

20020429

厚生労働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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間 野 博 行

平成15(2003)年3月

厚生労働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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間野 博行

平成15(2003)年3月

目次

I.	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	
	自治医科大学・医学部・ゲノム機能研究部 間野博行 -----	1
II.	分担研究報告	
1.	「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	
	自治医科大学・医学部・ゲノム機能研究部 間野博行 -----	6
2.	「プロテオーム解析による不応性貧血の病態及び病因の検討」に関する研究	
	東京女子医科大学血液内科 溝口秀昭-----	10
3.	「不応性貧血の新規治療法の開発」に関する研究	
	国立国際医療センター研究所難治疾患研究部 石坂幸人 -----	12
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	14
IV.	研究成果の刊行物・別冊 -----	16

主任研究者： 間野 博行 自治医科大学医学部 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、異なった血液疾患患者の骨髓細胞全体を比べるような単純な解析を行うと、両患者の「骨髓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、広く患者さんの骨髓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。具体的には、CD34-high, CD38-low の造血幹細胞特異的膜蛋白質である AC133 に対するアフィニティカラムを用いることで、造血幹細胞相当分画を健常人および各種特発性血液疾患患者より純化し、現在まで既に 400 例を越えるサンプルの保存に成功した。本サンプルを用いたゲノミクス解析・プロテオミクス解析を行うと共に、得られた実験データを元にした分子標的治療法の開発を目指した。

分担研究者

間野博行	自治医科大学医学部ゲノム機能研究部・教授
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

髓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髓全体の遺伝子発現プロファイルは大きく異なってしまう、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、この様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る。我々は特発性血液疾患の多くが造血幹細胞（あるいはその近傍）の異常増殖クローン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・保存するバンク事業「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) 不応性貧血の鑑別診断に有効な遺伝子マーカーの同定、(2) 不応性貧血由来白血病の薬剤感受性を規定する遺伝子マーカーの同定、(3) 不応性貧血の病期進行メカニズムの解明、および(4) 発症関連遺伝子産物を標的とした分子量法の開発、を本研究計画で目指した。

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特発性血液疾患が数多くある。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髓中に 5%ある患者と 90%ある患者の骨

B 研究方法

1) 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、各種特発性血液疾患患者骨髄より造血幹細胞分画のみを純化保存し、これを Blast Bank と名付けた。平成 15 年 3 月現在で 400 例を越えるサンプルの保存に成功しており、これは純化細胞を用いたゲノミクスプロジェクトとしては世界最大級である。

2) 上記検体群を用いて以下の DNA チップ解析を行った。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、ピオチン 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、ピオチン標識化した 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、蛍光色素 PE 結合アビジンと反応させた。この DNA チップ上の cRNA 結合スポット 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 5.0 (Silicon Genetics 社)にて行った。

3) 不応性貧血疾患細胞より蛋白質を抽出し、得られた蛋白について固定化 pH 勾配等電電気泳動 (IPG), SDS-PAGE による二次元蛋白電気泳動を行う。泳動後、銀染色等を施した後、イメージをスキャナーで取り込み、画像解析ソフトウェアで処理し、MDS と正常人の泳動パターンを比較検討する。MDS 特異的なスポット切り出し、プロテアーゼで消化した後、質量分析装置等を用いて、蛋白の同定および機能解析を行う。

4) Dlk 遺伝子の細胞外ドメインをコードする cDNA を組み込んだ組換えバキュロウイルスを作製し SF9 細胞に感染させることで、大量の Dlk 遺伝子産物を純化精製した (約 180 μ g)。現在本純化蛋白を抗原として単クローン抗体を調整中である。

(倫理面への配慮)

検体収集に関しては自治医科大学及び東京女子医科大学の生命倫理委員会認可を受けた事業として開始し、連結可能匿名化の

とで研究を行った。

C 研究結果

1) ヒト白血病幹細胞のバンク事業である Blasts Bank のサンプルを用いて Affymetrix 社 GeneChip HGU95A アレイ (12,000 種類以上のヒト遺伝子配置) による網羅的遺伝子発現解析を行い、カスタム DNA チップに配置するべき遺伝子候補として以下のものを得た。

「急性骨髄性白血病 (AML) と不応性貧血との鑑別診断に役立つ遺伝子マーカーの同定」

まず両疾患が発現プロファイルから異なる疾患群に属するか否かを明らかにする目的で DNA チップデータを比較し、主成分分析法による仮想空間を作製した。本空間に実際のサンプルを配置すると興味深いことに AML と不応性貧血のサンプルは異なった場所に位置することが判り、少なくとも発現データの面からは両疾患群の鑑別診断が可能なが示唆された。またこの鑑別診断に役立つ実際の遺伝子リストの抽出にも成功した。これらを用いて疾患診断の試みを行い 95% 以上の正診率で診断可能なことが確認された。

「薬剤感受性を規定する遺伝子マーカーの同定」

初回寛解導入療法の結果完全寛解に入った患者と寛解導入が失敗した患者とを発現プロファイルの面から比較した。その結果寛解失敗群 (治療抵抗性群) 特異的な発現を示す遺伝子群を同定することに成功した。その一つである DLK を血液細胞株に強制発現させるとピンクリスチン等のピンクアルカロイド系薬剤に対する抵抗性が誘導されることが明らかになった。

「不応性貧血の病期進行メカニズム解析」

不応性貧血患者の一部は数年の経過の後 AML 用の病態へと悪性転化する。本病期進行メカニズムを明らかにするべく各病期の Blast Bank サンプルを用いて DNA チップ解析を行い病期依存性の発現を示す遺伝子を同定した。その結果 PIASy 遺伝子の発現が健康人及び不応性貧血患者においては高いが、AML への転化に伴って発現減少するこ

とが示された。そこでPIASyのがん抑制遺伝子としての機能を検証する目的でマウス血液細胞株に導入したところ細胞死が誘導され、PIASyの発現低下が疾患の悪性化に関与することが示唆された。

2) 不応性貧血患者および正常人の両者の蛋白質二次元電気泳動において再現性のある泳動パターンを得ることができた。そこで患者と正常人の泳動パターンを画像解析システムを用いて比較検討した。その結果、不応性貧血においてのみ発現している、あるいは欠落しているいくつかのスポットを検出することができた。現在、それらについて質量解析等を行い、その同定、解析を進めている。

3) 薬剤感受性を規定することが明らかになったDLKについて同遺伝子産物を認識するモノクローナル抗体を作製し、フローサイトメーター法による簡便な薬剤反応性予測システムの開発を試みた。

D&E. 考察及び結論

本研究事業において各種特発性血液疾患の大規模な純化細胞DNAチップ解析を行い、膨大な遺伝子発現データを得た。これらを元に「発現量から統計的に有意に診断」を可能にする遺伝子群の抽出に成功し、カスタムDNAチップによる診断法の可能性を示した。またチップ解析の結果得られた疾患関連遺伝子のうち治療抵抗性にリンクして発現すると思われるものについては、実際の血液細胞に発現導入して薬剤反応性の変化を解析した。その結果チップ実験からピンクアルカロイド耐性遺伝子が同定された。また疾患あるいは合併症の発症に関与すると思われる遺伝子も複数単離することに成功し、これらを標的とした分子療法の開発に向けて基盤技術の開発に成功した。このように研究計画は極めて順調に推移した問えている。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Suzuki N, Nakamura S, Mano H and Kozasa T. Gα12 activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF. Proc Natl Acad Sci USA. 100: 733-738, 2003.

2) Mano H. TEC KINASES in Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine (John Wiley & Sons Inc, Hoboken, NJ): pp3107-3110, 2002.

3) Ohki R, Yamamoto K, Mano H, Lee RT, Ikeda U and Shimada K. Identification of mechanically induced genes in human monocytic cells by DNA microarrays. J Hypertens. 20: 685-691, 2002.

4) Makishima H, Ishida F, Ito T, Kitano K, Ueno S, 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. 118: 462-469, 2002.

5) 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.

6) Bony C, Roche S, Ueno S, Sasaki T, Crackower MA, Penninger J, Mano H and Pucaat 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.

7) 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.

8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) Usuki K, et al. Efficacy of granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of acute myelogenous leukaemia: a multicentre randomized study. *Br J Haematol* **116**: 103-112, 2002
- 14) Kitagawa Y, Inoue K, Sasaki S, Hayashi Y, Matsuo Y, Lieber MR, Mizoguchi H, Yokota J and Kohno T. Prevalent involvement of illegitimate V(D)J recombination in chromosome 9p21 deletions in lymphoid leukemia. *J Biol Chem.* **277**: 46289-46297, 2002.
- 15) Akiyama M, Yamada O, Kanda N, Akita S, Kawano T, Ohno T, Mizoguchi H, Eto Y, Anderson KC, and Yamada H. Telomerase overexpression in K562 leukemia cells protects against apoptosis by serum deprivation and double-stranded DNA break inducing agents, but not against DNA synthesis inhibitors. *Cancer Lett.* **178**: 187-197, 2002.
- 16) Minemoto Y, Uchida S, Ohtsubo M, Shimura M, Sasagawa T, Hirata M, Nakagama H, Ishizaka Y, and Yamashita K. Loss of p53 induces M-phase retardation following G2 DNA damage Checkpoint abrogation. *Arch Biochem Biophys*, in press.
- 17) Mishima T, 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.* **94**: 1020-1028, 2002.
- 18) Mishima Y, Terui Y, Mishima Y, Katsuyama M, Mori M, Tomizuka H, Takizawa T, Miyazato A, Ueda M, Yamada M, Hayasawa H, Mizunuma N, Ishizaka Y, Ikeda K, Kato T, Ozawa K, Hatake K. New human myelodysplastic cell line, TER-3: G-CSF specific downregulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV. *J Cell Physiol.* **191**: 183-190, 2002.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 1) 国際公開番号：PCT/WO97/34007 ・ 発明者：間野博行・名称「PROMOTER」・ 出願人：間野博行、株式会社 DNAVEC 研究所・公開日：1997年9月18日
- 2) 公開番号：特開 2001-269174 ・発明者： 間野博行・名称「骨髓異形成症候群(MDS) の検出方法及びMDSの治療剤」・出願人： 間野博行・公開日：2001年10月2日
- 3) 国際公開番号：PCT/WO 01/64946 A1 ・

発明者：間野博行・名称「METHOD OF
DETECTING CHRONIC
MYELOGENOUS LEUKEMIA」・出願人：
間野博行、宝酒造株式会社・公開日：2001
年9月7日

4) 出願番号：特願 2001-337752・発明者：
間野博行・名称「多発性骨髄腫の分子診断
方法」・出願人：藤沢薬品工業株式会社
・出願日：2001年11月2日

5) 出願番号：特願 2001-56438・発明者：
間野博行・名称「慢性骨髄性白血病の分子
診断方法」・出願人：藤沢薬品工業株式会
社・出願日 2001年3月1日

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）
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」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：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になり、これまで困難であった白血病の鑑別診断に役立つ新たな分子マーカーの同定が期待される。しかし DNA チップはその高感度のために、異なった白血病患者の骨髓細胞全体を比べるような単純な解析を行うと、両患者の「骨髓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あるいはそのごく近傍の幼若細胞の異常に起因することに着目し、広く白血病患者骨髓より造血幹細胞分画のみを純化・保存する「Blast Bank」を設立した。既にこれまで 400 例を越える Blast Bank 細胞の収集に成功しており、本バンクは純化細胞を用いたゲノミクスプロジェクトとして世界最大級のものである。本バンク細胞を用いて大規模 DNA チップ解析を行うことにより、不応性貧血の新規診断マーカーの同定及びその病態解明が可能になると期待される。本研究計画で我々はヒト 12,000 種類以上の遺伝子について DNA チップを用いた発現量の定量を行い、実際に疾患の新規分類法及び薬剤感受性規程遺伝子などの同定に成功した。

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髓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。治療法も他家骨髓移植以外に有効な方法が無く、発症時の年齢から骨髓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。我々は本研究計画において不応性貧血患者骨髓より造血幹細胞分画のみを純化し、これを用いて大規模な DNA

マイクロアレイ解析を行い、不応性貧血の新たな病態解明を目指した。

B. 研究方法

1) 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髓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 15 年 3 月現在で 400 例を越えるサンプルの保存に成功している。

2) 実際の実験に用いる DNA マイクロアレイとして、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 アレイを作製した。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 マイクロアレイの 2 者、計約 2400 個の遺伝子に関して発現解析を行った。また 12,000 種類以上のヒト遺伝子を配置した Affymetrix 社 GeneChip HGU95A アレイも解析に用いた。得られた大量の遺伝子に関する発現情報の統計処理は GeneSpring 5.0.3 ソフトウェア (Silicon Genetics 社) にて行った。

(倫理面の配慮)

本研究計画はヒトゲノム・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、患者さま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. 研究結果及び考察

1) 不応性貧血はしばしば急性骨髄性白血病 (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 de novo AML は化学療法に比較的反応性が良好である。したがって高齢者の白血病患者を診た場合、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 AML 5 例のサンプルを我々の DNA マイクロアレイ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 遺伝子の不応性貧血特異的高発現は不応性貧血患者 22 例、AML 31 例のサンプルを用いて行った定量的 real-time PCR 法によっても確認された。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。

2) 不応性貧血細胞の化学療法抵抗性に Dlk の高発現が関与する可能性を検証する目的で Dlk 遺伝子を血液細胞株に導入し、各種抗癌剤に対する反応性を検証した。その結果興味深いことにピンクアルカロイド系薬剤 (ピンクリスチン、ピンブラスチン、ピンデシン) に対してのみ抵抗性になることが明らかになった。以上より DNA マイクロアレイを用いた解析によって薬剤反応性を規定する遺伝子の一つが同定されたことになる。

3) 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による不応性貧血診断法の開発を目指した。また Dlk の「分化抑制能」を考えると、Dlk 機能をブロックするペプチドを開発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の同定を行った。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した。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。

4) 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 例および健康人 2 例のバンク細胞をカスタム DNA マイクロアレイを用いて比較した結果、PIASy 遺伝子が健康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。しかも同遺伝子を骨髄血液細胞株に導入すると著明な細胞死が誘導されることが明らかになり、PIASy 遺伝子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。現在既に PIASy 遺伝子のノックアウトマウスを作成済みである。

D. 考察

Blast Bank 事業は極めて順調に進行しており、本邦の複数の施設との共同研究の結果既に 400 例をこえる造血幹細胞サンプルの収集・保存に成功した。このような大規模な純化細胞ゲノミクスプロジェクトは世界的にも他に例を見ない。またこれまで Blast Bank サンプルを用いて解析した DNA マイクロアレイ数はカスタムチップで 72 例、Affymetrix 社 GeneChip で 48 例を数える。限られた症例数であるものの、これまでの DNA マイクロアレイ解析の結果不応性貧血の病期進行機構および薬剤耐性機構について既に分子メカニ

ズムの一部を解明することに成功した。これまで不応性貧血及びそれ由来の急性白血病に関するゲノミクス解析は他に報告がない。また純化細胞分画を用いた血液疾患の解析についても形質細胞分画を用いた多発性骨髄腫の解析について一部報告があるのみで、臨床上重要な白血病や不応性貧血については純化プロジェクト自体の報告さえ知られていない。これら疾患群について我々のゲノミクスプロジェクトの結果貴重な臨床情報が得られると期待される。

E. 結論

本研究計画で設立した Blast Bank を用いた純化細胞によるゲノミクス解析で不応性貧血の病態解明が極めて効率良く行われることが明らかになった。不応性貧血のみならず広く特発性血液疾患の病態理解に Blast Bank を用いた解析が有効なツールとなるといえる。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki N, Nakamura S, Mano H and Kozasa T. Gα12 activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100: 733-738, 2003.
- 2) Mano H. TEC KINASES in Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine (John Wiley & Sons Inc, Hoboken, NJ): pp3107-3110, 2002.
- 3) Ohki R, Yamamoto K, Mano H, Lee RT, Ikeda U and Shimada K. Identification of mechanically induced genes in human monocytic cells by DNA microarrays. *J Hypertens*. 20: 685-691, 2002.
- 4) Makishima H, Ishida F, Ito T, Kitano K, Ueno S, 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*. 118: 462-469, 2002.
- 5) 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.

6) Bony C, Roche S, Ueno S, Sasaki T, Crackower MA, 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.

7) 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.

8) 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.

9) 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.

10) 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.

11) 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.

12) 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.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1) 公開番号：特開 2001-269174 ・発明者：間野博行・名称「骨髓異形成症候群(MDS)の検出方法及び MDS の治療剤」・出願人：間野博行・公開日：2001年10月2日

2) 国際公開番号：PCT/WO 01/64946 A1 ・発明者：間野博行・名称「METHOD OF DETECTING CHRONIC MYELOGENOUS LEUKEMIA」・出願人：間野博行、宝酒造株式会社・公開日：2001年9月7日

3) 出願番号：特願 2001-337752 ・発明者：間野博行・名称「多発性骨髓腫の分子診断方法」・出願人：藤沢薬品工業株式会社・出願日：2001年11月2日

4) 出願番号：特願 2001-56438 ・発明者：間野博行・名称「慢性骨髓性白血病の分子診断方法」・出願人：藤沢薬品工業株式会社・出願日 2001年3月1日

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）
分担研究報告書

「プロテオーム解析による不応性貧血の病態および病因の検討」
に関する研究

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：プロテオーム解析の手法を用いて、不応性貧血患者の異常細胞を解析した。不応性貧血患者および正常人の血液中の好中球を純化し、その細胞由来蛋白を抽出した。得られた蛋白について、固定化 pH 勾配等電点電気泳動、SDS-PAGE による二次元電気泳動を行い、その泳動パターンを画像解析ソフトウェアで処理し解析した。その結果、不応性貧血に特異的な蛋白の発現や欠如の存在が示唆された。

A. 研究目的

ポストゲノム時代を迎え、DNA 解析とともにプロテオミクスによる疾患特異的な蛋白の同定やその機能解析が大きな研究課題となっている。事実、遺伝子の発現と蛋白質の発現には相関関係が低いことが明らかにされており、プロテオーム解析の重要性が増している。本研究は不応性貧血を対象として、その異常クローンに由来する血液細胞のプロテオーム解析を行い、疾患特異的なタンパク質を同定し、本症の病因、病態を明らかにするとともに、新しい診断マーカー、あるいは細胞標的療法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

不応性貧血クローン由来の血液細胞のプロテオーム解析を行うにあたり、対象として、末梢血中の成熟好中球を用いることとした。この細胞を解析対象とした理由は (1)不応性貧血の好中球には形態学的、細胞生化学的な異常が明らかに認められ、何らかの蛋白異常の存在が示唆される、(2)これらの細胞は蛋白質が質的、量的に豊富なため、蛋白質の解析を行うには適している、(3)末梢血を用いて簡便かつ実用的な不応性貧血の診断マーカーを同定できる可能性がある、(4)検体の採取が容易であることなどによる。方法は、まず患者および正常人より採取

しん血液から、デキストラン沈降法を用いて好中球を純化する。好中球はプロテアーゼやフォスファターゼが豊富なため、可溶化に先立ってこれらに対するインヒビターを用いて前処理する。得られた蛋白について固定化 pH 勾配等電点電気泳動 (IPG)、SDS-PAGE による二次元蛋白電気泳動を行う。泳動後、銀染色等を施した後、イメージをスキャナで取り込み、画像解析ソフトウェアで処理し、不応性貧血と正常人の泳動パターンを比較検討する。不応性貧血特異的なスポット切り出し、プロテアーゼで消化した後、質量分析装置等を用いて、蛋白の同定および機能解析を行う。

(倫理面への配慮)

不応性貧血患者および正常人に対して本研究について説明した後、文書にて同意を得た上で血液の提供を受けた。

C. 研究結果

好中球由来蛋白の二次元電気泳動を行うにあたり、好中球はプロテアーゼ・フォスファターゼが豊富であり、安定した泳動パターンを得ることが当初困難であった。しかし、いくつかの技術的な改良を加えることで、不応性貧血および正常人の両者において、再現性のある二次元泳動パターンを得ることができた。そこで、不応性貧血患者と正常人の泳動パターンを画像解析システムを用いて比較検討し

た。その結果、不応性貧血においてのみ発現している、あるいは欠落しているいくつかのスポットを検出することができた。現在、それらについて質量解析等を行い、その同定、解析を進めている。

D. 考察

不応性貧血は、血球形態異常がみられることが特徴である。今回、不応性貧血患者と正常人の好中球についてプロテオーム解析を行ったところ、蛋白レベルにおいて不応性貧血特異的蛋白の存在が示唆された。しかし、個体差、性差、年齢差によるバイアスに基づく蛋白も同時に同定している可能性もあり、今後、多数の検体を解析することにより、不応性貧血特異的蛋白を同定していく必要があると考えられる。また、解析対象として骨髓のCD34陽性細胞を用いた検討も必要であるが、解析に足る蛋白量を得ることが難しい。複数の検体をブレンドして解析を行うなどの工夫が必要であると考ええる。

E. 結論

不応性貧血患者の血球に不応性貧血特異的な蛋白の発現あるいは欠落が存在することが示唆された。それらの蛋白の同定、機能解析により、本症の病態および病因が明らかになるものと考ええる。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Usuki K, et al. Efficacy of granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of acute myelogenous leukaemia: a multicentre randomized study. *Br J Haematol* **116**: 103-112, 2002

2) Kitagawa Y, Inoue K, Sasaki S, Hayashi Y, Matsuo Y, Lieber MR, Mizoguchi H, Yokota J and Kohno T. Prevalent involvement of illegitimate V(D)J recombination in chromosome 9p21 deletions

in lymphoid leukemia. *J Biol Chem.* **277**: 46289-46297, 2002.

3) Akiyama M, Yamada O, Kanda N, Akita S, Kawano T, Ohno T, Mizoguchi H, Eto Y, Anderson KC, and Yamada H. Telomerase overexpression in K562 leukemia cells protects against apoptosis by serum deprivation and double-stranded DNA break inducing agents, but not against DNA synthesis inhibitors. *Cancer Lett.* **178**: 187-197, 2002.

H. 知的財産権の出願、登録状況
なし

分担研究者：石坂幸人 国立国際医療センター研究所部長

研究要旨：dlk 遺伝子の過剰発現が不応性貧血症の病態と密接に関連している知見が得られた。本分担研究では、dlk 遺伝子産物を検出するための単クローン抗体を作成することを試みている。昨年度、酵母システムにて調整した dlk 遺伝子産物を抗原として単クローン抗体の作成を試みたが、良好な反応性を示すクローンは得られなかった。そこで本年度は再度単クローン抗体作成を試みるため、カイコ細胞によるリコンビナント蛋白質発現システムを用いて dlk 遺伝子産物の細胞外ドメイン蛋白質を調整した。

A. 研究目的

DNA チップを用いた解析により、dlk 遺伝子の過剰発現が不応性貧血症に関与してことが明らかにされた。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、本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ことを目的としている。

B. 研究方法

Dlk 遺伝子の細胞外ドメインをコードする cDNA を PCR で増幅し、塩基配列を確認後、NcoI—HindIII DNA 断片（約 0.8 kb）を pFastBac ベクターに組み込んだ。得られたプラスミドをセルフェクチン試薬を用いて SF9 細胞に導入し、3 日間培養した。培養上清を段階希釈し、 4×10^5 /35 mm デイッシュの High Five 細胞に感染させ 3 日間培養した後、発現する dlk 遺伝子産物をウエスタン法により解析し、約 40kDa の蛋白質として確認した。一次ウイルスを含む上清と SF9 細胞を用いてウイルスを増幅した。 3×10^6 /10 cm プレートに 10 枚調整し、三次ウイルスを感染させて、精製開始サンプルとした。カイコ細胞の胞体内に dlk 蛋白質の発現を認めた。アミノ末端にタ

グとして付与された (His)₆ を用いてニッケルカラムで精製した。単一バンドが得られなかったため、陰イオン交換 (DEAE) カラムクロマトグラフィーを行った。300 mM の NaCl で溶出され画分中に dlk 遺伝子産物が単一蛋白質として精製された。10 枚のプレートから約 180 ug の精製標品が得られた。このプロトコルツールを繰り返すことにより約 500 ug の精製蛋白質を抗原として単クローン抗体を調整中である。

C. 研究結果

カイコ発現システムを用いて dlk 遺伝子産物を発現・精製した。今後、単クローン抗体の作成や結合ペプチドを同定するために、このシステムは有力な材料になると思われる。

D. 考察

Dlk 遺伝子は培養細胞での発現が困難であるが、カイコ由来細胞株では比較的効率良く発現させることが可能であった。

E. 結論

今回調整した dlk 遺伝子産物を用いて単クローン抗体を作成するとともに

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Minemoto Y, Uchida S, Ohtsubo

M, Shimura M, Sasagawa T, Hirata M, Nakagama H, Ishizaka Y, and Yamashita K. Loss of p53 induces M-phase retardation following G2 DNA damage Checkpoint abrogation. Arch Biochem Biophys, in press.

2) Mishima T, 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. **94**: 1020-1028, 2002.

3) Mishima Y, Terui Y, Mishima Y, Katsuyama M, Mori M, Tomizuka H, Takizawa T, Miyazato A, Ueda M, Yamada M, Hayasawa H, Mizunuma N, Ishizaka Y, Ikeda K, Kato T, Ozawa K, Hatake K. New human myelodysplastic cell line, TER-3: G-CSF specific downregulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV. J Cell Physiol. **191**: 183-190, 2002.

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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Suzuki N, Nakamura S, Mano H and Kozasa T	Ga12 activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF	Proc Natl Acad Sci USA	100	733-738	2003
Mano H	TEC KINASES	Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine	1	3107-3110	2002
Ohki R, Yamamoto K, Mano H, Lee RT, Ikeda U and Shimada K	Identification of mechanically induced genes in human monocytic cells by DNA microarrays	J Hypertens	20	685-691	2002
Makishima H, Ishida F, Ito T, Kitano K, Ueno S, 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	118	462-469	2002
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
Bony C, Roche S, Ueno S, Sasaki T, Crackower MA, 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
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
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
Yokohari K, Yamashita Y, Okada S, Ohya Ki K, Oda S, Hatano M, Mano H, Hirasawa H and Tokuhisa T	Isoform-dependent interaction of BRDGI with Tec kinase	Biochem Biophys Res Commun	289	414-420	2001
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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
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
Usuki K, et al.	Efficacy of granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of acute myelogenous leukaemia: a multicentre randomized study	Br J Haematol	116	103-112	2002
Kitagawa Y, Inoue K, Sasaki S, Hayashi Y, Matsuo Y, Lieber MR, Mizoguchi H, Yokota J and Kohno T	Prevalent involvement of illegitimate V(D)J recombination in chromosome 9p21 deletions in lymphoid leukemia	J Biol Chem	277	46289-46297	2002
Akiyama M, Yamada O, Kanda N, Akita S, Kawano T, Ohno T, Mizoguchi H, Eto Y, Anderson KC, and Yamada H	Telomerase overexpression in K562 leukemia cells protects against apoptosis by serum deprivation and double-stranded DNA break inducing agents, but not against DNA synthesis inhibitors	Cancer Lett	178	187-197	2002
Minemoto Y, Uchida S, Ohtsubo M, Shimura M, Sasagawa T, Hirata M, Nakagama H, Ishizaka Y, and Yamashita K	Loss of p53 induces M-phase retardation following G2 DNA damage Checkpoint abrogation	Arch Biochem Biophys		in press	
Mishima T, 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	94	1020-1028	2002
Mishima Y, Terui Y, Mishima Y, Katsuyama M, Mori M, Tomizuka H, Takizawa T, Miyazato A, Ueda M, Yamada M, Hayasawa H, Mizunuma N, Ishizaka Y, Ikeda K, Kato T, Ozawa K, Hatake K	New human myelodysplastic cell line, TER-3: G-CSF specific downregulation of Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase IV	J Cell Physiol	191	183-190	2002

20020429

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.14-P.15の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。