

200936007A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 三谷 絹子

平成22(2010)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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 三谷 絹子
平成22(2010)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 で観察される miR-9 過剰発現の白血病における臨床的意義

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 石川 隆之 ……………11

3. *TEL/TAO1r* アンチセンスキメラ RNA の機能解析

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. 輸血依存の骨髓不全患者における心鉄沈着の評価法

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. 骨髓異形成症候群の CD34 陽性細胞に発現する蛋白の同定

東京女子医科大学 血液内科 泉二 登志子 ……………19

7. MDS の新規原因遺伝子 *CBL* 変異の同定と機能に関する研究

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

研究代表者 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(MDS)は、汎血球減少と急性骨髄性白血病(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及びレナリドマイドがFDAにより承認されているが、本邦でもこれらの治療薬は近い将来承認される見通しである。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・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) 既存の治療薬の臨床評価法の確立、(4) 検体集積事業を柱として研究を推進している。(1)においては、高密度 SNP アレイ解析により観察された 11q 片親性二倍体(UPD)から、MDS/MPD の原因遺伝子 *CBL* が同定された。*CBL* 変異は機能獲得型変異であり、変異体発現細胞では E3 コピキチンリガーゼ活性が低下することにより、サイトカイン受容体の発現が維持されサイトカインへの感受性が遷延することを明らかにした。miRNA の発現解析では、RUNX1 蛋白の翻訳を負に制御する 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。特に AML においては、miR-9 の過剰発現は予後不良因子であった。プロテオミクス解析では saturation dye を用いて検出感度を上げることに成功し、MDS の CD34 陽性細胞の解析が可能となった。その結果、不応性貧血の造血幹細胞/前駆細胞に特異的に発現している蛋白及び病期の進展に伴い発現が変化する蛋白が同定された。(2)においては、7q の責任遺伝子 *Titan* のノックアウトマウスの新生仔期にレトロウイルスを感染させるとほぼ全個体が骨髄球系の白血病を発症することを観察してきたが、自然経過でも高齢マウスの約半数が MDS、骨髄増殖性腫瘍、AML を発症した。*Titan* は初期エンドソーム膜上に局在する EEA1 と結合し、*Titan* 発現抑制細胞ではリソソームの形成不良やサイトカイン受容体のリガンド依存性代謝の遷延を介してサイトカインシグナルが過剰に入ることが確認された。また、MDS/AML の症例に観察された t(12;17)(p13;q11)より *TEL* のセンス鎖と *TAO1* のアンチセンス鎖が融合したキメラ mRNA (*TEL-TAO1r*) が発現することが明らかになった。*TEL-TAO1r* は野生型 *TAO1* mRNA に対しアンチセンス RNA として働く。*TAO1* 蛋白の発現低下は、UV 刺激による p38 のリン酸化誘導の減弱をもたらし、DNA 損傷刺激に対する反応や細胞周期のチェックポイント制御の異常を誘導する可能性が示唆された。(3)においては、経口除鉄剤デフェラシロックスの効果判定のための心鉄過剰状態の評価には、心臓 MRI 検査による T2*値および R2*値が極めて有効であることが判明した。さらに、間接的に総赤血球輸血量から R2*値を算出し、仮想心駆出率を算出することが可能であった。(4)においては、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、「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、約 100 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。

研究分担者

- | | |
|-----------------------------------|---|
| ・石川 隆之
京都大学医学部
血液・腫瘍内科学 講師 | ・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 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(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、新規診断法及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。骨髄非破壊の前処置、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に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、治癒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で5q陽性の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治験が実施されており、近い将来導入される可能性が高い。本研究の目的は、ゲノム異常・miRNA発現異常・蛋白発現異常の網羅的探索、変異遺伝子・分子の機能解析等であり、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. ゲノム異常の探索(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、222 症例の MDS 検体におけるゲノムコピー数異常及びアレール不均衡の網羅的な解析を行った。本解析により同定された 11q 片親性二倍体(UPD)の集積領域から、新規原因遺伝子変異型 *CBL* を同定した。さらに、野生型及び変異型 *CBL* の機能を NIH3T3 細胞及び *CBL* ノックアウト細胞を用いて解析した。

B. miRNA 発現異常の探索(三谷)

RUNX1 mRNA の 3' 非翻訳領域に認識配列が存在する miRNA の中で MDS の一部の症例に過剰発現が観察された miR-9 の発現を、87 症例の AML の検体を用いて解析した。さらに、臨床データと照合することにより、miR-9 過剰発現の臨床的意義について検討した。

C. 蛋白発現異常の探索(泉二)

イムノビーズ法を用いて純化した MDS 症例および

正常人の骨髄 CD34 陽性細胞から蛋白を抽出した後、Saturation dye (GE Healthcare)を用いて蛋白を蛍光標識した。二次元電気泳動を行い、蛋白スポットを画像解析ソフト(PDQuest; BIO-RAD)を用いて解析した。スポットを切り出して質量分析を行い、MDS で発現が変化している蛋白を同定した。

(2) 変異遺伝子・分子の機能解析

A. 7q-の原因遺伝子 Titan の機能解析(稲葉)

Titan ノックアウトマウスを作製し解析した。TOF/TOF 型質量分析器を用いて、Titan 結合蛋白を同定した。

B. *TEL-TAO1r* の同定と機能解析(直江)

t(12;17)(p13;q11)を保有する MDS/AML の症例より *TEL-TAO1r* アンチセンスキメラ遺伝子を同定した。MDS 検体における TAO1 蛋白の発現をウエスタン法で解析するとともに、*TEL-TAO1r* 発現に伴う野生型 TAO1 蛋白の発現変化も解析した。さらに、内因性 TAO1 蛋白をノックダウンしたのちに UV 刺激を加え、p38 MAP キナーゼのリン酸化誘導の変化についても検討した。

(3) デフェラシロックスの効果判定法の確立(大屋敷)

輸血依存症例 7 例(MDS 6 名、再生不良性貧血 7 名、原発性骨髄線維症 4 名)に心臓 MRI 検査を施行し、T2*値及び R2* 値(=1/T2*)を算出した。総赤血球輸血量及び血清フェリチン値との相関を解析した。

(4) MDS 検体集積事業(石川・三谷)

「特発性造血障害に関する調査研究班」及び「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」の参加施設で、「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 MDS 患者のほか白血病移行例を含んだ多様な患者より検体を集積する。検体集積施設は、獨協医科大学内科学(血液)及び京都大学血液・腫瘍内科である。検体集積施設では単核球分離後、一部の細胞から DNA を抽出し、残りの細胞は凍結保存する。DNA は「高密度 SNP アレイを用いた MDS のゲノムコピー数異常・アレール不均衡の解析研究」(東京大学小川誠司准教授)へ提供される。凍結保存された細胞は、研究班で承認された個別研究課題に提供される。

(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、厚生労働省及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. ゲノム異常の探索(小川)

MDS 222 症例の 31.5%の症例で UPD が観察され、11q UPD の最小領域から *CBL* 遺伝子のホモ変異を同定した。変異型 *CBL* はがん遺伝子として機能し NIH3T3 細胞を強く形質転換させたが、野生型 *CBL*

は生体内ではがん抑制遺伝子として機能していた。変異型 *CBL* 導入細胞では、E3 ユビキチンリガーゼ活性が顕著に低下していた。また、造血サイトカイン刺激後の受容体型チロシンキナーゼの活性化状態が遷延し、サイトカイン刺激に高感受性となった。

B. miRNA 発現異常の探索 (三谷)

87 症例の AML 検体の中で、miR-9 発現陽性が 16 例 (約 18%)、陰性が 71 例 (約 82%) であった。臨床データを照合した所、miR-9 発現陽性例は陰性例に比べて寛解導入率には差がないものの、全生存期間及び無再発生存期間は統計学的有意に短かった。

C. 蛋白発現異常の探索 (泉二)

不応性貧血 (RA) に高発現する蛋白を 8 個 (NCBI データベース, GI: 28872730, GI: 14249382 など)、RAEB に高発現する蛋白を 2 個 (GI: 5803187 など) 同定した。これらの蛋白は細胞内酵素、細胞骨格関連蛋白、リン脂質関連結合蛋白、プロテアソーム関連蛋白、遺伝子制御蛋白などであった。

(2) 変異遺伝子・分子の機能解析

A. 7q-の原因遺伝子 *Titan* の機能解析 (稲葉)

Titan ノックアウトマウスは高齢になると約半数が MDS などの骨髄性腫瘍を発症することが明らかになった。その分化傾向、異形成の程度、表面マーカーは多様であった。また、質量分析器を用いた解析で、*Titan* は初期エンドソームに局在する EEA1 (early endosome antigen 1) と結合することが明らかになった。*Titan* 抑制細胞ではリソソームの形成不良が観察され、サイトカイン刺激後の Akt や Rac の活性化状態が遷延していた。

B. *TEL-TAO1r* の同定と機能解析 (直江)

MDS 患者骨髄検体では、TAO1 蛋白の発現が種々の白血病細胞株に比べて概して低下していた。*TEL-TAO1r* 発現ベクターを 293T あるいは HeLa 細胞に強制発現させた所、野生型 TAO1 蛋白の発現が *TEL-TAO1r* 発現の濃度依存性に減弱し、*TEL-TAO1r* がアンチセンス RNA として働く可能性が示唆された。HeLa 細胞を用いて内因性 TAO1 蛋白をノックダウンした後に UV 刺激を加えた所、野生株で認められる p38 MAP キナーゼのリン酸化誘導効果が減弱することが確認された。

(3) デフェラシロックスの効果判定法の確立 (大屋敷)

予備的な検討で、左心駆出率 (EF) のみでは心鉄過剰状態の把握は困難であることを再確認した。そこで、17 例の輸血依存骨髄不全患者における心臓 MRI 検査より T2*値及び R2*値 ($1/T2^*$) を算出し、輸血量及びフェリチン値との相関を検討した所、R2*値と総赤血球輸血量 ($r=0.93$) あるいは血清フェリチン値 ($r=0.83$) との相関、及び、R2*値と EF との逆相関 ($r=-0.72$) が証明された。EF と総赤血球輸血量あるいは血清フェリチン値との間には弱い相関しかみられなかった。

(4) MDS 検体集積事業 (石川・三谷)

平成 21 年 12 月までに 94 検体が集積された。WHO 分類に従えば、RCUD/MDS-U 15 検体、RCMD 10 検体、RAEB-1 15 検体、RAEB-2 17 検体、CMML 3 検体、AML 27 検体、MDS 疑い 7 検体である。これらの検体はいずれも正確な診断と十分な臨床情報に裏打ちされている。86 検体では、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、同意の撤回がない限りは「特異性造血障害に関する調査研究班」ならびに本班で将来行う遺伝子解析研究にも使用可能である。高密度 SNP アレイ解析による詳細なゲノム情報と患者の予後を対照した予備的検討において、SNP アレイ情報は患者の予後を推定する上で有用であることが示唆された。

D. 考察

(1) ゲノム・miRNA・蛋白異常の網羅的探索

MDS は極めて多様な疾患であるが、網羅的ゲノム解析の結果、UPD を含むゲノム異常の有無により分類が可能であることが明らかになった。特に、11q UPD から新規の原因遺伝子変異型 *CBL* が同定された。*CBL* 変異型 MDS の発症には、野生型 *CBL* 遺伝子の欠失が重要であると考えられた。*CBL* 変異型 MDS では増殖因子受容体が持続活性化状態にあると考えられることから、チロシンキナーゼ阻害剤が治療に有効であることが期待される。ゲノム解析研究の成果を新規原因遺伝子の同定及び治療開発に結びつけることに成功した。

MDS の 15% の症例で過剰発現していることが確認された miR-9 は、AML の症例においても同程度の頻度で過剰発現していることが明らかになった。しかも、miR-9 過剰発現例は非発現例に比して全生存及び無再発生存が統計学的有意差をもって不良であった。このことは、MDS の白血病への進展に miR-9 の過剰発現が関与している可能性を示唆している。MDS の発症・進展における miR-9 の標的 mRNA は *RUNX1* mRNA とは限らない。今後 miR-9R の標的 mRNA の同定が進めば、MDS の新たな分子病態が明らかにされる可能性がある。さらに、miRNA を標的とした新しい分子治療薬が開発されることも期待される。

プロテオミクス研究は、本年度は saturation dye を用いることにより、格段に検出感度を上げることに成功した。その結果、骨髄 CD34 陽性細胞を用いた解析が可能となり、MDS 発症において、あるいは、その病期の進展において造血幹細胞レベルで発現が変化する蛋白が同定された。これらの蛋白の中には 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。

(2) 変異遺伝子・分子の機能解析

これまでに同定してきた 7q-の原因遺伝子の中で、*Titan* の発生工学的・生化学的機能の知見が得られた。7q-を有する造血器腫瘍は MDS のみならず AML あるいは慢性骨髄性白血病の急性転化と多様であるが、*Titan* ノックアウトマウスも高齢になってから多彩な骨髄性腫瘍を発症した。*Titan* は生化学的には初期エンドソームの膜上にあり、EEA1 と結合して初期エンドソームの成熟とリソソームへの発育に関与することが明らかになった。*Titan* の機能的失活は、*CBL* 変異と同様に増殖因子受容体の機能を遷延させることにより、MDS を発症させる可能性があると考えられる。

t(12;17)(p13;q11)型 MDS では、*TEL-TAO1r* アンチセンスキメラ遺伝子が形成され、野生型 TAO1 蛋白の発現が低下する。この転座を有しない MDS 症例においても TAO1 蛋白の発現は低い傾向にあった。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・スレオニンキナーゼであるとともに、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。従って、TAO1 の発現低下が MDS の特徴である異形成や細胞増殖異常、遺伝子異常の蓄積などに関与するかどうかを今後検討する必要がある。7q の原因遺伝子 *Miki* の機能的失活も中心体分離不全により細胞周期の M 期の進行を阻害することから、MDS の分子病態において M 期の異常は重要な entity であると考えられる。

(3) デフェラシロックスの効果判定法の確立

心鉄過剰状態の把握には心臓 MRI 検査による T2* 値及び R2* 値が極めて有効であることが判明した。また、間接的に総赤血球輸血量から R2* 値を算出し、さらに仮想心駆出率を算出することが可能であった。鉄過剰症の経過観察及びデフェラシロックスの効果判定に心臓 MRI 検査は有用であると考えられた。

(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と遺伝子解析研究」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、臨床的にも興味深い知見が得られている。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、今後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・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を同定した。SNP アレイ解析を用いて、11q UPD より MDS の新規原因遺伝子変異型 *CBL* を同定することに成功した。*CBL* は増殖因子受容体の機能を負に制御することから、*CBL* 変異型 MDS にはチロシンキナーゼ阻害剤が有効である可能性があり、これは臨床的にも意義が高い知見である。一方、7q の原因遺伝子 *Titan* の生化学的機能解析の結果も、7q 型 MDS に同様にチロシンキナーゼ阻害剤あるいはシグナル伝達分子阻害剤が有効である可能性を示唆している。また、MDS で発現が低下している TAO1 及び 7q の別の標的遺伝子 *Miki* はいずれも細胞周期の M 期の進行を制御しており、M 期異常の修復は新しい MDS の分子標的療法の idea となり得る。さらに、発現異常を示す miRNA 及び蛋白が同定されており、これらの知見は病型分類のみならず、治療の層別化に有用である。最後に、分子病態研究の基盤整備を目的として、全国レベルの MDS 検体集積事業を実施している。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たことにより、さらに検体集積が加速化している。今後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. 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* 100: 689-697, 2009
2. Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Ohyashiki K, Yamagata T, Mitani K. Enhanced expression of the EVI1 gene in NUP98/HOXA-expressing leukemia cells. *Int J Hematol* 89: 253-256, 2009
3. Sasaki K, Tahara T, Mitani K. Presentation of familial Mediterranean fever in a heterozygous MEFV mutation triggered by immunosuppressive therapy for myelodysplastic syndrome. *Int J Hematol* 90: 91-93, 2009
4. Kanda J, Mizumoto C, Kawabata H, Ichinohe T, Tsuchida H, Tomosugi N, Matsuo K, Yamashita K, Kondo T, Ishikawa T, Uchiyama T. Clinical significance of serum hepsidin levels on early infectious complications in allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 15: 956-962, 2009
5. Mizumoto C, Kanda J, Ichinohe T, Ishikawa T, Matsui M, Kadowaki N, Kondo T, Imada K, Hishizawa M, Kawabata H, Nishikori M, Yamashita K, Takaori-Kondo A, Hori T, Uchiyama T. Mycophenolate mofetil combined with tacrolimus and minidose methotrexate after unrelated donor bone marrow transplantation with reduced-intensity conditioning. *Int J Hematol* 89: 538-545, 2009
6. 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* 33: 756-758, 2009
7. Asou H, Matsui H, Ozaki Y, Nagamachi A, Nakamura M, Aki D, Inaba T. Identification of a common microdeletion cluster in 7q21.3 subband among patients with myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 383: 245-251, 2009
8. Nagamachi A, Yamasaki N, Miyazaki K, Oda H, Miyazaki M, Honda Z, Kominami R, Inaba T, Honda H. Haploinsufficiency and acquired loss of *Bcl11b* and *H2AX* induced blast crisis of chronic myelogenous leukemia in a transgenic mouse model. *Cancer Sci* 100: 1219-1226, 2009
9. Wang YH, Takanashi M, Tsuji K, Hiroike N, Shiseki M, Mori N, Motoji T. Level of DNA topo-

isomerase II α mRNA predicts the treatment response of relapsed acute leukemic patients. *Leuk Res* 33: 902-907, 2009

10. Sakamaki H, Ishizawa K, Taniwaki M, Fujisawa S, Morishima Y, Tobinai K, Okada M, Ando K, Usui N, Miyawaki S, Utsunomiya A, Uoshima N, Nagai T, Naoe T, Motoji T, Jinnai I, Tanimoto M, Miyazaki Y, Ohnishi K, Iida S, Okamoto S, Seriu T, Ohno R. Phase 1/2 clinical study of dasatinib in Japanese patients with chronic myeloid leukemia or Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia 89: 332-341, 2009

11. Sanada M, Suzuki T, Shih LY, Otsu M, Kato M, Yamazaki S, Tamura A, Honda H, Sakata-Yanagimoto M, Kumano K, Oda H, Yamagata T, Takita J, Gotoh N, Nakazaki K, Kawamata N, Onodera M, Nobuyoshi M, Hayashi Y, Harada H, Kurokawa M, Chiba S, Mori H, Ozawa K, Omine M, Hirai H, Nakauchi H, Koeffler HP, Ogawa S. Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms. *Nature* 460: 904-908, 2009

12. Morita Y, Kanamaru A, Miyazaki Y, Imanishi D, Yagasaki F, Tanimoto M, Kuriyama K, Kobayashi T, Imoto S, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R. Comparative analysis of remission induction therapy for high-risk MDS and AML progressed from MDS in the MDS200 study of Japan Adult Leukemia Study Group. *Int J Hematol* 91: 97-103, 2010

13. Okuya M, Kurosawa H, Kikuchi J, Furukawa Y, Matsui H, Aki D, Matsunaga T, Inukai T, Goto H, Altura RA, Sugita K, Arisaka O, Look AT, Inaba T. Upregulation of survivin by the E2A-HLF chimera is indispensable for the survival of t(17;19)-positive leukemia cells. *J Biol Chem* 285: 1850-1860, 2010

14. Yamasaki N, Miyazaki K, Nagamachi A, Koller R, Oda H, Miyazaki M, Sasaki T, Honda Z, Wolff L, Inaba T, Honda H. Identification of *Zfp521/ZNF521* as a cooperative gene for *E2A-HLF* to develop acute B-lineage leukemia. *Oncogene* (in press)

15. Akahane K, Inukai T, Inaba T, Kurosawa H, Look AT, Kiyokawa N, Fujimoto J, Goto H, Endo M, Zhang X, Hirose K, Kuroda I, Honna H, Kagami K, Goi K, Nakazawa S, Sugita K. Specific induction of CD33 expression by E2A-HLF: the first evidence for aberrant myeloid antigen expression in ALL by a fusion transcription factor. *Leukemia* (in press)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他
いずれも予定なし

II. 分担研究報告

MDS で観察される miR-9 過剰発現の白血病における臨床的意義

研究代表者 三谷 絹子 獨協医科大学 内科学（血液） 教授

研究要旨

RUNX1 遺伝子の機能的失活は骨髄異形成症候群(MDS)の重要な発症機構である。*RUNX1* mRNA に結合配列を有する miRNA の発現について MDS 検体を用いて解析した所、正常骨髄では発現していない miR-9 の発現が約 1 割の症例で亢進していることが明らかになった。そこで、急性骨髄性白血病 (AML) の検体を用いて同様に解析したが、AML においても同程度の頻度で過剰発現例が存在した。臨床データと照合した所、miR-9 発現陽性 AML は陰性 AML に比して寛解率に差は認めなかったものの、全生存期間及び無再発生存期間が統計学的有意差をもって短いことが明らかになった。miR-9 の過剰発現は *RUNX1* やそれ以外のターゲット遺伝子の働きを抑制して、MDS の白血化に関与している可能性がある。

A. 研究目的

miRNA 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抑制的に働く。一方、miRNA 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。前年度までに骨髄異形成症候群 (MDS) で特徴的に発現が亢進する *RUNX1* mRNA 3'非翻訳領域結合 miRNA、miR-9、を同定している。本年度は miR-9 過剰発現の MDS の発症・進展における意義を検討する目的で、急性骨髄性白血病 (AML) 患者の骨髄細胞についても同様の解析を行い、その臨床的意義を明らかにする。

B. 研究方法

(1) 予備実験として、急性リンパ性白血病及び混合性白血病を含む 33 症例の急性白血病の骨髄検体より small RNA を抽出し、*RUNX1* mRNA を標的とする miRNA10 種 (miR-27a, miR-27b, miR-9, miR-199a, miR-18a, miR-30a, miR-30b, miR-30c, miR-30d, miR-30e) につき、Taqman 法により発現量を定量した。具体的には、目的の miRNA 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。miRNA の発現量は、目的とする miRNA 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) 同様の手法を用いて AML 症例の骨髄 87 検体と正常人 23 検体中の miR-9 の発現量を定量し、miR-9 の発現の有無で症例を分類した。

(3) 臨床データと照合することにより、miR-9 の発現の臨床的意義を検討した。

(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) ほとんどの miRNA は症例毎に発現レベルにばらつきはあるものの、正常及び AML 検体において発現が確認された。一方、miR-9 は正常骨髄ではほとんど発現しておらず、急性白血病骨髄では 3 症例に過剰発現が観察された。

(2) 87 症例の AML 骨髄では約 15% に miR-9 の過剰発現が認められた。そこで、正常骨髄で観察される発現レベルをカットオフ値として、miR-9 の発現の有無で AML 症例を 2 群に分類した所、16 例 (約 18%) が陽性、71 例 (約 82%) が陰性となった。

(3) miR-9 発現陽性群では陰性群に比べて以下の傾向を認めた：(a) 染色体異常の頻度が少ない、(b) 末梢血中の芽球の%が少ない、(c) LDH 値が高い、(d) 骨髄巨核球数が高い、(e) *ERG1* の発現が低い、(f) 骨髄移植の頻度が高い。miR-9 の発現の有無で、予後不良因子である 65 歳以上の高齢、WBC 5 万以上、FLT3-TKD や FLT3-ITD の頻度に有意差は存在しなかった。miR-9 発現陽性 AML は陰性 AML に比して寛解率に差は認めなかったものの、全生存期間及び無再発生存期間が統計学的有意差をもって短いことが明らかになった。

D. 考察

MDS 及び AML の一部に、miR-9 が過剰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わっていることが知られている。AML において miR-9 発現陽性群は全生存期間及び無再発生存期間が統計学的有意差をもって短いことから、miR-9 の過剰発現は MDS においては白血化に関与している可能性がある。また、MDS の発症・進展の機構を考える際に、miR-9 の *RUNX1* mRNA 以外の標的を同定することが重要であると考えられた。

E. 結論

一部の MDS 及び AML 症例において、miR-9 の過剰発現が認められた。miR-9 の過剰発現は AML においては明確な予後不良因子であることから、MDS においてはその進展に関与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. 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* 100: 689-697, 2009
2. Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Ohyashiki K, Yamagata T, Mitani K. Enhanced expression of the EVI1 gene in NUP98/HOXA-expressing leukemia cells. *Int J Hematol* 89: 253-256, 2009
3. Sasaki K, Tahara T, Mitani K. Presentation of familial Mediterranean fever in a heterozygous MEFV mutation triggered by immunosuppressive therapy for myelodysplastic syndrome. *Int J Hematol* 90: 91-93, 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

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

研究分担者 石川 隆之 京都大学医学研究科血液・腫瘍内科学 講師

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。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・アレル不均衡の解析研究」(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に期待される。

A. 研究目的

骨髄異形成症候群は再生不良性貧血や骨髄増殖性疾患などとの境界領域を有し、臨床経過も多様性に富む。最近の新規治療薬剤の開発により、本疾患の予後の改善が期待されるが、適切な治療法選択に役立つバイオマーカーの同定はますます急務となっている。また、更なる予後の改善には新規治療法の開発が不可欠である。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」と連携した質の高い検体を集積し、研究者に広く提供することで、骨髄異形成症候群に対する研究の進歩をはかる。

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のほか、白血病移行例を含んだより多様な患者より検体を集積する。具体的には、診療上の目的で骨髄穿刺を行った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)に送付していただき、検体集積施設では単核球分離後、一部の細胞から DNA を抽出し、残りの細胞は凍結保存する。DNA は「高密度 SNP アレイを用いた MDS のゲノムコピー数異常・アレル不均衡の解析研究」(東京大学小川誠司准教授)へ提供され、同研究での残余検体は再度検体集積施設に回収され他の研究に利用される。凍結保存された細胞は、提供患者の同意内容に応じて、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、その他当班で行われる各種遺伝子解析研究に提供される。

(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。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 21 年 12 月までに 94 検体が集積された。WHO 分類に従えば、RCUD/MDS-U 15 検体、RCMD 10 検体、RAEB-1 15 検体、RAEB-2 17 検体、CMML 3 検体、AML 27 検体、MDS 疑い 7 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、正確な診断と十分な臨床情報に裏打ちされている。86 検体では、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、同意の撤回がない限りは特発性造血障害に関する調査研究班ならびに本班で将来行う遺伝子解析研究にも使用可能である。高密度 SNP アレイ解析による詳細なゲノム情報と患者の予後を対照した予備的検討において、SNP アレイ情報は患者の予後を推定する上で有用性が高いことが示唆された。

D. 考察

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い。

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を行った。また、検体を用いた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. Kanda J, Mizumoto C, Kawabata H, Ichinohe T, Tsuchida H, Tomosugi N, Matsuo K, Yamashita K, Kondo T, Ishikawa T, Uchiyama T. Clinical significance of serum hepsidin levels on early infectious complications in allogeneic stem cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 15: 956-962, 2009

2. Mizumoto C, Kanda J, Ichinohe T, Ishikawa T, Matsui M, Kadowaki N, Kondo T, Imada K, Hishizawa M, Kawabata H, Nishikori M, Yamashita K, Takaori-Kondo A, Hori T, Uchiyama T. Mycophenolate mofetil combined with tacrolimus and minidose methotrexate after unrelated donor bone marrow transplantation with reduced-intensity conditioning. Int J Hematol 89: 538-545, 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

TEL/TAO1r アンチセンスキメラ RNA の機能解析

研究分担者 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

t(12;17)(p13;q11)を有する RAEB-2 から急性白血病に移行した患者腫瘍細胞を用いて、融合遺伝子の構造解析と転写産物の機能解析を施行した。12p13 の TEL 遺伝子と 17q11 の TAO1 遺伝子との相互転座より TEL のセンス鎖と TAO1 のアンチセンス鎖が融合したキメラ mRNA (TEL-TAO1r) が発現することを確認した。TEL-TAO1r を HeLa 細胞内で強制発現させると、内因性 TAO1 蛋白の発現が抑制されることが示され、TEL-TAO1r が野生型 TAO1 mRNA に対しアンチセンス RNA として働く可能性が示された。当該患者検体および他の MDS 患者腫瘍細胞における TAO1 の発現は概して低い傾向であった。TAO1 は p38 上流で働く MAPKKK の一つであるが、siRNA により TAO1 蛋白をノックダウンすると、UV 照射刺激による p38 のリン酸化誘導が減弱する傾向が示され、DNA 損傷刺激に対する反応や細胞周期チェックポイント機能の異常が MDS の病態形成に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

t(12;17)(p13;q11)を有する RAEB-2 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、その転写産物の生物学的意義について検討する。

B. C. 研究方法&研究結果

当該患者より文書による同意を取得し、以下の解析を行った。(1)12p13 に存在する TEL 遺伝子の 5'側と 3'側にプローブを設定し、FISH 法を施行したところ、片アレルにスプリットシグナルを認め、12p13 転座部位の責任遺伝子が TEL/ETV6 であることを確認した。(2)3'-RACE 法により、相互転座相手遺伝子が 17q11 に存在する TAO1 遺伝子であることを確認した。その転写産物 TEL-TAO1r において、TEL の exon 2 の 3'端は TAO1 遺伝子の intron の相補鎖配列に、続いて同遺伝子の exon の相補鎖配列に移行することを確認した。(3)当該患者腫瘍細胞検体を用いてアレル特異的 PCR 法を施行したところ、TEL-TAO1r mRNA の発現が確認されたが、同一融合遺伝子の逆方向から発現することが予想される TAO1-TELr mRNA の発現は確認されなかった。(4)当該患者および他の MDS 患者骨髄検体を用いたウエスタンブロット法による検討では、TAO1 蛋白の発現が種々の白血球細胞株に比べて概して低いことが確認された。(5)TEL-TAO1r を発現ベクターに挿入し 293T および HeLa 細胞内で強制発現させたところ、野生型 TAO1 蛋白の発現が TEL-TAO1r 発現の濃度依存的に減弱し、TEL-TAO1r がアンチセンス RNA として働く可能性が示唆された。(6)HeLa 細胞において、内因性 TAO1 蛋白をノックダウンさせたのちに UV 照射刺激を加えたところ、野生株で認められる p38 MAP キナーゼのリン酸化誘導効果が減弱することが確認された。(7)TEL 遺伝子と PER1 遺伝子との相互転座をもつ、他施

設より報告のある症例において、TEL-PER1r (PER1 遺伝子相補鎖配列) 融合遺伝子転写産物の発現を確認した。

D. 考察

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・スレオニンキナーゼである。DNA 損傷に続く修復機構や細胞分裂におけるチェックポイント機構に重要な役割を果たすことから、MDS における TAO1 蛋白の発現低下と、MDS の特徴とされる異形成や細胞増殖能、遺伝子異常の蓄積との関連に興味を持たれる。互いに逆方向に結合する融合遺伝子から発現する異常転写産物が、標的遺伝子をノックダウンするという「アンチセンスキメラ遺伝子（仮称）」という概念は、これまでに報告のない新規病態である可能性がある。この病態が、MDS を含む血液腫瘍に一般的に認められる現象であるのかどうか、今後更なる検討が必要である。

E. 結論

t(12;17)(p13;q11)を有する RAEB-2 から急性白血病に移行した症例より、TEL-TAO1r 融合遺伝子を同定し、この融合遺伝子転写産物が内因性 TAO1 蛋白発現をノックダウンする可能性を示した。互いに逆方向に結合する融合遺伝子から発現する異常転写産物が特定遺伝子をノックダウンする「アンチセンスキメラ遺伝子」という概念は、これまでに報告のない新規病態である可能性があり、MDS などの血液悪性疾患において一般に認められる病態であるかどうか、さら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. Morita Y, Kanamaru A, Miyazaki Y, Imanishi D, Yagasaki F, Tanimoto M, Kuriyama K, Kobayashi T, Imoto S, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R. Comparative analysis of remission induction therapy for high-risk MDS and AML progressed from MDS in the MDS200 study of Japan Adult Leukemia Study Group. Int J Hematol 91: 97-103, 2010

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

輸血依存の骨髄不全患者における心鉄沈着の評価法

研究分担者 大屋敷一馬 東京医科大学・血液内科 教授

研究要旨

輸血依存の鉄過剰症患者における心臓鉄沈着の評価法を検討した。心臓 MRI により T2*および R2* (1/T2*)を測定し、総赤血球輸血量および血清フェリチン値との関係を解析し、左心駆出率との関係を検討した。総赤血球輸血量より仮想左心駆出率を計算することが可能となった。

A. 研究目的

骨髄異形成症候群 (MDS) を含む骨髄不全患者では輸血依存度や血清フェリチン値が予後に大きな影響をもたらしている。特に心臓への鉄沈着は鉄過剰症患者の死因の 25%を占め、輸血後早期の鉄沈着状態の把握と鉄キレート療法開始が重要である。本研究では心臓 MRI により心鉄沈着状態を把握することを目的とする。

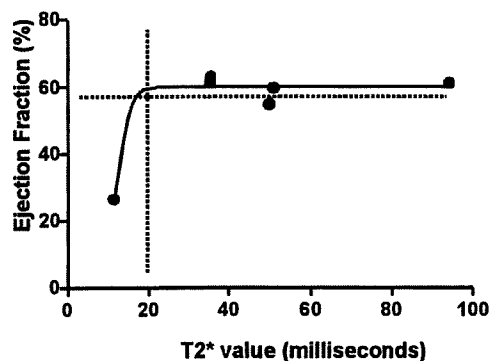
B. 研究方法

輸血依存患者 (男性 12 名、女性 5 名: 骨髄異形成症候群 6 名、再生不良性貧血 7 名、原発性慢性骨髄線維症 4 名: 年齢 35 歳—88 歳) より承諾を得て、心臓 MRI を施行した。心臓 MRI 施行時までの総赤血球輸血量、血清フェリチン値をパラメーターとして用いた。心臓 MRI より算出された値は T2*として表現し、R2* (=1/T2*)を算出して、統計学的処理を行なった。

C. 研究結果

予備的な検討では、左心駆出率(EF)の低下以前に T2*の低下がみられるが、EF の低下は T2*低下と相関せず(図 1)、EF の測定のみでは心鉄過剰状態の把握は困難であることを再確認した。

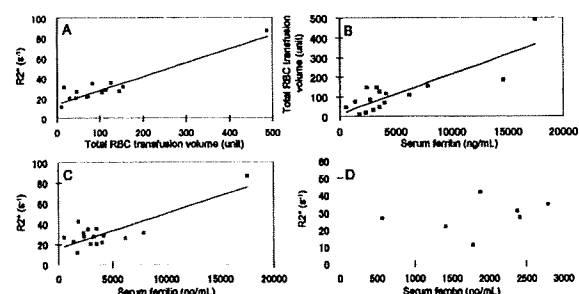
図 1: 心臓 MRI による鉄沈着指標となる T2* と心駆出率との関係



そこで、17 例の輸血依存骨髄不全患者における心臓 MRI より T2*値および R2*値 (1/T2*)を算出し、輸血量およびフェリチン値との相関

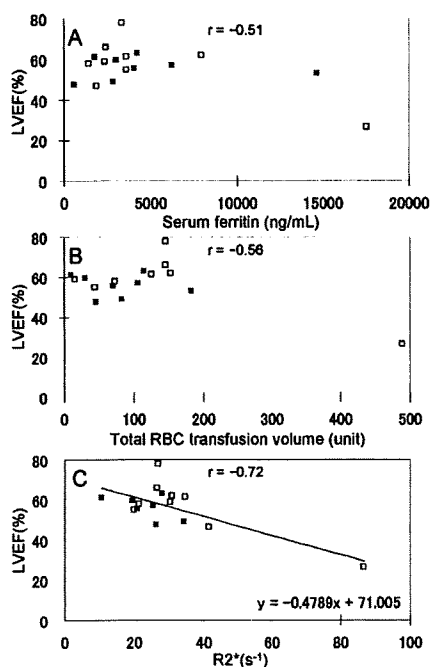
を検討したところ、R2*値と総赤血球輸血量 ($r=0.93$)および血清フェリチン値 ($r=0.83$)との相関が得られた (図 2)。

図 2: 17 例における R2*と総赤血球輸血量および血清フェリチン値の関係



さらに R2*値と EF との関係では逆相関 ($r=-0.72$)が得られたが、EF と総赤血球輸血量および血清フェリチン値の間には弱い相関しかみられなかった(図 3)。

図 3: 左心駆出率と血清フェリチン値、総赤血球輸血量および心 MRI R2*の関係



D. 考察

以上の結果より、心鉄過剰状態の把握には心臓 MRI による T2*および R2*が極めて有効であることが判明した。また、間接的に総赤血球輸血量から、R2*値を算出し、さらに仮想心駆出率を算出した。

計算式

$$y = 0.1376x + 14.374$$

(y = R2*値、x = 総赤血球輸血量)

$$y = -0.4789x + 71.005$$

(y = LVEF (%), x = R2*値)

E. 結論

心臓 MRI による心鉄過剰状態の把握は臨床的に重要であるが、全ての施設で可能ではない。そこで、簡便な仮想の心鉄過剰状態の把握が可能な計算式を提案した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. 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 33: 756-758, 2009
2. Sakuta J, Ito Y, Ohyashiki K. Defining indication to initiate iron chelation therapy for transfusional iron overload using cardiac R2* magnetic resonance. submitted.

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

研究分担者 稲葉 俊哉 広島大学原爆放射線医科学研究所 教授

研究要旨

7 番染色体長腕(7q)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、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することを観察していたが、自然経過でも高齢マウスの約半数が MDS,MPD,AML を発症することが明らかとなった。今年度は特に *Titan* の生化学的機能の解明を進めた。質量解析器を用いた検討により *Titan* は初期エンドソーム膜上に局在する EEA1 と結合することが判明した。*Titan* 発現抑制細胞ではリソソームの形成不良やサイトカイン受容体のリガンド依存性代謝の遅延が認められ、サイトカインシグナルが過剰に入る現象が確認された。

A. 研究目的

MDS の代表的な染色体欠失である-7/7q-の欠失責任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 システムを開発し、2004 年に隣接する三新規遺伝子(*Samd9* = *Kasumi*, *Samd9L* = *Titan*, *LOC253012* = *Miki*)を単離した。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だし、これら 4 遺伝子の解析を進めている。

これらの遺伝子は脊椎動物にのみ存在し、既知遺伝子との相同性をほとんど持たない。*Kasumi* と *Titan* は共通の祖先遺伝子より進化し、相互に 60%のアミノ酸相同性を持つ。マウスは *Titan* のみを有し、*Kasumi* に相当する遺伝子は持たない。

この 1 年間の大きな進展は、*Titan* 欠損マウスが自然経過で MDS を発症することが判明したこと、生化学的機能解明の糸口がつかめたことである。

B. 研究方法

一昨年度までに *Titan* 遺伝子欠損マウスを作成し、解析した。TOF/TOF 型質量解析器を用いて *Titan* の結合タンパク質の同定を行った。

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、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が、その後高齢マウスの約半数が MDS などの骨髄性腫瘍を発症することが明らかとなった。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、また異形成の強い 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。

質量解析器を用いた分析で、*Titan* は初期エンドソームに局在する EEA1 (Early Endosome Antigen 1) と結合することが明らかとなった。免疫蛍光染色法でも、*Titan* は初期エンドソームで EEA1 と共局在した。EEA1 は初期エンドソームの融合と成熟を司り、結果として初期エンドソームからリソソームへの移行を促進する。*Titan* の抑制細胞ではリソソームの形成不良が生じることが明らかとなった。リガンドと結合したサイトカイン受容体は細胞内に取り込まれ、初期エンドソームに局在するので、*Titan* の抑制はリガンドと結合した受容体の分解遅延をもたらし、受容体由来のシグナルを増強することが考えられる。実際 *Titan* 抑制細胞ではサイトカイン刺激による Akt や Rac の活性化などが遅延していた。

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* 遺伝子欠損マウスが自然経過で骨髄性腫瘍を多発したこと、生化学的機能解明の糸口がついたことである。

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 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。*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た。

一方、*Titan* が初期エンドソームの膜上にあり、EEA1 と結合して初期エンドソームの成熟とリソソームへの進展に関与する所見は、*Titan* の白血病発症機序の分子メカニズムを明らかにする上で大きな進展である。リガンドと結合したサ

イトカイン受容体は初期エンドソームからリソソームへと進展する中で消化され代謝される。このシステムの遅延はサイトカインに対する過剰な反応を引き起こすと想定され、骨髄性白血病の発症・促進機序として非常に考えやすいものである。今後詳細な検討を進めていきたい。

E. 結論

7q に存在する MDS 抑制遺伝子の有力四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. Asou H, Matsui H, Ozaki Y, Nagamachi A, Nakamura M, Aki D, Inaba T. Identification of a common microdeletion cluster in 7q21.3 subband among patients with myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 383: 245-251, 2009
2. Nagamachi A, Yamasaki N, Miyazaki K, Oda H, Miyazaki M, Honda Z-i, Kominami R, Inaba T, Honda H. Haploinsufficiency and acquired loss of *Bcl11b* and *H2AX* induced blast crisis of chronic myelogenous leukemia in a transgenic mouse model. *Cancer Sci* 100: 1219-1226, 2009

3. Okuya M, Kurosawa H, Kikuchi J, Furukawa Y, Matsui H, Aki D, Matsunaga T, Inukai T, Goto H, Altura R A, Sugita K, Arisaka O, Look AT, Inaba T. Upregulation of survivin by the E2A-HLF chimera is indispensable for the survival of t(17;19)-positive leukemia cells. *J Biol Chem* 285: 1850-1860, 2010
4. Yamasaki N, Miyazaki K, Nagamachi A, Koller R, Oda H, Miyazaki M, Sasaki T, Honda Z, Wolff L, Inaba T, Honda H. Identification of *Zfp521/ZNF521* as a cooperative gene for *E2A-HLF* to develop acute B-lineage leukemia. *Oncogene* (in press)
5. Akahane K, Inukai T, Inaba T, Kurosawa H, Look AT, Kiyokawa N, Fujimoto J, Goto H, Endo M, Zhang X, Hirose K, Kuroda I, Honna H, Kagami K, Goi K, Nakazawa S, Sugita K. Specific induction of CD33 expression by E2A-HLF: the first evidence for aberrant myeloid antigen expression in ALL by a fusion transcription factor. *Leukemia* (in press)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他
いずれも予定なし