

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病態解明・治療法の開発に関する研究

平成 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 三谷 絹子

平成 20 (2008) 年 3 月

# 目 次

## I. 総括研究報告

骨髓異形成症候群に対する病態解明・治療法の開発に関する研究 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 microRNA の発現解析 獨協医科大学・内科学(血液) 三谷 絹子 .....	9
2. 骨髓異形成症候群の遺伝子解析を目的とした検体集積に関する研究 京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学 内山 卓 .....	11
3. 骨髓異形成症候群に対する病態解明・治療法の開発に関する研究 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. 骨髓異形成症候群における JAK2-V617F 変異 —慢性骨髓増殖性疾患での意義との比較— 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病態解明・治療法の開発に関する研究 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 泉二 登志子 .....	19
7. SNP アレイを用いた MDS の新規原因遺伝子の同定に関する研究 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 .....	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病態解明・治療法の開発に関する研究

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(以下 AML)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。海外では様々な分子標的療法が承認されているが、現在日本ではこれらを使用することは出来ない。MDS の新規分子標的療法の開発を目的として、(1) ゲノム異常・miRNA 発現異常・リン酸化蛋白発現異常の網羅的探索、(2) 変異遺伝子・分子の機能解析、(3) 変異遺伝子の臨床的意義の検討を柱として、分子病態研究を推進した。(1)においては、高密度 SNP アレイを用いて多数のコピー数異常を伴わないアレルのホモ接合(UPD)をマップするとともに、11qUPD の責任遺伝子 *mds3* を同定した。また、miRNA 発現解析の結果、RUNX1 蛋白の翻訳を負に制御する miR-9 の発現が一部の症例で亢進していることを明らかにした。さらに、MDS/AML の CD34 陽性細胞に発現しているリン酸化蛋白の同定が進められた。(2)においては、MDS 骨髄細胞ではセリン・スレオニン非リン酸化 $\beta$ -catenin が核に蓄積しているが、これは FLT3 によるチロシンリン酸化の結果である可能性が示唆された。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。一方、7q-の責任候補遺伝子 *Samd9L* と *Miki* の機能解析を行った。*Samd9L* のノックアウトマウスは 4070A レトロウイルスの感染により高率に AML を発症した。*Miki* は分裂前期～中期の中心体・紡錘系に局在し、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髄細胞でも同様の形態異常が観察された。7q-症例に対する特異的分子標的療法の開発を目的として、中心体分離促進剤の有効性の検証が進行中である。(3)においては、多系統の異形成を伴う AML(以下 AML/MLD)では複雑核型+TP53 遺伝子変異陽性例で MDS の先行例が多く、そのいずれかを有する症例では極めて予後不良であるが、*NPM1* 遺伝子の変異は de novo AML/MLD の特徴であることが明らかにされた。また、骨髄増殖性疾患に特徴的な *JAK2* 遺伝子変異は MDS では稀であるが、骨髄線維化に関連して出現することが報告された。以上の研究により、MDS の病型分類、予後予測、治療層別化に有用な遺伝子・分子マーカーが同定された。また、これらの異常遺伝子・分子の機能解析の結果は、新規薬剤の開発を目指した低分子化合物のスクリーニングの指標となる。臨床的には、MDS 由来と de novo AML/MLD の鑑別及び線維症合併例抽出に有効な遺伝子異常が同定された。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」(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。これは全国から臨床情報を付帯した検体を集積するためのシステムであり、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。

### 分担研究者

- |                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| ・内山 卓<br>京都大学医学部<br>血液・腫瘍内科学 教授   | ・稲葉俊哉<br>広島大学<br>原爆放射線医科学研究所 教授          |
| ・直江 知樹<br>名古屋大学医学部<br>血液・腫瘍内科学 教授 | ・泉二登志子<br>東京女子医科大学<br>血液内科 助教授           |
| ・大屋敷一馬<br>東京医科大学<br>血液内科 教授       | ・小川誠司<br>東京大学医学部<br>21 世紀 COE プログラム特任准教授 |

## A. 研究目的

骨髄異形成症候群(以下 MDS)は高齢者に多く、QOL を著しくそこなうとともに決定的な治療法のない難治性造血障害である。高齢化社会に向かい増加傾向にある本疾患の分子病態を解析し、新規診断法および治療法を開発することは社会的ニーズが高い。現在低リスク MDS においては主に支持療法(輸血・サイトカイン療法)、ビタミン K2+D3 療法(前班で臨床試験実施、保険適応なし)、免疫抑制療法シクロスポリン(前班で臨床試験実施、保険適応なし)が選択され、高リスク MDS には化学療法が選択されるが、唯一の治療可能な治療法は造血幹細胞移植である。骨髄非破壊的前処置、臍帯血移植の導入等により造血幹細胞移植の適応年齢は 70 歳程度まで引き上げられたものの、依然として多くの高齢患者は臓器障害・合併症等が存在するため移植医療の適応外である。副作用を軽減した治療法の開発により、高齢患者の QOL を維持しつつ、治療を目指すことが求められる。この目的のためには腫瘍細胞に特異的に発現し、腫瘍発症に役割を担っている分子を標的とした分子治療が理想的な戦略となる。

米国ではメチル化阻害剤(アザシチジン、デシタピン)とサリドマイド誘導体(レナリドマイド)がすでに FDA によって認可されている。メチル化阻害剤は低~高リスク MDS に適応があり、急性骨髄性白血病(AML)への移行を遅らせ、生存を延長させる。レナリドマイドは輸血依存性の 5q-陽性低リスク例にのみ適応があるが、貧血を改善するばかりか細胞遺伝学的完全寛解をもたらす。本邦はこれらの分子標的療法の臨床導入に大きく遅れをとっている。

本研究の目的は、(1)ゲノム異常・miRNA 発現異常・リン酸化蛋白発現異常の網羅的探索、(2)変異遺伝子・分子の機能解析、(3)変異遺伝子の臨床的意義の検討を推進することにより、MDS の病態を包括的に理解することである。これらの知見は、治療の層別化に向けた新規診断システムの構築を可能とし、低分子化合物のスクリーニングによる新規治療薬開発の基礎となる。

## B. 研究方法

(1)ゲノム・miRNA・蛋白異常の網羅的探索

### A. ゲノムの探索(小川)

高密度 SNP アレイ(GeneChip100K ないし 500K アレイ)とゲノムコピー数解析ツール CNAG/AsCNAR を用いて 171 例の MDS 検体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。その結果同定された 11qUPD の共通領域を約 1MB まで狭め、同部位に存在する候補遺伝子の全エクソンの変異解析を行い、候補遺伝子を同定した。

### B. miRNA の探索(三谷)

RUNX1 は MDS において、自身の遺伝子変異及び染色体転座に伴うキメラ形成により、その機能が失活していることが知られている遺伝子である。MDS16 例と正常検体 11 例において、RUNX1 mRNA の 3'非翻訳領域に認識配列の存在する miRNA の発現の変化を定量的 PCR 法によって検討した。発現変化の認められた miRNA に関しては、RUNX1 mRNA の翻訳に変化が生じるかどうかをレポーター・アッセイにより検討した。

## C. リン酸化蛋白の探索(泉二)

イムノビーズ法を用いて純化した MDS/AML 症例の CD34 陽性細胞から蛋白を抽出して二次元電気泳動を行い、Pro-Q® Diamond Phosphoprotein Gel Stain (Invitrogen)及び SYPRO® Ruby Protein Gel Stain(Invitrogen)を用いてリン酸化蛋白スポットを検出した。スポットを切り出して質量分析を行い、蛋白を同定した。

(2)変異遺伝子・分子の機能解析

### A. FLT3 によるβ-catenin リン酸化の検討(直江)

野生型 FLT3 発現細胞(THP1、32D/WT)及び変異型 FLT3 発現細胞(MOLM13、MV4;11、32D/ITD)におけるβ-catenin のリン酸化状態を、モノクロナル抗体を用いた免疫染色法、免疫沈降法、ウエスタン解析法により検討した。また、リコンビナントβ-catenin と FLT3 を用いた in vitro kinase assay を施行した。

### B. 7q-の候補遺伝子 Samd9L, Miki の機能解析(稲葉)

短鎖プローブ・マイクロアレイ CGH 法を用いて、7q に存在する MDS 発症の原因候補遺伝子(Samd9, Samd9L, Miki)を単離した。Samd9L のノックアウトマウスに 4070A レトロウイルスを感染させ、AML 発症の有無を観察した。一方、Miki の機能を HeLa 細胞、K562 細胞を用いてノックダウン法により解析した。ノックアウトキメラマウスも作製した。

(3)変異遺伝子の臨床的意義の検討

### A. TP53 変異の AML/MLD における意義(直江)

33 例の多系統の異形成を伴う AML (acute myeloid leukemia with multilineage dysplasia; AML/MLD)で NPM1, MLL, RUNX1, CEBP/A, NRAS, FLT3, TP53 遺伝子の変異解析を行い、臨床像との比較検討を行った。変異は WAVE 法でスクリーニングし、direct sequence 法で決定した。

### B. JAK2-V617F 変異の意義(大屋敷)

骨髄増殖性疾患(MPD)症例 96 例(真性赤血球増加症(PV) 33 例、特発性血小板増加症(ET) 54 例、骨髄線維症(CIM) 9 例)および MDS44 例(内 6 例は骨髄線維症合併例)につき、JAK2 変異を SSP-SMFD (semi-quantitative sequence-specific primer single molecule fluorescence detection assay)法を用いて解析し、臨床像と比較検討した。

(倫理面への配慮)

本研究で実施される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、事前に各施設の倫理委員会の承認を得た。研究対象者からは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、平成 18 年文部科学省告示第 71 号「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」を遵守した。

## C. 研究結果

(1)ゲノム・miRNA・蛋白異常の網羅的探索

### A. ゲノムの探索(小川)

染色体分析では同定不可能な微小なゲノム領域のコピー数の異常が多数同定された。さらに、アレル不均衡の解析により、正常核型を含む約 30%の症例でコピー数異常を伴わないアレルのホモ接合(UPD)が認めら

れることが明らかとなった。これらの UPD は、1p, 1q, 4q, 7q, 11q, 14q, 17q, 21q 等 に集積して認められた。11q 上の UPD の最小共通領域を 1MB まで狭め、変異解析により候補遺伝子 *mids3* (研究室名) を同定した。変異 *mids3* 遺伝子は、正常 *mids3* に対してドミナントに作用し、NIH3T3 細胞を強く形質転換させ、マウス造血幹細胞の replating 活性を上昇させた。

#### B. miRNA の探索 (三谷)

候補 miRNA の中で miR-9 のみが、MDS 症例の 3 例で特異的に高く発現していた。これらの 3 症例で *RUNX1* mRNA の発現は低下していなかったことから、mRNA の破壊は起こっていないと考えられた。一方、*RUNX1* mRNA の 3' 非翻訳領域を用いたレポーター・アッセイにより、miR-9 の認識部位特異的に蛋白への翻訳が抑制されることが証明された。

#### C. リン酸化蛋白の探索 (泉二)

MDS/AML 症例において CD34 陽性細胞で、14-3-3 protein epsilon, calreticulin precursor, tropomyosin 3, splicing factor, arginine/serine-rich 1, N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein, alpha, F-actin capping protein alpha-1 subunit, protein phosphatase 1, regulatory subunit 7, heterogenous nuclear ribonucleoprotein K, TALDO1, enolase 1, acidic nuclear phosphoprotein pp32 等がリン酸化蛋白として発現していることが明らかになった。

#### (2) 変異遺伝子・分子の機能解析

##### A. FLT3 による $\beta$ -catenin リン酸化の検討 (直江)

変異型 FLT3 発現細胞では、チロシンリン酸化された  $\beta$ -catenin が検出された。これは FLT3 キナーゼ阻害剤 PKC412, AG1296 ならびに FLT3 に対する siRNA で抑制された。一方、野生型 FLT3 発現細胞では、リガンド刺激で  $\beta$ -catenin のチロシンリン酸化が誘導された。チロシンリン酸化した  $\beta$ -catenin は核に移行し、 $\beta$ -catenin の標的遺伝子である *c-MYC* や *cyclin D1* の転写を上昇させた。 $\beta$ -catenin は FLT3 と結合しており、直接の基質であることを証明した。FLT3 活性化による  $\beta$ -catenin のチロシンリン酸化は AML 例の骨髓細胞でも確認された。

##### B. 7q- の候補遺伝子 *Samd9L*, *Miki* の機能解析 (稲葉)

*Samd9L* ノックアウトマウス (ホモ・ヘテロ) とその正常同胞マウスの新生児期に 4070A レトロウイルスを感染させた。*Samd9* ノックアウトマウスはホモ・ヘテロともに、生後 9 カ月ごろから 60% 以上の頻度で AML を発症した。

*Miki* は、間期にはゴルジ野に、分裂期には中心体や紡錘糸に局在する。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、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)、ロゼット形成などが出現した。分裂細胞は後期に移行できずに遅滞し、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が観察された。また、キメラノックアウトマウスの骨髓細胞にも、同様の形態異常が認められた。

#### (3) 変異遺伝子の臨床的意義の検討

##### A. TP53 変異の AML/MLD における意義

AML/MLD と診断された 33 例の内、9 例が複雑核型、6 例では数あるいは構造異常が認められ、18 例が正常核型であった。複雑核型 9 例中 7 例で TP53 変異が認められ、これらは *NPM1* 変異 (1 例)、*CEBP/A* 変異 (1 例)、*MLL/PTD* 変異 (2 例) と重複していた。また、複雑核型と TP53 変異の両方を伴う群 7 例中 4 例では先行 MDS が認められた。TP53 変異あるいは複雑核型を有する群では極めて予後不良であった。一方、18 例の正常核型群では、10 例に *NPM1* 変異を認め、最も頻度の高い異常であった。*NPM1* 変異は、*FLT3* 変異 (5 例) や *NRAS* 変異 (2 例) と合併した。また、予後は AML 全体と比較しても遜色なかった。

#### B. JAK2-V617F 変異の意義 (大屋敷)

MDS 症例では 6 例の骨髓線維症移行例のうち 2 例に heterozygous *JAK2-V617F* 変異がみられた。骨髓線維症を併発しなかった 38 例では *JAK2-V617F* 変異は認められなかった。一方、初診時 MDS-RA で経過中に MPD に移行した 1 例では、白血球増加の時期に一致して *JAK2-V617F* 変異が出現していた。

#### (4) MDS 検体集積事業 (三谷・内山)

特発性造血障害に関する調査研究班の「再生不良性貧血と骨髓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」と連携して、MDS に対する遺伝子解析研究を前提とした検体集積事業「骨髓異形成症候群に対する検体集積事業・遺伝子解析研究」を行っている。特発性造血障害に関する調査研究班ならびに本班参加施設を中心に活動しているが、ヒト遺伝子解析研究に関する施設内倫理審査委員会の承認を得た施設数の増加とともに、集積検体数が着実に増加している。また、個別研究としては、「造血管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)、「骨髓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)、「SPARC 発現ネットワーク解析」(東京医科大学 大屋敷一馬)、「骨髓不全症候群の酸化ストレス系遺伝子発現ネットワーク解析」(東京医科大学 大屋敷一馬)が提案されており、今後検体集積に弾みがつくことが予想される。

#### D. 考察

##### (1) ゲノム・miRNA・蛋白異常の網羅的探索

高密度 SNP アレイを用いた網羅的なゲノムコピー数異常およびアレル不均衡の解析から、多数の UPD が同定された。このことは、MDS がゲノム異常の観点から複数の亜型に分類される可能性を示唆している。また、11q の UPD からは責任候補遺伝子 *mids3* が同定された。*mids3* の活性化型変異は 11qUPD 陽性症例のほぼ全例で観察され、造血細胞において強い造腫瘍活性を示すことが証明された。11qUPD を有する MDS は臨床的にも特徴的な一群を形成するが、標的遺伝子が同定されたことにより、その分子診断が可能となった。さらに、今後同変異分子を標的とした有効な分子標的薬が開発されれば、MDS の治癒率向上に貢献することが期待される。

MDS 症例における miRNA の発現解析の結果、*RUNX1* 蛋白の翻訳を負に制御する miRNA が一部の症例で過剰発現していることが示された。*RUNX1* の機能異常を示す MDS は予後不良であることが示されているが、従来より機能失活の原因として示されてい

る遺伝子変異、ドミナント・ネガティブキメラ形成以外に、miRNA の過剰発現も役割がある可能性が示唆された。今後 MDS の分子病態研究は、miRNA の発現異常という新しい切り口でも展開することが期待される。

リン酸化蛋白に対して特異的に結合する蛍光色素を利用して、電気泳動したゲル上でリン酸化蛋白のみを検出することが可能となった。この系を用いて、MDS/AML の CD34 陽性細胞で多数のリン酸化蛋白を同定した。リン酸化は蛋白の機能制御に関わる重要な翻訳後修飾であり、特異的なリン酸化蛋白を同定することにより、MDS の病因・病態が明らかになる可能性がある。

#### (2) 変異遺伝子・分子の機能解析

FLT3 がβ-catenin を基質として直接リン酸化することを明らかにした。白血病・MDS で認められるセリン・スレオニン非リン酸化β-catenin の核内移行には、チロシンリン酸化が関与する可能性が示唆された。Wnt/catenin シグナルは造血幹細胞の生存維持に重要な役割を担っているため、チロシンリン酸化によるβ-catenin の活性化は、MDS 発症の重要なワン・ヒットになっていると考えられる。

予後不良の染色体異常である 7q- の責任候補遺伝子として同定された *Samd9*, *Samd9L*, *Miki* は、その機能解析の結果ヘテロ欠失が MDS の表現型決定に関与し得ることが証明された。*Samd9L* ノックアウトマウスは 4070A レトロウイルスの感染により高率に AML を発症した。*Miki* は動原体や紡錘糸に局在し、染色体の正常な分配をとお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は、分裂異常の結果 MDS 様の形態異常が出現した。*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とともに、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。これらの知見を基礎に、候補三遺伝子のピンポイント欠失の遺伝子診断系を構築することが可能となった。7q- 症例に対する特異的な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。

#### (3) 変異遺伝子の臨床的意義の検討

AML/MLD 症例を MDS 由来例と de novo 例に分けるために、染色体異常、遺伝子変異、予後との関係を検討した。複雑核型及び TP53 変異を有する AML/MLD は MDS から進展した症例が多く、いずれかを有する症例は極めて予後不良であることが明らかにされた。一方、正常核型で *NPM1* 変異陽性症例の予後は、AML 全体と比較しても遜色なかった。*NPM1* 変異は MDS 症例では極めて稀であることから、これは de novo AML/MLD の特徴と考えられた。

*JAK2-V617F* 変異は MDS 症例には稀な異常であるが、MDS/MPD 症例及び骨髄線維症合併 MDS 症例では観察されることから、*JAK2-V617F* 変異の検出は一部の MDS 症例においては診断的価値を有すると考えられた。

#### (4) MDS 検体集積事業

「骨髄異形成症候群に対する検体集積事業・遺伝子解析研究」に基づく検体集積が開始されている。日本独自の分子標的療法を開発するために、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 の分子標的療法の開発を目的として、分子病態研究を推進した。ゲノム異常・miRNA 発現異常・リン酸化蛋白発現異常の網羅的探索を行い、MDS の病因・病態に関与する候補分子の同定に成功した。SNP アレイ解析の結果 11qUPD の原因遺伝子 *mds3* を、miRNA 発現解析の結果 miR-9 の発現異常をそれぞれ同定した。臨床的意義の解析が進めば、これらは病型分類のみならず、治療の層別化に有用なはずである。さらに、同定された候補遺伝子・分子の機能解析も進んでいる。7q- の責任候補遺伝子の機能解析により、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。また、造血幹細胞に生存シグナルを伝えるβ-catenin が、MDS 症例の一部ではチロシンリン酸化により活性化されている可能性が示唆された。これらは独創的な分子標的療法の開発に直結する知見である。臨床研究では、AML/MLD の複雑核型で TP53 遺伝子変異陽性例は MDS から進展例が多いが、*NPM1* 遺伝子変異は de novo 例の特徴であることが明らかにされた。MPD に特徴的な *JAK2* 遺伝子変異は MDS では稀であるが、骨髄線維化に関連して出現することが報告された。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ている。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。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

論文発表

1. Yamagata T, Nakamura Y, Mitani K. Low expression of ETV6/TEL found in patients with myelodysplastic syndrome. *Int J Hematol* 86: 282-285, 2007
2. Tokita K, Maki K, Mitani K. RUNX1/EVI1 that blocks myeloid differentiation inhibits CCAAT-enhancer binding protein a function. *Cancer Sci* 98: 1752-1757, 2007
3. Sasaki K, Yamagata T, Mitani K. Histone deacetylase inhibitors trichostatin A and valproic acid circumvent apoptosis in human leukemic cells expressing the RUNX1 chimera. *Cancer Sci* 99: 414-422, 2008
4. Ishikawa T, Tohyama K, Nakao S, Yoshida Y, Teramura M, Motoji T, Takatoku M, Kurokawa M, Mitani K, Uchiyama T, Omine M. A prospective study of cyclosporine a treatment of patients with low-risk myelodysplastic syndrome: presence of CD55-CD59-Blood cells predicts platelet response. *Int J Hematol* 86: 150-157, 2007
5. Shindo T, Ishikawa T, Fukunaga A, Hori T, Uchiyama T. Growth and Differentiation

- Advantages of CD4+OX40+ T Cells from Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Recipients. *Biol. Blood Marrow Transplant* 14: 268-281, 2008
6. Xu J, Suzuki M, Niwa Y, Hiraga J, Nagasaka T, Ito M, Nakamura S, Tomita A, Abe A, Kiyoi H, Kinoshita T, Naoe T. Clinical significance of nuclear non-phosphorylated beta-catenin in acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 140: 394-401, 2008
7. Iwasaki T, Sugisaki C, Nagata K, Takagi K, Takagi A, Kojima T, Ito M, Nakamura S, Naoe T, Murate T. Wilms' tumor 1 message and protein expression in bone marrow failure syndrome and acute leukemia. *Pathol Int* 57: 645-651, 2007
8. Kajiguchi T, Chung EJ, Lee S, Stine A, Kiyoi H, Naoe T, Levis MJ, Neckers L, Trepel JB. FLT3 regulates beta-catenin tyrosine phosphorylation, nuclear localization, and transcriptional activity in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* 21: 2476-2484, 2007
9. Ito Y, Ohyashiki K, Yoshida I, Takeuchi M, Aoyama Y, Mugitani A, Matsuura Y, Wakita H, Matsuda M, Sakamoto E, Kiguchi T, Urabe A, Tamura K, Kanamaru A, Masaoka T. The prophylactic effect of itraconazole capsules and fluconazole capsules for systemic fungal infections in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes: a Japanese multicenter randomized, controlled study. *Int J Hematol* 85: 121-127, 2007
10. Ohyashiki K, Hori K, Makino T, Ohyashiki JH. Automated JAK2V617F quantification using a magnetic filtration system and sequence-specific primer-single molecule fluorescence detection (SSP-SMFD) *Cancer Genet Cytogenet* 179: 19-24, 2007
11. Ohyashiki K, Tauchi T, Kuroda M, Kodama A, Ohyashiki JH. Recurrent chromosomal aberration at 12q15 in chronic idiopathic myelofibrosis with or without JAK2(V617F) mutation. *Leukemia* 21: 1578-1580, 2007
12. Watanabe-Okochi N, Kitaura J, Ono R, Harada H, Harada Y, Komeno Y, Nakajima H, Nosaka T, Inaba T, Kitamura T. AML1 mutations induced MDS and MDS/AML in a mouse BMT model. *Blood* (in press)
13. Aki D, Minoda Y, Yoshida H, Watanabe S, Yoshida R, Takaesu G, Chinen T, Inaba T, Hikida M, Kurosaki T, Saeki K, and Yoshimura A. Peptidoglycan and lipopolysaccharide activate PLCg2, leading to enhanced cytokine production in macrophages and dendritic cells. *Genes Cells* (in press)
14. Shiseki M, Kitagawa Y, Wang YH, Yoshinaga K, Kondo T, Kuroiwa H, Okada M, Mori N, Motoji T. Lack of nucleophosmin mutation in patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with chromosome 5 abnormalities. *Luek Lymphoma* 48: 2141-2144, 2007
15. Yasunami T, Wang YH, Tsuji K, Takanashi M, Yamada Y, Motoji T. Multidrug resistance protein expression of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leukemia Res* 31: 465-470, 2007
16. Ishikawa T, Tohyama K, Nakao S, Yoshida Y, Teramura M, Motoji T, Takatoku M, Kurokawa M, Mitani K, Uchiyama T, Omine M. A prospective study of cyclosporine A treatment of patients with low-risk myelodysplastic syndrome: presence of CD55-CD59- blood cells predicts platelet response. *Int J Hematol* 86: 150-157, 2007
17. Ogawa S, Nannya, Yamamoto G. Genome-wide Copy Number Analysis on GeneChip Platform Using Copy Number Analyzer for Affymetrix Gene Chip 2.0 Software Method in *Molecular Biology* 369. *Comparative Genomics* 2: 185-206, 2007
18. Yamamoto G, Nannya Y, Kato M, Sanada M, Levine RL, Kawamata N, Hangaishi A, Kurokawa M, Chiba S, Gilliland DG, Koeffler HP, Ogawa S. Highly sensitive method for genomewide detection of allelic composition in nonpaired, primary tumor specimens by use of affymetrix single-nucleotide-polymorphism genotyping microarrays. *Am j Hum Genet* 81: 114-26, 2007
19. 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* 21: 992-997, 2007

#### 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

## II. 分担研究報告

## MDS 症例における microRNA の発現解析

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

近年、いくつかの白血病・リンパ腫において microRNA の異常発現の報告が認められる。一方、骨髄異形成症候群(MDS)においても、その異常発現が病態形成に関与している可能性がある。今回我々は RUNX1 mRNA に作用すると予想される microRNA 10 種について、その発現を MDS 患者の骨髄検体を用いて調べた。10 種の microRNA のうち、miR-9 が 3 例の MDS 症例において異常に高発現していた。これらの患者検体において、RUNX1 mRNA の発現に変化はなかった。また、RUNX1 蛋白の翻訳に対する影響を調べたところ、miR-9 は抑制的に作用することが示された。miR-9 の過剰発現は、RUNX1 やそれ以外の標的 mRNA の機能を抑制して、複雑な MDS の分子病態の一端を担っている可能性が示唆された。

### A. 研究目的

microRNA は約 22 塩基からなる small RNA の一種であり、mRNA の切断や翻訳抑制を介して、遺伝子の機能に抑制的に作用する。一方、microRNA の異常発現は、造血の発生や維持に重要な遺伝子の機能を抑制することにより、造血器腫瘍の発症原因となることが推測される。事実、パーキット型リンパ腫や T 細胞性白血病の一部では、特定の microRNA の高発現がその発症に関与していることが報告されている。そこで我々は、MDS の分子病態の一部に microRNA の異常発現が関与しているのではないかという仮説を立て、その検証を行う目的で実験を行った。研究対象とする microRNA としては、RUNX1 mRNA に作用する可能性がある microRNA を選択した。その理由として、(1)RUNX1 は正常造血発生に重要な役割を果たしていること、(2)その異常が一部の白血病・MDS 発症に深く関与していること、(3)MDS における形態異常に RUNX1 遺伝子変異の関与が示唆されていること、等があげられる。RUNX1 関連 microRNA の中で異常発現しているものに関しては、その microRNA が RUNX1 mRNA の翻訳に及ぼす影響についても検討した。

### B. 研究方法

(1) 今回、RUNX1 関連 microRNA として我々が検討した microRNA は、miR-27a, miR-27b, miR-9, miR-199a, miR-18a, miR-30a, miR-30b, miR-30c, miR-30d, miR-30e の 10 種である。MDS 患者 (RA 4 例, RAEB 9 例, RAEB-t 2 例, CMMoL 1 例) および正常人 (11 例) の骨髄検体より small RNA を抽出し、Taqman 法により microRNA の発現を定量した。具体的

には、目的の microRNA に対する特異的プライマーを用いて逆転写反応を行ったのち、特異的 PCR プライマーを用いて増幅し、さらに特異的 Taqman プローブを用いてシグナルの検出を行った。コントロール RNA としては、同じ small RNA に属する RNU6B, RNU19, Z30 を用いた。microRNA の発現量は、目的とする microRNA のシグナルをコントロール RNA のシグナルで除することにより求めた。(2) 患者検体における RUNX1 の mRNA 量を測定し、microRNA の高発現との相関の有無について検討した。RUNX1 mRNA は定量的 PCR 法を用いて測定した。発現量は  $\beta 2$ -microglobulin mRNA に対する相対的発現量で表した。検出には Applied Biosystems 社の SYBER Green および 7700 Sequence Detector を用いた。(3) 高発現している microRNA の RUNX1 蛋白の翻訳に対する影響を調べた。RUNX1 mRNA の 3' 非翻訳領域をルシフェラーゼ遺伝子の翻訳領域の下流に接続したレポーター・プラスミドを作成し、高発現している microRNA とともに 293 細胞にコトランスフェクションした。また、RUNX1 mRNA の 3' 非翻訳領域の欠失変異体を作成し、microRNA 作用部位の有無により翻訳抑制効果に差が出るかどうかについても検討した。

(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のちに供与を受けた。

### C. 研究結果

(1) 検討した 10 種類の microRNA のうち、miR-27a, miR-27b, miR-199a, miR-18a,

miR-30a, miR-30b, miR-30c, miR-30d, miR-30e の 9 種については、MDS 検体と正常検体との間に有意な発現量の違いを認めなかった。一方、miR-9 については、MDS 患者 16 症例中 3 例において発現が正常検体の平均約 20 倍と異常に亢進していた。この 3 例の病型の内訳は RA 1 例と RAEB 2 例であった。(2) 患者検体における RUNX1 mRNA 量を測定したところ、miR-9 が高発現している 3 例において、特に RUNX1 mRNA の発現が低下しているという傾向は観察されなかった。従って、microRNA の高発現が RUNX1 mRNA を直接破壊している可能性は低いと考えられた。(3) RUNX1 mRNA の 3'非翻訳領域を下流にもつルシフェラーゼ遺伝子は、10 nM の miR-9 の導入により、その活性が 50%以下に減少した。一方、コントロール microRNA のコトランスフェクションでは、そのような効果は認められなかった。また、miR-9 の作用部位を欠失した 3'非翻訳領域変異体では、miR-9 の導入によるルシフェラーゼ活性の抑制効果は見られなかった。

#### D. 考察

MDS 患者の一部に、miR-9 が異常に高発現している症例が認められた。これらの症例では、RUNX1 蛋白への翻訳が抑制されている可能性が示唆された。RUNX1 失活型 MDS は予後不良であるが、RUNX1 の機能的失活は、遺伝子変異・キメラ形成以外に microRNA の発現亢進によっても起こることが明らかになった。miR-9 は必ずしも RUNX1 mRNA のみを標的として機能しているとは限らないが、少なくとも MDS の病態形成の一部を担っている可能性があり、今後の解析が必要であると思われる。

#### E. 結論

一部の MDS 症例において、miR-9 の高発現が認められた。本研究においては、microRNA の異常発現が、特定あるいは複数の標的 mRNA の翻訳を抑制することにより、複雑な MDS の分子病態の一部を形成してい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. Yamagata T, Nakamura Y, Mitani K. Low-level expression of ETV6/TEL in patients with Myelodysplastic syndrome. Int J Hematol.86:282-285, 2007
2. Tokita K, Maki K, Mitani K. RUNX1/EVI1 that blocks myeloid differentiation inhibits CCAAT-enhancer binding protein a function. Cancer Sci 98: 1752-1757, 2007
3. Sasaki K, Yamagata T, Mitani K. Histone deacetylase inhibitors trichostatin A and valproic acid circumvent apoptosis in human leukemic cells expressing the RUNX1 chimera. Cancer Sci. 99: 414-422, 2008

#### 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

## 骨髓異形成症候群の遺伝子解析を目的とした検体集積に関する研究

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

特発性造血障害に関する調査研究班の「再生不良性貧血と骨髓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」と連携して、骨髓異形成症候群に対する遺伝子解析研究を前提とした検体集積事業を行っている。特発性造血障害に関する調査研究班ならびに骨髓異形成症候群に対する病態解明・治療法の開発に関する研究班参加施設において、ヒト遺伝子解析研究に関する施設内倫理審査委員会の承認を得た施設数の増加とともに、集積検体数が着実に増加している。また、本事業で集められた検体を用いて行う遺伝子解析研究の内容がさらに充実した。今後検体収集に弾みがつくことが予想される。

### A. 研究目的

骨髓異形成症候群の発症・進展に至る遺伝子異常の解明、骨髓異形成症候群の正確な診断に役立つ分子指標の同定、適切な治療法選択のための有用な指標の作成、ならびに新規治療法開発のための分子標的の同定のためには、質の高い臨床データに裏打ちされた患者検体の集積と、それらを用いた遺伝子解析研究が不可欠である。現在、特発性造血障害に関する調査研究班で「再生不良性貧血と骨髓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」が行われている。主としてここに登録された骨髓異形成症候群の患者から検体を集積することを目指している。

### B. 研究方法

特発性造血障害に関する調査研究班および骨髓異形成症候群に対する病態解明・治療法の開発に関する研究班参加施設で、「再生不良性貧血と骨髓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」に参加する骨髓異形成症候群患者ならびに同研究には参加しない骨髓異形成症候群の各病型の患者（白血球移行例を含む）のうち、遺伝子解析を前提とした検体集積事業への参加の同意を得た患者を対象とする。診療上の目的での骨髓穿刺の際、検体集積事業用に 2ml の骨髓液を余分に採取し、検体集積施設（獨協医科大学内科学（血液）、京都大学血液・腫瘍内科）で単核球に分離後凍結保存する。現在決定している遺伝子解析研究は、造血器腫瘍における遺伝子異常の網羅的解析、骨髓異形成症候群の分子病態の解析と層別化治療の確立、骨髓異形成症候群の SPARK 発現ネットワーク解析、骨髓不全症候群の酸化ストレス系遺伝子発現ネットワーク解析の 4 つである。検体集積事業事務局は遺伝子解析研究機関の要請に応じて、遺伝子解析施設より伝えられた希望検体に該当する患者検体を選択し、

患者情報とともに提供する。

（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。従って、検体集積事業ならびに遺伝子解析研究において、検体集積施設、個別遺伝子解析研究実施施設のいずれにおいても、検体と患者名の照合は不可能である。

### C. 研究結果

骨髓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は、平成 18 年 6 月に研究計画が確定した。その後本事業は特発性造血障害に関する調査研究班ならびに本研究班参加施設で、ヒト遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会での審査に付され、多くの施設で承認が得られつつある。この間、獨協医科大学および京都大学で先行して検体集積が開始され、着実に検体数の増加が得られている。遺伝子解析研究も、新たに 2 研究が追加された。本研究は特発性造血障害に関する調査研究班の前方視症例登録と連動したもので、症例登録事業も一部施設からの登録が始まったところである。今後前方視的症例登録事業との連携の更なる強化が予定されている。

### D. 考察

多数の患者より疾患横断的な検体集積を行うとともに、病期の進行にそった検体収集により、疾患縦断的な検体集積も予定している。日本全国より収集された臨床情報に裏打ちされた骨髓異形成症候群患者検体は、骨髓異形成症候群に対する病態解明の基盤を形成し、遺伝子解析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る。

## E. 結論

骨髄異形成症候群の発症、進展に関する検討ならびに新規治療法開発を目指した遺伝子解析研究の基盤となる検体集積事業が開始された。来年度以降、特発性造血障害に関する調査研究班の前方視的症例登録が本格化すると予想されるが、それに備えて検体集積事業の準備を整えることができた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Ishikawa T, Tohyama K, Nakao S, Yoshida Y, Teramura M, Motoji T, Takatoku M, Kurokawa M, Mitani K, Uchiyama T, Omine M. A prospective study of cyclosporine a treatment of patients with low-risk myelodysplastic syndrome: presence of CD55-CD59-Blood cells predicts platelet response. Int J Hematol 86: 150-157, 2007

2. Shindo T, Ishikawa T, Fukunaga A, Hori T, Uchiyama T. Growth and Differentiation Advantages of CD4+OX40+ T Cells from Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Recipients Biol. Blood Marrow Transplant 14: 268-281, 2008

### 学会発表

Takatoku M, Uchiyama T, Okamoto S, Kanakura Y, Sawada K, Tomonaga M, Nakao S, Nakahata T, Harada M, Murate T, Ozawa K. : Retrospective survey highlighting the iron burden in Japanese transfusion-dependent patients with MDS. International MDS symposium, May 16-19, 2007, Florence, Italy.

## 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病態解明・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。(1) 幹細胞の維持や悪性化に関わるとされている Wnt/ $\beta$ カテニン経路は、MDS においても活性化している可能性があるため、この活性化機序の検討を行った。野生型 FLT3 のリガンド刺激あるいは活性化変異 FLT3 は、直接 $\beta$ カテニンのチロシン残基のリン酸化を引き起こし、 $\beta$ カテニンの核内移行と転写活性化に関わっていた。(2) AML with multilineage dysplasia(AML/MLD)における遺伝子異常 (NPM1, MLL, AML1, CEBP/A, NRAS, FLT3, TP53) を解析した。TP53/複雑核型タイプは AML/MLD に特徴的で、先行 MDS ありなしに関わらずに認められた。一方、NPM1 変異を伴うタイプは de novo タイプにのみ認められた。TP53/複雑核型タイプは、AML/MLD のなかでも極めて予後不良であった。

### 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)MDS における Wnt/ $\beta$ -catenin 経路の活性化のメカニズムとしてのチロシンキナーゼ経路との関わりを解析した、(2)MDS の特質の一つである「異型性」に着目し、AML with MLD における遺伝子変異を網羅的に解析し、その特性を解析した。

### B. 研究方法

(1)FLT3 変異の確認されている細胞株 MOLM13, MV4;11、野生型 FLT3 を有する THP1、マウス IL-3 依存性細胞株 32D とそれに FLT3/ITD を導入した 32D/FLT3-ITD、野生型 FLT3 を導入した 32D/Wt-FLT3 を細胞として用いた。抗体は FLT3、 $\beta$ カテニン、リン酸化チロシンなどに対する市販されているモノクロナール抗体を用い、免疫沈降法、免疫プロット、免疫染色、を行った。In vitro kinase assay には市販のレコンビナント $\beta$ カテニンと FLT3 を用いた。

(2)これまで名大病院でフォローされている AML のなかから、AML with MLD として診断された症例の内、細胞保存されている症例並びに済生会前橋病院、長崎大学から共同研究で資料の提出を受けた症例を対象とした。NPM1, MLL, AML1, CEBP/A, NRAS, FLT3, TP53 の変異は、これまでの方法に従い、PCR 増幅の後、一部は WAVE 法でスクリーニングを行い、Direct sequence 法で変異部位の解析を行った。

### (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」(名大承認番号 328)を得て行っている。

### C&D. 研究結果ならびに考察

(1)細胞株を抗 $\beta$ カテニン抗体で免疫沈降し、抗リン酸化チロシン抗体で免疫プロットすると、FLT3 の活性化している MOLM13 および 32D/FLT3-ITD で、チロシンリン酸化された $\beta$ カテニンが同定された。これは FLT3 キナーゼ阻害剤 PKC412、AG1296 ならびに FLT3 に対する siRNA で抑制された。一方、野生型 FLT3 を発現している THP1 ならびに 32D/Wt-FLT3 はリガンド刺激で $\beta$ カテニンのチロシンリン酸化が促進された。チロシンリン酸化した $\beta$ カテニンは核に移行し、 $\beta$ カテニンの標的遺伝子である c-MYC や cyclin D1 の転写を上昇させた。 $\beta$ カテニンは免疫沈降・免疫プロット法で、FLT3 と結合していたので、 $\beta$ カテニンが FLT3 キナーゼの直接の基質となりうるか否かを in vitro kinase 法で確認した。これらの FLT3 活性化による $\beta$ カテニンのチロシンリン酸化が臨床検体でも起きていることを、AML4 例における骨髄細胞で確認した。以上より、白血病・MDS で認められる $\beta$ カテニンのセリン・スレオニン残基非リン酸化核内移行には、チロシンリン酸化による機序が関与する可能性が考えられた。現在、リン酸化チロ

シン部位とβカテニン安定化に与える影響を解析している。

(2)2001年に提案されたWHO分類は、AMLのなかで芽球以外の背景細胞の異形成によって特徴づけられる疾患群(acute myeloid leukemia with multilineage dysplasia, AML/MLD)を新たに定義した。2008年改訂予定の分類でも、AMLにおける基本的な考え方は変わらず、AMLの中から治療関連AMLならびによく認められる染色体相互転座AMLを除いた後、MDSから移行するAMLならびにAMLの芽球背景にDysplasiaがある場合を合わせて、AML/MLDとしている。その結果、MDSとAMLとの異同は芽球が20%を超えるか否かで決まることになるが、AMLのなかでMLDのある疾患の分子病態の特徴を明らかにし、この疾患群がどのような疾患単位から形成されるのかを解析することで、最終的にはMDSにおけるハイリスク群の同定を行おうと考えた。AML/MLDと診断された33例の内、9例が複雑核型、6例が数あるいは構造異常が認められ、18例が正常核型であった。複雑核型9例中7例でTP53変異が認められ、これらはNPM1変異(1例)、CEBP/A(変異1例)、MLL/PTD(2例)と重複していた。また複雑核型・TP53変異両方をもとめる群7例中4例では先行MDSが認められた。TP53変異あるいは複雑核型を有する群では極めて予後不良であった。一方、18例の正常核型群では、10例にNPM1変異を認め、最も頻度の高い異常であった。NPM1変異は、FLT3変異(5例)やN-RAS変異(2例)と合併した。また予後は、AML全体と比較しても遜色なかった。これまでNPM1変異はMDSには極めて少ないことから、これらはde novoタイプのAML/MLDの特徴と考えられた。TP53と合併する変異は、NPM1、AML1、MLL/PTDさらにN-RASやFLT3で、TP53変異はいわゆるクラスI、クラスIIとは独立した変異であろうと考えられた。

## E. 結論

(1)白血病・MDSで認められるβカテニンの核内移行には、今回見出されたチロシンリン酸化による新しい機序が関与する可能性が考えられた。

(2)AML/MLDは遺伝子・染色体異常からみると、不均一な疾患であった。異形成・複雑核型・TP53変異によって形成される疾患は、AML/MDSにおける独立した単位を形成するかもしれない。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

論文発表

1. Xu J, Suzuki M, Niwa Y, Hiraga J, Nagasaka T, Ito M, Nakamura S, Tomita A, Abe A, Kiyoi H, Kinoshita T, Naoe T. Clinical significance of nuclear non-phosphorylated beta-catenin in acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome. Br J Haematol 140: 394-401, 2008
2. Kajiguchi T, Chung EJ, Lee S, Stine A, Kiyoi H, Naoe T, Levis MJ, Neckers L, Trepel JB. FLT3 regulates beta-catenin tyrosine phosphorylation, nuclear localization, and transcriptional activity in acute myeloid leukemia cells. Leukemia 21: 2476-2484, 2007
3. Iwasaki T, Sugisaki C, Nagata K, Takagi K, Takagi A, Kojima T, Ito M, Nakamura S, Naoe T, Murate T. Wilms' tumor 1 message and protein expression in bone marrow failure syndrome and acute leukemia. Pathol Int 57: 645-651, 2007

## 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 JAK2-V617F 変異 — 慢性骨髄増殖性疾患での意義との比較 —

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

診断的根拠としても重要な変化として着目されている JAK2 (Janus activating kinase 2) -V617F 変異につき、骨髄異形成症候群 (MDS) 患者を対象に行なった。MDS では 6 例の骨髄線維症移行例のうち 2 例に JAK2-V617F 変異がみられ、1 例は MDS-RA 経過後 6 年後に骨髄線維症を併発した症例であった。骨髄線維症を併発しなかった MDS の 38 例では JAK2-V617F 変異なし。一方、初診時に MDS-RA で経過中に MPN に移行した 1 例では白血球増加の時期に一致して JAK2-V617F 変異が出現した。MDS で JAK2-V617F 変異が見られた症例は全て、heterozygous JAK2-V617F 変異であった。JAK2-V617F 変異は MDS 患者には極めて稀な異常であるが、MDS・MPN の症例の一部、および MDS 骨髄線維症合併例ではみられることから、JAK2-V617F 変異の検出は一部の MDS 患者においては診断的価値を有すると考えられた。

### A. 研究目的

近年、慢性骨髄増殖性疾患 (chronic myeloproliferative neoplasia: MPN) の病態として JAK2 (Janus activating kinase 2) -V617F 変異による JAK2 の恒常的活性化が知られ、診断的根拠としても重要な変化として着目されている。MPN の病態の一つとして原発性骨髄線維症があるが、骨髄線維症は骨髄異形成症候群 (MDS) でもみられる病態の一つである。一方、稀に MDS から MPD への病型移行の症例もみられることが知られている。さらに RARS-T の 50%では JAK2-V617F 変異が検出されている。そこで MDS 患者および MDS/MPD 症例に JAK2 について検討した。

### B. 研究方法

対象および方法：当科で診断し、経過観察している MPD 症例 (96 例：内訳は真性赤血球増加症 (PV)：33 例、特発性血小板増加症 (ET) 54 例、骨髄線維症 (CIM) 9 例) および MDS 44 例 (内 6 例は骨髄線維症合併例) につき、JAK2 変異を SSP-SMFD (semiquantitative sequence-specific primer-single molecule fluorescence detection assay) 法 [1] を用いて検討した。尚、検討に際しては被験者本人よりの同意を得て行なった。

### C. 研究結果

JAK2-V617F 変異は PV では骨髄線維症への移行リスクとなり、ET では経過中の血栓症リスクとなる [2-4]。

一方、MDS では 6 例の骨髄線維症移行例のうち 2 例に JAK2-V617F 変異がみられ、1 例は MDS-RA 経過後 6 年後に骨髄線維症を併発した症例であった。さらに、この 1 例および CIM の 2 例に JAK2-V617F 変異の有無と無関係な 12q15 の染色体転座が確認された [5]。骨髄線維症を併発しなかった MDS の 38 例では JAK2-V617F 変異なし。一方、初診時 MDS-RA で経過中に MPN に移行した 1 例では白血球増加の時期に一致して JAK2-V617F 変異が出現した。MDS で JAK2-V617F 変異が見られた症例は全て、heterozygous JAK2-V617F 変異であった。

### D. 考察

JAK2-V617F 変異は MDS 患者には稀な異常であるが、MDS・MPN の症例の一部、および MDS 骨髄線維症合併例ではみられることから、JAK2-V617F 変異の検出は一部の MDS 患者においては診断的価値を有すると考えられた。

### E. 結論

今後、MDS・MPN 患者で JAK2-V617F 変異を対象とした治療の可能性があることが示唆された。MDS 患者における JAK2-V617F 変異の検出は骨髄増殖性疾患への移行を示唆する所見であり、血液学的変動が顕著な場合には、試みる検査と思われる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Ohyashiki K, Hori K, Makino T, Ohyashiki JH. Automated JAK2(V617F) quantification using a magnetic filtration system and sequence-specific primer-single molecule fluorescence detection. *Cancer Genet Cytogenet* 179: 19-24, 2007

2. Ohyashiki K, Aota Y, Akahane D, Gotoh A, Ohyashiki JH. JAK2(V617F) mutational status as determined by semiquantitative sequence-specific primer-single molecule fluorescence detection assay is linked to clinical features in chronic myeloproliferative disorders. *Leukemia* 21: 1097-1099, 2007

3. Ohyashiki K, Akahane D, Gotoh A, Ito Y, Tauchi T, Miyazawa K, Kimura Y, Ohyashiki JH. Uncontrolled thrombocytosis in polycythemia vera is a risk for thrombosis, regardless of JAK2(V617F) mutational status. *Leukemia* 21: 2544-2545, 2007

4. Ohyashiki K, Ito Y, Hori K, Sato K, Makino T, Ohyashiki JH. Thrombosis can occur at any phase of essential thrombocythemia with JAK2(V617F) mutation: a single institutional study in Japan. *Leukemia* 21: 1570-1571, 2007

5. Ohyashiki K, Tauchi T, Kuroda M, Kodama A, Ohyashiki JH. Recurrent chromosomal aberration at 12q15 in chronic idiopathic myelofibrosis with or without JAK2(V617F) mutation. *Leukemia* 21: 1578-1580, 2007

## 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病態解明・治療法の開発に関する研究

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

独自開発した短プローブ・マイクロアレイ CGH 法を用い、7 番染色体長腕(7q)より MDS を抑制する三候補遺伝子 (*Samd9*, *Samd9L*, *LOC253012* = *Miki*) を単離した。これらは隣接して存在し、ほとんど研究の対象となつてこなかったものである。*Samd9* と *Samd9L* は共通の祖先遺伝子より進化した、互いに 75% のアミノ酸相同性を持つ関連タンパク質をコードしている。マウスでは *Samd9L* に相当する遺伝子のみが存在するが、*Samd9L* 遺伝子欠損マウスにレトロウイルスを感染させたところ、非常に高率に AML を発症することから、本遺伝子の欠損は MDS や AML の発症に関与するものと考えられた。これらのタンパク質の機能の解明は今後の課題である。一方 *Miki* は、分裂期の中心体や紡錘糸に局在し、その発現抑制により、中心体成熟障害が生じる。その結果、紡錘糸の張力低下を生じて染色体が赤道面に整列せず、染色体遅延や散乱（コルヒチンミトーゼ）などの異常な分裂像を生じ、二核・多核・小核細胞など MDS に特徴的な形態異常を示した。これらの結果により、三遺伝子はいずれも 7q 欠失責任遺伝子である可能性が非常に高いと考えられた。

### A. 研究目的

MDS の主要な原因である染色体（部分）欠失により欠損する発がん抑制遺伝子（責任遺伝子）を同定するため、われわれは 2001 年より微小染色体欠損を高感度に同定できる短プローブ・マイクロアレイ CGH システムの開発を進めた。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、隣接する三新規遺伝子 (*Samd9*, *Samd9L*, *LOC253012* = *Miki*) を単離した。これらは脊椎動物にのみ存在し、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。

*Samd9* と *Samd9L* は共通の祖先遺伝子より進化した、相互に 75% のアミノ酸相同性を持つ関連タンパク質をコードしており、*Samd9* の点変異がユダヤ人のまれな遺伝性疾患 Normophosphatemic Familial Tumoral Carcinosis で報告されている。また、マウスは *Samd9L* に相当する遺伝子のみを有し、*Samd9* に相当する遺伝子は持たない。

本報告書では、今年度に解明された成果を中心にこれらの遺伝子産物の解析結果を記載する。

### B. 研究方法

一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、レトロウイルス、siRNA、shRNA による遺伝子発現促進・抑制細胞実験系による解析と、定法にもとづく遺伝子欠損マウスの作成とその解析を行った。

### C. 研究結果

*Samd9L* 欠損マウス（ホモ、ヘテロ）とその正常同胞マウスの新生児期に 4070A レトロウイルスを感染させた。繁殖される MMLV が、主としてリンパ系の腫瘍を正常マウスにも高頻度に発生させるのとは対照的に、本ウイルスは骨髄性白血病を発生させるが、正常マウスではその頻度が比較的低い。*Samd9* 欠損マウスはホモ・ヘテロともに、生後 9 カ月ごろから白血球増加、貧血、血小板の減少をきたし、骨髄で *Mac1+Gr1+* 芽球の増加を認める AML をきわめて高頻度 (> 60%) に発症した。レトロウイルス挿入部位の解析の結果、すでにいくつかの興味深い共通挿入部位を得ており、詳細な検討を進めている。

一方 *Miki* は、間期にはゴルジ野に、分裂期には中心体や紡錘糸に局在する。*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、染色体が紡錘糸極に対し、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。また、*Miki* の 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。

### D. 考察

近年 5q 責任遺伝子の単離が進んでいるが、広範囲に複数の責任遺伝子が散在する図式が

浮かび上がってきた。7q も同じとすれば、三遺伝子はこうした責任遺伝子（群）の有力な候補であろう。Samd9/Samd9L は遺伝子欠損マウスの AML 多発という直接的な証拠が得られたので、さらに Samd9LMiki ダブルノックアウトマウスの作製や種々の遺伝子改変マウスとのかけ合わせを進めており、すでに興味深い結果が得られつつある。ただ、その分子・細胞レベルの機能は現時点で推測の域を出ておらず、今後の検討課題である。一方、Miki 発現抑制が誘導する異常分裂は、MDS に高頻度に見られる多核細胞や核形態異常のみならず、細胞死を引き起こして無効造血の原因に、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、異型性・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、迅速遺伝子診断法を確立により、染色体欠損が確認できない MDS 症例における三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考えている。治療面では Miki の機能を促進し、中心体形成を促す化合物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 の異型性を改善し、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 抑制遺伝子の有力三候補を同定した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

論文発表

1. Watanabe-Okochi N, Kitaura J, Ono R, Harada H, Harada Y, Komeno Y, Nakajima H, Nosaka T, Inaba T, Kitamura T. AML1 mutations induced MDS and MDS/AML in a mouse BMT model. Blood, in press

2. Aki D, Minoda Y, Yoshida H, Watanabe S, Yoshida R, Takaesu G, Chinen T, Inaba T, Hikida M, Kurosaki T, Saeki K, and Yoshimura A. Peptidoglycan and lipopolysaccharide activate PLCg2, leading to enhanced cytokine production in macrophages and dendritic cells. Genes Cells, 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髄異形成症候群関連蛋白の 同定とその解析

分担研究者 泉二 登志子 東京女子医科大学血液内科 教授

### 研究要旨

骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndromes :MDS)の病態に関与する分子異常を、プロテオミクスの手法を用いて探索した。MDS から白血病に移行した患者および正常の CD34 陽性細胞由来蛋白を用いて二次元電気泳動を行い、ゲルをリン酸化蛋白を特異的に認識する蛍光試薬で染色し、検出されたスポットについて質量分析を行った。その結果、MDS 患者の CD34 細胞に存在する様々なリン酸化蛋白の同定が可能であった。本法を用いて MDS の CD34 陽性細胞におけるリン酸化蛋白の発現異常について、現在解析中である。

### A. 研究目的

細胞内で多種多様な機能を担っている蛋白は、その蛋白をコードする遺伝子情報に基づく翻訳後にさまざまな修飾、たとえばリン酸化や糖鎖の付加を受けることにより、その機能を発現している。そして、さまざまな疾患の病因、病態には細胞内蛋白の翻訳後修飾の異常が大きく関与していることが知られている。とくにキナーゼおよびホスファターゼによる蛋白のリン酸化、脱リン酸化は、その蛋白の機能発現や細胞内局在などを制御しており、それらに異常が起これば細胞機能やシグナル伝達に異常を来し、腫瘍の発生につながると考えられている。

本研究はプロテオミクス解析の手法を用いて骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndrome:MDS)の幹細胞/前駆細胞レベルの細胞(CD34 陽性細胞)に存在するリン酸化蛋白を同定、解析し、MDS の病因・病態を明らかにすること目的とした。

### B. 研究方法

MDS 患者の末梢血あるいは骨髄液から比重遠心法により単核球を分離し、イムノビーズ法を用いて CD34 陽性細胞を純化した。その細胞から蛋白を抽出した後、二次元電気泳動を行った。泳動後、リン酸化蛋白を検出するために Pro-Q® Diamond Phosphoprotein Gel Stain (Invitrogen) を行い、image analyzer FLA-5000 (Fujifilm) を用いてリン酸化蛋白スポットを検出した。画像取り込み後、同一ゲルに対して SYPRO® Ruby Protein Gel Stain(Invitrogen) を行い、同様に image analyzer にて全蛋白スポットを検出した。引き続き Pro-Q® Diamond 染色で検出されたスポットをゲルから切り出してトリプシン消化後、MALDI-TOF (autoflex II TOF/TOF:BRUKER DALTONICS) を用いてペプチドの質量分析を行った。得られた分析データについてペプチドデータベース(MASCOT)を用いて解析し、蛋白を同定した。また、リンパ腫などの患者で病期決定のために施行した

骨髄検査の際に提供を受けた骨髄液、あるいは自家移植目的のために採取した末梢血幹細胞で廃棄処分になったものから CD34 細胞を分離し、正常 CD 34 陽性細胞として同様な解析を行い、MDS 患者由来の CD34 陽性細胞の解析データと比較検討した。

(倫理面への配慮)

患者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検体の提供を受けた。

### C. 研究結果

CD34 細胞を用いて蛋白解析するためには、多くの細胞が必要であることから、最初に、MDS から白血病に移行した (MDS overt leukemia : MDS/ OL) 患者の CD34 陽性細胞を対象として解析した。CD34 陽性細胞由来蛋白の二次元電気泳動したゲルに対して Pro-Q® Diamond 染色を行ったところ、多数のスポットが認められた (図1右)。さらに、SYPRO® Ruby 染色を行うと、検出されたスポットが蛋白であることが確認された (図1左)。

図1. MDS/OL患者の二次電気泳動

表1. MDS/OLにおいて検出されたスポットの質量分析結果

Protein
14-3-3 protein epsilon
calreticulin precursor
tropomyosin 3
Splicing factor, arginine/serine-rich 1
N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein, alpha
F-actin capping protein alpha-1 subunit
protein phosphatase 1, regulatory subunit 7
heterogenous nuclear ribonucleoprotein K
TALDO1
enolase 1
Acidic nuclear phosphoprotein pp32