

厚生労働科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

骨髄異形成症候群の原因遺伝子の同定と発症機構の解明

平成 14 年度 総括研究報告書

主任研究者 平井 久丸

平成 15 年 (2003) 3 月

目 次

I. 総括研究報告書

骨髄異形成症候群の原因遺伝子の同定と発症機構の解明

東京大学医学部附属病院無菌治療部 平井 久丸 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 7

III. 研究成果の刊行物・別刷 8

I. 総括研究報告書

骨髄異形成症候群の原因遺伝子の同定と発症機構の解明

主任研究者 平井 久丸 東京大学医学部附属病院無菌治療部 助教授

研究要旨

骨髄異形成症候群(MDS)の原因遺伝子の同定とその発症機構の解明に関して、(1)MDS に高頻度に認められる予後不良の染色体異常、der(1;7)(q10;p10)および-7/7q-、の標的遺伝子異常に関するゲノム解析、ならびに(2)転写因子異常に基づく MDS 発症機構の個体レベルにおける解析として転写因子 AML1 および Evi-1 の遺伝子改変マウスの作成・解析を行った。der(1;7)(q10;p10)の解析では、本転座が1番および7番染色体動原体に存在する進化上保存されたアルフォイド配列間(D1Z7 および D7Z1)の遺伝子再構成により生ずること、および転座切断点が各アルフォイド内の広い範囲にわたって分布することが明らかとなった。この結果からは、本転座による MDS の発症には転座点近傍の特定の遺伝子の異常ではなく、転座によってもたらされる染色体の量的異常(7q-ないし+1q)が重要であることが示唆されるとともに、臨床的には両アルフォイド配列を用いた間期核 FISH による本転座の分子診断が可能となった。また、7q に存在が想定される MDS の標的遺伝子座については、メチル化による遺伝子の不活化という観点から、MDS 由来細胞株を含む造血器腫瘍検体について 7q に存在する CpG アイランドの網羅的メチル化解析を行った。その結果、これらの腫瘍検体では 7q の一群の遺伝子が腫瘍特異的な CpG アイランドのメチル化を受けていること、またこれらの遺伝子は 7q 上でクラスターを形成し、その分布は 7q における欠失の集積領域の分布とよく一致することを見出した。一方、MDS への関与が示唆されている転写因子 AML1 と Evi-1 に関しては、AML1 を成体造血組織で欠失する条件的遺伝子改変マウスと GATA-1 プロモーター下に Evi-1 を過剰発現する Evi-1 トランスジェニックマウスを作成し、各マウスについて造血系の解析を行った。これらのマウスでは形態異常を伴った巨核球の増生と血小板の低下(AML1 および Evi-1 遺伝子改変マウス)や巨核芽球性白血病の発症(Evi-1 遺伝子改変マウス)が観察され、MDS 類似の病態が再現されることから、これらの転写因子の異常が MDS の発症に関与することが個体レベルで確認されるとともに、MDS の病態解明・新規治療法の開発を行う上で有用なモデル動物となり得ることが示された。

分担研究者

・小川誠司

東京大学医学部造血再生医療寄付講座

助教授

・黒川峰夫

東京大学医学部血液腫瘍内科

助手

A. 研究目的

骨髄異形成症候群(MDS)は造血細胞の分化の障害と前白血病状態を特徴とするヘテロな疾患群である。その発症については、多くの病態の関与が報告されているが、分化の障害という観点からは造血前駆細胞の分化に深く関与する転写因子の異常

が、また前白血病状態という観点からは、ゲノムの不安定性に基づく染色体の異常が、その本質的な病態を規定していることが示唆される。そこで本申請の研究では、これらの染色体異常のゲノム解析により MDS の原因遺伝子の同定を試みるとともに、発生工学技術を用いて転写因子異常による MDS の発症機構を個体レベルで解析することにより、新規治療法の開発上必須と考えられる MDS モデルの確立を行うことを計画した。これに基づいて研究初年度である平成 14 年度においては、(1)MDS に認められる代表的な予後不良染色体異常である-7/7q-および der(1;7)のゲノム解析による MDS の原因遺伝子異常の探索および、(2)MDS の発症への関与が示唆されている 2 つの転写因子、AML1 および Evi-1、の遺伝子改変マウスの作成に

よる MDS 発症機構の解析とモデルマウスの作成を試みた。

(倫理面への配慮)

本研究において、患者を対象として行う臨床試験ならびに患者の検体を用いて行う研究は、全て各研究施設の倫理委員会の承認を得て実施されたものである。とくにヒトゲノム・遺伝子の解析については、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠して行われた。患者(被験者)の本研究への参加については、全て、文書による研究の説明を行ったうえで、書面による同意を取得した。

B. 研究方法

(1) 予後不良染色体異常のゲノム解析

●不均衡転座 der(1;7)(q10;p10) の解析

転座切断点近傍にマップされる 1 番および 7 番染色体の動原体プローブを含む種々のゲノムクローンをプローブとして当該転座を有する患者検体の FISH 解析を行い、der(1;7)(q10;p10) 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とシグナル強度を定量的に解析することにより、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同定と多数例における節電点のマッピングを行った。

●メチル化解析による 7q の癌抑制遺伝子座の同定

-7/7q-の標的と想定される癌抑制遺伝子座について、メチル化という観点から当該遺伝子座を同定する目的で、MDS 由来細胞株を含む 41 種類の検体について、7q の CpG アイランドの網羅的メチル化解析を行った。すなわち、公表された 7 番染色体長腕の塩基配列データベースから、CpG アイランドの定義を満たす配列を抽出し、各 CpG アイ

ランドのメチル化の有無と程度を、正常組織および腫瘍検体から抽出した DNA を用いて bisulfite 法により解析した。

(2) 造血関連転写因子の個体レベルにおける解析と MDS モデルマウスの作成

A)AML1 条件的欠失マウスの解析

成体型の造血系の構築に必須であることが知られている AML1 の機能的消失により MDS 類似の病態が生ずることが、AML1 遺伝子の変異を有するヒト家系の解析ならびに我々の MDS 患者検体の解析から示唆されている。そこで発牛工学の手法を用いて Cre-LoxP 配列を AML1 ゲノムに挿入した MX/Cre 成体マウスにおいて AML1 を条件的に欠失させることにより造血系に生ずる変化を解析した。

B)Evi-1 過剰発現マウスの解析

Evi-1 遺伝子は予後不良の MDS に認められる 3q26 転座の標的遺伝子と考えられている。そこで GATA-1 プロモータによる Evi-1 遺伝子のトランスジェニックマウスを作成し、同マウスにおける造血系の異常を解析した。

C. 結果

(1) der(1;7)(q10;p10) の解析

der(1;7)(q10;p10) 転座を有する 27 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。種々のプローブを用いた解析の結果、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、また、D1Z7 および D7Z1 を用いた Fiber FISH では、両シグナルが一つの DNA fiber 上で連続して観察されることから、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

て生じていることが示された。さらに派生染色体上の両アルフォイドシグナルの定量的解析により推定される転座切断点の各アルフォイド内での相対位置は症例により大きくことなること、また、これらの転座切断点は各アルフォイド領域の長腕側に偏っており、短腕側には存在しないことが明らかとなった(小川)。

(2) 7q の網羅的メチル化解析

7q の塩基配列データベースから抽出した 290 個の CpG 塩基配列のうち、Alu 配列その他の繰り返し配列を除く配列で PCR 増幅可能な 130 個の CpG アイランドについて、bisulfite 法によるメチル化の定量的検討を行った。ヒト胎盤(1)、末梢血単核球(4)、骨髄単核球(2)、AML 患者検体(4)、MDS 由来細胞株(5)、AML 由来細胞株(15)、および ALL 由来細胞株(15)を含む計 41 種類の検体を用いたメチル化解析の結果、MDS 由来細胞株を含む造血器腫瘍細胞株において、腫瘍特異的にメチル化をうける 25 個の遺伝子が同定された。さらに、これらの遺伝子は特定の染色体領域(7cen~7q11, 7q22, 7q32~33, 7q35~36)にクラスターを形成して存在すること、これらのメチル化領域は従来の欠失解析によって同定されている欠失の集積領域とオーバーラップする傾向が認められること、および患者腫瘍検体におけるメチル化は、正常組織と培養腫瘍細胞株の中間の分布と程度を示すこと、が明らかとなった(平井)。

(3) AML1 遺伝子条件的欠失マウスの解析

成体において PI/PC の投与により遺伝子を欠損させたマウスの末梢血の解析において赤血球系・顆粒球系に大きな異常は認められなかったが、血小板数は正常マウスの 1/3~1/5 に減少していた。骨髄所見においては小型で未熟な巨核球が著明に増加しており、巨核球の前駆細胞のアッセイにお

いて CFU-Meg の増加が認められるとともに、フローサイトメーターを用いた ploidy の解析により、これらの巨核球では多倍体化の障害が認められることが明らかとなった(黒川)。

(4) Evi-1 過剰発現マウスの解析

作成した Evi-1 過剰マウスは、白血球数および赤血球数は正常であったが、生直後から明らかな血小板減少を示した。骨髄および脾臓では核に空胞を持つ大型の巨核球が増生しており、一部のマウスで巨核球性白血病の発症を認められた(黒川)。

D. 考察

(1) 染色体異常のゲノム解析について、本年度はその臨床的重要性の観点から、特に MDS の不良予後に関連した染色体異常の解析を行った。

der(1;7)(q10;p10)は MDS の 7%内外に観察される予後不良の転座であるが、しばしば化学療法に伴う二次性 MDS に単独の異常として観察されることから、本転座による異常が MDS の発症に関与すると考えられる。本年度の解析の結果、本転座は DNA 複製後に進化上極めてよく保存されている 2 つのアルフォイド領域間の遺伝子再構成によって生ずることが明らかになるとともに、転座切断点が各アルフォイドの長大な領域に広く分布する事実から、本転座による MDS の発症機構としては、切断点近傍の特定の遺伝子の構造上・発現制御上の異常ではなく、不均衡転座によって生ずる染色体の量的変化(7q-ないし+1q)の重要性が示唆された。MDS の標的遺伝子の同定と病態の分子機構の解明という見地からは、今後、転座の結果生ずる 7q-ないし 1q+の標的となる遺伝子座の同定が必要である。

このうち、7q の欠失に関しては、MDS において極めて高頻度に観察される異常であるが、これまで

の多くの欠失解析によるアプローチからは有望な標的遺伝子の候補は同定されていない。我々は、この点に鑑みて、別の視点、すなわち、メチル化による遺伝子の不活化という観点から、その標的遺伝子座の探索を試みた。7q のほぼ全長にわたる網羅的メチル化解析の結果より、7q には造血器腫瘍特異的にメチル化をうける遺伝子群が存在することが明らかとなった。これらの遺伝子群の分布は欠失解析による欠失の集積領域の分布と重複する傾向がみとめられることから、染色体の欠失とメチル化は共通の遺伝子を標的としてこれらの遺伝子を不活化し、腫瘍の発症、進展、ないし細胞の不死化に関与している可能性が示唆された。他方、培養腫瘍細胞株におけるメチル化の程度は患者腫瘍検体に比して明らかに高くなっているという観察結果の解釈としては、これらのメチル化の多くが体外培養に関連した非特異的なものである可能性も排除できない。従って、次年度以降、7q の標的遺伝子の同定にあたっては、さらに primary tumor における検討を集積することにより、候補となる遺伝子を絞って解析を進める必要があると考えられる。

(2) 転写因子異常の観点からのアプローチにおいては、造血前駆細胞に発現する転写因子の網羅的解析の目的でこれらの転写因子遺伝子の cDNA を搭載したマイクロアレイの作成、MDS 検体バンクの整備進めると同時に (Data not shown)、既に MDS 発症への関与が強く示唆されている転写因子、AML1 および Evi-1 に関して、それぞれ条件的 AML1 欠失マウスおよび Evi-1 トランスジェニックマウスを作成することにより、これらの転写因子の異常が MDS 発症に関与するメカニズムを個体レベルで検討した。実際、これらのマウスにおいては MDS の病態の本質的な特徴である分化・成熟障害によ

る無効造血ないし前白血病状態が再現されており、これらの転写因子の異常が MDS 発症の原因と密接に関連していることが個体レベルで確認されるとともに、両マウスの作成は MDS の新規治療法の開発に向けたモデル動物の確立という観点からも重要な成果であると考えられる。次年度以降は、これらのマウスについて、その無効造血および白血病への移行の分子メカニズムに関してさらに詳細な解析を進める予定である。

E. 結論

(1) MDS における予後不良染色体異常である der(1;7)(q10;p10) および -7/7q- のゲノム解析を行った。der(1;7)(q10;p10) については、同転座が形成されるメカニズムとこれによって生ずる染色体の量的変化(7q-ないし+1q)の MDS における重要性を明らかにし、また、-7/7q- に関しては、MDS 由来細胞株を含む造血器腫瘍検体における 7q のメチル化の網羅的解析によって、腫瘍特異的メチル化により不活化をうける一群の遺伝子を同定した。

(2) MDS の発症に造血関連転写因子の異常が果たす役割について、AML1 遺伝子と Evi-1 遺伝子の遺伝子改変マウスを作成することにより個体レベルで検討を行った。両遺伝子の異常によって分化・成熟の異常および白血病の発症といった MDS 類似の病態が個体レベル再現され、両転写因子異常の MDS 発症への関与と MDS モデルマウスとしての有用性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kunisato A, Chiba S, Yamaguchi E, Kumano K, Saito T, Masuda S, Yamaguchi T, Osawa M, Kageyama R, Nakauchi H, Nishikawa M, Hirai H. HES-1 preserves purified hematopoietic stem cells ex vivo and accumulates side population cells in vivo. *Blood* 101:1777-1783, 2003.

2. Shimizu K, Chiba S, Saito T, Takahashi T, Kumano K, Hamada Y, Hirai H. Integrity of intracellular domain of Notch ligand is indispensable for cleavage required for release of the Notch2 intracellular domain. *EMBO Journal* 21: 294-302, 2002.

3. Suzuki T, Nakamoto T, Ogawa S, Seo S, Matsumura T, Tachibana K, Morimoto C, Hirai H. MICAL, a novel CasL interacting molecule, associates with vimentin. *Journal of Biological Chemistry* 277:14933-14941, 2002.

4. Yamaguchi E, Chiba S, Kumano K, Kunisato A, Takahashi T, Takahashi T, Hirai H. Expression of Notch ligands, Jagged 1, 2 and Delta1 in antigen presenting cells in mice. *Immunology Letters* 81:59-64, 2002.

5. Nakamoto T, Suzuki T, J Huang, Matsumura T, Seo S, Honda H, Sakai R, Hirai H. Analysis of gene expression profile in p130Cas-deficient fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294:635-641, 2002.

6. Ogawa S, Hangaishi A, Hirai H. Identificaiton of candidate tumor suppressor genes from critical deletions of long arm of chromosome 6 in hematopoietic neoplasm. *International Congress Series* 1246:251-260,

2002.

7. Hangaishi A, Ogawa S, Qiao Y, Wang L, Hosoya N, Yuji K, Imai Y, Takeuchi K, Miyawaki S, Hirai H. Mutations of Chk2 in primary hematopoietic neoplasms. *Blood*. 99:3075-3077, 2002;

8. Izutsu K, Kurokawa M, Imai Y, Ichikawa M, Asai T, Maki K, Mitani K, Hirai H. The t(3;21) fusion product, AML1/Evi-1 blocks AML1-induced transactivation by recruiting CtBP. *Oncogene* 21:2695-2703, 2002.

9. Imai Y, Kurokawa M, Izutsu K, Hangaishi A, Maki K, Ogawa S, Chiba S, Mitani K, Hirai H. Mutational analyses of the AML1 gene in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia & Lymphoma* 43:617-621, 2002.

10. Takahashi T, Holland PWH, Cohn MJ, Shimizu K, Kurokawa M, Hirai H. An orphan PRD class homeobox gene expressed in mouse brain and limb development. *Development Genes and Evolution* 212:293-297, 2002.

2. 学会発表

1. Motoshi Ichikawa, Takashi Asai, Toshiki Saito, Sachiko Seo, Go Yamamoto, Tetsuya Yamagata, Ieharu Yamazaki, Mineo Kurokawa, Kinuko Mitani, Hisamaru Hirai. AML1 Is Required for Megakaryocytic Maturation in Adult Hematopoiesis. The American Society of Hematology 44th Meeting and Exposition, 2002, USA

2. Yoichi Imai, Mineo Kurokawa, Yuko Yamaguchi, Kinuko Mitani, Hisamaru Hirai. The Interaction between AML1/RUNX1 and the Corepressor mSin3A Regulates Phosphorylation-Induced

Transcriptional Activation, Intranuclear Location, and Stability of AML1/RUNX1. The American Society of Hematology 44th Meeting and Exposition, 2002, USA

3. Yuko Yamaguchi, Mineo Kurokawa, Yoichi Imai, Koji Izutsu, Takashi Asai, Motoshi Ichikawa, Go Yamamoto, Eriko Nitta, Tetsuya Yamagata, Kinuko Mitani, and Hisamaru Hirai. AML1 is Functionally Regulated by p300-mediated Acetylation of Specific Lysine Residues. The American Society of Hematology 44th Meeting and Exposition, 2002, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

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
Kunisato A, Chiba S, Yamaguchi E, Kumano K, Saito T, Masuda S, Yamaguchi T, Osawa M, Kageyama R, Nakauchi H, Nishikawa M, <u>Hirai H.</u>	HES-1 preserves purified hematopoietic stem cells ex vivo and accumulates side population cells in vivo.	Blood	101	1777-1783	2003
Shimizu K, Chiba S, Saito T, Takahashi T, Kumano K, Hamada Y, <u>Hirai H.</u>	Integrity of intracellular domain of Notch ligand is indispensable for cleavage required for release of the Notch2 intracellular domain.	EMBO Journal	21	294-302	2002
Suzuki T, Nakamoto T, <u>Ogawa S.</u> , Seo S, Matsumura T, Tachibana K, Morimoto C, <u>Hirai H.</u>	MICAL, a novel CasL interacting molecule, associates with vimentin.	Journal of Biological Chemistry	277	14933-14941	2002
Yamaguchi E, Chiba S, Kumano K, Kunisato A, Takahashi T, Takahashi T, <u>Hirai H.</u>	Expression of Notch ligands, Jagged 1, 2 and Delta1 in antigen presenting cells in mice.	Immunology Letters	81	59-64	2002
Nakamoto T, Suzuki T, J Huang, Matsumura T, Seo S, Honda H, Sakai R, <u>Hirai H.</u>	Analysis of gene expression profile in p130Cas-deficient fibroblasts.	Biochem Biophys Res Commun	294	635-641	2002
<u>Ogawa S.</u> , Hangaishi A, <u>Hirai H.</u>	Identificaiton of candidate tumor suppressor genes from critical deletions of long arm of chromosome 6 in hematopoietic neoplasm.	International Congress Series	1246	251-260	2002
Hangaishi A, <u>Ogawa S.</u> , Qiao Y, Wang L, Hosoya N, Yuji K, Imai Y, Takeuchi K, Miyawaki S, <u>Hirai H.</u>	Mutations of Chk2 in primary hematopoietic neoplasms.	Blood	99	3075-3077	2002
Izutsu K, <u>Kurokawa M.</u> , Imai Y, Ichikawa M, Asai T, Maki K, Mitani K, <u>Hirai H.</u>	The t(3;21) fusion product, AML1/Evi-1 blocks AML1-induced transactivation by recruiting CtBP.	Oncogene	21	2695-2703	2002
Imai Y, <u>Kurokawa M.</u> , Izutsu K, Hangaishi A, Maki K, <u>Ogawa S.</u> , Chiba S, Mitani K, <u>Hirai H.</u>	Mutational analyses of the AML1 gene in patients with myelodysplastic syndrome.	Leukemia& Lymphoma	43	617-621	2002
Takahashi T, Holland PWH, Cohn MJ, Shimizu K, <u>Kurokawa M.</u> , <u>Hirai H.</u>	An orphan PRD class homeobox gene expressed in mouse brain and limb development.	Development Genes and Evolution	212	293-297	2002

20020406

以降 P8－P77までは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
P7「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください