

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

骨髄異形成症候群の原因遺伝子の同定と発症機構の解明

平成14年度～16年度 総合研究報告書

主任研究者 小川 誠司

平成17(2005)年3月

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

骨髄異形成症候群の原因遺伝子の同定と発症機構の解明

平成14年度～16年度 総合研究報告書

主任研究者 小川 誠司  
平成17(2005)年3月

# 目 次

## I. 総合研究報告書

骨髄異形成症候群の原因遺伝子の同定と発症機構の解明

小川 誠司 ..... 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 10

III. 研究成果の刊行物・別刷 ..... 14

# I. 総合研究報告書

## 骨髄異形成症候群の原因遺伝子の同定と発症機構の解明

主任研究者 小川 誠司 東京大学医学部附属病院 造血再生医療寄付講座 客員助教授  
(平成14～15年度 平井 久丸 東京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)に関して、ゲノム解析技術とマウスジェネティクスの手法を用いて、その原因遺伝子の同定と発症機構の解明を試みた。すなわち、(1)MDSにおける予後不良の染色体転座 der(1;7)(q10;p10)のゲノム解析を行い転座切断点の同定を行うとともに、同転座の分子診断法を確立した。(2)MDSに特徴的に認められる7番染色体長腕の欠失に関して、メチル化による不活化の観点から、MDSを含む造血器腫瘍における網羅的なメチル化マッピングを行い、その責任遺伝子の候補として、PFTK1 および Q9P1T7 を同定した。(3)MDSにおけるゲノムコピー数の変化を網羅的に同定するためのBACアレイおよび高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いたシステムを構築し、これを用いてMDSにおけるゲノムの増幅・欠失の標的遺伝子の候補を多数同定した。また、(4)MDSで高頻度に不活化変異が認められるAML1に関して、同遺伝子を成体造血で特異的に欠失するマウスを作成することにより、MDSの動物モデルを確立するとともに、AML1不活化に伴う造血系の異常をMDSの病態という観点から詳細に解析を行い、AML1変異に伴うMDSの造血異常のメカニズムを明らかにした。

### 分担研究者

千葉 滋

東京大学医学部附属病院  
無菌治療部 助教授

黒川 峰夫

東京大学医学部附属病院  
血液・腫瘍内科 講師

当該分子に対して特異的に作用する薬剤を開発することが必要である。本研究事業の目的は、急速な進展を遂げているゲノム解析技術を駆使することにより、MDSの原因分子を同定することにより、その病態を明らかにし、以てMDSに対する新規分子標的治療薬の開発研究に資することである。具体的には、

1) 頻度の高い予後不良病型のゲノム異常の解析  
2) MDSにおけるゲノムの異常の網羅的解析による原因遺伝子の同定

3) MDSで代表的に認められる遺伝子異常を有するMDSのマウスモデル作成によるMDSの病態解析とモデルマウスの確立

である。

### B. 研究方法

1) der(1;7)(q10;p10)のゲノム解析(小川)

der(1;7)(q10;p10)を有するMDSは全症例の4～6%に認められる、極めて予後の不良な病型である。本異常の責任遺伝子を同定する手法として、定量的FISH法を新

### A. 研究目的

骨髄異形成症候群(MDS)は、白血病化や造血不全による、腫瘍死、感染死、出血死をきたす予後不良な難治性疾患で、近年高齢者を中心に増加の一途を辿っている。一方、現在治癒の期待できる唯一の治療手段は造血幹細胞移植であるが、その治療関連毒性は極めて高く、高齢者に好発する本症に対して主たる治療手段とはなりえない。従って、高齢者にも適応可能な治療毒性の少ない効果的な治療法の開発が急務であるが、そのためには、MDSの原因となる遺伝子(分子)の異常を同定し、

たに開発し、これを用いてその転座切断点のマッピングと同定を行った。

#### 2) 7番染色体のメチル化領域の網羅的解析(千葉)

7q-は der(1;7)(q10;p10)と同様、MDS および白血病で予後不良を示す染色体の欠失異常であるが、残存アレルのメチル化による 2nd hit を想定したその標的遺伝子を同定する、目的で、bisulfite Sequence 法を用いて7qでメチル化を受ける CpG 配列を探索した。多数の検体でメチル化を受ける領域について下流遺伝子の発現の低下を認める CpG を 7q-の標的遺伝子の候補として探索した。

#### 3) MDS におけるゲノムワイドなコピー数の解析(小川)

相互転座型の異常の多い白血病とは対照的に MDS では染色体の増幅・欠失を伴う異常の頻度が高いことが特徴である。そこで我々は3264個のBACプローブを搭載する Human 1M アレイを構築し、これを用いたアレイ CGH 法を用いて、62例のMDSについてゲノムに生ずるコピー数の変化を 1Mb の平均解像度で網羅的に探索した。さらに、近年大規模 SNP 解析を目的として Affymetrix 社により開発された高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いて、ゲノムコピー数を高精度に分析できるソフトウェアを Affymetrix 社と共同開発し、これを用いた MDS のゲノム解析を行った。

#### 4) AML1 遺伝子欠失マウスの作成と病態解析(黒川)

AML1 遺伝子はMDSの10-25%で不活化を認めることが明らかとなっている。そこでAML1の不活化によるMDSの病態を明らかにする目的で、AML1欠失マウスを作成した。通常のAML1ノックアウトでは、胎生致死となるため、Cre/loxP システムを用いて成体造血で特異的にAML1を欠失させることのできるマウスを作成し、造血の各系統における異常を詳細に解析した。

(倫理面への配慮)

MDS 患者試料を用いたゲノム解析については、ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針、疫学研究に関する倫理指針および臨床研究に関する倫理指針に基づき、東京大学医学部の設置する倫理委員会の承認を得て行った。

実験に使用したマウスの安楽死には頸椎脱臼を用い、可能な限り苦痛を与えないよう配慮した。

### C. 研究結果

#### 1) der(1;7)(q10;p10)のゲノム解析(小川)

我々は同異常の転座切断点が、ヒト染色体動原体を構

成する alphoid と呼ばれる数 Mb におよぶ繰り返し配列に存在することを見だし、さらに1番、7番各染色体の alphoid プローブを用いた FISH のシグナルを定量的に解析することによって、異なる症例における切断点の分布を決定した。切断点は、数 Mb の alphoid 配列中に広範に分布することから、切断点近傍に特定の責任遺伝子を想定することは困難で、MDS の病態は、転座によってもたらされる 7q モノソミーおよび 1q トリソミーによる遺伝子の量的変化に帰せられることが強く示唆された。また、定量 FISH 法によるアレルを識別した解析から、MDS で認める動原体を含む同様の転座は全て相同組み換えによる同一のメカニズムで生ずることが推定され、これら一連の不均衡転座を centromere translocation と総称することを提唱している(添付資料 図1)。

#### 2) 7番染色体のメチル化領域の網羅的解析(千葉)

7番染色体長腕の塩基配列から予測される290個のCpGアイランドのうち、Alu配列を除いてPCR増幅が可能であった130個のCpGアイランドについて、41個の造血器腫瘍検体におけるメチル化の状態を決定した(添付資料 図2)。

7qのほぼ全長にわたるメチル化マッピングの結果から、造血器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、メチル化レベルと遺伝子の silencing が高い相関を示す遺伝子として、PFTK1 および Q9P1T7 を同定した。これらの遺伝子は、7q で不活化をうける標的遺伝子の有力な候補と考えられた。

#### 3) MDS におけるゲノムワイドなコピー数の解析(小川)

我々が独自に作成した Human 1M アレイを用いた CGH システムは、ヒトゲノム全域に渡って 1Mb の平均解像度でコピー数の変化を鋭敏に検出することが可能で、本システムを用いて62例のMDS試料についてコピー数の変化を解析した。本解析により、従来の染色体分析では検出不可能であった微細なゲノムの増幅・欠失が多数同定された(添付資料 図3)。増幅・欠失領域には、複数の症例で繰り返し認められる異常も複数存在し、こうした領域に含まれ遺伝子は MDS の病態の形成に関わる重要な遺伝子の候補であると考えられる。標的遺伝子の同定という観点からは、より解析の分解能を向上させて、異常の範囲を正確に define することが重要である。そこで、研究事業の最終年度には、Affymetrix 社より release されている大規模 SNP タイピング用に開発された高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いた

コピー数の解析システムを同社と共同開発し、これを用いて MDS におけるゲノムのコピー数変化をさらに詳細に解析した。同アレイを用いた我々の解析システムでは、116204 個の SNP プローブを用いて、全ゲノムで平均 23.6kb の分解能でゲノムに生ずるコピー数の変化を解析できること、また患者の正常組織とペアで解析することにより、アレル別にコピー数の増減が検出できること、また、これまでに前例のない解像度でゲノムワイドな LOH のマッピングを行うことができることが、特徴である(添付資料 図4)。解析の結果、アレイ CGH では検出できなかったいくつかのホモ接合性欠失を示す領域が同定され、これらの領域から MDS の発症に関与することが推定されるいくつかの遺伝子を見いだした。また、染色体分析では一見正常な核型を示す症例においても、相同組み換えによって uniparental disomy を広範に生じている症例が多数同定され、MDS ではゲノムの remodeling が通常の解析で認められる以上に広範に生じていることが明らかとなった。こうした 'UPD phenotype' は新たなゲノム不安定性の指標となるものであって、これが生ずるメカニズムを明らかにすることは、今後の課題である。

#### 4) AML1 遺伝子欠失マウスの作成と病態解析(黒川)

AML1 を成体造血系で欠失させたマウスでは、末梢リンパ球の減少および血小板の減少が観察された。これに対応して、巨核球における形態異常および多倍体化の障害、double negative T 細胞分画における DN2 から DN3 への移行の障害、B 細胞分画における Hardy 分画 A から B への移行の障害が確認された。一方、造血幹細胞分画においては減少が認められず、異常の結果より、AML1 は成体造血幹細胞の維持には必要ないが、その正常な分化には必須であることが明らかとなった(添付資料 図5)。同時に、これらの結果は MDS における血小板減少と巨核球の異形成、リンパ球分画への MDS クロンの関与がないことをよく説明するものであり、AML1 欠失マウスは MDS のモデル動物として有用であると考えられた。

### D. 考察

#### 1) 研究事業の達成度について

本研究を通じて、MDS における特徴的なゲノムの異常とその成因に関与する可能性のある標的遺伝子の候補を最新のゲノム解析技術を駆使して多数同定できた点、および MDS で最も高頻度に異常を示す遺伝子の一つで

ある AML1 についてその欠失と MDS の病態との関連を明らかにできた点では、初期の研究目標を達成できたと考えられる。一方、同定された多数の標的遺伝子の候補については、MDS の病態への関与を他の方法でさらに検証する必要がある。腫瘍特異的な体細胞変異の確認は有力な手段であるが、多数の候補について系統的に変異解析を進めていくためには、効率的な変異解析のシステム、とくにマイクロアレイを用いた resequencing 技術を確立して系統的に研究を進める必要がある。本研究では、コピー数解析システムの確立に多大な時間を要したこと、および resequencing アレイ導入の研究資金が確保できなかったことが、上記を達成できなかったことの要因であった。

#### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

我々が開発した GeneChip による腫瘍ゲノムのコピー数/LOH 解析システムはその精度において、少なくとも現状では世界最先端のものであると自負している。実際、本技術の供与による消化器癌、小児癌、乳癌ゲノムの解析に関する共同研究が多数進行中である。MDS の原因遺伝子の候補として同定された多数の遺伝子については、今後の MDS の病態解明とこれらの分子をターゲットとして新規分子標的薬の開発に資すると考えられる。また、AML1 欠失マウスの解析は国際的にも高い評価をすでに得ており、MDS の病態の解明のみならず、造血系の分化の制御に関する近年の最も重要な知見の一つである。

#### 3) 今後の展望について

今回の研究で同定された多数の候補遺伝子に関しては、これらの遺伝子の異常の病態生理学的意義を明らかにしていく必要がある。AML1 欠失マウスに認められるリンパ球および巨核球の異常については、これらが生ずる分子メカニズムの解明を行うことが重要である。また、今後 resequencing 技術を用いた high throughput な変異解析を確立し、MDS の網羅的な変異解析を行う。

### E. 結論

1) MDS の予後不良病型に高頻度に認められる特徴的な不均衡転座 der(1;7)(q10;p10) について、そのゲノム異常を明らかにするとともに、同転座の分子診断法を確立した。

2) 造血器腫瘍における 7q の網羅的なメチル化マッピングを行い、7q で不活化を受ける標的遺伝子の候補として PFTK1 および Q9P1T7 を同定した。

3) 最新のアレイ解析技術を用いて、超高解像度のコピー数変化の解析システムを開発し、これを用いた MDS ゲノムの解析から、MDS で増幅・欠失を生ずる多数のゲノム領域とその標的遺伝子の候補の同定を行った。

4) MDS で高頻度に不活化をうける AML1 遺伝子を成体で特異的に欠失するマウスを作成することにより、AML1 の不活化が成体造血に及ぼす変化を解析することにより、MDS の病態を個体レベルで明らかにするとともに、MDS のモデル動物の樹立に成功した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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 the Notch2 intracellular domain. *EMBO J* 21:294-302, 2002.
2. Suzuki T, Nakamoto T, Ogawa S, Seo S, Matsumura T, Tachibana K, Morimoto C, Hirai H. MICAL, a novel CasL interacting molecule, associates with vimentin. *J Biol Chem* 277:14933-14941, 2002.
3. Yamaguchi E, Chiba S, Kumano K, Kunisato A, Takahashi T, Takahashi T, Hirai H. Expression of Notch ligands, Jagged 1, 2 and Delta1 in antigen presenting cells in mice. *Immunol Letters* 81:59-64, 2002.
4. Nakamoto T, Suzuki T, J Huang, Matsumura T, Seo S, Honda H, Sakai R, Hirai H. Analysis of gene expression profile in p130Cas-deficient fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 94:635-641, 2002.
5. Ogawa S, Hangaishi A, Hirai H. Identification of candidate tumor suppressor genes from critical deletions of long arm of chromosome 6 in hematopoietic neoplasm. *International Congress Series* 1246:251-260, 2002.
6. Hangaishi A, Ogawa S, Qiao Y, Wang L, Hosoya N, Yuji K, Imai Y, Takeuchi K, Miyawaki S, Hirai H. Mutations of Chk2 in primary hematopoietic neoplasms. *Blood* 99:3075-3077, 2002;
7. 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.
8. 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. *Leuk Lymphoma* 43:617-621, 2002.
9. Takahashi T, Holland PWH, Cohn MJ, Shimizu K, Kurokawa M, Hirai H. An orphan PRD class homeobox gene expressed in mouse brain and limb development. *Development Genes and Evolution* 212:293-297, 2002.
10. Kunisato A, Chiba S, Yamaguchi E, Kumano K, Saito T, Masuda S, Yamaguchi T, Osawa M, Kageyama R, Nakauchi H, Nishikawa M, Hirai H. HES-1 preserves purified hematopoietic stem cells ex vivo and accumulates side population cells in vivo. *Blood* 101:1777-1783, 2003.
11. 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.
12. 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.
13. Nakamura F, Ogawa S, Izutsu K, Imai Y, Maki K, Yamagata T, Mitani K, Hirai H. Should young patients with e19a2 type BCR/ABL rearrangement undergo stem cell transplantation? *Leuk Lymphoma* 44:381-382, 2003.
14. Kumano K, Chiba S, Kunisato A, Sata M, Saito T, Nakagami-Yamaguchi E, Yamaguchi T, Masuda S, Shimizu K, Takahashi T, Ogawa S, Hamada Y, Hirai H. Notch1 but not Notch2 is essential for generating hematopoietic stem cells from endothelial cells. *Immunity* 18:699-711, 2003.
15. Komeno Y, Ogawa S, Ishida T, Takeuchi K, Tsujino S, Kurokawa M, Aoki K, Kanda Y, Chiba S, Motokura T, Fukayama M, Hirai H. Ischemic colitis as a manifestation of thrombotic microangiopathy following bone marrow transplantation. *Intern Med* 42:1228-1232, 2003.
16. Kawazu M, Kanda Y, Goyama S, Takeshita M, Nannya Y, Niino M, Komeno Y, Nakamoto T, Kurokawa M, Tsujino S, Ogawa S, Aoki K, Chiba S, Motokura T, Ohishi N, Hirai H. Rapid diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis by quantitative polymerase chain reaction using bronchial lavage fluid. *Am J Hematol* 72:27-30, 2003.
17. Komeno Y, Kanda Y, Kandabashi K, Kawazu M, Goyama S, Takeshita M, Nannya Y, Niino M, Nakamoto T, Kurokawa M, Tsujino S, Ogawa S, Aoki K, Chiba S, Motokura T, Hirai H. Reduced-intensity bone marrow



- transplantation from an alternative unrelated donor for myelodysplastic syndrome of first-donor origin. *Am J Hematol* 72:220-222, 2003.
18. Hosoya N, Ogawa S, Motokura T, Hangaishi A, Wang L, Qiao Y, Nannya Y, Kogi M, Hirai H. Molecular cytogenetic analyses of HIG, a novel human cell line carrying t(1;3)(p36.3;q25.3) established from a patient with chronic myelogenous leukemia in blastic crisis. *Int J Hematol* 78:432-438, 2003.
19. Asano Y, Kanda Y, Ogawa N, Sakata-Yanagimoto M, Nakagawa M, Kawazu M, Goyama S, Kandabashi K, Izutsu K, Imai Y, Hangaishi A, Kurokawa M, Tsujino S, Ogawa S, Aoki K, Chiba S, Motokura T, Hirai H. Male predominance among Japanese adult patients with late-onset hemorrhagic cystitis after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 32:1175-1179, 2003.
20. Ogawa S. Molecular genetics of Myelodysplastic syndrome. *Educational Program Book: Japanese Society of Hematology and Japanese Society of Clinical Hematology* 10-25, 2004.
21. Yamaguchi Y, Kurokawa M, Imai Y, Izutsu K, Asai T, Ichikawa M, Yamamoto G, Nitta E, Yamagata T, Sasaki K, Mitani K, Ogawa S, Chiba S, Hirai H. AML1 is functionally regulated through p300-mediated acetylation on specific lysine residues. *J Biol Chem* 279:15630-15638 2004.
22. Ogawa N, Kanda Y, Matsubara M, Asano Y, Nakagawa M, Sakata-Yanagimoto M, Kandabashi K, Izutsu K, Imai Y, Hangaishi A, Kurokawa M, Tsujino S, Ogawa S, Aoki K, Chiba S, Motokura T, Hirai H. Increased incidence of acute graft-versus-host disease with the continuous infusion of cyclosporine A compared to twice-daily infusion. *Bone Marrow Transplant* 33:549-552, 2004.
23. Ichikawa M, Asai T, Saito T, Yamamoto G, Seo S, Yamazaki I, Yamagata T, Mitani K, Chiba S, Ogawa S, Kurokawa M, Hirai H. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat Med* 2004;10:299-304.
24. Ichikawa M, Asai T, Chiba S, Kurokawa M, Ogawa S. Runx1/AML-1 ranks as a master regulator of adult hematopoiesis. *Cell Cycle* 3:722-724, 2004.
25. Kawazu M, Kanda Y, Nannya Y, Aoki K, Kurokawa M, Chiba S, Motokura T, Hirai H, Ogawa S. Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for galactomannan, and a (1→3)-β-D-glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol* 42:2733-2741, 2004.
26. Goyama S, Yamaguchi Y, Imai Y, Kawazu M, Nakagawa M, Asai T, Kumano K, Mitani K, Ogawa S, Chiba S, Kurokawa M, Hirai H. The transcriptionally active form of AML1 is required for hematopoietic rescue of the AML1-deficient embryonic para-aortic splanchnopleural (P-Sp) region. *Blood* 104:3558-3564, 2004.
27. 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, 2004.
28. 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 extracellular signal-regulated kinase-induced phosphorylation. *Mol Cell Biol* 24:3227-3237, 2004.
29. Kunisato A, Ogawa S, Chiba S. Dominant-negative activity of stem cell leukemia (SCL) lacking bHLH domain. *Blood* 105:1365-1366, 2005.
30. Kawazu M, Asai T, Ichikawa M, Yamamoto G, Saito T, Goyama S, Mitani K, Miyazono K, Chiba S, Ogawa S, Kurokawa M, Hirai H. Functional Domains of Runx1 Are Differentially Required for CD4 Repression, TCR β Expression, and CD4/8 Double-Negative to CD4/8 Double-Positive Transition in Thymocyte Development. *J Immunol* 174, 3526-3533, 2005.
31. Hosoya N, Qiao Y, Hangaishi A, Wang L, Nannya Y, Sanada M, Kurokawa M, Chiba S, Hirai H, Ogawa S. Identification of a SRC-like tyrosine kinase gene, FRK, fused with ETV6 in a patient with acute myelogenous leukemia carrying a t(6;12)(q21;p13) translocation. *Genes Chromosomes Cancer* 42:269-279, 2005.

## 2. 学会発表

1. Motoshi Ichikawa, Takashi Asai, Toshiki Saito, Sachiko Seo, Go Yamamoto, Tetsuya Yamagata, Ieharu Yamazaki, Mineo Kurokawa, Kinuko Mitani, Hisamaru Hirai. AML1 Is Required for Megakaryocytic Maturation in Adult

Hematopoiesis. *The American Society of Hematology 44<sup>th</sup> Meeting and Exposition, 2002, USA*

(Blood:100, p130a, 2002)

2. Yoichi Imai, Mineo Kurokawa, Yuko Yamaguchi, Kinuko Mitani, Hisamaru Hirai. The Interaction between AML1/RUNX1 and the Corepressor mSin3A Regulates Phosphorylation-Induced Transcriptional Activation, Intranuclear Location, and Stability of AML1/RUNX1. *The American Society of Hematology 44<sup>th</sup> Meeting and Exposition, 2002, USA*

(Blood:100, p65a, 2002)

3. Yuko Yamaguchi, Mineo Kurokawa, Yoichi Imai, Koji Izutsu, Takashi Asai, Motoshi Ichikawa, Go Yamamoto, Eriko Nitta, Tetsuya Yamagata, Kinuko Mitani, and Hisamaru Hirai. AML1 is Functionally Regulated by p300-mediated Acetylation of Specific Lysine Residues. *The American Society of Hematology 44<sup>th</sup> Meeting and Exposition, 2002, USA*

(Blood:100, p31a, 2002)

4. 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 *臨床血液学会総会 2003*

(臨床血液 44:698 (2003. 08))

5. 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 2003*

(日本癌学会 62 回総会記事 Page132 (2003. 08))

6. Hosoya N, Ogawa S, Qiao Y, Wang L, Xue D, Sanada S, Nannya S, Hangaishi A, Hirai H. Identification of a novel TEL-fusion partner gene, FRK, in a patient with acute myelogenous leukemia (AML-M2) carrying a  $t(6;12)(q21;p13)$  translocation. *The American Society of Hematology 45<sup>th</sup> Meeting and Exposition, 2003, USA*

(Blood:102, p848a, 2003)

7. Asai T, Yamagata T, Saito T, Ichikawa M, Seo S, Yamamoto G, Kurokawa M, Maki K, Mitani K, Aizawa S, Oda H, Hirai H. RUNX1 is required for thymocyte development through pre-TCR expression and Lck activity. *The American Society of Hematology 45<sup>th</sup> Meeting and Exposition, 2003, USA*

(Blood:102, p49a, 2003)

8. 真田昌, 南谷泰仁, 半下石明, 細谷紀子, 王莉莉, 藤田和博, 黒川峰夫, 千葉滋, 小峰光博, 平井久丸, 小川誠司 アレイ CGH を用いた造血器腫瘍の網羅的ゲノム異常の解析 *第66回日本血液学会総会, 2004*

(日本血液学会・日本臨床血液学会回総会プログラム・抄録集 66 回 46 回 Page775 (2004. 09))

9. 小川誠司 骨髄異形成症候群 *第66回日本血液学会総会, 2004*

(Educational Program Book: Japanese Society of Hematology and Japanese Society of Clinical Hematology 10-25, 2004)

10. Sanada M, Nanya Y, Hangaishi A, Hosoya N, Wang L, Kurokawa M, Omine M, Chiba S, Ogawa S. Array-Based Comparative Genomic Hybridization for Genome-Wide Analysis of DNA Copy Number in Myelodysplastic Syndromes. *The American Society of Hematology 46<sup>th</sup> Meeting and Exposition, 2004, USA*

(Blood:104, p933a, 2004)

#### G. 知的財産権の出願・取得状況

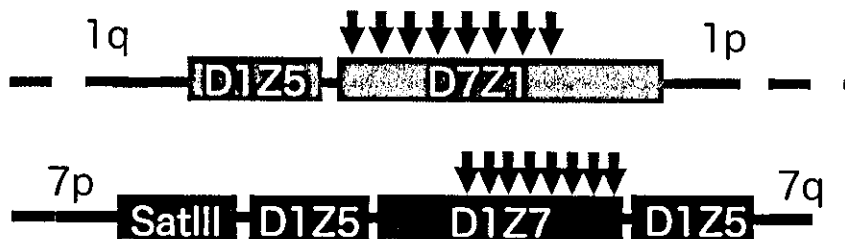
1. 二重カラー-FISH 法による  $t(1;7)(q10;p10)$  の分子診断法の開発 (申請予定)。

2. Affymetrix GeneChip を用いた悪性腫瘍における網羅的なゲノムコピー数/LOH 解析プログラム (CNAG) の開発 (申請予定)。

図1 der(1;7)(q10;p10)転座における切断点とその分布

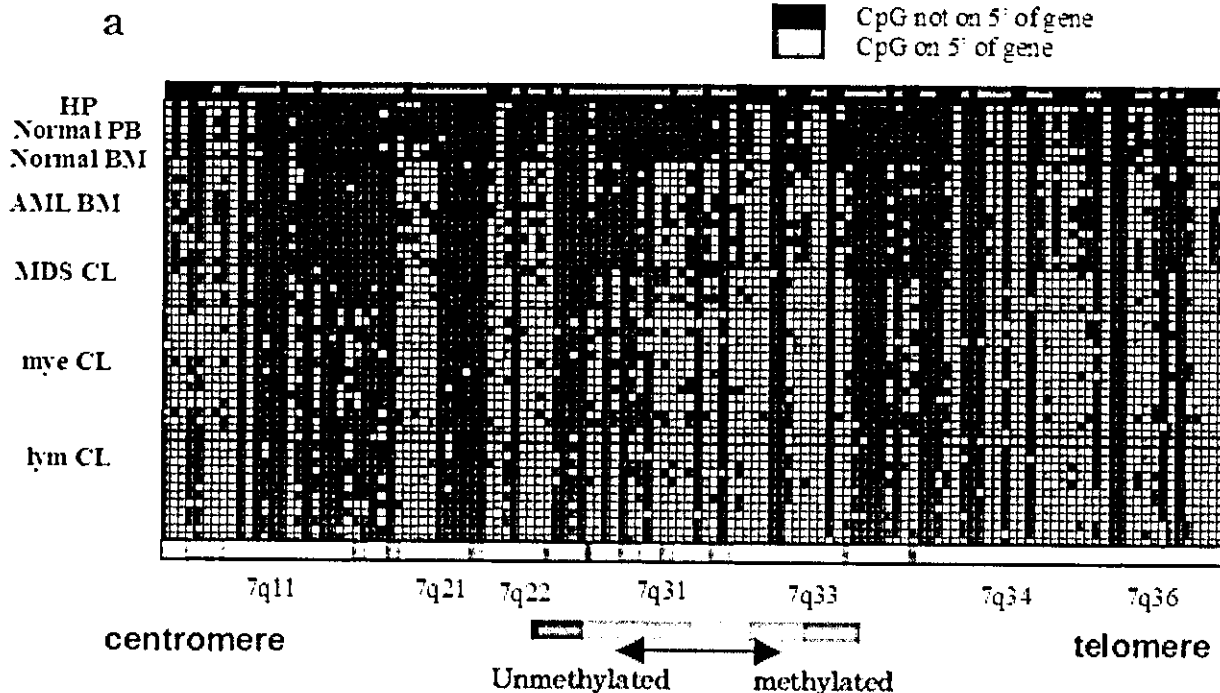


不均衡転座der(1;7)(q10;p10)(左)では、1番および7番染色体の動原体近傍の転座により1qトリソミーおよび7qモノソミーを生ずる。我々は、転座切断点が、両染色体動原体を構成するalphoid配列(D1Z7およびD7Z1)内に存在することが証明し、FISH法を用いたder(1;7)の分子診断技術を確立した(右)。



本転座では、進化上保存された両alphoid配列間の相同組み換えにより生ずるが、転座切断点は、両alphoid配列内に広く分布することから、MDSの発症に本質的なのは、1qトリソミーおよび7qモノソミーであることが示唆される。

図2 造血器腫瘍における7番染色体長腕のメチル化マッピング。



メチル化は特定のCpG配列に集積する傾向が認められ、これらの領域から7qのメチル化の標的として25個の遺伝子が同定された。

図3 アレイCGHによるMDSの増幅(青)および欠失(ピンク)領域の解析

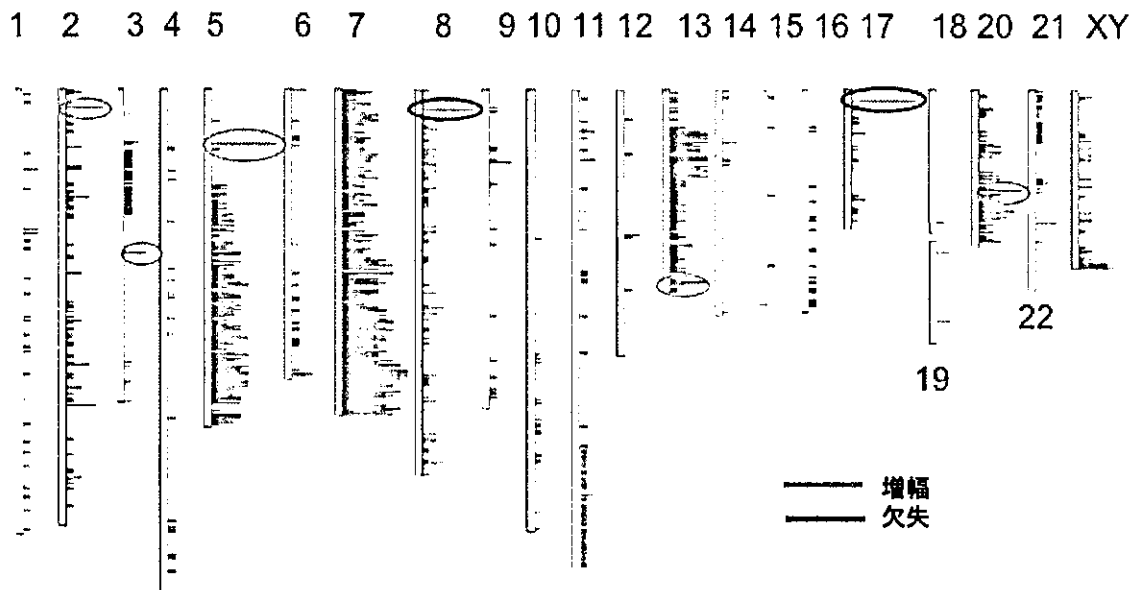
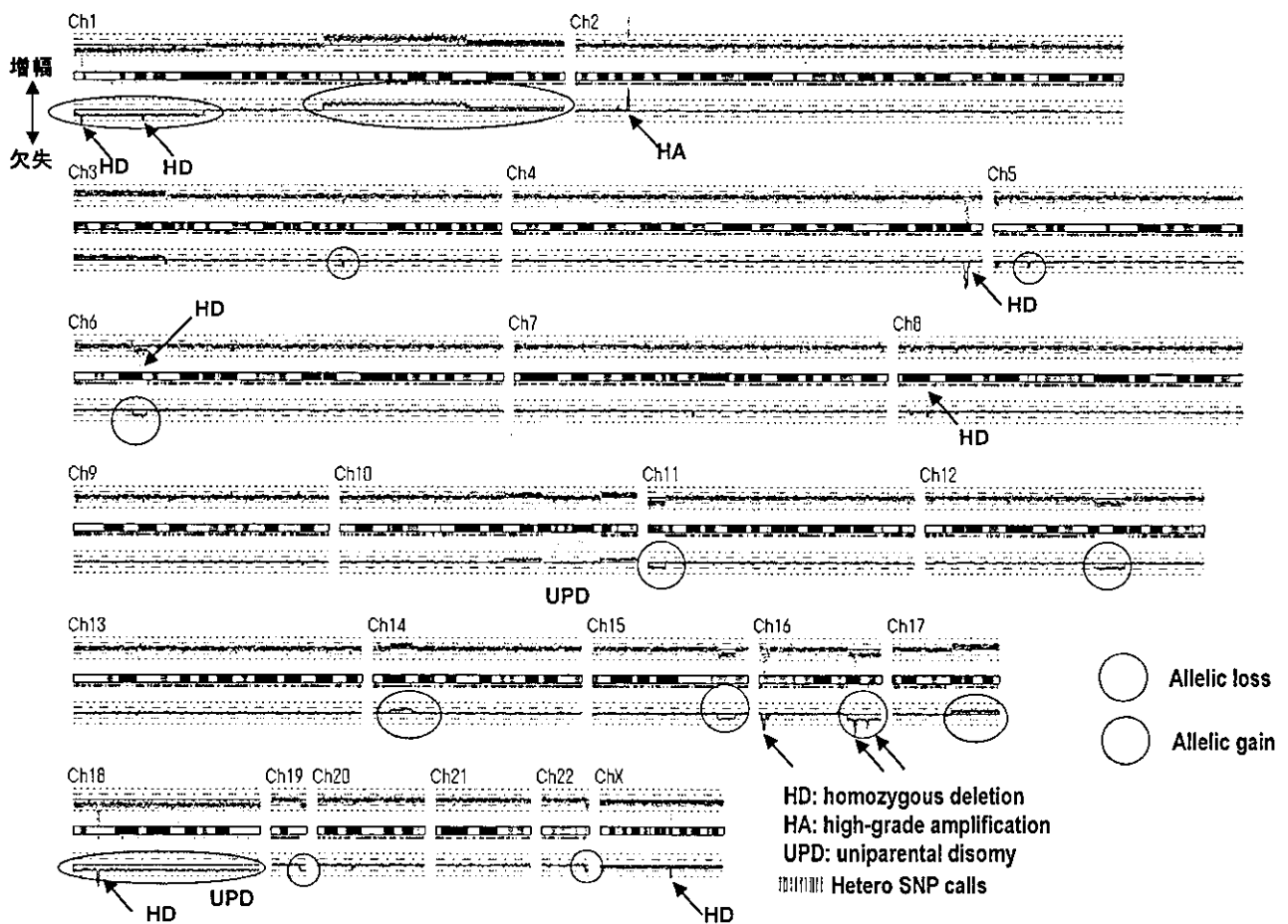


図4 Affymetrix GeneChipとCNAGを用いた超高解像度のコピー数解析

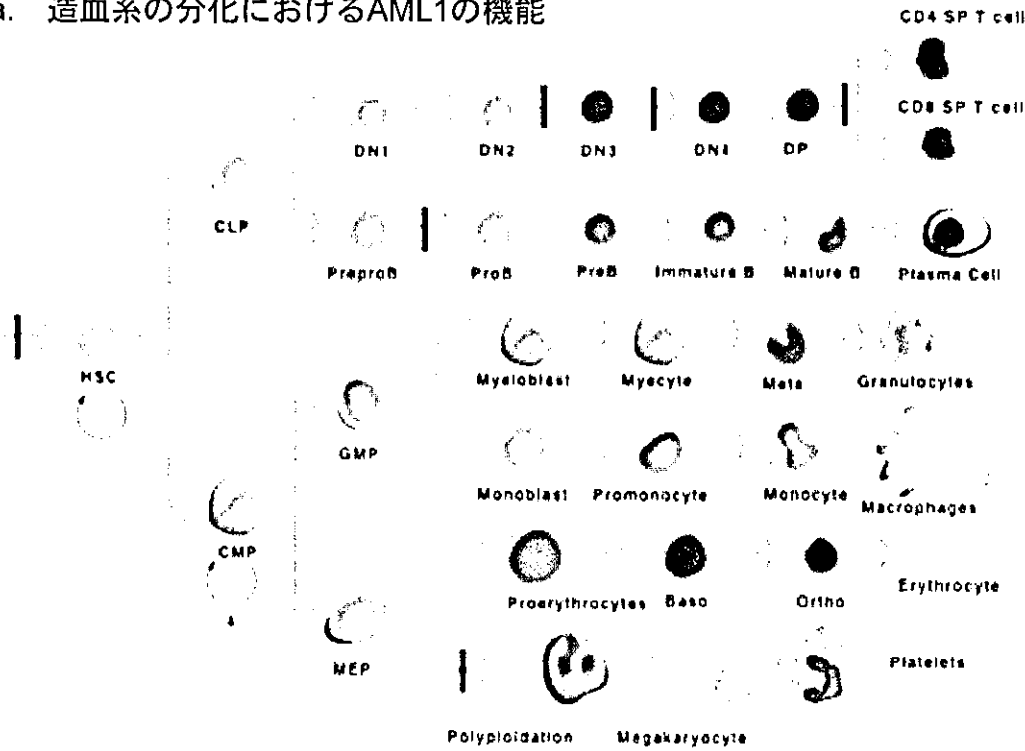


116,402個のSNP特異的プローブを搭載するGeneChipと独自の解析ソフトウェアを用いることにより、腫瘍ゲノムの超高解像度(23.6kb)のコピー数解析および高密度のLOH解析が可能となった。

図5 成体造血におけるAML1の機能

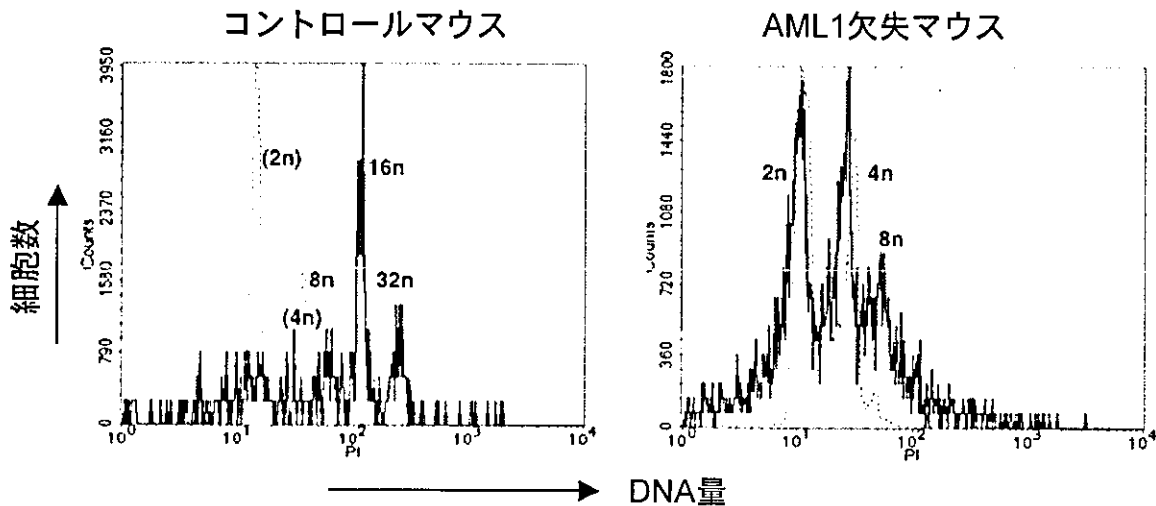
AML1は胎生期における成体型造血の発生に必須な造血のマスター遺伝子の一つであって、MDSの10-25%で変異を認めることが明らかにされている。  
 AML1を欠失したマウスの観察からは、本遺伝子が成体造血における造血幹細胞の維持には必須ではないが、血小板・リンパ球の産生には不可欠であることが示される(a)。巨核球は小型でploidyが低く、多倍体の障害を認める(b)。これらの一連の所見はMDSが造血幹細胞に由来するクローン性疾患であるにも関わらず、一般にリンパ球へのクローンの寄与が確認されないこと、またMDSの特徴である微小巨核球などの形態異常、といったMDSの病態をよく説明する。

a. 造血系の分化におけるAML1の機能



AML1の欠失により障害をうけることが判明したステップ

b. AML1欠失マウスに認められた巨核球における多倍体化の障害



## Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Ogawa S.	Molecular genetics of Myelodysplastic syndrome.		Educational Program Book: Japanese Society of Hematology and Japanese Society of Clinical Hematology	Japanese Society of Hematology and Japanese Society of Clinical Hematology	Japan (Kyoto)	2004	10-25

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Shimizu K, <u>Chiba S</u> , Saito T, Takahashi T, Kumano K, Hamada Y, <u>Hirai H</u> .	Integrity of intracellular domain of Notch ligand is indispensable for cleavage required for release of the Notch2 intracellular domain.	EMBO Journal	21	294-302	2002
Suzuki T, Nakamoto T, <u>Ogawa S</u> , Seo S, Matsumura T, Tachibana K, Morimoto C, <u>Hirai H</u> .	MICAL, a novel CasL interacting molecule, associates with vimentin.	Journal of Biological Chemistry	277	14933-14941	2002
Yamaguchi E, Chiba S, Kumano K, Kunisato A, Takahashi T, Takahashi T, <u>Hirai H</u> .	Expression of Notch ligands, Jagged 1, 2 and Delta1 in antigen presenting cells in mice.	Immunology Letters	81	59-64	2002
Nakamoto T, Suzuki T, J Huang, Matsumura T, Seo S, Honda H, Sakai R, <u>Hirai H</u> .	Analysis of gene expression profile in p130Cas-deficient fibroblasts.	Biochemical and Biophysical Research Communications	294	635-641	2002
<u>Ogawa S</u> , Hangaishi A, <u>Hirai H</u> .	Identificaiton of candidate tumor suppressor genes from critical deletions of long arm of chromosome 6 in hematopoietic neoplasm.	International Congress Series	1246	251-260	2002
Hangaishi A, <u>Ogawa S</u> , Qiao Y, Wang L, Hosoya N, Yuji K, Imai Y, Takeuchi K, Miyawaki S, <u>Hirai H</u> .	Mutations of Chk2 in primary hematopoietic neoplasms.	Blood	99	3075-3077	2002
Izutsu K, <u>Kurokawa M</u> , Imai Y, Ichikawa M, Asai T, Maki K, Mitani K, <u>Hirai H</u> .	The t(3;21) fusion product, AML1/Evi-1 blocks AML1-induced transactivation by recruiting CtBP.	Oncogene	21	2695-2703	2002
Imai Y, <u>Kurokawa M</u> , Izutsu K, Hangaishi A, Maki K, <u>Ogawa S</u> , Chiba S, Mitani K, <u>Hirai H</u> .	Mutational analyses of the AML1 gene in patients with myelodysplastic syndrome.	Leukemia& Lymphoma	43	617-621	2002
Takahashi T, Holland PWH, Cohn MJ, Shimizu K, <u>Kurokawa M</u> , <u>Hirai H</u> .	An orphan PRD class homeobox gene expressed in mouse brain and limb development.	Development Genes and Evolution	212	293-297	2002
Kunisato A, <u>Chiba S</u> , Yamaguchi E, Kumano K, Saito T, Masuda S, Yamaguchi T, Osawa M, Kageyama R, Nakauchi H, Nishikawa M, <u>Hirai H</u> .	HES-1 preserves purified hematopoietic stem cells ex vivo and accumulates side population cells in vivo.	Blood	101	1777-1783	2003



## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Wang L, <u>Ogawa S</u> , Hangaishi A, Qiao Y, Hosoya N, Nanya Y, Ohyashiki K, Mizoguchi H, <u>Hirai H</u> .	Molecular characterization of the recurrent unbalanced translocation der(1;7)(q10;p10).	Blood	102	2597-2604	2003
Qiao Y, <u>Ogawa S</u> , Hangaishi A, Yuji K, Izutsu K, Kunisato A, Imai Y, Wang L, Hosoya N, Nanya Y, Sato Y, Maki K, Mitani K, <u>Hirai H</u> .	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
Nakamura F, <u>Ogawa S</u> , Izutsu K, Imai Y, Maki K, Yamagata T, Mitani K, <u>Hirai H</u> .	Should young patients with e19a2 type BCR/ABL rearrangement undergo stem cell transplantation?	Leukemia& Lymphoma	44	381-382	2003
Kumano K, <u>Chiba S</u> , Kunisato A, Sata M, Saito T, Nakagami-Yamaguchi E, Yamaguchi T, Masuda S, Shimizu K, Takahashi T, <u>Ogawa S</u> , Hamada Y, <u>Hirai H</u> .	Notch1 but not Notch2 is essential for generating hematopoietic stem cells from endothelial cells.	Immunity	18	699-711	2003
Komeno Y, <u>Ogawa S</u> , Ishida T, Takeuchi K, Tsujino S, <u>Kurokawa M</u> , Aoki K, Kanda Y, <u>Chiba S</u> , Motokura T, Fukayama M, <u>Hirai H</u> .	Ischemic colitis as a manifestation of thrombotic microangiopathy following bone marrow transplantation.	Internal Medicine	42	1228-1232	2003
Kawazu M, Kanda Y, Goyama S, Takeshita M, Nanya Y, Niino M, Komeno Y, Nakamoto T, Kurokawa M, Tsujino S, <u>Ogawa S</u> , Aoki K, <u>Chiba S</u> , Motokura T, Ohishi N, <u>Hirai H</u> .	Rapid diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis by quantitative polymerase chain reaction using bronchial lavage fluid.	American Journal of Hematology	72	27-30	2003
Komeno Y, Kanda Y, Kandabashi K, Kawazu M, Goyama S, Takeshita M, Nanya Y, Niino M, Nakamoto T, Kurokawa M, Tsujino S, <u>Ogawa S</u> , Aoki K, <u>Chiba S</u> , Motokura T, <u>Hirai H</u> .	Reduced-intensity bone marrow transplantation from an alternative unrelated donor for myelodysplastic syndrome of first-donor origin.	American Journal of Hematology	72	220-222	2003
Hosoya N, <u>Ogawa S</u> , Motokura T, Hangaishi A, Wang L, Qiao Y, Nanya Y, Kogi M, <u>Hirai H</u> .	Molecular cytogenetic analyses of HIG, a novel human cell line carrying t(1;3)(p36.3;q25.3) established from a patient with chronic myelogenous leukemia in blastic crisis.	International Journal of Hematology	78	432-438	2003
Asano Y, Kanda Y, Ogawa N, Sakata-Yanaginoto M, Nakagawa M, Kawazu M, Goyama S, Kandabashi K, Izutsu K, Imai Y, Hangaishi A, <u>Kurokawa M</u> , Tsujino S, <u>Ogawa S</u> , Aoki K, <u>Chiba S</u> , Motokura T, <u>Hirai H</u> .	Male predominance among Japanese adult patients with late-onset hemorrhagic cystitis after hematopoietic stem cell transplantation.	Bone Marrow Transplantation	32	1175-1179	2003
Yamaguchi Y, Kurokawa M, Imai Y, Izutsu K, Asai T, Ichikawa M, Yamamoto G, Nitta E, Yamagata T, Sasaki K, Mitani K, <u>Ogawa S</u> , Chiba S, <u>Hirai H</u> .	AML1 is functionally regulated through p300-mediated acetylation on specific lysine residues.	Journal of Biological Chemistry	279	15630-15638	2004

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Ogawa N, Kanda Y, Matsubara M, Asano Y, Nakagawa M, Sakata-Yanagimoto M, Kandabashi K, Izutsu K, Imai Y, Hangaishi A, <u>Kurokawa M</u> , Tsujino S, <u>Ogawa S</u> , Aoki K, <u>Chiba S</u> , Motokura T, Hirai H.	Increased incidence of acute graft-versus-host disease with the continuous infusion of cyclosporine A compared to twice-daily infusion.	Bone Marrow Transplantation	33	549-552	2004
Ichikawa M, Asai T, Saito T, Yamamoto G, Seo S, Yamazaki I, Yamagata T, Mitani K, <u>Chiba S</u> , <u>Ogawa S</u> , <u>Kurokawa M</u> , Hirai H.	AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis.	Nature Medicine	10	299-304	2004
Ichikawa M, Asai T, <u>Chiba S</u> , <u>Kurokawa M</u> , <u>Ogawa S</u> .	Runx1/AML-1 ranks as a master regulator of adult hematopoiesis.	Cell Cycle	3	722-724	2004
Kawazu M, Kanda Y, Nannya Y, Aoki K, <u>Kurokawa M</u> , <u>Chiba S</u> , Motokura T, Hirai H, <u>Ogawa S</u> .	Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for galactomannan, and a (1->3)-beta-D-glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders.	Journal of Clinical Microbiology	42	2733-2741	2004
Goyama S, Yamaguchi Y, Imai Y, Kawazu M, Nakagawa M, Asai T, Kumano K, Mitani K, <u>Ogawa S</u> , <u>Chiba S</u> , <u>Kurokawa M</u> , Hirai H.	The transcriptionally active form of AML1 is required for hematopoietic rescue of the AML1-deficient embryonic para-aortic splanchnopleural (P-Sp) region.	Blood	104	3558-3564	2004
Imai Y, <u>Kurokawa M</u> , 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.	Molecular and Cellular Biology	24	1033-1043	2004
Maki K, Arai H, Waga K, Sasaki K, Nakamura F, Imai Y, <u>Kurokawa M</u> , Hirai H, Mitani K.	Leukemia-related transcription factor TEL is negatively regulated through extracellular signal-regulated kinase-induced phosphorylation.	Molecular and Cellular Biology	24	3227-3237	2004
Kunisato A, <u>Ogawa S</u> , <u>Chiba S</u> .	Dominant-negative activity of stem cell leukemia (SCL) lacking bHLH domain.	Blood	105	1365-1366	2005
Kawazu M, Asai T, Ichikawa M, Yamamoto G, Saito T, Goyama S, Mitani K, Miyazono K, <u>Chiba S</u> , <u>Ogawa S</u> , <u>Kurokawa M</u> , Hirai H.	Functional Domains of Runx1 Are Differentially Required for CD4 Repression, TCR {beta} Expression, and CD4/8 Double-Negative to CD4/8 Double-Positive Transition in Thymocyte Development.	The Journal of Immunology	174	3526-3533	2005
Hosoya N, Qiao Y, Hangaishi A, Wang L, Nannya Y, Sanada M, <u>Kurokawa M</u> , <u>Chiba S</u> , Hirai H, <u>Ogawa S</u> .	Identification of a SRC-like tyrosine kinase gene, FRK, fused with ETV6 in a patient with acute myelogenous leukemia carrying a t(6;12)(q21;p13) translocation.	Genes, Chromosomes & Cancer	42	269-279	2005

### Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷

# Molecular genetics of myelodysplastic syndrome

Seishi Ogawa

Department of Regeneration Medicine for Hematopoiesis,

Graduate School of Medicine, University of Tokyo

Myelodysplastic syndrome (MDS) is a constellation of bone marrow failure states characterized by a clonal expansion of abnormal hematopoietic progenitors, ineffective hematopoiesis, and frequent progression to acute myeloid leukemia (AML). Although pathogenesis of this intractable and mostly incurable disorder still remains to be fully understood, significant progress has been made to characterize molecular or

genetic abnormalities that explain pathogenesis of this syndrome, including mutations of *N-RAS*, *p53*, *AML1*, and other genes, translocations involving *MLL*, *Evi1*, and *TEL/ETV6* genes, and abnormally methylated *p15* gene. This review provides an overview of recent advances in the field of molecular genetics of the pathogenesis of MDS with its focus on genetic abnormalities.

## Introduction

Myelodysplastic syndrome (MDS) is a group of clonal myeloid disorders introduced into the FAB classification system to reorganize and reclassify 'refractory anemias' showing varying degrees of cytopenia with morphologic abnormalities in multiple blood components and a high predisposition to acute myeloid leukemia (AML)<sup>1</sup>, although it has been criticized that MDS contains heterogeneous groups of disorders having different clinical courses and pathogenesis<sup>2</sup>. In addition, it shows apparent overlaps with other bone marrow failure states, including aplastic anemia, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH), and myeloproliferative disorders (MPDs) in terms of responses to immunosuppressive therapies, appearance of PNH-positive blood cells, their clonality and cytogenetic profiles, and natural disease courses<sup>3</sup>. In boundary cases, therefore, some confusion may arise in differential diagnosis of these entities. In spite of these, however, common features of this syndrome are still evident in typical cases and consist of failure to produce mature blood components, clonal hematopoiesis, and a predisposition to AML, and currently it has been well established that a number of genetic alterations are involved in development of MDS. Although several other mechanisms have been also implicated in the pathogenesis of MDS, the primary roles of genetic alterations in this neoplastic disease should be underscored. In this review

major findings on these genetic abnormalities in MDS in recent years will be summarized.

## Clonality of MDS

Clonal hematopoiesis in MDS patients has been repeatedly tested using different methodologies<sup>4-7,8</sup>. Cytogenetic abnormalities are simple and reliable makers for evaluating clonality, but they may represent only specific subclones when it comes to multilineage contributions of the original MDS clone. Thus early studies on clonality in MDS by Fialkow et al., based on the hypothesis of random inactivation of X chromosomes, employed the polymorphism of G6PD protein in women genetically heterozygous for this locus<sup>5</sup>, and more recently, the polymorphism of the androgen receptor gene has been utilized for analyzing much larger numbers of women<sup>6,9</sup>, although several caveats should be still in mind<sup>10</sup>. With these methodologies, the clonal origins of granulocytes and erythroid progenitors have been unequivocally demonstrated for MDS. On the other hand, the clonal origin of lymphocytes remains controversial, where B lymphocytes are variably involved and T lymphocytes are usually not affected in MDS<sup>11</sup>. This may represent the fact that MDS is originated exclusively from a myeloid precursor or alternatively, the disease involves a pluripotent stem cell and makes it incapable of producing mature B and/or T lymphocytes. It is of special note, in view of therapeutic

Address correspondence to S. Ogawa, Department of Regeneration Medicine for Hematopoiesis, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan. Tel: +81-3-3815-5411; Fax: +81-3-5804-6261; E-mail: sogawa-tyk@umin.ac.jp