

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

分担研究者 間野 博行 自治医科大学ゲノム機能研究部 教授

研究要旨

DNA チップを用いることで数千～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が同定されると期待される。しかし DNA チップはあまりに高感度な検査法であるため、異なった白血病患者の骨髄細胞全体を比べるような単純な解析を行うと、両患者の「骨髄中の構成細胞の違い」を反映した偽陽性結果を得ることになる。我々は様々な特発性血液疾患が造血幹細胞の異常に起因することに着目し、広く骨髄異形成症候群（MDS）患者骨髄より造血幹細胞相当分画のみを純化し保存する「Blast Bank」を設立した。本バンク細胞は 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 チップを用いて比較することで、偽陽性が少なく精度の高い解析が可能になると期待された。既にこれまで300例を超える Blast Bank 細胞の収集に成功し、これらを用いることで MDS 由来白血病と de novo 急性骨髄性白血病との鑑別診断などに役立つ分子マーカーを同定することに成功した。

A. 研究目的

現在なお正確な診断が困難であり、かつ有効な治療法の存在しない白血病類縁疾患が骨髄異形成症候群（MDS）を含め数多くある。各患者の有効な治療法を選択する上でも正確な鑑別診断は必須であり、そのためには新たな分子診断マーカーの同定が最も重要であると考えられる。DNA チップは数千～数万の遺伝子発現変化を簡便に解析可能にする最新の研究システムであり、上述の目的に適したスクリーニング法であると期待される。しかしこれまでのような正常組織と癌組織を単純に DNA チップで比較するような実験においては、両組織の構成細胞成分があまりに異なるため「偽陽性」遺伝子群の同定に終始することが殆どであった。例えば全く同じ白血病細胞が骨髄中に5%ある患者と90%ある患者の骨髄単核球を分離して、そこから得た mRNA を用いて DNA チップ比較を行えば、白血病細胞特異的な遺伝子の発現量は後者において14倍に増加しているため骨髄全体の遺伝子発現プ

ロファイルは大きく異なってしまい、両患者が全く異なった疾患に罹患しているとの誤った結論が導かれるであろう。したがって真に臨床にフィードバック可能な精度の高い DNA チップ解析を行うためには、このようなポピュレーションの変化に影響されない新たなスクリーニング法の開発が必須と考えられる。我々は白血病などの特発性血液疾患の多くが造血幹細胞（あるいはその近傍）の異常に起因することに着目し、これら疾患患者のフレッシュ検体より造血幹細胞相当分画のみを純化しストックするバンク事業「Blast Bank」をスタートした。本バンク細胞を用いて DNA チップ解析を行うことで、疾患の種類に拘わらず分化レベルがほぼ均一な細胞群を比較することが可能になり、疾患の病態解明に有用な知見が得られると期待された。本システムを用いて、

(1) MDS と他の疾患との鑑別診断に有効な遺伝子マーカーの同定、(2) MDS 芽球の薬剤感受性に関与する遺伝子マーカーの同定、(3) MDS の病期進行機構の解明とその

知見に基づく新規治療法の開発を本研究計画で目指す。

B. 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、各種白血病患者の同意の下、骨髓単核球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。既に 300 例を越える純化細胞の保存に成功し、その内訳は急性骨髄性白血病 (AML)、MDS、およびその他がそれぞれほぼ 1/3 を占める。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。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 UTP 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 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 GMS 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。

(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. 研究結果、考察

骨髓異形成症候群 (MDS) は 60 歳以上で最も発症頻度の高い血液悪性疾患であるにもかかわらず現在なお明確な診断が困難である。その診断基準は (1) 血液細胞の異形成と (2) 抹消血での血球減少にも拘わらず骨髓中の細胞数が正常あるいは増加する「無効造血」の 2 点であるが、細胞の異形成は判断がしばしば困難であり、異なった病院間での診断の一致率も低い。MDS は抹消血球減少のみがあり比較的症状の少ない慢性期 (不応性貧血) を経た後、やがて白血病幼芽球の増加と共に急性白血病様の病態へと転化する。一旦 AML へと移行した MDS は抗癌剤抵抗性であり、他家骨髓移植の治療成績も悪い。一方 *de novo* の AML 細胞の多くは薬剤感受性であり、両者の鑑別診断は患者の治療方針の決定上きわめて重要である。

そこで我々は解析対象としてまず、MDS と *de novo* AML を選び、両者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 MDS 患者サンプル 5 例と *de novo* AML サンプル 5 例を我々の 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、むしろ骨髓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 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。まず Dlk の疾患特異的発現を確認するため Blast Bank に属する MDS 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 MDS の特徴である細胞の形態異常が著明であり、恐らく MDS 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 MDS 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法による MDS 診断法の開発を目指している。

D. 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 Blast Bank をさらに拡充し各種白血病の他の観点からの解析を行うと共に、Affymetrix 社の 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. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohmine K, Ota J, Ueda M, Ueno S, Yoshida K, Yamashita Y, Kiritó 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.
2. Miyazato A, Ueno S, Ohmine K, Ueda M, Yoshida K, Yamashita Y, Kaneko T, Mori M, Kiritó 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.
3. 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 commonly used antileukemic agents. *Blood* 97:1999-2007, 2001.

F. 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

白血病関連転写因子 TEL の赤芽球分化に果たす役割

分担研究者 三谷 絹子 獨協医科大学血液内科 教授

研究要旨

TEL は白血病関連転写因子をコードしており、FLI-1、Id1、stromelysin-1 等の標的遺伝子の転写を抑制する。発生工学的検討により、TEL は胎生期の造血には不要であるが、新生児期の骨髄での造血の成立に必須の役割を担っていることが示された。しかしながら、TEL がその後の造血に果たす役割は全く不明である。TEL が赤芽球造血に担う役割を解明する目的で、TEL をマウスフレンド細胞（MEL 細胞）に遺伝子導入した。その結果、TEL は HMBA あるいは DMSO が誘導する赤芽球分化を促進することが明らかになった。TEL は N 末に存在する HLH 領域でコリプレッサー mSin3A と結合した。この HLH 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・ネガティブに抑制した。さらに、-HLH 変異体は、TEL の赤芽球分化促進効果もドミナント・ネガティブに抑制した。TEL は赤芽球の分化制御に重要な役割を担っていると考えられた

A. 研究目的

TEL は 12p13 転座の標的遺伝子であり、転座に伴い様々な遺伝子とキメラ遺伝子を形成する。ETS ファミリーの転写因子をコードしており、FLI-1、Id1、stromelysin-1 等の標的遺伝子の転写を抑制する。N 末領域にホモダイマーあるいはヘテロダイマー形成に関与する helix-loop-helix（HLH）領域が存在し、C 末領域に DNA 結合に関与する ETS 領域が存在する。TEL のノックアウトマウスは卵黄囊の血管形成障害により胎生 10.5 日から 11.5 日に致死となるが、この時点での卵黄囊での造血は正常に営まれている。一方、TEL(-/-)ES 細胞を用いたキメラマウスの作製実験により、TEL は胎生期の造血には不要であるが、新生児期の骨髄での造血の成立に必須の役割を担っていることが示された。しかしながら、TEL がその後の造血に果たす役割は全く不明である。本研究では、TEL が赤芽球分化を抑制する転写因子 FLI-1 のプロモーターに抑制的に作用すること、及び、FLI-1 とヘテロダイマーを形成してその転

写因子としての機能を抑制するという 2 つの事実に注目した。そこで、TEL が赤芽球分化の制御に果たす役割を解明することを目的として、マウスフレンド細胞（MEL 細胞）を用いて遺伝子導入実験を行った。

B. 研究方法

TEL を MEL 細胞に遺伝子導入し TEL 発現クローンを樹立した。TEL の赤芽球の分化に対する効果を検討する目的で、HMBA あるいは DMSO 処理後のヘモグロビン陽性細胞の比率をベンチジン染色により評価した。また、赤芽球分化の分子マーカーとして δ -アミノレブリン酸合成酵素及び β -グロビン mRNA の発現量をノーザン解析により検討した。さらに、赤芽球分化を支配する転写因子 FLI-1 及び GATA-1 の発現に変化がないかどうかを核抽出液のウエスタン解析により検討した。ゲル・シフトアッセイにより分化過程における GATA-1 の DNA 結合能の変化も検討した。

TEL は転写抑制因子であるので、各種のコリプレッサーとの結合の有無を COS 細胞

で強発現させた蛋白質の免疫沈降法を用いて検討した。また、欠失変異体を用いて TEL 内のコリプレッサーとの結合部位を同定した。

コリプレッサーと結合できない欠失変異体が TEL と同様の ETS 結合部位(EBS)を介する転写抑制能を示すかどうかを HeLa 細胞及び MEL 細胞を用いたレポーター・アッセイで検討した。また、TEL の EBS に対する転写抑制活性にヒストン脱アセチル化酵素が必要であるかどうかをヒストン脱アセチル化酵素の阻害薬トリコスタチン A を用いて検討した。

次に、コリプレッサーと結合できない欠失変異体を MEL 細胞に遺伝子導入し、その細胞生物学的効果を HMBA あるいは DMSO を用いた分化実験により検討した。最後に MEL 細胞の分化過程における内因性の TEL の発現量の変化を RT-PCR 法を用いて半定量的に観察した。

C. 研究結果

HMBA あるいは DMSO 処理により、TEL 発現クローンはモック細胞に比べて、より早期からより高率にヘモグロビン陽性細胞を蓄積した。また、モック細胞では分化誘導前には δ -アミノレブリン酸合成酵素及び β -グロビン mRNA はほとんど検出されないが、誘導後 2 日目には弱い発現が観察され、3 日目以降にその発現は最高となった。一方、TEL 発現クローンでは分化誘導前にこれらの mRNA はすでに発現しており、2 日目にはモック細胞に比べて明らかに強い発現が観察され、3 日目以降にその発現は最高となった。従って、TEL は赤芽球分化を促進すると考えられた。TEL の発現は、FLI-1 及び GATA-1 の発現、及び GATA-1 の DNA 結合能にほとんど影

響を与えなかった。従って、TEL の赤芽球分化促進効果はこれらの転写因子の発現量の変化を介さないものであると考えられた。免疫沈降法により TEL とコリプレッサー mSin3A との結合が確認された。欠失変異体を用いた検討により、TEL は mSin3A と HLH 領域で結合していると結論された。HLH 領域はホモダイマーあるいはヘテロダイマーの形成を担うのみでなく、コリプレッサーとの結合にも関与している重要な機能ドメインであると考えられた。

HeLa 細胞及び MEL 細胞を用いたレポーター・アッセイで、TEL は用量依存性及び ETS 結合部位 (EBS) 配列依存性に転写抑制効果を示したが、-HLH 変異体には同様の効果は観察されなかった。また、-HLH 変異体は TEL の転写抑制能に対してドミナント・ネガティブ効果を発揮した。さらに、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬のトリコスタチン A を用いた MEL 細胞の実験で、TEL の EBS に対する転写抑制活性にはヒストン脱アセチル化酵素が必要であることが示された。

-HLH 変異体の MEL 細胞への遺伝子導入実験で、-HLH は完全に赤芽球分化を抑制した。さらに、TEL と -HLH 変異体を同時に発現する MEL 細胞のクローンを樹立した。この供発現クローンは HMBA 処理によって分化を誘導しても TEL による分化促進効果を示さず、モック細胞と同程度あるいはそれ以下の分化能しか示さなかった。従って、-HLH 変異体は TEL に対して細胞生物学的にもドミナント・ネガティブ効果を発揮することが証明された。MEL 細胞の赤芽球分化過程における内因性 TEL の発現量の変化を観察したが、内因性 TEL は HMBA による分化誘導に伴い 3 日目まで徐々に増加し、4 日目には急に低下して発

現が観察されなくなった。このことは内因性 TEL が赤芽球の分化制御に何らかの役割を担っていることを示唆している。

D. 考察 E. 結論

白血病関連転写因子 TEL が赤芽球分化を促進することを明らかにした。TEL の赤芽球分化の促進効果は FLI-1 及び GATA-1 の発現レベルの変化を伴わないものであった。FLI-1 は赤芽球分化を抑制するが、FLI-1 の発現レベルには変化がなくても、TEL は FLI-1 とヘテロダイマーを形成することにより FLI-1 を機能的に失活させて赤芽球分化を促進する可能性がある。また、GATA-1 とは別の経路で赤芽球の分化を促進すると考えられる。

一方、mSin3A 結合領域である HLH 領域を欠いた-HLH 変異体は TEL による赤芽球分化促進効果をもドミナント・ネガティブに抑制した。内因性の TEL mRNA の発現が赤芽球分化の初期に増加することも、TEL が赤芽球分化に重要な役割を有することを示唆している。

TEL 遺伝子から alternative splicing により第 3 及び第 4 エクソンでコードされる HLH 領域を欠いた isoform が転写されることを見いだした。この isoform は今回用いた-HLH 変異体とほぼ同様の構造を有する。-HLH 変異体が正常 TEL の転写抑制能に対してドミナント・ネガティブに作用することから、内因性に存在する 2 つの isoforms の拮抗作用により TEL の転写因子としての機能は制御されていると推測さ

れる。しかも、この拮抗作用は赤芽球分化促進効果においても観察され、isoforms の存在が TEL の標的遺伝子の転写制御を介して、TEL の赤芽球造血への効果を制御していると考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 結論

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 β signaling. *Blood* 97: 2815-2822, 2001.
2. 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.
3. Nakamura Y, Nakazato H, Sato Y, Furusawa S, Mitani K. Expression of the *TEL/EV11* 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

なし。

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Izutsu K, Kurokawa M, 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
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
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
Miyazawa K, Nishimaki J, Ohyashiki K, Enomoto S, Kuriya S, Fukuda R, Hotta T, Teramura M, Mizoguchi H, Uchiyama T, Omine M	Vitamin K ₂ 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
Naoe T, Tagawa Y, Kiyoi H, Koderu 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
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 / Shisid/scid mice.	Jpn. J. Cancer Res	92	529-536	2001
Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Koderu 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
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
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

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
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 commonly used antileukemic agents	Blood	97	1999-2007	2001
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
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

IV. 研究成果の刊行物・別刷

20010870

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。