

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～平成18年度 総合研究報告書

主任研究者 三谷 絹子

平成 19 (2007) 年 3 月

# 目 次

## I 総合研究報告

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 研究成果の刊行に関する一覧表	15
-------------------	----

III 研究成果の刊行物・別刷	27
-----------------	----

# I. 総合研究報告

## 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)への進展を伴う予後不良の難治性造血障害である。本研究では MDS の病態解明とこれに基づく新規治療法の開発を目的として、(1)ゲノムレベルでの MDS 原因遺伝子の網羅的探索、(2)蛋白レベルでの MDS 原因分子の網羅的探索、(3)転写制御等の異常による MDS 分子病態の解析、(4) MDS モデルマウスの作製、(5) 新規治療法の確立に向けた臨床試験、(6) 化学療法への標準化に向けた調査研究を施行した。(1)においては、SNP アレイを用いて平均解像度 5.8kb~47kb でアレル特異的なゲノムコピー数の変化を検出することが可能となった。154 例の解析の結果、1p, 1q, 4q, 7q, 9p, 11q, 13q, 17p, 21q の各領域にゲノムコピー数変化を伴わない LOH(UPD)が集積することが明らかになった。これらの UPD が、p53(17p)や RUNX1(21q)等のがん抑制遺伝子の不活性化に加えて、N-RAS(1p), cMPL(1p), JAK2(9p), FLT3(13q)等のがん遺伝子の活性化変異が重複する主要な機序になっていると考えられた。一方、アレイ CGH の技術を用いて、7q- の責任候補遺伝子 *Titan*, *Kasumi*, *Miki* が世界に先駆けて同定された。*Titan* と *Kasumi* は放射線照射により核内に移行し DNA-PK 複合体と結合することから、DNA 二重鎖切断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唆された。*Miki* は分裂期に中心体や紡錘糸に局在し、その発現を抑制すると中心体の分離不全により染色体の正常な再配列が阻害され、MDS に観察される核分裂異常を来することが証明された。(2)においては、プロテオーム解析により MDS 患者と正常人の好中球由来蛋白を比較検討した結果、MDS 好中球特異的に発現する CapG および Thiol-specific antioxidant protein (TSA) を同定した。CapG は好中球遊走能に、TSA は活性酸素種の消去に役割を担っている。これらの蛋白の発現変化が MDS 好中球の機能異常の分子基盤であると考えられた。(3)においては、転写抑制因子 TEL ががん抑制因子 p53 の機能を活性化することを証明した。MDS 症例の 15% に TEL の発現低下が観察された。様々な機序による p53 の機能的失活が MDS の発症・進展に重要な機序であることが明らかになった。一方、がん抑制遺伝子 *FHIT* は 40 例の MDS の 55% でメチル化により失活していた。メチル化の頻度および強度は、病期の進行した症例で有意に高い傾向を認めた。AML で高頻度に変異が認められる *NPM1* 遺伝子は、MDS においても 42 例中 4 例 (AML への進展症例ならびに refractory anemia with excess of blast in transformation) に変異が検出された。また、refractory anemia 11 例中 3 例において mRNA 発現の低下が認められた。最後に、約半数の MDS 症例で Wnt/catenin シグナルの活性化が観察された。これらの遺伝子変異研究においても、MDS の主要病態の一部が明らかにされた。(4)では、MDS の原因遺伝子 *RUNX1/EV11* のノックインマウスが作製された。ノックインヘテロマウスは造血不全により胎生致死となったが、胎仔肝には自己複製能の亢進した造血前駆細胞が残存していた。この造血前駆細胞は異形成のある骨髄球と巨核球に分化したが、赤芽球への分化能は失っていた。*RUNX1/EV11* は異形成を伴う造血不全を誘導することが証明された。一方、ノックインキメラマウスは巨核芽球性白血病を発症した。(5)として、多施設共同研究「低リスク MDS に対するシクロスポリン療法」及び「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」が実施された。前者には 22 例の患者が登録され、約 6 割に血球回復効果が認められた。シクロスポリンへの効果予測因子として PNH 血球と軽微な形態異常が抽出された。PNH 血球陽性例では、貧血のみでなく血小板減少も改善する傾向を認めた。後者には 38 例の患者が登録された。ビタミン K2 単独療法では血球回復効果は 13%にしか観察されなかったが、不応例においてもビタミン D3 を併用することにより約 3 割が反応した。(6)では、約 300 の症例を対象とした調査研究により、国際予後スコアリングシステムの間群 (Int) -2 が、Int-2A (予後良好・中間染色体) と Int-2B (予後不良染色体) に分割されることが示された。前者では支持療法と化学療法の間で予後に有意差を認めなかったが、後者では支持療法がいかなる化学療法よりも優っていた。これは中間群 MDS の治療の層別化に有用な情報であると考えられた。以上のように、網羅的ゲノム・蛋白解析および個別遺伝子解析により MDS の分子病態の理解が進み、治療の標的分子が明らかになった。特に、予後不良因子である 7q- の責任候補遺伝子を世界に先駆けて同定したことは大きな成果である。数年間に渡って実施された 2 つの臨床試験でも治療成績・効果予測因子がまとめられ、日本における新しい治療法の確立に貢献することが期待される。

## 分担研究者

- ・内山 卓  
京都大学医学部  
血液・腫瘍内科学 教授
- ・直江 知樹  
名古屋大学医学部  
血液・腫瘍内科学 教授
- ・大屋敷一馬  
東京医科大学  
血液内科 教授
- ・寺村正尚  
東京女子医科大学  
血液内科 助教授
- ・稲葉俊哉  
広島大学  
原爆放射線医科学研究所 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 (MDS) は無効造血と前白血病状態という2つの性格を有する難治性の疾患である。危険因子の多寡によりその臨床像及び予後が異なり、低リスク群は感染・出血が死亡原因になるが、高リスク群は治療抵抗性の白血病へ移行することにより死亡する。造血幹細胞移植が唯一治癒を期待出来る治療法であるが、MDS患者は高齢者が多く、その恩恵を受ける患者はわずかである。これから高齢化社会に向かう中、副作用の少ないMDSの新規治療法の開発は急務である。海外ではすでにMDSに対する分子標的療法(メチル化阻害剤、サリドマイド誘導体)が認可されているにもかかわらず、本邦ではこれらは全く使用することが出来ない。この状況を打開するためにも、独創的な研究により日本独自の分子標的を見いだし、分子療法開発の基盤を整備することは意義が高い。本研究は、ゲノムサイエンス・分子生物学を駆使してMDSの発症要因となる異常分子を同定し、分子病態に則って症例を層別化し、高齢者にも適応可能な分子標的療法を開発することを最終目標とする。具体的な研究目的は、(1)ゲノムレベルでのMDS原因遺伝子の網羅的探索、(2)蛋白レベルでのMDS原因分子の網羅的探索、(3)転写制御等の異常によるMDS分子病態の解析、(4)MDSモデルマウスの作製、(5)新規治療法の確立に向けた臨床試験、(6)化学療法の標準化に向けた調査研究である。

## B. 研究方法

(1) ゲノムレベルでのMDS原因遺伝子の網羅的探索

## A. 高感度のアレイシステムの開発と原因遺伝子の同定

3200個のBACクローンを搭載するCGHアレイ(Human1Mアレイ)の開発を行い、これを用いてMDSで生ずるゲノムコピー数の変化の網羅的な解析を行った(平成16年度/小川)。より高精度な解析を行うことを目的として、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(GeneChip 100K/500K, Affymetrix社)を用いた新規システムを開発し、150例のMDS検体の解析を行った(平成17年度/小川)。最後に、アレル組成の異常を鋭敏に検出することが可能な解析システムも開発し、MDSゲノムに生じたアレル変化のゲノムワイドな探索を行った。MDSにおけるアレル不均衡、特にヘテロ接合性の消失(LOH)の集積する領域を同定したのち、平成17年度の研究で明らかになったゲノムコピー数の異常を示す領域を含めて責任遺伝子の同定を試みた(平成18年度/小川)。

## B. 7q-の責任候補遺伝子の同定と機能解析

この領域の微小欠失部位を超高感度に検出するアレイCGH用のDNAチップを作製し、骨髄性白血病検体を解析した(平成16年度/稲葉)。同定された7q-の責任候補遺伝子(*Titan*, *Kasumi*, *Miki*)のcDNA、ゲノムDNAをクローニングし、抗体を作製した。MDS患者検体やMDS由来細胞株を用いて、候補遺伝子のゲノムDNAの異常やmRNA・蛋白の発現異常を検討した(平成17年度/稲葉)。さらに、候補遺伝子の機能を解析する目的で、RNA干渉実験およびノックアウトマウス作製を行った(平成18年度/稲葉)。

## C. der(1;7)例の調査研究

MDSで観察されるder(1;7)(q10;p10)の転座に伴うゲノムの異常および臨床像を解析した(平成16年度/小川)。

## (2) 蛋白レベルでのMDS原因分子の網羅的探索

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。抽出した蛋白の二次元電気泳動を行ったのち、両者の泳動パターンについて解析ソフト(Ettan Progenesis)を用いて比較した。発現量に差が認められたスポットの質量分析を行い(MALDI-TOF/TOF MSを使用)、ペプチドデータベース(MASCOT)を用いて蛋白を同定した(平成16年度/寺村)。同定した蛋白(CapG)のMDSと正常人の好中球における遺伝子発現をリアルタイムPCR法により、細胞内局在を免疫染色法により比較検討した(平成17年度/寺村)。また、抗リン酸化CapG抗体を作製し、免疫沈降、免疫蛍光染色を行い、

CapG のリン酸化状態を検討した(平成 18 年度/寺村)。

(3) 転写制御等の異常による MDS 分子病態の解析

A. 転写因子 TEL の機能異常による MDS 進展機構の解析

MDS の白血病化の際にアイソフォームの発現様式の変化により失活する転写因子 TEL の骨髓球系細胞における機能を検討する目的で 32D 細胞に遺伝子導入し、その効果を解析した。さらに、TEL の下流に存在する標的遺伝子を検討した。また、TEL の機能制御機構を明らかにする目的で、新規結合蛋白を同定した(平成 16、17 年度/三谷)。TEL-p53 経路の機能異常が MDS の発症・進展に関与しているのかどうかを検討する目的で、TEL、p53 (下流分子)、KAP1 (結合分子)、MDM2 (p53 制御分子) の遺伝子変異および発現レベルを MDS 検体で解析した(平成 18 年度/三谷)。

B. 転写因子 RUNX1 異常による MDS 発症機構の解析

RUNX1 遺伝子の点突然変異と協調的に作用して MDS の発症を促進する遺伝子を同定するため、ゲノム DNA や cDNA を SSCP 法や D-HPLC 法(WAVE)で解析し、点突然変異の有無を検討した。同定された点突然変異を持つ cDNA を合成し、細胞株に導入して機能を解析した(平成 16 年度/稲葉)。

C. 転写因子 Kruppel 様因子異常の解析

赤芽球系細胞に発現する Kruppel-like factor (KLF) ファミリーに属する FKLf-2/KLF-13 遺伝子の転写制御部位のクローニングとプロモーター解析を行った。これらの遺伝子の MDS における変異の有無を解析した(平成 16 年度/直江)。

D. MDS 原因遺伝子 TEL/Syk の機能解析

MDS 進展期に認められた染色体転座 t(9;12)(q22;p13)からクローニングした TEL/Syk キメラ遺伝子の機能を解析した(平成 16 年度/直江)。

E. がん抑制遺伝子 FHIT 異常の解析

固形癌においてがん抑制遺伝子の可能性が示されている FHIT 遺伝子について、MDS における変異・メチル化異常を解析した(平成 17 年度/直江)。

F. ヌクレオホスミン遺伝子 NPM1 異常の解析

急性骨髄性白血病(AML)の 1/4 の症例で認められる NPM1 遺伝子 C 末への 4 塩基挿入変異の MDS における頻度・意義について解析した(平成 17 年度/直江)。

G. 分化誘導療法亜ヒ酸の作用機序の検討

欧米から MDS の有効例の報告がある亜ヒ酸治療の正常造血に及ぼす影響を検討

し、活性酸素、酸化損傷マーカーである 8OhdG を測定した(平成 17 年度/直江)。

H. Wnt シグナル異常による MDS 発症機構の解析

MDS 細胞における  $\beta$ -catenin の活性化の有無を解析した(平成 18 年度/直江)。

I. テロメアの機能異常による MDS 発症機構の解析

MDS 患者におけるテロメア鋳型 RNA(hTERC)の突然変異のテロメア長およびテロメラーゼ活性への影響を検討することを目的として、35 例の MDS と 134 例の正常人の DNA を用い、再生不良性貧血で突然変異が報告されている 7 ヶ所につき直接シーケンス法により変異の有無を解析した(平成 18 年度/大屋敷)。

(4) MDS モデルマウスの作製

MDS の原因遺伝子 RUNX1/EV11 のノックインキメラマウスを作製して表現型を観察するとともに、交配によりノックインヘテロマウスを得た。形態観察、造血コロニー・アッセイ法により胎生造血への影響を解析した(平成 16-18 年度/三谷)。

(5) 新規治療法の確立に向けた臨床試験

A. 「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有効性に関する研究」

平成 13 年から 16 年にかけて 22 名の症例登録があった。遺伝子解析研究への同意を得た試験登録患者の末梢血を用いて HLA 群遺伝子解析などを行ない、治療効果との関連を検討した(平成 16 年度/内山)。さらに、シクロスポリンの治療研究の前後で採取された末梢血検体を用いて、T 細胞受容体レパトア解析ならびに spectratyping 法による微小 T 細胞クローンの解析を行い、その結果をシクロスポリンへの反応性と比較検討した(平成 17 年度/内山)。また、長期経過観察により、再度治療効果の予測因子の抽出を行った(平成 18 年度/内山)。

B. 「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」

ビタミン K2 単独療法(45mg/日、経口投与)にて 2 ヶ月後に効果を判定し、無効例にはさらにビタミン D3 (0.75  $\mu$ g/日、経口投与)の併用療法を行い、血液反応性と輸血頻度の変化を検討した(平成 17 年度/大屋敷)。

(6) 化学療法の標準化に向けた調査研究

本邦での MDS のリスク別治療の現状を把握する目的で、本班研究者を対象にアンケート調査を行った。治療法としては支持療法中心、低用量の抗がん剤中心、および AML に準じる治療に分類し、年齢および国際予後スコアリングシステム

(IPSS) 別に予後を Kaplan-Meier 法により算出した。また、IPSS の Int-2 (中間群-2) 患者を予後により 2 分し、治療戦略の構築を行った (平成 16 年度/大屋敷)。

#### (7) MDS 検体集積事業

MDS の治療法の開発ならびに治療の層別化に不可欠な患者検体の集積事業「骨髄異形成症候群に対する検体集積事業と遺伝子解析研究」を、「特発性造血障害に関する調査研究班」で開始した MDS の前方視的登録・追跡調査とリンクした形で立ち上げた (平成 18 年度/内山、三谷)。

#### (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) ゲノムレベルでの MDS 原因遺伝子の網羅的探索

##### A. 高感度のアレイシステムの開発と原因遺伝子の同定

Human 1Mアレイを用いた 74 例の MDS 症例の解析では、多数の微小な欠失や増幅が同定された。これらの領域には、MDS の病態に関与する責任遺伝子が存在すると考えられた (平成 16 年度/小川)。SNP アレイで得られるシグナルを定量的に解析し、ノイズを補正することにより、平均解像度 5.8kb~47kb という極めて高精度でゲノムコピー数を解析できることを示した。このアルゴリズム CNAG を用いて 154 例の MDS 症例の解析を行った結果、極めて多数の異常が同定された。12p- の TEL 遺伝子の欠失、17q- の NF1 遺伝子の欠失、21q- の RUNX1 遺伝子の欠失、12p+ における K-RAS 遺伝子の高度増幅など従来報告されている遺伝子異常の他、20q- の責任候補遺伝子が同定された (平成 17 年度/小川)。さらに、GeneChip に搭載された SNP 特異的なプローブのシグナルに生ずる腫瘍細胞由来の微妙なひずみを定量的に評価することにより、アレール特異的なゲノムコピー数の高感度な解析を可能とするアルゴリズム AsCNAR を独自

に開発した。AsCNAR を用いた MDS のアレール不均衡/LOH の解析の結果、染色体欠失に伴う LOH の他に、1p, 1q, 4q, 7q, 9p, 11q, 13q, 17p, 21q の各領域にゲノムコピー数変化を伴わない LOH (UPD) が集積することが明らかになった。これらの UPD が、p53(17p) や RUNX1(21q) 等のがん抑制遺伝子の不活化に加えて、N-RAS(1p), cMPL(1p), JAK2(9p), FLT3(13q) などのがん遺伝子の変異が重複する主要なメカニズムになっていることが明らかになった。UPD によって活性化される新たな MDS の責任遺伝子の同定にも成功した (平成 18 年度/小川)。

##### B. 7q- の責任候補遺伝子の同定と機能解析

7q- は MDS の 10~20% に見られ、RUNX1 点突然変異に伴うパートナーとしても最も高頻度 (40~60%) に観察された。共通微小欠失領域の単離に成功し、この領域より候補遺伝子 (Titan, Kasumi, Miki) を同定した (平成 16 年度/稲葉)。Titan, Kasumi, Miki は既知の遺伝子とは相同性がなかった。Titan と Kasumi は放射線照射により核内に移行し、DNA-PK 複合体と結合した。また、RNA 干渉法により Kasumi の発現を抑制すると放射線感受性が亢進することから、Kasumi は DNA 二重鎖切断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唆された。一方、Miki は分裂間期にはゴルジ野に存在するが、分裂期には中心体や紡錘糸に局在した (平成 17 年度/稲葉)。Miki は分裂期制御に関与しており、その発現を低下させると染色体が散乱する「コルヒチンミトーゼ (C-mitosis)」、染色体ロゼット形成、分裂後期遅滞、染色体ブリッジ形成などの異常分裂像及び小核・多核細胞など MDS 細胞に酷似した形態異常が出現した。成人 MDS/AML の微小欠失領域の検討では、10% 程度に三遺伝子の欠失が、10% 程度に Titan 単独や Miki/Titan 両遺伝子の欠失が認められた。この領域の欠失は DNA 修復異常や染色体分配異常を通じて MDS の発症に関与すると考えられた (平成 18 年度/稲葉)。

##### C. der(1;7) 例の調査研究

der(1;7) のゲノム解析では、本転座が 1 番染色体と 7 番染色体の動原体の反復配列間の相同組換えの結果生ずることを明らかにし、分子診断法を確立した。また、臨床像の解析では、本転座は日本人を含むアジア民族に高頻度に観察される染色体異常であり、芽球増加を示す例の予後は特に不良であることを明らかにした (平成 16 年度/小川)。

#### (2) 蛋白レベルでの MDS 原因分子の網羅的探索

MDS患者と正常人の好中球由来蛋白を比較検討した結果、MDS特異的に発現するCapGおよびThiol-specific antioxidant protein (TSA)を同定した。CapGはgelsolin familyに属し、アクチン調節蛋白、シグナル伝達の制御因子あるいは転写因子として機能すると推測されている。CapGノックアウトマウスでは好中球の遊走能の低下が認められる。また、TSAはperoxiredoxin familyに属する蛋白であり、様々な酸化ストレスにより産生される活性酸素種(ROS)の消去に重要な役割を担っている。以上より、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た(平成16年度/寺村)。CapG蛋白の細胞内局在を検討したところ、正常人好中球では細胞質優位に存在していたが、MDS好中球では核内優位に存在していた(平成17年度/寺村)。また、CapGのリン酸化レベルはMDS好中球で高い傾向を認めた。CapGはリン酸化により活性化し、核内でクロマチンの再構築に関与すると考えられている。CapGの細胞内局在及びリン酸化状態の変化がMDS好中球の機能異常に関与している可能性がある(平成18年度/寺村)。(3) 転写制御等の異常によるMDS分子病態の解析

#### A. 転写因子TELの機能異常によるMDS進展機構の解析

TELを32D細胞に過剰発現させると、顆粒球コロニー刺激因子の存在下で分化することなく、急速にアポトーシスに陥って死滅することが明らかになった。このアポトーシス誘導はミトコンドリアを介する内因系経路の活性化によるものであった。また、TELの発現によりp53蛋白の発現が亢進した。TELはp53の発現亢進を介して、p53のDNA結合能および転写活性化能を増強した。このことは、TELの機能的失活はp53の機能低下をもたらし、MDSの白血病への進展に関与し得ることを示唆している。一方、UT7/GM細胞にTELの各機能ドメインをGST融合蛋白の形で発現させ、免疫沈降産物の質量分析を行うことによりTELの新規結合蛋白KAP1を同定した。興味深いことに、KAP1はMDM2と結合し、p53の機能を負に制御する分子であった(平成16、17年度/三谷)。MDS検体を用いて、p53、KAP1、MDM2、TELの遺伝子変異を解析したが、変異が観察されたのはp53遺伝子のみであった。一方、TEL、KAP1、MDM2のmRNA発現量の解析では、15%の症例でTELの発現がほぼ消失していることが明らかになった。TEL-p53経路の異常がMDSの発症・進展に関与している可能性が示唆された(平成18年度/三

谷)。

#### B. 転写因子RUNX1異常によるMDS発症機構の解析

RUNX1遺伝子の点突然変異は、MDSの既知の遺伝子異常としては最も高頻度(約20%)であるが、MDSの発症には協調的に作用する因子が必要である。そのひとつとして、c-Kitのシグナルを増強するSHP2遺伝子の点突然変異を同定した。SHP2変異細胞にはイマチニブが有効である可能性があり、臨床的検討が必要である(平成16年度/稲葉)。

#### C. 転写因子Kruppel様因子異常の解析

ヒト赤芽球系細胞に特異的に発現する新規zinc finger遺伝子ZFF29をクローニングした。FKLF-2/KLF-13遺伝子上流域のプロモーター解析を行い、GATA1は赤芽球では転写抑制的に、線維芽細胞では促進的に作用することを明らかにした。また、MEL細胞においては、これらの遺伝子は赤芽球分化を抑制することも証明した。MDS(RA)の病態形成との関連を調べるため、発現レベルおよび変異について解析したが、異常は認めなかった(平成16年度/直江)。

#### D. MDS原因遺伝子TEL/Sykの機能解析

TEL/SykはIL-3依存性マウス白血病細胞株を形質転換し、PI3K、MAPK、STAT5の恒常的活性化を誘導した。TELのPTN領域を介したキナーゼの重合がSykの活性化に関与することから、TELとの融合で活性化し得るキナーゼ群のクローニング方法を開発した(平成16年度/直江)。

#### E. がん抑制遺伝子FHIT異常の解析

MDSにおいては40例中22例(55.0%)に遺伝子のメチル化を認めた。MDSにおいてメチル化を認めた症例の頻度およびメチル化の強度は、病期の進行した症例で有意に高かった。FHITおよびp15INK4B遺伝子のメチル化に相関は認められなかった。広範なメチル化解析は、メチル化阻害剤の有効性に関して情報をもたらすことが期待される(平成17年度/直江)。

#### F. ヌクレオホスミン遺伝子NPM1異常の解析

NPM1遺伝子変異は、42例中4例(AMLへの進展症例ならびにRA with excess of blast in transformation)で検出された。一方、RA11例中3例においてmRNA発現の低下が認められた。蛋白の発現レベルも解析する必要があると考えられた(平成17年度/直江)。

#### G. 分化誘導療法亜ヒ酸の作用機序の検討

亜ヒ酸の作用機序の解明のため、亜ヒ酸投与患者の血清を解析した。HIF1 $\alpha$ の誘導、エリスロポエチンの上昇、8OhdG



の上昇が認められた。亜ヒ酸の MDS への効果には、エリスロポエチン濃度の上昇が関与している可能性がある（平成 17 年度/直江）。

#### H. Wnt シグナル異常による MDS 発症機構の解析

46 例中 23 例の MDS 標本において、造血細胞の核に非リン酸化 $\beta$ -catenin が検出された。これは IPSS と相関し、特に 7 番染色体異常陽性例に高率に認められた。Wnt/catenin 経路が MDS 細胞で活性化している可能性が示唆された。非リン酸化 $\beta$ -catenin の免疫染色は、MDS の予後診断に有用な情報をもたらすと考えられた（平成 18 年度/直江）。

#### I. テロメアの機能異常による MDS 発症機構の解析

テロメア短縮例（27%）、テロメア正常例（69%）、テロメア延長例（5%）の MDS 検体を用いて *hTERC* 遺伝子の変異の有無を検討した。いずれのテロメア長を示す MDS 症例でも *hTERC* 遺伝子の突然変異は認められなかった（平成 18 年度/大屋敷）。

#### (4) MDS モデルマウスの作製

*RUNX1/EV11* のノックインキメラマウスの個体には生後 7 ヶ月で急性巨核芽球性白血病を発症するものが観察された。*RUNX1/EV11* は MDS の白血病化例に加えて、*de novo* の急性巨核芽球性白血病でも観察されることから、腫瘍の表現型決定に役割があると考えられた。一方、ヘテロマウスは胎仔肝の造血不全により胎生中期に致死となったが、胎仔肝には自己複製能の亢進した造血前駆細胞が存在した。この造血前駆細胞は異形成のある骨髓球と巨核球に分化したが、赤芽球には分化することができなかった。*RUNX1/EV11* は異形成を伴う造血不全を誘導すると結論された（平成 16-18 年度/三谷）。

#### (5) 新規治療法の確立に向けた臨床試験

##### A. 「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の有効性に関する研究」

低リスク MDS に対するシクロスポリン療法における 24 週間後の治療効果の予測因子を解析したところ、血小板回復例と貧血のみの回復例では患者背景が異なることが示唆された。すなわち、PNH 血球陽性例においては有意に血小板増加効果が認められるのに対して、貧血のみの回復例ではその予測因子は明らかではなかった。従来指摘されていた免疫抑制療法の効果予測因子である HLA DRB1 1501 は、本研究参加患者においては効果との関連が認められなかった（平成 16 年度/内山）。患者検体を用いた MHA 法による

T 細胞受容体レパトア解析ならびに T 細胞のクロナリティー解析の結果、解析した全例に T 細胞の微小クローン性増殖を認めた。微小クローンの頻度とシクロスポリンの臨床効果との比較では統計学的有意差は観察されなかったものの、微小 T 細胞クローンの頻度が低い例でシクロスポリンへの反応性が高い傾向が認められた。また、24 週の治療前後での検討により、シクロスポリン反応例においても微小 T 細胞クローンに変化は認められなかった。抗胸腺細胞グロブリン(ATG)療法では治療奏効例で微小 T 細胞クローンが消失することが報告されており、シクロスポリンの作用機序は ATG とは異なることが示唆された（平成 17 年度/内山）。長期経過観察の結果、治療反応例は、WHO 分類の RA かつ PNH 血球陽性で血小板を含む多系列の血球回復効果を示す群と、WHO 分類では RCMD に分類され貧血の回復のみを示す群に大別されることが示された。WHO 分類の RA かつ PNH 血球陽性例においては治療効果を高率に認める反面、RCMD における効果は低いことから、シクロスポリン療法の効果予測に PNH 血球の測定が有用であることが確認された（平成 18 年度/内山）。

##### B. 「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」

ビタミン K2 単独療法では評価対象 38 例中 5 例（13%）に有効性を認め、輸血依存症例 9 例中 2 例が輸血療法から離脱できた。ビタミン K2 単独療法が「無効」と判定された 33 例中 23 例がビタミン K2+D3 併用療法に移行し、評価対象 20 例中 6 例（30%）で血球減少が改善された。貧血、血小板減少の改善率は、ビタミン K2 単独では 4/24（16.7%）、5/24（21%）に対して、ビタミン K2+D3 併用療法では 5/11（45%）、3/11（27%）と、ビタミン併用による増強効果が示されたが、統計学的有意差は認めなかった。好中球減少に対しては、単独療法でも併用療法でも有効例はなかった。有害事象は極めて軽微であった（平成 17 年度/大屋敷）。

#### (6) 化学療法の標準化に向けた調査研究

20 施設 292 例の高リスク MDS と考えられる症例を解析した結果、予後不良染色体異常のみが危険因子であった。IPSS で Int-2 の MDS 患者は予後良好・中間染色体を示し骨髓中の芽球が 5% 以上の群（Int-2A）と予後不良染色体で芽球が 5% 未満の群（Int-2B）に分割できることが判明した。前者では支持療法と化学療法の間で予後に有意差を認めなかったが、後者では支持療法がいかなる化学療法よりも優っていた。以上の結果より、Int-2

患者では染色体異常の種類により、異なる治療戦略を採用すべきであることが示された（平成 16 年度／大屋敷）。

#### (7) MDS 検体集積事業

現在東日本のバンクが獨協医科大学、西日本のバンクが京都大学に設置され、検体集積が開始されている（両大学で倫理審査済み、平成 18 年度／内山、三谷）。

### D. 考察

#### (1) ゲノムレベルでの MDS 原因遺伝子の網羅的探索

日本のゲノム研究は世界をリードしているが、この 3 年間で目覚ましい技術的革新があった。当初の CGH アレイは SNP アレイに改良され、より高精度の解析が可能になった。この技術は世界に向けて公開されている（<http://www.genome.umin.jp/>）。さらに、アレル組成に関する情報も得られるシステムへと進化を遂げており、世界的にも例を見ないアレル不均衡や LOH に関する情報を基に原因遺伝子の探索が進行している。今回開発した網羅的ゲノム探索システムを用いて、今後染色体異常 5q-、20q-、12p- の原因遺伝子が同定されることが期待される。これらの日本における技術的進歩を背景に、世界で初めて予後不良因子 7q- の責任候補遺伝子（Miki, Titan, Kasumi）の同定に成功した。すでに候補遺伝子の機能解析も進められており、Titan と Kasumi は二重鎖切断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唆され、Miki は分裂期に中心体の分離を介して染色体の分配に重要な役割を担っていることが証明された。これらの責任遺伝子の機能異常を指標にした創薬への展開が期待される。

#### (2) 蛋白レベルでの MDS 原因分子の網羅的探索

プロテオーム解析により、MDS 好中球で発現異常を示す蛋白 CapG および TSA が同定された。CapG は好中球遊走能に、TSA は活性酸素種の除去に役割を担っている。これらの蛋白の発現レベル、細胞内局在、翻訳後修飾（リン酸化等）の変化が、MDS 好中球の機能異常の分子基盤になっていると考えられた。また、これらの発現レベルの変化は末梢血検体で解析されるため、侵襲の少ない MDS の診断スクリーニング法としても期待される。

#### (3) 転写制御等の異常による MDS 分子病態の解析

個別の遺伝子変異の解析においても、頻度の高い変異が見つかり、MDS の分子病態の理解に貢献した。FHIT 遺伝子は MDS の約半数例でメチル化により失活していた。また、免疫染色を用いた検討に

より、約 5 割の症例で核内に非リン酸化  $\beta$ -catenin が蓄積しており、Wnt/catenin シグナルの亢進が MDS 発症に関与していることが明らかになった。AML で高頻度に観察される NPM1 遺伝子の変異は約 1 割の症例で観察された。転写抑制因子遺伝子 TEL の発現は MDS の 15% で低下していた。TEL 遺伝子は従来よりがん抑制遺伝子と位置付けられていたが、興味深いことにその機能解析により p53 の機能を活性化することが明らかになった。p53 の遺伝子変異は病期の進展した症例を中心に MDS の 10% 程度に観察される。p53 経路は p53 自体の遺伝子変異・遺伝子座欠失により失活するが、TEL の発現低下等の様々な機序で失活し、MDS の進展・白血病化に関与すると考えられた。このように、高頻度変異遺伝子として同定された遺伝子の機能および機能制御機構の解析は MDS の分子病態理解を深めるとともに、原因分子の機能異常を指標にした低分子化合物のスクリーニングによる日本独自の汎用性のある新規分子標的療法の開発に貢献する知見となる。

#### (4) MDS モデルマウスの作製

MDS の白血病化の原因遺伝子 RUNX1/EVI1 のノックインマウスを作製した。ヘテロマウスの胎仔肝造血はほぼ廃絶していたが、自己複製能の亢進した造血前駆細胞が残存していた。この前駆細胞は正常な分化を遂げることが出来ないことから、RUNX1/EVI1 は胎生造血に異形成を誘導することが証明された。一方、キメラマウスは巨核芽球性白血病を発症した。本研究で樹立された MDS モデルマウスは新規治療薬のスクリーニングに極めて有用である。

#### (5) 新規治療法の確立に向けた臨床試験

「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有効性に関する研究」と「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 2 つの臨床試験が実施され、経過観察期間を経て治療成績がまとめられた。免疫抑制療法シクロスポリンの治療成績は世界的にも報告がない。欧米で試みられている抗胸腺細胞グロブリンに比べて重篤な副作用が少ない点で高齢者にも使用しやすく、長期にわたり約 6 割の症例が反応することが報告された。しかしながら、効果を維持するには多くの症例で継続投与が必要であった。また、効果予測因子（PNH 血球）も抽出され、層別化治療に向けた基盤も整えられた。一方、ビタミン療法は副作用の極めて少ない治療法として注目される。ビタミン K2 単独での有効性は低いものの（13%）、単独不応例でもビタミン D3 を併用するこ

とにより3割に効果が得られ、併用療法が有望であることが示された。これらの成績は本邦における低リスク MDS の治療の選択肢を増やす点で臨床的意義が高い。本班のホーム・ページ(<http://plaza.umin.ac.jp/~mhlw-mds/index.html>)で臨床試験の成果を公開している。

#### (6) 化学療法の標準化に向けた調査研究

細胞遺伝学的データを加えて IPSS の Int-2 群を細分類することにより、化学療法の適応が明確化された。すなわち、予後良好・中間染色体を示す Int-2A は化学療法の適応となり得るが、予後不良の染色体を保有する Int-2B では支持療法を選択すべきであることが示された。この情報は直ちに論文化され、本邦の MDS の治療ガイドとして広く普及している。

#### (7) MDS 検体集積事業

症例情報とリンクした「骨髄異形成症候群に対する検体集積事業と遺伝子解析研究」を立ち上げており、今後全国レベルの検体集積が可能な体制になっている。これらの検体を用いることにより、既に同定された 7q- の責任候補遺伝子および今後同定される新規遺伝子の異常の臨床的意義を検証することができる。その結果は MDS の新規診断システムの構築を可能とし、分子病態別の層別化治療への扉を開くものである。

### E. 結論

本研究においては、(1)ゲノムレベルでの MDS 原因遺伝子の網羅的探索、(2)蛋白レベルでの MDS 原因分子の網羅的探索、(3)転写制御等の異常による MDS 分子病態の解析、(4) MDS モデルマウスの作製、(5)新規治療法の確立に向けた臨床試験、(6)化学療法の標準化に向けた調査研究を柱として研究が展開されたが、新規遺伝子同定のための革新的技術開発、世界に先駆けた 7q- の責任候補遺伝子の同定、変異解析による高頻度変異遺伝子の同定、新規治療法導入のための班主導の臨床試験、高リスク群での化学療法の位置付けの標準化等、基礎から臨床に至るまで高範囲にわたる成果が得られた。これらの成果は、日本で使用可能な薬剤で MDS の治療成績を向上させ、さらには新規分子標的療法開発の基礎となるものである。

### F. 研究発表

#### 論文発表

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

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. 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

4. 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

5. Takeshita A, Naito K, Shinjo K, Sahara N, Matsui H, Ohnishi K, Beppu H, Ohtsubo K, Horii T, Maekawa M, Inaba T, Ohno R. Deletion 6p23 and add(11)(p15) leading to NUP98 translocation in a case of therapy-related atypical chronic myelocytic leukemia transforming to acute myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 152: 56-60, 2004

6. 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

7. Takahashi W, Sasaki K, Komatsu N, Mitani K. TEL/ETV6 accelerates erythroid differentiation and inhibits megakaryocytic maturation in a human leukemia cell line UT-7/GM. *Cancer Sci* 96: 340-348, 2005

8. Maki K, Yamagata T, Asai T, Yamazaki I, Oda H, Hirai H, Mitani K. Dysplastic definitive hematopoiesis in AML1/Evi-1 knock-in embryos. *Blood* 106: 2147-2155, 2005

9. Ito Y, Ohyashiki K, Hirai H, Ogawa S, Mitani K, Hotta T, Bessho M, Naoe T, Mizoguchi M, Uchiyama T, Omine M. Assessment of the international prognostic scoring system for determining chemotherapeutic indications in myelodysplastic syndrome: Japanese retrospective multicenter

- study. *Int J Hematol* 82: 236-242, 2005
10. Iwai M, Kiyoi H, Ozeki K, Kinoshita T, Emi N, Ohno R, Naoe T. Expression and methylation status of the FHIT gene in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 19: 1367-1375, 2005
  11. Mitsuma A, Asano H, Kinoshita T, Murate T, Saito H, Stamatoyannopoulos G, Naoe T. Transcriptional regulation of FKLf-2 (KLF13) gene in erythroid cells. *Biochem Biophys Acta* 1727: 125-133, 2005
  12. Kajiguchi T, Yamamoto K, Sawa M, Emi N, Naoe T. Increased erythropoietin level and reticulocyte count during arsenic trioxide therapy. *Leukemia* 19: 674-676, 2005
  13. Iguchi T, Miyazawa K, Asada M, Gotoh A, Mizutani S, Ohyashiki K. Combined treatment of leukemia cells with vitamin K2 and 1-, 25-dihydroxy vitamin D3 enhances monocytic differentiation and resistance to apoptosis by induction of cytoplasmic p21CIP1. *Int J Oncol* 27: 893-900, 2005
  14. Ohyashiki JH, Hisatomi H, Nagao K, Honda S, Takaku T, Zhang Y, Sashida G, Ohyashiki K. Quantitative relationship between functionally active telomerase and major telomerase components (hTERT and hTR) in acute leukemia cells. *Br J Cancer* 92: 1942-1947, 2005
  15. Ohyashiki K, Shay JW, Ohyashiki H. Lack of mutations of the human telomerase RNA gene (hTERC) in myelodysplastic syndrome. *Haematologica* 90: 691, 2005
  16. Ohyashiki K, Aota Y, Akahane D, Gotoh A, Miyazawa K, Kimura Y, Ohyashiki JH. The JAK2 V617F tyrosine kinase mutation in myelodysplastic syndromes (MDS) developing myelofibrosis indicates myeloproliferative nature in a subset of MDS patients. *Leukemia* 19: 2359-2360, 2005
  17. 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 Chromos Cancer* 42: 269-279, 2005
  18. Nanya Y, Sanada M, Nakazaki K, Hosoya N, Wang L, Hangaishi A, Kurokawa M, Chiba S, Bailey DK, Kennedy GC, Ogawa S. A robust algorithm for copy number detection using high-density oligonucleotide single nucleotide polymorphism genotyping arrays. *Cancer Res* 65: 6071-6079, 2005
  19. Komeno Y, Kurokawa M, Imai Y, Takeshita M, Matsumura T, Kubo K, Yoshino T, Nishiyama U, Kuwaki T, Kubo K, Osawa T, Ogawa S, Chiba S, Miwa A, Hirai H. Identification of Ki23819, a highly potent inhibitor of kinase activity of mutant FLT3 receptor tyrosine kinase. *Leukemia* 19: 930-935, 2005
  20. Maki K, Yamagata T, Yamazaki I, Oda H, Mitani K. Development of megakaryoblastic leukemia in Runx1-Evfl knock-in chimaeric mouse. *Leukemia* 20: 1458-1460, 2006
  21. 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
  22. Sobue S, Iwasaki T, Sugisaki C, Nagata K, Kikuchi R, Murakami M, Takagi A, Kojima T, Banno Y, Akao Y, Nozawa Y, Kannagi R, Suzuki M, Abe A, Naoe T, Murate T. Quantitative RT-PCR analysis of sphingolipid metabolic enzymes in acute leukemia and myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 20: 2042-2046, 2006
  23. Suzuki M, Abe A, Kiyoi H, Murata M, Ito Y, Shimada K, Morishita Y, Kinoshita T, Naoe T. Mutations of N-RAS, FLT3 and p53 genes are not involved in the development of acute leukemia transformed from myeloproliferative diseases with JAK2 mutation. *Leukemia* 20: 1168-1169, 2006
  24. 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
  25. Tauchi T, Shin-ya K, Sashida G, Sumi M, Nakajima A, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. Telomerase inhibition with a novel G-quadruplex-interactive agent, telomestatin: In vitro and in vivo studies in acute leukemia. *Oncogene* 25: 5719-5725, 2006
  26. Hsiao H-H, Sashida G, Ito Y,

- Kodama A, Fukutake K, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. Additional cytogenetic changes and prior genotoxic exposure predict unfavorable prognosis in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with der(1;7)(q10;p10). *Cancer Genet Cytogenet* 165: 161-166, 2006
27. Nunoda K, Sashida G, Ohyashiki K, Kodama A, Fukutake K. Translocation (4;12) in myelofibrosis associated with myelodysplastic syndrome: Impact of 12q21 breakpoint. *Cancer Genet Cytogenet* 164: 90-91, 2006
28. 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
29. Vu HA, Xinh PT, Masuda M, Motoji T, Tokyda A, Tokunaga K, Sato Y. FLT3 is fused to ETV6 in a myelo proliferative disorder with hyper-eosinophilia and a t(12;13)(p13;q12) translocation. *Leukemia* 20: 1414-1421, 2006
30. 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
31. Nishiyama U, Yoshino T, Ozai M, Yoshioka R, Fujisawa M, Ogasawara Y, Kitahori M, Yoshioka E, Kubo K, Komeno Y, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S, Osawa T, Kuwaki T, Hirai H, Miwa A. Antineoplastic effect of a single oral dose of the novel Flt3 inhibitor KRN383 on xenografted human leukemic cells harboring Flt3-activating mutations. *Leuk Res* 30: 1541-1546, 2006
32. 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
33. Ogawa S, Nanya Y, Yamamoto G. Genome-wide copy number analysis on GeneChip® platform using CNAG 2.0 software. *Method in molecular medicine* (in press)
34. Nakamura Y, Yamagata T, Maki K, Sasaki K, Kitabayashi I, Mitani K. A novel TEL/ETV6 binding protein KAP1 does not contribute to its transcription-repressive activity. *Int J Hematol* 84: 377-380, 2006
35. 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: 190-191, 2006
36. Kitawaki T, Kadowaki N, Sugimoto N, Kambe N, Hori T, Miyachi Y, Nakahata T, Uchiyama T. IgE-activated mast cells in combination with proinflammatory factors induce Th2-promoting dendritic cells. *Int Immunol* 18: 1789-1799, 2006
37. Fujita T, Kambe N, Uchiyama 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
38. Naoe T, Suzuki T, Kiyoi H, Urano T. Nucleophosmin: a versatile molecule associated with hematological malignancies. *Cancer Sci* 97: 963-969, 2006
39. 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
40. 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
41. Ishii Y, Ohyashiki K, et al. Derivative (1;7)(q10;p10) anomaly in multiple myeloma: A sign of therapy-related hidden myelodysplastic syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* 167: 131-137, 2006
42. Okabe S, Ohyashiki K, et al. Stromal cell-derived factor-1/CXCL12-induced chemotaxis of a T cell line involves intracellular signaling through Cbl and Cbl-b and their regulation by Src kinases and CD45. *Blood Cells Mol Dis* 36: 308-314, 2006
43. 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

44. 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)

45. Sanada M, Uike N, Ohyashiki K, Ozawa K, Lili W, Hangaishi A, Kanda Y, Chiba S, Kurokawa M, Omine M, Mitani K, Ogawa S. Unbalanced translocation der(1;7)(q10;p10) defines a unique clinicopathological subgroup of myeloid neoplasms. Leukemia (in press)

46. 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

47. 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

48. 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: 482-94, 2006

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

(直江知樹)

1. 出願番号：特願 2003-206534  
発明名称：癌遺伝子の探索方法
2. 出願番号：特願 2003-203508  
国際出願番号：PCT/JP2004/011287  
国際公開番号：WO2005/012257  
発明名称：インダゾール誘導体
3. 出願番号：特願 2003-203509  
国際出願番号：PCT/JP2004/011300  
国際公開番号：WO2005/012258  
発明名称：タンパク質キナーゼ阻害剤
4. 出願番号：特願 2004-097433  
国際公開番号：WO2005/094823  
国際出願番号：PCT/JP2005/006032  
発明名称：Flt-3 阻害剤
5. 出願番号：特願 2004-097434  
国際公開番号：WO2005/095382  
国際出願番号：PCT/JP2005/006034  
発明名称：抗腫瘍剤
6. 出願番号：特願 2004-097436  
国際公開番号：WO2005/095341  
国際出願番号：PCT/JP2005/006036  
発明名称：含窒素複素環化合物
7. (米国仮出願中)  
出願番号：60/734,278  
国際出願番号：PCT/JP2006/322280  
発明名称：遺伝子変異検出用アレイ及び検出方法
8. 出願番号：特願 2006-155281  
発明名称：急性骨髄性白血病治療剤の候補物質を同定する方法
9. 出願番号：特願 2006-266918  
発明名称：マイクロRNA生成の検出方法と癌の診断・治療およびマイクロRNA生成調整剤

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## II. 研究成果の刊行に関する一覧

研究成果の刊行に関する一覧表（論文）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Ichikawa M, Asai T, Saito T, Yamamoto G, Seo S, Yamazaki I, Yamagata T, <u>Mitani K</u> , Chiba S, <u>Ogawa S</u> , 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
Maki K, Arai H, Waga K, Sasaki K, Nakamura F, Imai Y, Kurokawa M, Hirai H, <u>Mitani K</u> .	Leukemia-related transcription factor TEL is negatively regulated through ERK-induced phosphorylation.	Mol Cell Biol	24	3227-3237	2004
<u>Mitani K</u> .	Molecular mechanisms of leukemogenesis by AML1/EVI-1.	Oncogene	23	4263-4269	2004
Sasaki K, Nakamura Y, Maki K, Waga K, Nakamura F, Arai F, Imai Y, Hirai H, <u>Mitani K</u> .	Functional analysis of a dominant-negative $\Delta$ ETS TEL/ETV6 isoform.	Biochem Biophys Res Comm	317	1128-1137	2004
Mitsuma A, Asano H, Kinoshita T, Murate T, Saito H, Stamatoyannopoulos G, <u>Naoe T</u> .	Transcriptional regulation of FKLF-2 (KLF13) gene in erythroid cells.	Biochimica Biophysica Acta	1727	125-133	2005
Asano H, Murate T, <u>Naoe T</u> , Saito H, Stamatoyannopoulos G.	Molecular cloning and characterization of ZFF29: a protein containing a unique Cys2 His2 zinc-finger motif.	Biochem J	384	647-653	2004
Abe A, Emi N, Kanie T, Imagama S, Kuno Y, Takahashi M, Saito H, <u>Naoe T</u> .	Expression cloning of oligomerization activated genes with cell-proliferating potency by pseudotype retrovirus vector.	Biochem Biophys Res Comm	320	920-926	2004



研究成果の刊行に関する一覧表（論文）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Kanie T, Abe A, Matsuda T, Kuno Y, Towatari M, Yamamoto T, Saito H, Emi N, <u>Naoe T.</u>	TEL-Syk fusion constitutively activates PI3-K/Akt, MAPK and JAK2-independent STAT5 signal pathways.	Leukemia	18	548-555	2004
Harada H, Harada Y, Niimi H, Kyo T, Kimura A, <u>Inaba T.</u>	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
Matsunaga T, <u>Inaba T.</u> 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
Kuribara R, Honda H, Matsui H, Shinjyo T, Inukai T, Sugita K, Nakazawa S, Hirai H, Ozawa K, <u>Inaba T.</u>	Roles of Bim in apoptosis of normal and Bcr-Abl-expressing hematopoietic progenitors.	Mol Cell Biol	24	6172-6183	2004
Inukai T, <u>Inaba T.</u> 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 down-regulating expression of the common $\beta$ chain of cytokine receptors.	Blood		(in press)	
Yokoyama T, Miyazawa K, Yoshida T, <u>Ohyashiki K.</u>	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
Yokoyama T, Miyazawa K, Kurakawa E, Nagate A, Shimamoto T, Iwaya K, Akata S, Aoshima M, Serizawa H, <u>Ohyashiki K.</u>	Interstitial pneumonia induced by imatinib mesylate: pathologic study demonstrates alveolar destruction and fibrosis with eosinophilic infiltration.	Leukemia	18	645-646	2004

## 研究成果の刊行に関する一覧表（論文）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Okabe S, Fukuda S, Kim YJ, Niki M, Pelus LM, <u>Ohyashiki K</u> , 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	105	474-480	2004
Sumi M, Tauchi T, Sashida G, Nakajima A, Gotoh A, Shin-Ya K, Ohyashiki JH, <u>Ohyashiki K</u> .	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
Ishii Y, Ito Y, Kuriyama Y, Tauchi T, <u>Ohyashiki K</u> .	Imatinib mesylate for chronic eosinophilic leukemia with myelofibrosis	Leukemia Res	28 Suppl 1	S79-S80	2004
Hosoya N, Qiao Y, Hangaishi A, Wang L, Nannya Y, Sanada S, Kurokawa M, Chiba S, 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 Chromos Cancer	42	269-279	2004
Ichikawa M, Asai T, Chiba S, Kurokawa M, <u>Ogawa S</u> .	Runx1/AML-1 ranks as a master regulator of adult hematopoiesis.	Cell Cycle	3	722-724	2004
Takahashi W, Sasaki K, Komatsu N, <u>Mitani K</u> .	TEL/ETV6 accelerates erythroid differentiation and inhibits megakaryocytic maturation in a human leukemia cell line UT-7/GM.	Cancer Sci	96	340-348	2005
Nakamura F, Nakamura Y, Maki K, Sato Y, <u>Mitani K</u> .	Cloning and characterization of a novel chimeric gene TEL/PTPRR in acute myelogenous leukemia with inv(12)(p13q13).	Cancer Res	65	6612-6621	2005

研究成果の刊行に関する一覧表（論文）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Maki K, Yamagata T, Asai T, Yamazaki I, Oda H, Hirai H, <u>Mitani K.</u>	Dysplastic definitive hematopoiesis in AML1/Evi-1 knock-in embryos.	Blood	106	2147-2155	2005
Kitawaki T, Kadowaki N, Sugimoto N, Kambe N, Hori T, Miyachi Y, Nakahata T, Uchiyama T.	IgE-activated mast cells in combination with proinflammatory factors induce Th2promoting dendritic cells.	Int Immunol	18	1789-1799	2006
Takeshita A, Shinjo K, Naito K, Matsui H, Sahara N, Shigeno K, Horii T, Shirai N, Maekawa M, Ohnishi K, <u>Naoe T.</u> Ohno R.	Efficacy of gemtuzumab ozogamicin on ATRA- and arsenic-resistant acute promyelocytic leukemia (APL) cells.	Leukemia	19	1306-1311	2005
Iwai M, Kiyoi H, Ozeki K, Kinoshita T, Emi N, Ohno R, <u>Naoe T.</u>	Expression and methylation status of the FHIT gene in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome.	Leukemia	19	1367-1375	2005
Mitsuma A, Asano H, Kinoshita T, Murate T, Saito H, Stamatyannopoulos G, <u>Naoe T.</u>	Transcriptional regulation of FKLF-2 (KLF13) gene in erythroid cells.	Biochim Biophys Acta	1727	125-133	2005
Kajiguchi T, Yamamoto K, Sawa M, Emi N, <u>Naoe T.</u>	Increased erythropoietin level and reticulocyte count during arsenic trioxide therapy.	Leukemia	19	674-676	2005
<u>Ohyashiki K.</u> Shay JW, Ohyashiki JH.	Lack of mutations of the human telomerase RAN gene (hTERC) in myelodysplastic syndrome.	Haematologica	90	691	2005

## 研究成果の刊行に関する一覧表（論文）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
<u>Ohyashiki K.</u> , Aota Y, Akahane D.	The JAK2 V617F tyrosine kinase mutation in myelodysplastic syndromes (MDS) developing myelofibrosis indicates the myeloproliferative nature in a subset of MDS patients.	Leukemia	103	2359-2360	2005
Ohyashiki JH, Hisatomi H, <u>Ohyashiki K.</u>	Quantitative relationship between functionally active telomerase and major telomerase components (hTERT and hTR) in acute leukaemia cells.	Br J Cancer	92	1942-1947	2005
Kazama H, <u>Teramura M.</u> , Yoshinaga K, Kato T, Motoji T, Mizoguchi H.	Proteomics approach to identifying proteins abnormally expressed in neutrophils in patients with myelodysplastic syndrome.	Leukemia	29 Suppl 1	S46	2005
Inukai T, <u>Inaba T.</u> , 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 b chain of cytokine receptors.	Blood	105	4437-4444	2005
Matsui H, Shinjyo T, <u>Inaba T.</u>	Structure of the human Bim gene and its transcriptional regulation in Baf-3, interleukin-3-dependent hematopoietic cells.	Mol Biol Rep	32	79-85	2005
Yamasaki M, Mishima KH, Yamashita H, Kashiwagi K, Murata K, Minamoto A, <u>Inaba T.</u>	Neuroprotective effects of erythropoietin on glutamate and nitric oxide toxicity in primary cultured retinal ganglion cells.	Brain Res	1050	15-26	2005
Hosoya N, Sanada S, Nannya Y, Nakazaki K, Wang L, Hangaishi A, Kurokawa M, Chiba S, <u>Ogawa S.</u>	Genome-wide screening of DNA copy number changes in chronic myelogenous leukemia with the use of high-resolution array-based comparative genomic hybridization.	Genes Chromosom Cancer		(in press)	