

200936007B

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～平成21年度 総合研究報告書

研究代表者 三谷 絹子

平成 22 (2010) 年 3 月

目 次

I. 総合研究報告

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 獨協医科大学 内科学(血液) 三谷 絹子	1
---	---

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	13
--------------------------	----

III. 研究成果の刊行物・別刷	21
------------------------	----

I. 総合研究報告

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)への進展を伴う予後不良の難治性造血障害である。本研究では MDS の病態解明とこれに基づく新規治療法の開発を目的として、(1) SNP アレイを用いたゲノムコピー数・アレール不均衡の解析及び網羅的ゲノム変異の解析、(2) miRNA 発現異常の解析、(3) プロテオーム解析による蛋白発現異常の解析、(4) 同定された候補分子の機能解析、(5) 治療薬の臨床効果及び作用機序の検討、(6) 検体集積事業を施行した。(1)においては、高密度 SNP アレイ(Affymetrix 社)を用いて 222 症例の MDS のゲノムコピー数異常・アレール不均衡の解析を行い、MDS/骨髄増殖性腫瘍(MPN)の一群に 11 番染色体長腕(11q)の片親性二倍体(UPD)が存在することを明らかにした。さらに、同 UPD より、標的遺伝子変異型 *CBL* を同定した。一方、MDS 症例における 7 番染色体長腕(7q)の共通欠失領域を独自に開発した短プローブアレイ CGH 法及びリアルタイム PCR 法を用いて詳細に解析した。前班ですでに標的遺伝子 *Samd9* = *Kasumi*, *Samd9L* = *Titan*, *LOC253012* = *Miki* の単離に成功している。(2)においては、その機能的失活が MDS 発症に重要な役割を担う *RUNX1* 遺伝子由来の mRNA の 3'非翻訳領域に標的配列を有する miRNA 群の発現解析を行なった。MDS 16 症例及び正常人 11 例の骨髄検体より small RNA を抽出し Taqman 法を用いて発現レベルを定量した所、正常骨髄では発現が観察されない miR-9 の過剰発現が約 2 割の MDS 症例で観察された。レポーター・アッセイを用いて検討した所、miR-9 は確かに *RUNX1* mRNA の 3'非翻訳領域を負に制御した。(3)においては、プロテオミクス解析により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。(4)においては、11q UPD より同定された *CBL* 変異は機能獲得型変異であり、変異型 *CBL* 発現細胞では E3 ユビキチンリガーゼ活性が低下しており、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。7q-の責任遺伝子 *Miki* は分裂期の中心体や紡錘糸に局在し、その発現が抑制された細胞では中心体の成熟が抑制される結果紡錘糸の張力が低下して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)や染色体ロゼット形成等の異常な分裂中期像を生じ、二核・多核・小核細胞など MDS に特徴的な形態異常を示した。*Titan* 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性腫瘍を発症するが、自然経過でも高齢マウスの約半数が MDS、MPN あるいは 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によりサイトカイン受容体のリガンド依存性代謝が遷延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。一方、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 に対してアンチセンス 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すことから、*TEL-TAO1r* は DNA 損傷刺激に対する反応や細胞周期の M 期チェックポイントの異常を誘導する可能性が示唆された。(5)においては、デフェラシロックスの作用機序と臨床効果の判定方法に関する検討が行われた。デフェラシロックスの抗白血病効果は、REDD 発現上昇→TSC 誘導→mTOR 抑制→S6K リン酸化抑制の経路によるものであることが明らかになった。また、臨床的な心鉄過剰状態の評価には心臓 MRI 検査による T2*値及び R2*値の算出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、仮想心臓出率を算出することも可能であった。(6)においては、「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 患者の検体集積事業を行っている。現在の所約 100 症例の検体が保管されている。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・アレール不均衡の解析研究」(東京大学小川誠司准教授)へ DNA の提供を開始した。ゲノム異常の有無は臨床現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フィードバックされている。以上のように、網羅的ゲノム・mRNA・蛋白解析及び個別遺伝子解析により MDS の分子病態の理解が進み、また、新たな治療の標的分子の同定に成功している。特に、前班で同定した予後不良因子である 7q-の責任遺伝子の機能解析が進み、新たに 11q UPD の標的遺伝子変異型 *CBL* が同定され、変異型 *CBL* 発現による MDS の発症機構にも知見が加えられた。今後も検体集積事業が継続され、分子異常と臨床情報の照合が進めば、MDS の分子診断、治療の層別化、新規治療の開発が大きく前進することが期待される。

研究分担者

- ・内山 卓 (平成19、20年度)
京都大学医学部
血液・腫瘍内科学 教授
- ・石川 隆之 (平成21年度)
京都大学医学部
血液・腫瘍内科学 講師
- ・直江 知樹
名古屋大学医学部
血液・腫瘍内科学 教授
- ・大屋敷一馬
東京医科大学
血液内科 教授
- ・稲葉俊哉
広島大学
血液内科 教授 原爆放射線医科学研究所
- ・泉二登志子
東京女子医科大学
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 特任副教授

A. 研究目的

骨髄異形成症候群 (MDS) は高齢者に多く決定的な治療法のない難治性造血障害である。唯一の治療可能な治療法は造血幹細胞移植であるが、多くの高齢患者は移植医療の適応外である。副作用を軽減した分子標的療法の開発により、治療を目指すことが求められる。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 により認可されている。前者は低~高リスク MDS に適応があり、後者は 5q 陽性例にのみ適応がある。日本でもこれらの薬剤の臨床試験が実施されている。このような状況を踏まえ、MDS の分子病態を包括的に理解し、日本独自の分子標的療法を開発することが本研究の目的である。そのために、(1) SNP アレイを用いたゲノムコピー数異常・アレル不均衡の解析及び網羅的ゲノム変異の解析、(2) miRNA 発現異常の解析、(3) プロテオミクス解析による蛋白発現異常の解析、(4) 同定された候補分子の機能解析、(5) 治療薬の臨床効果及び作用機序の検討を行った。さらに、同定された異常分子の臨床的意義を検証することを可能とする(6) 「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」(難治性疾患克服研究事業「特発性造血障害に関する調査研究班」(自治医大・小澤敬也班長)との共同研究)を推進した。

B. 研究方法

(1) SNP アレイを用いたゲノムコピー数異常・アレル不均衡の解析及び網羅的ゲノム変異の解析

A. 高密度 SNP アレイによる原因遺伝子の同定

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及びアレ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 UPD の集

積領域から、新規標的遺伝子を同定した。(平成 19 年度/小川)

B. 7q- の責任遺伝子の同定

MDS 症例における 7q の共通欠失領域の詳細な解析を、独自に開発した短プローブアレイ CGH 法及びリアルタイム PCR 法を用いて行った。(平成 19 年度/稲葉)

C. AML with MLD (multi-lineage dysplasia) における遺伝子変異の網羅的解析

AML with MLD 症例を対象とし、異形成に関わる遺伝子変異を網羅的に解析した。変異の解析は、PCR 増幅の後 WAVE 法でスクリーニングを行い、直接シーケンス法で行った。(平成 19 年度/直江)

(2) miRNA 発現異常の解析

RUNX1 mRNA の 3' 非翻訳領域を標的とする miRNA (以下 *RUNX1* 関連 miRNA: miR-27a, miR27b, miR-9, miR-199a, miR18a, miR-30a, miR-30b, miR30c, miR30d, miR-30e の 10 種) を解析対象とした。MDS 症例 16 例 (RA 4 例, RAEB 9 例, RAEB-t 2 例, CMML 1 例) 及び正常人 11 例の骨髓検体より small RNA を抽出し、Taqman 法により miRNA の発現を定量した。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。(平成 19、20 年度/三谷) さらに、AML 症例 87 例 (M0 7 例, M1 11 例, M 2 29 例, M3 13 例, M4 10 例, M5 10 例, M6 6 例, M7 1 例) についても同様に *RUNX1* 関連 miRNA の発現解析を行い、発現異常の臨床的意義を検討した。(平成 21 年度/三谷)

(3) プロテオミクス解析による蛋白発現異常の解析

MDS/AML 症例の CD34 陽性細胞より蛋白を抽出して二次元電気泳動後、リン酸化蛋白を特異的に認識する蛍光試薬 Pro-Q® Diamond (Invitrogen) を用いてゲルを染色した。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) にてペプチドの質量分析を行った。(平成 19、20 年度/泉二) さらに、不応性貧血 (RA) あるいは RAEB 症例についても saturation dye を用いた蛍光標識後に二次元電気泳動を行うことにより、CD34 陽性細胞由来の少量の蛋白で発現異常の解析を行なった。(平成 21 年度/泉二)

(4) 同定された候補分子の機能解析

A. *CBL* 変異遺伝子 (11q UPD 標的遺伝子) の機能解析

平成 19 年度の研究で同定された 11q UPD の標的遺伝子 *CBL* の変異体について、NIH3T3 細胞を用いたコロニー・アッセイ及びヌードマウスを用いた造腫瘍能アッセイにより、その発がん活性を検討するとともに、ユビキチンリガーゼとしての生化学的活性についても検討した。(平成 20 年度/小川) さらに、*CBL* ノックアウトマウスを作製し、同マウスを用いて *CBL* のがん抑制遺伝子としての機能を検討するとともに、*CBL* ノックアウトマウス由来の造血前駆細胞を用いて *CBL* 変異体による MDS/骨髄増殖性腫瘍 (MPN) 発症の分子機序について解析を行った。(平成 21 年度/小川)

B. *Miki* 遺伝子 (7q- 標的遺伝子) 欠失効果の解析

個体レベルでの遺伝子欠失の効果を検討するために、ノックアウトマウスを作製した。細胞分裂の解析には

恒常的にヒストン H2B-GFP 融合蛋白を発現する U2OS 細胞を樹立して動画撮影を行った。(平成 19 年度/稲葉)

C. Titan 遺伝子(7q-標的遺伝子)欠失効果の解析

ノックアウトマウスを作製してその表現型を解析するとともに、新生マウスにレトロウイルスを感染させ、発症した MDS 細胞から DNA を抽出し、inverse PCR 法を用いてレトロウイルス挿入部位の検索を行った。

(平成 20 年度/稲葉) また、MDS 原因遺伝子の相互協調作用を個体レベルで検討するために、骨髄移植実験を行った。マウス骨髄から幼若な造血前駆細胞を単離し、レトロウイルスを用いて目的の遺伝子を導入した後、致死量の放射線を照射したマウスの尾静脈に輸注した。さらに、TOF/TOF 型質量分析器を用いて Titan 結合蛋白の同定を行った。(平成 21 年度/稲葉)

D. β カテニンの活性化機序の検討

MDS 細胞では、セリン・スレオニン残基非リン酸化 β カテニンの核内移行が観察される。FLT3 変異の確認されている細胞株 MOLM13 等の細胞株を用いて β カテニンにおけるチロシンリン酸化の有無を解析し、FLT3 変異との関連を検討した。免疫沈降法、免疫ブロット法、免疫染色法、in vitro kinase assay 法を用いて、形態学的及び生化学的に解析した(平成 19 年度/直江)。

E. t(12;17)のキメラ遺伝子の同定

FISH 解析により TEL 遺伝子内に切断点が存在することを確認した後 3'RACE 法を行い、新規 TEL キメラ遺伝子を同定した。キメラ遺伝子の機能を解析するために、遺伝子導入実験を行った。また、MDS 検体における TAO1 の発現をウエスタン法で解析するとともに、TEL-TAO1^{tr}発現に伴う内因性 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させた後に 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。(平成 20、21 年度/直江)

F. WT1 の発現調節機構及び N 未短縮型 WT1 mRNA の発現と意義に関する検討

発現調節機構解明を目的として、WT1 遺伝子の転写における 5'プロモーター領域と 3'エンハンサー領域の機能解析を行った。また、GATA1 及び GATA2 の 3'エンハンサー領域内の GATA 結合部位への結合を EMSA 法にて解析した。一方、N 未短縮型 WT1 mRNA の発現と意義を解析するために、RT-PCR 法での測定系を確立し、MDS 33 症例を含む造血器腫瘍症例 330 例の骨髄検体での mRNA の発現レベルの定量を行った。(平成 21 年度/直江)

(5) 治療薬の臨床効果及び作用機序の検討

A. ビタミン K2 の臨床効果の検討

前班で実施した多施設共同研究「不応性貧血におけるビタミン K2 単独療法ならびにビタミン K2 と D3 併用療法」(ビタミン K2 単独療法(45mg/日、経口投与)にて 2 ヶ月後に効果を判定し、無効例にはさらにビタミン D3 (0.75 μ g/日、経口投与)の併用療法を実施;臨床第 II 相試験)の結果の集計を行なった。血液学的改善度は IWG による効果判定基準を用いて判定し、有効性・安全性を検討した。(平成 19 年度/大屋敷)。

B. デフェラシロックスの抗白血病細胞効果の検討

MDS 症例では 20%程度に経口除鉄剤(デフェラシロックス)による造血能の回復が認められることから、デフェラシロックスの抗白血病細胞効果の機序を検討した。マイクロアレイ解析でデフェラシロックスの抗白血病細胞効果の標的遺伝子候補を絞り込み、siRNA 干渉法を用いて関与遺伝子・シグナル伝達経路を同定した。さらに、白血病マウスにおけるデフェラシロックスの抗腫瘍効果を確認した。(平成 20 年度/大屋敷)

C. デフェラシロックスの臨床評価法の確立

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、輸血量及び血清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($r=-0.72$)が観察された。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観察されなかった。(平成 21 年度/大屋敷)

(6) MDS 検体集積事業

「特発性造血障害に関する調査研究班」ならびに「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」の合同で、「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」とリンクした「骨髄異形成症候群に対する検体集積事業と遺伝子解析研究」が前班の平成 18 年度より開始されている。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。平成 19 年度には収集検体の範囲を MDS より進展した AML にも拡大した。平成 20 年度には、検体の一部から DNA を抽出し、個別課題「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)への検体供与を開始した。また、SNP アレイの解析結果を速やかに検体提供施設にフィードバックさせるシステムを構築し、検体集積の促進をはかった。(平成 19-21 年度/内山、石川、三谷)

(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 MDS 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・遺伝子研究に関する倫理指針」を遵守し、事前に各参加施設の倫理委員会の承認を得た。また、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」及び各機関の定める動物実験倫理規定を遵守し、予め各機関に届け機関長の承認を得た。

C. 研究結果

(1) SNP アレイを用いたゲノムコピー数異常・アレル不均衡の解析及び網羅的ゲノム変異の解析

A. 高密度 SNP アレイによる原因遺伝子の同定

高密度 SNP アレイを用いた MDS のゲノム解析の結果、MDS では従来の染色体分析では同定不能な

UPD によるヘテロ接合性の消失が約 30%の症例で生じていること、それらは特定の染色体に集積しておりこれらの異常によって複数の独立した亜型に分類可能であること、また、それらは特定の遺伝子変異のホモ接合と密接に関連していることが明らかになった。さらに、MDS/MPN として診断される症例の中には、11q UPD を特徴とする亜型が存在することを明らかにし、その標的遺伝子変異として *CBL* ホモ変異を新たに同定した。(平成19年度/小川)

B. 7q の責任遺伝子の同定

7q より MDS の発症を抑制する三責任遺伝子 (*Samd9 = Kasumi*, *Samd9L = Titan*, *LOC253012 = Miki*) を単離した。いずれも新規遺伝子で、機能など詳細は解明されていない。このうち *Kasumi* と *Titan* は共通の祖先遺伝子より進化したと考えられ、75%のアミノ酸相同性を持つ関連蛋白をコードしていた。(平成19年度/稲葉)

C. AML with MLD における遺伝子変異の網羅的解析

AML の中で 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構成されるのかを分子病態面から解析した。*TP53* 変異と複雑核型を有する群と正常核型で *NPM1* 変異を認める群が最も多く、前者の予後は極めて不良、後者のそれは中間であった。これまで *NPM1* 変異は MDS には極めて少ないと考えられてきたことから、後者は *de novo* タイプの AML with MLD の特徴と考えられた。(平成19年度/直江)

(2) miRNA 発現異常の解析

検討した 10 種の *RUNX1* 関連 miRNA の中で、興味深い挙動を示したのは miR-9 であった。miR-9 は正常骨髄細胞ではほとんど発現が観察されないものの、MDS 症例 16 例中 3 例において発現が異常に亢進していた。*RUNX1* mRNA の 3' 非翻訳領域を下流にもつルシフェラーゼ・レポーターは miR-9 の共発現によりその活性が 50%以下に減少したことから、miR-9 は *RUNX1* 蛋白の翻訳を負に制御すると考えられた。

(平成19、20年度/三谷) AML 症例においても、約 18%の症例でその発現が異常に亢進していた。miR-9 の過剰発現と全生存及び無再発生存は負に相関しており、miR-9 の過剰発現は予後不良因子であると考えられた。(平成21年度/三谷)

(3) プロテオミクス解析による蛋白発現異常の解析

MDS/AML 症例の骨髄 CD34 陽性細胞において発現が増減しているリン酸化蛋白 (tropomyosin 3 isoform 2, splicing factor, arginine/serine-rich 2, cofilin 1, heterogenous nuclear ribonucleoproteins c1/c2 variant など) が明らかになった。(平成19、20年度/泉二) さらに、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) それぞれ同定した。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。(平成21年度/泉二)

(4) 同定された候補分子の機能解析

A. *CBL* 変異遺伝子(11q UPD 標的遺伝子)の機能解析

NIH3T3 細胞を用いたコロニー・アッセイ及びヌードマウスを用いた造腫瘍能アッセイによる検討では、

CBL 変異体はこれらの細胞を強く形質転換することから、がん遺伝子として機能することが明らかになった。

また、変異 *CBL* は E3 ユビキチンリガーゼ活性が顕著に低下しており、かつ、正常 *CBL* の有する同活性を抑制すること、さらに、サイトカイン/増殖因子刺激後の受容体型チロシンキナーゼの活性化状態を遷延させることが明らかになった。(平成20年度/小川)

CBL ノックアウトマウスでは、髄外造血を伴う脾腫ならびに骨髄幹細胞プールの拡大が認められること、*BCR/ABL* トランスジーン導入による CML モデルにおける急性転化が促進されること、また、全個体が遅発性の浸潤がんを発症することから、*CBL* 遺伝子自身はがん抑制遺伝子として機能することが明らかになった。一方、*CBL* ノックアウトマウスの造血前駆細胞は *CBL* 変異体の導入によってサイトカインへの感受性が強く上昇すること、また、この感受性の上昇は野生型アレルの導入によって強く抑制されることから、*CBL* 変異は機能獲得型変異であると考えられた。*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る。(平成21年度/小川)

B. *Miki* 遺伝子(7q 標的遺伝子)欠失効果の解析

Miki は分裂期の中心体や紡錘糸に局在した。その発現が抑制された細胞では、中心体成熟が抑制される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、染色体散乱 (コルヒチンミトーゼ) や染色体ロゼット形成等の異常な分裂中期像を生じ、二核・多核・小核細胞など MDS に特徴的な形態異常を示した。(平成19年度/稲葉)

C. *Titan* 遺伝子(7q 標的遺伝子)欠失効果の解析

Titan ノックアウトマウスは高齢になると MDS を中心とした骨髄性腫瘍をほぼ半数が発症することが明らかになった。さらに、*Titan* 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た所、ほぼ全個体が MDS を中心とした骨髄性腫瘍を発症した。ウイルス挿入部位を解析した所、6 個体で *Evi-1* 遺伝子の 3' 上流に、3 個体でヒストン脱メチル化酵素をコードする *Fbxl10* 遺伝子の 3' 上流に挿入されていた。これらの結果はヘテロノックアウトマウスでもホモノックアウトマウスでもほぼ同様であったことから、*Titan/Kasumi* は haploinsufficiency (片側アレルの欠失) 効果で MDS を発症させると考えられた。(平成20年度/稲葉) 骨髄移植実験により、*Titan* の欠失と *Evi-1* 遺伝子の過剰発現が協調して MDS を発症させることを確認した。*Evi-1* と *Fbxl10* はいずれも p15^{INK4b} の発現を抑制することから、p15 の転写調節やエピゲノム制御を介する発現抑制が MDS の発症に重要な役割を担っていると考えられた。一方、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。(平成21年度/稲葉)

D. β カテニンの活性化機序の検討

FLT3 が活性化している細胞株では、チロシンリン酸化 β カテニンが同定され、これが核内に移行し β カテニンの標的遺伝子である *MYC* や *CCND1* の転写を活性化させた。 β カテニンは FLT3 と結合し、その基

質となり得ることを証明した。従って、白血病・MDS で認められるβ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、チロシンリン酸化が関与する可能性が示唆された。(平成19年度/直江)

E. t(12;17)のキメラ遺伝子の同定

t(12;17)を保有するMDS/AML症例の腫瘍細胞から、新規TEL/ETV6融合遺伝子を同定した。3'RACE法により、TEL遺伝子は17番染色体短腕に存在するTAO1キナーゼ遺伝子の相補鎖に結合していることが明らかになった。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、内因性TAO1蛋白の発現がTEL-TAO1r発現の濃度依存性に減弱することから、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させた後にUV刺激を加えた所、野生株で認められるp38MAP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。(平成20、21年度/直江)

F. WT1の発現調節機構及びN末短縮型WT1 mRNAの発現と意義に関する検討

様々な白血病・固形癌細胞株においてWT1 mRNAとGATA1及びGATA2 mRNAの発現には高い相関が認められた。免疫プロット法でもWT1蛋白とGATA-1及びGATA-2蛋白の発現には強い相関が認められた。WT1遺伝子の5'プロモーターをルシフェラーゼ・レポーターに挿入して解析を行ったが、非発現細胞株と高発現細胞株の差を説明出来なかった。しかし、3'エンハンサー領域内の最も遠位に位置するGATA結合部位は有意に転写活性を上昇させた。EMSA法でも直接の結合が確認され、MDSでもGATA1/2がWT1 mRNA量に影響を与えたと考えられた。一方、N端を欠失するWT1(sWT1) mRNAはMDS症例33例中8例(24.2%)に認められ、その頻度はAMLや慢性骨髄性白血病での22-29%とほぼ同程度であった。一方、正常骨髄・末梢血・臍帯血ではsWT1 mRNAの発現は観察されなかった。WT1 mRNAとsWT1 mRNAの発現には強い相関があり、このため腫瘍に特徴的であると考えられた。(平成21年度/直江)

(5) 治療薬の臨床効果及び作用機序の検討

A. ビタミンK2の臨床効果の検討

ビタミンK2の単独療法では16週後に13%の血液学的改善を認めた。さらに無効例の内20例がビタミンD3+ビタミンK2併用療法に移行し、6例(30%)に血液学的改善が得られた。貧血の改善は54%、血小板減少の改善は30%に認め、輸血依存からの脱却例も観察されたが、好中球減少の改善例はなかった。副作用は消化器症状等軽微であり、低リスクMDSに有効な治療法であることを確認した。(平成19年度/大屋敷)

B. デフェラシロックスの抗白血病細胞効果の検討

デフェラシロックスの抗白血病細胞効果は、ヒトへの経口投与で到達する濃度(IC50: 50 nm)で、REDD発現上昇→TSC誘導→mTOR抑制→S6Kリン酸化抑制の経路によるものであることが判明した。さらに、ヒト白血病細胞移植マウスにおける白血病細胞増殖抑

制効果も確認され、一部のMDS患者においてはデフェラシロックスによる抗白血病効果が期待されること示唆された。(平成20年度/大屋敷)

C. デフェラシロックスの臨床評価法の確立

心鉄過剰状態の把握には心臓MRI検査によるT2*値及びR2*値の算出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。

(平成21年度/大屋敷)

(6) MDS検体集積事業

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。(平成19-21年度/内山、石川、三谷)

D. 考察

(1) SNPアレイを用いたゲノムコピー数異常・アレル不均衡の解析及び網羅的ゲノム変異の解析

ゲノム解析研究は、CGHアレイの時代からSNPアレイの時代へと長足の進歩を遂げて来た。前者ではゲノムのコピー数の変化のみしか観察することができないが、後者ではアレル不均衡に関する情報も得られる。CGHアレイの技術を用いて、本班では世界に先駆けて7q-の責任遺伝子Samd9 = Kasumi, Samd9L = Titan, LOC253012 = Mikiの単離に成功している。一方、SNPアレイによるアレル不均衡の分布の情報が、MDSの病型の細分類を可能にすることが明らかになった。11qUPDの集積領域にはCBL遺伝子のホモ変異が観察されることから、変異型CBLは新たなMDSの原因遺伝子であり、MDSの発症には野生型CBLの欠失が重要であると考えられた。

(2) miRNAの発現異常の解析

造血器腫瘍発症とmiRNAの発現異常との関係が注目されている。特に、がん抑制遺伝子由来の転写産物の翻訳を負に制御するmiRNAの過剰発現は、腫瘍発症の原因となる可能性がある。本研究では、その機能的失活がMDSの発症に重要な役割を担うRUNX1遺伝子のmRNAを標的とするmiRNAの発現レベルを検討した。それらの中でmiR-9は、正常の骨髄では発現していないものの、MDSの約20%の症例に過剰発現が観察された。miR-9の過剰発現はMDSの発症においてRUNX1の機能的失活のひとつの機序になっていると考えられた。さらに、miR-9はAMLの症例においてもほぼ同頻度で過剰発現しており、しかもmiR-9の過剰発現は臨床的には明確な予後不良因子であった。このことは、miR-9の過剰発現がMDSの病期の進展に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 のみとは限らない。今後 miR-9 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なる可能性がある。さらに、miRNA を標的とした新しい分子治療が開発されることも期待される。

(3) プロテオミクス解析による蛋白発現異常の解析

プロテオミクス研究では、まず蛋白修飾においてリン酸化が重要であることに注目して、MDS/AML の骨髄 CD34 陽性細胞で発現が変化しているリン酸化蛋白を同定した。これらは、MDS/AML の発症・進展に関与する可能性があると考えられる。一方、MDS/AML においては解析に必要な数の CD34 陽性細胞を確保するのが比較的容易であるのに対して、RA のような低リスク MDS においてはしばしば困難である。この技術的な問題に関しては、saturation dye を用いて検出感度を上げることにより克服した。その結果、RA の CD34 陽性細胞を用いた解析が可能となり、低リスク MDS 及び進展期 MDS 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。これらの蛋白の発現の変化は MDS の分子病態を考察する際に重要な糸口となるが、これらを標的とした新たな分子標的療法の開発も期待される。

(4) 同定された候補分子の機能解析

第一に、11q UPD より新規 MDS の原因遺伝子として変異型 *CBL* 遺伝子が同定された。野生型及び変異型 *CBL* 遺伝子の機能解析が、分子生物学的・発生工学的に進められた。野生型 *CBL* ががん抑制遺伝子であることは、発生工学マウスにより確認された。野生型 *CBL* は E3 コピキチンリガーゼ活性を有するが、変異体では同活性が失われており、その結果変異型 *CBL* 発現細胞では増殖因子受容体の活性化状態が遷延する。通常はがん抑制遺伝子の変異は“loss-of-function”型変異であるが、*CBL* の変異は“gain-of-function”型である点が特異である。*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。

第二に、これまで同定してきた 7q- の責任遺伝子の中で、*Miki* 及び *Titan* の機能に関する生化学的・発生工学的機能の知見が得られた。*Miki* は細胞周期の M 期における中心体の分離に必須の役割を担っており、*Miki* の欠失は中心体の分離不全をもたらす、MDS 細胞に特徴的な形態異常の原因となることが明らかになった。一方、*Titan* ノックアウトマウスは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局在して EEA1 と結合しており、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。7q- 型 MDS にも 11q UPD 型 MDS と同様に、受容体型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が示唆された。

第三に、MDS/AML 症例に観察された t(12;17)(p13;q11) より、新規原因遺伝子 *TEL-TAO1r* が同定された。*TEL-TAO1r* 遺伝子は *TAO1* mRNA に対してアンチセンスとして機能し、内因性 *TAO1* 蛋白の発現を低下させる。これは、tail-to-tail に融合し

たキメラ遺伝子がアンチセンスとして機能することを示した最初の例である。興味深いことに、この転座を有しない MDS においても *TAO1* の発現は低い傾向にあった。*TAO1* の失活は、DNA 損傷などのストレスに対する応答異常あるいは細胞分裂におけるスピンドルチェックポイントの制御異常を介して MDS の病態形成に関与している可能性がある。7q- の原因遺伝子 *Miki* の機能的失活も中心体分離不全を介して細胞周期 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。

(5) 治療薬の臨床効果及び作用機序の検討

前班で実施した多施設共同研究「不応性貧血におけるビタミン K2 単独療法ならびにビタミン K2 と D3 併用療法」の追跡結果がまとめられ、ビタミン療法の有効性と安全性が確認された。現在本邦においてはビタミン療法は保険適応になっていないが、これらの臨床試験の結果が評価されることを期待したい。

一方、輸血による慢性鉄過剰症に保険適応となった経口除鉄剤デフェラシロックスの造血回復効果が注目されている。今回デフェラシロックスの抗腫瘍効果の機序として、REDD 発現上昇→TSC 誘導→mTOR 抑制→SGK リン酸化抑制を明らかにした。こうした知見が、適応拡大の基礎になることが期待される。また、鉄過剰症治療の評価法として、心臓の MRI 検査が有用であることを明らかにした。臨床現場に応用可能な知見である。

(6) 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結果が得られている。このことにより、検体集積が加速するとともに、ゲノム情報と臨床情報の照合が進み、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

本研究においては、(1) SNP アレイを用いたゲノムコピー数・アレール不均衡の解析及び網羅的ゲノム変異の解析、(2) miRNA 発現異常の解析、(3) プロテオミクス解析による蛋白発現異常の解析、(4) 同定された候補分子の機能解析、(5) 治療薬の臨床効果及び作用機序の検討、(6) MDS 検体集積事業を柱として研究が展開されたが、新規原因遺伝子同定のためのゲノム解析技術の開発、世界に先駆けた 7q- 及び 11q UPD の標的遺伝子の同定、それらの機能解析、発現異常 miRNA 及び蛋白の同定、既存の治療薬の作用機序の解明と臨床効果評価方法の確立等、基礎から臨床に至るまで高範囲にわたる成果が得られた。これらの成果は、新規分子標的療法開発の基礎となるものである。今後の分子病態研究の基盤整備を目的とした検体集積事業も順調に進んでいる。

F. 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. 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
4. 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
5. 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
6. 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 multi-center randomized, controlled study. *Int J Hematol* 85: 121-127, 2007
7. 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
8. 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
9. 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
10. 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
11. Ogawa S, Nannya Y, 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
12. 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
13. 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
14. Maki K, Yamagata T, Mitani K. Role of the RUNX1-EVI1 fusion gene in leukemogenesis. *Cancer Sci* 99: 1878-1883, 2008
15. 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
16. 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
17. 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
18. 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
19. 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
20. 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
21. 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
22. 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
 23. 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
 24. Aki D, Minoda Y, Yoshida H, Watanabe S, Yoshida R, Takaesu G, Chinen T, Inaba T, Hikida M, Kurosaki T, Saeki K, Yoshimura A. Peptidoglycan and lipopolysaccharide activate PLC β 2, leading to enhanced cytokine production in macrophages and dendritic cells. *Genes Cells* 13: 199-208, 2008
 25. 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
 26. 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
 27. 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
 28. Yamada O, Kawachi 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
 29. Kawamata N, Ogawa S, Yamamoto G, Lehmann S, Levine RL, Pikman 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
 30. 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
 31. 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
 32. 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
 33. 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
 34. 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
 35. Ohyashiki JH, Kobayashi C, Hamamura R, Okabe S, Tauchi T, Ohyashiki K. The oral iron chelator deferasirox represses signaling through the mTOR in myeloid leukemia cells by enhancing expression of REDD1. *Cancer Sci* 100: 970-977, 2009
 36. 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
 37. 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
 38. 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
 39. Wang YH, Takanashi M, Tsuji K, Hiroike N, Shiseki M, Mori N, Motoji T. Level of DNA topoisomerase II α mRNA predicts the treatment response of relapsed acute leukemic patients. *Leuk Res* 33: 902-907, 2009
 40. 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. *Int J Hematol* 89: 332-341,

2009

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

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

43. 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, Koefler HP, Ogawa S. Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms. *Nature* 460: 904-908, 2009

44. 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

45. 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

46. 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)

47. 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)

G. 知的所有権の取得状況

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. 研究成果の刊行に関する一覧

研究成果の刊行に関する一覧表（論文）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Yamagata T, Nakamura Y, <u>Mitani K.</u>	Low expression of ETV6/TEL found in patients with myelodysplastic syndrome.	Int J Hematol	86	282-285	2007
Tokita K, Maki K, <u>Mitani K.</u>	RUNX1/EVI1 that blocks myeloid differentiation inhibits CCAAT-enhancer binding protein a function.	Cancer Sci	98	1752-1757	2007
Ishikawa T, Tohyama K, Nakao S, Yoshida Y, Teramura M, <u>Motoji T.</u> , Takatoku M, Kurokawa M, <u>Mitani K.</u> , <u>Uchiyama T.</u> , 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
Iwasaki T, Sugisaki C, Nagata K, Takagi K, Takagi A, Kojima T, Ito M, Nakamura S, <u>Naoe T.</u> , Murate T.	Wilms' tumor 1 message and protein expression in bone marrow failure syndrome and acute leukemia.	Pathol Int	57	645-651	2007
Kajiguchi T, Chung EJ, Lee S, Stine A, Kiyoi H, <u>Naoe T.</u> , 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
Ito Y, <u>Ohyashiki K.</u> , 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
<u>Ohyashiki K.</u> , Hori K, Makino T, <u>Ohyashiki JH.</u>	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
<u>Ohyashiki K.</u> , Tauchi T, Kuroda M, Kodama A, <u>Ohyashiki JH.</u>	Recurrent chromosomal aberration at 12q15 in chronic idiopathic myelofibrosis with or without JAK2(V617F) mutation.	Leukemia	21	1578-1580	2007
Shiseki M, Kitagawa Y, Wang YH, Yoshinaga K, Kondo T, Kuroiwa H, Okada M, Mori N, <u>Motoji T.</u>	Lack of nucleophosmin mutation in patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with chromosome 5 abnormalities.	Luek Lymphoma	48	2141-2144	2007
Yasunami T, Wang YH, Tsuji K, Takanashi M, Yamada Y, <u>Motoji T.</u>	Multidrug resistance protein expression of adult T-cell leukemia/lymphoma.	Leukemia Res	31	465-470	2007

研究成果の刊行に関する一覧表（論文）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
<u>Ogawa S</u> , Nannya Y, 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
Yamamoto G, Nannya Y, Kato M, Sanada M, Levine RL, Kawamata N, Hangaishi A, Kurokawa M, Chiba S, Gilliland DG, Koeffler HP, <u>Ogawa S</u> .	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	114-126	2007
Sanada M, Uike N, Ohyashiki K, Ozawa K, Lili W, Hangaishi A, Kanda Y, Chiba S, Kurokawa M, Omine M, Mitani K, <u>Ogawa S</u> .	Unbalanced translocation der(1;7)(q10;p10) defines a unique clinicopathological subgroup of myeloid neoplasms.	Leukemia	21	992-997	2007
Sasaki K, Yamagata T, <u>Mitani K</u> .	Histone deacetylase inhibitors trichostatin A and valproic acid circumvent apoptosis in human leukemic cells expressing the RUNX1 chimera.	Cancer Sci	99	414-422	2008
Maki K, Yamagata T, <u>Mitani K</u> .	Role of the RUNX1-EVI1 fusion gene in leukemogenesis.	Cancer Sci	99	1878- 1883	2008
Tasaka T, Tohyama K, Kishimoto M, Ohyashiki K, <u>Mitani K</u> , Hotta T, Kanamaru A, Okamoto S, Karasawa M, Kimura A, Tomonaga M, <u>Uchiyama T</u> , Ozawa K.	Myelodysplastic syndrome with chromosome 5 abnormalities: a nationwide survey in Japan.	Leukemia	22	1874-1881	2008
Shindo T, Ishikawa T, Fukunaga A, Hori T, <u>Uchiyama T</u> .	Growth and Differentiation Advantages of CD4+OX40+ T Cells from Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Recipients.	Biol Blood Marrow Transplant	14	268-281	2008
Kawahara M, Hori T, Chonabayashi K, Oka T, Sudol M, <u>Uchiyama T</u> .	Kpm/Lats2 in linked to chemosensitivity of leukemic cells through the stabilization of p73.	Blood	112	3856-3866	2008
Yamashita K, Miyoshi T, Arai T, Endo N, Itoh H, Makino K, Mizugishi K, <u>Uchiyama T</u> , Sasada M.	Ozone production by amino acids contributes to killing of bacteria.	Proc Natl Acad Sci USA	105	16912-16917	2008
Ishikawa Y, Xu J, Sakashita G, Urano T, Suzuki T, Tomita A, Kiyoi H, Nakamura S, <u>Naoe T</u> .	Abnormal cytoplasmic dyslocalisation and/or reduction of nucleophosmin protein level rarely occurs in myelodysplastic syndromes.	Leuk Lymphoma	49	2359-2364	2008

研究成果の刊行に関する一覧表（論文）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Hayakawa F, Abe A, Kitabayashi I, Pandolfi PP, <u>Naoe T.</u>	Acetylation of PML is involved in histone deacetylase inhibitor-mediated apoptosis.	J Biol Chem	283	24420-24425	2008
Xu J, Suzuki M, Niwa Y, Hiraga J, Nagasaka T, Ito M, Nakamura S, Tomita A, Abe A, Kiyoi H, Kinoshita T, <u>Naoe T.</u>	Clinical significance of nuclear non-phosphorylated beta-catenin in acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome.	Br J Haematol	140	394-401	2008
Miyazawa K, <u>Ohyashiki K.</u> , Urabe A, Hata T, Nakao S, Ozawa K, Ishikawa T, Kato J, Tatsumi Y, Mori H, Kondo M, Taniguchi J, Tani H, Rojksjaer 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
Yokoyama T, Miyazawa K, Naito M, Toyotake J, Tauchi T, Itoh M, Yuo A, Hayashi Y, Georgescu MM, Kondo Y, Kondo S, <u>Ohyashiki K.</u>	Vitamin K2 induces autophagy and apoptosis simultaneously in leukemia cells.	Autophagy	4	629-640	2008
Watanabe-Okochi N, Kitaura J, Ono R, Harada H, Harada Y, Komeno Y, Nakajima H, Nosaka T, <u>Inaba T.</u> , Kitamura T.	AML1 mutations induced MDS and MDS/AML in a mouse BMT model.	Blood	111	4297-4308	2008
Aki D, Minoda Y, Yoshida H, Watanabe S, Yoshida R, Takaesu G, Chinen T, <u>Inaba T.</u> , Hikida M, Kurosaki T, Saeki K, Yoshimura A.	Peptidoglycan and lipopolysaccharide activate PLCg2, leading to enhanced cytokine production in macrophages and dendritic cells.	Genes Cells	13	199-208	2008
Yoshinaga K, Mori N, Wang YH, Tomita K, Shiseki M, <u>Motoji T.</u>	JAK2 V617F mutation is rare in idiopathic erythrocytosis: a difference from polycythemia vera.	Int J Hematol	88	82-87	2008
Mori N, Yoshinaga K, Tada M, Wang YH, Shiseki M, <u>Motoji T.</u>	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
Yamada O, Kawauchi K, Akiyama M, Ozaki K, <u>Motoji T.</u> , Adachi T, Aikawa E.	Leukemic cells with increased telomerase activity exhibit resistance to imatinib.	Leuk Lymphoma	49	1168-1177	2008
Kawamata N, <u>Ogawa S.</u> , Yamamoto G, Lehmann S, Levine RL, Pikman Y, Nannya Y, Sanada M, Miller CW, Gilliland DG, Koefler HP.	Genetic profiling of myeloproliferative disorders by single-nucleotide polymorphism oligonucleotide microarray.	Exp Hematol	36	1471-1479	2008

研究成果の刊行に関する一覧表（論文）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Maki K, Porcher C, Shimizu R, Yamamoto M, <u>Mitani K.</u>	Leukemia-related transcription factor TEL/ETV6 expands erythroid precursors and stimulates hemoglobin synthesis.	Cancer Sci	100	689-697	2009
Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Ohyashiki K, Yamagata T, <u>Mitani K.</u>	Enhanced expression of the EVI1 gene in NUP98/HOXA-expressing leukemia cells.	Int J Hematol	89	253-256	2009
Sasaki K, Tahara T, <u>Mitani K.</u>	Presentation of familial Mediterranean fever in a heterozygous MEFV mutation triggered by immunosuppressive therapy for myelodysplastic syndrome.	Int J Hematol	90	91-93	2009
Kanda J, Mizumoto C, Kawabata H, Ichinohe T, Tsuchida H, Tomosugi N, Matsuo K, Yamashita K, Kondo T, <u>Ishikawa T.</u> , 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
Mizumoto C, Kanda J, Ichinohe T, <u>Ishikawa T.</u> , 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
Furuhata A, Murakami M, Ito H, Gao S, Yoshida K, Sobue S, Kikuchi R, Iwasaki T, Takagi A, Kojima T, Suzuki M, Abe A, <u>Naoe T.</u> , Murate T.	GATA-1 and GATA-2 binding to 3' enhancer of WT1 gene is essential for its transcription in acute leukemia and solid tumor cell lines.	Leukemia	23	1270-1277	2009
Ohyashiki JH, Kobayashi C, Hamamura R, Okabe S, Tauchi T, <u>Ohyashiki K.</u>	The oral iron chelator deferasirox represses signaling through the mTOR in myeloid leukemia cells by enhancing expression of REDD1.	Cancer Sci	100	970-977	2009
Park J, <u>Ohyashiki K.</u> , 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
Asou H, Matsui H, Ozaki Y, Nagamachi A, Nakamura M, Aki D, <u>Inaba T.</u>	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
Wang YH, Takanashi M, Tsuji K, Hiroike N, Shiseki M, Mori N, <u>Motoji T.</u>	Level of DNA topoisomerase II α mRNA predicts the treatment response of relapsed acute leukemic patients.	Leuk Res	33	902-907	2009

研究成果の刊行に関する一覧表（論文）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
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.	Int J Hematol	89	332-341	2009
Akagi T, Shih LY, Kato M, Kawamata N, Yamamoto G, Sanada M, Okamoto R, Miller CW, Liang DC, Ogawa S, Koeffler HP.	Hidden abnormalities and novel classification of t(15;17) acute promyelocytic leukemia (APL) based on genomic alterations.	Blood	113	1741-1748	2009
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	213-23	2009
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
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
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
Ando K, Kodama A, Iwabuchi T, Ohyashiki JH, Ohyashiki K.	Idiopathic neutropenia with fewer than 5% dysplasia may be a distinct entity of idiopathic cytopenia of undetermined significance.	Ann Hematol		(in press)	
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)	

III. 研究成果の刊行物・別刷

Low-Level Expression of ETV6/TEL in Patients with Myelodysplastic Syndrome

Tetsuya Yamagata, Yuka Nakamura, Kinuko Mitani

Department of Hematology, Dokkyo Medical University School of Medicine, Tochigi, Japan

Received May 7, 2007; received in revised form May 25, 2007; accepted June 12, 2007

Int J Hematol. 2007;86:282-285. doi: 10.1532/IJH97.07074
© 2007 The Japanese Society of Hematology

Myelodysplastic syndrome (MDS) is a group of myeloid disorders characterized by varying degrees of cytopenia with morphologic abnormalities in multiple blood cell lineages. The disease exhibits a broad clinical spectrum, from moderate anemia requiring occasional transfusion to progressive leukemia that needs immediate cytoreductive chemotherapy. In accordance with this variability, the pathogenesis of the disease is believed to be heterogeneous, including genetic abnormalities, immune dysregulation, and toxic environmental factors.

Of the genetic abnormalities, point mutations in key signaling molecules have been detected in MDS patients, implying that the dysregulation of signaling pathways plays a crucial role in the disease [1]. The mutations that cause constitutive activation of the receptor tyrosine kinase and RAS/MAPK pathways are key to the pathophysiology of this disease. These mutations generate constitutive proliferation signals in the cells, causing dysregulated expansion of the affected clones and replacement of the normal hematopoietic tissues, leading to progression into leukemia.

Point mutations in the *TP53* gene constitute one of the key genetic alterations in MDS. Mutations in *TP53* cause defects in apoptosis and cell cycle arrest, which allow the survival and expansion of the clones harboring other oncogenic alterations, thereby leading to the development of cancer or leukemia. Resistance to apoptosis and defects in cell cycle arrest have been documented in bone marrow cells from MDS patients. Thus, the mutation or deletion of *TP53* is thought to promote the development of MDS.

The activity of TP53 is controlled by various upstream molecules. MDM2 is a TP53-specific E3 ligase that binds to TP53 and promotes its ubiquitination and subsequent degradation. Recently, a KRAB-associated transcriptional

corepressor, TRIM28 (also known as KAP1), has been reported to regulate TP53 via protein-protein interaction with MDM2 [2]. More recently, our group showed that the proapoptotic function of TP53 is enhanced by the overexpression of ETV6/TEL, an ETS family transcriptional repressor involved in various forms of leukemia [3]. Furthermore, we have used mass spectrometry analysis in an independent search for molecules that interact with ETV6 and have reported TRIM28 to be a possible candidate [4]. Abnormalities in TP53 regulatory molecules have been implicated in the pathogenesis of hematopoietic malignancies. Thus, in the present study we searched for structural alterations in or aberrant expression of MDM2, TRIM28, and ETV6 that might influence the tumor suppressor activity of TP53 and lead to the generation of MDS.

We collected bone marrow cells according to protocols approved by the institutional review board at Dokkyo Medical University after obtaining written informed consent from the patients. RNA was extracted from cells and analyzed in our laboratory in the same institution. We conducted reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) direct sequence analysis with primers that cover most of the regions encoding TP53, MDM2, TRIM28, and ETV6 proteins. The results are summarized in Table 1. In the 40 patient samples examined (refractory anemia [RA], 13 patients; RA with ringed sideroblasts, 1 patient; RA with excess of blasts (RAEB), 18 patients; RAEB in transformation [RAEB-t], 6 patients; chronic myelomonocytic leukemia, 2 patients), we identified 4 mutations in *TP53* messenger RNA (mRNA) that cause amino acid substitutions (Gly154Asp, Ile162Ser, Arg280Gly, and Tyr236Cys). The first 3 mutations have been reported in the literature, and the fourth mutation, Tyr236Cys, was discovered in our analysis. All 4 amino acid changes were located within the DNA-binding region of the TP53 protein. The frequency of mutations found in our analysis (4/40) is consistent with the frequencies described in earlier reports [5] and with updated statistics in a TP53 database (82/646; <http://www.iarc.fr/p53/>). Besides these 4 mutations, we have identified 2 missense single nucleotide polymorphisms

Correspondence and reprint requests: Kinuko Mitani, MD, PhD, Professor, Department of Hematology, Dokkyo Medical University School of Medicine, 880 Kitakobayashi, Mibu-machi, Shimotsuga-gun, Tochigi-ken 321-0293, Japan; 81-282-86-5630; fax: 81-282-86-5630 (e-mail: kinukom-ky@umin.ac.jp).