

濃度を得るための治療最適化を検討する糸口になると思われた。

E. 結 論

MDSにおいても細胞内 Ara-C 代謝の差異が治療成績に関連する可能性があることを示した。MDS 症例の骨髄単核球細胞における 5'-NT mRNA を real-time PCR 法で測定することは、ハイリスク MDS 治療最適化を考慮するうえで重要で、予後因子としても有用であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表：該当なし
2. 学会発表

鈴木啓二郎, 伊藤薫樹, 村井一範, 石田陽治: ハイリスク MDS における 5'-nucleotidase 発現の検討. 第 66 回日本血液学会総会で発表予定

G. 知的所有権の取得状況

該当なし

H. 参考文献

1. Galmarini CM et al. Expression of high Km 5'-nucleotidase in leukemic blasts is an independent prognostic factor in adults with acute myeloid leukemia. *Blood*. 98, 1922-6, 2001.
2. Galmarini CM et al. Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies. *Leukemia*. 15, 875-90, 2001.

抗白血病剤シタラビン (ara-C) によるアルキル化剤の DNA 損傷修復の阻害と殺細胞効果の増強

上田 孝典、山内 高弘

福井大学 医学部 第一内科

研究要旨 DNA 合成期特異的な ara-C の抗腫瘍効果を、DNA 修復阻害を利用することで、非増殖細胞にもたらすことを試みた。静止リンパ球をモデルとして用い、DNA 修復の動態をコメットアッセイにより、殺細胞効果をアポトーシスとしてそれぞれ定量した。紫外線またはアルキル化剤により惹起された DNA 損傷修復は ara-C の併用により阻害され、殺細胞効果は増強された。ara-C が修復過程で DNA 内へ転入され修復を阻害したことが静止細胞に殺細胞効果をもたらしたと考えられた。このような基礎的検討も踏まえ、ara-C、melphalan, mitoxantrone の 3 剤併用少量療法を考案した。本法により骨髓異形成症候群の患者において完全寛解が得られた。

A. 研究目的

骨髓異形成症候群 (MDS) のなかで、白血病芽球の少ない RA、RARS においてはシクロスポリンなどによる免疫療法が、白血病芽球の多い RAEB、RAEB-t では抗白血病剤による化学療法が行われる。少量シタラビン (ara-C) 療法は最も頻用される化学療法の一つであるが寛解率 20%前後とその有効性は低い。

ara-C は、細胞内リン酸体 ara-CTP による DNA ポリメラーゼ阻害、DNA 内に転入された ara-C による DNA 伸長阻害により、抗腫瘍効果を発揮する^{1,2)}。即ち、ara-C の効果は DNA 合成期特異的で非増殖細胞には及ばない。MDS における白血病芽球は骨髓内で 30%未満であり、腫瘍集団全体に占める増殖群 growth fraction は小さいと考えられる。つまり ara-C が MDS により有効であるためには非増殖群にも本剤が効果的であるような戦略が必要になる。

アルキル化剤による DNA 障害は各種 DNA 除去修復を惹起し、その過程は障害ヌクレオチドの切断除去、DNA 合成による欠損部の充填、新生 DNA の再結合からなる。とすれば DNA 修復過程の DNA 合成期において ara-C は DNA 内に転入され修復を阻害し抗腫瘍効果を発揮すると仮説される。

今回我々は DNA 除去修復を利用することで ara-C の効果を非増殖細胞にも拡大することを試

みた。即ち、静止リンパ球をモデルとして ara-C による DNA 修復の阻害と殺細胞効果の増強について検討した。さらにこの基礎的検討も踏まえ、ara-C、melphalan, mitoxantrone 併用少量療法を考案し MDS 患者に施行した。

B. 研究方法

6 例の健常成人から得られた正常リンパ球を用いて ara-C による前処理または無処理後、紫外線照射またはカルムスチンと共培養した。その後新鮮培養液を用いて速やかに洗浄し再浮遊させ経時的に DNA 修復過程を定量した。DNA 修復は障害ヌクレオチドの切断除去と再結合の過程を Comet assay 法により DNA 単鎖切断量 (Tail Moment 値) として、DNA 再合成の過程をシンチレーションカウンターによりチミジンの取り込みとして、定量した。また 24 時間後の殺細胞効果をアポトーシスとして、Hoechst33342 蛍光染色を用いてその形態により、または flowcytometer を用いて annexin V 結合性により、定量した。

C. 研究成果

静止リンパ球において、紫外線照射 1 時間後に Tail Moment 値は最大となり徐々に減衰し 4 時間後に前値へ戻った。即ち、修復反応は、紫外線照射 1 時間以内に切断除去の過程が最大に誘導され、4 時間後に再結合過程により完了したことを

示唆していた。チミジンの取りこみ量は経時的に増加し4時間で最大となりその値を持続した。これはDNA再合成がほぼ4時間で完了したことを示唆し、このチミジンの取りこみの動態はTail Moment値の動態に合致していた。即ち、DNA除去修復は2つのパラメーターによりより定量することが可能であった(図1)。

ara-Cの2時間前処理により修復過程は阻害された。その阻害はチミジンの取りこみの減弱(図1B)、4時間後のTail Moment値の増大(図1A)として示され、各々はDNA再合成、修復DNA

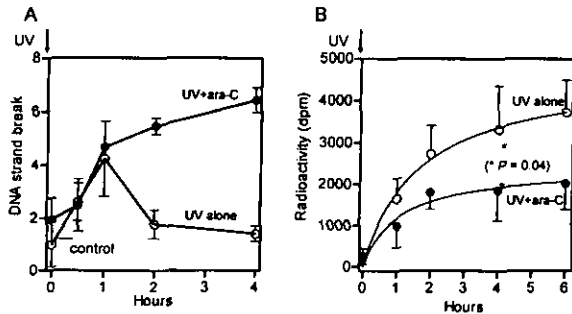


図1

DNA修復の阻害。A:障害ヌクレオチドの切断と新生DNAの再結合過程。B:DNA再合成過程。静止リンパ球にara-C 10 μ M、2時間前処理後あるいは無処理後、紫外線5 J/m²照射を行ない、新鮮培養液により洗浄した。DNA単鎖切断とチミジンの取りこみをそれぞれComet assayとシンチレーションカウンターにより経時的に定量した。

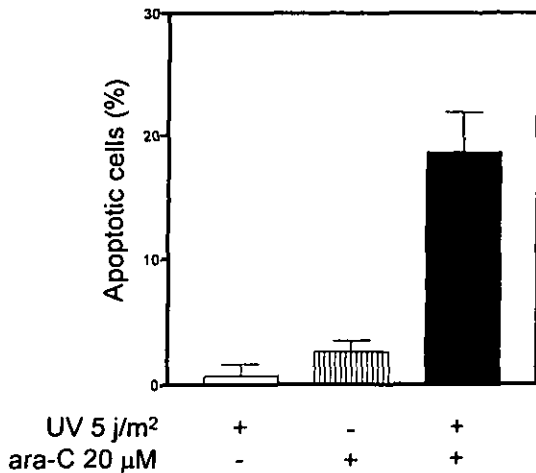


図2

殺細胞効果の増強。静止リンパ球をara-C 20 μ M、2時間培養、または紫外線5 J/m²照射、またはその両者により処理し、24時間後にアポトーシスをHoechst 33342染色により定量した。

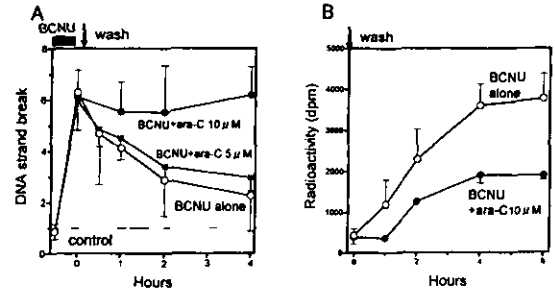


図3

DNA修復の阻害。A:障害ヌクレオチドの切断と新生DNAの再結合過程。B:DNA再合成過程。静止リンパ球にara-C 5 μ Mまたは10 μ M、2時間前処理後あるいは無処理後、BCNU(カルムスチン)60 μ M、30分の培養を行ない、新鮮培養液により洗浄した。DNA単鎖切断とチミジンの取りこみをそれぞれComet assayとシンチレーションカウンターにより経時的に定量した。

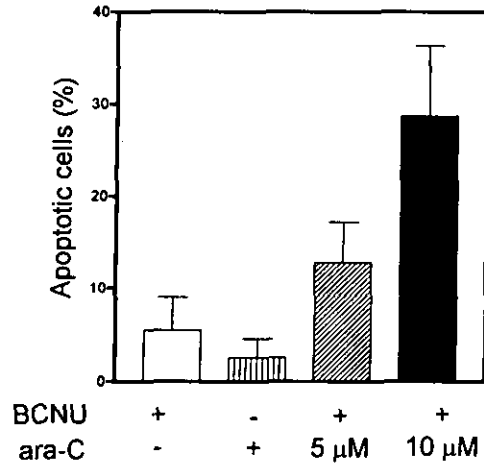


図4

殺細胞効果の増強。静止リンパ球をara-C 5 μ Mまたは10 μ M、2時間培養、またはBCNU(カルムスチン)60 μ M、30分培養、またはその両者により処理し、24時間後にアポトーシスをannexin V陽性度によりflow cytometerを用いて定量した。

の再結合の阻害と考えられた。Tail Moment値の1時間値は前処理で変化せず、ara-Cが切断除去の過程に影響を及ぼさないことを示唆していた(図1A)。両者併用による殺細胞効果は各薬剤単独処理による効果の単純和よりも増強された(図2)。ara-Cとカルムスチンの併用においても同様の結果が得られた(図3、4)。

臨床的に、高齢のMDS患者においてara-C、melphalan、mitoxantroneの3剤併用少量療法を施行し、完全寛解に到達した(図5)。

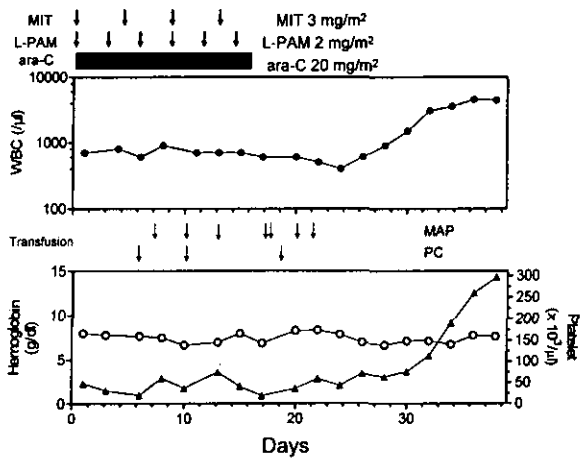


図5

MIT (mitoxantrone)、L-PAM (melphalan)、ara-C 3剤併用少量療法を高齢の MDS 患者 (79 歳、男性、RAEB-T、IPSS : High) に施行した。患者は完全寛解に到達した。

D. 考 察

DNA 損傷修復は静止リンパ球において機能していた。我々は既に慢性リンパ性白血病などの腫瘍細胞が DNA 修復能を有することを確認しており^{3,4)}、今回検討した 2 剤の併用機序は MDS 細胞においても機能しうると考えられた。ara-C と紫外線やカルマスチンとの併用による殺細胞効果の増強は、DNA 損傷が修復されなかったこと、あるいは ara-C が修復過程で DNA 内へ転入されたことによると考えられた。ara-C、melphalan、mitoxantrone の 3 剤併用少量療法は MDS 患者に有効で完全寛解をもたらしたが、この治療効果が真に上記のような mechanistic interaction によるものかは今後の検討課題と考えられた。特に治療中における MDS 細胞の DNA 修復過程を Comet assay により in vivo でモニターする必要性が示唆された。

E. 結 論

静止細胞において ara-C は紫外線、アルキル化剤で誘導された DNA 除去修復を阻害し殺細胞効果を増強した。また高齢の MDS 患者において ara-C、アルキル化剤を含む少量併用療法により完全寛解に到達することができた。DNA 修復機能は S 期特異的な ara-C による癌化学療法の戦略

的標的 (Biologic Target) となる可能性が示唆された^{3,5)}。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamauchi T, Kawai Y, and Ueda T. Inhibition of nucleotide excision repair by fludarabine in normal lymphocytes in vitro, measured by the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Jpn J Cancer Res*, 93: 567-573, 2002.
2. Yamauchi T, Kawai Y, and Ueda T. 1-(2-D-Arabinofuranosyl)cytosine is cytotoxic in quiescent normal lymphocytes undergoing DNA excision repair. *Jpn J Cancer Res*, 93: 1334-1341, 2002.

2. 学会発表

1. 山内高弘, 河合泰一, 上田孝典: 抗白血病剤フルダラビンヌクレオシド (F-ara-A) によるヌクレオシド除去修復の阻害, 第 35 回日本痛風核酸代謝学会総会, 平成 14 年 2 月, 神戸
2. 山内高弘, 河合泰一, 上田孝典: 正常リンパ球における ara-C による nucleotide excision repair の阻害と殺細胞効果の増強, 第 61 回日本癌学会総会, 平成 14 年 10 月, 東京

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

H. 参考文献

1. Yamauchi T, et al. *Cancer Res*, 56: 1800, 1996.
2. Yamauchi T, et al. *Jpn J Cancer Res*, 92: 546, 2001.
3. Yamauchi T, et al. *Clin Cancer Res*, 7: 3580, 2001.
4. Yamauchi T, et al. *Int J Hematol*, 76: 328, 2002.
5. Yamauchi T, et al. *Biochem Pharmacol*, 66: 939, 2003.

骨髄異形成症候群における CREB-binding protein (CBP) および p300 の遺伝子変異解析

大西 一功、重野 一幸、吉田 均

浜松医科大学 第3内科

研究要旨 CBP および p300 は転写共役因子としてヒストンアセチル化やクロマチンリモデリングの役割をはたしている。MDS を含む臨床検体 34 例にて遺伝子変異を RT-PCR-SSCP 法にて検討した。MDS (RAEB) 症例1例にて p300 の Ser507Gly の変異を認めた。これは p300 の CREB binding domain と CH2 domain の間に位置した。一方、de novo AML では CBP、p300とも遺伝子変異は認められなかった。細胞株では CEM にて p300のbromodomain に 21bp deletion mutation が認められた。これらの変異の機能解析については今後の検討課題である。

A. 研究目的

CREB-binding protein (CBP) および p300 は多くの転写因子を含む核内タンパクの共役因子でありヒストンアセチル化酵素活性によるクロマチン構造の制御、および一部転写因子の直接のアセチル化を通じて、さまざまな遺伝子発現の制御を行っている^{1,2)}。これまでに胃癌、大腸癌、乳癌などで p300 の遺伝子変異が報告されている^{3,4)}。

ここでは骨髄異形成症候群での CBP/p300 における遺伝子変異を RT-PCR-single-strand conformation polymorphism (SSCP) 法にて検討した。

B. 研究方法

白血病細胞株 9 株、造血器悪性腫瘍患者の骨髄単核球 34 例 (AML 29 例、MDS/MDS 由来 AML 5 例) および正常人コントロール 30 例を用いた。

RT-PCR-SSCP: 細胞株および Ficoll 分離にて得られた単核球より total RNA および genome DNA を抽出し cDNA を作成した。CBP/p300 の 5 つの機能領域に対して nested-PCR 法を用いて約 200bp の DNA となるように増幅し、アガロースゲルにて確認した。次に SSCP にて異常バンドの検出を行った。異常バンドをゲルより切り出し、TA ベクターにクローニングした後に Sequence を行った。

genome PCR: genome DNA を抽出し、遺伝子変異を認めた領域に intron を含むプライマーを設

定し PCR を行った。PCR 産物を TA ベクターにクローニングし Sequence を行った。

C. 研究成果

1. CBP、p300 とも RT-PCR にて band が検出され対象としたすべての細胞にてそれらの mRNA の発現があることが確認された。
2. 臨床検体では MDS (RAEB) の 1 症例にて CBP の A2718G となる一塩基変異を認めた。これは p300 の CREB binding domain と CH2 domain の間に位置する Ser507Gly となるアミノ酸の変異をもたらした。
3. 細胞株 9 種類のうち CEM/C1 では、電気泳動にて正常サイズに加えて short form が認められた。これは p300 の bromodomain 内である 4461bp から 4481bp までの 21bp の cDNA の欠失であり、exon 18 の開始部位に相当することが明らかになった。genome PCR の解析にて intron 17 の acceptor site に tagGAT から tggGAT への変異が認められ、この部位の aberrant splicing による欠失であることが確認された。

D. 考 察

臨床検体の MDS (RAEB) 症例にて p300 の変異を認めた。この変異は CREB binding domain と CH2 domain の間に位置することから⁵⁾ CREB との結合に関与することが示唆された。今後この領域の機能解析が必要と思われる。また細胞株

CEM/C1 では、やはり p300 の bromodomain 内に 21bp の deletion mutation が存在した。この変異は P/CAF の bromodomain の相同性解析⁹⁾によりアセチル化リジンを認識するのに重要である p300 の Tyr1089 を含む前後 7 アミノ酸の欠失であることが認められ、その構造と機能上の変化を生じることにより p300 のヒストンアセチル化活性に影響を与えることが推測された。bromodomain ではヒストンのアセチル化リジンを認識し安定化することにより局所におけるヒストンのアセチル化を促進したり、アセチル化された他の転写因子を認識し DNA 結合能やその転写活性を増強するという機能が推測されており、この部位の変異は重要であると考えられた。

E. 結 論

骨髓異形成症候群の一部の症例に CBP/p300 の遺伝子変異が認められた。これらが腫瘍形成に寄与する可能性があると考えられた。その頻度は稀であると考えられるが、一部の造血器悪性腫瘍においては CBP/p300 がその腫瘍の発生に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Shigeno K, Ohnishi K, et al.: Disease-related potential of mutations in transcriptional cofactors CREB-binding protein and p300 in leukemias. Cancer letters (in press)

2. 学会発表

1. Shigeno K, Ohnishi K, et al.: Mutation Analysis of Transcriptional Co-activators, CREB-binding Protein and p300, in Hematologic Malignancies. The 43rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, 2001. USA
2. 重野一幸, 大西一功ら: 造血器悪性腫瘍における CBP および p300 の遺伝子変異解析. 第 63 回日本血液学会総会 2001 年

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

H. 参考文献

1. Shikama L, et al. Trends. Cell Biol. 7, 230-236, 1997
2. Giles RH, et al. Trends Genet 14, 178-83, 1998
3. Muraoka M, et al. Oncogene 12, 1565-1569, 1996
4. Gayther SA, et al. Nat Genet 24, 300-303, 2000
5. Winston F, et al. Nat. Struct. Biol. 6, 601-604, 1999
6. Dhalluin C, et al. Nature 399, 491-496, 1999

骨髄異形成症候群における SDF-1/CXCR4 系異常とアポトーシスとの関連

金丸 昭久、松田 光弘、森田 泰慶、辰巳 陽一、前田 裕弘

近畿大学医学部 血液・腎臓・膠原病内科

研究要旨 骨髄異形成症候群において、造血機構への関与が注目されているケモカイン、SDF-1/CXCR4 系とアポトーシスの関連を解析した。その結果、SDF-1 による遊走活性は MDS 患者では有意に低下していた。MDS 患者における CD34 陽性細胞のアポトーシスは、SDF-1 による遊走活性と負の相関を、また骨髄血漿中 SDF-1 濃度と正の相関を認めた。以上から、MDS の無効造血には SDF-1/CXCR4 系の不良が関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

CXC ケモカインである SDF-1 とそのレセプターである CXCR4 は、胎児肝・骨髄における B 細胞の生成、骨髄における造血幹細胞のホーミングや増幅に関与することが示されている¹⁾²⁾。骨髄異形成症候群（以下 MDS）での無効造血にはアポトーシスが関与しているとされる³⁾が、その詳細は不明である。今回、我々は MDS において、SDF-1/CXCR4 系異常とアポトーシスの関連を解析した。

B. 研究方法

同意を得た初診 low risk MDS 患者 19 例（RA 12 例、RARS 3 例、RAEB 4 例）および健常人 10 例から骨髄 CD34 陽性細胞を純化した。SDF-1 による遊走活性、フローサイトメーターによる、Annexin V の測定によるアポトーシスの割合、CXCR4 発現および骨髄血漿中の SDF-1 濃度を ELISA で解析した。

C. 研究成果

MDS 患者の年齢中央値は 60 歳で健常人と有意差を認めなかった。①MDS 患者の骨髄 CD34 陽性細胞では、健常人と比較して、有意にアポトーシスが認められた。さらに、CXCR4 発現には有意差を認めず、SDF-1 による遊走能は有意に低下を認めた（図 1）。②SDF-1 による遊走能とアポトーシスとの間には、負の相関関係が認められた（図 2）。③MDS 患者の骨髄中 SDF-1 濃度は、健常人と比較して、有意に増加を認め（図 3）、ア

ポトーシスとの間に正の相関関係が認められた（図 4）。

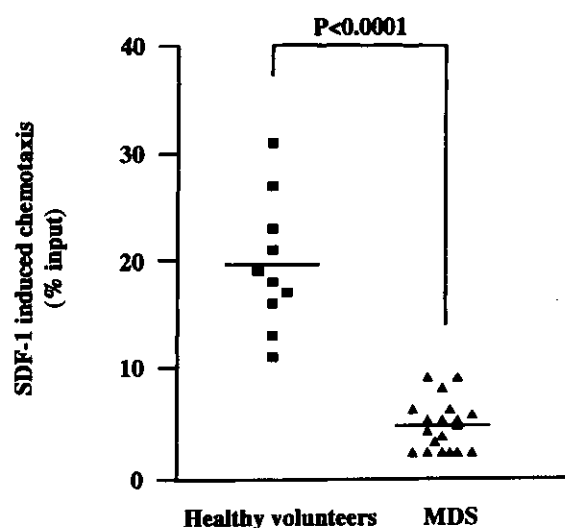


図 1 MDS と健常人における骨髄 CD34 陽性細胞の SDF-1 による遊走活性

MDS 患者と健常人から骨髄 CD34 陽性細胞を純化し、chemotaxis chamber を用いて、SDF-1 による遊走活性を測定した。

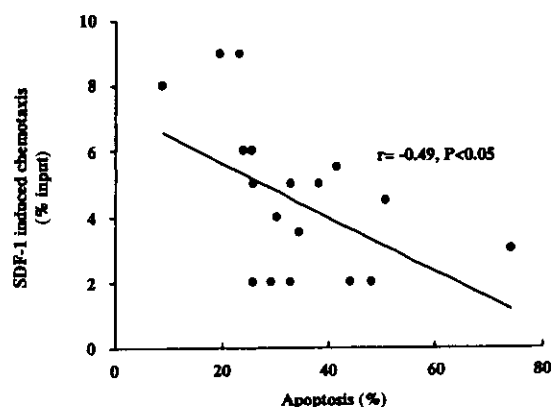


図 2 MDS における骨髄 CD34 陽性細胞の SDF-1 による遊走活性とアポトーシスとの関連

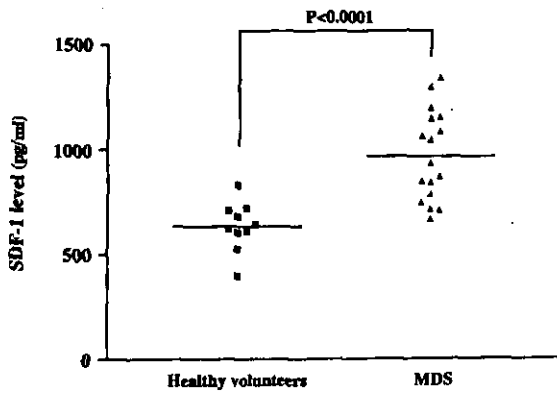


図3 MDS 健康人における骨髓血漿中 SDF-1 濃度

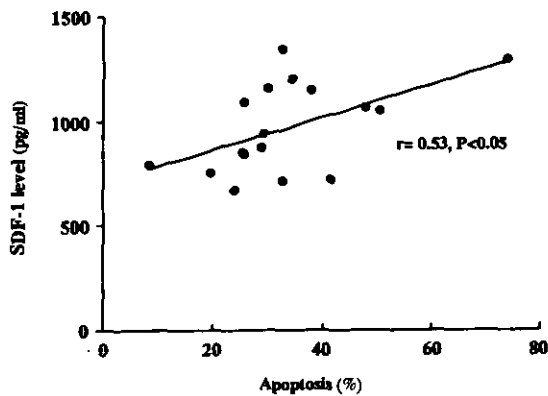


図4 MDS おける骨髓血漿中 SDF-1 濃度とアポトーシスとの関連

D. 考 察

以上の結果から、それぞれ①MDS における CXCR4 への結合能あるいは CXCR4 以降のシグナル伝達機構の異常。②SDF-1 への反応性が悪い CD34 陽性細胞が、分化障害やアポトーシスを来す可能性。③骨髓中 SDF-1 濃度が骨髓内でのアポトーシスの指標になりうることを示唆された。

E. 結 論

MDS の無効造血には、SDF-1/CXCR4 系の不良が関与している可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Matsuda M et al.: CD34⁺ progenitors from MDS patients are unresponsive to SDF-1, despite high levels of SDF-1 in bone marrow plasma. *Leukemia in press*

2. 学会発表

金丸 昭久他: 骨髓異形成症候群における SDF-1/CXCR4 システム異常とアポトーシスとの関連. 第 65 回日本血液学会総会・第 45 回日本臨床血液学会総会. 平成 15 年度

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

H. 参考文献

1. Nagasawa T et al. *Nature* 1996; 382: 635-638.
2. Aiuti A et al. *J Exp Med* 1997; 185: 111-120.
3. Yoshida Y et al. *Leukemia* 1993; 7: 144-146.

AML1/RUNX1 の点突然変異は骨髄異形成症候群 (MDS) に高頻度に認められる

木村 昭郎、新美 寛正、原田 浩徳、原田 結花、稲葉 俊哉

広島大学原爆放射能医学研究所 血液内科・癌分子病態

研究要旨 MDS 症例における AML1 の点突然変異を全長にわたって検索した結果、MDS/AML (RAEB・RAEBt・MDS からの白血病) で高頻度に変異を認めた。変異群は変異のない群と比較し有意に予後不良であった。機能解析から、変異体は機能を消失しているか、正常 AML1 に対して拮抗的に作用していた。AML1 点変異を有する MDS/AML を一疾患単位として捉え、遺伝子レベルでの新たな MDS の疾患分類を提唱できる。

A. 研究目的

MDS は多様な疾患群であり、複数の癌遺伝子や癌抑制遺伝子の異常が蓄積して発症すると考えられる。-5/5q-、-7/7q- などの染色体異常は初期より認められ、MDS の発症に関与しているといわれている。しかし、造血細胞の腫瘍化を直接引き起こすような遺伝子異常は明らかになっていない。AML1/RUNX1 は二次造血の発生に不可欠な転写因子であり、また転座型白血病において最も高頻度の標的となっている。さらに、AML1 の点変異は造血細胞の悪性化に関与すると考えられており、われわれも統発性白血病/MDS で高頻度に runt ドメインを中心とした AML1 の点変異がみられることを報告した²⁾。一方鎖骨頭蓋形成不全症の原因遺伝子である RUNX2 はその全長に点突然変異が認められている³⁾。そこで MDS における AML1 の点変異を遺伝子全長にわたって検索し、MDS の発症機序における AML1 遺伝子変異の関与について検討した。

B. 研究方法

研究目的に同意の得られた患者サンプルから単核球を分離して DNA を抽出した。6 つの翻訳エクソン (exon 3-8) ごとに PCR-SSCP 法を行い、異常症例はゲノム DNA と mRNA 配列を決定した。同定された AML1 変異体の DNA 結合能、CBF β 結合能、転写活性化能を検討した。

C. 研究結果

MDS 156 例中 27 例 (17.3%)、RAEB・

RAEBt・MDS からの白血病 (これらを MDS/AML とする) に限ると 26/110 例 (23.6%) に AML1 遺伝子の点突然変異が認められた。runt ドメインを含む N 末端側 (exon3-5) の変異が 18 例、C 末端側 (exon6-8) の変異が 9 例であった。RA/RARS では 46 症例中 1 例 (2.2%) のみであった。AML1 の点変異を有する MDS/AML 症例は、変異のない症例と比較して有意に生存期間が短く予後不良であった。N 末端側の変異は、フレームシフトにより runt ドメイン内でストップするものと、DNA に直接結合する 3 つのループ内における一塩基置換であった。C 末端側の変異は、数塩基の欠失・挿入やイントロン内のスプライスシグナル変異で全例フレームシフトを生じ、不正な読み枠由来の長大な異常蛋白がキメラ蛋白様に付加した症例も 4 例あった。機能解析では、C 末端側の変異は DNA 結合能・CBF β 結合能は保たれていたが、転写活性化能が低下しており、正常 AML1 に対してドミナント・ネガティブに作用した。

D. 考 察

高率に白血病に移行する遺伝性家族性血小板減少症 (FPD/AML) の責任遺伝子として AML1 が同定され、AML1 の点変異が造血細胞の腫瘍化に直接関与すると示唆されている。今回 AML1 点変異が MDS/AML で高頻度に認められ、変異体が転写活性化能を失っていたことから、この変異が MDS/AML 発症の中心的な役割を演じていると考えられる。すなわち MDS/AML における

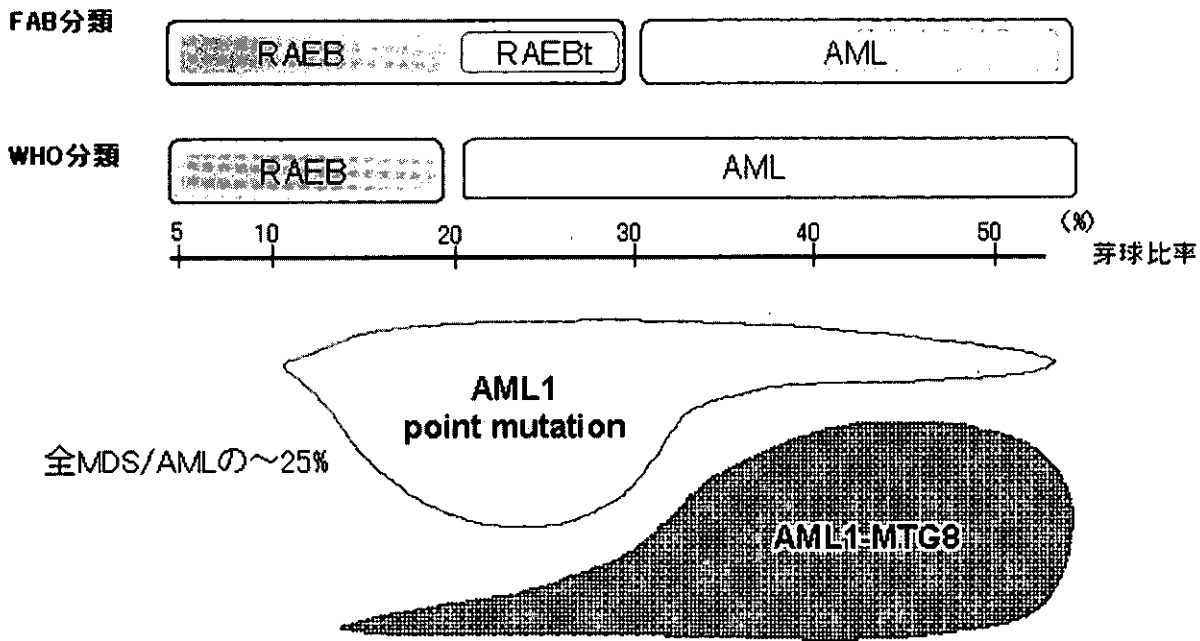


図1 AML1点突然変異のMDS/AMLにおける位置付け

AML1点変異は、発症のメカニズムから見てAML1-MTG8やCBF β -MYH11のようなキメラ遺伝子と同じレベルで造血細胞に作用するマスターイベントである。それに引き続いてRAS・p53などのセカンドヒットが加わることによって発症すると思われる。またAML1点変異を有するMDS/AMLの臨床病態は、①低芽球比率、②3血球系の異常、③予後不良、という特徴を呈している。さらにAML1遺伝子の異常からMDSおよびAMLの分類を再考すると、AML1点変異はMDS/AMLを中心に分布しており、大部分がAMLであるAML1-MTG8キメラとは異なっている(図1)。以上のことから、AML1点変異を有するMDS/AMLは一疾患単位であり、遺伝子レベルからの新たなMDS分類ができるといえる。

E. 結論

AML1点変異はMDS/AMLで高頻度にみられ、疾患単位を形成すると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Harada H et al.: Implications of somatic

mutations in the AML1 gene in radiation-associated and therapy-related myelodysplastic syndrome / acute myeloid leukemia. *Blood* 101(2): 673-680, 2003.

2. Sultana T et al.: Expression and functional analysis of granulocyte colony-stimulating factor receptors on CD34⁺⁺ cells in patients with myelodysplastic syndrome (MDS) and MDS-acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology* 121(1): 63-75, 2003.

3. Harada H et al.: High incidence of somatic mutations in the AML1/RUNX1 gene in myelodysplastic syndrome and low blast percentage myeloid leukemia with myelodysplasia. *Blood* 103(6): 2316-2324, 2004.

2. 学会発表

1. 原田浩徳 et al. AML1/RUNX1の点突然変異はMDSの約15% (RAEB, RAEBtの約21%)に認められる. 第65回日本血液学会総会, 2003.

2. 新美寛正 et al. AML1点突然変異を認めた慢性骨髓増殖性疾患由来急性白血病の3例. 第45回日本臨床血液学会総会, 2003.

3. 原田浩徳 et al. 骨髄異形成症候群 (MDS) に高頻度かつ特異的にみられる AML1 (Runx1) 転写因子の C 末端側変異. 第 62 回日本癌学会総会, 2003.
4. 須藤仁美, 伴 貞幸, 相良雅史, 今井高志, 小田健司, 野田正昭, 藏本 憲, 田中英夫, 木村昭郎: 骨髄異形成症候群 (MDS) 患者由来 B リンパ芽球細胞における G2/M チェックポイントの解析. 第 62 回日本癌学会総会, 2003.
5. 木村昭郎: 分子標的療法. 「シンポジウム: 造血器腫瘍の新しい治療法と検査」第 43 回日本臨床化学会年会・第 50 回日本臨床検査医学会総会連合大会「検査総合の威力」, 2003.
6. Harada H, et al. Point mutations in the carboxy-terminal region of the AML1/RUNX1 gene associated with myelodysplastic syndrome. 45th American Society of Hematology annual meeting, 2003.
7. 新美寛正 et al. AML1 点突然変異は骨髄異形成症候群 (MDS) に高頻度に認められる. 第 101 回日本内科学会講演会, 2004.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H. 参考文献

1. Song W-J, et al. Nat Genet, 23,166-175, 1999
2. Harada H et al. Blood, 101, 673-680, 2003.
3. Otto F, et al. Hum Mutat, 19, 209-216, 2002

IV. 骨髓纖維症

原発性慢性骨髄線維症の臨床像および予後因子の検討

原田 実根¹、下田 和哉¹、谷本 哲也¹、岡村 孝²

九州大学大学院病態修復内科学（第1内科）¹、久留米大学第2内科²

研究要旨 本邦では年間約 35 例の骨髄線維症患者が発症しており、染色体異常が 58 %にみられるが、骨髄線維症に特異的な異常はない。70 歳未満の症例における多変量解析では、全身症状あり、Hb < 10 g/dl、末梢血中芽球 ≥ 1 %が予後不良因子であった。予後不良因子を 2 つ以上有する症例では生存期間中央値は 65 ヶ月であったが、予後不良因子 2 つ未満では生存期間中央値には到達しておらず、予後不良因子の同定は同種移植の適応決定に有用である。

A. 研究目的

原発性慢性骨髄線維症のアンケート調査に基づく本邦での臨床像の解析を行う。新規の発症例の集積および 1997 年に行った過去 10 年に診断された原発性骨髄線維症の全国調査の追跡調査を行い、本邦における予後因子解析を行なう。

B. 研究方法

全国血液学会認定指定病院 495 施設へアンケート調査を行い、1999-2003 年に新規に発症した骨髄線維症患者を集積、解析した。また、1997 年に施行した過去 10 年に診断された原発性骨髄線維症の全国調査を基に、その後の追跡調査を行い、骨髄線維症に対する根治的治療法である同種造血幹細胞移植の一般的な適応年齢と考えられる 70 歳未満の症例に関し予後因子解析を行なった。

C. 研究成果

1997 年におこなった過去 10 年間の症例集積の全国調査（322 例の回答）^{1,2)}に引き続き、本研究で調査を行った 1999 年から 2003 年の 5 年間で新たに発生した骨髄線維症患者は 175 例であった。本邦では年間約 35 例の新規患者が発症している。発症年齢は中央値 63 歳（28-86 歳）、男女比 1.66 と男性に多く、診断時に主訴を有していた症例は 62 %であり、合併症を 40 %に有していた。

1997 年のアンケート調査では、336 例の原発性慢性骨髄線維症患者のうち 154 例が染色体検査を

施行され、そのうち 58 例（38 %）に染色体異常がみられた。1999 年から 2003 年の 5 年間に新たに発生した骨髄線維症 175 例のうち、127 例に染色体分析が施行され、結果が得られた 115 例の解析では、48 例（42 %）が正常核型であり、67 例（58 %）に異常が見られた。del (13) が 7 例と最も多く、他に、del (20)、+8 などの異常がみられており、複雑核型異常を呈する例もあった。

染色体異常の存在は、予後不良予測因子の一つであるとの報告が多かったが、われわれが 1997 年に施行した日本でのアンケート調査結果では染色体異常と予後の相関は認められなかった^{1,2)}。本調査に登録された 127 例を prospective に follow することにより、前回抽出された予後因子の妥当性と、我が国における骨髄線維症での染色体異常と予後の相関を明らかにする必要がある。

1999 年から 2003 年の間に新規発症した 175 例のうち、死亡例がこの 5 年間で 19 例ある。年齢中央値は 66 歳と、全体の 63 歳と較べ、やや高い。重症度分類では、重症 16 例、中等症 2 例、軽症 1 例であり、全症例である 175 例が重症 78 例、中等症 59 例、軽症 38 例になると較べ、重症例が占める割合が高い。染色体分析では、分裂像が得られた 12 例中 7 例（58 %）に異常核型がみられる。死因は、感染症が 5 例、白血化が 3 例（1 例は M7）、脳血管障害が 3 例であり、他に心不全、肝不全、骨髄不全、多臓器不全、突然死を 1 例ずつ含む。

原発性慢性骨髄線維症の治療に関しては、造血

幹細胞移植以外に特異的な治療がなく、またある程度の長期生存が望めることから対処療法が主体であり、症状が軽く、重篤な合併症のない場合は無治療で経過をみることが多い。1997年に施行した過去10年に診断された原発性骨髄線維症の全国調査では、298例の5年生存率は68.6%、10年生存率は51.1%であり、平均生存期間は10年であった。このデータを基に、追跡調査を行い、骨髄線維症に対する根治的治療法であるミニ移植を含めた同種造血幹細胞移植適応年齢と考えられる70歳未満の症例における予後因子解析を行なった。多変量解析ではHb < 10g/dl (Hazard ratio [HR] 2.90; 95% confidence interval [C.I.] 1.79-4.69; $P < .0001$)、全身症状あり (HR 2.51; 95% C.I. 1.44-4.37; $P = .001$)、末梢血中芽球 $\geq 1\%$ (HR 1.69; 95% C.I. 1.12-2.54; $P = .012$) が予後不良因子であった。観察期間中央値59ヶ月で、予後不良因子を2つ以上有する症例では生存期間中央値は65ヶ月であった。予後不良因子2つ未満では生存期間中央値にはまだ到達していなかった。予後不良因子の同定は同種移植の適応決定に有用である。

D. 考 察

1997年に集積した過去10年間に発症した骨髄線維症例の、その後の予後調査を含めた70歳未満の症例解析では、全身症状あり、Hb < 10 g/dl、Plt < $10 \times 10^4/\mu\text{l}$ が予後不良因子であった。今後新規に発症した症例をprospectiveに解析することにより、これらの予後不良因子の妥当性を明らかにする必要がある。

E. 結 論

本邦では年間約35例の骨髄線維症患者が発症している。本邦の骨髄線維症における予後規定因子を同定した。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H. 参考文献

1. Okamura T, et al, Int J Hemat. 73, 194, 2001
2. 岡村孝, Annual Review 血液 2000, 103, 2000

骨硬化症を伴う急性巨核芽球性白血病の芽球由来 IL-11 は オステオプロテゲリン (OPG) を誘導する

新津洋司郎、松永 卓也、佐藤 勉

札幌医科大学医学部内科学第四講座

研究要旨 我々は、全身骨硬化症を伴い、慢性の経過をとる急性巨核芽球性白血病の 1 症例を経験した。Real-time quantitative RT-PCR 法を用いた検討で、本症例の芽球の培養上清を添加して培養した osteoblasts 細胞株 (MG63) の OPG mRNA は、コントロール培養上清を添加して培養した MG63 のそれに比べて、7 倍に増加することが明らかとなった。次に骨硬化促進因子である estrogen、bone morphogenetic protein 2 (BMP2)、TGF-beta1、TPO、IL-11 の芽球培養上清中の濃度を ELISA 法で測定したところ、estrogen、BMP2、TGF-beta1 は何れも検出感度以下であり、IL-11 と TGF-beta1 のみが検出された。更に、IL-11 及び TGF-beta1 に対する中和抗体で前処理した芽球の培養上清を添加して培養した MG63 を用いた Western blotting の結果、MG63 から OPG の産生を促進するサイトカインは、IL-11 である事が明らかとなった。本症例においては、芽球が IL-11 を産生し、osteoblasts から osteoclasts の抑制因子である OPG を過剰に誘導する事により、骨硬化を来した事が示唆された。

A. 研究目的

近年の化学療法の進歩にも関わらず、急性巨核芽球性白血病 (AMgL) は予後が極めて不良である。しかし、AMgL の極く一部の症例は、慢性的な臨床経過をとることが報告されている¹⁾。AMgL に骨髓線維化を伴うことは良く知られており、諸家により AMgL の骨髓線維化の原因は、芽球から産生される TGF-beta, platelet derived growth factor (PDGF)、fibroblast growth factor (FGF) 等のサイトカインによる骨髓線維芽細胞からのコラーゲンの産生の亢進であることが報告されている。一方、骨硬化症は AMgL の非常に稀な合併症であり、骨硬化の発症機序については未だ明らかにされていない。Osteoprotegerin (OPG) は、最近発見された osteoclasts の抑制因子であり、骨吸収を抑制する機能を有する。OPG は osteoblast から産生され、OPGL (osteoblast から産生される OPG のリガンド) の decoy receptor として働き、活性化 osteoclast への OPGL の結合を抑制する。Estrogen、BMP2、TGF-beta1、IL-11 などのサイトカインによる刺激で osteoblast から OPG の産生が促進されることが報告されている²⁾。OPG のトランスジェニックマウスでは、OPG が過剰に産生され骨硬化症を来す。我々は、慢性

の経過をとり、骨硬化症を合併する AMgL の 1 症例を経験した。我々は、AMgL の骨硬化症に OPG の過剰産生が寄与していることを想定して検討を加えた。

B. 研究方法

1. 症例

34 才の男性。腹部膨満感と体重減少を主訴に、1993 年 1 月 28 日に当科へ入院した。身体所見では、眼瞼結膜が貧血様で、左季肋下に 15 cm に及ぶ脾腫を認めた。血液検査所見では、WBC 7,500/ μ l (芽球 5%)、Hb 6.3 g/dl、Plt 11.9 万/ μ l、LDH 1,891 IU/l、CRP 1.2 mg/ml であった。Flow cytometry による解析では、芽球は CD34+CD41+ であった。骨髓穿刺検査は dry tap であり、骨髓生検では骨梁の不規則な肥厚、異形を示す巨核球の増生とコラーゲン線維の密な沈着を認めた。骨 X 線写真では、全身骨にびまん性の透過性低下の所見を認めた。99mTc を用いた骨髓シンチグラムでは、骨髓への uptake の低下と肝脾への uptake の亢進を認め、髄外造血の亢進が明らかとなった。

2. 芽球の選択的採取

まず、CS3000 plus を用いて leukapheresis を行

い、患者の末梢血単核球を採取した。次に、この末梢血単核球から Isolex 50 を用いて CD34 陽性細胞を positive selection する方法を用いて芽球を得た。

3. 芽球の培養上清の調整

1x10⁶ 個の芽球を 7 日間液体培養した後に培養上清を回収した。

4. Osteoblast 細胞株 MG63 からの OPG の産生量の測定

上記の芽球の培養上清 (10 % 濃度) を添加して MG63 を 24 時間液体培養して OPG mRNA 量を real-time quantitative RT-PCR 法で測定した。

5. 芽球の培養上清中の骨硬化性ホルモンおよびサイトカイン濃度の測定

標準的 ELISA 法を用いて、芽球の培養上清中の estrogen、BMP2、TGF-beta1、TPO、IL-11 の濃度を測定した。

6. MG63 から OPG の産生を促進させるサイトカインの同定

TGF-beta1 および IL-11 に対するポリクローナル抗体で前処理した芽球の培養上清を添加して MG63 を 3 日間液体培養した後に、抗 OPG モノクローナル抗体を用いて Western blotting を行った。

IL-11 に対する中和抗体を用いて前処理した芽球の培養上清を添加して培養した MG63 では、前処理していない芽球の培養上清を添加して培養した MG63 に比べて OPG の発現量が有意に低下した (図 2)。

一方、TGF-beta1 に対する中和抗体を用いて前処理した芽球の培養上清を添加して培養した MG63 では、前処理していない芽球の培養上清を添加して培養した MG63 に比べて OPG の発現量に変化を認めなかった。

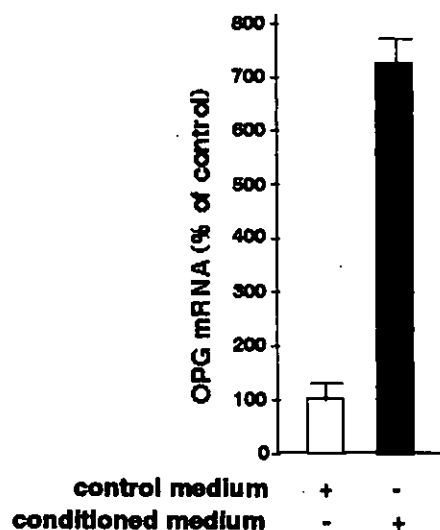


図 1 Osteoblast 細胞株 MG63 からの OPG の産生量

C. 研究成果

1. Osteoblast 細胞株 MG63 からの OPG の産生量

芽球の培養上清を添加して培養した MG63 の OPG mRNA 量は、コントロール培養上清を用いて培養した MG63 のそれに比べて 7 倍に増加した (図 1)。

2. 芽球の培養上清中の骨硬化性ホルモンおよびサイトカイン濃度の測定

Estrogen、BMP2、TGF-beta1 は測定感度以下であったのに対して、IL-11 (271 pg/ml) と TGF-beta1 (327 pg/ml) は測定可能であった。以上のデータから、芽球から産生される IL-11 もしくは TGF-beta1 が MG63 からの OPG の産生促進に寄与していることが推測された。

3. MG63 から OPG の産生を促進させるサイトカインの同定

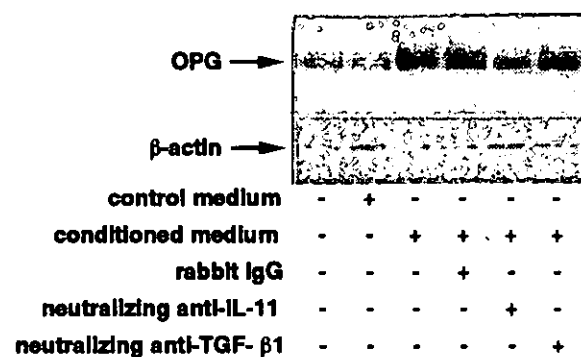


図 2 MG63 から OPG の産生を促進させるサイトカインの同定

D/E. 考察/結論

本症例においては芽球が IL-11 を産生し、osteoclasts の抑制因子である OPG を osteoblasts から過剰に誘導する事により、骨硬化を来した事が示唆された。

F. 研究発表

1. Sato T, Matsunaga T, Niitsu Y et al. Interleukin-11 as an Osteoprotegerin-Inducing Factor in Culture Medium of Blastic Cells from a Patient of Acute Megakaryocytic Leukemia Complicated with Osteosclerosis. Am J Hematol 2004, in press

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

H. 参考文献

1. Stamatopoulos, K., Yataganas, X., Papadaki, T. & Paterakis, G. Unusually prolonged survival of a case of acute megakaryoblastic leukemia secondary to long-standing polycythemia vera. Leuk Res 2002, 26, 699-700.
2. Kostenuik, P.J. & Shalhoub, V. Osteoprotegerin: a physiological and pharmacological inhibitor of bone resorption. Curr Pharm Des 2001, 7, 613-635.

V. 移植・遺伝子治療

慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝子治療法の開発

小澤 敬也^{1,2}、上田 亨司²、岡田真由美¹、高德 正昭¹

花園 豊³、久米 晃啓²

自治医科大学 内科学講座血液学部門¹、遺伝子治療研究部²、再生医学研究部³

研究要旨 慢性肉芽腫症などの遺伝性疾患に対する造血幹細胞遺伝子治療では、抗癌剤や全身放射線照射などによる前処置は避けることが望ましい。そこで、前処置を省いた骨髓内移植法 (iBMT) の有効性をカニクイザルの系で検討した。しかし、遺伝子導入細胞の末梢血への出現は不十分であったため、EPO 反応型選択的増幅遺伝子 (SAG) を組み合わせたと、iBMT 後の EPO による SAG 導入細胞の体内増幅が可能であった。以上より、SAG 併用 iBMT 法の有用性が示された。

A. 研究目的

慢性肉芽腫症などの遺伝性疾患に対する造血幹細胞遺伝子治療では、抗癌剤や全身放射線照射などによる前処置は避けることが望ましい。そこで前処置を省いた骨髓内移植法 (iBMT) の有効性をカニクイザルの系で検討した。さらに移植後の遺伝子導入細胞増幅の目的で、選択的増幅遺伝子 (SAG) システムを利用し、体内での細胞増幅を検討した。

B. 研究方法

レトロウイルスベクターで遺伝子標識した CD34 陽性細胞を、四肢長管骨の骨髓内に直接注入し、移植後の骨髓、および末梢血中の導入遺伝子陽性率をコロニーアッセイ法および PCR 法で検討した。次に、遺伝子導入細胞の体内増幅のために、エリスロポエチン (EPO) 受容体細胞外ドメインとトロンボポエチン受容体 (c-Mpl) 細胞内ドメインのキメラ受容体 (EpoRMpl) をコードする SAG を、マーカー遺伝子と共に CD34 陽性細胞に遺伝子導入した。この細胞を iBMT 法で骨髓内に直接注入した。移植後 EPO 投与を行い、*in vivo* での選択的増幅効果を検討した。

C. 研究成果

移植後、コロニー形成細胞 (CFU) 全体の 2-30% が導入遺伝子陽性であったが、末梢血の遺伝子標識細胞は 0.1% 以下にとどまった。一方、EPO 反応型選択的増幅遺伝子 (SAG) を導入して

iBMT 法による移植を行ったところ、移植後 EPO による SAG 導入細胞の体内増幅が可能であった。増幅は EPO 依存性で、末梢血の遺伝子導入レベルは EPO 中断により低下したが、再度 EPO を投与することで、SAG 導入細胞を再増幅することが可能であった (図)。SAG で増幅された細胞は、骨髓球系・リンパ球系・赤芽球系と多系統に分化していることが *in situ* PCR 法などで確認できた。また、増幅された細胞が多クローン由来であることが、LAM-PCR 法により示された。

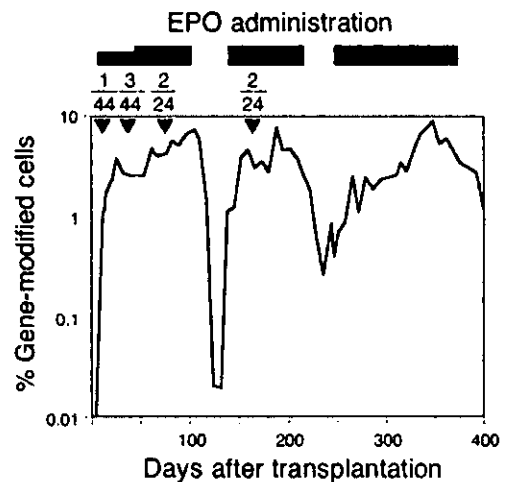


図. SAG 併用 iBMT 法を行ったサル末梢血における標識遺伝子陽性細胞の EPO 依存性増幅

D. 考察

カニクイザルにおいて、前処置なしで iBMT 法により移植細胞の生着が確認されたが、移植細胞由来の細胞の末梢血中への出現は低レベル (0.1

%)で治療応用域には達していなかった。このため SAG システムを組み合わせ検討したところ、SAG 分子スイッチ (EPO) 依存性に細胞増幅が臨床応用可能なレベルまで増幅ができた。しかし、一頭のサルにおいて、途中より EPO 投与不応になり、増幅ができなくなった。これは SAG キメラ遺伝子がヒト型であるためドナーサル体内に特異的 CTL が誘導され、排除された機序が示唆された。

E. 結 論

iBMT 法により、前処置なしで CD34 細胞の生着は可能であった。しかし、末梢血での遺伝子導入細胞は低レベルであった。

SAG システムを利用することで、EPO 依存性に遺伝子導入細胞が増幅し、治療可能域まで達した。また SAG 導入細胞の増幅は、EPO 投与中に限られ、その増幅は多系統の細胞にみられ、ポリクローナルであった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nagashima T, et al.: In vivo expansion of gene-modified hematopoietic cells by a novel selective amplifier gene utilizing the erythropoietin receptor as a molecular switch. *J Gene Med.* 6: 22-31. 2004
2. Kume A, et al.: In vivo expansion of transduced murine hematopoietic cells with a selective amplifier gene. *J Gene Med* 5: 175-181, 2003.
3. Asano T, et al.: Engraftment and tumor formation after allogeneic in utero transplantation of primate embryonic stem cells. *Transplantation.* 15: 1061-7. 2003

2. 学会発表

1. Ueda K, et al.: A novel method of hematopoietic stem cell gene therapy without conditioning: the intra bone marrow transplantation with selective amplifier gene in primates. 第 9 回日本遺伝子治療学会 2003. 7. 20. 東京
2. Kume A, et al.: Expansion of respiratory burst-positive granulocytes in chronic granulomatous disease mice with second generation selective amplifier gene. 第 9 回日本遺伝子治療学会 2003. 7. 20. 東京
3. 上田亨司ほか. 霊長類を用いた造血幹細胞遺伝子治療法の開発: 選択的増幅遺伝子と骨髄内移植法による移植前処置の回避. 第 65 回日本血液学会・第 45 回日本臨床血液学会同時開催. 2003. 8. 28 大阪
4. 原 武志ほか. 慢性肉芽腫症モデルマウスにおける第二世代選択的増幅遺伝子を用いた造血幹細胞遺伝子治療. 第 65 回日本血液学会・第 45 回日本臨床血液学会同時開催. 2003. 8. 28 大阪
5. Ueda K, et al.: A novel hematopoietic stem cell gene therapy method without marrow conditioning by intra-bone marrow transplantation combined with selective amplifier gene. The 45th Annual Meeting of the American Society of Hematology, 2003. 12. 8, San Diego, USA

G. 知的所有権の取得状況

1. A method for transplanting lympho-hematopoietic cells into a mammal 米国仮出願済み 出願番号 60/483, 357 号

H. 参考文献

1. Hanazono Y, et al.: *Gene Ther* 9: 1055, 2002