変異を検討した。遺伝子変異によって形成される AML1 の変異体について、HeLa 細胞におけるレポーターアッセイを用いて macrophage-colony stimulating factor receptor (M-CSF-R) や neutrophil elastase (NE) のプロモーターに対する転写活性化能を検討した。COS7 細胞に発現させた AML1 の変異体の DNA 結合能を、ゲルシフトアッセイを用いて調べた。さらに、AML1 の変異体が正常の AML1 の DNA 結合能に及ぼす影響を同様にゲルシフトアッセイを用いて調べた。正常の AML1 は共因子である PEBP2 β と二量体を形成して DNA 結合能及び転写活性化能が増加するが、この PEBP2 β と AML1 の変異体との相互作用を免疫沈降法を用いて調べた。

[結果]

1. CMMoL の症例でコドン105における停止をもたらすフレームシフト変異 (V105ter) が一つのアリルで、MDS から移行した overt leukemia の症例でコドン139での1アミノ酸置換をもたらす点突然変異 (R139G) が両アリルで認められた。
2. レポーターアッセイにおいて、正常の AML1 は PEBP2 β と協調して M-CSF-R や NE のプロモーターからの転写を著明に活性化するが、V105ter および R139G 変異体はいずれもこの転写活性化能を欠いていた。さらに R139G を正常の AML1 と共発現させると、正常の AML1 によって誘導された NE プロモーターの活性は著明に抑制された。(図1)

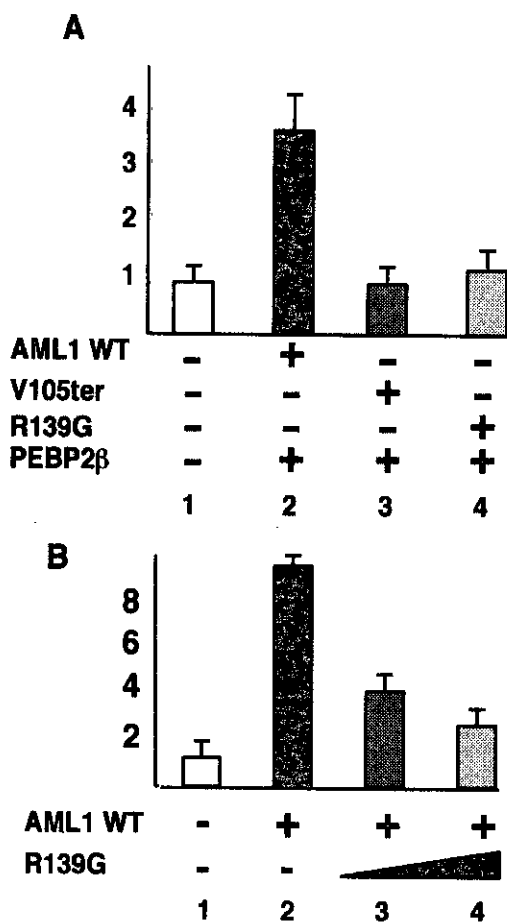


図1

3. AML1 を発現させた COS7 細胞の核抽出液に AML1 の DNA 結合配列からなるプローブを加えてゲルシフトアッセイを行うと、正常の AML1 では DNA との複合体を示すシフトバンドが得ら

れたが、V105ter および R139G 変異体ではこの DNA 結合は消失していた。さらに R139G は正常の AML1 と共発現させることによりその DNA 結合を著明に抑制した。(図2)

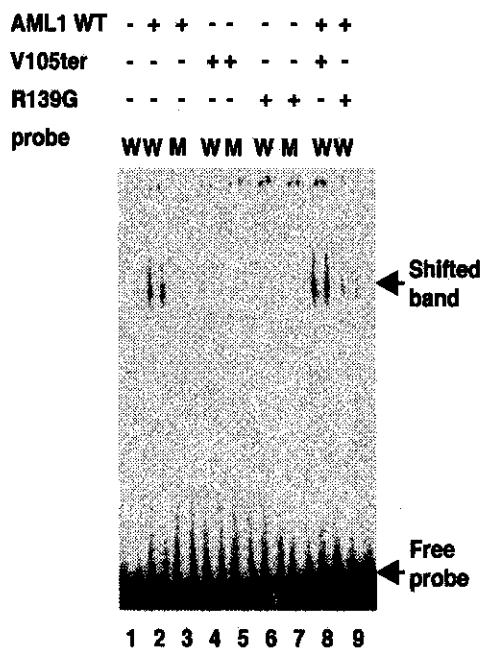


図 2

4. 変異型 AML1 と PEBP2 β の免疫沈降反応を行うと R139G は野生型よりも強い親和性で PEBP2 β と結合した。

[考察・結論]

我々は前白血病状態と考えられる MDS において AML1 遺伝子の runt ドメインをコードする領域に遺伝子変異がみられることを示した。すでに種々の白血病の発症に AML1 遺伝子の異常が関与していることが知られているが、本研究は前白血病状態の MDS の発症にも AML1 の構造変化が関与している可能性を示すものであり、造血器腫瘍の発症における AML1 の機能異常の果たす役割の解明に重要な手がかりとなると考えられる。さらに、これらの遺伝子変異により形成される AML1 の変異体は標的遺伝子の転写活性化能を欠き、また一部の変異体は、正常の AML1 の PEBP2 β との二量体形成を競合的に阻害することによって、正常 AML1 の DNA 結合能及び転写活性化能を抑制することが示された。これらの知見は AML1 の構造変化に基づく機能異常のメカニズムの解明に寄与すると考えられる。

[参考文献]

1. Tanaka T, et al, EMBO J 14, 341, 1995
2. Osato M, et al, Blood 93, 1817, 1999

MLL/MEN による p53の転写活性化能の抑制

三谷 絹子 (東京大学医学部、血液・腫瘍内科)

[はじめに]

ヒト骨髄異形成症候群・白血病に観察される 11q23転座では、11q23上にマップされるZnフィンガー型の転写制御因子 MLL がその中央部分に存在する Zn フィンガー領域の上流で切断され、AT フックを含むN末領域が転座の相手遺伝子とキメラを形成する。11q23転座型白血病に於いては、MLL が Zn フィンガー領域以下の塩基配列を失い失活すること、あるいは、相手遺伝子が MLL 由来の AT フックを含む塩基配列を獲得して機能的に修飾されることが、その発症機構に関与していると考えられる。

成人骨髄異形成症候群に観察される t(11;19)(q23;p13.1) では、MLL のN末領域に 19p13.1上に存在する MEN 遺伝子がコードする RNA ポリメラーゼII伸長因子のほぼ全長が結合した融合蛋白質が発現している¹⁾。MEN はリジン豊富領域依存性に AP-1活性を刺激し、ラットの線維芽細胞 Rat1のコロニー形成能を増強する²⁾。一方、p53遺伝子はその欠失や変異が造血器腫瘍を始め多くのヒト悪性腫瘍の発症に関与していることが証明されている癌抑制遺伝子である。骨髄異形成症候群の発症・進展の機構の一端を明らかにする目的で、MLL/MEN 及び MEN の p53の機能に対する効果を検討した。

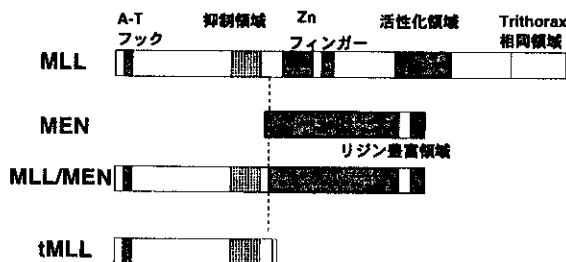


図1 MLL/MEN融合蛋白質の構造

MLLはZnフィンガー型の転写制御因子であり、MENはRNAポリメラーゼII転写伸長因子である。

[方法]

1. p53は転写因子として各種の標的遺伝子の転写を活性化する事によって、癌抑制機能を発揮する。そこで、2つの p53結合部位とtk基本プロモーターを含み p53によって転写が活性化される人工的レポーター (2xRGC-Luc) を HeLaS3細胞に導入してルシフェラーゼアッセイを行い、MLL/MEN 及び MEN のp53の転写活性化能に対する効果を検討した。また、p53の標的遺伝子サイクリンGのプロモーターを用いて同様の検討を行った。さらに、MLL/MEN あるいは MEN が一般的な転写抑制因子ではない事を証明する為に、GAL4-VP16による GAL4-Luc の転写活性化に対する影響をルシフェラーゼアッセイで検討した。
2. p53と MLL/MEN あるいは MEN との結合の有無を免疫沈降-ウエスタン解析により検討した。
3. p53の転写活性化能を抑制する MEN の機能領域を決定する為に各種の欠失変異体を作製し、これらを用いてルシフェラーゼアッセイ及び免疫沈降-ウエスタン解析を施行した。
4. レトロウイルスを用いて MEN を Rat1細胞に遺伝子導入するとコロニー形成能の増強が観察される。この系を用いて、p53の転写活性化能を抑制出来ない欠失変異体のコロニー形成能の有無を検討した。

[結果・考察]

1. p53とレポーターを同時に HeLaS3細胞に導入するとレポーターの著明な転写活性化が観察されたが、MLL/MEN、MEN、tMLL (MLL/MEN に含まれる MLL 部分で、Zn フィンガー領域を含まず AT フックのみを含むN末領域) の発現プラスミドを導入した場合には転写活性化は観察されなかった³⁾。しかしながら、p53と MLL/MEN あるいは MEN を同時に導入した場合には、p53による転写活性化は完全に抑制された。tMLL には p53の転写活性化抑制効果は存在しなかった。また、p53の標的であるサイクリンGプロモーターを用いたレポーターアッセイに於いても同様の結果が得られた。従って、MLL/MEN は MLL 部分ではなく MEN 部分によって p53の転写活性化能を抑制す

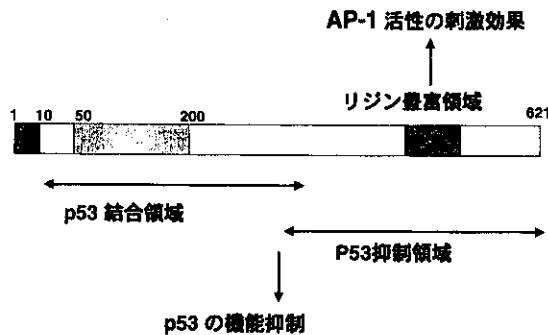


図2 MENの機能

MENはリジン豊富領域依存性にAP-1活性を刺激する。一方、N末1/2の領域でp53に結合し、C末1/2の領域でp53の転写活性化能を抑制する。これらの機能により、MENは造腫瘍活性を発揮すると考えられる。

ると考えられた。また、MLL/MENもMENもGAL4-VP16によるGAL4-Lucの転写活性化に対し抑制的に作用しないことから、MLL/MEMもMENも一般的な転写の抑制因子ではないことが明らかになった。

2. p53とFLAG tagを結合させたMLL/MENをCos1細胞に同時に発現させ、抗FLAG抗体で免疫沈降し抗p53抗体でウエスタン解析をするとp53が検出された。従って、MLL/MENとp53は結合すると考えられた。同様に、p53とFLAG tagを結合させたMENをCos1細胞に同時に発現させ、抗FLAG抗体で免疫沈降し抗p53抗体でウエスタン解析をするとp53が検出された。また、p53とHA tagを結合させたMENをCos1細胞に同時に発現させ、抗p53抗体で免疫沈降し抗HA抗体でウエスタン解析をするとMENが検出された。以上の結果より、MLL/MENはMEN部分でp53と結合するものと考えられた。

3. ルシフェラーゼアッセイの結果より、MENのN末1/2の領域及びC末1/2の領域を欠いた欠失変異体はいずれもp53の転写活性化抑制能を失う事が明らかになった。また、同じ欠失変異体を用いた免疫沈降-ウエスタン解析の結果、MENはN末1/2の領域でp53と結合することが明らかになった。従って、MENはN末1/2の領域でp53と結合し、C末1/2の領域でp53の転写活性化能を抑制すると考えられた。そこで、N末1/2の領域をp53結合領域、C末1/2の領域をp53抑制領域と命名した。

4. p53結合領域及び抑制領域を欠いた欠失変異体はいずれもRat1細胞のコロニー形成能を増強させなかった。従って、MENの造腫瘍活性はp53の機能抑制を介するものであると推測された。

[結論]

MLL/MEN融合蛋白質はMEN部分依存性に癌抑制蛋白質p53と結合し、その機能を抑制することが明らかになった。p53の機能抑制はt(11;19)(q23;p13.1)による骨髄異形成症候群発症の一つの分子機構を担っていると考えられた。

欠失変異体を用いた検討により、MENはN末1/2の領域でp53と結合し、C末1/2の領域でp53の転写活性化能を抑制することが証明された。MENによる造腫瘍活性の発揮にはこの両機能領域が必要であることから、MENはp53の機能を抑制することにより造腫瘍活性を発揮していると考えられた。

t(11;19)(q23;p13.1)を伴う白血病ではMENがMLLとキメラを形成することにより白血病原性を獲得すると考えられるが、今回の検討ではMLL/MENとMENの機能的差異を明らかにすることは出来なかった。キメラ形成によるMENの白血病原性の獲得の機序としては、MLLプロモーター下に発現することによりその発現が恒常的になること、あるいは、増強すること等が考えられる。

[参考文献]

1. Mitani K, et al, Blood 85, 2017, 1995
2. Kanda Y, et al, J Biol Chem 273, 5248, 1998
3. Maki K, et al, Blood 93, 3216, 1999