

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 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 三谷 絹子

平成 19 (2007) 年 3 月

目 次

I 総括研究報告

骨髓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. MDS 症例における p53 経路異常の解析 獨協医科大学・内科学（血液） 三谷 絹子	9
2. 骨髓異形成症候群に対する画期的治療法に関する研究 京都大学医学部附属病院血液・腫瘍内科学 内山 卓	11
3. 骨髓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血液・腫瘍内科学 直江 知樹	13
4. 不応性貧血に対するビタミン K2（VK2）単独療法およびVK2 と D3 併用療法 —多施設共同研究成績— 東京医科大学血液内科 大屋敷 一馬	15
5. 骨髓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. プロテオミクスを用いた骨髓異形成症候群関連蛋白の同定とその解析 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 東京大学大学院医学系研究科 21 世紀 COE プログラム 小川 誠司	21

III 研究成果の刊行に関する一覧表	27
--------------------------	----

IV 研究成果の刊行物・別刷	33
----------------------	----

I. 総括研究報告

骨髓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

骨髓異形成症候群(以下 MDS)は、汎血球減少と急性骨髄性白血病への進展を特徴とする予後不良の難治性造血障害である。本研究は 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する。分子病態解明を推進するため、(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 (TEL・ β -catenin 遺伝子) 異常の解析を実施した。(3) MDS 新規治療法の開発では、すでに実施された臨床研究「低リスク骨髓異形成症候群に対するシクロスポリン療法」および「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」の成績がまとめられた。(1)においては、高密度 SNP アレイと新たに開発したアルゴリズムを用いて、MDS ゲノムにおけるアレル特異的なコピー数の異常を解析した。その結果、従来検出が不可能であったコピー数異常を伴わないアレルのホモ接合(UPD)が多数存在することが明らかになり、これらの領域から疾患特異的に活性化変異を生ずる遺伝子を複数同定した。また、前年度に同定した 7q-の責任候補遺伝子 *Miki* の機能解析を行った。*Miki* は分裂前期～中期の中心体・紡錘糸に局在し、その発現抑制により中心体の分離不全に伴う染色体散乱や多核・小核細胞など MDS と酷似した分裂異常と核形態異常が出現した。*Miki* のキメラノックアウトマウスの骨髓細胞でも同様の形態異常が観察された。7q-例に対する特異的分子標的療法として中心体分離促進剤の有効性の検証が進行中である。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 CapG を同定したが、MDS 好中球では正常好中球に比べて CapG のリン酸化状態および細胞内局在が変化していることが明らかになった。(2)においては、MDS 検体では非リン酸化 β -catenin が核に蓄積しており、MDS の発症に Wnt/catenin シグナルの活性化が関与していると考えられた。また、p53 の機能を活性化する転写因子 TEL の発現が MDS の約 15%の症例で低下していることが示された。(3)においては、シクロスポリンは約 6 割の症例に血球回復をもたらすが、形態異常が軽微あるいは PNH 血球陽性例では貧血のみでなく血小板も回復することが示された。一方、ビタミン K2 は単独で 13%の症例に血球回復をもたらしたが、不応例においてもビタミン D3 と併用することにより約 3 割の症例が反応した。以上の研究により、ゲノム解析研究の技術的革新が達成された。世界に先駆けて予後不良因子 7q-の責任候補遺伝子が同定され、機能解析が進められた。また、臨床研究の成果は、低リスク MDS に対する副作用の少ない新たな治療法の確立に貢献するものと思われる。最後に、本邦における独創的な MDS の病態研究の基盤を整備することを目的として、MDS 検体集積事業「骨髓異形成症候群に対する検体集積事業と遺伝子解析研究」（東日本バンク：獨協医科大学、西日本バンク：京都大学）を開始した。

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
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 助教授 |
| ・大屋敷一馬
東京医科大学
血液内科 教授 | ・小川誠司
東京大学医学部
21 世紀 COE プログラム 特任助教授 |

A. 研究目的

骨髄異形成症候群（以下 MDS）は多系統におよ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 は特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開発が急務となっている。

MDS の分子病態は非常に多様であり、多段階的にがん遺伝子・がん抑制遺伝子の変異が蓄積することにより、発症・進展する。これらの遺伝子異常は、造血幹細胞の分化・増殖・アポトーシスの異常、あるいは、免疫学的異常の分子基盤になるものと考えられる。しかしながら、既知の分子機構のみで MDS の複雑な病態を説明することは不可能であり、今後も網羅的検討を継続する必要がある。

治療面では、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、高齢者には適応とならないことが多い。MDS は高齢者に好発するため、副作用や合併症の少ない生理的な治療法を開発する必要がある。しかしながら、メチル化阻害剤・免疫調節薬（サリドマイド誘導体）の臨床導入において本邦は欧米諸国に大きく遅れをとっている。

このような現状に鑑み、本研究はゲノム・蛋白の網羅的解析および特異的遺伝子の変異解析により、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・治療法を開発することを目的としている。さらに、新規治療法確立に直結する国内で現在使用可能な薬剤の臨床試験を推進することも重要な課題である。

B. 研究方法

(1) ゲノム・蛋白異常の網羅的探索

A. ゲノムレベルでの探索（小川）

高密度 SNP アレイを用いた従来のコピー数解析に加えて、腫瘍特異的な SNP シグナルのひずみを指標としてアレル不均衡を検出するアルゴリズム (AsCNAR) を新たに開発した。これを用いて 153 例の MDS 試料におけるゲノムコピー数およびアレル不均衡の網羅的な解析を行った (molecular allelotyping)。

B. 7q- の責任候補遺伝子の機能解析（稲葉）

Miki の機能を解析するために、レトロウイルス、siRNA、shRNA による遺伝子発現促進・抑制実験を行うとともに、遺伝子欠損マウスを作製した。

C. 蛋白レベルでの探索（寺村）

プロテオーム解析により同定した MDS 好中球で特異的に発現が変化する蛋白 CapG に対する各種ポリクロナル抗体を作製し、免疫染色により細胞内局在を検討するとともに、免疫沈降およびウエスタン法により蛋白のリン酸化状態の解析を行った。さらに、好中球における Thiol-specific antioxidant protein (TSA) の遺伝子発現について real-time PCR 法を用いて検討した。

(2) 特異的遺伝子異常の解析

A. β -catenin 異常の解析（直江）

β -catenin に対するモノクロナル抗体を用いて、骨髄クロット標本の染色ならびに保存 MDS 細胞の免疫プロットを行い、 β -catenin の発現・活性化と臨床像を比較検討した。

B. TEL の発現異常の解析（三谷）

MDS 症例におけるがん抑制遺伝子 TEL の発現レベルを real-time PCR 法によって検討するとともに、遺伝子変異の有無についても解析した。さらに、MDS の発症における p53 経路異常の関与を明らかにする目的で、p53、MDM2、KAP1 の遺伝子変異、MDM2 と KAP1 の発現レベルについても検討した。

(3) MDS の新規治療法の開発

A. シクロスポリン療法の成績のまとめ（内山）

本研究班で行われた「低リスク骨髄異形成症候群に対するシクロスポリン療法」の臨床試験の追跡調査により得られた臨床情報と、付随研究として行われたフローサイトメトリー法を用いた PNH 血球の解析、HLA 群遺伝子解析、T 細胞受容体レパトア解析ならびにスペクトルタイプングによるクロナリティー解析の結果を対比させることで、シクロスポリンによる治療効果の予測因子とシクロスポリンの作用機序の検討を行った。

B. ビタミン療法の成績のまとめ（大屋敷）

本研究班で行われた「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」の臨床試験の追跡調査が実施された。効果判定は IWG 反応基準に従った。

(4) MDS 検体バンク設立（三谷・内山）

特発性造血障害に関する調査研究班と合同で、新規発症 MDS 患者を前方視的に登録、追跡調査を行うとともに、登録された患者の骨髄検体を全国の主要医療機関から広く集積・保管し、班で予定されている各種遺伝子解析研究に供給するシステムを構築する。

(倫理面への配慮)

本研究で実施された患者検体を用いた遺伝子解析研究は、原則として腫瘍細胞の体細胞突然変異を扱うものであるが、平成 16 年文部科学省、厚生労働省および経済産業省告示第 1 号「ヒトゲノム・遺伝子研究に関する倫理指針」を遵守し、事前に各参加施設の倫理委員会の承認を得た。また、臨床研究は平成 16 年厚生労働省告示 459 号「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、事前に各参加施設の倫理委員会の承認を得た。いずれも研究対象者より文書による同意を得た。動物実験に関しては、動物愛護の観点から、各動物施設の承認を得た。

C. 研究結果

(1) ゲノム・蛋白異常の網羅的探索

A. ゲノムレベルでの探索（小川）

MDS における molecular allelotyping により、従来の解析技術では検出が不可能であったゲノムコピー数変化を伴わないヘテロ接合性の消失 (UPD) が多数同定された。このような UPD は MDS の約 30% の症例で認められ、1p、1q、4q、7q、9p、11q、17q、21q などの特定の染色体領域に集積する傾向が認められた。17qUPD および 21qUPD においては p53 および RUNX1 遺伝子の失活型ホモ変異が、1q、14q および 9p の UPD においては N-Ras、FLT3 および JAK2

遺伝子の活性化型変異が同定された。さらに、MDSにおいて高頻度に UPD が集積する領域から、新規のがん遺伝子の変異を同定した。

B. 7qの責任候補遺伝子の機能解析 (稲葉)

Miki は分裂間期にはゴルジ野を中心に細胞質に局在したが、分裂前期で中心体に局在し、前中期および中期では中心体より伸びる紡錘糸に局在した。Miki が高発現しており、分裂像や核形態が端正な HeLa 細胞や K562 細胞で Miki の発現を抑制すると、中心体の不明瞭化、紡錘糸張力の低下、多極化などの顕著な分裂異常が生じた。その結果染色体整列異常が起こり、二核・多核・小核細胞など MDS に特徴的な形態異常が出現した。Miki^{+/+}ES 細胞より作製したキメラノックアウトマウスの骨髄中にも分裂異常細胞が認められたことから、片側のアレルの欠失 (haplo-insufficiency) でこれらの分裂異常が生じると結論された。

C. 蛋白レベルでの探索 (寺村)

MDS 好中球で発現が亢進している CapG は正常好中球では細胞質優位に存在していたのに対し、MDS では核内優位に存在していた。また、抗チロシンリン酸化 CapG 抗体を用いて解析したところ、リン酸化体は MDS 好中球においては核内優位に存在し、正常好中球では細胞質内、特に細胞膜周辺に存在していた。また、TSA mRNA の発現量に関しては、MDS 症例と正常人の好中球の間に明らかな差は認められなかった。

(2) 特異的遺伝子異常の解析

A. β -catenin 異常の解析 (直江)

抗非リン酸化 β -catenin 抗体を用いた免疫染色および免疫プロットの結果、MDS 46 例中 23 例で核に非リン酸化 β -catenin が同定された。これは国際予後スコアリングシステムあるいは RAEBT/MDS からの AML への進展と相関し、特に 5 番や 7 番染色体異常症例に高率に認められた。

B. TEL の発現異常の解析 (三谷)

MDS の約 15% の症例に TEL の発現低下が認められた。TEL の発現低下と病期との間に相関はなかった。また、p53 遺伝子の変異は従来の報告どおり病期の進展した約 1 割の症例に観察されたが、p53 遺伝子変異と TEL の発現低下は同一症例には存在しなかった。MDM2 および KAP1 遺伝子の発現変化例は存在せず、TEL、MDM2 および KAP1 遺伝子の変異陽性例も認められなかった。

(3) MDS の新規治療法の開発

A. シクロスポリン療法成績のまとめ (内山)

追跡調査より、各血球系統におけるシクロスポリンの効果発現には最長で 2 年を要することが明らかになった。また、シクロスポリン有効例は FAB 分類で RA のみであった。効果予測の観点からは、PNH 血球陽性もしくは形態学的異形成が軽微な群とそれ以外に分類され、前者では血小板を含む複数血球系統の回復が高頻度で観察される一方、後者における奏効率は低く、半数以下に貧血の改善を見る程度であった。T 細胞受容体のクロナリティー解析では、両者で高率に健常人では認められない微小 T 細胞クローンを認めたが、シクロスポリン有効例においてもこれらは消失しなかった。シクロスポリン早期中止例で血球減少の再燃が見られたことから、シクロスポリンは造血障害性 T 細

胞クローンを排除するのではなく、その機能を一時的に抑制することで効果を発揮しているものと推測された。

B. ビタミン療法成績のまとめ (大屋敷)

ビタミン K2 単独療法の全体的な有効率は 13%、赤血球は 16.7% (2/9 例で輸血離脱)、血小板は 21% (1/6 例で輸血離脱) であった。好中球の改善例はなかった。ビタミン K2 単独療法不応例を対象としたビタミン K2+D3 併用療法では、全体的な有効率は 30%、赤血球は 45% (1/2 例で輸血離脱)、血小板は 30% (1/3 例で輸血離脱) であった。好中球の改善例はなかった。有害事象はほとんど発生しなかった。

(4) MDS 検体バンク設立 (三谷・内山)

研究計画書「骨髄異形成症候群に対する検体集積事業ならびに遺伝子解析研究」(研究代表者、獨協医科大学 三谷絹子; 検体集積事業総括責任者、京都大学 内山卓) が作成された。東日本のバンクは獨協医科大学に、西日本のバンクは京都大学に設置する。これらの検体の臨床情報は、厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「特発性造血障害に関する調査研究班」(班長 小澤敬也) および本班で実施される「再生不良性貧血と骨髄異形成症候群の前方視症例登録・セントラルレビュー・追跡調査研究」とリンクさせることにより得られる。また、個別研究 1「造血器腫瘍における遺伝子異常の網羅的解析」(東京大学 小川誠司) および個別研究 2「骨髄異形成症候群の分子病態の解析と層別化治療の確立」(獨協医科大学 三谷絹子) も提案されている。この研究計画書は獨協医科大学および京都大学の倫理審査を通過し、検体集積が開始されている。本事業には全国の多くの大学病院が参加する予定である。

D. 考察

(1) ゲノム・蛋白異常の網羅的探索

本年度に開発されたアレル特異的なコピー数の定量法(AsCNAR)により、腫瘍細胞ゲノムの量的・質的異常がゲノムワイドに解析可能となった(molecular allelokaryotyping)。このシステムでは高感度にアレル不均衡も検出される。本法を用いて MDS の網羅的なゲノム解析を行い多数の UPD を同定したが、これらの一つについては遺伝子標的も明らかにした。MDS の 5% の症例に同遺伝子の活性化型変異が観察されるため、この変異は分子療法開発の標的として注目される。今後も標的分子が次々と同定されることが期待される。

予後不良の染色体異常である 7q の責任候補遺伝子を世界に先駆けて同定したことは画期的な成果である。3 つの責任遺伝子の中で Miki は動原体や紡錘糸に局在し、染色体の正常な分配をととして分裂期の制御に重要な役割を果たすことが証明された。キメラノックアウトマウスの骨髄細胞に、分裂異常の結果 MDS 様の形態異常が出現することから、7q に伴う Miki 遺伝子座のヘテロ欠失が MDS の表現型決定に関与すると考えられる。さらに、Miki の機能低下による分裂異常は、アポトーシスを引き起こして無効造血の原因となる可能性がある。また、染色体不均等分配は異数性や多倍

体化をとおして白血化にも関与すると考えられる。7q-症例に対する特異的分子標的療法として中心体分離促進剤の有効性の検証が進行中である。

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 CapG および TSA が同定された。CapG は好中球遊走能に関与している。MDS 症例では、CapG のリン酸化状態および細胞内局在が変化していた。一方、TSA は活性酸素種 (ROS) 消去に重要な役割を担っている。これらの知見は MDS の分子病態を考察する上で極めて興味深く、新たな MDS 診断法開発の基礎となる。

(2) 特異的遺伝子異常の解析

非リン酸化 β -catenin の免疫染色により、MDS 細胞で Wnt/catenin シグナルが活性化している可能性が示唆された。免疫染色法には個々の細胞の遺伝子発現を解析出来るという利点があり、MDS のように多系統・多分化段階の細胞に増殖変化と無効造血という2種類の異常が観察される疾患に対する有力なアプローチ方法になると考えられた。

がん抑制遺伝子 *TEL* は遺伝子座の欠失およびアイソフォームの発現様式の変化により MDS 細胞で失活していることを示してきた。本年度は MDS の約 15% の症例で *TEL* 遺伝子の発現が低下していることを明らかにした。発現低下例に *p53* の遺伝子変異陽性例は含まれていなかった。*TEL* は *p53* の機能を活性化することを示しており、*TEL* の発現低下は *p53* の失活を介して MDS 発症に関与している可能性がある。様々な機序による *p53* 経路の失活は、MDS の 2 割以上の症例に認められると考えられた。

(3) MDS の新規治療法の開発

シクロスポリン療法では低リスク MDS の約 6 割に血球回復効果が得られた。効果予測因子として軽微な血球形態異常と PNH 血球が抽出された。また、反応例においても異常 T 細胞クローンは消失しないことも明らかにされ、シクロスポリンの作用機序を考察する上で興味深い。海外では MDS の免疫抑制療法としては抗胸腺細胞グロブリンが選択されるため、本臨床試験の成果は日本独自の免疫抑制療法の成績として注目される。

一方、ビタミン療法としては、ビタミン K2 単独療法ではその有効率は低かったが、不応例においてもビタミン D3 と併用することにより約 3 割の症例が反応した。日本でのこれらの成績は海外の成績よりも良好である。ビタミン K2+D3 療法は副作用が極めて少ないため、高齢者の多い MDS の治療法として有望である。

(4) MDS 検体バンク設立

事務局・バンク担当施設で倫理審査が終了し、検体集積が開始された。米国では食品医薬品局が MDS の分子標的療法としてメチル化阻害剤 (アザシチジン・デシタピン)・サリドマイド誘導体 (レナリドマイド) を承認している。日本はこれらの分子標的療法の導入で大きく遅れを取っており、独自の分子標的療法の開発が望まれる。新規分子標的の同定のため、全国から収集され臨床情報を付帯した検体は大きな貢献をすることが期待される。

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・蛋白異常の網羅的探索と特異的遺伝子異常の解析を行い、MDS の病因・病態に関与する候補分子の同定に成功した。特に、7q-の責任遺伝子の同定は画期的な成果である。ゲノム解析技術の進歩は著しく、詳細かつ精度の高いゲノムコピー数の変化とアレルの情報を同時に得ることが可能となった。これはピンポイントで候補遺伝子にアプローチが可能なることを意味しており、今後次々と原因遺伝子が明らかにされていくことが期待される。さらに、同定された候補遺伝子・蛋白の機能解析も進んでおり、MDS の分子病態として、染色体再配列の異常による細胞分裂不全が重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。これは独創的な分子標的療法の開発に直結する知見である。治療開発研究では、免疫抑制療法シクロスポリンとビタミン K2+D3 療法の血球回復効果が示された。決定的な治療法のない低リスク MDS の治療法としては十分な反応率であると言える。また、副作用が軽度である点も高齢者に対する治療法として優れている点である。最後に、分子病態研究の基盤整備を目的として、全国レベルの MDS 検体集積事業が開始された。これは欧米諸国と並ぶエビデンス・レベルの高い分子病態研究を展開するために必須のシステムである。以上の研究成果は班のホーム・ページ (<http://plaza.umin.ac.jp/~mhlw-mds/index.html>) 上で公開されている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Maki K, Yamagata T, Yamazaki I, Oda H, Mitani K. Development of megakaryoblastic leukemia in Runx1-Evi1 knock-in chimaeric mouse. *Leukemia* 20: 1458-1460, 2006
2. Yamagata T, Maki K, Waga K, Mitani K. TEL/ETV6 induces apoptosis in 32D cells through p53-dependent pathways. *Biochem Biophys Res Comm* 347: 517-526, 2006
3. Tokita K, Maki K, Tadokoro J, Nakamura Y, Arai Y, Sasaki K, Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Mitani K. Chronic idiopathic myelofibrosis expressing a novel type of TEL-PDGFRB chimaera responded to imatinib mesylate therapy. *Leukemia* 21: 190-192, 2006
4. Kitawaki T, Kadowaki N, Sugimoto N, Kambe N, Hori T, Miyachi Y, Nakahata T, Uchivama T. IgE-activated mast cells in combination with proinflammatory factors induce Th2-promoting dendritic cells. *Int Immunol* 18: 1789-1799, 2006
5. Fujita T, Kambe N, Uchivama T, Hori T. Type I Interferons attenuate T cell activating functions of human mast cells by decreasing TNF-alpha production and OX40 ligand expression while increasing IL-10 production. *J Clin Immunol* 26: 512-518, 2006
6. Naoe T, Suzuki T, Kiyoi H, Urano T.

Nucleophosmin: a versatile molecule associated with hematological malignancies. *Cancer Sci* 97: 963-969, 2006

7. Ninomiya M, Abe A, Yokozawa T, Ozeki K, Yamamoto K, Ito M, Ito M, Kiyoi H, Emi N, Naoe T. Establishment of a myeloid leukemia cell line, TRL-01, with MLL-ENL fusion gene. *Cancer Genet Cytogenet* 169: 1-11, 2006

8. Atsumi A, Tomita A, Kiyoi H, Naoe T. Histone deacetylase 3 (HDAC3) is recruited to target promoters by PML-RARalpha as a component of the N-CoR co-repressor complex to repress transcription in vivo. *Biochem Biophys Res Comm* 345: 1471-1480, 2006

9. Liu Y-C, Ito Y, Hisao H-H, Sashida G, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. Risk factor analysis in myelodysplastic syndromes patients with del(20q): prognosis revisited. *Cancer Genet Cytogenet* 171: 9-16, 2006

10. Tauchi T, Shin-ya K, Sashida G, Sumi M, Nakajima A, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. Telomerase inhibition with a novel G-quadruplex-interactive agent, telome-statin: In vitro and in vivo studies in acute leukemia. *Oncogene* 25: 5719-5725, 2006

11. Ohyashiki K, Ohyashiki JH. Reply to Kremer M, et al. The JAK2 V617F mutation occurs frequently in myelodysplastic/myeloproliferative disease, but absent in true myelodysplastic syndrome with myelofibrosis. *Leukemia* 20: 1297-1298, 2006

12. Ishiyama M, Teramura M, Iwabe K, Kato T, Motoji T. Clonally expanded T-cells in the peripheral blood of patients with idiopathic thrombocytopenic purpura and Helicobacter pylori infection. *Int J Hematol* 83: 147-151, 2006

13. Niimi H, Harada H, Harada Y, Ding Y, Imagawa J, Inaba T, Kyo T, Kimura A. Hyperactivation of the RAS signaling pathway in myelodysplastic syndrome with AML1/RUNX1 point mutations. *Leukemia* 20: 635-644, 2006

14. Matsui H, Asou H, Inaba T. Cytokines direct the regulation of Bim mRNA stability by heat shock cognate protein 70. *Mol Cell* 25: 99-112, 2007

15. Inukai T, Hirose K, Inaba T, Kurosawa H, Hama A, Inada H, Chin M, Nagatoshi Y, Ohtsuka Y, Oda M, Goto H, Endo M, Morimoto A, Imaizumi M, Kawamura N, Miyajima Y, Ohtake M, Miyaji R, Saito M, Tawa A, Yanai F, Goi K, Nakazawa S, Sugita K. Hypercalcemia in childhood acute lymphoblastic leukemia: frequent implication of PTHrP and E2A-HLF from translocation 17;19. *Leukemia*, in press

16. Nakagawa M, Ichikawa M, Kumano K, Goyama S, Kawazu M, Asai T, Ogawa S, Kurokawa M, Chiba S. AML1/Runx1 rescues Notch1-Null mutation-induced deficiency of para-aortic splanchnopleural hematopoiesis. *Blood* 108: 3329-3334, 2006

17. Suzuki T, Yokoyama Y, Kumano K, Takanashi M, Kozuma S, Takato T, Nakahata T, Nishikawa M, Sakano S, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S. Highly efficient ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells using Delta1-Fc chimeric protein. *Stem Cells* 24: 2456-2465, 2006

18. Hosoya N, Sanada M, Nannya Y, Nakazaki K, Wang L, Hangaishi A, Kurokawa M, Chiba S, Ogawa S. Genomewide screening of DNA copy number changes in chronic myelogenous leukemia with the use of high-resolution array-based comparative genomic hybridization. *Genes Chromos Cancer* 45: 482-494, 2006

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

①急性骨髄性白血病治療剤の候補物質を同定する方法: 直江知樹他2名; 名古屋大学, 特願2006-155281, 2006.6.2

②マイクロRNA生成の検出方法と癌の診断・治療及びマイクロRNA生成調整剤: 赤尾幸博他2名; 財団法人岐阜県国際バイオ研究所他, 特願2006-266918, 2006.9.29

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告

MDS 症例における p53 経路異常の解析

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

p53 遺伝子の変異は多くの固形癌および白血病で認められるが、骨髄異形成症候群(MDS)においても p53 の失活がその発症に関与する可能性が示唆されている。p53 機能の低下は、p53 自体の異常と p53 を制御する分子の異常による場合がある。p53 経路の異常が MDS 発症に関与する機序と頻度を明らかにする目的で、MDS 患者検体(40 例)を用いて p53 遺伝子の変異、p53 を制御する遺伝子 *TEL*、*KAP1*、*MDM2* の変異、その発現量について検討を行った。p53 遺伝子の変異は 4 例に観察されたが、*TEL*、*KAP1*、*MDM2* の遺伝子変異は認められなかった。一方、mRNA 発現量を測定したところ、6 例において *TEL* の発現が著しく低下していた。これらの症例には p53 遺伝子の変異は存在しなかったことから、*TEL* の発現低下による p53 経路の失活が MDS の発症に関与している可能性があると考えられた。*KAP1* および *MDM2* の発現が変化している症例は存在しなかった。p53 経路は MDS 症例の約 2 割で失活していると考えられた。

A. 研究目的

病期の進展した症例を中心に MDS 症例の約 1 割で p53 遺伝子の変異が観察されることから、p53 機能の低下が MDS の発症・進展に関与すると考えられている。近年我々は、がん抑制因子 *TEL* が p53 を介して骨髄球にアポトーシスを誘導すること、*TEL* が p53 の活性を制御するコリプレッサー *KAP1* と結合することを見出している。これらの p53 制御分子の発現・機能異常が MDS の発症に関与する可能性を検討することを目的に、p53 遺伝子の変異、p53 を制御する遺伝子 *TEL*、*KAP1*、*MDM2* の変異、その発現量について解析を行った。

B. 研究方法

(1) MDS 患者 (RA 13 例, RARS 1 例, RAEB 18 例, RAEB-t 6 例, CMMoL 2 例) および正常人の骨髄検体より RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて p53、*TEL*、*KAP1*、*MDM2* 遺伝子の機能ドメインを増幅し、直接シーケンス法を用いて塩基配列を決定した。(2) *TEL*、*KAP1*、*MDM2* の mRNA 発現量を定量的 PCR 法で測定し、病的な発現量の変化の有無について検討した。発現量は $\beta 2$ -microglobulin mRNA に対する相対量で表した。検出には Applied Biosystems 社の SYBER Green および 7700 Sequence Detector を用いた。(倫理面への配慮)

本研究は当院の倫理委員会で承認されている。検討に用いた検体は、当該患者から文書による同意を得た後に供与された。

C. 研究結果

(1) MDS 患者 40 症例中 4 例に p53 の遺

伝子変異が存在した。このうち 3 例は既知の変異 (G154D, I162S, R280G) であり、1 例は新規の変異 (Y236C) であった。これらの変異はいずれも p53 の DNA 結合領域に存在していた。*TEL*、*KAP1*、*MDM2* の遺伝子変異は認められなかった。(2) *TEL*、*KAP1*、*MDM2* の mRNA 量を測定したところ、*KAP1* および *MDM2* は正常検体と比較して発現量に大きな変化は見られなかった。一方、*TEL* mRNA は、正常検体に比較して極めて低い発現 (<1.5 SD) を示す症例が 6 例ほど存在した。この *TEL* の低発現は異なる二種類のプライマー・ペアを用いて確認された。

D. 考察

本研究においても一部の MDS 患者に p53 遺伝子の変異が認められ、この経路の異常が MDS 発症に関与していることが確認された。*TEL*、*KAP1* および *MDM2* 遺伝子には SNP 以外の塩基配列変化は認められず、これらの蛋白の変異が MDS 発症に関与している可能性は低いと考えられた。*KAP1* および *MDM2* 遺伝子の発現変化は観察されなかった。*MDM2* については一部の白血病においてその過剰発現が p53 の活性低下をもたらすことが報告されているが、本検討では過剰発現を示す MDS 症例は存在しなかった。一方、一部の症例において *TEL* の発現が著しく低下していた。これらの患者では p53 遺伝子の変異は認められなかったことから、p53 変異を伴わない症例においても *TEL* の発現低下により p53 のがん抑制能が低下し、MDS 発症に関与している可能性が示唆された。p53 経路は MDS 症例の約 2 割で失活している

と考えられた。

E. 結論

病期の進展した MDS 症例では、p53 遺伝子の欠失及び変異が高頻度に観察されることから、p53 の機能的失活は MDS の発症・進展に中心的役割を担うと考えられている。一方、p53 の遺伝子変異を伴わない症例においても、TEL 発現の低下が p53 の機能的失活をもたらし、MDS を発症・進展させる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Nakamura Y, Yamagata T, Maki K, Sasaki K, Kitabayashi I, Mitani K. TEL/ETV6 binds to corepressor KAP1 via the HLH domain. Int J Hematol 84: 377-380, 2006.

2. Yamagata T, Maki K, Waga K, Mitani K. TEL/ETV6 induces apoptosis in 32D cells through p53-dependent pathways. Biochem Biophys Res Commun 347: 517-526, 2006.

3. Tokita K, Maki K, Tadokoro J, Nakamura Y, Arai Y, Sasaki K, Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Mitani K. Chronic idiopathic myelofibrosis expressing a novel type of TEL-PDGFRB chimera responded to imatinib mesylate therapy. Leukemia 21: 190-192, 2006.

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 内山卓 京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学 教授

研究要旨

低リスク骨髄異形成症候群に対するシクロスポリン療法の追跡調査をもとに効果予測因子の検討を行った。シクロスポリン奏効群は全例 FAB 分類で RA に属した。RA 患者は PNH 血球をもつか骨髄細胞の異形成所見が軽微な群とそれ以外に大別され、前者で複数血球系統の回復を高率に認めた一方で、後者では半数弱に貧血の回復を認めた。一方、治療前に多くの例で微小 T 細胞クローンが認められたが、治療奏効例においてもこれらは消失しなかった。造血不全における T 細胞の寄与が推測されるとともに、シクロスポリンは造血不全を来す T 細胞の機能を一時的に抑制しているものと考えられた。一方、特発性造血障害に関する調査研究班と共同して、本年度に骨髄異形成症候群に対する検体集積事業ならびに遺伝子解析研究が開始された。骨髄異形成症候群の発症、進展に関わる分子生物学的機構の解明とともに、新規治療薬剤の開発の端緒となることが期待される。

A. 研究目的

（骨髄異形成症候群に対するシクロスポリン療法の作用機序に関する研究）骨髄異形成症候群の血球減少に対して免疫抑制療法が一部の患者で有効であることが知られている。免疫抑制療法の効果予測因子を検討することで、作用機序の解明、さらには新たな治療法の開発を目指す。

（検体集積事業と遺伝子解析研究）十分な臨床情報に裏打ちされた臨床検体を国内の多くの施設より集積することで、日本人における MDS の発症、進展に関わる研究を一段と促進させ、新規治療法の開発に役立てる。

B. 研究方法

（骨髄異形成症候群に対するシクロスポリン療法の作用機序に関する研究）特発性造血障害に関する調査研究班とともに行われた、低リスク骨髄異形成症候群に対するシクロスポリン(CSA)療法の追跡調査により得られた臨床情報と、付随研究として行われたフローサイトメトリー法を用いた PNH 血球の解析、HLA 群遺伝子解析、T 細胞受容体レパトア解析並びにスペクトルタイピングによるクロナリティー解析の結果を対比させることで、CSA による治療効果の予測因子、ならびに CSA の作用機序の検討を行った。

（検体集積事業と遺伝子解析研究）特発性造血障害に関する調査研究班とともに、新規発症骨髄異形成症候群患者を前方視的に登録、追跡調査を行うとともに、登録された患者の骨髄検体を全国の主要医療機関から広く集積、保管し、班で予定されている各種遺伝子解析研究に供給する。

（倫理面への配慮）

検体集積事業と遺伝子解析研究はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づ

いて行われる。すなわち、各施設の倫理審査委員会での承認の後、文書によるインフォームドコンセントを得るとともに、患者施設において連結可能匿名化を行う。

C. 研究結果

（骨髄異形成症候群に対するシクロスポリン療法の作用機序に関する研究）CSA 療法の追跡調査より、各血球系統における CSA の効果発現には最長で 2 年要することが判明した。また、CSA 有効例は FAB 分類で RA に限られ、CSA の治療効果予測という見地からは、PNH 血球陽性もしくは形態学的異形成所見を呈する頻度が低い群と、それ以外に分類され、前者では血小板を含む複数血球系統の回復が高頻度で期待される一方、後者における奏効率は低く、半数以下に貧血の改善を見る程度であった。T 細胞受容体のクロナリティー解析では、両者で高率に健常人では認められない微小 T 細胞クローンを認めたが、CSA 有効例においてもこれらは消失しなかった。CSA 早期中止例で血球減少の再燃が見られたことと合わせ、CSA は造血障害性 T 細胞クローンを排除するのではなく、その機能を一時的に抑制することでその効果を発揮しているものと推測された。

（検体集積事業と遺伝子解析研究）平成 17 年度の第二回班会議で研究計画案が討議され、修正に付された後、平成 18 年 6 月に最終研究案が本研究の研究代表者の所属機関である獨協医科大学、ついで検体集積事業事務局である京都大学の倫理審査委員会にて承認された。現在までに 9 例の検体集積が行われている。

D. 考察

（骨髄異形成症候群に対するシクロスポリン療法の作用機序に関する研究）PNH 血球の

存在する、もしくは血球の異形成所見に乏しく再生不良性貧血との鑑別が問題となる例において、高い確率でシクロスポリンの有効性が期待できる。PNH 血球は再生不良性貧血における免疫抑制療法の予測因子でもあることから、軽度の血球形態の異形成の意義を前方視的に再検討する必要がある。本年度に開始された再生不良性貧血と骨髄異形成症候群のセントラルレビューを含む前方視的症例登録、追跡調査により、この問題の解決が期待される。一方、異形成所見の強い骨髄異形成症候群における CSA の効果予測因子は今回明らかにできなかったが、今後症例登録事業を介してこの問題に取り組みたい。一方、CSA が有効であった骨髄異形成症候群患者における薬剤終了時期の判定に、微小 T 細胞クローンの検討が利用できる可能性がある。

(検体集積事業と遺伝子解析研究)この事業は今後の日本における骨髄異形成症候群に関する研究の進展に計り知れない寄与をもたらすことが期待され、本事業の問題点を解決しつつ、来年度以降検体の更なる集積につとめたい。

E. 結論

骨髄異形成症候群の血球減少の機序のひとつに T 細胞を介する免疫学的機序があり、CSA の奏効率は PNH 血球の存在、ならびに形態学的観察により予測可能である。ただし、上記以外の群における貧血改善の効果予測因子は不明である。今後、十分な臨床情報に裏打ちされた質の高い検体を広く収集することにより、骨髄異形成症候群の診断、発症・進展機序の解明、治療反応性に関する検討、さらには新規治療法開発を目指したい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

内山卓、朝長万左男、大屋敷一馬、三谷絹子、通山薫、上田孝典、大西一功、小川誠司、木村昭郎、小澤敬也、谷本光音、中畑龍俊、堀田智知光、村手隆、小峰光博： 不応性貧血（骨髄異形成症候群）診療の参照ガイド 臨床血液 47；47-68、2006

学会発表

1. 石川隆之 学会シンポジウム 骨髄異形成症候群の分子病態と新しい治療法 The indication of cyclosporine for the treatment of myelodysplastic syndrome. 第 68 回日本血液学会総会、第 48 回日本臨床血液学会総会合同総会、福岡、2006 年 10 月 6-8 日

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

いずれも該当なし

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 血液・腫瘍内科学 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ている。AML において高率に認められる NPM1 変異は MDS の小数例に認められるがその発現量と病態の関連は明らかではない。そこで NPM を認識するモノクロナル抗体の作成を行い、免疫染色系を確立した。また Wnt/ β カテニン経路の関与を検討するため、市販モノクロナル抗体で MDS 標本における非リン酸化 β カテニンの免疫染色を行った。MDS 46 例中 23 例において、造血細胞の核に非リン酸化 beta-catenin が同定された。これは IPSS スコアと相関し、特に 5 番や 7 番染色体異常に高率に認められた。Wnt/beta-catenin 経路は MDS においても活性化している可能性が示唆され、これは MDS の予後診断に有用な情報をもたらすかも知れない。

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の一層の研究進展と病態に基づく薬剤開発が望まれている。本年度は(1)急性骨髄性白血病の 1/4 において認められる NPM1 遺伝子 C 末への 4 塩基挿入変異の MDS における頻度・意義について解析する。(2) MDS における Wnt/beta-catenin 経路の活性化、チロシンキナーゼ経路との関わりを解析する、の 2 点を目標とした。

B. 研究方法

(1) 市販されている抗体は NPM の C 末(227-293 アミノ酸残基)を認識する抗体であるので、変異 NPM あるいは Short Type である NPM1.2 を認識することができない。我々は N 末に対する家兎血清ならびに大腸菌で作成した NPM1.1 を免疫して得られたマウスモノクロナル抗体 9.2 の Characterize を、免疫染色、免疫沈降法ならびに免疫プロット法を用いて行った。

(2) 市販されているベータカテニンに対するモノクロナル抗体を用いて、骨髄クローン標本の染色ならびに保存 MDS 細胞の免疫プロットを行い、ベータカテニンの発現、活性化と臨床像を解析した。

(倫理面への配慮)

解析に用いた臨床検体は、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絡可能匿名化を施して検討に用いた。また遺伝子変異解析については施設倫理審査委員会の承認「造血器腫瘍におけるゲノム遺伝子の解析」承認番号 328 を得て行っている。

C&D. 研究結果ならびに考察

(1) 家兎血清はならびにマウスモノクロナル抗体は、変異 NPM1 ならびに正常 NPM1.1 および NPM1.2 を免疫プロットならびに免疫染色で同定した。免疫染色では細胞の核小体のみならず核全体に染色され、増殖期細胞により強く、また成熟赤芽球や桿状球・分葉球には染色されなかった。この結果、MDS 一部症例における発現低下は、疾患によるものよりは細胞分画の変動を反映していることが同定された。CD34 など未分化画分における正常並びに MDS 検体での発現を解析する必要がある。

(2) 抗ベータカテニン抗体では、正常の血管内皮、一部赤芽球の膜に沿って染色された。しかし、抗非リン酸化ベータカテニン抗体では全く染色はされなかった。一方、MDS では核に濃染する症例が認められた。この結果は免疫プロットの結果と一致した。MDS 合計 46 例中 23 例において、造血細胞の核に非リン酸化 beta-catenin が同定された。これは IPSS スコアあるいは RAEBT/MDS からの AML 進展と相関し、特に 5 番や 7 番染色体異常に高率に認められた。これらの結果は、MDS の進展あるいは病態にはベータカテニン経路の活性化が関与することを示唆した。

E. 結論

免疫染色法は、個々の細胞における細胞内発現を同定出来る利点があり、MDS のような多系統・多分化段階の細胞が関与し、増殖変化と無効造血という性格を併せ持つ疾患に対する有力なアプローチ方法となると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Naoe T, Suzuki T, Kiyoi H, Urano T. Nucleophosmin: a versatile molecule associated with hematological malignancies. *Cancer Sci* 97: 963-969, 2006
2. Ninomiya M, Abe A, Yokozawa T, Ozeki K, Yamamoto K, Ito M, Ito M, Kiyoi H, Emi N, Naoe T. Establishment of a myeloid leukemia cell line, TRL-01, with MLL-ENL fusion gene. *Cancer Genet Cytogenet* 169: 1-11, 2006
3. Atsumi A, Tomita A, Kiyoi H, Naoe T. Histone deacetylase 3 (HDAC3) is recruited to target promoters by PML-RARalpha as a component of the N-CoR co-repressor complex to repress transcription in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 345: 1471-1480, 2006

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

① 急性骨髄性白血病治療剤の候補物質を同定する方法：直江知樹他 2 名；名古屋大学，

特願 2006-155281, 2006.6.2

② マイクロ RNA 生成の検出方法と癌の診断・治療及びマイクロ RNA 生成調整剤：赤尾幸博他 2 名；財団法人岐阜県国際バイオ研究所他，特願 2006-266918, 2006.9.29

③ CD20 陰転化 B 細胞性悪性リンパ腫細胞株及びその利用，直江知樹他 2 名，特願 2006-259355, 2006.11.17

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

不応性貧血に対するビタミンK2（VK2）単独療法および VK2 と D3 併用療法—多施設共同研究成績—

分担研究者 大屋敷一馬 東京医科大学 血液内科 教授

研究要旨

低リスク群の骨髄異形症候群(MDS)に対するビタミンK2(VK2)単独療法、およびVK2不応例に対するVK2とビタミンD3(VD3)併用療法の前向き試験を行なった。VK2単独療法では5/38例(13%)—赤血球系の有効性が4/24例(16.7%)、血小板の有効性が5/24例(21%)—の有効率が得られた。さらにVK2単独療法の無効例33例を対象にVK2とVD3併用療法を行い、6/20例(30%)—赤血球系の有効性が5/11例(45%)、血小板の有効性が3/30例(30%)—の有効率が得られた。また輸血依存からの離脱症例も散見された。また、本試験での有害事象は極めて軽微であった。以上よりVK2とVD3併用療法は高齢者のRA/RCNMDの血球減少に対する治療の選択肢の一つであると考えられる。

A. 研究目的

骨髄異形成症候群(MDS)では血球減少に伴う“骨髄不全”が死亡原因の重要な位置を占め、特に低リスクMDSでは血球減少の改善を目的とした治療が主眼となる。従来よりのin vitroの系での検討により、VK2とVD3併用投与では顆粒球系細胞の単球への分化と抗アポトーシス効果がみられた。VK2の単独投与あるいはVK2とVD3併用療法によりMDS患者の血球減少の改善が散発的に報告されるようになり、今回VK2の単独療法およびVK2とVD3併用療法の前向き試験により、これらの治療の安全性、有効性および治療効果の持続性を評価する目的で本試験を行なった。

B. 研究方法

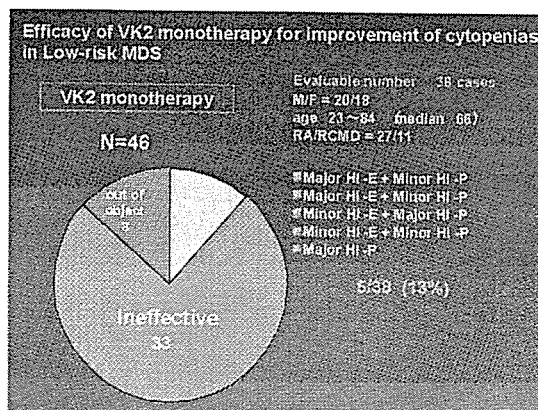
対象および方法：RA/RCMDで、IPSS low/int-1、PS 0-2、年齢20歳以上、輸血療法を除き4週間以上他の治療を受けていないMDS患者。試験への同意を取得後、VK2単独療法にて8週後に評価し、無効症例では、さらに同意を確認しVK2とVD3併用療法に移行し8週間後の血球減少改善効果の評価した。評価判定はIWG反応基準に従った。

C. 研究結果

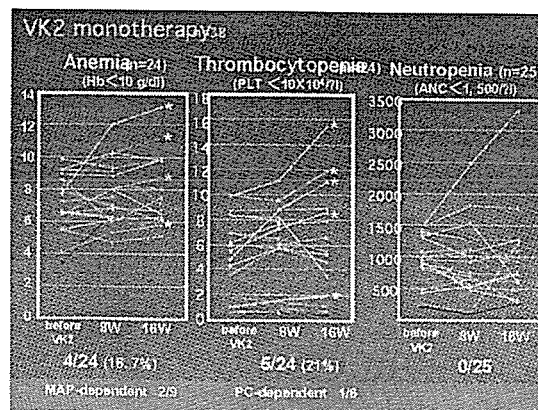
46名のMDSが登録され、38名が評価可能。38名のMDSは年齢:22-84歳、性別:男性20名/女性18名、RA27名/RARS11名、24/38名が赤血球減少、24/38名が血小板減少、

25/38名が好中球減少、27名が予後良好核型/7名が予後中間核型/3名が予後不良核型。

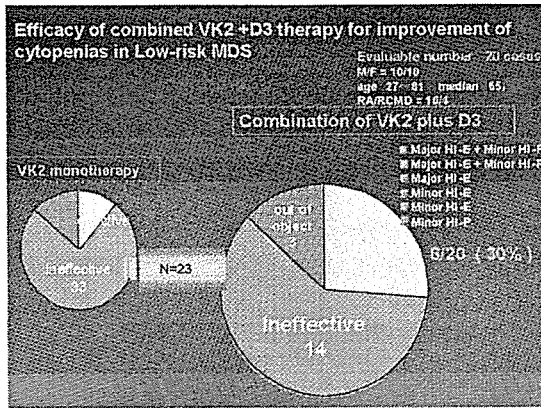
VK2単独療法：



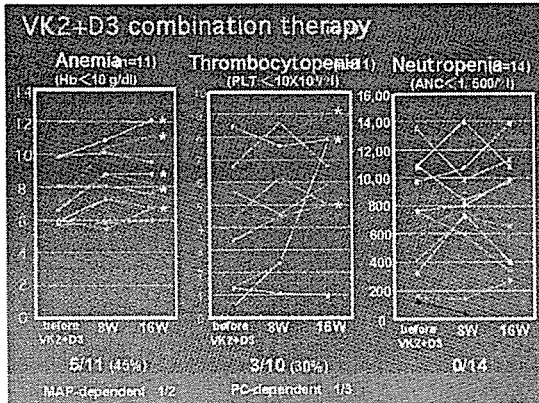
全体的な有効率13%、赤血球系の有効率16.7%(2/9例で輸血離脱)、血小板での有効率は21%(1/6例で輸血離脱)、好中球の改善例なし。



VK2 と VD3 併用療法 :



全体的な有効率 30%、赤血球系の有効率 45% (1/2 例で輸血離脱)、血小板での有効率は 30% (1/3 例で輸血離脱)、好中球の改善例なし。



VK2/VD3 併用療法は VK2 単独療法に比べ有意差をもってヘモグロビン改善が確認された (P<0.05)。

有害事象

消化器症状 (grade 1) 1 例、皮診 2 例 (grade 2 以下) を認めたのみで、耐用可能。

D. 考察

VK2/VD3 併用療法は副作用もほとんどなく、比較的長期間の投与も可能であった。血球減少改善効果は赤血球系で 45%、血小板数 30% にみられ、好中球減少の改善はみられないものの優れた有効性を発揮する治療であることが判明した。

E. 結論

VK2/VD3 併用療法は高齢者の RA/RCMD の血球減少に対する治療の選択肢と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G 研究発表

論文発表
準備中

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

骨髄異形性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

7番染色体長腕(7q)領域に存在することが想定されている MDS 発症抑制遺伝子候補を同定するため、われわれは微小染色体欠失を高感度に検出できるマイクロアレイ CGH 法を独自に開発した。このシステムを用いて、*Miki*、*Kasumi*、*Titan* と命名した新規遺伝子を単離した。これら三遺伝子は脊椎動物以外に相同遺伝子がなく、哺乳類になってからも遺伝子構造を大きく変えていた。既知遺伝子との相同性に乏しく、既知モチーフを持たないなど、進化上新しい遺伝子群であった。*Miki* は分裂前期～中期の中心体・紡錘系に結合し、その発現抑制は染色体散乱や多核・小核細胞など MDS と酷似した分裂異常と核形態異常を生じた。*Kasumi* と *Titan* は Ku70/Ku80/DNA-PKcs 複合体との結合が示され、DNA 二重鎖切断時の非相同組換え断端結合(NHEJ)による修復に関与している可能性が示された。

A. 研究目的

MDS 発症の二大原因である染色体（部分）欠失による発がん遺伝子の欠損と点突然変異のうち、染色体欠失部位に座位することが想定される責任遺伝子の同定は立ち遅れている。われわれは、MDS の画期的治療法開発のためには、責任遺伝子の同定が急務であると考え、2001 年より微小染色体欠損を極めて高感度に同定できるマイクロアレイ CGH システムの独自開発を進めた。本システムは 2004 年におおむね完成し、これを用いて MDS に見られる代表的な染色体欠損である 7q 欠失部位からの責任遺伝子の同定を試みた。その結果、*Miki*、*Kasumi*、*Titan* と命名した新規遺伝子を単離した。これらは脊椎動物以外に相同遺伝子はなく、哺乳類になってからも遺伝子構造を大きく変えている。また、既知遺伝子との相同性に乏しく、既知モチーフをほとんど持たない、進化上新しい遺伝子群である。

Kasumi と *Titan* に関しては、昨年までの検討で Ku70/Ku80/DNA-PKcs 複合体との結合が示され、DNA 二重鎖切断時の非相同組換え断端結合(NHEJ)による修復に関与している可能性が示された。今年度は *Titan* 欠損マウスの作成に力を傾注し、マウスを得て、解析の準備をおこなっているところである。

一方、*Miki* は分裂期の中心体・紡錘系に局在することが昨年度までに判明していたので、今年度はその詳細な性状解析をおこなった。本報告書では *Miki* の機能解析の結果を記載する。

B. 研究方法

昨年度までに三遺伝子の cDNA クローニング、発現ベクター作成、ポリクローナル抗体の作成・精製などの基本的な研究材料の作

成を完了した。今年度は、特に *Miki* に関して、レトロウイルス、siRNA、shRNA による遺伝子発現促進・抑制実験系の作成と、定法にもとづく遺伝子欠損マウスの作成を行った。

C. 研究結果

Miki は間期にはゴルジ野を中心に細胞質に局在したが、分裂前期で中心体に共局在し、前中期および中期では中心体より伸びる紡錘系に局在した。*Miki* が高発現しており、分裂像や核形態が端正な HeLa 細胞や K562 細胞で *Miki* の発現を抑制すると、中心体の不明瞭化、紡錘系張力の低下、多極化などの顕著な分裂異常が生じた。その結果、染色体が赤道面に整列せず、染色体散乱（コルヒチンミトーゼ）、染色体ロゼット形成、染色体が紡錘系極に対し、同じ側に整列してしまうなど、顕著な染色体整列異常が生じた。このため、分裂細胞は後期に入れずに遅滞し、染色体早期脱凝集現象を生じて、二核・多核・小核細胞など MDS に特徴的な形態異常を生じた。*Miki*^{+/+}ES 細胞より作成したキメラノックアウトマウスの骨髄中にも、異常分裂細胞が認められたことから、一アレルの欠失（haplo-insufficiency）で、これらの分裂異常が生じることが推定された。こうした分裂異常が生じるメカニズムを、動画撮影や共焦点顕微鏡を用いた画像再構成などの手法を駆使して検討したところ、中心体分離不全がその主要な原因であることが判明した。すなわち *Miki* の発現抑制により、分裂前中期に起きる中心体の分離が著しく抑制される結果、染色体はロゼットを形成した。そのため、紡錘系の張力は落ちて染色体散乱が生じ、染色体早期脱凝集から、多核・小核細胞形成へ至ると考えられた。

D. 考察

MDS は強い異形成を持つ点が通常(de novo)の AML や CML, MPD などと決定的に違う点である。異常分裂に伴う多核細胞や核形態異常は、MDS に高頻度に見られるだけでなく、細胞死(アポトーシスやいわゆる mitotic catastrophe)を引き起こして無効造血の原因となると考えられる。また、染色体不均等分配による-5/+8 の付加異常や、多倍体化を通じて白血化にも関与すると考えられる。このように分裂期の異常は、異形成、無効造血、白血化という MDS の三主徴に深く関与している可能性が高い。

われわれは、今回の成果を、診断・治療両面に生かす努力をおこなっている。診断面では、実際の MDS 細胞における遺伝子欠損や遺伝子発現の検討をおこない、迅速遺伝子診断法を確立する。これにより、染色体欠損が確認できない MDS 症例における Miki 遺伝子のピンポイントの欠失が明らかとなり、予後予測に生かせるとがんがえてい。また、治療面では長期的な課題となるが、Miki 遺伝子の欠損が引き起こす中心体分離不全が MDS の異形成の原因となっている可能性が示されたことから、中心体分離促進剤の開発を検討中である。このアプローチは分裂期の進行を阻害する薬剤を開発するという従来の抗がん剤開発思想とは正反対のものであるが、MDS 細胞の分裂を正常化することで、MDS の異形成を改善し、無効造血の改善と、白血化の遅延をもたらすことを狙ったものである。また、MDS 細胞を細胞周期に入れることにより、通常の抗白血病剤に対する感受性を向上させ、造血幹細胞移植の前処置としておこなう高がん剤大量療法の有効性を増強させることができるのではないかと期待している。

E. 結論

7q に存在する MDS 抑制遺伝子の有力候補 Miki を同定し、その発現抑制が中心体分離不全を生じることにより、MDS の三主徴(異形成、無効造血、白血化)に深く関与している知見を得た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Niimi H, Harada H, Harada Y, Ding Y, Imagawa J, Inaba T, Kyo T, Kimura A. Hyperactivation of the RAS signaling pathway in myelodysplastic syndrome with AML1/RUNX1 point mutations. *Leukemia* 20: 635-644, 2006
2. Matsui H, Asou H, Inaba T. Cytokines direct the regulation of Bim mRNA stability by heat shock cognate protein 70. *Molecular Cell* 25: 99-112, 2007
3. Inukai T, Hirose K, Inaba T, et al. Hypercalcemia in childhood acute lymphoblastic leukemia: frequent implication of PTHrP and E2A-HLF from translocation 17;19. *Leukemia*, 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

プロテオミクスを用いた骨髓異形成症候群関連蛋白の 同定とその解析

分担研究者 寺村正尚 東京女子医科大学血液内科 助教授

研究要旨

骨髓異形成症候群(myelodysplastic syndromes :MDS)の病態に關与する分子異常を、プロテオミクスの手法(Differential proteomic display: 二次元電気泳動法, スポット検出、泳動結果の解析)を用いて探索した。その結果、MDS 患者好中球において疾患特異的に発現異常のある蛋白を数種類同定した。そのうちの1つはCapG蛋白であり、MDS 血球ではそのリン酸化状態および細胞内局在が正常血球と異なっており、本症の血球にみられる増殖、分化異常に深く關与していることが示唆された。

A. 研究目的

さまざまな疾患の病因、病態には蛋白翻訳後の修飾、たとえば蛋白のリン酸化や糖鎖の異常などが關与していることが知られている。その異常を明らかにするためには、遺伝子レベルではなく蛋白レベルでの解析が必要である。本研究はプロテオミクス解析の手法を用いて骨髓異形成症候群(myelodysplastic syndrome: MDS)の血球における疾患特異的な蛋白異常を見つけ出し、その結果として本症の治療のターゲットあるいは診断マーカー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にあり、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、骨髓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を解析ソフト(Ettan progenesis)で解析した。発現量に差が認められたスポットの質量分析をMALDI-TOF/TOF MS を用いて行い、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。また同定した蛋白に対する各種ポリクローナル抗体を作成し、その細胞内局在を免疫組織染色により検討し、また免疫沈降およびウエスタンブロッティングにより蛋白解析を行った。さらに、好中球にお

るそれらの遺伝子発現についてリアルタイムPCR法を用いて検討した。

(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、MDS において異常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。

MDS 好中球におけるCapGの細胞内局在を検討するために、各種抗CapG抗体を作成し、それを用いて好中球の免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて検討した。その結果、CapGは正常好中球ではほとんどすべての細胞において細胞質優位に存在していたのに対し、MDSでは核内優位に高発現する好中球が高頻度に認められた。また、抗チロシンリン酸化CapG抗体を用いて解析したところ、MDS好中球においてはチロシンリン酸化CapGが明らかに核内優位に存在し、細胞質にはほとんど発現していなかった。一方、正常好中球では細胞質内とくに細胞膜周辺に存在し、核内にはほとんど認められなかった。また、TSAのmRNA発現についてリアルタイムPCR法で検討したところ、MDSと正常人の好中球の間には明らかな発現量の違いは認められなかった。

D. 考察

MDS 患者の好中球には正常人と比較し、発現異常を認める蛋白が複数存在することが明らかになった。その1つはCapGである。CapGはゲルソリンファミリーに属し、アクチンの