20010455

厚生科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

「ゲノミクス技術を用いた不応性貧血の病態解明」に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間 野 博 行

平成14(2002)年3月

厚生科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

「ゲノミクス技術を用いた不応性貧血の病態解明」に関する研究

平成13年度　総括・分担研究報告書

主任研究者　　間野　博行

平成14（2002）年　3月

目　次

総括研究報告書概要 ---------- 1

総括研究報告書 ---------- 4
「ゲノミクス技術を用いた不応性貧血の病態解明」に関する研究
間野　博行

分担研究報告書
溝口　秀昭 ---------- 7
石坂　幸人 ---------- 8

研究成果の刊行に関する一覧表 ---------- 10

研究成果の刊行物・別刷 ---------- 15

様式A（4）

厚生科学研究費補助金研究報告書

平成 14 年 3 月 28 日

厚生労働大臣 坂口 力 殿

住　所 〒320-0003栃木県宇都宮市豊郷台2-14-9
フリガナ マノ ヒロユキ
研究者 氏　名 間野 博行
(所属機関 自治医科大学)

平成 13 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）に係る研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究課題名（課題番号）：ゲノミクス技術を用いた不応性貧血の病態解明（H12-ゲノム-015）

国庫補助金精算所要額 ：金 50,000,000 円也

厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版

（1）研究費の名称=厚生科学研究費補助金

（2）研究事業名=ヒトゲノム再生医療等研究事業

（3）研究課題名=「ゲノミクス技術を用いた不応性貧血の病態解明」に関する研究（総括研究報告書）

（4）国庫補助金精算所要額（円）=50,000,000

（5）研究期間（西暦）=2001

（6）研究年度=2001

（7）主任研究者名=間野博行（自治医科大学医学部）

（8）分担研究者名=溝口秀昭（東京女子医科大学医学部），石坂幸人（国立国際医療センター研究所）

（9）研究目的=不応性貧血は赤血球を含む各種血球の慢性減少を特徴とする疾患であり、白血球減少に伴う感染症に対する治療や、赤血球・血小板の減少に対する成分輸血をしばしば必要とする。本症は末梢血中の血球減少にもかかわらず患者骨髄中の造血細胞数はむしろ正常～増加することが多く、「無効造血」と呼ばれる特徴的な病態を呈する。不応性貧血は造血幹細胞のクローン性異常に起因すると考えられているが、その具体的な分子メカニズムは未だ全く不明のままである。本疾患の年間発症率は人口 10 万人あたり 60 歳台で約 10 人、80 歳台で約 100 人と高齢化に伴い急速に上昇し、本邦における高齢者の主要な血液疾患の一つとなっている。治療法も他家骨髄移植以外に有効な方法が無く、発症時の年齢から骨髄移植の適応外であることが殆どである。さらに本疾患の一部は急性白血病へと移行する事が知られており、不応性貧血から移行した白血病の多くは薬剤耐性である。したがって今後の本邦人口のさらなる高齢化を考慮すると、不応性貧血の病態解明、診断及び治療法の開発は血液内科学に限らず今日の医学研究の急務の一つであるといえる。

ヒトゲノムプロジェクトの結果得られた遺伝子情報を元に DNA チップなどを用いた疾患解析が可能となってきた。しかし単純に患者骨髄細胞を用いて DNA チップによる比較を行った場合、各個人間の骨髄構成細胞のポピュレーションの違いが大きいため「偽陽性」な結果を得ることが殆どである。そこで真に不応性貧血の臨床にフィードバック可能な情報を得るため、我々は本研究計画において不応性貧血を含めた各種血液疾患患者より、疾患の種類によらず分化レベルがほぼ均一である造血幹細胞分画のみを大規模に収集する造血幹細胞バンク「Blast Bank」を設立する。これら純化した造血幹細胞間で DNA チップ解析及びプロテオミクス解析を行うことによって、偽陽性の極めて少ない効率的なゲノミクス解析が可能になり、世界に先駆けた病態解明が行われると期待される。本研究計画の具体的な目標として、不応性貧血の(1)分子診断、(2)発症機構の解明、(3)薬剤耐性獲得機構の解析、及び(4)新たなアプローチによる治療法の開発を目指す。

（10）研究方法=造血幹細胞特異的マーカーである AC133 に対するアフィニティカラムを用いて、不応性貧血を含む各種特発性血液疾患患者骨髄より造血幹細胞分画を純化保存し、これを Blast Bank と名付けた。平成 14 年 3 月現在で 300 例を越えるサンプルの保存に成功している。また実際の実験に用いる DNA チップとして、将来的にフローサイトメトリーを用いる簡便な診断法を開発することを目指してヒト細胞膜蛋白をコードする遺伝子をスポットしたカスタム DNA チップを作製した。本チップとヒト転写因子をコードする遺伝子をスポットした DNA チップの 2 者、計約 2400 個の遺伝子に関して発現解析を行った。またヒト遺伝子約 12,000 個を配置した Affymetrix 社 GeneChip も解析に用いた。Blast Bank の細胞よりトータル RNA を抽出し、これを T7 RNA ポリメラーゼを用いてまず in vitro にて増幅した。さらにこれをもとに二本鎖 cDNA を合成し、ビオチン結合 CTP の存在下で再び T7 RNA ポリメラーゼと反応させることで、ビオチン標識化した complementary RNA（cRNA）を作製した。この biotin-cRNA を DNA チップとハイブリダイズさせ、洗浄後、抗ビオチン-ラビット抗体と反応させた。さらに Cy3 結合抗ラビットグロブリン抗体と反応させることで、ビオチン標識化した complementary RNA（cRNA）を作製した。この biotin-cRNA を DNA チップとハイブリダイズさせ、洗浄後、抗ビオチン-ラビット抗体と反応させた。さらに Cy3 結合抗ラビットグロブリン抗体と反応させることで DNA チップ上の cRNA 結合スポットを蛍光標識した。DNA チップは Affymetrix 社の蛍光スキャナーで励起させ、各スポットの蛍光強度を測定した後統計処理を GeneSpring 3.2（Silicon Genetics 社）にて行った。

（11）結果と考察=まず、不応性貧血と de novo 急性骨髄性白血病（AML）との鑑別診断を目指した。不応性貧血はしばしば AML 用への病態へと変化し、抗癌剤に抵抗性であるが、一般の AML は化学療法に反応性が比較的良好である。したがって高齢者の白血病を診た場合、その患者が de novo の AML なのか不応性貧血由来なのかを判別することは治療法の選択の上からも極めて重要である。しかしながら現段階では両者の鑑別は細胞の形態異常に頼っており、しばしば困難である。そこで我々は白血化した不応性貧血と de novo AML とを鑑別する新たな分子マーカーの同定を試みた。Blast Bank に属する進行期の不応性貧血患者 5 例と de novo AML5 例のサンプルを我々の DNA チップを用いて比較したところ、Delta/Notch ファミリーに属する Dlk 遺伝子が前者に特異的に高発現することが明らかになった。Dlk はこれまで血球での発現は知られておらず、むしろ骨髄間質細胞表面において発現し造血幹細胞の自己複製と分化抑制に必須であるとされてきた。したがって Dlk が不応性貧血患者血球で高発現する事実は、Dlk が単に診断のマーカーと

なるだけでなく、不応性貧血の最大の特徴である「無効造血」の成因に関与する可能性を示唆する。まずDlkの疾患特異的発現を確認するためBlast Bankに属する不応性貧血患者22例、AML31例のサンプルを用いて定量的real-time PCR法を行った。その結果、前者で12例に、また後者で3例にDlkの高発現が確認された。また後者の3例の内、2例においては不応性貧血の特徴である細胞の形態異常が著明であり、恐らく不応性貧血が白血化した症例であると予想された。以上よりDlkは世界で初めての不応性貧血特異的分子マーカーの候補となると考えられた。現在我々は一回膜貫通型蛋白であるDlkの細胞外領域を認識する抗体を作成し、フローサイトメトリー（FACS）による不応性貧血診断法の開発を目指している。FACSによる診断が可能となればDlkの臨床的意義は極めて重要なものになるといえよう。Dlkが不応性貧血患者の造血幹細胞で高発現することは同疾患の発症機構への関与の面からも興味深い。現在不応性貧血の成因としてのDlkの意義をin vivoにおいて検証するために、Dlk発現トランスジェニックマウスを作成し造血異常の有無を確認中である。一方Dlkの「分化抑制能」を考えると、Dlk機能をブロックすることで不応性貧血患者骨髄細胞を正常の分化へと誘導できると期待される。そこでDlkの細胞外領域に結合しその機能を抑制するペプチドを同定中である。具体的にはまず、細胞表面にランダムな12アミノ酸を発現している大腸菌のプールよりパンニング法にてリコンビナントDlk蛋白質に結合する大腸菌を同定し、さらにそれらクローンが発現するペプチド配列を同定する。これらペプチドの中で高親和性にDlkに結合し、しかもその機能を抑制するものを不応性貧血患者骨髄細胞を用いたコロニーアッセイ法などにより同定している。さらに我々は、不応性貧血の病初期と進行期のBlast Bankサンプルを比較することで病期進行メカニズムの解明を目指した。不応性貧血32例および健常人2例のバンク細胞をカスタムDNAチップを用いて比較した結果、遺伝子A（特許申請中）が健常人および不応性貧血初期において高発現しており、疾患の悪性化と共に発現が低下することが明らかになった。しかも同遺伝子を血液細胞株に導入すると著明な細胞死が誘導され、遺伝子Aががん抑制遺伝子として機能することが明らかになった。同遺伝子の発現低下は、全く新しい不応性貧血の病期進行メカニズムとして注目される。また同遺伝子の病期特異的発現変化は定量的real-time PCR法によっても確認された。現在遺伝子Aについては遺伝子破壊マウスを作成中であり、不応性貧血の疾患モデルマウスの確立を目指している。

（12）結論=本年度の研究結果より、Blast Bank細胞を用いることで臨床医学に直接フィードバック可能な遺伝子情報が効率よく得られることが確認された。次年度は不応性貧血の他のテーマでの解析を行うと共に、Affymetrix社の全ヒト遺伝子が配置された新しいGeneChipシステムを用いて解析遺伝子数を増大させ、スクリーニング範囲の更なる拡大を目指す。

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
「ゲノミクス技術を用いた不応性貧血の病態解明」に関する研究

主任研究者：　　間野　博行　　自治医科大学・医学部・教授

研究要旨：不応性貧血とは骨髄が正常〜過形成であるにも拘わらず末梢血の血球成分が減少する慢性疾患であり、造血幹細胞の異常に基づく「無効造血」が病態の本質であると考えられている。本疾患の発症率は高齢化と共に急速に増大するが現在のところ有効な治療法は無く、診断自体も未だ不明確な点が多い。我々は本研究計画において不応性貧血の分子診断法の開発、病態解明、及び新しい治療法の開発を目指して以下のようゲノミクス・プロテオミクス研究計画を遂行した。まず不応性貧血の本態が以上造血幹細胞クローンであることに着目し、各種特発性造血障害患者骨髄より広く造血幹細胞分画のみを純化し保存する「Blast Bank」を設置した。本細胞を用いて DNA チップ解析を行うことにより、各患者の骨髄中の構成細胞の違いなどに影響されない、偽陽性の少ないゲノミクス解析が可能になると期待された。本サンプルを用いて不応性貧血由来の白血病と de novo 急性骨髄性白血病との鑑別診断マーカーの同定、及び不応性貧血の病期進行メカニズムの解明などに成功した。

分担研究者
溝口秀昭　東京女子医科大学血液内科・教授
石坂幸人　国立国際医療センター研究所・部長

A　研究目的

不応性貧血は赤血球を含む各種血球の慢性減少を特徴とする疾患であり、白血球減少に伴う感染症に対する治療や、赤血球・血小板の減少に対する成分輸血をしばしば必要とする。本症は末梢血中の血球減少にもかかわらず患者骨髄中の造血細胞数はむしろ正常〜増加することが多く、「無効造血」と呼ばれる特徴的な病態を呈する。不応性貧血は造血幹細胞のクローン性異常に起因すると考えられているが、その具体的な分子メカニズムは未だ全く不明のままである。本疾患の年間発症率は人口 10 万人あたり 60 歳台で約 10 人、80 歳台で約 100 人と高齢化に伴い急速に上昇し、本邦における高齢者の主要な血液疾患の一つとなっている。治療法も他家骨髄移植以外に有効な方法が無く、発症時の年齢から骨髄移植の適応外であることが殆どである。さらに本疾患の一部は急性白血病へと移行する事が知られており、不応性貧血から移行した白血病の多くは薬剤耐性である。したがって今後の本邦人口のさらなる高齢化を考慮すると、不応性貧血の病態解明、診断及び治療法の開発は血液内科学に限らず今日の医学研究の急務の一つであるといえる。
ヒトゲノムプロジェクトの結果得られた遺伝子情報を元に DNA チップなどを用いた疾患解析が可能となってきた。しかし単純に患者骨髄細胞を用いて DNA チップによる比較を行った場合、各個人間の骨髄構成細胞のポピュレーションの違いが大きいため「偽陽性」な結果を得ることが殆どである。そこで真に不応性貧血の臨床にフィードバック可能な情報を得るため、我々は本研究計画において不応性貧血を含めた各種血液疾患患者より、疾患の種類によらず分化レベルがほぼ均一である造血幹細胞分画のみを大規模に収集する造血幹細胞バンク「Blast Bank」を設立する。これら純化した造血幹細胞間で DNA チップ解析及びプロテオミクス解析を行うことによって、偽陽性の極めて少ない効率的なゲノミクス解析が可能になり、世界に先駆けた病態解明が行われると期待される。本研究計画の具体的な目標として、不応性貧血の(1)分子診断、(2)発症機構の解明、(3)薬剤耐性獲得機構の解析、及び(4)新たなアプローチによる治療法の開発を目指す。

B　研究方法

1）造血幹細胞特異的マーカーである CD133 に対するアフィニティカラムを用いて、不応性貧血を含む各種特発性血液疾患患者骨髄より造血幹細胞分画を純化保存し、これを Blast Bank と名付けた。平成 14 年 3 月現在で 300 例を越えるサンプルの保存に成功している。また実際の実験に用いる DNA チップとして、将来的にフローサイトメトリーを用いる簡便な診断法を開発することを目指してヒト細胞膜蛋白をコードする遺伝子をスポットしたカスタム DNA チップを作製した。本チップとヒト転写因子をコードする遺伝子をスポットした DNA チップの 2 者、計約 2400 個の遺伝子に関して発現解析を行った。またヒト遺伝子約 12,000 個を配置した Affymetrix 社 GeneChip も解析に用いた。
2）Blast Bank の細胞よりトータル RNA を抽出し、これを T7 RNA ポリメラーゼを用いてまず in vitro にて増幅した。さらにこれをもとに二本鎖 cDNA を合成し、ビオチン結合 CTP の存在下で再び T7 RNA ポリメラーゼと反応させることで、ビオチン標識化した complementary RNA（cRNA）を作製した。この biotin-cRNA を DNA チップとハイブリダイズさせ、洗浄後、抗ビオチン−ラビット抗体と反応させた。さらに Cy3 結合抗ラビットグロブリン抗体と反応させ

ることで、ビオチン標識化した complementary RNA（cRNA）を作製した。この biotin-cRNA を DNA チップとハイブリダイズさせ、洗浄後、抗ビオチン-ラビット抗体と反応させた。さらに Cy3 結合抗ラビットグロブリン抗体と反応させることで DNA チップ上の cRNA 結合スポットを蛍光標識した。DNA チップは Affymetrix 社の蛍光スキャナーで励起させ、各スポットの蛍光強度を測定した後統計処理を GeneSpring 3.2 (Silicon Genetics 社)にて行った。

3）ランダムペプチドを細胞表面に発現する大腸菌ライブラリーを用いてリコンビナント Dlk 蛋白に結合する蛋白質のスクリーニングを行った。

（倫理面への配慮）

本研究計画は三省庁合同指針に準拠した自治医科大学の倫理委員会の認可を受けており、患者さんには研究計画の説明とサンプルの提供を希望する説明書をお渡しし、同意書に署名をいただいている。

C　研究成果

1）まず、不応性貧血と de novo 急性骨髄性白血病（AML）との鑑別診断を目指した。不応性貧血はしばしば AML 用への病態へと変化し、抗癌剤に抵抗性であるが、一般の AML は化学療法に反応性が良好である。したがって高齢者の白血病を診た場合、その患者が de novo の AML なのか不応性貧血由来なのかを判別することは治療法の選択の上からも極めて重要である。しかしながら現段階では両者の鑑別は細胞の形態異常に頼っており、しばしば困難である。そこで我々は白血化した不応性貧血と de novo AML とを鑑別する新たな分子マーカーの同定を試みた。Blast Bank に属する進行期の不応性貧血患者 5 例と de novo AML5 例のサンプルを我々の DNA チップを用いて比較したところ、Delta/Notch ファミリーに属する Dlk 遺伝子が前者に特異的に高発現することが明らかになった。Dlk はこれまで血球での発現は知られておらず、むしろ骨髄間質細胞表面において発現し造血幹細胞の自己複製と分化抑制に必須であるとされてきた。したがって Dlk が不応性貧血患者血球で高発現する事実は、Dlk が単に診断のマーカーとなるだけでなく、不応性貧血の最大の特徴である「無効造血」の成因に関与する可能性を示唆する。まず Dlk の疾患特異的発現を確認するため Blast Bank に属する不応性貧血患者 22 例、AML31 例のサンプルを用いて定量的 real-time PCR 法を行った。その結果、前者で 12 例に、また後者で 3 例に Dlk の高発現が確認された。また後者の 3 例の内、2 例においては不応性貧血の特徴である細胞の形態異常が著明であり、恐らく不応性貧血が白血化した症例であると予想された。以上より Dlk は世界で初めての不応性貧血特異的分子マーカーの候補となると考えられた。現在我々は一回膜貫通型蛋白である Dlk の細胞外領域を認識する抗体を作成し、フローサイトメトリー（FACS）による不応性貧血診断法の開発を目指している。FACS による診断が可能となれば Dlk の臨床的意義は極めて重要なものになるといえよう。

2）Dlk が不応性貧血患者の造血幹細胞で高発現することは同疾患の発症機構への関与の面からも興味深い。現在不応性貧血の成因としての Dlk の意義を in vivo において検証するために、Dlk 発現レトロウィルスを感染させた骨髄細胞による造血再構築マウスを作成中である。また Dlk 発現トランスジェニックマウスも作成し、不応性貧血の疾患モデルマウスの樹立を目指す。

Dlk の「分化抑制能」を考えると、Dlk 機能をブロックすることで不応性貧血患者骨髄細胞を正常の分化へと誘導できると期待される。そこで Dlk の細胞外領域に結合しその機能を抑制するペプチドを同定中である。具体的にはまず、細胞表面にランダムな 12 アミノ酸を発現している大腸菌のプールよりパンニング法にてリコンビナント Dlk 蛋白質に結合する大腸菌を同定し、さらにそれらクローンが発現するペプチド配列を同定する。これらペプチドの中で高親和性に Dlk に結合し、しかもその機能を抑制するものを不応性貧血患者骨髄細胞を用いたコロニーアッセイ法などにより同定している。

3）次に我々は、不応性貧血の病初期と進行期の Blast Bank サンプルを比較することで病期進行メカニズムの解明を目指した。不応性貧血 32 例および健常人 2 例のバンク細胞をカスタム DNA チップを用いて比較した結果、遺伝子 A（特許申請中）が健常人および不応性貧血初期において高発現しており、疾患の悪性化と共に発現が低下することが明らかになった。しかも同遺伝子を血液細胞株に導入すると著明な細胞死が誘導され、遺伝子 A ががん抑制遺伝子として機能することが明らかになった。同遺伝子の発現低下は、全く新しい不応性貧血の病期進行メカニズムとして注目される。また同遺伝子の病期特異的発現変化は定量的 real-time PCR 法によっても確認された。現在遺伝子 A については遺伝子破壊マウスを作成中であり、不応性貧血の疾患モデルマウスの確立を目指している。

D　結論および考察

本年度の研究結果より、Blast Bank 細胞を用いることで臨床医学に直接フィードバック可能な遺伝子情報が効率よく得られることが確認された。次年度は不応性貧血の他のテーマでの解析を行うと共に、Affymetrix 社の全ヒト遺伝子が配置された新しい GeneChip システムを用いて解析遺伝子数を増大させ、スクリーニング範囲の更なる拡大を目指す。

E　　健康危険情報

無し

F　　研究発表

1. Okutomi, K., Ohmine, K., Ueno, S., Ueda, M., Ota, J., Yamashita, Y., Yoshida, K., Teramura, M., Ozawa, K., Mizoguchi, H., and Mano, H.: DNA microarray analysis of multiple myeloma with purified CD138+ plasma cells. Blood, in press.
2. Yoshida, K., Ueno, S., Iwao, T., Yamasaki, S., Tsuchida, A., Ohmine, K., Ueda, M., Yamashita, Y., Ota, J., Chayama, K., Sato, K., and Mano, H.: Identification of pancreatic ductal carcinoma-specific genes by DNA microarray with ductal cells of normal- and cancer-origin. Cancer Res., in press.
3. Ohki, R., Yamamoto, K., Mano, H., Lee, R.T., Ikeda, U., and Shimada, K.: Identification of mechanically induced genes in human monocytic cells by DNA microarrays. J. Hypertens., in press.
4. Makishima, H., Ishida, F., Ito, T., Kitano, K., Ueno, S.-i., Ohmine, K., Yamashita, Y., Ota, J., Ota, M., Yamauchi, K., and Mano, H.: DNA microarray analysis of T-cell type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. Br. J. Haematol., in press.
5. Yokohari, K., Yamashita, Y., Okada, S., Ohya Ki, K., Oda, S., Hatano, M., Mano, H., Hirasawa, H., and Tokuhisa, T.: Isoform-Dependent Interaction of BRDG1 with Tec Kinase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 289: 414-420, 2001.
6. Yamashita, Y., Kajigaya, S., Yoshida, K., Ueno, S., Ota, J., Ohmine, K., Ueda, M., Miyazato, A., Ohya, K., Kitamura, T., Ozawa, K., and Mano, H.: Sak serine/threonine kinase acts as an effector of Tec tyrosine kinase. J. Biol. Chem. 276: 39012-39020, 2001.
7. Takahashi, M., Nishihira, J., Shimpo, M., Mizue, Y., Ueno, S., Mano, H., Kobayashi, E., Ikeda, U., and Shimada, K.: Macrophage migration inhibitory factor as a redox-sensitive cytokine in cardiac myocytes. Cardiovasc. Res. 52: 438-445, 2001.
8. Tago, K., Funakoshi, M., Mano, H., Yanagisawa, K., Hayakawa, M., Kuroiwa, K., Iwahana, H., Kasahara, T., and Tominaga, S.: Presence of a genistein-responsive inhibitory mechanism on interleukin-1 alpha-induced NF-kappaB activation. Eur. J. Biochem. 268: 6526-6533, 2001.
9. Ohmine, K., Ota, J., Ueda, M., Ueno, S.-i., Yoshida, K., Yamashita, Y., Kirito, K., Imagawa, S., Nakamura, Y., Saito, K., Akutsu, M., Mitani, K., Kano, Y., Komatsu, N., Ozawa, K., and Mano, H.: Characterization of stage progression in chronic myeloid leukemia by DNA microarray with purified hematopoietic stem cells. Oncogene 20: 8249-8257, 2001.
10. Miyazato, A., Ueno, S., Ohmine, K., Ueda, M., Yoshida, K., Yamashita, Y., Kaneko, T., Mori, M., Kirito, K., Toshima, M., Nakamura, Y., Saito, K., Kano, Y., Furusawa, S., Ozawa, K., and Mano, H.: Identification of myelodysplastic syndrome-specific genes by DNA microarray analysis with purified hematopoietic stem cell fraction. Blood 98: 422-427, 2001.
11. Kano, Y., Akutsu, M., Tsunoda, S., Mano, H., Sato, Y., Honma, Y., and Furukawa, Y.: In vitro cytotoxic effects of a tyrosine kinase inhibitor STI571 in combination with antileukemic agents. Blood 97: 1999-2007, 2001.
12. Bony, C., Roche, S., Ueno, S., Sasaki, T., Crackower, M.A., Penninger, J., Mano, H., and Puceat, M.: A specific role of phosphatidylinositol 3-kinase γ: a regulation of autonomic Ca^{2+} oscillation in cardiac cells. J. Cell. Biol. 152: 717-727, 2001.

G　　知的所有権の取得状況

「骨髄異形成症候群(MDS)の検出方法及び MDS の治療剤」　　特願 2000-85153

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

ゲノミクス技術を用いた不応性貧血の病態解明

分担研究者 溝口秀昭 東京女子医科大学血液内科教授

研究要旨 不応性貧血の末梢血および骨髄中のT細胞レパトアを解析した。解析した11例のすべてにおいてオリゴクローナルなT細胞が認められた。シクロスポリン投与が奏功した症例では、血球数改善後に一部のT細胞クローンの消失を認めた。免疫抑制療法に対する反応性と個々の症例における造血幹細胞の遺伝子発現との関係について、DMAチップを用いて解析中である。

A. 研究目的

不応性貧血(Refractory anemia: RA)は造血幹細胞における何らかの遺伝子異常が原因となり、発症する血液疾患と考えられている。また、半数以上の症例でシクロスポリンや抗胸腺細胞グロブリンなどの免疫抑制剤投与により、血球数が改善することが明らかにされている。このことは、本症の病態に免疫学的機序が関与していることを示していると考えられる。本研究は本症における免疫学的病態について明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

11例のRA症例を対象とした。患者より末梢血、骨髄細胞を採取し、RT-PCR·SSCP 法にて T 細胞レセプター(TCR) β鎖の complementarity determining region 3 (CDR3) 領域のレパトア解析を行った。また、T 細胞のクローナルな増殖を認めた Vβ遺伝子については、そのCDR3領域の塩基配列、アミノ酸配列を決定した。

(倫理面への配慮)

骨髄および末梢血の提供を受けた患者については本研究の目的を説明し、文書にて同意を得た。

C. 研究結果

患者末梢血(11 例)および骨髄(10 例)を解析した結果、全例でオリゴクローナルな T 細胞の存在を示すバンドが認められた。また、10 例中 3 例では末梢血より骨髄において、より著明なバンドが認められた。シクロスポリンが有効であった症例では、治療後に一部の Vβ subfamily において、オリゴクローナルな T 細胞の存在を示すバンドの消失が認められた。

D. 考察

RAにおいてはオリゴクローナルなT細胞が末梢血、骨髄内に存在すること、免疫抑制療法による血球改善例では一部の T 細胞クローンの消失が認められることから本疾患にみられる血球減少には疾患特異的T細胞が関与している可能性が考えられる。今後、免疫抑制療法の有効性と患者の造血幹細胞の遺伝子発現との関連についてDMAチップを用いて解析を進め、本症の免疫学的病態をさらに明らかにする予定である。

E. 結論

RA では骨髄および末梢血中にオリゴクローナルな T 細胞が存在し、RA の血球減少症に深く関与していると考えられる。

F. 研究発表

学会発表

Analysis of T cell receptor V repertoire in patients with myelodysplastic syndrome.
(International Society for Experimental Hematology, 2002 発表予定)

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム再生医療等研究事業）
分担研究者　石坂幸人　国立国際医療センター研究所

不応性貧血症例の骨髄細胞を用いて行われた DNA チップ解析により、dlk 遺伝子の過剰発現が本疾患の病態と密接に関連している知見が得られた。本研究では、dlk 遺伝子産物を検出するためのシステムを構築する事を目的としている。本年度は、ネイテイブな dlk 蛋白質に反応する単クローン抗体の作成を試みた。一方、HIV アクセサリー遺伝子産物 VPR に由来するペプチドが、細胞の培養液中に添加されるだけで、効率よく胞体内に取り込まれることを見出した。さらに、このペプチドを付加したβ-ガラクトシラーゼをヒト臍帯血由来蛋白球細胞の培養液中に添加することにより、同蛋白質の活性を効率良く標的細胞に誘導させることが可能となった。今後、VPR 由来ペプチドをベクターとして用いた細胞療法の可能性を明らかにし、dlk 遺伝子の発現阻害を誘導することによる新たな治療法開発の可能性を探りたいと考えている。

A. 研究目的

DNA チップを用いた解析により、不応性貧血症例由来 AC133 陽性骨髄細胞では、健常人由来骨髄細胞と比較して、dlk 遺伝子が数倍高い発現を示すことが見出された。Dlk 遺伝子の発現は、細胞分化に対して阻害的に作用するとの報告があることから、dlk 遺伝子の発現による造血幹細胞の分化異常が不応性貧血の原因の一つとして考えられる。本分担研究では、dlk の不応性貧血病態における役割を明らかにする目的で、dlk 遺伝子産物を検出するためのシステムの開発と、dlk 遺伝子標的による新たな治療法確立に向けた試みを行う。

B. 研究方法

細胞外ドメインをコードする Dlk 遺伝子 cDNA を PCR で増幅させ、酵母蛋白質発現ベクターである pICZa ベクターに組み込んだ。得られたプラスミドを SMD1168 細胞にエレクトロポレーション法にて導入し、ゼオシン存在下に培養後、薬剤耐性株を選択した。各クローンについて、メタノールによる蛋白質発現誘導を行い、高発現を示すクローンを選び、大量培養系に移した。このシステムでは、リコンビナント蛋白質は、培養液中に分泌されることから、培養液を硫安沈殿にて濃縮し、カラムクロマトグラフィーにて精製し、抗原として供した。一方、９６アミノ酸からなる VPR の内、C-末端１８個のアミノ酸を欠失した C-末側２７アミノ酸からなるペプチド（以下 C45delta18）をビオチン標識し、ヒト臍帯血由来単核球細胞の培養液中に添加した。翌日、細胞を固定し、0.02%の Triton X-100 で処理した後、ストレプトアビジン結合 FITC を作用させることにより、胞体内に取り込まれたペプチドを検出した。また、市販されているβ-ガラクトシラーゼ蛋白質を用いて、C45delta18 を-s-s-結合を用いて複合体を作成し、臍帯血細胞に作用させ、酵素活性能の有無を FDG（Molecular Probe 社製）を基質として、FACS による測定を行った。

（倫理面への配慮）

ヒト臍帯血を採取する際の妊婦への説明と同意は、当センター倫理委員会が示した方法に従った。

C. 研究結果

1. dlk に反応する単クローン抗体産生ハイブリドーマは得られなかった。
2. VPR 由来ペプチドは、高率にヒト臍帯血由来単核球細胞に取り込まれた。
3. 同ペプチドを用いることにより、９０％以上の臍帯血細胞に対して β-ガラクトシラーゼ活性が誘導された。

D. 考察

ハイブリドーマを得るために行った今回の免疫は、３週間という比較的短期間で行った。その

ため、成熟した B 細胞の誘導が十分でなかった可能性がある。今後、あらたに抗原を用意し、４－５ヶ月免疫した後に、再びハイブリドーマの作成を試みる。

VPR 由来ペプチドが効率良く、細胞内に取り込まれることが明らかになった。無血清培地で４日間培養し、静止期に導入された細胞も、このペプチドを効率良く取り込むことから、このペプチドが造血幹細胞に対する新しい形質転換ベクターとして機能することが期待される。また、β-ガラクトシラーゼの分子量は、約５４０kDa であることから、C45delta18 が巨大な分子をも胞体内に運搬できる究めて興味深い特性を備えていることが想像される。今後は、C45delta18 を核酸に結合させ、蛋白質と同様、胞体内に運搬し得るか否かを検討したい。核酸としては siRNA を用いる。約２０塩基の二重鎖 RNA は安定で、かつ蛋白質への翻訳阻害が強力に誘導されることが知られている。Dlk 遺伝子の開始コドンの近傍に対して C45delta1-siRNA を作用させ、造血幹細胞に対する細胞療法の可能性を明らかにする予定である。

E．結論

1. dlk のリコンビナント蛋白質を酵母蛋白質発現システムを用いて発現・精製した。
2. HIV アクセサリー遺伝子 VPR 由来ペプチドに、形質転換ベクターとしての機能が見出された。

F．健康危険情報　特記すべきことなし。

G．研究発表

1.　論文発表

1. Mishima, T., Yuko Mishima, Y., Terui, Y., Katsuyama, M., Yamada, M., Mori, M., Ishizaka, Y., Ikeda, K., Watanabe, J., Mizunuma, N., Hayasawa, H., and Hatake, K.: Resistance mechanisms of CD13/Aminopeptidase-N to apoptosis mediated by endothelial cells. J. Natl. Cancer Inst., in press.
2. Mori M., Terui, Y., Tanaka, M., Ymizuka, H., Mishima, Y., Ikeda, M., Kasahara, T., Uwai, M., Ueda, M., Inoue, R., Itoh, T., Yamada, M., Hayasawa, H., Furukawa, Y., Ishizaka, Y., Ozawa, K., and Hatake, K. Antitumor effect of b2-microglubulin in leukemic cell-bearing mice via apoptosis-inducing activity: activation of caspase-3 and nuclear factor-kB. Cancer Res., 61, 4414-4417, 2001.
3. Shimura, M., and Ishizaka, Y., Inhibition by quercetin of micronuclei formation via VPR, an accessory gene of HIV. Recent Res, Devel. Cancer 3, 1-5, 2001.

2.　学会発表

1. Kotani, S., Shimura, M., Tanaka, H., Yasuda, H., Ishizaka, Y. : Binding to D-box Motif by Vpr, an Accessory Gene of Human Immunodeficiency Virus, Leading to Perturbation of APC Activities with Delayed Mitosis and Precocious Sister Chromatid Separation. Cell cycle meeting, 2001 May, Salk, USA.
2. 志村まり、石坂幸人: HIV アクセサリー遺伝子 Vpr による細胞分裂異常　第６０回日本癌学会総会. 2001 年 10 月、横浜.
3. 田口　崇、志村まり、石坂幸人: HIV アクセサリー遺伝子 Vpr に相同性を示す蛋白質の同定. 第２４回日本分子生物学会年会. 2001 年 12 月. 横浜.
4. 溝口　出、志村まり、大沢宣明、石坂幸人: RET 結合ペプチド（RBP-1）を用いた RET 発現細胞への選択的遺伝子導入　第２４回日本分子生物学会年会. 2001 年 12 月. 横浜.
5. 志村まり、石坂幸人: HIV アクセサリー遺伝子 Vpr による細胞分裂異常　第２４回日本分子生物学会年会. 2001 年 12 月. 横浜.

H．知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得　　無
2. 実用新案登録　　無
3. その他　　無

研究成果の刊行に関する一覧表

間野　博行

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Miyazato, A, et al.	Identification of myelodysplastic syndrome-specific genes by DNA microarray analysis with purified hematopoietic stem cell fraction.	Blood	98(2)	422-427	2001
Kano, Y, et al.	In vitro cytotoxic effects of a tyrosine kinase inhibitor STI571 in combination with antileukemic agents.	Blood	97(7)	1999-2007	2001
Yamashita, Y, et al.	Sak serine/threonine kinase acts as an effector of Tec tyrosine kinase.	J. Biol. Chem.	276(42)	39012-39020	2001
Yokohari, K, et al.	Isoform-Dependent Interaction of BRDG1 with Tec Kinase.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	289	414-420	2001
Ohmine, K, et al.	Characterization of stage progression in chronic myeloid leukemia by DNA microarray with purified hematopoietic stem cells.	Oncogene	20	8249-8257	2001
Takahashi, M, et al.	Macrophage migration inhibitory factor as a redox-sensitive cytokine in cardiac myocytes.	Cardiovasc. Res.	52	438-445	2001

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
間野博行	DNAチップを用いた再生不良性貧血と不応性貧血との鑑別法.	血液・腫瘍科	43(4)	304-310	2001
間野博行	DNAチップ-その現況と将来.	今日の移植	14(5)	649-654	2001

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tago, K, et al.	Presence of a genistein-responsive inhibitory mechanism on interleukin-1 alpha-induced NF-kappaB activation.	Eur. J. Biochem.	268	6526-6533	2001
間野博行	DNAチップによる悪性リンパ腫の解析.	Annual Review 血液 2002		121-127	2002
間野博行	DNAチップ.	蛋白質　核酸　酵素	46(16)	2625-2629	2001
間野博行	DNAチップによるリンパ腫解析.	臨床医	27(12)	2654-2656	2001
間野博行	DNAチップによる血液疾患の解析.	臨床血液	42(9)	671-679	2001
間野博行	本態性高血圧と心不全に関するマイクロアレイ.	ゲノム医学	1(2)	45-50	2001

研究成果の刊行に関する一覧表

溝口　秀昭

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表紙名	巻号	ページ	出版年
Motomura S, et al.	Successful treatment by high-dose methylprednisolone associated with an increment in CD68-positive cellsin bone marrow.	Am J Hematol	66(2)	80-84	2001
Yoshinaga K, et al.	Anti-lymphoma effect of naproxen and indomethacin in a patient with relapsed diffuse large B-cell lymphoma.	Am J Hematol	66	220-223	2001
Higaki Y, et al.	Granzyme-B-containing lymphocyte involvement in epidermal injury in graft-versus-host disease.	Dermatology	202	94-98	2001
Wang H, et al.	Relative increase of granulocytes with a paroxysmal nocturnal haemoglobinuria phenotype in aplastic anaemia patients : the high prevalence at diagnosis.	Eur J Haematol	66	200-205	2001
Muramatsu M, et al.	Reversible integration of the dominant negative retinoid receptor gene for *ex vivo* expansion of hematopoietic stem / progenitor cells.	BBRC	285	891-896	2001
Shimamoto T, et al.	Successful treatment with cyclosporin a for myelodysplastic syndrome with erythroid hypoplasia associated with T-cell receptor gene rearragements.	Br J Haematol	114	358-361	2001
Nakazato H, et al.	TEL/MN1 fusion in a *de novo* acute myeloid leukemia-M2 patient who showed strong resistance to treatment.	Br J Haematol	113	1079-1081	2001

別紙5

研究成果の刊行に関する一覧表

石坂　幸人

書籍

著者氏名	論文タイトル	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社	出版地	出版年	ページ
Shimura, M., and Ishizaka, Y.	Inhibition by quercetin of micronuclei formation via VPR, an accessory gene of HIV.	Pandalai. S.G.	Recent Res, Devel. Cancer	Transworld Research Networ	India	2001	1-5

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Mori M., Terui, Y., Tanaka, M., Ymizuka, H., Mishima, Y., Ikeda, M., Kasahara, T., Uwai, M., Ueda, M., Inoue, R., Itoh, T., Yamada, M., Hayasawa, H., Furukawa, Y., Ishizaka, Y., Ozawa, K., and Hatake, K.	Antitumor effect of b2-microglubulin in leukemic cell-bearing mice via apoptosis-inducing activity: activation of caspase-3 and nuclear factor-kB.	Cancer Res.	61	4414-4417	2001
Mishima, T., Yuko Mishima, Y., Terui, Y., Katsuyama, M., Yamada, M., Mori, M., Ishizaka, Y., Ikeda, K., Watanabe, J., Mizunuma, N., Hayasawa, H., and Hatake, K.:	Resistance mechanisms of CD13/ Aminopeptidase-N to apoptosis mediated by endothelial cells.	J. Natl Cancer Inst			in press.

20010455

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。