

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

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 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 三谷 絹子

平成 16 年 (2004) 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	
	獨協医科大学内科学（血液） 三谷 絹子	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	
	獨協医科大学内科学（血液） 三谷 絹子	7
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	9
3.	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	11
4.	後方視的調査による骨髄異形成症候群治療法選択のための層別化の試み	
	東京医科大学第一内科 大屋敷 一馬	13
5.	プロテオミクスの手法を用いた MDS 特異的な蛋白質の同定	
	東京女子医科大学血液内科 寺村 正尚	15
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	17
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	
	東京大学医学系研究科造血再生医療寄付講座 小川 誠司	19
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	21
IV.	研究成果の刊行物・別刷	23

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

主任研究者 三谷 絹子 獨協医科大学・内科学（血液）・教授

研究要旨

骨髄異形成症候群(以下 MDS)は、汎血球減少と急性骨髄性白血病(AML)への進展を伴う予後不良の難治性造血障害である。本研究では MDS の病態解明とこれに基づく新規治療法の開発を目的として、(1)ゲノム解析技術を用いたアプローチおよび(2)血球分化に関わる転写因子からのアプローチにより MDS の病態解析を推進し、さらに(3)新規治療法の開発のための臨床研究を施行した。(1)においては、前年度の 7q の CpG アイランドの網羅的メチル化解析により同定された腫瘍特異的にメチル化をうける 20 個の遺伝子の中で、PFTK1 および Q9P1T7 の 2 つの遺伝子にはメチル化と発現抑制の間に相関が認められることを明らかにした。これらは 7q-の標的遺伝子の候補と考えられた。また、網羅的なゲノム異常の解析を目的として、約 3600 個の BAC/PAC クローンを搭載したアレイ CGH 法を確立した。一方、マイクロアレイ解析により、MDS の病期の進行とともに発現の低下する PIASy 遺伝子を同定した。さらに、病期の進行に伴って癌抑制遺伝子 FHIT のプロモーター領域のメチル化が増強することも明らかにした。メチル化と遺伝子発現は相関し、メチル化を受けている症例は遺伝子発現が低い傾向を認めた。また、5-aza-dC 処理によりメチル化が解除され、遺伝子発現が増強した。(2)においては、MDS モデルマウスとして転写因子異常を背景とした、AML1 コンディショナルノックアウトマウス、EVI-1 トランスジェニックマウス及び AML1/EVI-1 ノックインマウスを作製した。AML1 コンディショナルノックアウトマウス及び EVI-1 トランスジェニックマウスは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た。さらに、EVI-1 トランスジェニック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。一方、AML1/EVI-1 ノックインマウスは胎仔肝における成体型造血が廃絶しており、中枢神経系の出血により胎生中期に致死となった。胎仔肝細胞のコロニー・アッセイにより、AML1/EVI-1 ノックインマウスは赤芽球造血の著明な低下、骨髄球の分化異常、巨核球の形態異常を示すことが明らかになり、その造血異常は一部 MDS の造血異常に類似していることが証明された。さらに、(3)として多施設共同研究「低リスク MDS に対するシクロスポリン療法」及び「低リスク MDS に対するビタミン K2 療法」が進行中である。前者には 21 例の患者が登録され、約 50%の症例に minor response 以上の効果が認められた。シクロスポリンの効果予測因子としては HLA DRB1 1501 の有用性は明らかではなかったが、PNH 顆粒球の存在が有用であると考えられた。後者は現在 15 例の患者に進行中である。以上の研究により、「ゲノムの異常」という観点から、MDS の病態に関与する候補分子を同定した。また、転写因子異常を原因とする MDS モデルマウスも作製され、これは病態解析、治療開発に有用であると考えられた。治療開発研究としては、国際的にも新規の「低リスク MDS に対するシクロスポリン療法」の臨床試験の成果が待たれる。

分担研究者

- | | |
|----------------------------------|----------------------------------|
| ・内山 卓
京都大学医学部
血液・腫瘍内科学 教授 | ・寺村正尚
東京女子医科大学
血液内科学 助教授 |
| ・直江 知樹
名古屋大学医学部
分子細胞内科学 教授 | ・間野博行
自治医科大学
ゲノム機能研究部 教授 |
| ・大屋敷一馬
東京医科大学
内科学 1 教授 | ・小川誠司
東京大学医学部
造血再生医療講座 助教授 |

A. 研究目的

骨髓異形成症候群（以下、MDS）は多系統に及ぶ造血障害と白血病への移行を特徴とするヘテロな難治性疾患群である。本症の予後は一般に不良であり、多くの症例は種々の治療に抵抗して急性骨髄性白血病（以下 AML）への進展ないしは汎血球減少による重篤な感染症や出血により不帰の転帰をとる。MDS はとくに高齢者を中心として近年増加の一途を辿っており、その病態の解明と有効な治療法の確立が急務となっている。治療という観点からは、造血幹細胞移植療法が現在本症に対して治癒を期待できる唯一の治療手段であるが、移植は治療関連死亡が多く、また MDS が高齢者に好発することを考えると、今後迎える高齢化社会においては副作用や合併症の少ない生理的な治療法の開発が必要となる。一方、MDS の病態についても、造血幹細胞の分化・増殖・アポトーシスの異常、そしてその背景としての転写因子異常、癌遺伝子や癌抑制遺伝子の変異、免疫学的異常など多くの可能性が指摘されているものの、未だにその本質的な発症機序は解明されておらず、有効な治療法の開発に結びつく成果は少ないのが現状である。このような現状に鑑み、本研究では治療法の開発を視野に入れた「ゲノム解析技術を用いたアプローチ」および「血球分化に関わる転写因子からのアプローチ」により、MDS の病因や病態に深くかかわる分子を探索し、これらの分子を標的とする MDS の新規診断技術・治療法の開発研究を行う。

B. 研究方法

(1)ゲノム解析技術を用いたアプローチ

A. MDS に特徴的な染色体異常の解析(平井/小川)

昨年度にメチル化アッセイにより同定された 7q- の候補遺伝子に関して、腫瘍検体における発現を定量 PCR 法により解析する。さらに、メチル化と発現低下の相関が確認できる遺伝子に関して、変異解析を行うことにより当該遺伝子の MDS への関与を明らかにする。また、MDS におけるゲノム異常を網羅的に解析する目的で、アレイ CGH (comparative genomic hybridization) システムを確立し、これを用いて MDS 検体に共通のゲノムの増幅・欠失領域の探索を行う。

B. MDS に特徴的な発現異常遺伝子の同定(間野)

MDS/AML と de novo 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検討する。さらに 3456 遺伝子を搭載したカスタムチップを作製し、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る。

C. MDS の発現異常蛋白のプロテオミクス解析(寺村)

MDS 症例および正常人由来の好中球を可溶性し二次元電気泳動で展開した後、特異的に出現し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る。

D. MDS に特徴的な遺伝子変異の解析(直江)

細胞周期制御因子 p15、p16 および p21 遺伝子のメチル化について解析し、FHIT 遺伝子のメチル化との関連性について検討する。さらに、FHIT 遺伝子のメチル化の病態進展への関与について検討する。

(2)血球分化に関わる転写因子からのアプローチ(平井/小川、三谷)

MDS モデルマウスを樹立するために、MDS で認められる転写因子異常を導入した遺伝子改変マウス (AML1 コンディショナルノックアウトマウス、GATA-1 プロモーターを用いた EVI-1 トランスジェニックマウス及び AML1/EVI-1 ノックインマウス) を作製する。

(3) MDS の新規治療法の開発

A. 「低リスク MDS に対するシクロスポリン療法」に関する多施設共同研究を実施する。シクロスポリン療法を施行された MDS 症例で TCR レパトアおよび造血系のクロナリティーの動態解析、治療効果と HLA との相関解析を行い、免疫抑制療法の効果に影響を及ぼす因子を解明し、より効果的な免疫抑制療法の開発を目指す。(内山)

B. MDS 細胞に対するビタミン K2 及びビタミン D3 の効果発現機序を検討し、「低リスク MDS に対するビタミン K2 療法」に関する多施設共同研究を実施する。(大屋敷)

C. 高リスク MDS 症例の選択基準と治療効果を明らかにする目的でアンケート調査を行う。(大屋敷)

(倫理面への配慮)

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。患者の本研究への参加については、全て文書による説明を行ったうえで、書面による同意を取得した。特に、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」(平成 13 年 3 月 29 日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)に準拠して行われた。また、動物実験については動物愛護の理念に基づき、各動物実験施設の承認を得た後、施設の「動物実験マニュアル」に沿って実施した。

C. 研究結果

(1)ゲノム解析技術を用いたアプローチ

A. MDS に特徴的な染色体異常の解析(平井/小川)

7q の網羅的メチル化解析で同定された 20 個の 7q- の候補遺伝子に関して、40 種類の腫瘍検体を用いて発現を定量 PCR 法により解析した結果、PFTK1 および Q9P1T7 の 2 つの遺伝子にメチ

ル化と発現抑制に相関が認められた。ただし、MDS 検体における変異解析では現在までのところ遺伝子変異は認められていない。

また、アレイ CGH 法による網羅的なゲノム異常の解析については、約 3600 個の BAC/PAC クロームを搭載した Human 1M アレイを作製し、これらのアレイを用いて MDS 検体におけるゲノムの増幅・欠失を検討した。その結果、MDS の腫瘍細胞におけるゲノムの異常を染色体全長にわたって正確に同定できることが明らかになった。現在 MDS において共通に欠失ないし増幅を認める領域の探索が進行中である。

B. MDS に特徴的な発現異常遺伝子の同定 (間野)

MDS/AML と de novo AML の発現プロファイルの比較解析により、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を同定した。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、造血細胞にアポトーシスを誘導することを明らかにした。

C. MDS の発現異常蛋白のプロテオミクス解析 (寺村)

正常者と MDS 症例の好中球の二次元電気泳動パターンを比較検討した結果、両者の泳動パターンに偏りが存在することが明らかになった。さらに質量分析を行い、数種の蛋白を同定した。

D. MDS に特徴的な遺伝子変異の解析 (直江)

正常造血細胞においては p16 および FHIT 遺伝子のメチル化を認めなかったが、p15 および p21 遺伝子には軽度のメチル化を認める例が存在した。一方、MDS 細胞においては、p16 遺伝子にはメチル化を認めなかったが、p21 遺伝子には病期に関係なく弱いメチル化が認められ、さらに p15 および FHIT 遺伝子では病期の進行に伴ってメチル化が増強する傾向を認めた。各遺伝子間のメチル化状態は重複する傾向にあった。また、AML および MDS/AML 症例におけるメチル化頻度は、p15、p16 および p21 遺伝子ではほぼ同程度であったが、FHIT 遺伝子では両者に差異が認められた。メチル化と遺伝子発現は相関し、メチル化を受けている症例は遺伝子発現が低い傾向を認めた。また、5-aza-dC 処理によりメチル化が解除され、遺伝子発現が増強した。AML における FHIT 遺伝子の経時的なメチル化状態の解析では、再発時にメチル化が増強する傾向が認められた。

(2) 血球分化に関わる転写因子からのアプローチ
AML1 コンディショナルノックアウトマウス及び EVI-1 トランスジェニックマウスは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た。さらに、EVI-1 トランスジェニック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 コンディショナルノックアウトマウスで

は、巨核球の多倍体化の異常が認められた。

一方、AML1/EVI-1 ノックインマウスは AML1 ノックアウトマウス及び AML1/ETO (de novo AML の原因遺伝子) ノックインマウスと同様に胎仔肝における成体型造血が廃絶しており、中枢神経系の出血により胎生中期に致死となった。胎仔肝細胞のコロニー・アッセイにより、AML1/EVI-1 ノックインマウスは赤芽球造血の著明な低下、骨髓球の分化異常、巨核球の形態異常を示すことが明らかになった。

(4) MDS の新規治療法の開発

A. 「低リスク MDS に対するシクロスポリン療法」に関する多施設共同研究には、平成 16 年 2 月現在 21 例の患者登録がなされ、うち 19 例で遺伝子解析を含む作用機序研究への参加の承諾を得ることができた。平成 15 年の登録が 12 例を占めるため、現時点で 32 週の治療期間が終了し、調査票回収に至った症例は 7 例である。聞き取り調査を含めて治療効果の判明した 11 例での検討では、5 例に minor response 以上の効果が認められた。その 11 例における作用機序の研究結果としては、再生不良性貧血ならびに MDS で免疫抑制療法に対する反応性との関連が指摘されている HLA DRB1 1501 は 4 例に認め、1501 陽性例の有効率は 2/4、50%であったのに対し、1501 陰性例では 3/7、43%であった。治療前 PNH 顆粒球は 11 例中 5 例に認め、うち 4 例で治療効果を認めた。従って、シクロスポリンの効果予測因子としての HLA DRB1 1501 の有効性は現時点では明らかではないが、PNH 顆粒球の存在は優れた予測因子となりうると考えられた。治療前の TCR レパトア解析は現在まで 6 例に施行し、全例でレパトアの偏りを認め、多くの例では spectratyping 法で clonal peak が認められた。(内山 平成 13-15 年度)

B. ビタミン K2 および D3 の造血細胞における機能の検討では、ビタミン K2 が HL60 および U937 にアポトーシスを誘導すること、またビタミン D3 との併用では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して抵抗性になること、このアポトーシス抵抗性の一部は p21/CIP1 の誘導によることを証明した。「低リスク MDS に対するビタミン K2 療法」に関する多施設共同研究は現在 15 例に進行中である。(大屋敷 平成 14、15 年度)

C. 高リスク MDS 症例の治療では、66 歳以上では無治療群の生存が有意に良好であり、急性白血病と同様な化学療法群および低用量化学療法群では生存の延長が得られないことが判明した。65 歳以下では予後良好核型を持つ症例で急性白血病と同様な化学療法による生存の延長が確認された。(大屋敷 平成 15 年度)

D. 考察

(1) ゲノム解析技術を用いたアプローチ

7q-は MDS に特徴的な染色体異常であり予後不良の徴候とされているが、長い間その責任癌抑制遺伝子は同定されていない。今回、遺伝子変

異を指標にするのではなく、CpG アイランドのメチル化を網羅的に解析することにより、発現の低下している候補遺伝子 PFTK1 および Q9P1T7 を同定した。これらの遺伝子の片方の遺伝子座が染色体異常に伴い欠失し、残りの遺伝子座がメチル化により失活することが MDS 発症に役割を担っている可能性がある。また、新たに確立したアレイ CGH 法による網羅的なゲノム異常の解析により、今後新たな責任遺伝子の存在部位が解明されるものと期待される。マイクロアレイ解析により、MDS に特徴的に発現している遺伝子及び病期の進展に伴い発現が変化する遺伝子が同定された。これらは、MDS の成因及び白血病化に関与する遺伝子であると考えられる。現在進行中のプロテオミクス解析においても同様の成果が期待される。これらの技術は MDS の病態解析に極めて有用であると考えられた。

さらに、特定の遺伝子を標的にした遺伝子変異の解析も有用な情報を提供した。病期の進展した MDS では、細胞周期制御因子をコードする p15 遺伝子がメチル化を受けその発現が低下していることが示されているが、同様に癌抑制遺伝子 FHIT も MDS 症例でメチル化によって不活化されていること、しかも病期の進展に伴いメチル化は増強する傾向にあることが明らかにされた。癌抑制遺伝子のメチル化による不活化は MDS の進展の過程で重要な役割を担っていると考えられた。

(2) 血球分化に関わる転写因子からのアプローチ
転写制御異常を原因とする MDS モデルマウスが作製された。AML1 コンディショナルノックアウトマウス及び EVI-1 トランスジェニックマウスはともに巨核球造血に異形成が認められた。AML1/EVI-1 ノックインマウスは胎生中期に致死となるためモデルマウスにはならないが、胎仔肝での成体型造血は 3 血球系統に異常を示し、一部 MDS の造血異常を反映していることが証明された。

(3) MDS の新規治療法の開発

「低リスク MDS に対するシクロスポリン療法」は、約 50% の症例に minor response 以上の効果が認められた。欧米では MDS の免疫抑制療法の主流は副作用の強い抗胸腺細胞グロブリンであり、シクロスポリンの有用性に関するエビデンスはない。高齢者に多い本疾患において比較的副作用の軽いシクロスポリンの有用性を明らかにしたことは意義が大きい。また、治療効果の予測のために HLA DRB1 1501 は有用でなく、PNH 顆粒球が有用である傾向を認めた。HLA DRB1 が予測因子とならない点は再生不良性貧血と異なり興味深い。副作用が少ないという点で「低リスク MDS に対するビタミン K2 療法」も有望である。今後治療成績が明らかになるものと思われる。最後に、高リスク MDS 症例を対象としたアンケート調査により、「66 歳以上では無治療群の生存が有意に良好であるが、65 歳以下で予後良好核型を持つ症例では急

性白血病と同様な化学療法により生存が延長する。」との有用な情報が得られた。

E. 結論

MDS の新規分子標的療法の開発を目的として、「ゲノムの異常」という観点と「転写因子の異常」という観点からアプローチを行い、MDS の病態に関与する候補分子を同定した。この中には MDS の分子標的療法の開発に直結するものも存在した。転写因子異常を原因とする MDS モデルマウスも作製され、これは病態解析、治療開発に有用であると考えられた。さらに、新規治療法の開発を目的として、現在国際的にも新規の「低リスク MDS に対するシクロスポリン療法」の臨床試験が継続中である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Hirai H.: Molecular mechanisms of myelodysplastic syndrome. *Jpn J Clin Oncol* 33:153-160, 2003.
2. Wang L, Ogawa S, Hangaishi A, Qiao Y, Hosoya N, Nanya Y, Ohyashiki K, Mizoguchi H, Hirai H.: Molecular characterization of the recurrent unbalanced translocation der(1;7)(q10;p10). *Blood* 102:2597-2604, 2003.
3. Kurokawa M, Hirai H.: Role of AML1/Runx1 in the pathogenesis of hematological malignancies. *Cancer Sci* 94:841-846, 2003.
4. Ota J, Yamashita Y, Okawa K, Kisanuki H, Fujiwara S, Ishikawa M, Choi YL, Ueno S, Ohki R, Koinuma K, Wada T, Compton D, Kadoya T, Mano H.: Proteomic analysis of hemato-poietic stem cell-like fractions in leukemic disorders. *Oncogene* 22: 5720-5728, 2003.
5. Ueda M, Ota J, Yamashita Y, Choi YL, Ohki R, Wada T, Koinuma K, Kano Y, Ozawa K, Mano H.: DNA microarray analysis of stage progression mechanism in myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 123:288-296, 2003.
6. Watamoto K, Towatari M, Ozawa Y, Miyata Y, Okamoto M, Abe A, Naoe T, Saito H.: Altered interaction of HDAC5 with GATA-1 during MEL cell differentiation. *Oncogene* 22:9176-9184, 2003.
7. Minami Y, Yamamoto K, Kiyoi H, Ueda R, Saito H, Naoe T.: Different antiapoptotic pathways between wild-type and mutated FLT3: insights into therapeutic targets in leukemia. *Blood* 102:2969-2975, 2003.
8. Matsunami T, Yoshioka T, Tsuruta Y, Shimamoto T, Ohyashiki JH, Suzuki R,

Ohyashiki K.: Determination of T-cell receptors of clonal CD8-positive T-cells in myelodys-plastic syndrome with erythroid hypoplasia. *Leukemia Res* 27:305-312, 2003.

9. Sashida G, Ohyashiki JH, Nakajima A, Kawakubo K, Tauchi T, Ohyashiki K.: Telomere dynamics in myelo-dysplastic syndromes determined by telomere measurement of marrow metaphases. *Clin Cancer Res* 9:1489-1496, 2003.

10. Shimamoto T, Tohyama K, Okamoto T, Uchiyama T, Mori H, Tomonaga M, Asano Y, Niho Y, Teramura M, Mizoguchi H, Omine M, Ohyashiki K.: Cyclosporin A therapy for patients with myelodysplastic syndrome: Multicenter pilot studies in Japan. *Leukemia Res* 27:783-788, 2003.

11. Tauchi T, Shinya K, Sumi M, Nakajima A, Sashida G, Shimamoto T, Ohyashiki JH, Ohyashiki K.: Activity of a novel G-quadruplex-interactive telomerase inhibitor, telomestatin, against human leukemia cells: Involvement of ATM-dependent DNA damage response pathways. *Oncogene* 22:5338-5547, 2003.

12. Shimamoto T, Ohyashiki K.: Immuno-suppressive treatments for myelodysplastic syndromes. *Leuk & Lymph* 44:593-604, 2003.

13. Oshima Y, Ueda M, Yamashita Y, Choi YL, Ota J, Ueno S, Ohki R, Koinuma K, Wada T, Ozawa K, Fujimura A, Mano H.: DNA microarray analysis of hematopoietic stem cell-like fractions from individuals with the M2 subtype of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 17:1990-1997, 2003.

14. Kajiguchi T, Yamamoto K, Hossain K, Akhand AA, Nakashima I, Naoe T, Saito H, Emi N.: Sustained activation of c-jun-terminal kinase (JNK) is closely related to arsenic trioxide-induced apoptosis in an acute myeloid leukemia (M2)-derived cell line, NKM-1. *Leukemia* 17:2189-2195, 2003.

15. Qiao Y, Ogawa S, Hangaishi A, Yuji K, Izutsu K, Kunisato A, Imai Y, Wang L, Hosoya N, Nannya Y, Sato Y, Maki K, Mitani K, Hirai H.: Identification of a novel fusion gene, TTL, fused to ETV6 in acute lymphoblastic leukemia with

t(12;13)(p13;q14), and its implication in leukemogenesis. *Leukemia* 17: 1112-1120, 2003.

16. Imai Y, Kurokawa M, Yamaguchi Y, Izutsu K, Nitta E, Mitani K, Satake M, Noda T, Ito Y, Hirai H.: The corepressor mSin3A regulates phosphorylation-induced activation, intranuclear location, and stability of AML1. *Mol Cell Biol* 24:1033-1043, 2003.

17. Ozeki K, Kiyoi H, Hirose Y, Iwai M, Ninomiya M, Kodera Y, Miyawaki S, Kuriyama K, Shimazaki C, Akiyama H, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Ueda R, Ohno R, Emi N, Naoe T.: Biological and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia. *Blood* 103:1901-1908, 2004.

18. Ichikawa M, Asai T, Saito T, Yamamoto G, Seo S, Yamazaki I, Yamagata T, Mitani K, Chiba S, Hirai H, Ogawa S, Kurokawa M.: AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hemato-poietic stem cells in adult hemato-poiesis. *Nat Med* 10:299-304, 2004.

19. Maki K, Arai H, Waga K, Sasaki K, Nakamura F, Imai Y, Kurokawa M, Hirai H, Mitani K.: Leukemia-related transcription factor TEL is negatively regulated through ERK-induced phosphorylation. *Mol Cell Biol* (in press)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

「骨髄異形成症候群(MDS)の検出方法及び MDS の治療剤」特許公開番号 2001-269174

「腫瘍に対する医薬品候補化合物のスクリーニング方法」国際公開番号 W000/11470

「タンパク質キナーゼ阻害剤」

特許出願番号 P2003-203509

「インダゾール誘導体」

特許出願番号 P2003-203508

「癌遺伝子の探索方法」

特許出願番号 P2003-206534

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告

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

主任研究者 三谷 絹子 獨協医科大学・内科学（血液）・教授

研究要旨

染色体転座の結果形成されるキメラ遺伝子が骨髄異形成症候群の病期の進展において果たす役割を解明する目的で、本年度は進行期 MDS でその発現が認められるキメラ蛋白 AML1/EVI-1 を発現するノックインマウスを作製し、個体レベルの機能解析を行った。AML1/EVI-1 ヘテロノックインマウスは胎生致死（胎生 13.5 日）であった。病理所見としては中枢神経系の出血および胎仔肝での成体型造血の欠如を認めた。胎生 13.5 日の胎仔肝の造血コロニーアッセイにおいて、骨髄球系細胞の分化の抑制および形態異常が認められ、赤芽球系細胞の形成はほとんど認めなかった。また、継代培養実験にてより高い自己複製能を持つことが確認された。胎仔肝における造血系転写因子の発現については、野生型マウスと同等の PU.1 の発現、および、C/EBP α の発現上昇が認められた。以上の結果から、AML1/EVI-1 は AML1 に対してドミナントネガティブ効果を持つことが個体レベルで初めて証明された。また、報告されている AML1/ETO ノックインマウスと比較して、成体型造血における著しい分化障害を認めた。AML1/EVI-1 の胎仔肝における成体型造血の異常は、骨髄異形成症候群の造血異常に一部類似していると考えられた。

A. 研究目的

AML1/EVI-1 は、慢性骨髄性白血病の急性転化時や進行期骨髄異形成症候群にみられる t(3;21)(q26;q22)転座の結果形成されるキメラ遺伝子である。AML1/EVI-1 キメラ蛋白は、AML1 に対してドミナントな抑制効果を示し、また EVI-1 領域も造腫瘍効果を持つことが培養細胞を用いた実験で示されているが、その個体レベルでの機能は不明である。一方、AML1/ETO キメラ遺伝子も、同様に AML1 に対してドミナントネガティブに機能することが培養細胞実験やノックインマウスの解析で示されているが、臨床的には AML1/ETO は *de novo* の急性骨髄性白血病(M2)に高頻度に認められ、その臨床像は AML1/EVI-1 と異なっている。そこで、AML1/EVI-1 ノックインマウスを作製し、AML1/EVI-1 の個体レベルでの機能を解析し、また、すでに報告されている AML1/ETO ノックインマウスの表現型と比較した。

B. 研究方法

マウス AML1 遺伝子の第 5 エクソンにヒト EVI-1 cDNA をイン・フレームでつけたノックイン・ターゲティングベクターを構築、エレクトロポレーション法にて ES 細胞に遺伝子導入し、相同組換え体を得た。この ES クローンを用い、常法に従い AML1/EVI-1 キメラマウスを作製した。このキメラマウスと C57BL/6 マウスを掛けあわせて得られた F1 (AML1/EVI-1

ヘテロノックインマウス) を解析した。

C. 研究結果

(1)AML1/EVI-1 ヘテロノックインマウスは胎生致死（胎生 13.5 日）であった。(2)病理所見としては中枢神経系の出血および胎仔肝での成体型造血の欠如を認めた。電子顕微鏡では、胎生 13.5 日の胎仔肝において赤芽球系細胞およびミエロペルオキシダーゼ陽性骨髄球系細胞の著明な減少と、分離膜形成の欠如した異形成のある巨核球系細胞を認めた。また、末梢血には有核赤血球のみが認められ、成体型造血による脱核した赤血球は認められなかった。(3)造血コロニーアッセイにおいて、胎生 13.5 日のヘテロマウス胎仔肝では多系統の細胞からなる混合コロニーが多数得られたが、胎生 12.5 日では少数の CFU-M の形成を認めるのみであった。赤芽球系のコロニーは、いずれの胎生においても全く観察されなかった。胎生 13.5 日のヘテロマウス胎仔肝由来の混合コロニーのサイトスピン標本において、骨髄球系細胞には分化の抑制および形態異常が認められた。赤芽球系細胞は全く認められなかった。また、継代培養実験にて、AML1/EVI-1 胎仔肝には野生型と比してより高い自己複製能を持つ造血前駆細胞が含まれていることが確認された。(4)胎仔肝細胞における造血系転写因子の発現について、半定量的 RT-PCR 法にて解析した。AML1/EVI-1 ヘテロマウスでは、野生型マウスと同等の PU.1 の発

現、および、C/EBP α の発現上昇が認められた。また、LMO2 および SCL の発現は 1/10 程度まで低下していた。

D. 考察

AML1/EVI-1 は AML1 に対してドミナントネガティブ効果を持つことが個体レベルで確認された。ヘテロマウスが胎生致死(胎生 13.5 日)であること、および胎仔肝に高い自己複製能を持つ造血前駆細胞が存在することは、AML1/ETO ノックインマウスと共通する表現型である。一方、コロニーアッセイで認められた多系統の造血細胞の分化障害、特に赤芽球系細胞の欠如は AML1/ETO ノックインマウスと異なる所見である。また、PU.1 および C/EBP α の発現は、AML1/ETO 発現細胞ではいずれも低下すると報告されており、今回半定量的 RT-PCR 法で示された AML1/EVI-1 ノックインマウスの結果とは異なっている。これらの相違点は、AML1/EVI-1 と AML1/MTG8 に由来する白血病の臨床像の違いに深く関連している可能性があると考えられる。

E. 結論

AML1/EVI-1 は AML1 に対してドミナントネガティブ効果を持つことが個体レベルで初めて証明された。AML1/EVI-1 の胎仔肝における成体型造血の異常は、骨髄異形成症候群の造血異常に一部類似していると考えられた。
なし。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Imai Y, Kurokawa M, Yamaguchi Y, Izutsu K, Nitta E, Mitani K, Satake M, Noda T, Ito Y, Hirai H.: The corepressor mSin3A regulates phosphorylation-induced activation, intranuclear location, and stability of AML1. *Mol Cell Biol* 24:1033-1043, 2003.
2. Maki K, Arai H, Waga K, Sasaki K, Nakamura F, Imai Y, Kurokawa M, Hirai H, Mitani K.: Leukemia-related transcription factor TEL is negatively regulated through ERK-induced phosphorylation. *Mol Cell Biol* (in press)
3. Yamaguchi Y, Imai Y, Izutsu K, Asai T, Ichikawa M, Yamamoto G, Nitta E, Yamagata T, Sasaki K, Mitani K, Ogawa S, Chiba S, Hirai H, Kurokawa M.: AML1 is functionally regulated through p300-mediated acetylation on specific lysine residues. *J Biol Chem* (in press)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
 2. 実用新案登録
 3. その他
- いずれも予定

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

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

骨髄異形成症候群（MDS）に対する新規治療法として免疫抑制療法に期待がもたれている。過去の報告より推測されるシクロスポリン療法の有効率は 30-50%であることから、治療効果の予測因子を明らかにすると共に、有効率を高める手段の開発のため、シクロスポリンの作用機序に関する検討を行った。シクロスポリン療法に反応性が見られた 5 名と、反応を認めなかった 6 名の末梢血検体の解析より、治療前の PNH 型顆粒球の存在とシクロスポリンの効果とは関連が見られ、有望な予測因子となり得ると考えられた。再生不良性貧血における免疫抑制療法の予測因子とされる HLA DRB1 1501 と治療効果の間には今のところ関連は認められていない。T 細胞受容体遺伝子解析では多数例で末梢血 T 細胞レパトアの偏りと、複数の T 細胞のクローナルな増殖を認め、MDS の病態形成に細胞性免疫異常の関与が示唆されたが、治療前後の変化に関しては一定した傾向が得られるに至っていない。

A. 研究目的

骨髄異形成症候群（MDS）は急性白血病に移行する危険性により高リスク群と低リスク群に分類され、後者においては白血病化よりむしろ造血不全が患者の予後を左右する。低リスク MDS 患者に見られる血球減少に対しては、従来蛋白同化ステロイド剤や、エリスロポエチンなどのサイトカイン療法が行われてきたが、一部の患者に貧血の改善を認めるのみであった。近年、シクロスポリンや抗 T 細胞グロブリンを用いた免疫抑制療法が注目されている。いずれの報告でも有効率は 30-50%に留まるが、3 血球系統すべての改善が得られ、予後の改善が期待されている。本研究では、免疫抑制療法の作用機序を検討することで、免疫抑制療法に感受性のある患者を治療前に同定できるようにすること、また個々の患者に至適な免疫抑制剤の選択ができるようにすることを目的とする。

B. 研究方法

特発性造血障害に関する研究班（小峰班）の低リスク 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 1) 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）、2) 末梢血単核球より抽出した DNA を用いた microplate hybridization assay 法による HLA 群遺伝子解析、3) 末梢血単核球より RNA を抽出、増幅後、microplate hybridization assay 法による T 細胞受容体レパトア解析ならびにスペクトル解析によるクロナリティー解析を行った。1) な

らびに 3) はシクロスポリン療法の前後で比較検討した。これらの解析結果をシクロスポリン療法反応性と比較検討することで、免疫病態の臨床的意義を検討する。

（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機関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

平成 16 年 2 月現在、小峰班の臨床試験に患者登録がなされ、遺伝子解析を含む作用機序研究への参加の承諾を得ることができた 21 名中、32 週の治療期間が終了し、調査票もしくは聞き取り調査により治療効果の判明した 11 名を対象とした。minor response 以上の治療効果は 11 名中 5 名に認められた。HLA 遺伝子の解析では、DRB1 1501 は 11 名中 4 名に認め、DRB1 1501 陽性例中の有効率は 2/4 であったのに対し、1501 陰性例では 3/7 と今のところ差を認めていない。治療前 PNH 型顆粒球陽性であった 5 名中 4 例で治療効果を認めた一方、陰性の 6 名中 1 名のみ効果を確認した。治療前の TCR レパトア解析では全例でレパトアの偏りを認め、多くの例では spectratyping 法で clonal peak を認めているが、治療前の偏りの程度、および治療前後での変化と治療効果との関連は現時点では判断困難で、より多くの検体を用いた解析が不可欠である。

D. 考察

DRB1 1501 は再生不良性貧血と異なりシクロスポリン感受性とは相関しない可能性がある。一方 PNH 顆粒球の存在は低リスク MDS のシクロスポリン感受性の優れた予測因子となることが期待される。TCR レパトア解析からは、低リスク MDS 患者の多くに免疫異常の存在を示しているものの、その生物学的意義や治療法選択の指標となりうるかはさらなる検討が必要である。

E. 結論

小峰班の臨床試験の進行に伴い、シクロスポリン感受性患者の同定に有用な指標が明らかになりつつある。試験完了患者数の増

加に伴い、これらの指標の意義に関してよりいっそうの理解が深まるものと予想され、その結果一部の低リスク群 MDS の治療法としてのシクロスポリン療法が確立されることが期待される。

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

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 直江 知樹 名古屋大学大学院医学系研究科分子細胞内科学 教授

研究要旨

癌抑制遺伝子 FHIT (fragile histidine triad) 遺伝子について、DNA プロモーター領域のメチル化および遺伝子発現の解析を行い、細胞周期制御遺伝子 p15、p16 および p21 のメチル化との比較検討を行った。MDS 由来骨髄細胞では病期の進行に伴い、FHIT および p15 遺伝子のメチル化増強を認めたが、両者のメチル化に相関はなかった。病期の進行した MDS 症例では、多数の遺伝子が同時にメチル化している症例も存在した。メチル化と遺伝子発現は逆相関し、5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) 処理により、メチル化の解除および遺伝子発現の増強が認められた。以上より、FHIT 遺伝子のメチル化は MDS の進展に関与している可能性があり、脱メチル化剤を用いた MDS 治療への臨床応用が期待される。

A. 研究目的

遺伝子のプロモーター領域に存在する CpG island のメチル化は遺伝子発現を負に制御することが知られ、現在までに様々な癌抑制遺伝子や転写制御因子遺伝子のメチル化が、造血器腫瘍の発症・進展に関与していることが報告されている。平成 15 年度の研究結果から、固形癌において癌抑制遺伝子と推定されている FHIT 遺伝子は、病期の進行した MDS 症例において高頻度にメチル化されていることが判明した。このメチル化はメチル化阻害剤 5-aza-dC 処理によって解除され、遺伝子発現の増強につながった。これらの結果から、FHIT 遺伝子は造血器腫瘍細胞においてもメチル化による遺伝子発現の抑制機構が存在する可能性が示唆された。しかし、このメチル化が MDS の発症・進展に関与するか否か、あるいは異常メチル化の反映であるのかについては不明であった。今回、我々は細胞周期制御遺伝子である p15、p16 および p21 のメチル化状態を同時に解析し、FHIT 遺伝子メチル化との関連性について比較検討を行った。

B. 研究方法

メチル化特異的 PCR および bisulfite genomic sequencing を用いて、MDS40 例、AML233 例および白血病細胞株 4 例における p15、p16 および p21 遺伝子プロモーター領域のメチル化を解析し、FHIT 遺伝子メチル化との関連性について比較検討した。同時に RT-PCR あるいは real time PCR を用いて遺伝子発現を解析し、メチル化との相関について検討した。同様に比較対照として、正常成人骨髄（骨髄移植ド

ナー）5 例、正常成人末梢血リンパ球 4 例および臍帯血 5 例を検討に加えた。また、5-aza-dC 処理によって生ずるメチル化状態および遺伝子発現の変化につき解析した。（倫理面への配慮）

検討に用いた検体は、すべて、診療上必要な臨床検査のために採取した残余で、当該患者のインフォームドコンセントを得た後に連結可能匿名化を施して検討に用いた。また、臍帯血に関しては、東海臍帯血バンクより、各種条件によってバンク登録不可となったものを、東海臍帯血バンク運営委員会の承認の上、研究用として供与戴いた。

C. 研究結果

正常造血細胞では、p16 および FHIT 遺伝子プロモーター領域にメチル化は認められなかったが、p15 遺伝子の 1 例および p21 遺伝子の 2 例でのみ軽度のメチル化が認められた。一方、MDS 細胞においては、p16 遺伝子にはメチル化を認めなかったが、p21 遺伝子では 60% の症例において特定の部位に軽度のメチル化が認められ、さらに p15 および FHIT 遺伝子では、病期の進行に伴ってメチル化した症例の頻度およびメチル化の密度が増強する傾向が認められた（RA でのメチル化症例の頻度はそれぞれ 0%、10%、MDS/AML ではそれぞれ 57.1%、85.7%）。病期の進行した MDS 症例では多数の遺伝子がメチル化されている傾向にあったが、各遺伝子間のメチル化に相関はなかった。MDS および AML におけるメチル化の分布様式は各遺伝子間で異なっていた。また、AML および MDS/AML におけるメチル化された症例の頻度は p15、p16 および p21 遺伝子ではほぼ同程度で

あったが（それぞれ 57.5%および 57.1%、1.7%および 0%、62.5%および 60%）、FHIT 遺伝子では両者に差異を認めた（13.8%および 85.7%）。メチル化と遺伝子発現は逆相関し、メチル化されている症例は遺伝子発現が低い傾向を認めた。5-aza-dC 処理では 11 例中 6 例（54.5%）にメチル化の解除が認められ、7 例（63.6%）に遺伝子発現の増強が認められた。脱メチル化と遺伝子の発現増加は相関していた。

D. 考察

正常造血細胞では遺伝子プロモーター領域にほとんどメチル化は認められないが、MDS の病態進行に伴ってメチル化が増強する FHIT 遺伝子は MDS の進展に関与している可能性があり、今後、同遺伝子のメチル化を有する MDS 症例の病態、治療効果判定などへの臨床応用が期待される。また、メチル化による遺伝子発現抑制機構の存在は、将来的に、MDS における脱メチル化剤を用いた治療へと臨床応用される可能性を示唆する。さらに、AML および MDS/AML 症例では FHIT 遺伝子のメチル化頻度に差を認めたこと、および各遺伝子間でメチル化の分布様式が異なっていたことから、遺伝子間あるいは疾患群の違いによってメチル化の作用機序が異なっている可能性があり、メチル化機構解明の糸口となる可能性が示唆される。また、MDS において様々な遺伝子が異常にメチル化されている可能性を考慮すると、メチル化を指標として、新たな MDS の原因遺伝子を同定することも可能となるかもしれない。

E. 結論

MDS における FHIT、p15、p16、p21 など様々な遺伝子のメチル化は、MDS の診断、予後、治療効果判定などに臨床応用される可能性がある。また、各種固形癌において癌抑制遺伝子と推定されている FHIT 遺伝子が、AML よりも MDS で高頻

度のメチル化を認めたことは、病型特異的なメチル化プロファイルの可能性を示唆する。メチル化によるがん抑制遺伝子の発現抑制は、脱メチル化剤を用いた MDS 治療へと臨床応用される可能性が期待される。MDS の進展における、FHIT の生物学的な意義についてはさらなる検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

Ozeki K, Kiyoi H, Hirose Y, Iwai M, Ninomiya M, Kodera Y, Miyawaki S, Kuriyama K, Shimazaki C, Akiyama H, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Ueda R, Ohno R, Emi N and Naoe T: Biological and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia. *Blood* 103:1901-8. 2004

Kajiguchi T, Yamamoto K, Hossain K, Akhand AA, Nakashima I, Naoe T, Saito H and Emi N.: Sustained activation of c-jun-terminal kinase (JNK) is closely related to arsenic trioxide-induced apoptosis in an acute myeloid leukemia (M2)-derived cell line, NKM-1. *Leukemia* 17: 2189-95. 2003

Minami Y, Yamamoto K, Kiyoi H, Ueda R, Saito H, Naoe T: Different anti-apoptotic pathways between wild-type and mutated FLT3: insights into therapeutic targets in leukemia. *Blood* 102: 2969-75. 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

後方視的調査による骨髓異形成症候群治療法選択のため の層別化の試み

分担研究者 大屋敷一馬 東京医科大学第一内科 教授

研究要旨

MDS で治療法選択に国際予後スコアリングシステム(IPSS)を用いるためには、治療効果の検討が必要である。今回、研究班所属 27 施設にアンケート調査を行い、20 施設からの回答を基に後方視的解析を行った。各施設でハイリスクと考えた 292 例(RA/RCMD 58 例、RCMD-RS 1 例、RAEB-1 66 例、RAEB-2 84 例、RAEBt(FAB) 68 例、CMML 15 例)を生存率、寛解率などで評価した。骨髓中の芽球割合、血球減少による層別化では治療効果良好な群の抽出は困難であった。IPSS の良好核型群で AML 様の中等量化学療法で寛解率 50%、5 年生存率 51%と最も良好であった。不良核型群は、中等量化学療法で寛解率 20%、50%生存期間 9 ヶ月、低用量化学療法でもそれぞれ 21%と 10 ヶ月であり、50%生存期間は非化学療法群の 26 ヶ月に比べ有意に短かった。また INT-2 以上の全症例中、66 歳以上では中等量・低用量とも 50%生存期間が 12 ヶ月と不良であった。化学療法は 65 歳以下で良好核型では推奨されるが、66 歳以上または不良核型には推奨されないと考えられた。

A. 研究目的

骨髓異形成症候群は多彩な病態が混在する疾患単位であるが、その治療法決定のための層別化において、FAB 分類や WHO 分類などの病型分類が必ずしも適しているとは言えない。また、1997 年に発表された国際予後スコアリングシステム(IPSS)は予後予測に頻用されるが、IPSS による層別化は治療結果を反映していない。化学療法は MDS 治療において大きな位置を占めているが、化学療法のための層別化を行うにあたり様々な問題点が想定される。そこで、化学療法反応性良好な群を抽出すること、および治療決定のための層別化を試みることを目的に多施設調査を行った。

B. 研究方法

研究班所属 27 施設に対しアンケート調査を実施し、20 施設から回答が得られた。解析対象と判断したのは 292 例で、年齢中央値がヨーロッパガイドラインの化学療法適応年齢限界に近い 63 歳で、男性が女性の約 2 倍であった。

初回治療の種類で 3 グループすなわち①AML に準じた化学療法、

②低用量化学療法、③その他の支持療法に分類した。①には IDR+ara-C (45.9%)、BHAC-DM ± VP-16 (20.1%)、DC(M) (13.5%)、②には ara-C + ACR + G-CSF (CAG)療法 (41.0%)、ara-C 少量療法 (20.5%)、ara-C 少量療法+ACR (16.7%)が含まれた。③では無治療が最も多く (40.3%)、以下 vitamin K₂ ± vitamin D₃ (18.7%)、蛋白同化ステロイド (13.0%)、副腎皮質ステロイド (6.5%)、シクロスポリン (5.0%) が含まれた。生存率を Kaplan Meier 法にて分析、さらに寛解率の分析、非寛解症例の経過などを患者数で検討し、年齢による治療成績の違いも分析した。

C. 研究結果

芽球割合の違いによる全生存率を見ると、芽球 10%以上では 3 グループすべてで生存率に差は認めなかった。芽球割合 5-9%の場合、50%生存は①12 ヶ月 (p=0.041)、②13 ヶ月 (p=0.031)のいずれも③27 ヶ月より有意に低値であった。これらの結果を踏まえると、芽球割合による層別化は 10%で分け、10%未満ではさらに別の方法で層別化の上化学療

法の適応を決める必要性が示唆された。

血球減少 1 系統以下と 2 系統以上のグループ間に差はなかった。

染色体核型の違いによる 3 グループでの差を、50%生存期間で見ると poor 群では③の 26 カ月に比べ①の 9 カ月 ($p=0.0004$)と②の 10 カ月 ($p=0.020$)がいずれも不良であった。good 群の 50%生存期間は②の 20 カ月が③の 52 カ月よりも短く ($p=0.024$)、①は 87 カ月で最も良好であった。

寛解率では good 群の①で寛解率が 50%で最も良く、G-CSF を使うことで寛解率は 66.7%となった。

66 歳以上では good 群、poor 群のいずれでも化学療法(①または②)による生存期間の延長は認めなかった。

D. 考察

化学療法の良い適応は 65 歳以下、染色体核型 good 群で、骨髄中芽球 10%以上の症例であると考えられ、AML に準じた化学療法を行い治療後好中球減少に対し G-CSF 使用が

推奨される。

化学療法を躊躇せざるをえない症例は、66 歳以上の症例または、染色体核型 poor 群であった。これらの症例に対し推奨される治療法は現時点ではない。

E. 結論

芽球割合に多くを依存した IPSS のみで化学療法適応決定は難しく、染色体、年齢などによる層別化が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

2. 学会発表

伊藤良和：High-risk MDS の治療：化学療法(学会シンポジウム 3) 第 65 回日本血液学会総会/第 45 回日本臨床血液学会総会(大阪、2003/8/28-31) 臨床血液 44(8): 635, 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

プロテオミクスの手法を用いた MDS 特異的な蛋白質の同定

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

骨髄異形成症候群(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。MDS 患者と正常人の末梢血を採取し、その好中球を純化したのち、蛋白を抽出し、二次元電気泳動を行った。両者の蛋白の発現パターンを解析ソフトを用いて比較検討した結果、MDS に特異的な蛋白の発現が認められた。現在、それらの蛋白群の同定およびその機能解析を進めており、MDS の診断および治療の標的となる蛋白の候補を探索中である。

A. 研究目的

近年、DNA チップなどの解析手法を用いて、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ないとされており、病因や病態を解析するためには、プロテオミクスの手法を用いた蛋白レベルでの疾患特異的な蛋白質の検索も行う必要があると考えられる。本研究は骨髄異形成症候群(MDS)における疾患特異的な蛋白質を明らかにし、その機能を解析するとともに、何らかの疾患マーカー、治療のターゲットとなる蛋白を同定することを目的とした。

B. 研究方法

MDS、特に不応性貧血 (refractory anemia: RA) 患者の末梢血中の好中球をターゲットとして蛋白質の解析を行うこととした。これらを解析対象とした理由は以下の通りである。

(1) MDS (RA) の好中球は異常クローン由来であり、形態学的、細胞生化学的な異常が明らかであり、何らかの蛋白異常が存在していると考えられる。

(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と考えられる。

(3) 臨床的に末梢血を検査するだけで、MDS を診断しうるような、実用的な疾患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ため、骨髄に比して検体の収集が進みやすい。

研究方法としては、MDS 患者および正常人の末梢血よりデキストラン法を用いて好中球を分離した。その細胞より蛋白質を抽出した後、二次元電気泳動を行った。両者の泳動パターンを解析ソフト (Ettan progenesis) で解析した。発現量に差が認められるスポットの質量分析を MALDI-TOF/TOF MS を用いて行い、その蛋白質をペプチドデータベース

(MASCOT) を用いて同定した。

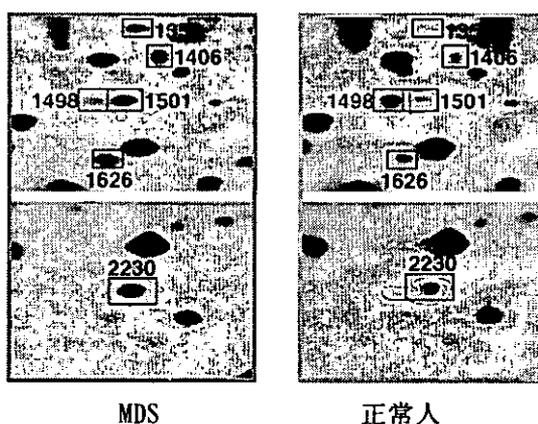
(倫理面への配慮)

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

MDS 患者と正常人の末梢血好中球由来の蛋白の泳動パターンを解析ソフトで解析したところ、両者間で蛋白の発現量の違うスポットが認められた (図)。それらのスポットについて MS によるペプチドマップを作製し、データベース上でペプチドマス・フィンガープリント測定を行い、蛋白質を同定した。これらの蛋白質の発現について複数の MDS 患者を対象とした検討、およびその蛋白機能解析を進めている。

(図) 発現量に差が認められたゲル上のスポット



D. 考察

MDS 患者の好中球には、正常人のそれとは異なる蛋白の発現プロファイルが存在することが明らかになり、MDS の病因、病態に関わる、いくつかの特異的な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MDS検体を用いて検証する必要があると考えられる。また、MDSに特異的に発現していると考えられる蛋白に関しては、その機能解析を進める必要がある。今後、技術的な面として、蛍光染色の手技を応用した、より詳細な蛋白質発現量の比較を行う予定である。また、より精度の高いMSを用いることにより、微小な泳動スポットの質量分析を進める予定である。このような技術的な問題を向上させることにより、MDSの骨髄細胞を検体として、CD34陽性細胞レベルでのプロテオーム解析も可能となると考える。

E. 結論

MDS患者と正常人の好中球の蛋白発現パターンを比較検討した結果、MDS好中球に特異的な蛋白の発現が認められることが明らかになった。それらの蛋白群の同定、解析を進めており、MDSの診断および治療の標的となる蛋白の候補を探索中である。

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

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：

MDS を含む各種特発性造血障害患者骨髄より造血幹細胞分画を純化保存する Blast Bank プロジェクトを遂行し、既に 500 例を超える疾患幹細胞の保存に成功した。本バンクに属する検体の中で MDS および MDS 由来白血病のサンプルより mRNA を調整し、ヒト約 12,000 種類の遺伝子が配置された DNA チップによる大規模発現解析を行った。その結果 MDS の病期進行に関わる細胞内シグナル伝達分子 PIASy の同定、特発性 AML と MDS 由来白血病とを鑑別する新規分子診断マーカーの同定などに成功した。さらに Blast Bank サンプルより蛋白可溶画分を調整し、二次元電気泳動にて展開後銀染色を行い、疾患ごとに発現量・等電点が異なるタンパク質のスクリーニングも行った。その結果、複雑な染色体異常を示す白血病において、細胞分裂に重要な役割を果たすタンパク質 NuMA1 の発現が異常亢進していることも明らかになった。

A. 研究目的

DNA チップは現在なお診断・治療法に不明な点が多い骨髄異形成症候群（MDS）の病態解明の上で有用なスクリーニング法になると期待されるが、その高感度のため偽陽的な結果を生じることも多い。我々は MDS を含め多くの特発性血液疾患が造血幹細胞あるいはその近傍の異常クローンに起因することに着目し、効率の良い DNA チップ解析を行う目的で様々な特発性血液疾患患者より造血幹細胞分画のみを純化して保存する「Blast Bank」を設立した。本バンク細胞を用いて DNA チップ解析をすることで、各患者骨髄中の悪性芽球の割合やそれぞれの疾患における芽球の分化方向の違いなどに影響されず、MDS の病態解析が可能になると期待される。本研究計画において我々はこれらの解析を通して（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、骨髄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 500 例を越える純化細胞の保存に成功している。Blast Bank の細胞より mRNA 分画を調整し、さらに T7 RNA ポリメラーゼを用いてビオチン標識化 complementary RNA (cRNA) を作製

した。この biotin-cRNA を Affymetrix 社 HGU95A アレイにハイブリダイズさせ、DNA チップ上の cRNA 結合スポットの蛍光強度を測定した。得られた蛍光強度データの統計処理は GeneSpring 6.1 ソフトウェア (Silicon Genetics 社) にて行った。

（倫理面への配慮）

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

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、やがて白血病幼若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、同種骨髄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。まず比較を容易にするために FAB 分類で同じ M2 に属する MDS 由来白血病患者と de novo AML 患者計 20 例を比較した。具体的には Blast Bank に属するこれらサンプルより標識 cRNA を調整し、12,000 種類以上のヒト遺伝子を配置した HGU95A チップにて発現プロファイルを得た。これらの遺伝子発