

厚生科学研究費補助金
特定疾患対策研究事業

骨髄異形成症候群に対する新規治療法の開発に関する研究

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 平井 久丸

平成 14 年 (2002) 3 月

目 次

I. 総括研究報告

- 骨髓異形成症候群に対する新規治療法の開発に関する研究
東京大学医学部附属病院血液腫瘍内科 平井 久丸 1

II. 分担研究報告

1. 骨髓異形成症候群に対する新規治療法の開発に関する研究
東京大学医学部附属病院血液腫瘍内科 平井 久丸 9
2. 骨髓異形成症候群における免疫抑制剤の作用機序に関する研究
京都大学医学部血液病態学 内山 卓 12
3. 骨髓異形成症候群患者の T細胞レパトアに関する研究
東京女子医科大学血液内科 寺村 正尚 14
4. 治療関連 MDS・白血病における遺伝的背景と遺伝子変異
名古屋大学大学院医学研究科臨床感染統御学 直江 知樹 16
5. 骨髓異形成症候群に対する新規治療法の開発に関する研究
自治医科大学ゲノム機能研究部 間野 博行 18
6. 白血病関連転写因子 TEL の赤芽球分化に果たす役割
獨協医科大学血液内科 三谷 絹子 21

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 25

IV. 研究成果の刊行物・別刷 27

I . 総括研究報告

骨髄異形成症候群に対する新規治療法の開発に関する研究

主任研究者 平井 久丸 東京大学医学部附属病院血液腫瘍内科 助教授

研究要旨

骨髄異形成症候群(以下 MDS)は、汎血球減少と急性骨髄性白血病(AML)への進展を伴う予後不良の難治性造血障害である。本研究では MDS の病態の解明とこれに基づく新規治療法の開発を目的として、(1)ゲノム解析技術を駆使した分子遺伝学的アプローチ、(2)造血関連転写因子遺伝子の異常を標的としたアプローチ、および(3)MDS 発症における自己免疫機序に着目した分子免疫学的アプローチにより以下の研究を行った。(1)では MDS に特異的に認められる転座型の染色体異常 t(1;7)転座、t(1;3)転座についてその転座切断点を同定し、さらに t(1;7)転座については、同転座が 1 番および 7 番染色体動原体に存在するアルフォイド配列 D1Z7 および D7Z1 の相同組み換えにより生ずることを明らかにした。また造血器腫瘍における幹細胞相当分画を純化精製して保存する「Blast Bank」を構築し、これを用いたマイクロアレイ解析により MDS 特異的に発現の亢進を認める遺伝子 Dlk を同定した。さらに de novo および二次性 MDS/AML における転写因子遺伝子を含む遺伝子変異の解析により、両者の発症において抗腫瘍剤の代謝に関連する遺伝子の多型頻度をはじめとする遺伝学的背景に差異が認められることを明らかにした。(2)においては、造血関連転写遺伝子 TEL が赤芽球分化に及ぼす機能を明らかにした。また、MDS モデルマウスの確立を目的として、MDS への関与が示されている転写因子遺伝子 AML1 および Evi-1 遺伝子について遺伝子改変マウスの作成を行った。(3)に関しては、PCR/SSCP を用いた MDS 患者検体の TCR レパトアの解析により、低リスク MDS の症例の骨髄および末梢血に oligoclonal な T 細胞集団が存在すること、またその一部が免疫抑制療法により消失しうることを示した。これにより、MDS における自己免疫異常の存在を分子免疫学的にとらえる手法を確立するとともに、MDS に対する新たな免疫抑制療法確立のための基盤整備を行った。

分担研究者

- ・ 内山 卓
京都大学医学部血液内科 教授
- ・ 寺村正尚
東京女子医科大学血液内科 講師
- ・ 直江知樹
名古屋大学大学院医学研究科
感染制御学 教授
- ・ 間野博行
自治医科大学ゲノム機能研究部 教授
- ・ 三谷絹子
獨協医科大学血液内科 教授

A. 研究目的

骨髄異形成症候群（以下、MDS）は多系統に及ぶ造血障害と白血病への移行を特徴とするヘテロな難治性疾患群である。本症の予後は一般に不良であり、多くの症例は種々の治療に抵抗して急性骨髄性白血病(以下 AML)への進展ないし汎血球減少による重篤な感染症や出血により不帰の転帰をとる。MDS はとくに高齢者を中心として近年増加の一途を辿っており、その病態の解明と有効な治療法の確立が急務となっている。治療という観点からは、造血幹細胞移植法が現在本症に対して治療が期待できる唯一の治療手段であるが、本法は治療関連死亡が高く、また MDS が高齢者に好発することを考えると、今後迎える高齢化

社会においてはさらに副作用や合併症の少ない生理的な治療法の開発が必要である。一方、MDS の病態についても、造血幹細胞の分化・増殖の異常、アポトーシス異常、転写因子異常、癌遺伝子や癌抑制遺伝子の変異、免疫学的異常など多くの可能性が指摘されてはいるものの、未だにその本質的な発症機序は解明されておらず、有効な治療法の開発に結びつく成果は少ないのが現状である。このような現状に鑑み、本研究では、治療法の開発に役立つと考えられる新たな視点から、「ゲノム解析技術を用いたアプローチ」「血球分化に関わる転写因子レベルからのアプローチ」および「分子免疫学的アプローチ」により、MDS の病因や病態に深くかかわる分子を探索し、これらの分子を標的とした MDS の新規診断技術・治療法の開発研究を行うことを目的とした。

(倫理面への配慮)

検討に用いた検体は、全て、診療上必要な臨床検査のために採取した残余の検体を、当該患者のインフォームドコンセントを得たのちに連結可能匿名化を施して検討に用いた。

B. 研究方法

(1) 「ゲノム解析技術をもちいたアプローチ」

①MDS に共通して認められる特徴的な染色体異常において変異を受ける遺伝子を明らかにすることを試みた。すなわち、MDS で認められる転座型の異常、t(1;7)転座および t(1;3)転座について、整列化された PAC/BAC クローンをを用いた FISH 法により各転座切断点を同定し、切断点近傍にあると予測される責任遺伝子の単離を行う。また本症で高頻度に認められる欠失型の異常である 7q-、5q- および 20q- に関しては、ゲノムアレイを用いて多数の MDS 症例の欠失解析を行い、欠失の最小

共通領域を同定したのち、当該領域より標的となる構造遺伝子を単離する(平井)。もう一つのゲノムからのアプローチとしては、②近年開発されたマイクロアレイ技術を用いて MDS 特異的に発現の異常をきたす遺伝子群の同定を行う。すなわち MDS、MDS に由来する AML、および de novo AML 検体について AC133 抗体ビーズを用いて造血幹細胞関連分画を純化した「Blast Bank」を構築し、得られた AC133 陽性細胞分画についてマイクロアレイによる発現プロファイルの比較・解析を行うことにより、MDS の細胞において特異的に発現の異常をきたしている遺伝子、あるいは AML への進展に関与する可能性のある遺伝子を網羅的に同定することを試みる。また、このようにして明らかにされた特定の遺伝子を用いた「MDS 診断チップ」の開発を行う(間野)。さらに③de novo MDS(/AML)と放射線・化学療法に続発する二次性 MDS(/AML)について、種々の転写因子遺伝子、癌遺伝子、癌抑制遺伝子、および薬剤代謝関連遺伝子の遺伝子多型・遺伝子変異を解析・比較検討し、両者の発症における遺伝的背景の相違という観点から MDS の病因・病態の解明にアプローチする(直江)。

(2) 「血球分化に関わる転写因子レベルからの解析」

造血細胞の分化に本質的な役割を担うことが明らかにされている造血関連転写因子群の異常を PCR/SSCP 法とマイクロアレイ解析を用いて網羅的に同定する。さらに MDS における細胞の分化障害の分子機序を明らかにするという観点からは、造血系の構築に必須の機能を果たしていると考えられる転写因子 TEL の分子レベルでの転写機能の制御機構について、近年注目されている種々の核内蛋白との相互作用に焦点を当てて解析を行う(三谷)。以上の研究で MDS 発症への関与が示唆

された遺伝子異常、および既に MDS への関与が示されている遺伝子について、発生工学的手法を用いて当該遺伝子異常をマウスに再構築することにより MDS モデルマウスを確立し、MDS に対する新規治療法の開発に資するとともに、MDS の病態の個体レベルでの解明を目指す(平井)。

(3)「分子免疫学的アプローチ」：MDS には再生不良性貧血と鑑別困難な一群が存在し、これらに対してはシクロスポリン療法が有効であることが報告されている。そこで本研究では、MDS 患者の骨髄および末梢血における TCR レパトアの解析、PNH 顆粒球の検索および HUMARA 法による造血系のクロナリティの解析を行うことにより、MDS の発症における自己免疫異常の病態解析を行う。さらに特発性造血器障害に関する研究班と共同で「低リスク MDS に対するシクロスポリン療法」に関する多施設共同研究を行うとともに、シクロスポリン療法を施行された MDS 患者における同様な TCR レパトアおよび造血系のクロナリティの動態解析、治療効果と HLA との相関解析を行い、免疫抑制療法の効果に影響を及ぼす因子の解明を行うとともに、より効果的な免疫抑制療法の開発を行う(寺村、内山)。

C. 研究結果

(1) MDS に認められる染色体異常のゲノム解析

MDS に認められる染色体異常のうち、本年度は転座型の異常である t(1;7)転座および t(1;3)転座について解析を行った。すなわち、各転座に関与する染色体上の整列化された PAC/BAC クローンをプローブとして FISH 法により各染色体転座の転座切断点を同定した。t(1;7)転座においては転座の切断点は 1 番染色体動原体のアルフォイド領域 D1Z7 と

7 番染色体動原体のアルフォイド領域 D7Z1 に存在することを明らかにするとともに、D1Z7 および D7Z1 プローブを用いた FISH 法による t(1;7)転座の分子診断法を確立した。また、本転座による MDS 発症のメカニズムとしては、これらのアルフォイド領域における切断点の相対的位置が症例毎に大きく異なることから、転座点近傍の遺伝子の構造的な変化よりもむしろ転座によって生ずる遺伝子の量的異常(1q+ないし 7q-)が MDS の発症に重要であると考えられた。t(1;3)転座に関しては、切断点を含む 1 番、3 番各染色体の BAC/PAC クローンの全塩基配列の決定を行い、転座の標的となる構造遺伝子の探索が進行中である(平井)。

(2) MDS 特異的な遺伝子の発現異常の解析

間野らは、まず AC133 抗体ビーズを用いて造血器腫瘍の造血幹細胞相当分画を純化し保存する「Blast Bank」を構築し、既に 300 検体以上の AC133 純化細胞の保存に成功した。ついで同 Bank の MDS 検体および de novo AML 検体を用いてマイクロアレイにより約 2400 個の遺伝子について発現プロファイルの解析を行った。MDS と de novo AML における発現プロファイルの比較解析により MDS 特異的に発現する遺伝子の候補として Delta/Notch ファミリーに属する Dlk 遺伝子を同定した。Dlk 遺伝子の発現を RT-PCR により検討したところ、MDS では 22 例中 12 症例に Dlk 遺伝子の発現が認められたが、AML においては 31 例中 3 例に発現を認めたのみで、発現を認めた 3 例についても 2 例は MDS から進展したと考えられる AML であった。このことより Dlk 遺伝子の発現は MDS に特異的であり、その成因にも関与している可能性が示唆された。

(3) また直江らは、放射線療法・化学療法後に続発する二次性 MDS/AML と de novo

MDS/AML における遺伝学的背景について比較検討した。二次性 MDS/AML では de novo MDS/AML に比べて、NQO1 遺伝子のコーディング領域における function-less 変異型が多く認められた(24%、Odds ratio 2.26、 $p=0.002$) が、GSTM1、GSTT1、MPO の多型には差を認めなかった。また、MLL 遺伝子再構成、p53 変異、AML1 変異、予後不良染色体異常は de novo MDS/AML に比べて二次性 MDS/AML により多く認めたが、N-RAS 点突然変異は同程度、FLT3 遺伝子の変異はより少なかった。

(4)造血関連転写因子遺伝子の解析

MDS 検体を用いて血球分化に関与する転写因子遺伝子の変異を網羅的に解析する研究については、解析対象とする遺伝子の検討、マイクロアレイ作成の準備等の基盤整備を行った(平井)。一方、三谷らは転写因子 TEL が赤芽球分化に及ぼす効果をフレンド細胞(MEL 細胞)に TEL およびその変異体を遺伝子導入することにより検討した。その結果、①TEL は HMBA あるいは DMSO が誘導する赤芽球分化を促進すること、②TEL は N 末に存在する HLH 領域でコリプレッサー mSin3A と結合すること、③HLH 領域を欠いた欠失変異体(-HLH)は TEL の示す ETS 結合領域を介する転写抑制能を示さず、しかも TEL の転写抑制能をドミナント・ネガティブに抑制すること、さらに、④-HLH 変異体は、TEL の赤芽球分化促進効果もドミナント・ネガティブに抑制することが明らかとなった。

(5)MDS モデルマウスの開発については、既に MDS への関与が示されている AML1 遺伝子および Evi-1 遺伝子に関して、条件的 AML1 遺伝子欠失マウスおよび GATA1 プロモーターによる Evi-1 トランスジェニックマウスの作成に成功しており、現在これらのマウスの造血系における表現型の解析が進行中である

(平井)。

(6)MDS における分子免疫学的機序の検討において、寺村らは、RT-PCR/SSCP 法により TCRV β 鎖のレパトア解析を行った11例のRA全例において TCR のクロナリティーを示唆する oligoclonal なバンドが検出されること、またシクロスポリンが奏功した1例ではこれらのバンドの一部が消失することを確認し、低リスク MDS における自己免疫機序の関与を分子免疫学的に明らかにした。一方、内山らによる MDS における自己免疫異常とシクロスポリン療法の有効性に関する研究については、「低リスク MDS に対するシクロスポリン療法」の多施設共同研究が進行中であることから、本年度は来年度以降の研究の基盤整備として、①抗体を用いた特定の TCR レパトアの検出法の確立、②多重染色によるそれら T 細胞の表面抗原解析技術の開発、③磁気ビーズ法を併用した T リンパ球の分離法の検討、および④抗原提示細胞として樹状細胞を用いた ELISPOT 法の確立を行った。

D. 考察

(1)本解析の結果、t(1;7)(p11;q11)転座の切断点は、両染色体動原体上の2つのアルフォイドクラスター、D1Z7 および D7Z1 の間で生ずることが示された。一方、上記(2)の結果より各染色体における転座の切断点の位置は症例毎に異なっており、数 Mb におよぶ各アルフォイドクラスター内に広く分布していると推定されることから、現在のところ本転座による MDS の発症機序としては、転座による切断点近傍の遺伝子の構造変化よりも、転座の結果生ずる染色体の量的異常(7q-ないし1q+)が想定された。D1Z7 および D7Z1 は同じアルフォイドサブファミリーに属し、互いに極めて高い相同性を有することから、本不均衡転座の生ずるメカニズムとして、DNA

複製後に一組の娘染色体間で D1Z7/D7Z1 の相同組み換えを生じ、これが正常の染色体分配機構に基づいて娘細胞に分配されるモデルが推定された。また D1Z7・D7Z1 プローブを用いた間期核 FISH 法による t(1;7)転座の分子診断が可能となり今後臨床応用が期待される。t(1;3)転座については切断点を含む PAC クローンの全塩基配列の決定がほぼ完了し、次年度以降、転座の標的遺伝子の同定を試みる。

(2) マイクロアレイを用いた MDS の発現解析では、数千～数万の遺伝子に関する発現変化を比較的簡便に解析することが可能となり、これまでは鑑別診断が困難であった血液疾患の診断に役立つ新たな分子マーカーの同定に有用であると期待される。また、AC133 で純化した「Blast Bank」の細胞は MDS の病期に関わらず分化レベルがほぼ均一であり、異なった病期のサンプルを DNA チップにより比較・検討することで、偽陽性が少なく精度の高い解析が可能になると考えられる。今回「Blast Bank」を用いた MDS マイクロアレイ解析により、MDS 特異的に発現を認める遺伝子として Dlk を同定した。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 MDS 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、MDS 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。これまでの検討では Dlk 発現の MDS における特異性は極めて高く、今後 MDS の優れた分子マーカーとなる可能性があり、さらに検討を重ねる予定である。

(3) de novo MDS/AML と二次性 MDS/AML における遺伝子変異・遺伝子多型の比較検討からは、両者の発症病態に遺伝的背景の差異

が存在することが示唆された。とくに二次性 MDS/AML においては抗癌剤代謝酵素の一つである NQO1 の機能的喪失を伴う多型が de novo の病型に比して有意に高い頻度で観察されたことから、抗腫瘍剤の使用と MDS/AML 発症との間の興味深い関連が想定された。特定の遺伝子多型と遺伝学的不安定性という観点からも今後更なる研究の発展が期待される。

(4) 血球分化に関わる転写因子レベルからの MDS の病態解析に関して、本年度は転写因子 TEL の赤芽球分化における機能の解析を行った。TEL を遺伝子導入することにより HMDB および DMSO によるフレンド細胞の赤芽球への分化が促進されることから、TEL が赤芽球の分化に重要な役割を果たしていることが示唆された。TEL はその HLH を介してホモダイマーあるいはヘテロダイマーを形成することが知られているが、今回の研究からこの HLH ドメインは転写のコリプレッサー mSin3A との結合にも関与し、TEL の赤芽球分化の促進に重要な役割を果たしていることが示唆された。

(5) MDS の分子免疫学的解析により、低リスク MDS において、自己の造血前駆細胞に反応する T 細胞集団の存在を示唆する実験結果が得られたことから、MDS における自己免疫機序の関与に興味を持たれる。しかしながら MDS の病態における自己免疫の役割を明確にするためには MDS で認められる oligoclonal な T 細胞集団が実際に自己の造血前駆細胞を認識して障害しているのか、そうであるとするとその標的分子は何であるかを明らかにすることが必要であると思われる。また、シクロスポリンをはじめとした免疫抑制剤の投与によるこれらの T 細胞集団の動態変化の解析、またそれらと免疫抑制剤への反応性との関連を明らかにしていくことは、

MDS の自己免疫機序の解明にとって本質的であり、MDS に対するより効果的な免疫抑制療法の確立を目指す本研究班の次年度以降の重要な課題である。

E. 結論

MDS に対する新規治療法の開発に関する初年度の研究として、(1)t(1;7)転座およびt(1;3)転座の転座切断点の同定と転座点周辺のゲノム構造の解析、(2)「Blast Bank」の構築とマイクロアレイ解析による MDS 特異的発現異常を示す遺伝子「Dlk」の同定、(3)二次性 MDS/AML と de novo MDS/AML の遺伝学的背景の相違に関する検討、(4)造血関連転写遺伝子 TEL の赤芽球分化に及ぼす機能の解析、(5)MDS 動物モデルの確立を目的とした AML1 および Evi-1 に関する遺伝子改変マウスの作成、および(6)MDS における自己免疫機序の解析を目的とした TCR レパトアの解析と自己免疫異常の解析法の検討を行った。本年度の研究を通じて MDS の発症に関与する可能性のある新規遺伝子の同定、MDS の新規分子診断法の開発、MDS における造血関連転写因子遺伝子の異常の同定、および MDS の自己免疫機序の解明、等に関する重要な成果が得られており、次年度以降の研究の展開に興味を持たれる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Izutsu K, Kurokawa M, Imai Y, Maki K, Mitani K, Hirai H. The corepressor CtBP interacts with Evi-1 to repress transforming growth factor β signaling. *Blood* 97:2815-2822, 2001.

2. Imai Y, Kurokawa M, Izutsu K, Hangaishi A, Maki K, Ogawa S, Chiba S, Mitani K, Hirai H. Mutations of the Smad4 gene in acute myelogenous leukemia and their functional implications in leukemogenesis. *Oncogene* 20:88-96, 2001.

3. Shimizu K, Chiba S, Saito T, Kumano K, Takahashi T, Hirai H. Manic fringe and lunatic fringe modify different sites of the Notch2 extracellular region, resulting in different signaling modulation. *J. Biol. Chem.* 276:25753-25758, 2001

4. Miyazawa K, Nishimaki J, Ohyashiki K, Enomoto S, Kuriya S, Fukuda R, Hotta T, Teramura M, Mizoguchi H, Uchiyama T, Omine M. Vitamin K₂ therapy for myelodysplastic syndromes (MDS) and post-MDS acute myeloid leukemia: information through a questionnaire survey of multi-center pilot studies in Japan. *Leukemia* 1156-1157, 2000

5. Naoe T, Tagawa Y, Kiyoi H, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Kusumoto S, Shimazaki C, Saito K, Akiyama H, Motoji T, Nishimura M, Shinagawa K, Ueda R, Saito H, Ohno R. Prognostic significance of the null genotype of glutathione S-transferase-T1 in patients with acute myeloid leukemia: increased early death after chemotherapy. *Leukemia* 16:203-208, 2002

6. Kosugi H, Ito M, Yamamoto Y, Towatari M, Ito M, Ueda R, Saito H, Naoe T. In vivo effects of a histone deacetylase inhibitor, FK228, on human acute promyelocytic leukemia in

NOD/Shi-scid/scid mice. *Jpn. J. Cancer Res.* 92:529-536, 2001

7. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kadera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Saito H, Ueda R, Ohno R, Naoe T. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 97:2434-2439, 2001

8. Ohmine K, Ota J, Ueda M, Ueno S, Yoshida K, Yamashita Y, Kirito K, Imagawa S, Nakamura Y, Saito K, Akutsu M, Mitani K, Kano Y, Komatsu N, Ozawa K, Mano H. Characterization of stage progression in chronic myeloid leukemia by DNA microarray with purified hematopoietic stem cells *Oncogene* 20:8249-8257, 2001.

9. 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, Mano H. Identification of myelodysplastic

syndrome-specific genes by DNA microarray analysis with purified hematopoietic stem cell fraction *Blood* 98:422-427, 2001.

10. Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Mano H, Sato Y, Honma Y, Furukawa Y. In vitro cytotoxic effects of a tyrosine kinase inhibitor STI571 in combination with antileukemic agents *Blood* 97:1999-2007, 2001.

11. Tadokoro J, Nakamura Y, Furusawa S, Mitani K. Low frequency of BCL10 gene mutations in B-cell Non-Hodgkin's lymphoma. *Int. J. Hematol* 73:222-225, 2001.

12. Nakamura Y, Nakazato H, Sato Y, Furusawa S, Mitani K. Expression of the *TEL/EVI1* fusion transcript in a patient with chronic myelogenous leukemia with t(3;12)(q26;p13). *Am. J. Hematol* 69:80-82, 2001

H. 知的財産権の出願・登録状況

「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

Ⅱ. 分担研究報告書

骨髄異形成症候群に対する新規治療法の開発に関する研究

主任研究者 平井 久丸 東京大学医学部附属病院血液腫瘍内科 助教授

研究要旨

骨髄異形成症候群(MDS)に認められる予後不良の不均衡型染色体転座 $t(1;7)(p11;q11)$ について、その転座切断点の解析を行った。FISH 法を用いた解析の結果、 $t(1;7)(p11;q11)$ 転座の転座切断点は 1 番染色体 D1Z7 および 7 番染色体 D7Z1 に存在することが明らかとなった。転座は互いに高い相同性を有するこれらのアルフォイドクラスターにおける DNA 複製後の相同組み換えにより生ずると推定された。一方、各アルフォイドクラスター内での切断点の分布は症例により大きく異なっていることから、本転座による腫瘍化のメカニズムとしては、切断点近傍に存在する遺伝子の構造的変化よりも転座に伴う染色体の量的変化、すなわち 7 番染色体長腕の欠失ないし 1 番染色体長腕の増幅が重要である可能性が示唆された。

A. 研究目的

$t(1;7)(p11;q11)$ 転座は MDS の 7%内外に認められる特徴的な染色体異常の一つである。本転座は化学療法に伴う二次性 MDS において典型的に認められる異常の一つであること、また本転座を有する症例ではしばしば高度の血球減少が認められ、重症感染症の合併により生存中央値は 3~4 カ月と予後不良であること、急性骨髄性白血病 (AML) への進展が高率に認められることなど、多くの臨床的特徴が存在し、本転座がこれらの MDS/AML の病像を規定している可能性が示唆されている。そこで本研究では $t(1;7)(p11;q11)$ におけるゲノム構造の異常を明らかにし、本転座を有する MDS/AML の病態を解明することを目的とする。

(倫理面への配慮)

検討に用いた検体は、全て、診療上必要な臨床検査のために採取した残余の検体を、当該患者のインフォームドコンセントを得たのちに連結可能匿名化を施して検討に用いた。

B. 研究方法

1 番および 7 番染色体の動原体プローブおよび

両染色体上に存在する種々のゲノムクローンをプローブとして two color FISH を行い、 $t(1;7)(p11;q11)$ の派生染色体における当該プローブの残存シグナルの有無を決定することにより、当該転座の 1 番染色体上および 7 番染色体上における切断点のマッピングを行った。続いて Fiber FISH の解像度で転座切断点を同定し、さらに各 FISH シグナルの定量的解析により切断点の分布の推定を行った。

C. 研究結果

(1) $t(1;7)(p11;q11)$ 転座を有する 18 例の検体について、1 番および 7 番染色体動原体近傍にマップされる YAC および PAC/BAC クローンをを用いて FISH 法により両染色体上の切断点のマッピングを行った。18 例中 16 例については、1 番染色体上の切断点は 1 番染色体動原体領域 (D1Z7) と D1S3445 領域の間に、また 7 番染色体上の切断点は 7 番染色体動原体領域 (D7Z1) と sWSS295 領域の間に集積していた。

(2)(1)において派生染色体上の D1Z7 および D7Z1 両シグナルは正常染色体上のシグナルに比して明確に減弱していることから、同転座が

D1Z1 と D7Z1 の二つのアルフォイド配列間の遺伝子再構成によって生じていると推定された。実際、D1Z7 および D7Z1 を用いた FISH 法では、両シグナルが一つの DNA 上で連続して観察されること、さらに CCD カメラを用いて分裂中期核におけるこれらの FISH シグナルの定量を行った結果、D1Z7 および D7Z1 による派生染色体上のシグナルは、確かに対応する正常アレルのそれぞれのシグナルに比して蛍光強度が減弱していること、さらにそれらの相対強度は症例によって異なることが明らかとなった。3 反復多型領域を用いた FISH の結果より、①残存する 2 本の正常 1 番染色体は常に異なるアレルに由来すること、また②派生染色体の 7 番短腕部分も常に残存正常 7 番染色体と異なるアレルに属することが示された。

D. 考察

1 本解析の結果、17p11q11 転座の切断点は、両染色体動原体上の 2 つのアルフォイドクラスター、D1Z7 および D7Z1 の間で生ずることが示された。一方、上記 2 の結果より各染色体における転座の切断点の位置は症例毎に異なっており、数 Mb におよぶ各アルフォイドクラスター内に広く分布していると推定されることから、現在のところ本転座による MDS の発症機序としては、転座による切断点近傍の遺伝子の構造変化よりも、転座の結果生ずる染色体の量的異常 7q-ないし 1q+ が想定される。

2 D1Z7 および D7Z1 は同じアルフォイドサブファミリーに属し、互いに極めて高い相同性を有しており、上記 3 の結果を勘案すると、本不均衡転座の生ずるメカニズムとして、DNA 複製後に一組の娘染色体間で D1Z7/D7Z1 の相同組み換えを生じ、これが正常の染色体分配機構に基づいて娘細胞に分配されるモデルが推定される。

3 本転座がアルキル化剤や放射線による治療

後に生ずる二次性 MDS ないし AML にしばしば観察されることから、これらの agent によるゲノム DNA への障害がかかる相同組み換えを惹起する可能性が示唆される。

4 本研究の直接の成果として、D1Z7 と D7Z1 をプローブとした間期核 FISH 法を用いて 17p11q11 転座を正確に診断することが可能となり、今後同転座を有する MDS、AML の診断、治療の効果判定などへの臨床応用が期待される。

E. 結論

MDS および二次性 AML にしばしば認められる不均衡型染色体転座、17p11q11 の転座切断点を明らかにした。これにより FISH 法による 17p11q11 転座の正確な臨床診断が可能となり、今後 MDS 診療への応用が期待される。転座は D1Z7 および D7Z1 の間の相同組み換えにより生ずることが強く示唆される。本転座による腫瘍化の機序としては、転座の結果もたらされる染色体の量的異常 7q-ないし 1q+ が重要である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1 論文発表

1. Izutsu K, Kurokawa M, Imai Y, Maki K, Mitani K, Hirai H. The corepressor CtBP interacts with Evi-1 to repress transforming growth factor β signaling. *Blood* 97:2815-2822, 2001.
2. Imai Y, Kurokawa M, Izutsu K, Hangaishi A, Maki K, Ogawa S, Chiba S, Mitani K, Hirai H. Mutations of the Smad4 gene in acute myelogenous leukemia and their functional implications in

leukemogenesis. *Oncogene* 20:88-96, 2001.

3. Shimizu K, Chiba S, Saito T, Kumano K, Takahashi T, Hirai H. Manic fringe and lunatic fringe modify different sites of the Notch2 extracellular region, resulting in different signaling modulation. *J. Biol. Chem.* 276:25753-25758, 2001

2.学会発表

Wang L, Ogawa S, Hangaishi A, Ohyashiki K, Mizoguchi H, Hirai H. The breakpoint analysis of unbalanced t(1;7)(q10;p10) translocation. *Exp. Hematology* 29:14, 2001.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

骨髄異形成症候群における免疫抑制剤の作用機序に関する研究

分担研究者 内山 卓 京都大学医学部血液病態学 教授

研究協力者 石川 隆之 京都大学医学部血液病態学 助手

研究協力者 通山 薫 京都大学医学部臨床病態検査学 講師

研究要旨

一部の骨髄異形成症候群に対して免疫抑制療法が著効を示すことが知られている。従来より本疾患の発症もしくは進展に免疫学的機序が関わっていることが示唆されており、免疫抑制療法は従来有効な治療法のなかった本疾患に起因する造血不全に対して優れた治療法になり得ると予想される。本年度に厚生科学研究特発性造血障害に関する研究班で開始された「低リスク MDS に対するシクロスポリン療法」の多施設共同研究に附随して、骨髄異形成症候群における免疫異常の本体に迫り、より有効な治療法の開発につなげることを目的に本研究が企画された。具体的には、シクロスポリン療法の有効性の予測を治療前に可能とすることでシクロスポリン療法の安全性と有効性を飛躍的に高めること、得られた成果をもとに骨髄異形成症候群における免疫異常の本体に迫り、新規治療法の開発につなげることである。本年度は多施設共同研究の開始の年に当たり、現在まで解析に足る十分の症例登録が得られなかったが、来年度以降の研究に向けての基盤整備を行った。

A. 研究目的

特発性造血障害に関する研究班の過去の調査研究ならびに International MDS Risk Analysis Workshop からの報告により、低リスク骨髄異形成症候群（白血病化の危険の低い群）患者において、造血不全は生命予後を左右する深刻な問題であることが示された。この目的のために従来各種の治療法が試みられてきたが、十分な生存の延長効果が得られたものはない。近年骨髄異形成症候群（MDS）における血球減少の機序の一つに、再生不良性貧血と同様の T リンパ球を介した免疫学的機構が提唱され、MDS の血球減少に対する免疫抑制療法の有効性が報告され、自然経過をも変えうる治療法として注目されている。厚生科学研究特発性造血障害に関する研究班参加施設におけるアンケート調査でもシクロスポリン療法の有用性が示唆されたことから、同班により「低リスク MDS に対する

シクロスポリン療法」の多施設共同研究が開始された。それに附随する形で「シクロスポリンの作用機序および薬物感受性に関する基礎的研究」も行われている。本研究では、シクロスポリン療法に附随したこれらの研究結果の解析を通じて、シクロスポリン療法の有効性の予測を治療前に可能とすること、得られた成果をもとに、MDS における免疫異常の本体に迫り、より効果的な新規治療法の開発につなげることを目的とする。

B. 研究方法

特発性造血障害に関する研究班の共同研究により得られた患者の背景、シクロスポリン療法の反応性、ならびに TCR レパトア・PNH 顆粒球の検索・HUMARA 法によるクロナリティ解析の情報をもとに、シクロスポリン療法の有効性の予測因子を抽出する。最近、MDS において

も再生不良性貧血と同様に特定の HLA 型 (DR15) においてシクロスポリン療法の高い有効性が見られるとの報告や、少数例ながらも MDS 患者において TCR レパトアの偏りが大きいことを示す報告がなされ、MDS の造血障害に自己反応性 T 細胞が関与していることを伺わせている。特発性造血障害に関する研究班の共同研究で得られる HLA と TCR レパトアの解析結果は、MDS の免疫異常における T リンパ球の役割に関してさらなる示唆を与えてくれるものと期待される。特定の TCR レパトアの消長と治療効果に相関が見られた際には、当科通院・入院中の MDS 患者末梢血検体から多重染色蛍光抗体法によりこれらの T 細胞画分の細胞表面抗原形質の検討を行うと共に、抗体と磁気ビーズ法を用いて該当 T 細胞を分離し、コロニーアッセイ法および IFN- γ ELISPOT 法により造血障害活性の検討を行う。

C. 研究結果 D. 考察

本年度は多施設共同研究に附随する基礎的研究の立案と、当研究に含まれる遺伝子研究 (HUMARA 法によるクロナリティ解析、HLA-DNA タイピング、TCR レパトア検査) に関して各参加施設の施設内審査委員会 (倫理委員会またはそれに相当するもの) の承認を得るための説明文書、同意文書のひな形の作成を行い、各施設に配付した。本研究開始にあたっては各施設で慎重な討論がなされ、症例登録に時間を要することが予想され、一定数の症例登

録とその後の経過観察により得られた知見が本研究の実行には不可欠なことから、本年度は来年度以降の研究の基盤整備として、抗体を用いた特定の TCR レパトアの検出方法、多重染色によるそれら T 細胞の表面抗原解析ならびに磁気ビーズ法を併用した T リンパ球の分離と、抗原提示細胞として樹状細胞を用いた ELISPOT 法の確立を行った。

E. 結論

当研究は臨床の現場で得られた事実から解析を進めていくことが特徴である。当初の予想以上に「低リスク MDS に対するシクロスポリン療法」の多施設共同研究の進捗状況が遅れているため、本年度は基盤整備を行うに留まった。多施設共同研究の進捗の遅れは施設内審査機関による承認の遅れによるものが大きいと考えられ、来年度以降本研究のもととなる臨床情報の蓄積がすすみ、本研究の進展も期待される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録

なし。

骨髓異形成症候群患者の T 細胞レパトアに関する研究

分担研究者 寺村 正尚 東京女子医科大学血液内科 講師

研究要旨

骨髓異形成症候群患者（不応性貧血）の末梢血および骨髓中の T 細胞レパトアを解析した。解析症例全例でオリゴクローナルな T 細胞が存在した。免疫抑制療法の有効例では一部の T 細胞クローンの消失を認めた。以上より、本疾患では疾患特異的な T 細胞が病態に深く関与しているものと考えられた。

A. 研究目的

骨髓異形成症候群（MDS）は造血幹細胞レベルでの異常が原因となって引き起こされるクローナルな疾患と考えられている。近年、再生不良性貧血に有効である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が MDS、特に不応性貧血（RA）の血球減少症に対して有効であることが明らかになり、注目されている。このことは、MDS においても再生不良性貧血と同様に、そ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 MDS の病態にクローナルな T 細胞が関与している可能性について明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

RA 症例で他の疾患の合併がなく、血液、骨髓採取時に明らかな感染が認められない 11 症例（男性 5 例、女性症例）を対象とした。平均年齢は 52.2 歳であった。染色体異常は 11 例中 3 例、輸血歴は 3 例に認められた。

各々の患者の末梢血、骨髓細胞を採取し、単核球分画を分離した。このリンパ球を含む単核球分画から RNA を抽出し、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 V β 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、クローナルな T 細胞の存在を確認した。

（倫理面への配慮）

今回の研究において、骨髓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。疾患名、年齢、性別以外の個人情報是一切秘匿とした。

C. 研究結果

T 細胞レパトア解析の結果、オリゴクローナルな T 細胞の存在を示すバンドが末梢血においては 11 例中 11 例、骨髓においては 10 例中 10 例に認められた。また、10 例中 3 例では末梢血より骨髓において、より著明なバンドが認められた。骨髓より末梢血において、より著明なバンドが認められた症例は認めなかった。

シクロスポリンが有効の 1 例について、シクロスポリン投与前と投与開始後 4 ヶ月で解析を行い、比較した。両者のオリゴクローナルな T 細胞の存在を示すバンドの位置はほとんど V β サブファミリーにおいて不変であったが、一部の V β subfamily（V β 8）においては、明らかなバンドの消失が認められた（図）。

D. 考察

MDS（RA）患者のほとんどすべての例で末梢血、骨髓にオリゴクローナルな T 細胞が存在すると考えられる。シクロスポリンが有効であった症例で血球改善後に一部の V β subfamily でクローナルな T 細胞の存在を示すバンドの消失が認められたことより、本疾患にみられる血球減少には疾患特異的な T 細胞が関与している可能性が考えられる。

E. 結論

MDS の 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 の病態に深く関与していると考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1.論文発表

1.Miyazawa K, Nishimaki J, Ohyashiki K, Enomoto S, Kuriya S, Fukuda R, Hotta T, Teramura M, Mizoguchi H, Uchiyama T, Omine M Vitamin K2 therapy for myelodysplastic syndromes (MDS) and post-

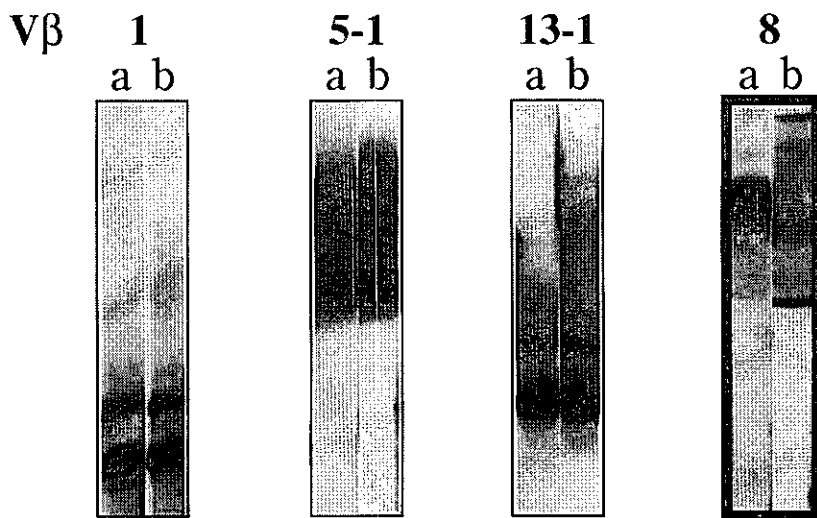
MDS acute myeloid leukemia: information through a questionnaire survey of multi-center pilot studies in Japan. Leukemia 14 1156-1157, 2000.

2.学会発表

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。



シクロスポリンが有効であったMDS(RA)患者のシクロスポリン投与前後の末梢血Tリンパ球のTCR Vβの変動

a; Cy A投与前
b; Cy A投与後

治療関連 MDS・白血病における遺伝的背景と遺伝子変異

分担研究者 直江知樹 名古屋大学大学院医学研究科臨床感染統御学 教授
研究協力者 清井 仁 名古屋大学医学部附属病院難治感染症部 講師
研究協力者 岩井雅則 名古屋大学医学部附属病院難治感染症部 医員

研究要旨

一次腫瘍に対する化学・放射線療法の開始後 2 ヶ月以後に発症した骨髄異形成症候群 (MDS)・白血病 60 例の遺伝的背景と遺伝子変異を明らかにすることを目的とした。治療関連 MDS・白血病では de novo MDS・白血病に比べて、NQO1 遺伝子のコーディング領域における function-less 変異型が多く認められたが、GSTM1、GSTT1、MPO の多型性には差を認めなかった。また、MLL 遺伝子再配列、p53 変異、AML1 変異、予後不良染色体異常は de novo 白血病・MDS に比べてより多く認めたが、N-RAS 点突然変異は同程度、FLT3 変異はより少なく認めた。NQO1 遺伝子多型性は、特定化学療法の既往、病型、遺伝子変異とは関係しなかった。

A. 研究目的

一次腫瘍に対する化学・放射線療法の開始後 2 ヶ月以後に発症した骨髄異形成症候群 (MDS)・白血病 (TRMDS/L) の遺伝的背景と遺伝子変異を明らかにする。

B. 研究方法

一次腫瘍に対する化学・放射線療法の開始後 2 ヶ月以後に発症した骨髄異形成症候群 (MDS) 24 例、同じく急性骨髄性白血病 (AML) 36 例、de novo AML (M3 以外) 200 例、de novo MDS 30 例を対象にした。初診時骨髄血から DNA および RNA を抽出し、サザンプロット法、あるいは目的遺伝子を PCR で増幅後、酵素切断/直接シーケンスで解析した。遺伝子多型性については、グルタチオン S トランスフェラーゼ (GST) M1、GSTT1、骨髄ペルオキシダーゼ (MPO)、NAD(P)H:キノン酸化還元酵素 (NQO1) の 4 種、遺伝子変異については、MLL、N-RAS、p53、FLT3、AML1 の 5 種を解析し、染色体異常とあわせて解析した。

C. 研究結果

治療関連 MDS・白血病 (TRMDS/L) では de novo 白血病・MDS に比べて、NQO1 遺伝子のコーディング領域における function-less 変異型が多く認められた (24%、Odd ratio 2.26、 $p=0.002$) が、GSTM1、GSTT1、MPO の多型性には差を認めなかった。また、MLL 遺伝子再構成、p53 変異、AML1 変異、予後不良染色体異常は de novo 白血病・MDS に比べて TRMDS/L により多く認めたが、N-RAS 点突然変異は同程度、FLT3 変異はより少なかった。NQO1 遺伝子多型性と特定の化学療法の既往、病型、遺伝子変異の間には相関を認めなかった。

D. 考察

MDS の発症リスクは、なんらかの遺伝子変異ストレスと生体の反応という面で考えると、環境要因の明らかな MDS・白血病の発症に酸化/還元関連酵素の遺伝子多型性が関与することは十分理解できる。今後は、症例を増やした網羅的遺伝子変異解析によって、MDS と白血病におけるより詳細な病態を明らかにすることが必要である。また TRMDS/L の発症や進展に酸化/還元がどのように関わるのか、その標的遺伝子が何であるのかについて研究を進め、

新規治療法の開発に繋げたい。

E. 結論

TRMDS/L は、de novo MDS/leukemia と連続的ではあるが特定の遺伝子異常が関わりやすい疾患群であることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. Naoe T, Tagawa Y, Kiyoi H, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Kusumoto S, Shimazaki C, Saito K, Akiyama H, Motoji T, Nishimura M, Shinagawa K, Ueda R, Saito H, Ohno R. Prognostic significance of the null genotype of glutathione S-transferase-T1 in patients with acute myeloid leukemia: increased early death after chemotherapy. *Leukemia* 16:203-208, 2002.
2. Kosugi H, Ito M, Yamamoto Y, Towatari M, Ito M, Ueda R, Saito H, Naoe T. In vivo effects of a histone deacetylase inhibitor, FK228, on human acute promyelocytic leukemia in NOD/Shi-scid/scid mice. *Jpn. J. Cancer Res.* 92:529-536, 2001
3. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Saito H, Ueda R, Ohno R, Naoe T. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 97:2434-2439, 2001.