

平成12年度：厚生科学研究費補助金  
(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)

# 研究報告書

研究課題名  
(課題番号)

Representational Difference Analysis 法を  
用いた血液腫瘍進展増悪因子遺伝子の研究  
(H10-ゲノム-007)

主任研究者： 佐藤裕子  
(国立国際医療センター研究所 臨床病理研究部 超微細構造研究室)

分担研究者： 澤田賢一  
(北海道大学大学院医学研究科・分子病態制御学講座)

# 研究報告書目次

平成12年度：厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

## 研究課題名（課題番号）

Representational Difference Analysis 法を用いた血液腫瘍進展増悪因子遺伝子の研究  
(H10-ゲノム-007)

- |                        |        |       |       |
|------------------------|--------|-------|-------|
| 1. 厚生科学研究費補助金研究報告書     | 様式 A-4 | ----- | 2 ページ |
| 2. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要 | 別添 1   | ----- | 1 ページ |
| 3. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書   | 別添 4   | ----- | 6 ページ |
| 4. 厚生科学研究費補助金分担研究報告書   | 別添 5   | ----- | 4 ページ |
5. 雑誌掲載論文（英文論文のみ）
- 1) Nakazato H, Shiozaki H, Zhou M, Nakatsu M, Miyawaki S, Sato Y: *TEL/MNI* fusion in a AML-M2 patient who showed strong resistance to treatment, *Brit J Haematol*, in press
  - 2) Ogiue-Ikeda M, Kotani H, Iwasaka M, Sato Y, Ueno S: Inhibition of leukemia cell growth under magnetic fields of up to 8T. *IEEE Transactions on Magnetics*, in press
  - 3) Sato Y, Kobayashi H, Suto Y, Olney HJ, Davis EM, Super HG, Espinosa III R, Le Beau MM, Rowley JD: Chromosomal instability in chromosome band 12p13: multiple breaks leading to complex rearrangements including cytogenetically undetectable sub-clones. *Leukemia*, in press.
  - 4) Iijima Y, Okuda K, Tojo A, Setoyama M, Sakaki Y, Asano S, Kruh GD, Sato Y: Transformation of BaF3 cells and Rat-1 cells by *ETV6/ARG*, accepted to *Oncogene*
  - 5) Kano Y, Akutsu M, Mano H, Sato Y, Tsunoda S, Homma Y, Furukawa Y: In vitro cytotoxic effects of a tyrosine kinase inhibitor STI571 in combination with commonly used antileukemic agents. *Blood* 97: 1999-2007, 2001
  - 6) Iijima Y, Ito T, Oikawa T, Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Kamada N, Kishi K, Asano S, Sakaki Y, Sato Y: A new *ETV6(TEL)* partner gene, *ARG* (*ABL2*) related gene or *ABL2* identified in a AML-M3 cell line with the t(1;12)(q25;p13) translocation. *Blood* 95:2126-2131, 2000
  - 7) Endo T, Sakai T, Fujimoto K, Yamamoto S, Takashima H, Haseyama Y, Nishio M, Koizumi K, Koike T, Sawada K: A possible role for lamivudine as prophylaxis against hepatitis B reactivation in carriers of hepatitis B who undergo chemotherapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant*, in press
  - 8) Nishio M, Koizumi K, Moriwaka F, Koike T, Sawada K: Reversal of HIV associated motor neuron disease after highly active antiretroviral therapy (HAART). *J Neurology*, in press
  - 9) Endo T, Oda A, Haseyama Y, Nishio M, Koizumi K, Satoh I, Amasaki Y, Sato Y, Ikebuchi K, Ikeda H, Koike T, Sawada K: Stem cell factor protects c-kit positive human primary erythroid cells from apoptosis. *Exp Hematol*, in press
  - 10) Nishio M, Oda A, Koizumi K, Satoh I, Sato Y, Endoh T, Tsutsumi A, Fujihara M, Ikebuchi K, Ikeda H, Koike T, Sawada K: Stem cell factor prevents Fas-mediated apoptosis of human erythroid precursor cells with Src-family kinase dependency. *Exp Hematol* 29:19-29, 2001  
Nishio M, Oda A, Koizumi K, Sato I, Haseyama Y, Endo T, Takashima H, Tsutsumi A, Fujihara M, Ikebuchi K, Ikeda H, Koike T, Sawada K: Stem cell factor prevents Fas-mediated apoptosis of human erythroid precursor cells with Src-family kinase dependency. *Exp Hematol* 29:19-29, 2001
  - 11) Yamaguchi M, Hirayama F, Kanai M, Sato N, Fukazawa K, Yamashita K, Sawada K, Koike T, Kuwabara M, Ikeda H, Ikebuchi K: Serum-free coculture system for ex vivo expansion of human cord blood primitive progenitors and scid mouse-reconstituting cells using human bone marrow primary stromal cells. *Exp Hematol* 29:174-182, 2001

- 12) Oda A, Sawada K: Signal transduction in primary cultured human erythroid cells. *J Hematotherapy & Stem Cell Res* 9:417-423, 2000
- 13) Tsutsumi A, Ichikawa K, Matsuura E, Sawada K, Koike T: Heterogeneous behavior of anti- $\beta$ 2-glycoprotein I antibodies on various commercially available enzyme immunoassay plates coated with  $\beta$ 2-glycoprotein I. *J of Rheumatol* 27:391-396, 2000
- 14) Ieko M, Ichikawa K, Atsumi T, Takeuchi R, Sawada K, Yasukouchi T, Koike T: Effects of  $\beta$ 2-glycoprotein I and monoclonal anticardiolipin antibodies on extrinsic fibrinolysis. *Sem Thrombos Hemostas* 26:85-90, 2000
- 15) Kashii Y, Kirito K, Tanaka M, Uchida M, Nishijima K, Ando T, Koizumi K, Endo T, Sawada K, Momoi M, Miura Y, Ozawa K, Komatsu N: A member of forkhead family transcription factor FKHRL1 is one of the downstream molecule of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt activation pathway in erythropoietin signal transduction. *Blood* 96:941-949, 2000
- 16) Koizumi K, Nishio M, Endo T, Takashima H, Haseyama Y, Fujimoto K, Yamamoto S, Sato N, Ikebuchi K, Ikeda H, Koike T, Sawada K: Large scale purification of human blood CD34+ cells from cryopreserved peripheral blood stem cells, using a nylon-fiber syringe system and immunomagnetic microspheres. *Bone Marrow Transplant* 26:787-793, 2000
- 17) Nishio M, Koizumi K, Endo T, Takahima H, Haseyama Y, Fujimoto K, Yamamoto S, Kobayashi H, Koike T, Sawada K: Effective high dose chemotherapy combined with CD34+ - selected autologous peripheral blood stem cell transplantation in a patient with cutaneous CD30-negative large T cell lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 25:1315-1317, 2000
- 18) Notoya A, Bohgaki T, Mukai M, Kohno M, Sato H, Sawada K: Splenomegaly and chronic disseminated intravascular coagulation in Osler-Weber-Rendu disease. *Am J Hematol* 65:315-318, 2000

平成12年度：厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

## 総括研究報告書

### representational difference analysis法を用いた 血液腫瘍進展増悪因子遺伝子の研究 (H10-ゲノム-007)

主任研究者： 佐藤 裕子  
(国立国際医療センター研究所 臨床病理研究部 超微細構造研究室)

分担研究者： 澤田 賢一  
(北海道大学大学院医学研究科・分子病態制御学講座)

#### 研究要旨

本研究では、近年、高齢患者数の増加がみられ、しかも病勢の急性増悪をくい止めることができたならば、大幅な予後の改善が期待できる血液腫瘍性疾患である慢性骨髄性白血病(CML)、骨髄異形性症候群(MDS)、多発性骨髄腫(MM)を対象とし、cDNA-RDA法やSSH法を用いて、急性期(BP)検体から慢性期(CP)検体を差し引くことにより、病勢増悪責任遺伝子を単離し、治療薬の開発をめざす。

1. CML: cDNA-RDAにより、急性転化時には、①EEF2(eukaryotic elongation factor 2), ②HSP90(heat shock protein 90), ③cMYCが高発現していることを見いだした。また、39種類の novel sequence も釣り上げた(現在、EST cloningで解析中)。HSP90については、HSP90阻害剤としてマウスでは副作用の軽微な radicicol 誘導体が既に開発されていた。そこで以降は radicicol 誘導体の臨床応用を目指した方向へと研究を進めた。まず、臨床検体(慢性期9例、移行期3例、急性期8例)を用いてHSP90 mRNA定量を行ったところ、急性期では慢性期に比べ有意に高値であり、CML細胞株では全例高値であった。また、CML細胞株細胞で radicicol 誘導体の添加培養を行ったところ、全例で著明な増殖抑制が認められ、増殖抑制には①G1 arrest タイプと、②アポトーシス・タイプがあること、BCR/ABL 蛋白を著明に減少させることが判明した。今後は radicicol 誘導体のヒトにおける副作用を検討し、CML-BP に対する治療薬の可能性を探る。EEF2については阻害剤が報告されているが、入手困難であるため、anti-sense を作成し、増殖抑制作用の検討を行う。また、2症例で、病期の異なる同一患者由来骨髄塗抹標本から微量 DNA を抽出し、増幅後にゲノム SSHを行った。現在はゲノムデータベースが未整備のため、特定の遺伝子を同定するには至っていないが、多数のクローンから同一の DNA sequence が釣り上がっていること、2症例で同一の DNA sequence が釣り上がっていること、から、今後、ゲノムデータベースの整備・充実と共に、本方法により、ゲノムレベルで病勢増悪部位が特定できると考えられた。

2. MDS: サブトラクションは成功しなかったが、病勢増悪因子遺伝子を単離するための分子細胞生物学的指標を得ることを試み、①SCFはヒト造血前駆細胞の Fas/Fas-L システムによって誘導される細胞死を抑制すること、②この生存シグナル伝達経路は src family kinase を介する AKT 活性化に依存していることを明らかにすることができた。

3. MM: 同一患者由来であるが、発生母地(骨髄と胸水)と性状・形態が大きく異なる多発性骨髄腫ペア細胞株 KMS21BM(接着性なし、CD95/Fas 低発現、IL10 低発現)と KMS21PE(接着性有り、CD95/Fas 高発現、IL10 高発現)を用いて、cDNA-SSHを行った。[KMS21BM-KMS21PE]では XIST が、[KMS21PE-KMS21BM]では cyclin D2 が釣り上がった。細胞接着性は骨髄腫細胞の易転移性、易白血化とも深い関連があるため、こうした関連責任遺伝子が単離出来る可能性がある。同様の骨髄腫ペア細胞株3種を用いて、CGH(comparative genomic hybridization)を行った。これまでの解析では、それぞれの細胞株で発現している表面抗原遺伝子部位の増幅が確認されている。また、同一患者で病期の異なる骨髄塗抹標本より、マイクロマニピュレーターで骨髄腫細胞のみを掻き取り、微量DNAを増幅の後、genomic SSH法を行った(結果は現在、解析中)

## A. 研究目的

わが国では急速な高齢化にともない高齢ガン患者が急増し、ガン治療費の高騰が健康保険財政を圧迫している。

本研究では高齢患者数の増加がみられ、しかも病勢の急性増悪をくい止めることができるならば、予後が著しく好転するような血液腫瘍性疾患である慢性骨髄性白血病(CML)や骨髄異形性症候群(MDS)、多発性骨髄腫(MM)を対象とし、病勢増悪責任遺伝子の単離をめざす。さらには病勢増悪を阻止しガンと共存しつつ天寿を全うするような治療法の開発をめざす。

## B. 研究方法

サブトラクション法的一种であるcDNA-RDA法やSSH法とarray hybridization法を組み合わせて、病末期検体から病初期検体を差し引くことにより、病末期に発現している病勢増悪因子遺伝子の単離をめざした。cDNAサブトラクションの他に、骨髄塗沫標本上の微量DNAを用いて、ゲノム・サブトラクションも試みた。

## C. 研究成果

### (1) 慢性骨髄性白血病(CML)

今年度は、cDNA-RDA法により、複数検体の[BP-CP]で釣り上げられた、①EEF2(eukaryotic elongation factor 2)、②HSP90(heat shock protein 90)、③cMYCについて、cDNA array hybridization法で実際に高発現していることを確認した。6種類のCML細胞株と3例の慢性期臨床検体で3種類の遺伝子の発現を検討したところ、CML細胞株での高発現と臨床検体での低発現が確認された。

HSP90については、最近、Shiotsu Y (協和発酵)らにより、HSP90 inhibitorでもあり tyrosine kinase inhibitorでもある radicicolがK562細胞に赤芽球系分化を伴った増殖抑制を起こすことが報告されている(Shiotsu Y, et al: Novel oxime derivatives of radicicol induce erythroid differentiation associated with preferential G(1) phase accumulation. Blood 96:2284-91, 2000)。彼らはCMLではHSP90が高発現していることを知らずに、radicicolの tyrosine kinase inhibitor作用に注目してこの研究を開始したが、私達のデータを公開し、共同研究を持ちかけたところ、快諾を得ることができた。Radicicolはin vivoでは活性が低下するため、彼らは、in vivo活性のある radicicol誘導体(KF58333、KF25706)を既に開発していた。マウスによる実験では、他の

HSP90阻害剤(Geldamycin, Herbimycin)に比べ、肝・腎・骨髄に対する副作用が極めて軽微であり、K562細胞を腹腔輸中したSCIDマウスに対して著明な延命効果を認めている(40日から70日へ)。そこで、この薬剤の臨床応用をめざして、1)臨床症例(慢性期9例、移行期3例、急性期8例)におけるHSP90発現量差の検討、2)CML細胞株を含めた多くの細胞株について、radicicol誘導体添加培養による増殖抑制とその作用機序の検討を行った。

その結果、1)HSP90発現量は慢性期35.30、移行期79.47、急性期109.17(単位:コピー数/total RNA 1mg)であり、BP症例ではCP症例に比べ、有意に高発現していること(危険率5%以下)、2)6種類のCML細胞株で著明な増殖抑制が認められること、3)増殖抑制には、①G1 arrestタイプと②アポトーシス・タイプがあること、4)BCR/ABL蛋白が著明に減少すること、5)その他の細胞株(MM、AML/ALL、リンパ腫)でも著明な増殖抑制が認められること、が判明した。上記の結果から、radicicol誘導体はCML-BP治療薬や抗血液腫瘍剤として有望と思われる。また、増殖抑制パターンとして、G1 arrestタイプとアポトーシス・タイプがあることも極めて興味深い知見である。つまり、radicicol誘導体添加前後の検体のサブトラクションにより、G1 arrestタイプからはアポトーシス抵抗関連遺伝子が、アポトーシス・タイプからはアポトーシス誘導促進遺伝子が単離できる可能性がある。つまり、これらの遺伝子をつり上げた後には、radicicol誘導体の効果を促進する併用剤開発の可能性が開ける。今後はヒトにおける副作用を検討し radicicol誘導体の臨床応用に向けて研究を。

EEF2については、阻害剤として sordarin が報告されているが、これは入手不可能である。そこで EEF2に対する anti-sense oligo を作成して、細胞株における増殖抑制を検討し、臨床応用の可能性を探る。

また、CML-BPに高発現している遺伝子として39種類の novel sequence が釣り上がった。これらについては、今後、EST cloning を行い、遺伝子の同定を図る。

本研究では、当初から「同一患者より得られた病期差のある検体間のサブトラクションではない」「cell lineageの異なる検体間でサブトラクションを行っている」という欠点があった。この欠点を克服すべく、同一患者のBPとCPの骨髄塗沫標本から微量DNAを抽出し、DOP-PCR法で増幅した後、ゲノムSSHを試みた。現在はゲノムデータベースが未整備のため、BLAST searchの結果は全てBAC

clone, DNA sequence であり、特定の遺伝子を同定するには至っていないが、多数のクローンから同一の DNA sequence が釣り上がっていること、2 症例で同一の DNA sequence が釣り上がっていること、から、今後、ゲノムデータベースの整備・充実と共に、本方法により、ゲノムレベルでも病勢増悪部位が特定できるものと考えられた。

## (2) 骨髄異形性症候群 (MDS)

昨年度は [ (OHN : RAEB-T から樹立した細胞株) と (正常人 BM プール検体) ] 間で cDNA-RDA を行ったが、成功しなかった。本年度は同一の検体で再度、cDNA-RDA を試みたが、釣れてきたクローンは  $\beta$ グロブリンや rRNA のみであった。また、[ (MDS-RAEB 期に樹立された MDS 株) と (高頻度にアポトーシスを起こす MDS-L 亜株) ] で cDNA-SSH を試みたが、昨年同様に、両検体に同一の遺伝子が釣り上がっており、サブトラクションは成功していない。成功しない理由については、検体 RNA の劣化が考えられる。分担研究者：澤田は SCF が標的とする細胞内情報伝達分子を明らかにし、病勢増悪因子遺伝子を単離するための分子細胞生物学的指標を得ることを試みた。その結果、SCF は c-kit を介してヒト赤芽球系前駆細胞の細胞死を抑制すること、②この生存シグナル伝達経路は src family kinase を介する AKT 活性化に依存していることを明らかにした。

## (C) 多発性骨髄腫 (MM)

MM では臨床経過中にしばしば骨髄腫細胞の性状・形態変異や白血化が見られる。そこで、こうした変異に関連する遺伝子発現を解明すべく、同一患者由来であるが発生母地 (骨髄と胸水)、性状・形態が大きく異なる多発性骨髄腫ペア細胞株 3 組を用いて (川崎医大 : 大槻剛巳博士より供与)、両検体間で cDNA-SSH を行った。KMS21BM は接着性なし、CD95/Fas 低発現、IL10 低発現であり、KMS21PE は接着性有り、CD95/Fas 高発現、IL10 高発現である。[KMS21BM - KMS21PE] では XIST が、[KMS21PE - KMS21BM] では cyclin D2 が釣り上がった。細胞接着性は骨髄腫細胞の易転移性、易白血化とも深い関連があると考えられるため、今後、こうした関連責任遺伝子が単離出来る可能性がある。

同様の骨髄腫ペア細胞株 3 組を用いて、CGH (comparative genomic hybridization) を行った。結果は現在解析中であるが、それぞれの細胞株で発現している表面抗原遺伝子部位の増幅が確認されている。

また、同一患者で病期の異なる骨髄塗沫標本から

マイクロマニユプレーターで骨髄腫細胞のみを掻き取り、微量 DNA を抽出し、DOP-PCR 法で増幅した後、ゲノム SSH を試みた。結果は現在、解析中であるが、極微量の DNA 検体を用いてもゲノム・サブトラクションが可能であることが判った。

## D. 考 察

### 1. 慢性骨髄性白血病

これまでに CML 急性転化時に高発現している遺伝子として、cMYC は報告があるが (Daheron L, et al: Identification of several genes differentially expressed during progression of chronic myelogenous leukemia Leukemia 12:326-332, 1998)、HSP90, EEF2 は報告がない。HSP90 は分子シャペロンであり、分化・増殖・発生・アポトーシスなど、広範囲の細胞機能に深く関与していることが最近明らかにされてきた分子である。これまでに多くの固形腫瘍で高発現が確認されているが、病勢増悪に関与しているという報告はこれまでになく、本研究では極めて興味深い知見が得られた。本サブトラクションによって得られた分子が病勢増悪を引き起こす primary trigger であるか、結果として増加している分子であるのかは、現在のところ特定する手段がないが、恐らく、結果として増加している分子であると考えられる。

古い骨髄塗沫標本を利用したゲノム・サブトラクションも非常に有用な方法であると考えられるので、早期に結論を出したい。

### 2. 骨髄異形性症候群

今回は遂にサブトラクションが成功せず、特定の遺伝子を同定出来なかったが、今後、新たな細胞株を見いだして、再度、挑戦したい。

### 3. 多発性骨髄腫

病期の異なる検体間のサブトラクションではないが、骨髄腫細胞の性状・形態差に関連する遺伝子がつり上がると期待され、興味深い。

## E. 結 論

### 1. 慢性骨髄性白血病

急性増悪期に高発現している遺伝子として①EEF2, ②HSP90, ③cMYC 見いだした。急性増悪期臨床検体と CML 細胞株においても HSP90 は高値を示した。HSP90 阻害剤である radicicol 誘導体は CML 細胞株に対して著明な増殖抑制を示したので、今後、この薬剤の臨床応用を検討していく。

### 2. 骨髄異形性症候群

サブトラクションは成功しなかった。

## 3. 多発性骨髄腫

同一患者由来であるが、発生母地、性状・形態が大きく異なる多発性骨髄腫ペア細胞株間でサブトラクションを行ない、性状差に関連する遺伝子の単離をはかった。また、同様の検体を用いてCGHも行った。

## F. 研究発表

## 1. 論文発表

- 1) Nakazato H, Shiozaki H, Zhou M, Nakatsu M, Miyawaki S, Sato Y: *TEL/MNI* fusion in a AML-M2 patient who showed strong resistance to treatment, *Brit J Haematol*, in press
  - 2) Ogiue-Ikeda M, Kotani H, Iwasaka M, Sato Y, Ueno S: Inhibition of leukemia cell growth under magnetic fields of up to 8T. *IEEE Transactions on Magnetics*, in press
  - 3) Sato Y, Kobayashi H, Suto Y, Olney HJ, Davis EM, Super HG, Espinosa III R, Le Beau MM, Rowley JD: Chromosomal instability in chromosome band 12p13: multiple breaks leading to complex rearrangements including cytogenetically undetectable sub-clones. *Leukemia*, in press.
  - 4) Iijima Y, Okuda K, Tojo A, Setoyama M, Sakaki Y, Asano S, Kruh GD, Sato Y: Transformation of BaF3 cells and Rat-1 cells by ETV6/ARG, accepted to *Oncogene*
  - 5) Kano Y, Akutsu M, Mano H, Sato Y, Tsunoda S, Homma Y, Furukawa Y: In vitro cytotoxic effects of a tyrosine kinase inhibitor STI571 in combination with commonly used antileukemic agents. *Blood* 97: 1999-2007, 2001
  - 6) Iijima Y, Ito T, Oikawa T, Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Kamada N, Kishi K, Asano S, Sakaki Y, Sato Y: A new *ETV6(TEL)* partner gene, *ARG* (ABL related gene or *ABL2*) identified in a AML-M3 cell line with the t(1;12)(q25;p13) translocation. *Blood* 95:2126-2131, 2000
  - 7) Endo T, Sakai T, Fujimoto K, Yamamoto S, Takashima H, Haseyama Y, Nishio M, Koizumi K, Koike T, Sawada K: A possible role for lamivudine as prophylaxis against hepatitis B reactivation in carriers of hepatitis B who undergo chemotherapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant* (in press)
  - 8) Nishio M, Koizumi K, Moriwaka F, Koike T, Sawada K: Reversal of HIV associated motor neuron disease after highly active antiretroviral therapy (HAART). *J Neurology* (in press)
  - 9) Endo T, Oda A, Haseyama Y, Nishio M, Koizumi K, Satoh I, Amasaki Y, Sato Y, Ikebuchi K, Ikeda H, Koike T, Sawada K: Stem cell factor protects c-kit positive human primary erythroid cells from apoptosis. *Exp Hematol* (in press)
  - 10) Nishio M, Oda A, Koizumi K, Sato I, Sato Y, Endo T, Tsutsumi A, Fujihara M, Ikebuchi K, Ikeda H, Koike T, Sawada K: Stem cell factor prevents Fas-mediated apoptosis of human erythroid precursor cells with Src-family kinase dependency. *Exp Hematol* 29:19-29, 2001
  - 11) Yamaguchi M, Hirayama F, Kanai M, Sato N, Fukazawa K, Yamashita K, Sawada K, Koike T, Kuwabara M, Ikeda H, Ikebuchi K: Serum-free coculture system for ex vivo expansion of human cord blood primitive progenitors and scid mouse-reconstituting cells using human bone marrow primary stromal cells. *Exp Hematol* 29:174-182, 2001
  - 12) Oda A, Sawada K: Signal transduction in primary cultured human erythroid cells. *J Hematotherapy & Stem Cell Res* 9:417-423, 2000
  - 13) Tsutsumi A, Ichikawa K, Matsuura E, Sawada K, Koike T: Heterogeneous behavior of anti-β2-glycoprotein I antibodies on various commercially available enzyme immunoassay plates coated with β2-glycoprotein I. *J of Rheumatol* 27:391-396, 2000
  - 14) Ieko M, Ichikawa K, Atsumi T, Takeuchi R, Sawada K, Yasukouchi T, Koike T: Effects of β2-glycoprotein I and monoclonal anticardiolipin antibodies on extrinsic fibrinolysis. *Sem Thrombos Hemostas* 26:85-90, 2000
  - 15) Kashii Y, Kirito K, Tanaka M, Uchida M, Nishijima K, Ando T, Koizumi K, Endo T, Sawada K, Momoi M, Miura Y, Ozawa K, Komatsu N: A member of forkhead family transcription factor FKHL1 is one of the downstream molecule of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt activation pathway in erythropoietin signal transduction. *Blood* 96:941-949, 2000
  - 16) Koizumi K, Nishio M, Endo T, Takashima H, Haseyama Y, Fujimoto K, Yamamoto S, Sato N, Ikebuchi K, Ikeda H, Koike T, Sawada K: Large scale purification of human blood CD34+ cells from cryopreserved peripheral blood stem cells, using a nylon-fiber syringe system and immunomagnetic microspheres. *Bone Marrow Transplant* 26:787-793, 2000
  - 17) Nishio M, Koizumi K, Endo T, Takashima H, Haseyama Y, Fujimoto K, Yamamoto S, Kobayashi H, Koike T, Sawada K: Effective high dose chemotherapy combined with CD34+ selected autologous peripheral blood stem cell transplantation in a patient with cutaneous CD30-negative large T cell lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 25:1315-1317, 2000
  - 18) Notoya A, Bohgaki T, Mukai M, Kohno M, Sato H, Sawada K: Splenomegaly and chronic disseminated intravascular coagulation in Osler-Weber-Rendu disease. *Am J Hematol* 65:315-318, 2000
2. 学会発表
- 1) Yuji K, Mitani K, Ueno H, Sato Y, Ikawa S, Qiao Y, Hangaishi A, Ogawa S, Kurokawa M, Hirai H: A new partner gene of the tel/etv6, AF7p15, cloned in acute myeloid leukemia with t(7;12)(p15;p13). The 42th Annual Meeting of American Society of Hematology, in San Francisco, Dec. 1-5, 2000.
  - 2) Sato Y, Mian Zhou M, Davis EM, Espinosa III R, Yoshida M, Ozawa K, Le Beau MM, Rowley JD: A new recurrent translocation t(1;3)(p36;p21) associated with therapy-related leukemia. The 42th Annual Meeting of American Society of Hematology, in San Francisco, Dec. 1-5, 2000.
  - 3) Zhou M, Akanuma A, Furukawa T, Kano Y, Kishi K, Sato Y: Characterization of progression-related genes in ph-positive chronic myelogenous leukemia using cDNA-representational difference analysis. The 42th Annual Meeting of American Society of Hematology, in San Francisco, Dec. 1-5, 2000.
  - 4) Endo T, Oda A, Haseyama Y, Nishio M, Koizumi K, Sato I, Amasaki Y, Sato Y, Ikebuchi K, Ikeda H, Koike T, Sawada K: Stem cell factor protects c-kit positive human erythroid cells from apoptosis. The 42th Annual Meeting of American Society of Hematology, in San Francisco, Dec. 1-5, 2000.
  - 5) 吉田 稔、佐藤裕子: 46,XY,+1,der(1;7)(q10;p10)を認め好酸球増多を合併した不応性貧血の一例。第62日本血液学会総会、福岡、2000年3月16-18日

- 6) 角田三郎, 阿久津美百生, 佐藤裕子, 中津雅美, 五十嵐誠治, 加納康彦: Ph染色体異常を呈した悪性リンパ腫の一例. 第62回日本血液学会総会, 福岡, 2000年3月16-18日
- 7) 周 棉, 赤沼大輔, 加納康彦, 岸 賢治, 佐藤裕子: cDNA-RDA(representative difference analysis)法を用いた慢性骨髄性白血病(CML)における病態増悪責任遺伝子の同定. 第59回日本癌学会総会, 横浜市, 2000年10月4-6日
- 8) 湯地晃一郎, 三谷絹子, 上野博夫, 井川俊太郎, 佐藤裕子, 半下石明, 小川誠司, 黒川峰夫, 平井久丸: t(7;12)(p11;p12)における新しい転座融合遺伝子の単離. 第59回日本癌学会総会, 横浜市, 2000年10月4-6日
- 9) 佐藤裕子: 磁性体ビーズと電磁波を用いた血液腫瘍細胞殺傷療法の開発. 厚生省研究班「がんの診断治療法光学機器の開発」田尻班班会議, 東京, 2000年10月20日
- 10) 中村裕一, 原口京子, 斎藤憲治, 三谷絹子, 中里 洋, 佐藤裕子: 急性転化に先立ち, t(3;12)(q26;p13) 転座およびTEL/EVI1 キメラ mRNA の発現を認めた慢性骨髄性白血病 (CML) の一例. 第42回日本臨床血液学会総会, 倉敷市, 2000年11月8-10日
- 11) 湯地晃一郎, 上野博夫, 半下石明, 小川誠司, 黒川峰夫, 平井久丸, 三谷絹子, 井川俊太郎, 佐藤裕子: t(7;12)(p11;p12)転座を有するAML(M2)に認められた新規 TEL 融合遺伝子の解析. 第42回日本臨床血液学会総会, 倉敷市, 2000年11月8-10日
- 12) 塩崎宏子, 初見菜穂子, 高田 寛, 佐倉 徹, 宮脇修一, 中里 洋, 佐藤裕子: TEL 遺伝子8の関与が判明したt(12;22)(p13q13)転座難治性白血病の1例. 第42回日本臨床血液学会総会, 倉敷市, 2000年11月8-10日
- 13) 飯嶋良味, 奥田恵子, 東條有伸, 瀬戸山操, Gary D. Kruh, 神佳之, 浅野茂隆, 佐藤裕子: t(1;12)(q25;p13) 転座を持つAML-M3 cell line (HT93A)より同定された新しいoncogene, ETV6/ARG 融合遺伝子の機能解析. 第22日本分子生物学会総会, 神戸, 2000年12月13-16日
- 14) 海津 完也, 矢田健一郎, 山田 治, 八幡義人, 大槻剛巳, 佐藤裕子: CGH法を用いた性状・形態の異なる同一患者由来骨髄腫ペア細胞株のゲノム異常解析. 第63回日本血液学会総会, 名古屋, 2001年4月19-21日
- 15) 矢田健一郎, 周 棉, 佐藤裕子, 山田 治, 八幡義人, 大槻剛巳: 同一患者より樹立した骨髄腫細胞株(KMS21PE, BM)の細胞生物学的性状と発現遺伝子差異の検討. 第63回日本血液学会総会, 名古屋, 2001年4月19-21日
- 16) 周 棉, 岸 賢治, 加納康彦, 永井孝一, 古川達雄, 佐藤裕子: cDNA-RDA法を用いた慢性骨髄性白血病の病態増悪責任遺伝子の解析. 第63回日本血液学会総会, 名古屋, 2001年4月19-21日
- 17) 小川一英, 七島 勉, 丸山幸夫, 佐藤裕子: IFN 使用後, 興味あるmajor BCR/ABL mRNA 減少パターンを示したPh陽性CMLの一例. 第63回日本血液学会総会, 名古屋, 2001年4月19-21日
- 18) Endo T, Oda A, Haseyama Y, Nishio M, Koizumi K, Sato I, Amasaki Y, Sato Y, Ikebuchi K, Ikeda H, Koike T, Sawada K: Stem cell factor protects c-kit positive human erythroid cells from apoptosis. 42th Annual Meeting of American Society of Hematology, San Francisco, USA, December 1-5, 2000 (Blood abs 96:341, 2000)
- 19) Takashima H, Nishio H, Nishio M, Koizumi K, Oda A, Wakao H, Koike T, Sawada K: Molecular cloning and characterization of a novel human kruppel-associated box (KRAB) containing zinc finger protein, EKZ1 from human erythroid progenitor cells. 42th Annual Meeting of American Society of Hematology, San Francisco, USA, December 1-5, 2000 (Blood abs 96:4277, 2000)
- 20) Komatsu N, Okamoto T, Yoshida T, Nakao S, Urabe A, Nagasawa T, Asoo N, Ohno R, Ikeda Y, Sawada K, Hotta T, Kanamaru A, Bessho M, Kageyama S, Okamura T, Jinnai I, Kanakura Y, Mizoguchi H: Pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHuMGDF) augmented circulating platelet counts (PLT) in patients with aplastic anemia (AA) and myelodysplastic syndrome (MDS). 42th Annual Meeting of American Society of Hematology, San Francisco, USA, December 1-5, 2000 (Blood abs 96:1273, 2000)
- 21) Kirito K, Kashii Y, Uchida M, Toshima M, Endoh T, Sawada K, Ozawa K, Komatsu N: Forkhead family transcription factor FKHRL1 is expressed in human megakaryocytes and regulates cell cycling as a downstream molecule of TPO signaling. 42th Annual Meeting of American Society of Hematology, San Francisco, USA, December 1-5, 2000 (Blood abs 96:4308, 2000)
- 22) 西尾充史, 澤田賢一, 小泉和輝, 遠藤知之, 小池隆夫, 小田淳, 藤原満博, 池淵研二, 池田久實: Stem cell factor (SCF)はヒト赤芽球系前駆細胞の Fas を介したアポトーシスを抑制する, 厚生科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業), 厚生省重点研究事業, 平成11年度第2回合同班会議総会, 東京, 2000.1.21
- 23) 小野雄司, 藤本勝也, 山本聡, 遠藤知之, 高島英典, 長谷山美仁, 西尾充史, 小泉和輝, 澤田賢一, 小池隆夫, 田中伸哉: 生前診断が困難であった Primary effusion lymphoma (PEL)の一例, 第214回日本内科学会北海道地方会, 札幌, 2000.2.5
- 24) 皆内康一郎, 宮崎広亀, 山口悦郎, 川上義和, 高島英典, 小泉和輝, 澤田賢一, 清水道生: B-cell lymphoma を合併した angioimmunoblastic T-cell lymphoma の一例, 第214回日本内科学会北海道地方会, 札幌, 2000.2.5
- 25) 山本聡, 西尾充史, 小泉和輝, 藤本勝也, 遠藤知之, 高島英典, 橋本英明, 長谷山美仁, 澤田賢一, 小池隆夫: 再発造血器腫瘍に対する超大量化学療法時に, FCZ 抵抗性真菌症を併発した二例, 第1回真菌症フォーラム学術集会, 東京, 2000.3.4
- 26) 西尾充史, 澤田賢一, 小田淳, 小泉和輝, 遠藤知之, 藤原満博, 池淵研二, 池田久實, 小池隆夫: Stem cell factor (SCF) はヒト赤芽球系前駆細胞の Fas を介したアポトーシスを抑制する, 第37回日本臨床分子医学会学術総会, 東京, 2000.3.10-11
- 27) 西尾充史, 澤田賢一, 小田淳, 小泉和輝, 遠藤知之, 藤原満博, 池淵研二, 池田久實, 小池隆夫: Stem cell factor (SCF)はヒト赤芽球系前駆細胞の Fas を介したアポトーシスを抑制する, 第62回日本血液学会総会, 福岡, 2000.3.16-18 (日血会誌 71:113, 279, 2000)
- 28) 小泉和輝, 澤田賢一, 西尾充史, 遠藤知之, 高島英典, 長谷山美仁, 藤本勝也, 山本聡, 小池隆夫: APBSCT を施行した Subcutaneous panniculitic T-cell lymphoma の三症例, 第62回日本血液学会総会, 福岡, 2000.3.16-18 (日血会誌 71:163, 472, 2000)
- 29) 山口美樹, 平山文也, 金井誠, 佐藤典宏, 東寛, 澤田賢一, 小池隆夫, 池淵研二, 池田久實: ヒト骨髄初代培養ストローマ細胞と無血清培地を用いたヒト造血前駆細胞/幹細胞の増幅, 第62回日本血液学会総会, 福岡, 2000.3.16-18 (日血会誌 71:175, 516, 2000)
- 30) 遠藤知之, 澤田賢一, 藤本勝也, 山本聡, 高島英典, 長谷山美仁, 西尾充史, 小泉和輝, 小池隆夫: 凍結保



- 存細胞から純化を行い自家末梢血 CD34 陽性細胞選択移植を施行した悪性リンパ腫の一例、第 62 回日本血液学会総会、福岡、2000.3.16-18 (日血会誌 71:215, 667, 2000)
- 31) 長谷山美仁、澤田賢二、坂井俊哉、藤本勝也、山本聡、遠藤知之、高島英典、西尾充史、小泉和輝、小池隆夫：骨髓浸潤を伴わずに急激な自己免疫性血小板減少を起こしたホジキン病の一例、第 35 回日本血液学会北海道地方会、札幌、2000.4.22
  - 32) 坂井俊哉、山本聡、藤本勝也、遠藤知之、高島英典、長谷山美仁、西尾充史、小泉和輝、澤田賢二、小池隆夫、清水道生：SIADH を合併した多発性骨髄腫の一症例、第 215 回日本内科学会北海道地方会、札幌、2000.6.10
  - 33) 後藤明子、澤田賢二、坂井俊哉、藤本勝也、遠藤知之、高島英典、長谷山美仁、西尾充史、小泉和輝、小池隆夫：原発性副甲状腺機能亢進症を合併した IgD 型多発性骨髄腫の一例、第 216 回日本内科学会北海道地方会、札幌、2000.9.2
  - 34) 遠藤知之、澤田賢二、坂井俊哉、藤本勝也、山本聡、高島英典、長谷山美仁、西尾充史、小泉和輝、小池隆夫：移植前 HBs 抗体陽性で APBSCT 後に B 型肝炎を発症した多発性骨髄腫の 3 例、第 44 回日本輸血学会北海道支部会例会、札幌、2000.9.30
  - 35) 藤本勝也、澤田賢二、小泉和輝、坂井俊哉、山本聡、遠藤知之、高島英典、長谷山美仁、西尾充史、小池隆夫：血小板増多を呈した骨髄異形成症候群の骨髄 CD34 陽性細胞の検討、札幌、第 42 回日本臨床血液学会北海道地方会、2000.10.7
  - 36) 西尾充史、澤田賢二、坂井俊哉、藤本勝也、山本聡、遠藤知之、高島英典、長谷山美仁、小泉和輝、小池隆夫、高橋弘昌、田口和典：ハイリスクおよび再発乳がんに対する自家末梢血幹細胞移植(APBSCT)の治療成績、癌治療学会総会、仙台、2000.10.22-24
  - 37) 西尾充史、澤田賢二、小泉和輝、遠藤知之、高島英典、長谷山美仁、藤本勝也、坂井俊哉、河野通史、大西勝憲、佐藤典宏、池田久實、小池隆夫：自家末梢血幹細胞移植 (APBSCT) を施行した中高悪性度リンパ腫 (NHL) 28 例の予後因子の検討、第 42 回日本臨床血液学会総会、倉敷、2000.11.8-10
  - 38) 西尾充史、澤田賢二、小池隆夫：HAART が奏効した HIV 関連 motor neuron disease (MND) の一例、第 14 回日本エイズ学会学術集会、京都、2000.11.28-30
  - 39) 西尾充史、小泉和輝、遠藤知之、高島英典、長谷山美仁、藤本勝也、坂井俊哉、小池隆夫、澤田賢二：CD34 陽性細胞選択自家末梢血幹細胞移植 (CD34+ APBSCT) 後 1 ヶ月以内の T 細胞の回復の遅延により CMV 感染症が増加する、第 23 回日本造血細胞移植学会総会、京都、2000.12.8-9
  - 40) 山倉昌之、澤田賢二、藤本勝也、山本聡、西尾充史、遠藤知之、長谷山美仁、高島英典、坂井俊哉、小池隆夫：サイトメガロウイルス (CMV) 感染による血小板減少をきたした脾摘後特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) の一例、第 218 回日本内科学会北海道地方会、札幌、2001.2.17
  - 41) 遠藤知之、西尾充史、長谷山美仁、高島英典、小池隆夫、小田淳、澤田賢二：ヒト c-kit 陽性 CFU-E の SCF における apoptosis 抑制機序、厚生科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)、厚生省重点研究事業、平成 12 年度第 2 回合同班会議総会、東京、2000.1.25-26
- ### 3. 招請講演
- 1) 佐藤裕子：染色体解析への FISII/CGII 技法利用について。セキテクノトロン・バイオセミナー、東京都、1998年9月4日
  - 2) 佐藤裕子：TEL/ETV6 遺伝子再編成・欠失と白血病「Ets ファミリー癌遺伝子の生物学的機能」。佐々木研究所ワークショップ、東京都、1998年9月29日
  - 3) 佐藤裕子：血液腫瘍性疾患における染色体及び遺伝子異常。日本遺伝子研究所セミナー、仙台市、1998年12月21日
  - 4) 佐藤裕子：12p13 異常と TEL/ETV6 遺伝子異常及び 1p36 異常。東北大学加齢医学研究所セミナー、仙台市、1998年12月21日
  - 5) 佐藤裕子：Ph 陽性白血病における major, minor BCR/ABL mRNA 同時発現機構の解明。東京 CML 研究会、東京 (パレスホテル)、1999年10月2日
  - 6) 佐藤裕子：東京 CML 研究会臨床症例中間報告。東京 CML 研究会、東京 (パレスホテル)、2000年1月2日
  - 7) Sawada K., Oda A, Nishio M, Endo T, Koizumi K: Role of SCF in erythropoiesis. International Symposium on the Regulation of Hematopoiesis in Response to Environmental Stress. Sapporo, Japan, October 18-19, 2000
  - 8) 澤田賢二：自家末梢血純化造血幹細胞 (CD34 陽性細胞) 移植、第 38 回日本癌治療学会総会、仙台、2000.10.22
  - 9) Sawada K.: Altered responses of purified blast cells from the myelodysplastic syndromes to stem cell factor in vitro: comparison with normal blast cells. Biweekly Hematology/Oncology Laboratory Research Seminar, Nashville, TN, USA, December 9, 1999
  - 10) 澤田賢二：「HIV 感染症、医療現場における感染予防と対策を中心として」、函館脳神経外科病院院内勉強会、函館、1999.5.21
  - 11) 澤田賢二：教育講演、「HIV 感染症の医療現場における感染予防と対策について」、第 4 回職業感染対策研究会、札幌、1999.6.25
  - 12) 澤田賢二：「自己末梢血幹細胞移植の応用」、第 1 回 TEN TOPICS IN RHEUMATOLOGY-'99、札幌、1999.8.28
  - 13) 澤田賢二：自家末梢血幹細胞移植の新展開、日本医師会生涯教育講座、小樽、1999.11.11
- ### G. 私的所有権の取得状況
1. 特許取得  
現在のところ、取得なし。
  2. 実用新案登録  
現在のところ、取得なし。
  3. その他  
なし。

平成12年度：厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

## 分担研究報告書

representational difference analysis法を用いた  
血液腫瘍進展増悪因子遺伝子の研究  
(H10-ゲノム-007)

分担研究者： 澤 田 賢 一

(北海道大学大学院医学研究科・分子病態制御学講座)

### 研究要旨

本研究の目的は骨髄異形成症候群（MDS）における病勢増悪因子遺伝子を単離することである。我々は、これまでに、MDSはコロニー分析により、①増殖型＝白血病移行死と、②非増殖型＝骨髄不全死に大きく分類できること、また、増殖型においてはサイトカインのひとつである stem cell factor (SCF)が病勢進展に大きな役割を果たしていることを明らかにしてきた。しかし、SCFの病勢進展における機序の詳細については不明であり、病勢増悪因子遺伝子の単離における大きな障害となっていた。

今年度は、SCFが標的とする細胞内情報伝達分子を明らかにすることによって、病勢増悪因子遺伝子を単離するための分子細胞生物学的指標を得ることを目的とした。その結果、1) SCFはc-kitを介してヒト赤芽球系前駆細胞の細胞死を抑制すること、2) この生存シグナル伝達経路はsrc family kinaseを介するAKT活性化に依存していることを明らかにした。本知見をもとに、MDSや白血病における病勢増悪の細胞内情報伝達経路が明らかにされ、責任遺伝子の同定が促進されると考えられる。

### A. 研究目的

本研究の目的は骨髄異形成症候群（MDS）における病勢増悪因子遺伝子を単離することである。これを目的として、MDSの病勢進展において最も重要な役割を果たす細胞内分子の生物学的意義と責任分子の変異を明らかにすることに重点を絞って検討を進めた。MDSは多能性幹細胞の腫瘍性疾患であり、異常細胞の多段階発癌による白血病移行と無効造血による骨髄不全死を特徴とする。我々は、その病態の本質は「細胞死の制御機構の異常に基づく」と推論した。すなわち、細胞死からの逸脱は、異常増殖＝白血病死、細胞死の促進＝骨髄不全死となる。作業仮説を「両者に共通する細胞内情報伝達経路が存在する」とした。これまでの研究から、MDS芽球の増殖には、SCFが決定的な役割を果たしていることを明らかにしてきた。また、SCFは芽球（造血幹細胞）のFas/Fas-Lシステムによる細胞死(apoptosis)に拮抗すること、この生存シグナル伝達経路はsrc family kinaseを介するAKT活性化に依存していることを明らかにした。一方、SCFが正常造血において果たしている細胞内シグナルに関しては、検討系の欠如からほとんど解明されていない。

本研究では、我々が開発したヒトCD34陽性細胞

の大量純化法をもとに、赤芽球系前駆細胞(CFU-E)への系特異的分化・増殖誘導を行ない、これをモデルとして正常人の造血前駆細胞におけるSCFによる生存シグナル伝達経路を解析した。この際、SCF作用の特異性を明らかにするために、GPA<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup>細胞を純化して検討に供した。本研究における当方の分担は、ヒト造血幹細胞の生存におけるSCFの細胞内情報伝達分子を同定し、MDSの病勢進展における病的状態と対比することで、MDSの病勢進展における責任遺伝子とその変異の指標を明らかにすることである。

### B. 研究方法

顆粒球コロニー刺激因子を投与した健常人末梢血から、新たに開発した大量純化システム(Cytherapy 1:319, 1999)を用いてCD34<sup>+</sup>細胞を純化し、凍結・保存して以後の検討に用いた。純化ヒトCD34<sup>+</sup>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 ELISA キット (Cell Death Detection ELISA™, Boehringer Mannheim) を用い、cytosolic oligonucleosome 結合 DNA を定量した。また DNA 電気泳動により DNA 断片化を視覚的に確認した。アポトーシスの早期に細胞表面に出現するフォスファチジルセリンを AnnexinV を用いてフローサイトメーターで解析した。Day7 細胞から、抗 c-kit 抗体を用い MACS system で、GPA<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup>細胞を得た。また、Day7 細胞を EPO 単独でさらに 2 日間培養して GPA<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup>細胞を得た。CD34<sup>+</sup>細胞を、EPO の入らない条件下で 7 日間培養し、非赤芽球系細胞を得た。

### C. 研究成果

GPA<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup>細胞では、サイトカイン free では、4 時間日から 6 時間日にかけて、著明な DNA 断片化が認められた。この断片化は EPO や SCF によって明らかに抑制された。この SCF の効果は生理的濃度 (5ng/ml 前後) で認められた。一方、GPA<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup>細胞と非赤芽球系細胞では、サイトカインの有無に関わらず、24 時間以内の検討では DNA 断片化の増加を認めず、apoptosis に抵抗性であることが示唆された。GPA<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup>細胞を各種サイトカイン存在下で培養した後の、コロニー形成能を検討した。EPO や EPO+SCF ではコロニー形成能の著明な増加が認められた。サイトカイン free では、コロニー形成能が培養時間とともに有意に低下した。SCF は、これを阻止したが 24 時間目ではコロニーの減少が認められたことから、EPO の作用とは異なる一時的な作用であることが示唆された。

EPO と SCF は細胞内のシグナル伝達において Src family kinase である Lyn などの活性化を来すことが報告されている。そこで Src family kinase の特異的拮抗剤 PP2 を用いて、SCF の apoptosis 抑制作用を検討した。PP2 もしくはその非活性型 analog PP3 は EPO 存在下 (EPO もしくは EPO+SCF) による DNA 断片化の解除に影響を及ぼさなかった。しかし、PP2 は SCF による DNA 断片化の解除を完全に阻止する一方で、非活性型 analog PP3 にその働きは認められなかったことから SCF による生存シグナルは Src family kinase を介していることが示唆された。その下流分子を検討する目的で、Day7 細胞を DMSO および PI-3K の阻害剤である LY294002 で 15 分処理した後、SCF 100ng/ml を加えて時間毎の AKT のリン酸化を測定した。基剤である DMSO では 5~10 分をピークに AKT のリン酸化が認められたが、LY294002 は AKT のリン酸化を完全に阻害した。一方、PP2 の添加によっても同様の所見、AKT のリン酸化阻害が認められたことから SCF による生存シグナル伝達経路は src family kinase を介する AKT 活性化に依存していることが

示唆された。

### D. 考察と結論

骨髓異形成症候群 (MDS) の無効造血には apoptosis が関与していると考えられている。また、MDS に限らず再生不良性貧血など、様々な疾患において apoptosis が重要な役割を果たしていることが報告されている。しかし、その多くにおいて、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、apoptosis 抑制における SCF の役割についてその細胞内メカニズムを検討した。今回の報告で、SCF は src family kinase から PI-3K/AKT を介して c-kit<sup>+</sup>赤芽球系前駆細胞の apoptosis を抑制する機序が示唆された。これらの分子による生存経路は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おり、MDS の病勢進展における責任遺伝子とその変異の基本的分子である可能性が考えられた。

### E. 研究発表

#### (1) 論文発表

- 1) Endo T, Sakai T, Fujimoto K, Yamamoto S, Takashima H, Haseyama Y, Nishio M, Koizumi K, Koike T, Sawada K: A possible role for lamivudine as prophylaxis against hepatitis B reactivation in carriers of hepatitis B who undergo chemotherapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. Bone Marrow Transplant (in press)
- 2) Nishio M, Koizumi K, Moriwaka F, Koike T, Sawada K: Reversal of HIV associated motor neuron disease after highly active antiretroviral therapy (HAART). J Neurology (in press)
- 3) Endo T, Oda A, Haseyama Y, Nishio M, Koizumi K, Satoh I, Amasaki Y, Sato Y, Ikebuchi K, Ikeda H, Koike T, Sawada K: Stem cell factor protects c-kit positive human primary erythroid cells from apoptosis. Exp Hematol (in press)
- 4) Nishio M, Oda A, Koizumi K, Sato I, Sato Y, Endo T, Tsutsumi A, Fujihara M, Ikebuchi K, Ikeda H, Koike T, Sawada K: Stem cell factor prevents Fas-mediated apoptosis of human erythroid precursor cells with Src-family kinase dependency. Exp Hematol 29:19-29, 2001
- 5) Yamaguchi M, Hirayama F, Kanai M, Sato N, Fukazawa K, Yamashita K, Sawada K, Koike T, Kuwabara M, Ikeda H, Ikebuchi K: Serum-free coculture system for ex vivo expansion of human cord blood primitive progenitors and scid mouse-reconstituting cells using human bone marrow primary stromal cells. Exp Hematol 29:174-182, 2001
- 6) Oda A, Sawada K: Signal transduction in primary cultured human erythroid cells. J Hematotherapy & Stem Cell Res 9:417-423, 2000
- 7) Tsutsumi A, Ichikawa K, Matsuura E, Sawada K, Koike T: Heterogeneous behavior of anti-β2-glycoprotein I antibodies on various commercially available enzyme immunoassay plates coated with β2-glycoprotein I. J of Rheumatol 27:391-396, 2000
- 8) Ieko M, Ichikawa K, Atsumi T, Takeuchi R, Sawada

- K, Yasukouchi T, Koike T: Effects of  $\beta$ 2-glycoprotein I and monoclonal anticardiolipin antibodies on extrinsic fibrinolysis. *Sem Thrombos Hemostas* 26:85-90, 2000
- 9) Kashii Y, Kirito K, Tanaka M, Uchida M, Nishijima K, Ando T, Koizumi K, Endo T, Sawada K, Momoi M, Miura Y, Ozawa K, Komatsu N: A member of forkhead family transcription factor FKHRL1 is one of the downstream molecule of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt activation pathway in erythropoietin signal transduction. *Blood* 96:941-949, 2000
  - 10) Koizumi K, Nishio M, Endo T, Takashima H, Haseyama Y, Fujimoto K, Yamamoto S, Sato N, Ikebuchi K, Ikeda H, Koike T, Sawada K: Large scale purification of human blood CD34+ cells from cryopreserved peripheral blood stem cells, using a nylon-fiber syringe system and immunomagnetic microspheres. *Bone Marrow Transplant* 26:787-793, 2000
  - 11) Nishio M, Koizumi K, Endo T, Takahima H, Haseyama Y, Fujimoto K, Yamamoto S, Kobayashi H, Koike T, Sawada K: Effective high dose chemotherapy combined with CD34+ selected autologous peripheral blood stem cell transplantation in a patient with cutaneous CD30-negative large T cell lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 25:1315-1317, 2000
  - 12) Notoya A, Bohgaki T, Mukai M, Kohno M, Sato H, Sawada K: Splenomegaly and chronic disseminated intravascular coagulation in Osler-Weber-Rendu disease. *Am J Hematol* 65:315-318, 2000

## (2) 学会発表

### 招請講演

- 1) Sawada K, Oda A, Nishio M, Endo T, Koizumi K: Role of SCF in erythropoiesis. *International Symposium on the Regulation of Hematopoiesis in Response to Environmental Stress*. Sapporo, Japan, October 18-19, 2000
- 2) 澤田賢二: 自家末梢血純化造血幹細胞 (CD34 陽性細胞) 移植、第 38 回日本癌治療学会総会、仙台、2000.10.22

### 一般発表

- 1) Endo T, Oda A, Haseyama Y, Nishio M, Koizumi K, Sato I, Amasaki Y, Sato Y, Ikebuchi K, Ikeda H, Koike T, Sawada K: Stem cell factor protects c-kit positive human erythroid cells from apoptosis. *42th Annual Meeting of American Society of Hematology*, San Francisco, USA, December 1-5, 2000 (Blood abs 96:341, 2000)
- 2) Takashima H, Nishio H, Nishio M, Koizumi K, Oda A, Wakao H, Koike T, Sawada K: Molecular cloning and characterization of a novel human kruppel-associated box (KRAB) containing zinc finger protein, EKZ1 from human erythroid progenitor cells. *42th Annual Meeting of American Society of Hematology*, San Francisco, USA, December 1-5, 2000 (Blood abs 96:4277, 2000)
- 3) Komatsu N, Okamoto T, Yoshida T, Nakao S, Urabe A, Nagasawa T, Asoo N, Ohno R, Ikeda Y, Sawada K, Hotta T, Kanamaru A, Bessho M, Kageyama S, Okamura T, Jinnai I, Kanakura Y, Mizoguchi H: Pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHuMGDF) augmented circulating platelet counts (PLT) in patients with aplastic anemia (AA) and myelodysplastic syndrome (MDS). *42th Annual Meeting of American Society of Hematology*, San Francisco, USA, December 1-5, 2000 (Blood abs 96:1273, 2000)
- 4) Kirito K, Kashii Y, Uchida M, Toshima M, Endoh T, Sawada K, Ozawa K, Komatsu N: Forkhead family transcription factor FKHRL1 is expressed in human megakaryocytes and regulates cell cycling as a downstream molecule of TPO signaling. *42th Annual Meeting of American Society of Hematology*, San Francisco, USA, December 1-5, 2000 (Blood abs 96:4308, 2000)
- 5) 西尾充史、澤田賢二、小泉和輝、遠藤知之、小池隆夫、小田淳、藤原満博、池淵研二、池田久實: Stem cell factor (SCF) はヒト赤芽球系前駆細胞の Fas を介したアポトーシスを抑制する、厚生科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)、厚生省重点研究事業、平成 11 年度第 2 回合同班会議総会、東京、2000.1.21
- 6) 小野雄司、藤本勝也、山本聡、遠藤知之、高島英典、長谷山美仁、西尾充史、小泉和輝、澤田賢二、小池隆夫、田中伸哉: 生前診断が困難であった Primary effusion lymphoma (PEL) の一例、第 214 回日本内科学会北海道地方会、札幌、2000.2.5
- 7) 皆内康一郎、宮崎広亀、山口悦郎、川上義和、高島英典、小泉和輝、澤田賢二、清水道生: B-cell lymphoma を合併した angioimmunoblastic T-cell lymphoma の一例、第 214 回日本内科学会北海道地方会、札幌、2000.2.5
- 8) 山本聡、西尾充史、小泉和輝、藤本勝也、遠藤知之、高島英典、橋本英明、長谷山美仁、澤田賢二、小池隆夫: 再発造血器腫瘍に対する超大量化学療法時に、FCZ 抵抗性真菌症を併発した二例、第 1 回真菌症フォーラム学術集会、東京、2000.3.4
- 9) 西尾充史、澤田賢二、小田淳、小泉和輝、遠藤知之、藤原満博、池淵研二、池田久實、小池隆夫: Stem cell factor (SCF) はヒト赤芽球系前駆細胞の Fas を介したアポトーシスを抑制する、第 37 回日本臨床分子医学会学術総会、東京、2000.3.10-11
- 10) 西尾充史、澤田賢二、小田淳、小泉和輝、遠藤知之、藤原満博、池淵研二、池田久實、小池隆夫: Stem cell factor (SCF) はヒト赤芽球系前駆細胞の Fas を介したアポトーシスを抑制する、第 62 回日本血液学会総会、福岡、2000.3.16-18 (日血会誌 71:113, 279, 2000)
- 11) 小泉和輝、澤田賢二、西尾充史、遠藤知之、高島英典、長谷山美仁、藤本勝也、山本聡、小池隆夫: APBSCT を施行した Subcutaneous panniculitic T-cell lymphoma の三症例、第 62 回日本血液学会総会、福岡、2000.3.16-18 (日血会誌 71:163, 472, 2000)
- 12) 山口美樹、平山文也、金井誠、佐藤典宏、東寛、澤田賢二、小池隆夫、池淵研二、池田久實: ヒト骨髓初代培養ストローマ細胞と無血清培地を用いたヒト造血前駆細胞/幹細胞の増幅、第 62 回日本血液学会総会、福岡、2000.3.16-18 (日血会誌 71:175, 516, 2000)
- 13) 遠藤知之、澤田賢二、藤本勝也、山本聡、高島英典、長谷山美仁、西尾充史、小泉和輝、小池隆夫: 凍結保存細胞から純化を行い自家末梢血 CD34 陽性細胞選択移植を施行した悪性リンパ腫の一例、第 62 回日本血液学会総会、福岡、

- 2000.3.16-18 (日血会誌 71:215, 667, 2000)
- 14) 長谷山美仁、澤田賢一、坂井俊哉、藤本勝也、山本聡、遠藤知之
  - 15) 高島英典、西尾充史、小泉和輝、小池隆夫：骨髄浸潤を伴わずに急激な自己免疫性血小板減少を起こしたホジキン病の一例、第 35 回日本血液学会北海道地方会、札幌、2000.4.22
  - 16) 坂井俊哉、山本聡、藤本勝也、遠藤知之、高島英典、長谷山美仁、西尾充史、小泉和輝、澤田賢一、小池隆夫、清水道生：SIADH を合併した多発性骨髄腫の一症例、第 215 回日本内科学会北海道地方会、札幌、2000.6.10
  - 17) 後藤明子、澤田賢一、坂井俊哉、藤本勝也、遠藤知之、高島英典、長谷山美仁、西尾充史、小泉和輝、小池隆夫：原発性副甲状腺機能亢進症を合併した IgD 型多発性骨髄腫の一例、第 216 回日本内科学会北海道地方会、札幌、2000.9.2
  - 18) 遠藤知之、澤田賢一、坂井俊哉、藤本勝也、山本聡、高島英典、長谷山美仁、西尾充史、小泉和輝、小池隆夫：移植前 HBs 抗体陽性で APBSCT 後に B 型肝炎を発症した多発性骨髄腫の 3 例、第 44 回日本輸血学会北海道支部会例会、札幌、2000.9.30
  - 19) 藤本勝也、澤田賢一、小泉和輝、坂井俊哉、山本聡、遠藤知之、高島英典、長谷山美仁、西尾充史、小池隆夫：血小板増多を呈した骨髄異形成症候群の骨髄 CD34 陽性細胞の検討、札幌、第 42 回日本臨床血液学会北海道地方会、2000.10.7
  - 20) 西尾充史、澤田賢一、坂井俊哉、藤本勝也、山本聡、遠藤知之、高島英典、長谷山美仁、小泉和輝、小池隆夫、高橋弘昌、田口和典：ハイリスクおよび再発乳がんに対する自家末梢血幹細胞移植(APBSCT)の治療成績、癌治療学会総会、仙台、2000.10.22-24
  - 21) 西尾充史、澤田賢一、小泉和輝、遠藤知之、高島英典、長谷山美仁、藤本勝也、坂井俊哉、河野通史、大西勝憲、佐藤典宏、池田久實、小池隆夫：自家末梢血幹細胞移植 (APBSCT) を施行した中高悪性度リンパ腫 (NHL) 28 例の予後因子の検討、第 42 回日本臨床血液学会総会、倉敷、2000.11.8-10
  - 22) 西尾充史、澤田賢一、小池隆夫：HAART が奏効した HIV 関連 motor neuron disease (MND) の一例、第 14 回日本エイズ学会学術集会、京都、2000.11.28-30
  - 23) 西尾充史、小泉和輝、遠藤知之、高島英典、長谷山美仁、藤本勝也、坂井俊哉、小池隆夫、澤田賢一：CD34 陽性細胞選択自家末梢血幹細胞移植 (CD34+ APBSCT) 後 1 ヶ月以内の T 細胞の回復の遅延により CMV 感染症が増加する、第 23 回日本造血細胞移植学会総会、京都、2000.12.8-9
  - 24) 山倉昌之、澤田賢一、藤本勝也、山本聡、西尾充史、遠藤知之、長谷山美仁、高島英典、坂井俊哉、小池隆夫：サイトメガロウイルス (CMV) 感染による血小板減少をきたした脾摘後特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) の一例、第 218 回日本内科学会北海道地方会、札幌、2001.2.17
  - 25) 遠藤知之、西尾充史、長谷山美仁、高島英典、小池隆夫、小田淳、澤田賢一：ヒト c-kit 陽性 CFU-E の SCF における apoptosis 抑制機序、厚生科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)、厚生省重点研究事業、平成 12 年度第 2 回合同班会議総会、東京、2000.1.25-26

#### F. 私的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得・実用新案登録・その他

現在のところ、取得なし。

20000369

以降は雑誌に掲載された論文となりますので、  
P.1「研究報告書目次 5. 雑誌掲載論文(英文論文)」をご参照ください。

by altered blood flow following recovery of blood supply to the spleen. Although the extent of splenic dysfunction may be variable, it was thought the low-churner DIC was associated primarily with splenic infarction. The data showing improved coagulation factors by splenectomy is significant because, prior to splenectomy, it appeared that our patient might have been in a state of worsening microthrombotic owing to hyperfibrinolysis.

Vascular lesions in liver, spleen and myocardium and retroperitoneum. For patients presenting with Osler's disease, we should consider any condition not only in the vascular lesions, but should also investigate the possibility of a vascular lesion in every organ system as well as abnormalities in coagulation. Further, splenic infarction is common.

REFERENCES

1. Oler JG. Osler's family form of peripheral vascular disease with cerebral arteriosclerosis of the anterior and posterior cerebral arteries. *Ann Surg* 1912;2:110-17
2. Nagata M, Terasu AF, Cornwell PC. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: an etiopathologic study of 10 cases. *Am J Pathol* 1962;78:103-116
3. Tiller E, Deussen JF, Lisch P, Rapp W. Splenic infarction: hyperfibrinolysis and multiple thrombotic events. *Am J Med* 1977;63:46-51
4. Nagata M. Hemorrhagic telangiectasia. *Am J Pathol* 1962;78:117-121
5. Terasu J, Nagata M, Rapp W, Terasu CM. Hemorrhagic telangiectasia of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Arch Intern Med* 1976;136:144-148

6. Adams WW, Gilman D, Frost PP. Neurologic aspects of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Report of two cases. Arch Intern Med* 1975;135:167-168
7. Walker TG, Joseph H, Lewis CW. Hereditary hemorrhagic telangiectasia with neurovascular malformations. *Arch Intern Med* 1976;136:25-27
8. Haddadov K, Pender MK. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: a clinical syndrome. *Am J Surg* 1972;124:79-81
9. Jaffe V. Hemorrhagic telangiectasia. *Am J Pathol* 1961;77:587-593
10. Wessner MM. Hereditary hemorrhagic telangiectasia. In: *Practical Hematology: Clinical Hematology 2<sup>nd</sup> ed*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1971; p 1077-1082
11. Edman RM. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: an autosomal recessive. *Arch Int Med* 1974;134:377-378
12. Hogg CA. Hereditary hemorrhagic telangiectasia. A review. *Canad J Pathol* 1975;32:339-346
13. Harkin W, McCann D, Liu C, Vitek P, Williams J, Khan J, Coughlin C, Lange RM. A study of a hereditary telangiectasia (Osler-Weber-Rendu's disease) associated with cerebral arteriovenous malformation and thrombolyticity. *Thromb Haemostas* 1982;57:1-7
14. Epp RL. Hereditary hemorrhagic telangiectasia and thrombotic microangiopathy: a new clinical syndrome. *Am J Med* 1982;73:623-624
15. Epp RL, Murphy S, Epp RL, Williams S. Hereditary hemorrhagic telangiectasia and thrombotic microangiopathy: a new clinical syndrome. *Thromb Haemostas* 1983;57:362
16. Lerner SD. Osler's disease with isolated splenic infarction. *Am J Med* 1976;161:134-136
17. Haddadov K, Pender MK, Goad A, Cornwell PC. Hereditary hemorrhagic telangiectasia and pulmonary arteriovenous malformation. *Am J Med* 1972;52:421-424
18. Nagata M. Clinical spectrum of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Med* 1973;57:989-997