

現プロファイルを比較することにより統計的に有意に MDS 由来白血病と de novo AML とを鑑別する遺伝子群の抽出に成功した。また上記計 20 例のサンプルを初回寛解導入療法の成功例 8 例と失敗例 12 例とに区分し、薬剤感受性を規定する遺伝子群の抽出も試みた。その結果ピンカアルカロイド系薬剤に対する感受性を規定する遺伝子の同定に成功した。一方骨髄異形成症候群の各病期の Blast Bank サンプル計 31 例を用いて 3456 遺伝子を配置したカスタム DNA チップによる発現比較も行った。その結果骨髄異形成症候群の病期特異的に発現する遺伝子の抽出にも成功した。中でも病期進行と共に発現低下する遺伝子として PIASy を同定し、PIASy の発現誘導によって骨髄系細胞のアポトーシスが誘導されることも確認した

#### D. 考察

Blast Bank を用いた解析により、MDS の新規診断マーカーの同定および病期進行メカニズムの理解に成果が得られた。

#### E. 結論

Blast Bank に属するサンプルは平成 16 年 1 月時点で 500 例を越え、ヒトの純化疾患細胞収集事業として世界最大級である。本プロジェクトの拡充は現在も順調に進行しており、十分な達成度が得られた。また本バンクを用いた DNA チップ解析により、12000 種類のヒト遺伝子の発現情報が de novo AML 症例 22 例、MDS 由来白血病症例 28 例で既に得られており、また計 3456 遺伝子の発現情報が MDS 症例 43 例において得られた。それぞれ両疾患群の鑑別診断マーカーの同定および病態解明に重要な知見となった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

a) 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 hematopoietic stem cell-like fractions in leukemic disorders. *Oncogene* 22:5720-5728, 2003.

b) 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.

c) 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.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

公開番号：特開 2001-269174・発明者：間野博行・名称「骨髄異形成症候群(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

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

## 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 小川 誠司 東京大学大学院医学系研究科 造血再生医療寄付講座  
前任研究者 平井 久丸 東京大学大学院医学系研究科 血液腫瘍病態学講座

### 研究要旨

骨髄異形成症候群(MDS)に対する新規分子標的療法を開発することを目的として以下の研究を行った。すなわち、(1)分子標的療法のターゲットとなる分子を同定する目的で、約 3000 個の BAC クローンを搭載した Human 1M アレイを開発し、ヒトゲノム全域にわたって約 1Mb の解像度で遺伝子の増幅・欠失を同定することが可能なアレイ CGH システムを確立した。(2)さらに同アレイを用いて MDS 検体に生じているゲノムの増幅・欠失の網羅的探索を行い、MDS の責任遺伝子座の候補となる領域の同定を行った。一方、MDS の新規治療薬剤の開発に不可欠なモデルマウスの作成に関しては(3)MDS における不活化変異が報告されている AML1 遺伝子について、成体骨髄で特異的に同遺伝子を欠失するマウスの作成を行うことにより、巨核球系における異形成と血小板の減少を特徴とする MDS 類似の病態を有するマウスの樹立に成功した。また、(4)同マウスの造血機能の解析から、AML1 遺伝子は胎生期における成体造血幹細胞の形成には必須であるもののその維持には必須ではなく、むしろ AML1<sup>-/-</sup>の骨髄においては FACS 上造血幹細胞分画の増加が認められること、またリンパ球への分化が強く障害されることなど、AML1 の成体造血における機能に関して重要な知見を得ることができた。

### A. 研究目的

MDS は造血前駆細胞の異常により、無効造血と白血病への進展を特徴とする予後不良の難治性造血器疾患で、現在のところ造血幹細胞移植以外の有効な根治的治療法は知られていない。しかるに造血幹細胞移植は合併症のリスクが高く、また MDS が高齢者に好発することを考えると、より副作用の少ない有効な治療手段の開発が必須である。この目的のためには、MDS の発症を規定する責任遺伝子を同定することによりその原因分子とその病態への関与を明らかにし、遺伝的に相同なモデル動物を作成して、当該分子に特異的に作用する薬剤を開発する、いわゆる分子標的治療の開発が必須である。そこで、本研究では、まず、MDS の原因遺伝子を明らかにすることを目的として、ゲノムの欠失・増幅を網羅的に探索することが可能なアレイ CGH 法を開発し、これを用いて MDS におけるゲノムの異常を解析するとともに、我々の研究を含むこれまでの研究から MDS における変異が示されている AML1 遺伝子に関して、その条件的欠失マウスを作成することにより、AML1 の機能的欠失と MDS の病態との関連を個体レベルで明らかにすることを試みた。

(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

(1)アレイ CGH システムの確立とこれを用いた MDS のゲノム異常の網羅的探索  
FISH 法によりヒト染色体上でのユニークなシグナルが確認された BAC クローン約 3000 個について、大腸菌クローンから DNA を抽出し、DOP-PCR を用いて各 DNA の増幅を行ったのち、アミノシランコートしたガラススライド上にスポットすることにより Human 1M アレイを作成した。正常男性 DNA および腫瘍ゲノム DNA をそれぞれ Cy3、Cy5 で標識し、競合的ゲノムハイブリダイゼーション(CGH)を行うことにより得られる各スポットのシグナルを検出・解析することにより、当該ゲノム領域の欠失・増幅を網羅的に探索した。  
(2)AML1 条件的欠失マウスの作成と解析  
Cre/LoxP システムを用いた条件的欠失マウス作成の常法に従い、LoxP 配列を AML1 Exon5 の両端に挿入した AML1<sup>fllox</sup> アレルを作成し、AML1<sup>fllox/-</sup>アレルと Mx/Cre トランスジーンを導入した AML1<sup>fllox/-</sup>Mx/CreTg マウスを作成した。通常通り出生後に pIpC の腹腔内投与を行うことにより、骨髄で誘導的に AML1 遺伝子を欠失させて生ずる造血系の変化を、移植と FACS により解析した。

## C. 結果

### (1)アレイ CGH 解析

ヒト全ゲノム領域にわたって配置された約 3000 クロンの BAC クロンを搭載した Human 1M アレイを完成し、その性能評価を行った。正常男性ゲノム同士の CGH では各スポットのシグナル比のばらつきは  $SD = 0.1 \sim 0.15$  程度に押さえられており、また各実験間での再現性も良好であった。同アレイを用いて 10 例の MDS 症例のゲノムの解析を行ったところ、染色体分析で得られる欠失・増幅に関しては勿論のこと、染色体分析では同定不可能であった小さな欠失・増幅領域の特定が可能であった。

### (2)AML1 条件的欠失マウスの解析

AML1<sup>lox/-</sup>/Mx/CreTg マウスについて pIpC を腹腔内投与することにより、成体骨髄で AML1 をホモに欠失させることに成功した。同マウスでは、末梢白血球数、赤血球数は正常であったが、pIpC 投与一週間目から、血小板数の低下が観察された。骨髄の巨核球は、顕著な増加を認めたが、正常に比して小型で、顕著な多倍体化の障害が認められ、電子顕微鏡下の観察でも、限界膜の形成異常など多彩な異常が観察された。また、pIpC 投与後の AML1<sup>lox/-</sup>/Mx/CreTg の骨髄を正常マウスに移植したところ、AML1<sup>-/-</sup>の幹細胞では、造血前駆細胞の増加が認められる一方、Common Lymphoid Progenitor (CLP)からの T および B 細胞の分化が強く障害されていることが明らかとなった。

## D. 考察

(1)多数の BAC クロンを標的としたアレイ CGH 法は MDS をはじめとする悪性腫瘍のゲノム異常を探索する上で極めて強力な手法であることが明らかとなった。最終年度では、より多数の MDS 症例のアレイ CGH を用いた解析により、MDS の標的遺伝子の同定と、こうして得られるゲノムプロフィールを用いた予後解析が可能となると期待される。一方、

(2)Mx/CreTg マウスとの交配による AML1 の条件的欠失マウスの解析では、無効造血による血小板の低下、巨核球の異形成、リンパ球分化の停止および造血前駆細胞の増加が認められることから、同マウスが、ヒトの家族性血小板減少症(FPD)に類似した MDS のモデルとしてその病態解析と治療法の開発に極めて有用であると考えられた。また、AML1 は AGM に始まる胎生期の造血系の確立には必須であるが、その成体での維持には必須でないという事実は AML1 による造血の制御機構を明らか

にする上で極めて重要な知見である。

## E. 結論

(1)MDS の原因遺伝子の網羅的探索の基礎となるアレイ CGH システムを確立し、MDS 検体を用いてその有用性を明らかにした。  
(2)成体造血組織で特異的に AML1 遺伝子を欠失するマウスを作成し、同マウスが MDS 類似の病態を示すことを明らかにするとともに、AML1 の成体造血における意義を明らかにした。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1.論文発表

○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 hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. Nat Med. (In press).

○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.

○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

### 2.学会発表

○小川誠司, 大屋敷一馬, 三谷絹子, 村瀬卓平, 澤田賢一, 王莉莉, 喬穎, 南谷泰仁, 細谷紀子, 半下石明, 小峰光博, 平井久丸 不均衡転座 der(1;7)(q10;p10)及び-7/7q-の細胞遺伝学的病態解析。臨床血液学会

○南谷泰仁, 小川誠司, 半下石明, 細谷紀子, 王莉莉, 喬穎, 大屋敷一馬, 平井久丸 造血器腫瘍における第 7 染色体に存在する CpG アイランドのメチル化。日本血液学会総会

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧

## 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
Minami Y, Yamamoto K, Kiyoi H, Ueda R, Saito H, <u>Naoe T</u> .	Different anti-apoptotic pathways between wild-type and mutated FLT3: insights into therapeutic targets in leukemia.	Blood	102	2969-2975	2003
Kajiguchi T, Yamamoto K, Hossain K, Akhand AA, Nakashima I, <u>Naoe T</u> , 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	2189-2195	2003
Sashida G, Ohyashiki JH, Nakajima A, Kawakubo K, Tauchi T, <u>Ohyashiki K</u> .	Telomere dynamics in myelodysplastic syndromes determined by telomere measurement of marrow metaphases.	Clin Cancer Res	9	1489-1496	2003
Matsutami T, Yoshioka T, Tsuruta Y, Shimamoto T, Ohyashiki JH, Suzuki R, <u>Ohyashiki K</u>	Determination of T-cell receptors of clonal CD8-positive T-cells in myelodysplastic syndrome with erythroid hypoplasia.	Leukemia Res	27	305-312	2003
Shimamoto T, Tohyama K, Okamoto T, Uchiyama T, Mori H, Tomonaga M, Asano Y, Niho Y, Teramura M, Mizoguchi H, Omine M, <u>Ohyashiki K</u> .	Cyclosporin A therapy for patients with myelodysplastic syndrome: Multicenter pilot studies in Japan.	Leukemia Res	27	783-788	2003
Ueda M, Ota J, Yamashita Y, Choi YL, Ohki R, Wada T, Koinuma K, Kano Y, Ozawa K <u>Mano H</u> .	DNA microarray analysis of stage progression mechanism in myelodysplastic syndrome.	Br J Haematol	123	288-296	2003
Oshima Y, Ueda M, Yamashita Y, Choi YL, Ota J, Ueno S, Ohki R, Koinuma K, Wada T, Ozawa K, Fujimura A <u>Mano H</u> .	DNA microarray analysis of hematopoietic stem cell-like fractions from individuals with the M2 subtype of acute myeloid leukemia.	Leukemia	17	1990-1997	2003
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 <u>Mano H</u> .	Proteomic analysis of hematopoietic stem cell-like fractions in leukemic disorders.	Oncogene	22	5720-5728	2003
Wang L, <u>Ogawa S</u> , 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

## 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
Qiao Y, <u>Ogawa S</u> , 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
Imai Y, Kurokawa M, Yamaguchi Y, Izutsu K, Nitta E, <u>Mitani K</u> , 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.	2004
Maki K, Arai H, Waga K, Sasaki K, Nakamura F, Imai Y, Kurokawa M, Hirai H, <u>Mitani K</u> .	Leukemia-related transcription factor TEL is negatively regulated through ERK-induced phosphorylation.	Mol Cell Biol		(In press)	2004
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 <u>Naoe T</u> .	Biological and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia.	Blood	103	1901-1908	2004
Ichikawa M, Asai T, Saito T, Yamamoto G, Seo S, Yamazaki I, Yamagata T, Mitani K, Chiba S, Hirai H, <u>Ogawa S</u> , Kurokawa M.	AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis.	Nat Med		(In press)	2004

20030834

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