

厚生労働科学研究費補助金
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 14 年度 総括・分担研究報告書

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

- 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
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
東京大学医学部附属病院血液腫瘍内科 平井 久丸 9
2. 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
京都大学医学部血液・腫瘍内科 内山 卓 12
3. ビタミン K2 および D3 併用による白血病細胞の分化誘導増強効果ならびに分化誘導に伴うアポトーシス耐性化機構
東京医科大学内科学第一講座 大屋敷 一馬 14
4. 骨髄異形成症候群における特異的蛋白の同定に関する研究
東京女子医科大学血液内科 寺村 正尚 16
5. 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
名古屋大学大学院医学系研究科分子細胞内科 直江 知樹 18
6. 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
自治医科大学ゲノム機能研究部 間野 博行 20
7. 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
獨協医科大学血液内科 三谷 絹子 23

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 27

IV. 研究成果の刊行物・別刷 31

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

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

骨髓異形成症候群(MDS)は、ゲノムの異常、造血細胞の分化の異常、アポトーシスの異常、免疫学的異常など多様な病態の関与する難治性造血器疾患である。本研究では、こうした MDS の病態の原因となる分子異常を同定し、その発症機序の解明を行うことにより、MDS に対する新規治療法の開発を行うことを計画した。平成 14 年度については、前年度の研究成果に基づいて、MDS におけるゲノム・遺伝子発現の異常の網羅的探索、血球分化の制御にかかわる転写因子の異常、免疫の異常の解析、さらには MDS モデルマウスの作成を通じて、新たな分子診断技術の開発と分子標的療法・免疫療法の開発に関する研究を推進した。すなわち、ゲノムの異常としては、DNA のメチル化という観点から、7q における網羅的メチル化解析により 7q 欠失の標的遺伝子の候補を同定するとともに、MDS における癌抑制遺伝子 FHIT のメチル化の異常を明らかにした。また網羅的遺伝子発現異常の観点からは、前年度からの重要な成果である純化白血球細胞バンクとマイクロアレイ解析技術を用いた網羅的遺伝子発現の検討により、MDS の病期進行に関与する遺伝子群の同定と機能解析、さらには、MDS に関連した AML の病型の分子診断法・MDS のテラーメイド治療開発の基礎となる遺伝子発現プロファイルの解析を行った。また、遺伝子発現の網羅的解析のプロテオミクス技術を用いた新たな方法として MDS 細胞に発現する蛋白の二次元電気泳動展開による異常蛋白の同定法の確立を行った。転写因子異常の観点からは、MDS における転写因子 TEL のアイソフォーム異常の解析を行うとともに、条件的 AML1 欠失マウスおよび GATA-1 プロモーターを用いた Evi-1 過剰発現マウスなど、MDS 類似の病態を示すモデル動物の作成を行った。一方、MDS のより生理的な治療法の開発に関連して、Vitamin(Vit) K2 および D3 の併用による血球減少改善のメカニズムを、アポトーシスの抑制と分化誘導効果の観点から解析するとともに、これらの薬剤を用いた MDS の治療に関する臨床試験の基盤整備を行った。また、MDS の分子免疫機序の解明とより効果的な免疫抑制療法の開発については、「低リスク MDS に対するシクロスポリン療法」の臨床試験を継続するとともに、登録症例について臨床効果と分子免疫学的パラメータの関連について検討を行った。

分担研究者

- ・大屋敷一馬
東京医科大学第一内科 教授
- ・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 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

骨髓異形成症候群(MDS)は無効造血と前白血病状態を特徴とする予後不良の難治性造血器障害の一つである。近年、高齢者や固形腫瘍に対する化学療法の進歩に伴い本症は増加の一途を辿っており、その病態の解明と有効な治療手段の開発が急務である。MDS の発症と進展には、造血前駆細胞の分化・増殖の障害、アポトーシスの異常、転写因子の異常、癌遺伝子・癌抑制遺伝子の異常、ゲノムの不安定性、免疫学的異常などの多くの病態の関与が示唆されているが、一部の MDS 症例を除いてその本質的な病態は不明である。一方、治療の観点からは、副作用の極めて大きい造血幹細胞移植が現在のところ唯一の根治的治療法であって、本症の主体をなす高齢者にも

適応可能な副作用の少ない根治的治療手段は知られていない。本研究は、こうした背景に基づいて、これら MDS の複雑な病態を一元的に説明しうるメカニズムを解明し、こうして得られた知見に基づいてより生理的で副作用の少ない新規治療法を開発することを目的として計画されたものである。具体的には、(1) 近年急速な進歩を遂げたゲノム情報・解析技術を用いた MDS の原因遺伝子の同定、(2) 血球分化に關与する転写因子レベルからの病態解析、ならびに(3)MDS の分子免疫学的解析を行うことにより、MDS の原因となる分子異常を明らかにし、これらの分子を標的とした新規分子標的治療・分子免疫療法の開発を進めている。我々は、昨年度までの研究により、der(1;7)転座をはじめとした MDS に認められる染色体転座の解析、マイクロアレイ技術を駆使した、MDS における遺伝子発現異常の解析、薬剤代謝遺伝子、転写因子関連遺伝子に焦点を絞った MDS の遺伝的素因の解析、転写因子 AML1、Evi-1 遺伝子改変マウスの作成、および転写因子 TEL に関する機能解析、さらに MDS における T 細胞レパトア解析などによる免疫学的異常の關与について、一定の成果を得ることができたので、本年度はこれらの研究成果を踏まえて、さらに以下の研究を行った。

「ゲノムレベルからの MDS 原因遺伝子の探索」

- (1)MDS に高頻度に認められる予後不良染色体異常で 7q-の標的遺伝子の探索(平井)。
- (2)FHIT 遺伝子の MDS におけるメチル化の解析(直江)。
- (3)昨年度に引き続きマイクロアレイによる MDS における遺伝子発現異常の網羅的解析(間野)。
- (4)プロテオミクス技術を用いた MDS における蛋白レベルでの網羅的発現解析(寺村)。

「血球分化にかかわる転写因子レベルからの病態解析」

(5)TEL 遺伝子のアイソフォームの機能とその MDS における発現異常の解析(三谷)。

(6)MDS に対する Vitamin(Vit) K2 および D3 の作用機序の検討(大屋敷)。

(7)昨年度作成した AML1 条件的欠失マウス、および Evi-1 過剰発現マウスの造血系の解析(平井)。

「分子免疫学的アプローチによる MDS の病態解明」

(8)「低リスク MDS に対するシクロスポリン療法」および「シクロスポリンの作用機序および薬剤感受性に関する遺伝子研究」についての多施設共同研究(内山)。

(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)7q-の標的遺伝子の探索

MDS で高頻度に欠失をみとめる 7q の標的遺伝子についてメチル化による不活化という観点から探索を行った。すなわち、ヒトゲノム塩基配列データベースから、7q 上メチル化の標的となりうる CpG アイランドを抽出し、PCR で増幅可能な 130 個の CpG アイランドについて bisulfite-法によりメチル化される CpG 塩基を同定することにより、7q 全長にわたる CpG アイランドのメチル化マップを作成した(平井)。

(2)MDS における癌抑制遺伝子 FHIT のメチル化による不活化について、メチル化特異的 PCR 法、bisulfite 法および定量 PCR 法により解析した(直江)。

(3)MDS における遺伝子発現異常の網羅的検討 MDS 由来の AML と de Nove AML について、12000 種類以上の遺伝子を搭載した Affimetrix HGU95A アレイを用いて解析し、遺伝子発現プロファイルと病型・治療反応性との相関を解析した。さらに 3456 遺伝子を搭載したカスタムチップを作成し、これを用いたマイクロアレイ解析により MDS で病期特異的に発現する遺伝子群の同定を試みた(間野)。

(4)MDS の蛋白発現異常のプロテオミクス解析

MDS 由来好中球および正常好中球を可溶化し、両者を二次元電気泳動展開した後、特異的に出現ないし消失するスポットについて、質量分析法による分子種の同定を試みた(寺村)。

(5)MDS における TEL アイソフォームの解析 MDS に発現する種々の TEL アイソフォームを RT-PCR 法を用いて同定し、各アイソフォームの機能を EBS(Ets binding sequence)を用いたレポーターアッセイならびに MEL 細胞を用いた biological アッセイにより検討した(三谷)。

(6)MDS における Vit K2 および D3 の作用機序の検討

Vit K2 および D3 を HL60 および U937 の in vitro 培養系に添加することにより、分化誘導とアポトーシスに及ぼす効果を検討した(大屋敷)。

(7)転写因子異常と MDS の病態に関する個体レベルでの解析

Cre-LoxP システムによる条件的 AML1 欠失マウスおよび GATA-1 プロモーターを用いた Evi-1 過剰発現マウスについて、成体造血系における異常を解析した(平井)。

(8)低リスク MDS に対するシクロスポリンの有効性の分子免疫学的解析

多施設共同研究により低リスク MDS に対するシクロスポリンの有効性を前方視的に検討

するとともに、HLA 遺伝子型、PNH 顆粒球、T 細胞受容体(TCR)レパトア解析、ならびに HUMARA 法によるクロナリティーの解析によりシクロスポリンの作用機序と治療効果予測因子の解析を行った(内山)。

C. 結果

(1)7q の CpG アイランドの網羅的メチル化解析では、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。これらの遺伝子は特定の染色体領域にクラスターを形成して存在すること、その 7q における分布は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)。

(2)腎細胞癌等で不活化が示されている癌抑制遺伝子 FHIT 遺伝子のプロモーター領域のメチル化の解析の結果、MDS 患者検体においても FHIT 遺伝子のプロモーター領域のメチル化が観察されること、またメチル化は病期の進行に伴って増強することを明らかにした(直江)。

(3)MDS における遺伝子発現異常のマイクロアレイ解析では、各 10 例の de novo AML と MDS 由来 AML について純化 AC133 陽性細胞バンク(BLAST バンク)の検体を用いた遺伝子発現の網羅的解析により、両病型で発現パターンの異なる遺伝子群を明らかにするとともに、ピンカアルカロイドに対する薬剤感受性を規定する遺伝子の同定を行った。さらに病期の異なる MDS 31 検体のカスタムチップによる解析により、病期の進行とともに発現の変化する遺伝子群を同定した。このうち病期の進行とともに発現の低下する遺伝子 PIASy については、造血細胞においてアポトーシスを誘導に作用することを明らかにした(間野)。

(4) プロテオミクスを用いた MDS の発現解析の結果、二次元電気泳動システムによる蛋白解析システムを確立するとともに、MDS 好中球で特異的に発現ないし消失するいくつかの蛋白のスポットの同定に成功し、現在質量分析法による各異常スポットの同定が進行中である(寺村)。

(5) MDS における TEL アイソフォームの検討では、TEL の DNA 結合領域である ETS ドメインの全部ないし一部を欠いたアイソフォームが MDS で特異的に発現していること、またこれらのアイソフォームは、正常 TEL に対してドミナントネガティブに作用し、正常 TEL の機能を抑制することを示した(三谷)。

(6) Vit K2 および D3 はの造血細胞における機能の検討では、Vit K2 が HL60 および U937 にアポトーシスを誘導すること、また両者を培養液中に添加した場合、相乗的に分化が誘導されるとともに、アポトーシス刺激に対する抵抗性となること、このアポトーシス抑制機能の一部は p21CIP1 の誘導によることを示した。(大屋敷)。

(7) MDS における転写因子異常の個体レベルでの解析においては、成体造血組織において条件的に AML1 を欠失するマウスおよび GATA-1 プロモーター下に造血組織で Evi-1 を過剰発現するマウスを発生工学の手法を用いて作成し、その造血系における異常を解析した。両マウスともに形態異常を伴う巨核球の増生と血小板の低下を示し、さらに Evi-1 過剰発現マウスにおいては巨核芽球性白血病の発症が認められるなど、MDS 類似の病態が観察された。また AML1 欠失マウスでは、巨核球の多倍体化の異常が認められた(平井)。

(8) 「低リスク MDS に対するシクロスポリン療法」および「シクロスポリンの作用機序および薬剤感受性に関する遺伝子研究」についての多施設共同研究では 9 名の患者が登録され、3 名については治療後の解析が終了した。解析症例数が十分ではないものの、9 名中 4

名が DRB1 1501/1502 を有しており、治療の終了した 3 名についてはシクロスポリン投与前後で TCR レパトアが変化することが確認されている。

D. 考察

研究 2 年度目に当たる平成 14 年度の研究においては、「ゲノムレベルからのアプローチ」「造血細胞の分化に関与する転写因子からのアプローチ」および「分子免疫学的アプローチ」により得られた平成 13 年度の成果に基づいて、これらをさらに継続・発展されることにより、MDS の病態のさらなる解明と新規治療法の確立を目指した。

まず、「ゲノムレベルからのアプローチ」では、MDS で高頻度に認められ、かつ予後不良の染色異常という観点から、-7/7q-の異常について解析を行った。7q-については、従来の精力的な欠失解析においても責任遺伝子の同定に至っていないことに鑑み、メチル化による遺伝子の不活化という観点からアプローチを試みた。7q の網羅的メチル化解析の結果、7q ゲノムでクラスターをなして腫瘍特異的なメチル化をうける遺伝子群が同定された。次年度以降、これらの遺伝子群のから 7q における MDS の標的遺伝子の同定を試みる(平井)。同様に直江らは、MDS の病態における DNA のメチル化の重要性に着目し、メチル化により不活化されることが知られている癌抑制遺伝子 FHIT の MDS および AML における不活化検討した。現在までの解析で、MDS 特異的な FHIT プロモーターのメチル化および MDS 病期の進行と FHIT のメチル化の関連を示唆する結果が得られており、7q のメチル化解析の結果も併せて、今後 MDS における脱メチル化剤による治療の可能性が示唆された。

間野らは、平成 13 年度に引き続き、マイクロアレイを用いた MDS における遺伝子発現の網羅的検討を行った。純化白血病細胞検体

保存事業である BLAST バンクは本年度 400 検体を超え、世界最大の純化白血病細胞バンクとなっている。本年度は、この BLAST バンク検体を用いて、まず治療戦略上しばしば鑑別が問題となる de novo AML と MDS 由来の AML における分子病態の相違について遺伝子発現プロファイルの比較検討を行うことにより、解析を行い、両病型での鑑別に有用な遺伝子群を同定するとともに治療反応性を規定する遺伝子群の同定を行った。これらは MDS のマイクロアレイ診断、あるいはテラーメド治療を可能にする重要な研究であると考えられる。また、MDS における遺伝子発現の異常を蛋白レベルで解析することを目的として、MDS に発現する蛋白の二次元電気泳動展開と質量分析による異常蛋白の同定技術の確立に関する基礎的研究も行った。さらに MDS の病態解明の観点からは、MDS の病期特異的な遺伝子発現の異常の解析も行い、MDS の病態の進行に重要な遺伝子群を明らかにした。次年度以降、これらの機能的な解析により MDS 病態進展の分子メカニズムが明らかになることが期待される。

一方、「造血細胞の分化に関与する転写因子からのアプローチ」において、三谷らは、転写因子 TEL の MDS における異常について昨年度に引き続き解析を行い、MDS においては、TEL 遺伝子の異なるアイソフォームが転写され、これに対応する蛋白が、正常 TEL の機能をドミナントネガティブに抑制することにより、MDS の病態に関与する可能性を示した。また、昨年度の重要な成果として樹立された AML1 および Evi-1 遺伝子改変マウスの検討では、無効造血と白血病化という MDS を特徴づける病態が再現されることが確認された(平井)。これらのマウスは、今後個体レベルでの MDS 発症機構の分子機序の解明の貴重であるばかりでなく、新規治療薬剤の開発という観点からも、MDS のモデル動物として有用であると考えられる。さらに、

本研究の最終的目標の一つである「MDS に対する新規治療法の開発」に関連して、大屋敷らは、現在 MDS に対するより生理的で副作用の少ない治療法として有望視されている Vit K2 と Vit D3 の白血病細胞に対する分化とアポトーシスの誘導効果およびその作用機序に関して研究を行った。本年度の検討は、次年度から実施される「骨髄異形成症候群 不応性貧血におけるビタミン K2 単独療法ならびにビタミン K2 と D3 併用療法の有効性に関する検討」の重要な基礎的研究であると考えられる。

「分子免疫学的アプローチ」では、昨年度より内山らによって「低リスク MDS に対するシクロスポリン療法」および「シクロスポリンの作用機序および薬剤感受性に関する遺伝子研究」の多施設共同研究の基盤整備と分子免疫学的解析技術の確立が行なわれていたが、本年度は両研究の登録が開始となり、これまでに 9 例の患者が登録が完了した。これらの臨床試験は、「Vit K2 および D3」による治療法の研究とならんで、臨床に直結する重要な研究であると位置づけている。いまだ少数の解析ながら、MDS と免疫異常に関する興味深い観察結果が得られている。今後各施設の倫理委員会等の手続きの終了とともに登録の増加が予測され、来年度中の試験終了を目指している。

E. 結論

平成 13 年度の研究成果を踏まえ、平成 14 年度についても引き続き、MDS の原因遺伝子の同定と病態の解明、ならびに MDS に対する新規治療法の開発を目的として研究を行った。MDS の原因としてのゲノム異常の解析では、DNA のメチル化に着目して 7q の網羅的メチル化解析により 7q 欠失の標的遺伝子の候補となる遺伝子群の同定を行った他、FHIT 遺伝子のメチル化と MDS の関連についても解析を行った。遺伝子発現異常の網羅

的解析では、マイクロアレイ技術と純化白血病細胞バンクの検体を用いて MDS の病期特異的な遺伝子の網羅的解析による MDS 病期進展にかかわる遺伝子群の同定と MDS の病型・治療反応性に関与する遺伝子群の同定を行うとともに、プロテオミクス技術を用いた発現異常蛋白の同定法を確立した。転写因子異常の観点からは、TEL 遺伝子アイソフォームの MDS への関与を明らかにするとともに、転写因子異常による MDS モデルマウスの確立を行った。また、新規治療法の開発にも関連して、本研究で MDS への臨床試験を予定している Vit K2 および D3 の白血病細胞における分化誘導とアポトーシスに関する研究を行った。MDS における分子免疫機序の解明と有効な免疫抑制療法の開発に関しては、本年度よりシクロスポリンの低リスク MDS に対する臨床試験が本格的にスタートした。これらの成果を踏まえ、最終年度においては、包括的なゲノム異常、転写因子異常の探索による MDS の分子機序の解明を行うとともに、MDS に対する新規治療法の開発、という本研究の最終目標をより高度のレベルで達成することを目指す。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

◆論文発表

1. 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.
2. 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.

3. 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 Notch2 intracellular domain. *EMBO J.* 21:294-302, 2002.
4. Funato K, Miyazawa K, Yaguchi M, Gotoh A, Ohyashiki K. Combination of 22-oxa-1,25-dihydroxyvitamin D3, a vitamin D3 derivative, with vitamin K2 (VK2) synergistically enhances cell differentiation but suppresses VK2-inducing apoptosis in HL-60 cells. *Leukemia* 16:1519-1527, 2002.
5. Ohyashiki JH, Sashida G, Tauchi T, Ohyashiki K. Telomeres and telomerase in hematologic neoplasia. *Oncogene* 21:680-687, 2002.
6. Ito Y, Okabe-Kado J, Honma Y, Iwase O, Shimamoto T, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. Elevated plasma level of differentiation inhibitory factor nm23-H1 protein correlates with risk factors for myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 16:165-169, 2002.
7. Minami Y, Kiyoi H, Yamamoto K, Ueda R, Saito H, Naoe T. Selective apoptosis of tandemly duplicated FLT3-transformed leukemia cells by Hsp90 inhibitors. *Leukemia* 16:1535-1540, 2002.
8. Kiyoi H, Ohno R, Ueda R, Saito H, Naoe T. Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the jaxtamembrane domain. *Oncogene* 21: 2555-2563, 2002.
9. Luo J-M, Yosida H, Komura S, Ohishi N, Pan L, Shigeno K, Hanamura K, Iida S, Ueda R, Naoe T, Akao Y, Ohno R, Ohnishi K. Possible Dominant-negative mutation of the SHIP gene in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 17:1-8, 2003.
10. 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.

11. 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.

12. Suzuki N, Nakamura S, Mano H and Kozasa T. Gα12 activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leuke-mia-associated RhoGEF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.

13. Waga K, Nakamura Y, Maki K, Arai H, Yamagata T, Sasaki K, Kurokawa M, Hirai H, Mitani K. Leukemia-related trans-cription factor TEL accelerates diffe-rentiation of Friend erythro-leukemia cells. *Oncogene* 22:59-68, 2003.

14. Arai H, Maki K, Waga K, Sasaki K, Nakamura Y, Imai Y, Kurokawa M, Hirai H, Mitani K. Functional regulation of TEL by p38-induced phosphorylation. *Biochem Biophys Res Comm* 299: 116-125, 2002.

15. Tsurumi S, Nakamura Y, Maki M, Omine M, Fujita K, Okamura T, Niho Y, Hashimoto S, Kanno K, Suzuki K, Hangaishi A, Ogawa S, Hirai H, Mitani K. N-ras and p53 gene muta-tions in Japanese patients with myelo-proliferative disorders. *Am J Hematol* 71: 131-133, 2002.

◆学会発表

1. Lili Wang, Seishi Ogawa, Akira Hangaishi, Ying Qiao, Noriko Hosoya, Kazuma Ohyashiki, Hideaki Mizoguchi, Hisamaru Hirai. Molecular characterization of the recurrent unbalanced translocation t(1;7)(q10;p10). 44th Annual Meeting for American Society of Hematology 2003.

2. Ohyashiki K, Sashida G, Nakajima A, Tauchi T, Ohyashiki JH: Telomere Dynamics in

Myelodysplastic Syndromes Determined by Telomere Measurement of Marrow Metaphases. 44th Annual Meeting for American Society of Hematology, *Blood* 110: 372a-373a.

3. Iwabe K, Shimoyama M, shiyama M, Kazama H, Teramura M, Kato T, Mizoguchi H. Analysis of T cell receptor Vb repertoire in patients with myelodysplastic syndrome.

Experimental Hematology 30(suppl1): 98, 2002

4. Ninomiya M, Hirose Y, Kiyoi H, Ito M, Naoe T. Retinoic acid syndrome in xeno-transplanted mouse with human acute promyelocytic leukemia cell line. *International Journal of Hematology* 76: Supplement I, 18, 2002

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

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

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

骨髓異形成症候群(MDS)に典型的に観察される 7 番染色体長腕(7q)の欠失について、その標的遺伝子を同定する目的で、7q 領域の網羅的メチル化解析を行った。ヒトゲノム計画により公開されている 7q の一次塩基配列からメチル化を受ける可能性のある CpG アイランド 130 個を抽出し、MDS 由来細胞株を含む 41 検体について、メチル化の有無を bisulfite 法により染色体ワイドに解析した。解析の結果、(1)MDS 由来細胞株を含む造血器腫瘍細胞株において、7q の CpG アイランドのメチル化は腫瘍特異的に観察されること、(2)メチル化される領域は腫瘍細胞ごとに異なるのではなく、特定の染色体領域にクラスターを形成して存在すること、(3)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こと、および(4)患者腫瘍検体におけるメチル化の程度は、正常組織と培養腫瘍細胞株の中間の値を示すこと、が明らかとなった。以上より、7 番染色体の欠失と並んでそのメチル化が MDS を含む造血器腫瘍の病態や細胞の不死化に関与している可能、ならびに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の不活化を生じ、MDS の発症・進展に関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

7 番染色体長腕の欠失(-7/7q-)は MDS や急性骨髄性白血病(AML)、とくに化学療法などに続発する二次性の MDS/AML に典型的かつ高頻度に認められる予後不良の染色体異常であることから、その標的遺伝子の同定は MDS の病態を解明し、分子標的治療を含む MDS の新規治療法を確立する上で極めて重要である。しかし、従来の古典的な欠失解析による-7/7q-の検討では、確かに欠失の集積する染色体領域が複数同定されるものの、未だその標的遺伝子の同定には至っていない。一方、遺伝子の不活化は遺伝子の欠失のみならずそのプロモーター領域のメチル化によっても生ずること、また MDS は脱メチル化剤が有効性を示す代表的な病態であることから、7q 欠失により不活化される遺伝子はメチル化による不活化の標的となっている可能性も想定される。そこで本研究では、7q の MDS(/AML)における標的遺伝子を同定することを目的として 7q 上の CpG アイランドのメチル化の網羅的解析を行った。

(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、当該患者から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

公表されたヒトゲノム塩基配列データベースから、7q 上メチル化の標的となりうる CpG アイランドを抽出し、各 CpG アイランドについて 300bp 内外の塩基配列を増幅する PCR プライマーを用いて、bisulfite 処理を施した正常組織および腫瘍検体のゲノム DNA から各 CpG アイランドを PCR 増幅したのち、直接塩基配列決定法により増幅した PCR 断片の塩基配列を決定した。決定した個々の塩基配列について C→T 塩基置換をカウントして各 CpG アイランドのメチル化の程度を数値化することにより、7q 全長にわたる CpG アイランドのメチル化マップを作成した。

C. 結果

7q の塩基配列データベース検索から抽出された CpG アイランドの定義を満たす 290 個の塩基配列のうち、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 個の塩基配列(CpG アイランド)について、メチル化の定量的検討を行った。これは 7q の全 CpG アイランドの約 60% に相当すると考えられる。ヒト胎盤(HP)1、末梢血単核球(PB)4、骨髄単核球(BM)2、AML 患者検体(AML)4、MDS 由来細胞株(MDS/CL)5、AML 由来細胞株(AML/CL)15、および ALL 由来細胞株(ALL/CL)15、の計 41 種類の検体を用いたメチル化解析の結果、(1)MDS 由来細胞株を含む造血器腫瘍細胞株において、7q の CpG アイランドのメチ

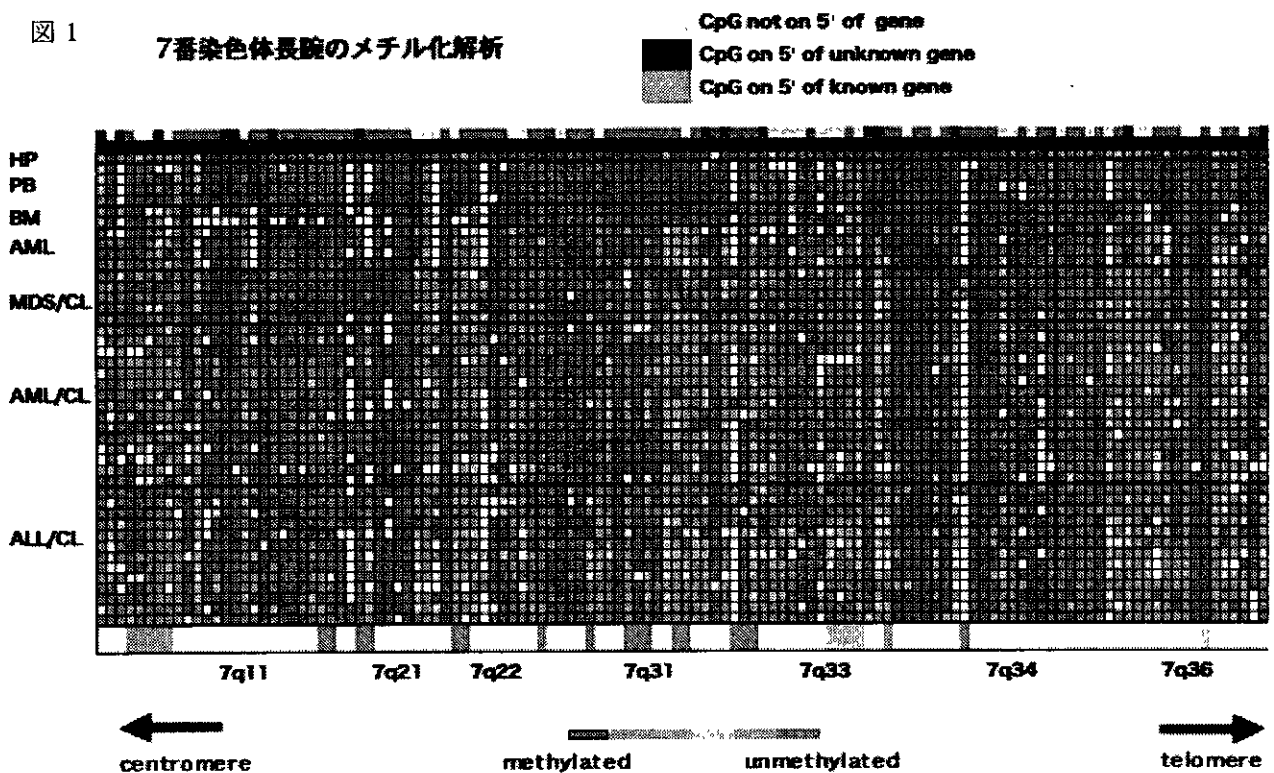
ル化は腫瘍特異的、かつ高頻度に観察されること、(2)メチル化を受ける領域は腫瘍細胞ごとに異なるのではなく、特定の染色体領域(7cen~7q11, 7q22, 7q32~33, 7q35~36)にクラスターを形成して存在すること、(3)これらのメチル化領域は従来の欠失解析によって同定されている欠失の集積領域とオーバーラップする傾向が認められること、および(4)患者腫瘍検体におけるメチル化は、正常組織と培養腫瘍細胞株の中間の分布と程度を示すこと、が明らかとなった。

D. 考察

本研究では、MDS/AML に関する癌抑制遺伝子座が想定される 7q 領域について、メチル化による遺伝子の不活化という観点

図 1

7番染色体長腕のメチル化解析



から、その標的遺伝子(ないし遺伝子群)に対するアプローチを試みた。

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る。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こと、メチル化される遺伝子が染色体上にクラスターをなして存在する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ものあるいは染色体の構造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、今後 7q の標的遺伝子の同定に当たっては、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限定していく必要があると考えられる。

E. 結論

MDS および AML で高頻度に欠失が認められる 7q の領域について、腫瘍検体を用いた網羅的メチル化解析を行い、MDS 由来細胞株を含む腫瘍検体特異的にメチル化をうける共通の遺伝子群を同定した。今後これらの遺伝子の機能解析、変異解析によって、MDS/AML における 7q の標的遺伝子の同定が可能になると期待される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

◆論文発表

1. 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
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 Notch2 intracellular domain. *EMBO J.* 21: 294-302, 2002.
3. 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.

◆学会発表

1. Lili Wang, Seishi Ogawa, Akira Hangaishi, Ying Qiao, Noriko Hosoya, Kazuma Ohyashiki, Hideaki Mizoguchi, Hisamaru Hirai. Molecular characterization of the recurrent unbalanced translocation t(1;7)(q10;p10). 44th Annual Meeting for American Society of Hematology 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

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

分担研究者 内山 卓 京都大学医学部附属病院血液・腫瘍内科 教授

研究要旨

特発性造血障害に関する研究班の骨髓異形成症候群（MDS）に対するシクロスポリン療法に参加された患者検体を用いて免疫学的解析を行った。HLA 遺伝子の解析では DRB1 1501/1502 を有する割合が高い傾向にあり、PNH 顆粒球も半数例で陽性であった。T 細胞受容体遺伝子解析ではシクロスポリン療法の前後でレパトアならびに clonal peak の偏位を認めた。低リスク MDS 患者の病態形成に T 細胞の関与した免疫異常が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

A. 研究目的

MDS は急性白血病に移行する頻度により高リスク群と低リスク群に分類することができ、後者においては造血の回復により予後の改善が期待される。再生不良性貧血と同様、免疫抑制剤が一部の MDS 患者の造血回復に有効であるが、本研究は多様性に富む病態を呈する MDS 患者のおおの至適な免疫抑制療法の開発を目指すことを目的とする。

B. 研究方法

特発性造血障害に関する研究班の MDS に対するシクロスポリン療法の共同研究に参加された患者検体を用いて、フローサイトメトリー法を用いた PNH 顆粒球の検索（金沢大学大学院細胞移植学、中尾眞二先生との共同研究）、HLA 遺伝子群の検査、T 細胞受容体レパトア解析、ならびに女性患者では HUMARA 遺伝子を用いたクロナリティー解析（東海大学血液リウマチ内科、堀田知光との共同研究）を行い、治療の反応性との比較検討を行った。

（倫理面での配慮）

本研究は遺伝子解析研究を含むため、検体採取にあたっては参加各施設の施設内審査期間による審査と当該患者の口頭と文書によるインフォームドコンセントを前提とし

た。採取検体は各施設で連結可能匿名化を行い検討に用いた。

C. 研究結果

9 名の患者より治療前の検体を得ることができ、うち 3 名では治療後の検討もなされた。再生不良性貧血におけるシクロスポリン反応性との関連が指摘されている DRB1501/1502 を有していたものは 9 名中 4 名に認めた。また、治療前 PNH 顆粒球は 8 名中 4 名に認め、HUMARA 遺伝子による解析では女性患者 3 名すべて治療前 polyclonal と判定された。治療前後の TCR レパトア解析が可能であった 3 名すべてで、治療前後でのレパトアの偏りの変化を認め、spectratyping 法でも clonal peak の変動を認めた。

D. 考察

治療終了した患者は 4 名にとどまっていることから、現在のところシクロスポリンの効果との比較は不可能である。HLA 遺伝子、特に DRB1 との関連では、日本人の 1501 遺伝子頻度 6.08%、1502 が 8.74% と報告されていることを考えると、本研究に登録された患者における DR15 の発現頻度は高い傾向にあるが、より多数例を用いた統計解析が必要である。中尾らは PNH 顆粒球は免疫学的造血抑制の存在を示唆す

るものとしているが、TCR レパトアならば clonal peak の変動とあわせて考えれば、低リスク MDS 患者の多くに T 細胞を含む免疫異常が存在し、病態形成へ関与していることが推測される。今後のシクロスポリン治療研究への患者登録の増加により、これらの免疫異常の一端が解明されることが期待される。

E. 結論

低リスク MDS 患者の病態形成に T 細胞を含む免疫学的機序が関与していることが示唆された。今後はシクロスポリン療法の効果との比較検討によりシクロスポリン有効例の特徴を明らかにするとともに、T 細胞の関与の機序についても検討を加えたい。

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・登録状況

なし

ビタミン K2 および D3 併用による白血病細胞の分化誘導増強 効果ならびに分化誘導に伴うアポトーシス耐性化機構

分担研究者 大屋敷 一馬 東京医科大学 内科学第一講座 教授

研究要旨

骨髄異形成症候群(MDS)の不応性貧血(RA)における血球減少は、血球細胞のアポトーシスを介した無効造血に起因する。VK2 と D3 の併用療法は、一部の RA 症例に有効であることが報告されている。ビタミン K2 (VK2) は *in vitro* で白血病細胞のアポトーシスを効率良く誘導する。一方、VK2 と D3 とを併用すると、HL-60 および U937 細胞株の単球系への分化が相乗的に増強し、かつ、分化誘導に伴い、VK2 を含めた種々のアポトーシス誘導に対して抵抗性を獲得した。この耐性化には、p21CIP1 の核から細胞質への細胞内局在の変化が関与していることが示唆された。VK2 と D3 併用による分化増強効果とアポトーシス耐性化は、MDS の RA における血球減少の改善効果の作用機序の一つと考える。

A. 研究目的

VK2 は MDS RA の 20%~75%の症例で血球減少を改善する作用があると報告されている。また、一部の症例では、VK2 とビタミン D3 (D3)との併用により、その有効性が増強することも示唆されている。現在、当研究班では、MDS RA における VK2 単独療法および VK2 と D3 併用療法の有効性を客観的に評価すること目的として、多施設共同臨床研究が進行中である。しかし、これらビタミンの RA 症例に対する作用機序は未だ明らかではない。

一方、VK2 は *in vitro* で白血病細胞のアポトーシスを効率よく誘導することが知られている。また、BCL-2 を過剰発現させた HL-60 *bcl-2* 細胞株では、このアポトーシス誘導はほぼ完全にブロックされるが、同時に、G1 arrest を介して単球系への分化が誘導された。これより、VK2 はアポトーシス耐性クローンに対しては、分化誘導効果も発現することが示唆される。よって本研究では、分化誘導剤として知られる D3 と VK2 との白血病細胞における相互作用について検討を行った。

B. 実験方法

白血病細胞株 HL-60, U937 および核内移行シグナルを欠損した Δ NLS-p21CIP1 強制発現株 U937 Δ NLS-p21 を用いて、VK2 (menaquinone-4)と $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, および D3 誘導体の一つである $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -22-oxavitamin D3 (oxacarcitriol: OCT)による、アポトーシスならびに分化誘導における相互作用を、細胞形態、flow cytometry, immunocytochemistry により検討した。

C. 研究結果

1) HL-60 および U937 細胞を $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ または OCT の存在下で培養すると単球系への分化が誘導された。OCT は $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の約 5~10 倍の比活性を認め、分化誘導能における至適濃度は 10 nM であった。2) VK2 (10 μM) と sub-optimal dose の OCT (1nM) または $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10nM) とを同時に添加すると、CD14 の発現が相乗的に著しく増強した。この効果は、最大効果が得られる OCT 10 nM をはるかに

上回るものであった。3) 一方、この分化誘導に伴い、1. VK2 単独処理、2. H₂O₂ の添加、および、3. FCS 除去によって誘導される caspase-3 の活性化ならびにアポトーシス誘導が、全て抑制された。また、単球系への分化に伴い p21CIP1 の核内から細胞質への移行が観察された。4) U937 ΔNLS-p21 細胞株では未分化状態にも拘わらず、cytoplasmic p21CIP1 を発現し、かつ、本細胞株においては VK2 によるアポトーシス誘導が有意に抑制された。

D. 考察

cytoplasmic p21CIP1 は ASK1 との分子間会合により、アポトーシス シグナルをブロックすることが知られている (Asada M, et al. EMBO J 1999)。VK2+D3 併用による単球系への分化増強、ならびに分化に伴う p21CIP1 の核から細胞質への移行が、アポトーシス耐性の獲得に一部関与していると考えられる。MDS RA における血球減少は骨髄内でのアポトーシスを介した無効造血に因ると考えられている。VK2 と D3 が、造血細胞においても同様に作用するとすれば、分化誘導とそれに伴うアポトーシスの回避は、RA 症例における血球減少改善効果に寄与する可能性が示唆される。また、両ビタミン併用による分化誘導効果の増強により、D3 の濃度を 1/10 以下に下げることが可能となり、D3 投与の際の dose-limiting factor の一つである高カルシウム血症の克服にもつながることが予想される。

E. 結論

VK2 と D3 との併用は、白血病細胞の分化を相乗的に増強させ、かつ、分化誘導の伴うアポトーシス刺激に対する耐性を獲得する。こ

れらの生物活性により、両ビタミンの併用は、MDS RA における分化誘導療法として有用に作用する可能性が示唆された。

F. 研究危険情報

なし。

G. 研究発表

◆論文発表

1. Funato K, Miyazawa K, Yaguchi M, Gotoh A, Ohyashiki K. Combination of 22-oxa-1,25-dihydroxyvitamin D₃, a vitamin D₃ derivative, with vitamin K₂ (VK₂) synergistically enhances cell differentiation but suppresses VK₂-inducing apoptosis in HL-60 cells. *Leukemia* 16:1519-1527, 2002.
2. Ohyashiki JH, Sashida G, Tauchi T, Ohyashiki K. Telomeres and telomerase in hematologic neoplasia. *Oncogene* 21:680-687, 2002.
3. Ito Y, Okabe-Kado J, Honma Y, Iwase O, Shimamoto T, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. Elevated plasma level of differentiation inhibitory factor nm23-H1 protein correlates with risk factors for myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 16:165-169, 2002.

◆学会発表

1. Ohyashiki K, Sashida G, Nakajima A, Tauchi T, Ohyashiki JH: Telomere Dynamics in Myelodysplastic Syndromes Determined by Telomere Measurement of Marrow Metaphases. 44-th Annual Meeting for American Society of Hematology, *Blood* 110: 372a~373a.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

骨髓異形成症候群における特異的蛋白の同定に関する研究

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(MDS)を対象として、その異常血液細胞のプロテオーム解析を行った。対象として、MDS 患者および正常人末梢血中の成熟好中球を用いた。MDS 患者および正常人の両者の好中球において、再現性のある二次元蛋白泳動パターンが得られた。両者の泳動パターンを比較検討した結果、MDS に特異的な蛋白の発現や欠如の存在が示唆され、その解析を進めている。

A. 研究目的

近年、DNA チップなどを用いた疾患特異的な遺伝子の検索が大規模に行われている。しかし、遺伝子の発現と蛋白質の発現には相関関係が低いと報告されており、DNA 解析とともにプロテオーム解析による疾患特異的な蛋白質の発現やそれらの機能解析の重要性が増している。本研究は骨髓異形成症候群(MDS)を対象として、その異常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探索し、新規の診断マーカー、あるいは細胞標的療法のターゲットとなりえる蛋白を同定することを目的とした。

B. 研究方法

MDS 患者および正常人の末梢血中の成熟好中球を用いて解析を行う。この細胞を解析対象とした理由は (1)MDS の好中球には形態学的、細胞生化学的な異常が明らかにあり、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 MDS 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。得られた好中球に 7M Urea, 2M Thiourea, 4%CHAPS を添加し、好中球を可溶化する。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加えて前処理する。得られた蛋白について、二次元電気泳動を行う。一次元目の泳動は固定化 pH 勾配等電点電気泳動 (IPG) を行う。二次元目の電気泳動は SDS-PAGE を行う。泳動後、銀染色等を施した後、イメージをスキヤナで取り込み、画像解析ソフトウェアで処理し、正規化する。MDS と正常人の間で差のあるスポット切り出し、プロテアーゼで消化した後、MALDI-TOF MS, LC/MS による質量分析を行う。

(倫理面への配慮)

MDS 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、MDS 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、MDS 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、MDS においてのみ発現しそれらについて、質量解析等を進めている。

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、

D. 考察

MDS 患者および正常人の好中球由来蛋白の二次元電気泳動パターンを比較検討したところ、両者間で差異のあるスポットが複数検出され、MDS 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スポットも混在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、それらを解析対象からはずす必要があると考えられる。また、MDS の骨髓細胞を検体として CD34 陽性細胞レベルでのプロテオーム解析も当然必要であり、それらについても検討をすすめる予定である。

E. 結論

MDS 患者および正常人の末梢血中の好中球を用いたプロテオーム解析の結果、MDS において発現あるいは欠落している特異的蛋白の存在が示唆された。

F. 研究危険情報

なし。

G. 研究発表

◆学会発表

I.Iwabe K, Shimoyama M, shiyama M, Kazama H, Teramura M, Kato T, Mizoguchi H. Analysis of T cell receptor Vb repertoire in patients with myelodysplastic syndrome. Experimental Hematology 30(suppl1): 98, 2002

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし