

200834014A

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20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 三谷 絹子

平成21(2009)年3月

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 20 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 三谷 絹子
平成 21 (2009) 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と白血病における microRNA 発現の比較
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. 骨髓異形成症候群患者に認められた t(12;17) 染色体異常により生じる
新規 *TEL* 融合遺伝子の解析
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. Deferasirox の抗白血病効果
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
東京大学医学部附属病院がんゲノミクスプロジェクト 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 綱子 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。米国では分子標的薬メチル化阻害剤およびレナリドマイドがFDAにより承認されているが、日本でもこれらの薬剤の臨床治験が開始されている。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ている。(1)においては、miRNA発現解析の結果、RUNX1蛋白の翻訳を阻害するmiR-9の発現がMDS及びAMLの一部の症例で異常に亢進していることを明らかにした。さらに、リン酸化蛋白の発現解析の結果、MDS/AMLのCD34陽性細胞で発現が増加するものとしてtropomyosin 3 isoform 2、splicing factor、arginine/serine-rich 2、発現が減少するものとしてcofilin 1、heterogenous nuclear ribonucleoproteins c1/c2 variantがそれぞれ同定された。(2)においては、MDS/AMLで観察されたt(12;17)(p13;q11)より新規アンチセンスキメラ遺伝子TEL-TAO1rが同定された。TEL-TAO1rが野生型TAO1 mRNAに対してアンチセンスとして働くことが、MDSの進展に関与する可能性が示唆された。また、7qの責任候補遺伝子Titanの機能を発生工学的に解析した。新生仔期のTitan遺伝子欠損マウスにレトロウイルス4070Aを感染させたところ、ほぼ全個体が骨髄性の白血病を発症した。レトロウイルスの挿入部位を解析したところ、Evi1遺伝子とヒストン脱メチル化酵素をコードするFbx10遺伝子が同定された。Titan遺伝子とこれらの遺伝子の発現異常が協調的に作用して、7q型MDSを発症・進展させると考えられた。さらに、経口除鉄剤(deferasirox)による抗白血病効果を検証した。DeferasiroxはREDD1発現亢進、mTOR抑制、S6キナーゼ抑制を介して白血病細胞株にアポトーシスを誘導することから、除鉄効果のみならず抗白血病効果も期待し得ることが明らかとなった。(3)においては、高密度SNPアレイ(Affymetrix社)を用いた171例のMDS検体のゲノムコピー数異常・アレル不均衡の解析結果を従来の古典的な染色体分析の結果と比較検討した。染色体分析で正常核型と判定された74例のうち43例でSNPアレイ解析により異常が検出されるとともに、片親性二倍体(aUPD)が全症例の30%に検出された。今後これらのゲノム異常とMDSの臨床像との関連を検討し、層別化治療の基礎を構築する予定である。最後に、本邦における独自の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)が進行中であり、61症例の検体が集積されている。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
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 | ・泉二登志子
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
東京大学医学部附属病院
がんゲノミクスプロジェクト 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(前駆で臨床試験実施、保険適応なし)、免疫抑制療法シクロスポリン(前駆で臨床試験実施、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。本邦でもこれらの分子標的薬の臨床試験が開始されているが、新規薬の開発には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ものである。

B. 研究方法

(1)ゲノム・miRNA・蛋白異常の網羅的探索

A. miRNAの探索(三谷)

*RUNX1*はMDSにおいて、自身の遺伝子変異およ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。MDS症例16例、白血病症例3例と正常人11例の骨髄細胞を用いて、*RUNX1* mRNAの3'非翻訳領域に認識配列の存在するmiRNA(miR-27a, miR-27b, miR-9, miR-199a, miR-18a, miR-30a, miR-30b, miR-30c, miR-30d, miR-30e)の発現の変化を定量的PCR法を用いて検討した。

B. 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症例および正常人の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-Q² Diamond Phosphoprotein Gel Stain (Invitrogen)およびSYPRO² 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、MDS/AML細胞で発現が変化

しているリン酸化蛋白を同定した。

(2)変異遺伝子・分子の機能解析

A. *TEL-TAO1r*の同定と機能解析(直江)

t(12;17)(p13;q11)を保有するMDS/AMLの骨髄細胞を用いてFISH解析を行うことにより、12p13の転座切断点が*TEL*遺伝子内に存在することが明らかになった。3' RACE法により*TEL-TAO1r*アンチセンスキメラ遺伝子を同定した。*TEL-TAO1r*発現に伴う野生型*TAO1*蛋白の発現変化をウエスタン解析により検討した。

B. 7q-の候補遺伝子*Titan*の機能解析(稲葉)

常法に基づいて*Titan*遺伝子欠損マウスを作製した。新生仔期にレトロウイルス4070Aを感染させて白血病発症の有無を観察するとともに、レトロウイルス挿入部位をinverse PCR法・サザンブロット法で同定した。

C. Deferasiroxの抗白血病効果の検討(大屋敷)

白血病細胞株(K562, U937, HL-60)を用いて細胞増殖抑制効果、caspase-3の活性化効果、アポトーシス誘導効果を検証後、Gene Chip(U133 plus 2.0)にてdeferasirox投与による遺伝子発現変化を解析して標的遺伝子を絞り込んだ。MDS症例の末梢血単核球を用いて標的遺伝子の発現変化を確認した。さらに、K562細胞株にシグナル伝達系と標的遺伝子に対するsiRNAを導入して、遺伝子発現変化を検討した。また、U937担瘤ヌードマウスを用いて、deferasirox経口投与後の腫瘍縮小効果および病理学的変化を観察した。

(3)ゲノム異常の臨床的意義の検討(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い、その結果を通常の染色体分析の結果と比較した。

(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. miRNAの探索(三谷)

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症例と正常人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MDS16症例中3例において発現が正常人の平均約20倍と異常に亢進していた。この3例の病型の内訳はRAEB2例、RA1例であった。白血病症例においては、MDS症例と同様にmiR-9の高発現が33例中3例に認められた。また、これとは別に、miR-27aの発現がAML症例では高く、急性リンパ性白血病(ALL)や混合性白血病(MLL)症例では低い傾向が認められた。

B. リン酸化蛋白の探索 (泉二)

MDS/AML患者のCD34陽性細胞由来蛋白を二次元電気泳動したゲルに対してPro-Q² Diamond染色を行い、多数のスポットを検出した。そのスポットを切り出し、質量分析をしたところ、細胞骨格、酵素、遺伝子発現制御、細胞周期、プロテアソームに関連する様々な蛋白が同定された。MDS/AML症例と正常のCD34陽性細胞のリン酸化蛋白のスポットを比較検討した結果、MDS/AML細胞において発現が増減している蛋白が認められた。それらの中で、特に発現が増加していたものは tropomyosin 3 isoform 2、splicing factor、arginine/serine-rich 2 であり、減少していたものは cofilin 1、heterogenous nuclear ribonucleoproteins c1/c2 variant であった。

(2) 変異遺伝子・分子の機能解析

A. *TEL-TAO1r* の同定と機能解析 (直江)

TEL-TAO1r アンチセンスキメラ遺伝子では、*TEL* のエクソン2の3'端が *TAO1* 遺伝子のイントロンの相補鎖配列に移行し、その3'側に同遺伝子のエクソンの相補鎖配列が挿入された。*TEL* 融合蛋白のアミノ酸配列は、転座部位から16アミノ酸で終止コドンとなることが予想された。患者検体における *TAO1* 蛋白の発現は正常骨髄や白血病細胞株に比べて有意に低く、融合遺伝子に存在する *TAO1* 遺伝子の相補鎖配列が野生型 *TAO1* mRNA に対してアンチセンスとして働く可能性が示唆された。*TEL-TAO1r* 発現ベクターを293T細胞で強制発現させると、野生型 *TAO1* の発現は *TEL-TAO1r* の濃度依存性に低下した。他のMDS/AML症例の骨髄検体を用いて *TAO1* 蛋白の発現レベルを検討したところ、正常検体や白血病細胞株に比べて発現が低い傾向が認められた。

B. 7q-の候補遺伝子 *Titan* の機能解析 (稲葉)

Titan 欠損マウス (ホモ、ヘテロ) はメンデルの法則に従って誕生し、1年半程度の観察期間中異常は示さなかった。新生仔期にレトロウイルス4070Aを感染させた *Titan* 欠損マウスは、ホモ・ヘテロともに生後8カ月ごろから白血球増加、貧血、血小板減少をきたし、最終的にはほぼ全個体が骨髄性白血病を発症した。これに対し、正常同胞群でAMLを発症したのは1個体のみであった。*Titan* 欠損マウスが発症した白血病の病型は典型的なAML、分化傾向の強いCML、または異形成の強いMDSなど多彩であった。レトロウイルス挿入部位の解析の結果、6個体で *Evi1* 遺伝子に挿入を認めたほか、3個体でヒストン脱メチル化酵素をコードする *Fbx10* 遺伝子に挿入が認められた。ウイルス挿入部位はいずれも第1エクソンの上流付近に集中しており、real-time RT-PCR解析によりmRNAの過剰発現が認められた。

C. Deferasirox の抗白血病効果の検討 (大屋敷)

白血病細胞株 K562、U937 及び HL-60 において、deferasirox 投与に伴う caspase-3 の活性化およびアポトーシス誘導を認めた。遺伝子発現プロファイルにより、mREDD1 を標的として mTOR、S6 キナーゼが抑制されることにより抗腫瘍効果が発揮されることが明らかになった。さらに、U937 担癌マウスモデルにおいて、deferasirox による腫瘍細胞のアポトーシス亢進と腫瘍の縮小が確認された。

(3) 変異遺伝子の臨床的意義の検討 (小川)

染色体分析で正常核型と判定された75例(43.3%)の

うち43例でSNPアレイ解析による異常が検出された。また、各染色体別にみた異常の検出率は、SNPアレイによる解析が平均で2.59倍であり、すべての染色体でSNPアレイの検出率が従来の核型分析を上回っていた。もっとも顕著な相違は片親性二倍体(aUPD)の検出で、従来の核型分析では原理的に同定不可能であるが、SNPアレイ解析で30%の症例に検出された。

(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」と連携したMDS症例の検体集積事業を行っている。各施設での倫理審査が進んだ結果、今年度は多くの検体が集積された。平成20年末までに集積されたWHO分類別の検体数は、RA 8検体、RCMD 4検体、RAEB-1 11検体、RAEB-2 15検体、CMML 2検体、AML 16検体の計61検体である。また、新規登録検体の一部を用いて「高密度SNPアレイを用いたMDSのゲノムコピー数異常・アレル不均衡解析研究」(東京大学小川誠司准教授)への提供を開始し、24検体で実施された。ゲノム異常の有無は実診療の場においても有意義な情報となり得るため、この解析結果は事務局を介して速やかに検体送付施設に返却されている。詳細なゲノム情報の判明した検体は、各種遺伝子解析研究の施行にあたっても有用性が高く、今後の遺伝子解析研究の充実が期待される。

D. 考察

(1) ゲノム・miRNA・蛋白異常の網羅的探索

MDS及びAML症例におけるmiRNAの発現解析の結果、RUNX1蛋白の翻訳を阻害するmiR-9が一部の症例で過剰発現していることが示された。miR-9は癌遺伝子であるMYCの下流に存在するmiRNAであり、何種類かの腫瘍でその高発現が癌化に関与していることが知られている。MDSおよび白血病においてmiR-9が腫瘍化に関与しているか否かは今後明らかにしていく必要がある。また、AMLにおいてはmiR-27aが高発現している傾向があり、骨髄性白血病の発症に関与している可能性が示された。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、二次元電気泳動したゲル上でリン酸化蛋白をスポットとして検出することが出来る。このスポットを質量分析することにより、リン酸化蛋白を網羅的に同定することが可能となった。この系を用いて、MDS/AMLのCD34陽性細胞で異常発現しているリン酸化蛋白が複数同定された。これらのリン酸化蛋白の中にはMDSの病因、病態に深く関与する蛋白が存在している可能性があると考えられる。今後、これらのリン酸化蛋白について、多数の症例を用いて発現を検討するとともに、その遺伝子解析および機能解析を行う予定である。

(2) 変異遺伝子・分子の機能解析

t(12;17)(p13;q11)陽性MDS/AML細胞より、*TEL-TAO1r* アンチセンスキメラ遺伝子が同定された。*TEL-TAO1r* は野生型 *TAO1* mRNA に対してアンチセンスとして働き、*TAO1* 蛋白の発現を低下させた。*TAO1* は、p38 MAPキナーゼ経路におけるMAPKKKの一つで、DNA損傷などのストレスに反応するセリ

ン・スレオニキナーゼである。また、細胞分裂におけるスピンドルチェックポイントに重要な役割を果たすため、MDSの特徴とされる異形成や細胞増殖異常、遺伝子異常の蓄積などにおけるTAO1の発現低下の関与についての検討が今後の課題となる。また、TEL-TAO1rのようなアンチセンスキメラ遺伝子の形成が、MDSを含む血液腫瘍で他にも観察される分子病態であるのかどうかに興味を持たれる。

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=Kasumi, Samd9L=Titan, Mikiの機能解析が進行中である。Titan欠損マウスは4070Aレトロウイルスの感染により高率にAMLを発症した。Titan欠損マウスで発症する白血病は、形態、表面抗原ともに多彩である点で、ヒト-7/7q-型白血病の特徴を備えている。さらに、ヘテロ・ホモ欠失マウスともに同時期に白血病を発症する上、ヘテロ欠失マウスで生じた白血病細胞ではTitanの発現が維持されていることから、Titanの片アレルの欠失による発現低下が白血病発症に関与すること(haploinsufficient効果)が示唆された。一方、レトロウイルス挿入サイトの検索により、Evi1とFbx10の二つが共通挿入遺伝子座として同定された。Evi1はヒトAMLでも高頻度に過剰発現やキメラ遺伝子の形成が認められる遺伝子であり、7qの協調遺伝子として有力である。Fbx10はjumonji familyに属するヒストン脱メチル化酵素をコードしており、エピゲノム制御異常がMDSの病態形成に重要な役割を果たしている可能性がある。

経口除鉄剤であるdeferasiroxのin vitroおよびin vivoにおける抗白血病効果が確認された。この効果は、REDD1発現亢進、mTOR抑制、S6キナーゼ抑制を介するアポトーシスの誘導によるものであった。DeferasiroxはMDS症例に造血改善効果を示すが、これは抗腫瘍効果に関連するものである可能性が示唆された。今後deferasirox投与前後における遺伝子発現の変化を解析することにより、造血改善効果予測のためのマーカーを同定することを計画している。

(3)変異遺伝子の臨床的意義の検討

MDSは、臨床病理学的に極めて多様性の大きな疾患群である。治療法選択の観点からは、現在、血球減少を示す系統数と芽球の割合および染色体異常を加味したIPSS分類が広く日常診療で用いられている。しかしながら、今回の解析結果から、染色体分析においては検出されないゲノム異常が多数存在することが明らかになった。このことは、染色体分析が有糸分裂の頻度に依存していること、aUPDを含む微細な異常は検出不可能なことなどに起因していると思われる。通常の染色体分析とSNPアレイで異常の検出感度が大きく異なることは、SNPアレイ解析により検出されるゲノム異常を考慮することにより、より精度の高い予後予測システムが構築可能であると考えられる。

(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」に基づく検体集積を実施している。各施設での倫理審査が進んだ結果、多くの検体が集積されるようになった。また本年度より、本事業に検体が供与された場合には、可及的速やかに高密度SNPアレイ解析を実施して詳細なゲノム情報を供与施設に返却するシステムが稼働している。このことにより、検体集積が加速すると

ともに、臨床情報とゲノム情報の照合が進み、治療開発のための分子標的の同定が大きく前進することが期待される。さらに、来年度には、個別研究課題に対して検体の配布が行われ、遺伝子解析研究という新たなステージに本事業が発展する予定である。

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。染色体転座解析の結果アンチセンスキメラ遺伝子TEL-TAO1r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、エピゲノム制御異常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、deferasiroxの造血改善効果の分子機構の一旦が解明された。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、SNPアレイ解析は通常の染色体分析に比してゲノム異常の検出率が高いことが明らかとなり、今後の治療の層別化に有用であることが示された。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検体集積事業を実施している。本事業に登録された検体に対しては、SNPアレイ解析による詳細なゲノム情報を返却するシステムが構築され、検体集積は進んでいる。来年度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目指して、すでに提案されている個別遺伝子解析研究に検体の供与を開始する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Maki K, Yamagata T, Mitani K. Role of the RUNX1-EVI1 fusion gene in leukemogenesis. *Cancer Sci* 99: 1878-1883, 2008.
2. Tasaka T, Tohyama K, Kishimoto M, Ohyashiki K, Mitani K, Hotta T, Kanamaru A, Okamoto S, Karasawa M, Kimura A, Tomonaga M, Uchiyama T, Ozawa K. Myelodysplastic syndrome with chromosome 5 abnormalities: a nationwide survey in Japan. *Leukemia* 22: 1874-1881, 2008.
3. Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Maki K, Porcher C, Shimizu R, Yamamoto M, Mitani K. Leukemia-related transcription factor TEL/ETV6 expands erythroid precursors and stimulates hemoglobin synthesis. *Cancer Sci* (in press)
4. Kawahara M, Hori T, Chorabayashi K, Oka T, Sudol M, Uchiyama T. Kpm/Lats2 is linked to chemosensitivity of leukemic cells through the stabilization of p73. *Blood* 112: 3856-3866, 2008
5. Yamashita K, Miyoshi T, Arai T, Endo N, Itoh H, Makino K, Mizugishi K, Uchiyama T, Sasada M.

Ozone production by amino acids contributes to killing of bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 16912-16917,2008

6. Ishikawa Y, Xu J, Sakashita G, Urano T, Suzuki T, Tomita A, Kiyoi H, Nakamura S, Naoe T. Abnormal cytoplasmic dyslocalisation and/or reduction of nucleophosmin protein level rarely syndoccur in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* 49:2359-2364,2008

7. Hayakawa F, Abe A, Kitabayashi I, Pandolfi PP, Naoe T. Acetylation of PML is involved in histone deacetylase inhibitor-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 283: 24420-24425,2008

8. 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

9. Ohyashiki JH, Ohyashiki K, et al. The oral iron chelator deferasirox represses signaling through the mTOR in myeloid leukemia cells by enhancing expression of REDD1. *Cancer Sci* (in press)

10. Park J, Ohyashiki K, Akata S, Takara K, Uno R, Kakizaki D, Miyazawa K, Kimura Y, Tokuyue K. Evaluation of cardiac iron overload in transfusion-dependent adult marrow failure patients by magnetic resonance imaging. *Leuk Res* (in press)

11. Miyazawa K, Ohyashiki K, Urabe A, Hata T, Nakao S, Ozawa K, Ishikawa T, Kato J, Tatsumi Y, Mori H, Kondo M, Taniguchi J, Tani H, Rojkaer L, Omine M. A safety, pharmacokinetic and pharmacodynamic investigation of deferasirox (Exjade, ICL670) in patients with transfusion-dependent anemias and iron-overload: a Phase I study in Japan. *Int J Hematol* 88: 73-81,2008

12. Aki D, Minoda Y, Yoshida H, Watanabe S, Yoshida R, Takaesu G, Chinen T, Inaba T, Hikida M, Kurosaki T, Saeiki K, and Yoshimura A. Peptidoglycan and lipopolysaccharide activate PLC γ 2, leading to enhanced cytokine production in macrophages and dendritic cells. *Genes Cells* 13: 199-208,2008

13. 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 BMF model. *Blood* 111: 4297-4308, 2008

14. Yoshinaga K, Mori N, Wang YH, Tomita K, Shiseki M, Motoji T. JAK2 V617F mutation is rare in idiopathic erythrocytosis: a difference from polycythemia vera. *Int J Hematol* 88: 82-87,2008

15. Mori N, Yoshinaga K, Tada M, Wang YH, Shiseki M, Motoji T. Infrequent V617F mutation of the JAK2 gene in myeloid leukemia and its absence in lymphoid malignancies in Japan. *Genet Mol Biol* 31: 427-430,2008

16. Yamada O, Kawauchi K, Akiyama M, Ozaki K, Motoji T, Adachi T, Aikawa E. Leukemic cells with increased telomerase activity exhibit resistance to imatinib. *Leuk Lymphoma* 49: 1168-1177,2008

17. Akagi T, Ogawa S, Dugas M, Kawamata N, Yamamoto G, Nannya Y, Sanada M, Miller CW, Yung A, Schnittger S, Haferlach T, Haferlach C, Koeffler HP. Frequent genomic abnormalities in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome with normal karyotype. *Haematologica* 94: 213-223,2009

18. Kawamata N, Ogawa S, Yamamoto G, Lehmann S, Levine RL, Plikman Y, Nannya Y, Sanada M, Miller CW, Gilliland DG, Koeffler HP. Genetic profiling of myeloproliferative disorders by single-nucleotide polymorphism oligonucleotide microarray. *Exp Hematol* 36: 1471-1479,2008

19. Akagi T, Ogawa S, Dugas M, Kawamata N, Yamamoto G, Nannya Y, Sanada M, Miller CW, Yung A, Schnittger S, Haferlach T, Haferlach C, Koeffler HP. Hidden abnormalities and novel classification of t(15;17) APL based on genomic alterations. *Blood* 113: 1741-1748,2009

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 と白血病における microRNA 発現の比較

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、白血病・リンパ腫において microRNA の異常発現がその発症に関与しているとの報告が見られる。本研究では骨髄異形成症候群(MDS)発症における microRNA 発現異常の関与を明らかにすることを目的とする。白血病および MDS の発症に深く関与している *RUNX1* 遺伝子に作用すると予想される microRNA について、その発現量を MDS および白血病患者の骨髄検体を用いて調べた。いずれの群においても約 1 割の症例において miR-9 の発現が異常に亢進していた。また、急性骨髄性白血病(AML)においては miR-27a の発現が高い傾向が見られた。これらの microRNA の異常発現が *RUNX1* やそれ以外のターゲット遺伝子の働きを抑制して、複雑な MDS の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 の切断や翻訳を抑制することにより遺伝子抑制的に働く。一方、microRNA の異常発現は造血発生や細胞維持に重要な遺伝子の働きを抑制することにより、造血器腫瘍発症の原因となることが考えられる。本研究では MDS の病態解明の一端として、microRNA の異常発現が MDS の発症に関与しているのではないかという仮説を立て、その検証を行うことを目的とする。まず、MDS 患者の骨髄細胞における microRNA の発現パターンを解析する。次に、急性白血病患者の骨髄細胞についても同様の解析を行い、MDS 患者と白血病患者において microRNA の発現パターンに差があるかどうかを解析する。MDS 患者に特異的な microRNA の異常が存在すれば、それが MDS 特異的な病態の形成の一端を担っていると考えられる。

B. 研究方法

(1) 解析対象となる microRNA として、*RUNX1* 遺伝子を標的とする microRNA (以下、*RUNX1* 関連 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)その機能の抑制が一部の白血病・MDS の発症に深く関与していること、があげられる。今回は、miR-27a, miR-27b, miR-9, miR-199a, miR-18a, miR-30a, miR-30b, miR-30c, miR-30d, miR-30e の 10 種の microRNA を選択した。MDS 症例 16 例(RA 4 例, RAEB 9 例, RAEB-t 2 例, CMMoL 1 例)、白血病患者 33 例(M0 2 例, M1 6 例, M2 7 例, M3 2 例, M4 1 例, M5 3 例, M6 3 例, ALL 7 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。基準となるコントロール 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。

(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、当該患者からインフォームドコンセント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 症例と正常人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 RAEB2 例, RA1 例であった。(2) 白血病患者においては、MDS 患者と同様に miR-9 の高発現が 33 例中 3 例に認められた。また、これとは別に、miR-27a の発現が AML 症例では高く、急性リンパ性白血病(ALL)や混合性白血病(MLL)症例では低い傾向が認められた。

D. 考察

MDS および白血病患者の一部に、miR-9 が異常に高発現している症例が認められた。miR-9 は癌遺伝子である *MYC* の下流に存在する miRNA であり、何種類かの腫瘍でその高発現が癌化に関与していることが知られている。MDS および白血病において miR-9 が腫瘍化に関与しているか否かは今後明らかに

していく必要がある。また、AMLにおいてはmiR-27aが高発現している傾向があり、骨髄性白血病の発症に関与している可能性が示された。

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。MDSの発症原因として様々な遺伝子の変異や増幅、再構成などが報告されている。本研究においては、特定のmicroRNAの異常発現が特定あるいは複数の標的遺伝子の翻訳を抑制することにより、複雑なMDSの病態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. Maki K, Yamagata T, Mitani K. Role of the RUNX1-EVII fusion gene in leukemogenesis. *Cancer Sci* 99: 1878-1883, 2008

2. Tasaka T, Tohyama K, Kishimoto M, Ohyashiki K, Mitani K, Hotta T, Kanamaru A, Okamoto S, Karasawa M, Kimura A, Tomonaga M, Uchiyama T, Ozawa K. Myelodysplastic syndrome with chromosome 5 abnormalities: a nationwide survey in Japan. *Leukemia* 22: 1874-1881, 2008

3. Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Maki K, Porcher C, Shimizu R, Yamamoto M, Mitani K. Leukemia-related transcription factor TEL/ETV6 expands erythroid precursors and stimulates hemoglobin synthesis. *Cancer Sci* (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

骨髄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」と連携した骨髄異形成症候群患者の検体集積事業を行っている。各施設での倫理審査がすすんだ結果、今年度は多くの検体が集積された。そこで、新規登録検体の一部を用いた「高密度 SNP アレイを用いた MDS のゲノムコピー数異常・アレール不均等解析研究」(東京大学小川誠司准教授)への提供を開始した。ゲノム異常の有無は実診療の場においても有意義な情報となりえるため、この解析結果は事務局を介して速やかに検体送付施設にフィードバックされている。詳細なゲノム情報の判明した検体は、各種遺伝子解析研究の施行にあたっても有用性が高く、今後の遺伝子解析研究の充実が期待される。

A. 研究目的

本班では、骨髄異形成症候群の発症・進展機序の解明、再生不良性貧血などの鑑別および適切な治療法選択に役立つ分子指標の同定、ならびに新規治療法開発を目指した研究が行われているが、これらの研究の実施にあたっては、質の高い臨床データに裏打ちされた患者検体の集積が不可欠である。特発性造血障害に関する調査研究班で行われている「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」と連携することで、質の高い検体を集積する。

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班参加施設で、「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」に参加する骨髄異形成症候群患者、ならびに同研究には参加しない骨髄異形成症候群患者(白血病移行例を含む)の、診療上の目的での骨髄穿刺の際に採取した骨髄液を、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)で凍結保存し、遺伝子研究に提供する。平成 20 年 4 月より、検体の一部から DNA を抽出し、「高密度 SNP アレイを用いた MDS のゲノムコピー数異常・アレール不均等解析研究」(東京大学小川誠司准教授)への提供を開始した。そのほか、造血器腫瘍における遺伝子異常の網羅的解析、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、骨髄異形成症候群の SPARK 発現ネットワーク解析、骨髄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研究に対しても順次提供していく予定である。(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

平成 20 年末までに集積された WHO 分類別の検体数は、RA 8 検体、RCMD 4 検体、RAEB-1 11 検体、RAEB-2 15 検体、CMML 2 検体、AML 16 検体の計 61 検体である。これらの検体はいずれも日本を代表する血液内科で採取されたもので、十分な採取時の臨床情報と正確な診断に裏打ちされている。また、大多数の検体は、遺伝子解析の施行に関する包括的な同意が得られており、本班で今後新規遺伝子解析研究が予定されても使用可能である。高密度 SNP アレイ解析は 24 検体でなされ、染色体分析法ではわかり得ないゲノム異常が多数明らかにされた。

D. 考察

各施設での倫理審査がすすんだ結果、今年度になって多くの検体が寄せられるようになった。また、高密度 SNP アレイ解析により詳細なゲノム情報の判明した検体は、その他の遺伝子解析研究にあたっても有用性が高く、今後の遺伝子解析研究の充実が期待される。

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軌道に乗りつつあり、遺伝子解析研究も開始された。今後新たな遺伝子研究への検体供与が予定されている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Kawahara M, Hori T, Chonabayashi K, Oka T, Sudol M, Uchiyama T. Kpm/Lats2 in linked to chemosensitivity of leukemic cells through the stabilization of p73. Blood 112: 3856-3866,2008
2. Yamashita K, Miyoshi T, Arai T, Endo N, Itoh H, Makino K, Mizugishi K, Uchiyama T, Sasada M. Ozone production by amino acids contributes to killing of bacteria. Proc Natl Acad Sci USA 105: 16912-16917,2008

3. Tasaka T, Tohyama K, Kishimoto M, Ohyashiki K, Mitani K, Hotta T, Kanamaru A, Okamoto S, Karasawa M, Kimura A, Tomonaga M, Uchiyama T, Ozawa K. Myelodysplastic syndrome with chromosome 5 abnormalities: a nation-wide survey in Japan. Leukemia 22: 1874-1881,2008

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

骨髄異形成症候群患者に認められた t(12;7) 染色体異常により 生じる新規 TEL 融合遺伝子の解析

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

今回我々は、これまでに報告のない t(12;17)(p13;q11) を有する MDS-RAEBII から急性白血病に移行した患者腫瘍細胞を用いて融合遺伝子の詳細を検討した。12p13 に位置する TEL 遺伝子と 17q11 に存在する TAOI 遺伝子の相互転座を確認し、また TEL のセンス鎖と TAOI のアンチセンス鎖が融合したキメラ mRNA の発現 (TEL-TAOI_r) を確認した。患者検体における野生型 TAOI 蛋白の発現は白血病細胞株に比べて有意に低く、TEL-TAOI_r が野生型 TAOI mRNA に対してアンチセンスとして働く可能性が示唆された。TAOI は DNA 損傷やスピンドルチェックポイントに重要な役割をもつ MAPKKK のひとつとして知られており、TAOI 蛋白の発現低下と MDS における細胞分化、分裂、増殖異常との関わりに興味を持たれる。また、本症例に発現が認められたようなアンチセンスキメラ遺伝子 (仮称) という概念が、腫瘍発生に広く認められる現象であるのか否か、今後の検討が必要と考えられる。

A. 研究目的

t(12;17)(p13;q11) を有する MDS-RAEBII から急性白血病に移行した症例に着目し、新規相互転座責任遺伝子の同定と、その生物学的意義につき検討した。

B. C. 研究方法 & 研究結果

当該患者より文書による同意を得た後に、以下の解析を行った。(1) 12p13 には白血病において多数転座の報告がある TEL/ETV6 遺伝子が存在する。TEL 遺伝子の 5'側と 3'側にプローブを設定し、FISH 法を施行した。片方のアレルにスプリットシグナルを認め、12p13 転座の責任遺伝子が TEL であることを確認した。(2) 3'-RACE 法を施行し、TEL 遺伝子の転座相手の遺伝子を同定した。融合 mRNA の塩基配列を確認したところ、TEL のエクソン 2 の 3'端は TAOI 遺伝子のイントロンの相補鎖配列に移行し、その 3'側に同遺伝子のエクソンの相補鎖配列が確認された。TEL 融合蛋白のアミノ酸配列は、転座部位から 16 アミノ酸で終始コドンとなることが予想された。(3) 融合遺伝子の切断点を挟むプライマーを設定し、患者細胞を用い RT-PCR を施行したところ、特異的なバンドが確認された。(4) 患者骨髄細胞を用いて Western blot 法を施行し、TAOI 蛋白の発現を確認した。患者検体における TAOI 蛋白の発現は、正常骨髄や白血病細胞株に比べて有意に低かった。(5) 融合遺伝子に存在する TAOI 遺伝子の相補鎖配列が、野生型 TAOI mRNA に対してアンチセンスとして働く可能性が示唆された。融合遺伝子配列 (TEL-TAOI_r) を発現ベクターに挿入し 293T 細胞内で強制発現させ、TAOI 蛋白の発現の変化を検討した。野生型 TAOI の発現は、TEL-TAOI_r の濃度依存的に低下を示した。(6) MDS より急性白血病に移行した患者骨髄検体を用いて TAOI 蛋白発現を Western blot 法にて確

認したところ、正常検体や白血病細胞株に比べ、発現が低い傾向が認められた。

D. 考察

TAOI は、p38 MAP キナーゼ経路における MAPKKK の一つで、DNA 損傷などのストレスに反応するセリン・スレオニンキナーゼである。また、細胞分裂におけるスピンドルチェックポイントに重要な役割を果たし、MDS の特徴とされる異形成や細胞増殖能、遺伝子異常の蓄積などにおける TAOI の関与についての検討が、今後の課題となる。また、今回 TEL-TAOI_r に認められたような、アンチセンスキメラ遺伝子 (仮称) という新しい概念の病態が、MDS を含む血液腫瘍に一般的に認められる病態であるかどうか、今後確認が必要である。

E. 結論

- (1) t(12;17)(p13;q11) を有する MDS-RAEBII から急性白血病に移行した症例より、TEL-TAOI_r 融合遺伝子を同定した。
- (2) 患者検体における TAOI 蛋白の発現は、正常骨髄や白血病細胞株に比べて有意に低く、293T 細胞内で TEL-TAOI_r を強制発現させたところ、内因性 TAOI の発現は、TEL-TAOI_r の濃度依存的に低下を示した。融合遺伝子に存在する TAOI 遺伝子の相補鎖配列が、野生型 TAOI mRNA に対してアンチセンスとして働く可能性が示唆された。
- (3) TAOI 異常発現と MDS 発症の関与および、アンチセンスキメラ遺伝子という新しい概念について、更なる検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表
論文発表

1. Ishikawa Y, Xu J, Sakashita G, Urano T, Suzuki T, Tomita A, Kiyoi H, Nakamura S, Naoe T. Abnormal cytoplasmic dyslocalisation and/or reduction of nucleophosmin protein level rarely syndoccurs in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* 49:2359-2364,2008

2. Hayakawa F, Abe A, Kitabayashi I, Pandolfi PP, Naoe T. Acetylation of PML is involved in histone deacetylase inhibitor-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 283: 24420-24425,2008

3. 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

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

Deferasirox の抗白血病効果

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

経口除鉄剤(deferasirox)による抗白血病効果を検証した。Deferasirox は REDD1 発現亢進、mTOR 抑制、S6 kinase 抑制を介し、アポトーシスを誘導することが判明し、除鉄効果のみならず、抗白血病効果も期待しうることが明らかとなった。

A. 研究目的

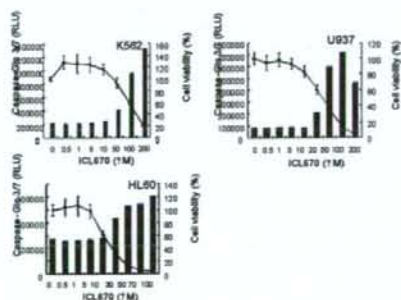
経口除鉄剤の deferasirox により骨髄異形成症候群 (MDS) 患者の 10-20% に造血能の回復がもたらされることが知られている。一方、deferasirox は除鉄効果のみならず、高い抗腫瘍効果を持つことが報告されている。そこで、deferasirox の抗白血病効果が MDS における造血能回復の一因となりうるかを明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

白血病細胞株 (K562, U937, HL-60) を用いて細胞増殖抑制効果、caspase-3 の変化、アポトーシス誘導効果を検証後、Gene Chip (U133 plus 2.0) にて deferasirox による遺伝子発現解析を施行。標的遺伝子を絞り込み、「骨髄不全症候群の酸化ストレス系遺伝子発現のネットワーク解析: 医学倫理委員会 899 (平成 20 年 1 月 16 日承認)」により得られた末梢血単核球を用いて標的遺伝子発現を解析。さらに K562 細胞株でのシグナル伝達系と標的遺伝子に対する siRNA 導入による遺伝子発現変化を検討した。また、U937 担癌ヌードマウスにおける deferasirox の経口投与の腫瘍縮小効果、生存および腫瘍の病理学的検索を行なった。

C. 研究結果

(1) 白血病細胞株 (K562, U937, HL-60) における deferasirox の抗腫瘍効果と caspase-3 の上昇およびアポトーシスを認めた (図 1)。

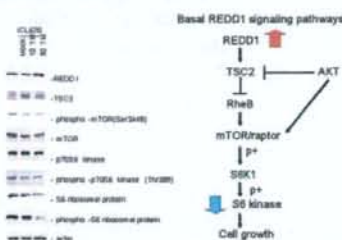


遺伝子発現プロファイルより REDD1 を標的とし、

mTOR、S6 kinase の抑制により抗腫瘍効果が発揮されていることが判明した(図 2)。

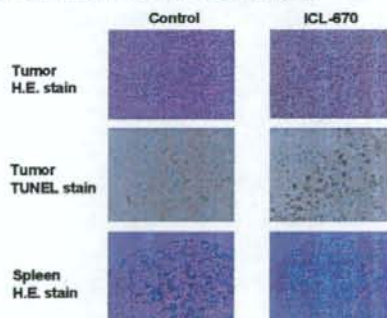
図 2: 遺伝子発現カスケード

ICL670 represses S6 kinase, a target of mTOR, by enhancing expression of REDD1



さらに、U937 担癌マウスモデルにおいて腫瘍細胞のアポトーシス亢進と腫瘍量の縮小が確認された(図 3)。

図 3: 担癌マウスでの抗腫瘍効果



D. 考察

- (1) deferasirox の抗白血病効果がアポトーシス誘導によるものであることを確認した。
- (2) これは REDD1 発現亢進、mTOR 抑制、S6 kinase 抑制の経路による抗腫瘍効果であることを確認した。
- (3) 担癌マウスモデルへの deferasirox の経口投与でアポトーシスの誘導による抗腫瘍効果を確認した。

E. 結論

経口除鉄剤である deferasirox の抗白血病効果の in vitro および in vivo での確認により、MDS 患者における造血改善に REDD1 発現亢進、mTOR 抑制、S6 kinase 抑制を介する抗腫瘍効果が一助を担っている可能性が示唆された。今後、deferasirox 投与前後における遺伝子発現解析により、実臨床における deferasirox の抗白血病効果の有用性が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Ohyashiki JH, Ohyashiki K, et al. The oral iron chelator deferasirox represses signaling through the mTOR in myeloid leukemia cells by enhancing expression of REDD1. *Cancer Sci* (in press)

2. Park J, Ohyashiki K, Akata S, Takara K, Uno R, Kakizaki D, Miyazawa K, Kimura Y, Tokuyasu K. Evaluation of cardiac iron overload in transfusion-dependent adult marrow failure patients by magnetic resonance imaging. *Leuk Res* (in press)

3. Miyazawa K, Ohyashiki K, Urabe A, Hata T, Nakao S, Ozawa K, Ishikawa T, Kato J, Tatsumi Y, Mori H, Kondo M, Taniguchi J, Tani H, Rojkaer L, Omine M. A safety, pharmacokinetic and pharmacodynamic investigation of deferasirox (Exjade, ICL670) in patients with transfusion-dependent anemias and iron overload: a Phase I study in Japan. *Int J Hematol* 88: 73-81, 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学科学研究所 教授

研究要旨

7番染色体長腕(7q)より MDS を抑制する遺伝子の候補として単離した四遺伝子(*Samd9* = *Kasumi*, *Samd9L* = *Titan*, *LOC253012* = *Miki*, *CG-NAP*)の検討を行った。*Kasumi* と *Titan* は共通の祖先遺伝子より進化した、互いに60%のアミノ酸相同性を持つ、機能不詳の関連タンパク質をコードする。*Titan* 遺伝子欠損マウスを作成し、その新生仔期にレトロウイルスを感染させたところ、ほぼ全例が骨髄球系の白血病を発症した。レトロウイルスの挿入部位を同定したところ、*Evi1* とともに、ヒストン脱メチル化酵素をコードする *Fbx10* 遺伝子が同定された。一方、*Miki*, *CG-NAP* は分裂期中心体に局在し、その発現抑制により生じる細胞分裂の異常が MDS 特有の形態異常の原因と考えてきたが、これまで不明であった *Miki* の機能として、分裂期に必要な傍中心体物質(PCM)を中心体に輸送するシステムのメンバーであることが明らかとなった。

A. 研究目的

MDS に認められる代表的な染色体欠失である -7/7q により欠損する発がん抑制遺伝子を同定するため、われわれは 2001 年より短プローブ・マイクロアレイ CGH システムの開発を進めた。本システムを用いて、2004 年に隣接する三新規遺伝子(*Samd9* = *Kasumi*, *Samd9L* = *Titan*, *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。また *Miki* と複合体を形成する蛋白質 CG-NAP をコードする遺伝子がこれら三遺伝子のごく近傍にあることを見いだした。

Kasumi と *Titan* は共通の祖先遺伝子より進化した、相互に60%のアミノ酸相同性を持つ機能不詳の関連タンパク質をコードしているが、マウスは *Titan* に相当する遺伝子のみを有し、*Kasumi* に相当する遺伝子は持たない。本報告書では、*Titan* 欠損マウスの解析結果を記載する。

B. 研究方法

昨年度までに定法に基づいて *Titan* 遺伝子欠損マウスを作成し、今年度はその解析を行った。レトロウイルス挿入部位の同定は inverse PCR 法を用いて行い、サザンブロット法で確認した。

C. 研究結果

Titan 欠損マウス(ホモ、ヘテロ)はメンデルの法則に従って誕生し、(現時点で)1年半程度の観察期間中、特に大きな異常は示さなかった。*Titan* 欠損が白血病を生じるためには協調する遺伝子異常が必要であると考え、遺伝子欠損マウスとその正常同胞マウスの新生仔期に 4070A レトロウイルスを感染させた。このような実験で頻用される 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は低い。レトロウイルスを感染させた *Titan* 欠損マウスはホモ・ヘテロともに、生後8カ月ごろから白血球増加、貧血、血小板の減少をきたし、最終的には、ほぼ全例が骨髄球性の白血病を発症した。これに対し、正常同胞群で AML を発症したのは1匹のみであった。興味深いことに、その病型は幼弱な骨髄芽球の増多をみる典型的な AML から、分化傾向の著しい CML 様、また異型性の強い MDS など多彩であった。表面抗原も骨髄球系、単球系を中心に、高頻度に赤芽球系や巨核球系のマーカーが陽性となるなど、多様なパターンを示した。レトロウイルス挿入部位の解析の結果、6匹で *Evi1* 遺伝子に挿入を認めたほか、3匹でヒストン脱メチル化酵素をコードする *Fbx10* 遺伝子に挿入が認められた。いずれの遺伝子も、サザンブロット解析により DNA の再構成を認めたことから、その挿入が白血病化に寄与していることが示された。ウイルス挿入部位はいずれも第一エクソンの上流付近に集中しており、real-time RT-PCR 解析により mRNA の過剰発現が認められた。

D. 考察

われわれは MDS で高頻度に欠失する 7q の責任遺伝子として4つの候補遺伝子を同定し、検討を進めてきた。今年度の大きな進展は *Titan* 遺伝子についてマウス個体レベルで 7q 欠失責任遺伝子であるという証拠が得られたことである。7q の欠損はリンパ系の腫瘍ではほとんど認められないが、骨髄球系の腫瘍では小児から成人に至るまで、また MDS 以外にも典型的な転座型の白血病や CML などの付加異常としても出現し、広い範囲の骨髄芽球の腫瘍化に関与すると考えられている。*Titan* 欠損マウスで発症する白血病は、形態、表面抗原ともに多彩である点で、このようなヒト-7/7q-白血病の特徴に一致している。これ

に加え、ヘテロ・ホモ欠失マウスともに同時期に白血病が発症する上、ヘテロ欠失マウスで生じた白血病細胞では、Titan の発現が維持されていた。この結果は、Titan の片アレルの欠失による発現低下が白血病発症に関与することを示唆するものであり、いわゆる haploinsufficient 効果を示すものとして注目される。

レトロウイルス挿入サイトの検索により、*Evi1* 遺伝子と *Fbx10* 遺伝子の二つが共通挿入遺伝子として同定された。*Evi1* はレトロウイルスによるマウス白血病発がん実験モデルでウイルスの挿入サイトとして見いだされ、ヒト AML でも高頻度に過剰発現やキメラ遺伝子の形成が認められるなど、ヒトでもマウスでも骨髄球系の白血病の原因であることは確実である。今回、本遺伝子がウイルス挿入サイトとして同定された事実は、われわれの実験系が機能していることを示している。

Fbx10 は 2004 年にウイルス感染によるマウス発がん実験系でがん抑制遺伝子として単離され、その後、別のグループによるラットのモデル発がん実験系では発がん遺伝子として同定された。今回のわれわれの結果を加えると、この遺伝子がマウスで発がんに関与していることは確実であると思われる。*Fbx10* のコードする、jumonji family に属するヒストン脱メチル化酵素が -7/7q と協調して発がんに関与するとすれば、この遺伝子はエピゲノム制御異常が MDS に関与するメカニズムを解析する上で非常に有用な研究対象であると考えられ、ヒトの発がんに関与するかの解析を手始めに、全力で研究を推進していきたい。

E. 結論

7q に存在する MDS 抑制遺伝子の有力候補遺伝子の解析を推進した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. 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 PLC γ 2, leading to enhanced cytokine production in macrophages and dendritic cells. *Genes Cells* 13: 199-208, 2008
2. 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* 111: 4297-4308, 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