

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画期的治療法に関する研究

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 三谷 絹子

平成 17 (2005) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

- 骨髄異形成症候群に対する画期的治療法に関する研究
獨協医科大学・内科学（血液） 三谷 絹子…………… 1

II. 分担研究報告

1. AML1キメラを保有する骨髄異形成症候群に対するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の有効性の検討
獨協医科大学・内科学（血液） 三谷 絹子…………… 9
2. 骨髄異形成症候群における免疫抑制剤の作用機序に関する研究
京都大学医学部附属病院血液・腫瘍内科 内山 卓……………11
3. 骨髄異形成症候群に対する画期的治療法に関する研究
名古屋大学大学院医学系研究科分子細胞内科学 直江 知樹……………13
4. 骨髄異形成症候群 不応性貧血におけるビタミンK2単独療法ならびに
ビタミン K2とD3併用療法の有効性に関する検討 多施設共同臨床試験
—中間報告—
東京医科大学内科学第一講座 大屋敷 一馬 ……………15
5. 骨髄異形成症候群に対する画期的治療法に関する研究
広島大学原爆放射線医科学研究所 稲葉 俊哉……………17
6. プロテオミクスの手法を用いたMDS関連蛋白の同定
東京女子医科大学血液内科 寺村 正尚……………19
7. CGHアレイを用いたMDSの原因遺伝子の探索
東京大学医学部附属病院造血再生医療寄付講座 小川 誠司……………21

III. 研究成果の刊行に関する一覧表……………25

IV. 研究成果の刊行物・別刷……………29

I. 総括研究報告

骨髄異形成症候群に対する画期的治療法に関する研究

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)への進展を示す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画期的治療法の開発を目的として、(1) ゲノム・蛋白レベルでの MDS 原因遺伝子の網羅的探索、(2) 特異的遺伝子（転写因子遺伝子・キナーゼ遺伝子等）異常の解析により MDS の分子病態解明を推進し、(3) MDS モデルマウスを用いて新規分子標的療法の有効性を検討した。さらに、(4) 画期的治療法の開発のためにすでに実施済みの免疫抑制療法の治療成績を解析し、ビタミン K2 療法の臨床研究を施行した。(1)においては、ヒト全ゲノムにわたって平均 1Mb の解像度の Human 1M アレイの作成とこれを用いた MDS 検体のゲノム解析を行い、多数の微小な欠失や増幅を同定した。さらに、より高解像度の Affymetrix GeneChip を用いて、ゲノムコピー数の新規解析法の確立とその性能の検討を行った。また、長鎖 PCR 支援マイクロアレイ CGH 法により、7 番染色体長腕領域(7q)に存在する有力な候補遺伝子 TITAN (仮称) を単離した。一方、末梢血好中球を用いたプロテオーム解析により、MDS 特異的に高発現している蛋白を数種類同定した。(2)においては、AML1 遺伝子の点突然変異陽性例の 15% に SHP2 遺伝子の変異があることが明らかになった。このような症例ではイマチニブが有効である可能性が示唆された。また、MDS の原因遺伝子 TEL/Syk の下流では STAT5、MAP キナーゼおよび PI3 キナーゼ系のシグナル伝達分子が恒常的に活性化されていることが証明された。さらに、(3)として AML1 関連キメラを保有する白血病細胞株を NOD/SCID マウスに接種することにより病期進展 MDS および白血病モデルマウスを作製し、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の有効性について検討した。これらのマウスの生存は Trichostatin A の投与により延長する可能性が示唆された。(4)では、前班で実施された多施設共同研究「低リスク MDS に対するシクロスポリン療法」の治療成績がまとめられ、効果予測因子が解析された。FAB 分類で不応性貧血と診断された 17 名中 10 名でシクロスポリンの効果が認められたが、末梢血での PNH 型血球の存在と血小板を含む造血回復との間に有意な関連を認められた。また、「低リスク MDS に対するビタミン K2 療法」が進行中であるが、2004 年 12 月末までの中間報告として、ビタミン K2 の経口投与により 20%の症例（20 例中 4 例）で血球減少の改善が観察された。また、ビタミン K2 単独療法無効例に、さらにビタミン K2 と D3 とを併用することにより 8 例中 3 例で有効性が観察された。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まとめられた。

分担研究者

- | | |
|----------------------------------|----------------------------------|
| ・内山 卓
京都大学医学部
血液・腫瘍内科学 教授 | ・稲葉俊哉
広島大学
原爆放射線医科学研究所 教授 |
| ・直江 知樹
名古屋大学医学部
分子細胞内科学 教授 | ・寺村正尚
東京女子医科大学
血液内科学 講師 |
| ・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

骨髄異形成症候群（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はいるものの、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・蛋白の網羅的解析および特異的遺伝子の変異の解析により、MDS の病因や病態に深くかかわる分子を同定し、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。さらに、新規治療開発に直結する臨床試験を推進する。

B. 研究方法

(1) ゲノム・蛋白レベルでの MDS 原因遺伝子の網羅的探索

A. ゲノムレベルでの探索（小川、稲葉）

FISH 法によって特異的なヒト染色体座が確認されている約 3200 個の BAC クローン配置したアレイ（Human 1M アレイ）を大量に作製し、MDS 62 例を対象にゲノムコピー数の網羅的解析を行った。さらに、複数の症例において共通にコピー数の異常を認める領域を同定し、その領域内に存在する遺伝子を見出した。また、Affymetrix GeneChip は定量性の高い SNP タイピングが可能なシステムであることから、同アレイを用いて MDS を含む腫瘍ゲノムのコピー数を高精度に解析するアルゴリズムの確立を試みた。（小川）一方、プローブ長を 3-5kb に短縮した長鎖 PCR 支援マイクロアレイ CGH 法では数十 kb 程度の染色体微小欠損を検出することが可能であり、これを用いて 7q に存在する DNA の微小欠失領域の検出を試みた。（稲葉）

B. 蛋白レベルでの探索（寺村）

不応性貧血患者および正常人の末梢血好中球より蛋白を抽出した後、二次元電気泳動を行い両者の泳動パターンについて解析ソフト（Ettan progenesis）を用いて比較検討した。発現量に差が認められたスポットについて質量分析を行い、その蛋白を同定した。

(2) 特異的遺伝子の変異の解析（稲葉、直江）

MDS における SHP2 遺伝子の変異を解析し、AML1 遺伝子の変異との相関を検討した。（稲葉）また、新規にクローニングした赤芽球分化抑制因子 FKLIF-2 の遺伝子変異についても解析した。さらに、TEL/Syk

遺伝子の下流シグナルを明らかにした。（直江）

(3) モデルマウスを用いた新規分子標的療法の検討（三谷）

AML1 のキメラ型変異を有した細胞株（AML1/Evi-1、SKH-1; AML1/MTG8, Kasumi-1, SKNO-1; TEL/AML1, Reh）を種々のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤（Trichostatin A, Valproic acid, Butylate, Apicidin, Depudecin, Scriptaid, Sirtinol）存在下で培養し、その抗増殖効果を検討した。さらに、これらの細胞株を皮下接種して得た NOD/SCID マウスモデルに Trichostatin A (0.5mg/kg) および Valproic acid (300mg/kg) を連日皮下注射し、腫瘍形成時期、腫瘍増殖能、生存期間に関して解析を加えた。

(4) MDS の新規治療法の開発

前班で実施された多施設共同研究「低リスク MDS に対するシクロスポリン療法」の治療成績がまとめられ、効果予測因子が解析された。（内山）一方、「低リスク MDS に対するビタミン K2 療法」の多施設共同研究が継続され、中間成績がまとめられた。（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 日文部科学省・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・蛋白レベルでの MDS 原因遺伝子の網羅的探索

A. ゲノムレベルでの探索

Human 1M アレイにより、従来の染色体分析により繰り返し報告されてきた染色体セグメント単位での大きな異常に加えて、多数の微小な欠失や増幅が同定され、また、これらの多くが症例間で共通してコピー数の異常が認められることが明らかとなった。また、シグナル/ノイズ比が低く極めて精度の高い Affymetrix GeneChip 用コピー数解析プログラムを独自に構築した。同アレイでは、膨大な SNP の多型情報が同時に得られることから、単なるコピー数の変化ではなく、従来は全く不可能であったアレル別のコピー数の解析も可能となった。（小川）

長鎖 PCR 支援マイクロアレイ CGH 法を応用して 7q に存在することが確認される MDS の原因遺伝子の同定を試みた結果、3 症例と 1 細胞株で共通に微小欠失する部位を見出した。この共通微小欠失はただひとつの遺伝子を欠損させるため、この遺伝子を TITAN（仮称）と名づけた。（稲葉）

B. 蛋白レベルでの探索

不応性貧血患者と正常人の末梢血好中球由来の蛋白泳動パターンを解析ソフトで比較したところ、不応性貧血患者で明らかに高発現しているスポットが認められた。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、蛋白を数種同定した。そのうちの2つは CapG および Thiol-specific antioxidant protein (TSA)であった。(寺村)

(2) 特異的遺伝子の変異の解析

47例の8;21転座型AML中12例(25%)にc-Kitの変異が存在すること、AML1遺伝子の点突然変異を持つMDS34例中4例(12%)にSHP2遺伝子の変異があることを見出した。c-Kitの変異は全てキナーゼドメイン内にあり、11例がAsp816、1例のみAsn822の変異であった。c-Kitの変異を持った細胞株(Kasumi-1)や未治療の新患由来の骨髄単核球は、標準的な濃度のイマチニブにより細胞周期の停止やアポトーシスの抑制が認められた。また、SHP2の変異を持つ白血病細胞株の増殖は試験管内でイマチニブによって抑制された。(稲葉)

ヒト赤芽球に発現するzinc finger遺伝子として、ZFP29遺伝子とFKLF-2遺伝子をクローニングした。FKLF-2の二種類のgene-targeting vectorを構築し、順次細胞内に導入することで、FKLF-2-null MEL細胞を樹立した。その結果、FKLF-2は赤芽球の分化を抑制することを明らかにした。不応性貧血11症例についてFKLF-2遺伝子の変異の有無を検討したが、点突然変異は認められなかった。1例については、PCR増幅ができず、部分欠失の可能性も含めて解析中である。一方、t(9;12)(q22;p13)型MDSの原因遺伝子TEL/SykをIL-3依存性マウス白血病細胞株であるBaF3に導入すると、サイトカイン非依存性の増殖が可能になる。この細胞を用いてTEL/Sykの下流シグナルを解析したところ、STAT5、MAPキナーゼおよびPI3キナーゼ系のシグナル伝達分子に恒常的な活性化が見られ、これらが造血器腫瘍の発症に関連していると考えられた。(直江)

(3) モデルマウスを用いた新規分子標的療法の検討

AML1キメラ型変異を有した細胞株においては対照細胞株と比較して、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤存在下でより強く増殖の抑制が認められる傾向が観察された。また、AML1キメラ型細胞株をNOD/SCIDマウスに接種したところ、SKNO-1、Kasumi-1、SKH-1では接種部位に一致して腫瘍の形成を認めた。また、Rehは腸腰筋に浸潤し下肢の麻痺を引き起こした。これらの白血病モデルマウスにTrichostatin AあるいはValproic acidを投与したところ、腫瘍形成時期及び腫瘍増殖速度に関してはヒストン脱アセチル化酵素阻害剤投与群と非投与群で有意な差は認められなかった。しかし、生存期間に関しては、Kasumi-1、SKNO-1およびReh接種マウスにおいてTrichostatin A投与群で延長する傾向が認められた。(三谷)

(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」

治療研究結果として、24週のシクロスポリン(CSA)投与が可能であった18名中、血球回復を10名に認めた。FAB分類では18名中17名が不応性貧血に該当したため、本研究では不応性貧血患者に限っての解析を行った。PNH型血球陽性と判定された7名中5名で効果を認め、予測因子としての有効性が示された。CSA反応例のうち、血小板増加効果もしくは複数の血球系統の造血回復を認めた6例中5例でPNH型血球

陽性であったが、貧血の回復のみを認めた4例はすべてPNH型血球陰性であった。一方、本研究参加患者におけるDRB1 1501の頻度は日本人全体の集団より高かったものの、患者数の少なさによるものか有効例と無効例におけるDRB1 1501発現頻度に有意差を認めなかった。末梢血TCRレパトア解析ならびにスペクトル解析では、多くの患者で治療前にレパトアの偏りと複数のクローナルなT細胞増殖が確認され、無効例のみならず有効例においても治療後にその偏りは是正されていなかった。また、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も明らかではなかった。(内山)

B. 「低リスクMDSに対するビタミンK2療法」

2004年12月末までに、ビタミンK2単独療法に対して35例の症例登録があり、20例が評価対象例となった。

(他の8例が進行中(服用開始後16週未満)、7例は投与開始後8週未満の脱落例あるいは対象疾患外と判明したものである。) 大血液学的改善(major HI)3例を含む4例(20%)に有効性を認めた。また、ビタミンK2単独無効の16例中13例で二次登録が行われ、ビタミンK2+D3併用療法に移行した。内8例が評価対象例となり(他の3例が進行中、2例が脱落例)、8例中3例に血球減少改善効果を認めた。有害事象はVK2単独投与にて1例に上腹部不快感(grade I)を、ビタミンK2+D3併用投与にて1例に皮疹(grade I)を認めたのみであった。(大屋敦)

D. 考察

(1) ゲノム・蛋白レベルでのMDS原因遺伝子の網羅的探索

MDSには5q-、7q-あるいは20q-等の染色体部分欠失が高頻度に観察され、これらの欠失部位にはMDS発症に関与するがん抑制遺伝子が存在すると考えられる。しかしながら、長い間その責任遺伝子は同定されていない。Human 1Mアレイを用いた網羅的ゲノムコピー数の解析により、多数の微小な欠失や増幅が同定された。さらに、新たにAffymetrix社のアレイを用いた解析法を確立したことにより、非常に微細なゲノムコピー数の解析が可能となり、最小3.8kbの欠失まで確認されている。これらの新技術により、責任遺伝子への到達が効率化されることが期待される。一方、長鎖PCR支援マイクロアレイCGH法により7q-の候補遺伝子TITANが同定され、MDSの中でも予後不良群とされる7q-陽性例の分子病態が解明される可能性がある。

プロテオーム解析では、MDS好中球で特異的に高発現しているCap GおよびThiol-specific antioxidant proteinが同定された。前者は好中球遊走能に関与しており、後者は活性酸素種(ROS)消去に重要な役割を担っている。MDSに特徴的な高発現蛋白の同定は、新たな診断法および治療法の開発に有効であると考えられる。

(2) 特異的遺伝子の変異の解析

転写因子遺伝子およびキナーゼ遺伝子の変異はMDSで観察される代表的な遺伝子変異である。これらの遺伝子変異の解析はMDSの分子病態の解明に重要であり、かつ、これらの変異によって変化するシグナルを同定することは分子標的療法の開発に直結する。本年

度の検討では、AML1 遺伝子変異陽性例の一部にチロシンホスファターゼ遺伝子 SHP2 の変異が観察されることが明らかになった。しかも、in vitro の検討では、これらの症例にイマチニブが有効である可能性が示唆された。一方、MDS の原因遺伝子産物 TEL/Syk では非受容体型チロシンキナーゼ Syk が恒常的に活性化されていることが知られているが、今回の検討で STAT5、MAP キナーゼおよび PI3 キナーゼがその下流に存在することが明らかにされ、TEL/Syk 発現症例ではこれらのシグナルを対象とした分子標的療法が有効であると考えられた。

(3)モデルマウスを用いた新規分子標的療法の検討
NOD/SCID マウスを用いて AML1 キメラを発現する病期の進展した MDS モデルマウスを作製することが可能であることが明らかになった。しかも、これらのモデルマウスでは理論的に有効であると考えられたヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が抗腫瘍効果を発揮することが示唆され、分子標的療法の有効性を個体レベルで検証することが可能な系であると考えられた。今後 MDS 症例の primary cell を接種した MDS モデルマウスを作製し、転写制御異常を標的とした各種の分子標的療法の有効性を検討する予定である。

(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」

解析対象の患者数は限られたものの、CSA 反応例は PNH 型血球陰性で貧血のみの改善を認める群と、PNH 型血球陽性で血小板を含む複数の血球系列の反応を認める群に大別されることが示唆された。一方、TCR レパトアならびにスペクトル解析から、CSA の作用機序は T 細胞レパトアの異常を正すのではなく、T 細胞の障害活性の抑制にあることが示唆された。CSA 有効例の多くは CSA 依存性であるという臨床的事実もこの仮説を支持すると考えられた。

B. 「低リスク MDS に対するビタミン K2 療法」

約 20% の症例でビタミン K2 単独投与により血球減少に改善効果があり、その効果は貧血の改善のみにとどまらず、好中球数および血小板数の上昇も観察された。また、現在評価対象症例は少数ながらも、ビタミン K2 無効例に D3 製剤を上乗せすることにより、血球減少の改善する症例も観察された。これにより、ビタミン K2+D3 同時併用療法により、その有効性が增强することが示唆された。

E. 結論

MDS の画期的分子標的療法の開発を目的として、ゲノム異常・蛋白異常の網羅的探索と特異的遺伝子の変異の解析を行い、MDS の病因・病態に関与する候補分子の同定に成功した。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、これは候補分子標的薬の個体レベルでのスクリーニングに有用な系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、「低リスク MDS に対するシクロスポリン療法」の臨床試験の成績がまとめられ、治療効果予測因子が抽出された。また、「低リスク MDS に対するビタミン K2 療法」の臨床試験が進行中であり、VK2 単独療法および VK2+D3 併用療法は安全性が高く、不応性貧血症例に血球減少改善効果が存在するこ

とが検証されつつある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 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* 10: 299-304, 2004 (Author list corrected in Erratum, *Nat Med* 11:102, 2005)
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* 24: 3227-3237, 2004
3. Mitani K. Molecular mechanisms of leukemogenesis by AML1/EVI-1. *Oncogene* 23: 4263-4269, 2004
4. Sasaki K, Nakamura Y, Maki K, Waga K, Nakamura F, Arai H, Imai Y, Hirai H, Mitani K. Functional analysis of a dominant-negative Δ ETS TEL/ETV6 isoform. *Biochem Biophys Res Commun* 317: 1128-1137, 2004
5. Mitsuma A, Asano H, Kinoshita T, Murate T, Saito H, Stamatoyannopoulos G, Naoe T. Transcriptional regulation of FKLf-2 (KLF13) gene in erythroid cells. *Biochimica et biophysica Acta* 1727: 125-133, 2005
6. Asano H, Murate T, Naoe T, Saito H, Stamatoyannopoulos G. Molecular cloning and characterization of ZFF29: a protein containing a unique Cys2His2 zinc-finger motif. *Biochem J* 384: 647-653, 2004
7. Abe A, Emi N, Kanie T, Imagama S, Kuno Y, Takahashi M, Saito H, Naoe T. Expression cloning of oligomerization-activated genes with cell-proliferating potency by pseudotype retrovirus vector. *Biochem Biophys Res Commun* 320: 920-926, 2004
8. Kanie T, Abe A, Matsuda T, Kuno Y, Towatari M, Yamamoto T, Saito H, Emi N, Naoe T. TEL-Syk fusion constitutively activates PI3-K/Akt, MAPK and JAK2-independent STAT5 signal pathways. *Leukemia* 18: 548-555, 2004
9. Harada H, Harada Y, Niimi H, Kyo T, Kimura A, Inaba T. High incidence of somatic mutations in the AML1/ RUNX1 gene in myelodysplastic syndrome and low blast percentage myeloid leukemia with myelodysplasia. *Blood* 103: 2316-2324, 2004
10. Matsunaga T, Inaba T, Matsui H, Okuya M, Kinoshita T, Miyajima A, Funabiki T, Endo M,

Inukai T, Look AT, Kurosawa H. Regulation of annexin II by cytokine-initiated signaling pathways and E2A-HLF oncoprotein. *Blood* 103: 3185-3191, 2004

11. Kuribara R, Honda H, Matsui H, Shinjo T, Inukai T, Sugita K, Nakazawa S, Hirai H, Ozawa K, Inaba T. Roles of Bim in apoptosis of normal and Bcr-Abl-expressing hematopoietic progenitors. *Mol Cell Biol* 24: 6172-6183, 2004

12. Inukai T, Inaba T, Dang J, Kuribara R, Ozawa K, Miyajima A, Wu W, Look AT, Arinobu Y, Iwasaki H, Akashi K, Kagami K, Goi K, Sugita K, Nakazawa S. TEF, an anti-apoptotic bZIP transcription factor related to the oncogenic E2A-HLF chimera, inhibits cell growth by downregulating expression of the common β chain of cytokine receptors. *Blood* (in press)

13. Yokoyama T, Miyazawa K, Yoshida T, Ohyashiki K. Combination of vitamin K2 plus imatinib mesylate enhances induction of apoptosis in small cell lung cancer cell lines. *Int J Oncol* 26: 33-40, 2005

14. Yokoyama T, Miyazawa K, Kurakawa E, Nagate A, Shimamoto T, Iwaya K, Akata S, Aoshima M, Serizawa H, Ohyashiki K. Interstitial pneumonia induced by imatinib mesylate: pathologic study demonstrates alveolar destruction and fibrosis with eosinophilic infiltration. *Leukemia* 18: 645-646, 2004

15. Okabe S, Fukuda S, Kim YJ, Niki M, Pelus LM, Ohyashiki K, Pandolfi PP, Broxmeyer HE. Stromal cell-derived factor-1 α /CL12-induced chemotaxis of T cells involves activation of the RasGAP-associated docking protein p62Dok-1. *Blood* 105: 474-480, 2004

16. Sumi M, Tauchi T, Sashida G, Nakajima A, Gotoh A, Shin-Ya K, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. A G-quadruplex-interactive agent, telomestatin (SOT-095), induces telomere shortening with apoptosis and enhances chemosensitivity in acute myeloid leukemia. *Int J Oncol* 24: 1481-1487, 2004

17. Hosoya N, Qiao Y, Hangaishi A, Wang L, Nannya Y, Sanada S, 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, 2004

18. 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許申請：特願2003-206534

「癌遺伝子の探索方法」

出願日：平成15年8月7日

Affymetrix GeneChip 用コピー数解析プログラム
CNAG (Copy Number Analyzer for Affymetrix®
GeneChip® Mapping 100K arrays;特許出願予定)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告

AML1 キメラを保有する骨髓異形成症候群に対する ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の有効性の検討

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

AML1/Evi-1 は骨髓異形成症候群の進展に関与するキメラ遺伝子産物であり、ヒストン脱アセチル化酵素リクルートによる野生型 AML1 に対するドミナント・ネガティブ効果とその作用機序のひとつであることが知られている。そこで、AML1 キメラを発現する白血病細胞株（AML1/Evi-1, SKH-1; AML1/MTG8, Kasumi-1, SKNO-1; TEL/AML1, Reh）の増殖に対するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の有効性について検討した。in vitro の培養系では各種のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が容量依存性にこれらの細胞株の増殖を抑制した。さらに、これらの細胞株を NOD/SCID マウスに皮下接種し白血病モデルを得たが、Trichostatin A はマウスの白血病発症には影響しなかったが、生存を延長させる可能性が示唆された。一部の進展期骨髓異形成症候群にヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が有効であると考えられた。

A. 研究目的

転写因子遺伝子 AML1 は骨髓異形成症候群（MDS）において転座型変異および点突然変異が見い出されている。MDS に観察される転座型 AML1 キメラは AML1/Evi-1 であるが、de novo 白血病で観察される AML1 キメラの AML1/MTG8 および TEL/AML1 と同様に、コリプレッサーを介してヒストン脱アセチル化酵素をリクルートし、野生型 AML1 に対してドミナント・ネガティブ効果を発揮することが腫瘍化の本質であると考えられている。本年度は、AML1 キメラ型腫瘍に対する種々のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の抗腫瘍効果を in vitro および in vivo で解析し、MDS に対する治療薬としてのヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の可能性を検討した。

B. 研究方法

(1) in vitro の解析：AML1 のキメラ型変異を有した細胞株（AML1/Evi-1, SKH-1; AML1/MTG8, Kasumi-1, SKNO-1; TEL/AML1, Reh）を種々のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤（Trichostatin A, Valproic acid, Butylate, Apicidin, Depudecin, Scriptaid, Sirtinol）存在下で培養し、その抗増殖効果を検討した。さらに、この効果を AML1 のキメラ型変異を有しない細胞株（U937, K562, HL60, BALL1）と比較した。(2) in vivo の解析：上記の AML1 キメラ細胞株を NOD/SCID マウスに接種し腫瘍を形成させ、白血病モデルマウスを複製した。さらに、このモデルマウスに Trichostatin A（0.5mg/kg）および Valproic acid（300mg/kg）を連日皮下注し、腫瘍形成時期、腫瘍増殖能、生存期間に関して解析を加えた。

C. 研究結果

(1) AML1 キメラ型変異を有した細胞株においては対照細胞株と比較して、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤存在下でより強く増殖の抑制が認められる傾向が観察された。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の薬理学的効果はヒストン 4 のアセチル化状態の亢進により確認された。(2) AML1 キメラ型細胞株を NOD/SCID マウスに接種したところ、SKNO-1 細胞では day 13~22、Kasumi-1 細胞では day 17~21、SKH-1 細胞では day 10~13 に接種部位に一致して腫瘍の形成を認めた。また、Reh 細胞は腸腰筋に浸潤し、接種後 day 29~35 に下肢の麻痺を引き起こした。これらの白血病モデルマウスに Trichostatin A あるいは Valproic acid を投与したところ、腫瘍形成時期に関してはヒストン脱アセチル化酵素阻害剤投与群と非投与群で有意な差は認められなかった。また、腫瘍の増殖能についても有意な差は認められなかった。一方、生存期間に関しては、Kasumi-1、SKNO-1 および Reh 接種マウスにおいて Trichostatin A 投与群で延長する傾向が認められた。いずれのマウスにおいても Valproic acid 投与に伴う延長傾向は観察されなかった。

D. 考察

今回の解析により、AML1 キメラ型腫瘍に対してヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が有効である可能性が示唆された。このことは AML1 の機能的失活が MDS の進展に重要な役割を果たしていることを示唆しており、病期の進展した MDS に AML1 遺伝子の点突然変異が高頻度に観察されるという報告に合致する。しかしながら、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が AML1 のいかなる標的遺伝子の発現を回復させ、その抗腫瘍効果を発揮するのかわからない。今後 primary

cell を用いて同様のモデルを作製し、各種の転写制御異常を標的とした分子標的療法の有効性について検討する予定である。

E. 結論

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は一部の病期の進展した MDS 症例の治療薬として有望であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. 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* 10: 299-304, 2004 (Author list corrected in Erratum, *Nat Med* 11:102, 2005)

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* 24: 3227-3237, 2004

3. Mitani K. Molecular mechanisms of leukemogenesis by AML1/EVI-1. *Oncogene* 23: 4263-4269, 2004

4. Sasaki K, Nakamura Y, Maki K, Waga K, Nakamura F, Arai H, Imai Y, Hirai H, Mitani K. Functional analysis of a dominant-negative Δ ETS TEL/ETV6 isoform. *Biochem Biophys Res Comm* 317: 1128-1137, 2004

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
いずれも予定なし

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

低リスク群骨髄異形成症候群患者（MDS）においては白血病移行とともに造血不全が予後を左右する。一部の低リスク MDS 患者に免疫抑制療法が有効であることが知られているが、免疫抑制療法非反応例において重篤な有害事象発生の危険が高く、作用機序の解明を通じた治療前的確な効果予測、至適な免疫抑制剤の選択が求められている。小峰班による前向き臨床試験において、FAB 分類で refractory anemia と診断された 17 名中 10 名で CSA の効果が認められたが、末梢血での PNH 型血球の存在と血小板を含む造血回復との間に有意な関連を認めた。一方、貧血の回復のみを認めた患者における効果予測因子は明らかにできなかった。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たものの、反応例、無効例ともに治療後にもその改善は見られなかった。多くの低リスク MDS 患者、特に FAB 分類で RA に該当する患者の造血不全に免疫学的機序の関与が示唆され、CSA は T 細胞による造血障害を可逆的に抑制する可能性が考えられた。

A. 研究目的

低リスク群骨髄異形成症候群患者（MDS）においては白血病移行とともに造血不全が予後を左右する。一部の低リスク MDS 患者に、再生不良性貧血に準じたシクロスポリンや抗胸腺細胞グロブリンを用いた免疫抑制療法が有効であることが知られているが、その作用機序は明らかでない。また、免疫抑制療法非反応例においては重篤な有害事象発生の危険が高く、治療前的確な効果予測、ならびに至適な免疫抑制剤の選択が求められている。本研究は免疫抑制療法の作用機序の解析を通してこれらの課題の解決をはかるとともに、新たな免疫抑制療法の開発を目指すことを目的とする。

B. 研究方法

特発性造血障害に関する研究班（小峰班）の低リスク MDS に対するシクロスポリン（CSA）療法に参加され、作用機序解析研究参加の同意を得た患者 21 名の末梢血を用いて 1) フローサイトメトリー法を用いた PNH 型血球の検索（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) microplate hybridization assay 法による HLA 群遺伝子解析、3) microplate hybridization assay 法による T 細胞受容体（TCR）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い、治療成績との関連を検討した

（倫理面での配慮）

本研究は遺伝子解析研究を含むため、検体採取にあたっては参加各施設の施設内審査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

治療研究結果として、24 週の CSA 投与が可能であった 18 名中、血球回復を 10 名に認めた。FAB 分類では 18 名中 17 名が refractory anemia (RA) に該当したため、本研究では FAB RA 患者に限っての解析を行った。血液生化学所見など一般的な臨床所見から CSA 有効例の特徴を抽出することは困難であったが、PNH 型血球陽性と判定された 7 名中 5 名で効果を認め、予測因子としての有効性が示された。さらに、CSA 反応例のうち、血小板増加効果もしくは複数の血球系統の造血回復を認めた 6 例中 5 例で PNH 型血球陽性であった一方で、貧血の回復のみを認めた 4 例すべて PNH 血球陰性であった。骨髄不全症候群における免疫抑制療法の予測因子として HLA DRB1 1501 が知られているが、本研究参加患者における DRB1 1501 の頻度は日本人全体の集団より高かったものの、患者数の少なさによるものか有効例と無効例における DRB1 1501 発現頻度に有意差を認めなかった。末梢血 TCR レパトア解析ならびにスペクトル解析では、多くの患者で治療前にレパトアの偏りと複数のクローナルな T 細胞増殖が確認され、無効例のみならず有効例においても治療後にその偏りは是正されていなかった。また、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も明らかでなかった。

D. 考察

解析対象の患者数は限られたものの、PNH 血球という観点から見たとき、CSA 反応例は PNH 型血球陰性で貧血のみの改善を認める群と、PNH 血球陽性で血小板を含む複数の血球系列の反応を認める群に大別されることが示唆された。前者における治療効果の予測因子は本研究においても抽出されず、今後の検討が必要である。一

方、TCR レパトアならびにスペクトル解析からは、抗胸腺グロブリンと異なり、CSA の作用機序は T 細胞レパトアの異常を正すのではなく、T 細胞の障害活性の抑制にあることが示唆された。CSA 有効例の多くは CSA 依存性であるという臨床的事実もこの仮説を支持する

E. 結論

多くの低リスク MDS 患者、特に FAB 分類で RA に該当する患者の造血不全の発症に、単一ではない免疫学的機序が関与することが示唆された。CSA は T 細胞による造血障害を抑制することにより造血回復効果を発揮することが考えられた。

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

1. 特許取得
 2. 実用新案登録
 3. その他
- いずれも予定なし

骨髄異形成症候群に対する画期的治療法に関する研究

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

MDSにおける分子異常の標的遺伝子群を明らかにする目的で研究を進めた。(1) 赤芽球系の分化に関わる転写因子 FKLF-2 をクローニングし、その異常が MDS の病態形成に関与している可能性について検討した。(2) MDS の進展期に認められたキメラ遺伝子 TEL-Syk が恒常的シグナル伝達に関わることを明らかにした。(3) FHIT および p15 遺伝子メチル化が、MDS 検体における CD34 陽性細胞分画にも及んでいるが、両者のメチル化細胞集団は一致しないことを明らかにした。

A. 研究目的

骨髄異形成症候群(MDS)は、造血におけるクローン性増殖と無効造血という二面性を有する疾患群であり、その本質的な病態や標的遺伝子はほとんど解明されていない。本年度は以下 3 点を目標とした。(1) 貧血をその主要な症状とする不応性貧血(RA)を対象疾患として、その病態形成に赤血球分化関連因子の関与を想定して研究を進める。(2) MDS 進展期に認められたキメラ遺伝子の意義を解析するとともに、増殖関連の新しいキナーゼ変異のクローニング系を確立する。(3) MDS におけるがん抑制遺伝子のメチル化の意義について解析する。

B. 研究方法

C. 研究結果

(1) ヒト赤芽球細胞に発現する zinc finger 遺伝子として、ZFF29 遺伝子と FKLF-2 遺伝子をクローニングした。FKLF-2(KLF13)の赤血球系細胞における転写制御機構を明らかにするため、転写調節領域 DNA のクローニングとプロモーター解析を行った。GATA-1 による FKLF-2 遺伝子の転写調節は、赤芽球細胞では抑制的に、繊維芽細胞では活性化に働いた。FKLF-2 は常染色体上の遺伝子であるため二種類の gene-targeting vector を構築し、順次細胞内に導入することで、FKLF-2-null MEL 細胞を樹立した。FKLF-2 は赤血球系細胞の分化を抑制することを明らかにした。MDS RA の病態形成に FKLF-2 遺伝子の関与していることを想定して MDS (RA)11 症例について FKLF-2 遺伝子配列について調べた。検討可能であった 9 症例で点突然変異は認められなかった。1 例については、PCR 増幅ができず、部分欠失の可能性も含めて解析中である。

(2) TEL/SYK 融合遺伝子は t(9;12) (q22; p13) 転座を有する MDS 症例から得られた融合遺伝子である。TEL/SYK 融合タンパクにおいては TEL の PNT 領域を介した会合により SYK のチロシンキナーゼに恒常的な活性化が生じており、この融合遺伝子を IL-3 依存性マウス白血病細胞

株である BaF3 に導入すると、サイトカイン非依存性の増殖が可能になった。この細胞を用いてその下流のシグナルを解析したところ、STAT5、MAP キナーゼおよび PI3 キナーゼ系のシグナル伝達分子に恒常的な活性化が見られ、これらが造血器腫瘍の発症に関連していると考えられた。このデータにヒントを得て、TEL の下流に cDNA を組み込み、TEL との融合で活性化すると 32D 細胞株をトランスフォームするキナーゼ群のクローニング法を開発した。

(3) 骨髄異形成症候群(MDS)の発症、進展に関与する分子機構を解明するために、FHIT 遺伝子のメチル化について、p15 遺伝子のメチル化と同時に検討した。MDS40 例中 22 例(55.0%)に FHIT 遺伝子の、12 例(30%)に p15 遺伝子のメチル化を認め、病期の進行とともにメチル化の頻度、密度ともに増加傾向を示したが、両者に相関は認めなかった。また、10 例の MDS 症例において、CD34 陽性分画と陰性分画におけるメチル化を比較したところ、FHIT 遺伝子のメチル化は 4 例で両者に差はないものの、3 例で CD34 陽性分画に強く、3 例で陰性分画に強く認めた。しかし、p15 遺伝子のメチル化は全例で差を認めなかった。

(倫理面への配慮)

検討に用いた検体は、全て、診療上必要な臨床検査のために採取した残余で、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。

D. 考察

これまでのところ MDS (RA) 検体に FKLF-2 変異は検出されていないが、FKLF-2 の過剰発現が赤血球の分化障害を引き起こす可能性は残っており、FKLF-2 の発現レベルの解析が今後の課題である。一方 ZFF29 に関してはヒト胎生期グロビン遺伝子の活性化能を明らかにしており、ZFF29 遺伝子についても変異や発現異常を MDS 患者検体で調べる予定である。

MDS の進展に伴い、N-RAS や FLT3 が活性化変異をきたすことが知られているが、我々は、

今回 TEL とのキメラにより活性化するチロシンキナーゼ Syk をクローニングした。今後、新たな発現クローニング法で転座によらず活性化したキナーゼ遺伝子の発現クローニングを行う予定である。

我々は昨年までに、FHIT の遺伝子メチル化は比較的 MDS に特徴的であり、その進展に関与することを示してきた。今回、メチル化程度を CD34 陽性・陰性分画にわけて解析し、FHIT および p15 の癌抑制遺伝子メチル化は、MDS 検体における CD34 陽性細胞分画にも及んでいるが、両者のメチル化細胞集団は一致しないことを明らかにした。

今後、骨髄系・赤芽球系の分化に関わる転写因子群ならびに転写調節複合体の変異・発現異常が MDS の病態形成に関与している可能性、ならびに新しいキナーゼ変異が MDS の進展に関与する可能性を探索し、画期的な新規治療の開発に結び付けたいと考えている。

E. 結論

(1) 赤芽球系の分化に関わる転写因子 FKLF-2 をクローニングし、その異常が MDS の病態形成に関与している可能性について検討した。

(2) MDS の進展期に認められたキメラ遺伝子 TEL-Syk が恒常的シグナル伝達に関わることを明らかにした。

(3) FHIT および p15 遺伝子メチル化が MDS 検体における CD34 陽性細胞分画にも及んでいるが、両者のメチル化細胞集団は異なることを示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Mitsuma A, Asano H, Kinoshita T, Murate T, Saito H, Stamatoyannopoulos G, Naoe T. Transcriptional regulation of FKLF-2 (KLF13) gene in erythroid cells. *Biochimica et biophysica Acta* 1727: 125-133, 2005
2. Asano H, Murate T, Naoe T, Saito H, Stamatoyannopoulos G. Molecular cloning and characterization of ZFF29: a protein containing a unique Cys2His2 zinc-finger motif. *Biochem J* 384: 647-653, 2004
3. Abe A, Emi N, Kanie T, Imagama S, Kuno Y, Takahashi M, Saito H, Naoe T. Expression cloning of oligomerization-activated genes with cell-proliferating potency by pseudo-type retrovirus vector. *Biochem Biophys Res Commun* 320: 920-926, 2004
4. Kanie T, Abe A, Matsuda T, Kuno Y, Towatari M, Yamamoto T, Saito H, Emi N, Naoe T. TEL-Syk fusion constitutively activates PI3-K/Akt, MAPK and JAK2-independent STAT5 signal pathways. *Leukemia* 18: 548-555, 2004

学会発表

浅野治彦、村手隆、直江知樹。内因性グロビン遺伝子の発現を活性化する新規 zinc finger 蛋白。第 66 回日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会総会 *臨床血液* 45: 180, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許申請：特願 2003-206534

「癌遺伝子の探索方法」

出願日：平成 15 年 8 月 7 日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

骨髓異形成症候群 不応性貧血におけるビタミン K2 単独療法ならびに
ビタミン K2 と D3 併用療法の有効性に関する検討
多施設共同臨床試験—中間報告—

分担研究者 大屋敷一馬 東京医科大学 内科学第一講座 主任教授

研究要旨

不応性貧血を対象に、ビタミン K2(以下 VK2)による血球減少の改善効果を検証する多施設共同臨床試験が現在進行中である。2004 年 12 月末までの中間報告として、VK2 の経口投与により 20%の症例 (20 例中 4 例) で血球減少の改善が観察された。また、VK2 単独療法で無効例に、さらに VK2 と D3 とを併用することにより 8 例中 3 例で有効性が観察された。

A. 研究目的

本邦で骨粗鬆症の治療薬として使用されている経口ビタミン K2 製剤 (以下 VK2) が、白血病症例における芽球の減少や MDS 不応性貧血 (RA) における血球減少に有効であることが散発的に国内の施設より報告されている。本多施設共同プロスペクティブ試験は、RA 症例における VK2 の血球減少の改善効果を、より客観的に検証することを目的とする。また、VK2 単剤投与による無効例に対しては、ビタミン D3 (以下 D3) をさらに追加投与し、VK2 と D3 併用による有効性増強の有無を検討することを secondary endpoint とする。

B. 研究方法

対象：MDS RA (IPSS: low~int-1)、目標症例数：70 症例。

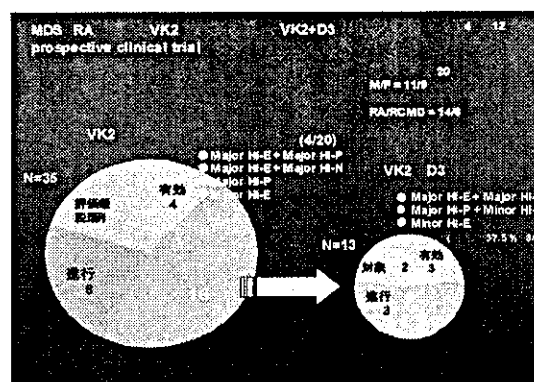
primary endpoint：臨床試験参加同意が得られた症例に対して一次登録を行い、適格例に対しては、まず VK2 製剤(グラケ- 45mg/day、po)の連日服用を行い、16 週後における血球減少の改善効果を International Working Group による Hematological Improvement (HI)の基準に従って評価する。

secondary endpoint：1) VK2 無効例には二次登録を行い、D3 製剤 (アルファロール 0.75µg/day、po) をさらに追加併用し、両ビタミン併用による 16 週目における血球減少の改善効果を検討する。また、2) VK2 単剤および VK2+D3 併用投与中の有害事象発生率、3) 血球減少改善効果の持続性、4) 染色体の核型変化の有無、5) PS 改善度、6) progression free survival を併せて評価する。

C. 研究結果

2004 年 12 月末までに、VK2 単独療法に対して 35 例の症例登録があり、20 例が評価対象例となった。(他の 8 例が進行中(服用開始後 16

週未満)、7 例は投与開始後 8 週未満の脱落例あるいは対象疾患外と判明したものである。)



major HI 3 例を含む 4 例 (20%) に有効性を認めた。また、VK2 単独無効の 16 例中 13 例で二次登録が行われ、VK2+D3 併用用法に移行。内 8 例が評価対象例となり (他の 3 例が進行中、2 例が脱落例)、8 例中 3 例に血球減少改善効果を認めた。

有害事象は VK2 単独投与にて 1 例に上部不快感 (grade I) を、VK2+D3 併用投与にて 1 例に皮疹 (grade I) を認めたのみであった。

D. 考察

約 20%の症例で VK2 単独投与により血球減少に改善効果が期待される。また、その効果は貧血の改善のみにとどまらず、好中球実数、血小板数の上昇も観察された。また、現在、評価対象症例は少数ながらも、VK2 無効例に D3 製剤を上乗せすることにより、血球減少の改善する症例も観察された。これより VK2+D3 同時併用療法により、その有効性が増強することが示唆された。

E. 結論

MDS RA における VK2 単独療法および VK2+D3 併用療法は極めて安全性が高く、血球減少に対する改善効果が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Yokoyama T, Miyazawa K, Yoshida T, Ohyashiki K. Combination of vitamin K2 plus imatinib mesylate enhances induction of apoptosis in small cell lung cancer cell lines. *Int J Oncol* 26: 33-40, 2005
2. Yokoyama T, Miyazawa K, Kurakawa E, Nagate A, Shimamoto T, Iwaya K, Akata S, Aoshima M, Serizawa H, Ohyashiki K. Interstitial pneumonia induced by imatinib mesylate: pathologic study demonstrates alveolar destruction and fibrosis with eosinophilic infiltration. *Leukemia* 18: 645-646, 2004
3. Okabe S, Fukuda S, Kim YJ, Niki M, Pelus LM, Ohyashiki K, Pandolfi PP, Broxmeyer HE. Stromal cell-derived factor-1alpha/ CL12-induced chemotaxis of T cells involves activation of the RasGAP-associated docking protein p62Dok-1. *Blood* 1105: 474-480, 2004
4. Sumi M, Tauchi T, Sashida G, Nakajima A, Gotoh A, Shin-Ya K, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. A G-quadruplex-interactive agent, telomestatin (SOT-095), induces telomere shortening with apoptosis and enhances chemosensitivity in acute myeloid leukemia. *Int J Oncol* 24: 1481-1487, 2004

学会発表

1. 井口具隆、宮澤啓介、船渡甲太郎、後藤明彦、大屋敷一馬。1-、25(OH)2-vitamin D3 と vitamin K2 による白血病細胞のアポトーシスと細胞分化の機序。第 66 回日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会総会 臨床血液 45: 814, 2004
2. 宮澤啓介、高久智生、張宇、後藤明彦、大屋敷一馬、大屋敷純子。ビタミン K2 と D3 併用による HL-60 の分化誘導に連動した抗アポトーシス効果:遺伝子発現プロファイル解析から。第 66 回日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会総会 臨床血液 45: 813, 2004
3. 指田吾郎、大屋敷純子、高久智生、本多聖子、石井裕子、田内哲三、大屋敷一馬。低リスク骨髄異形成症候群におけるリンパ球と顆粒球テロメア長の変化。第 66 回日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会総会 臨床血液 45: 808, 2004
4. 伊藤良和、大屋敷一馬、小川誠司、平井久丸、三谷絹子、堀田知光、別所正美、直江知樹、溝口秀昭、内山卓、小峰光博。MDS の化学療法成績を踏まえた IPSS 亜分類の試み。第 66 回日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会総会 臨床血液 45: 926, 2004

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
いずれも予定なし

骨髄異形成症候群に対する画期的治療法に関する研究

分担研究者 稲葉俊哉 広島大学原爆放射線医科学研究所 教授

研究要旨

MDS に対する分子標的治療を開発するために、ふたつのアプローチを試みた。ひとつは MDS の発症分子機序を明らかにすることによって新規の分子標的を同定することである。われわれは 3 年前より長鎖 PCR 支援マイクロアレイ CGH 法の開発を独自に進めてきたが、この度おおむね完成したため、本法を応用して 7 番染色体長腕領域(7q)に存在することが確実視される MDS の原因遺伝子の同定を試みた。その結果、有力な候補遺伝子 TITAN (仮称) を単離した。ふたつめは、既存、あるいは近未来に投与可能となることが予想される分子標的薬剤の適応症例を決定する方法を開発することである。このためわれわれは、特にイマチニブ (商品名グリベック) の適応症例の発見法を検討した。AML において 8;21 転座の 25% (全 AML の約 4%) にイマチニブが有効である c-Kit の変異が存在することを示したのに引き続き、MDS においても AML1 遺伝子の点突然変異を持つ症例のうちの 15% (RAEB、RAEBt、MDS より移行した AML の約 3%) でイマチニブが有効である可能性がある SHP2 遺伝子の変異があることを見出した。

A. 研究目的

いまだ難治の MDS に対する新しい治療法開発のため、分子標的治療の開発が急がれる。MDS は染色体転座に伴うキメラ遺伝子が発現することはむしろまれであり、造血システム制御に重要な役割を果たす遺伝子の点突然変異や、染色体欠失による機能欠損の蓄積により発症すると考えられている。これらの遺伝子異常は解析が進んでいるものは少ないのが現状である。特に 5q、7q、20q には MDS の発症を抑制する遺伝子が存在することが長らく確実視されているが、未だに遺伝子の単離に成功していない。そこでこうした遺伝子を同定し、将来的に MDS の分子標的薬の開発につなげることが本研究の第一の目標である。

もうひとつのアプローチは、イマチニブなどすでに実績を持つ分子標的薬や近未来に開発される薬剤の MDS に対する適応を検討することである。こうした薬剤を無差別に MDS 患者に投与しても失望的な結果しか得られないことはすでに明らかである。しかし少数の症例は有効である可能性を有しており、こうした患者を選別できる方法が開発できれば、該当する患者さんにとって大きな福音となる。そこでわれわれはイマチニブが有効である可能性を持つ MDS 症例の選別方法を検討した。

B. 研究方法

長鎖 PCR 支援マイクロアレイ CGH 法は、われわれが 3 年前より開発をすすめてきた。数十 Kb 程度の染色体微小欠損を検出するため、通常 100Kb 以上あるプローブ長を 3-5Kb に短縮した世界で唯一のシステムである。改善すべき点は残されているが、実用段階にはいったため、7q に存在する MDS 責任遺伝子のホットポイント約 25Mb に 268 個 (平均プローブ間隔 90Kb) の

プローブを作成し、MDS 細胞より抽出した DNA の微小欠失領域の検出を試みた。点突然変異の検出には SSCP 法または DHPLC 法でスクリーニングをおこなったのち、シークエンスで確認した。

(倫理面への配慮)

MDS 患者検体の採取にあたっては、指針に基づいてインフォームドコンセントを文書で得た。研究は広島大学研究倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

長鎖 PCR 支援マイクロアレイ CGH 法を応用して 7q に存在することが確実視される MDS の原因遺伝子の同定を試みた結果、3 症例と 1 細胞株で共通に微小欠失する部位を見出した。この共通微小欠失はただひとつの遺伝子を欠損させるため、この遺伝子を TITAN (仮称) と名づけた。

47 例の 8;21 転座型 AML 中 12 例(25%)に c-Kit の変異が存在すること、AML1 遺伝子の点突然変異を持つ MDS34 例中 4 例 (12%)に SHP2 遺伝子の変異があることを見出した。c-Kit の変異は全てキナーゼドメイン内にあり、11 例が Asp816、1 例のみ Asn822 の変異であった。c-Kit の変異を持った細胞株(Kasumi-1)や未治療の新患由来の骨髄単核球は、標準的な濃度のイマチニブにより細胞周期の停止やアポトーシスの抑制が認められた。また SHP2 の変異を持つ白血病細胞株の増殖は試験管内でイマチニブによって抑制された。

D. 考察

MDS は AML と異なり染色体転座に伴うキメラ遺伝子の発現は稀で、遺伝子の欠損や点変異の蓄積により発症すると考えられる。7q の欠損は

MDS でもっとも高頻度に認められる染色体異常であることから、*TITAN* の発見は MDS に対する分子標的治療薬開発への第一歩となることが期待されるものである。そのためには、本遺伝子が真に MDS の発症に寄与しているかどうかに加えて、本遺伝子産物の生化学的・生物学的機能を明らかにする必要がある。現在精力的に患者サンプルの分析、遺伝子産物の生化学的機能の解析、遺伝子改変動物の作成を進めている。われわれが見出した *c-Kit* 変異のある 8;21 転座型 AML 症例と *SHP2* 変異のある MDS 症例に真にイマチニブが有効であるかについて、研究者間で意見の相違が存在する。しかしながらイマチニブは抗腫瘍剤としては例外的に副作用の少ないものであり、これらの症例はほかに有効な治療法がなく予後が不良である。試験管内で有効である可能性を示唆する結果が出ている以上、イマチニブを用いた治療プロトコールを作成することを考慮することは許されるとわれわれは考えている。

E. 結論

7q に存在する MDS 原因遺伝子の有力候補 *TITAN* (仮称) を同定した。8;21 転座型 AML の 25% (全 AML の約 4%) に *c-Kit* の変異が、AML1 遺伝子変異を持つ MDS のうち 15% (MDS/AML の約 3%) に *SHP2* 遺伝子変異を検出した。これらの症例にはイマチニブが有効である可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Harada H, Harada Y, Niimi H, Kyo T, Kimura A, Inaba T. High incidence of somatic mutations in the AML1/RUNX1 gene in myelodysplastic syndrome and low blast percentage myeloid leukemia with myelodysplasia. *Blood* 103: 2316-2324, 2004
2. Matsunaga T, Inaba T, Matsui H, Okuya M, Kinoshita T, Miyajima A, Funabiki T, Endo M, Inukai T, Look AT, Kurosawa H. Regulation of annexin II by cytokine-initiated signaling pathways and E2A-HLF oncoprotein. *Blood* 103: 3185-3191, 2004
3. Kuribara R, Honda H, Matsui H, Shinjyo T, Inukai T, Sugita K, Nakazawa S, Hirai H, Ozawa K, Inaba T. Roles of Bim in apoptosis of normal and Bcr-Abl-expressing hematopoietic progenitors. *Mol Cell Biol* 24: 6172-6183, 2004
4. Inukai T, Inaba T, Dang J, Kuribara R, Ozawa K, Miyajima A, Wu W, Look AT, Arinobu Y, Iwasaki H, Akashi K, Kagami K, Goi K, Sugita K, Nakazawa S. TEF, an anti-apoptotic bZIP transcription factor related to the oncogenic E2A-HLF chimera, inhibits cell growth by downregulating expression of the common β chain of cytokine receptors. *Blood*, 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
いずれも予定なし

プロテオミクスの手法を用いた MDS 関連蛋白の同定

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)における血球を対象としてプロテオーム解析を行った。MDS 患者と正常人における末梢血中の好中球を純化し、その蛋白を抽出し、二次元電気泳動を行った。そして、両群の蛋白発現パターンについて解析ソフトを用いて比較検討し、MDS に高発現しているスポットについて質量分析を行った。その結果、MDS 特異的に高発現している蛋白を数種類同定した。これらの蛋白は MDS の病態に深く関与していると考えられ、本症の診断および治療法の開発につながる可能性がある。

A. 研究目的

近年、DNA マイクロアレイなどの解析手法を用いて、疾患の病因や病態に関与する遺伝子の探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は必ずしも相関するものではない。また、翻訳後修飾が病因や病態に大きく関わる場合も想定される。したがって、疾患の病因や病態を解析するためには、蛋白レベルでの解析も行う必要があると考えられる。本研究はプロテオミクスの手法を用いて骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndrome:MDS)における異常血球の蛋白解析を行い、本症に特異的に高発現している蛋白を明らかにし、その機能解析をすることにより MDS の病因、病態を解明し、それに基づいた新規治療法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

MDS の中で最も頻度が高いサブグループである不応性貧血 (refractory anemia: RA) 患者の好中球を対象としてプロテオーム解析を行った。これ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認められることから、何らかの蛋白異常が存在していると考えられる。

(2)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、実用的な疾患特異的マーカーを同定できる可能性がある。

(3)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について解析ソフト(Ettan progenesis)を用いて比較検討した。発現量に差が認められたスポットについて質量分析を行い (MALDI-TOF/TOF MS を使用)、その蛋白について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 患者と正常人における末梢血好中球由来の蛋白泳動パターンを解析ソフトで分析したところ、MDS において明らかに高発現しているスポットが認められた。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、蛋白を数種同定した。そのうちの 2 つは CapG および Thiol-specific antioxidant protein (TSA)であった。現在これらの蛋白についてその機能解析を行っている。

D. 考察

MDS 患者の好中球には正常人と比較し、明らかに高発現している蛋白が数種類存在することが明らかになった。その 1 つは CapG である。CapG は gelsolin family に属し、アクチンの capping に関わる蛋白であり細胞形態の変化や細胞運動だけでなく、細胞の増殖やアポトーシスあるいは腫瘍化の制御にも関与していることが明らかにされている。ちなみに CapG ノックアウトマウスでは好中球遊走能の低下が認められている。以上より CapG は MDS の病態に深く関与している蛋白であることが示唆される。CapG はリン酸化を受け活性化する蛋白と考えられており、MDS では脱リン酸化した CapG の発現が増強していると推測される。したがって、CapG の不活化が MDS にみられる好中球機能の低下などの原因の 1 つであると思われる。現在 MDS の好中球における CapG の機能解析を行っている。

MDS に高発現していた蛋白の 1 つである Thiol-specific antioxidant protein (TSA) は peroxiredoxin family に属する蛋白であり、活性酸素種 (ROS) 除去に重要な役割を担っている。MDS の血球はさまざまなサイトカインによる酸化ストレスにより、活性細胞種が増加していることが知られ