

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 4日現在

機関番号：11101
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591149
 研究課題名（和文） BACH1トランスジェニックマウスを用いた骨髄線維症の
 分子標的療法の開発
 研究課題名（英文） Development of molecular targeted therapy
 of bone marrow fibrosis with BACH1 transgenic mice
 研究代表者
 佐々木 伸也（SASAKI SHINYA）
 弘前大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：10344590

研究成果の概要（和文）：

骨髄線維症の発症機序を解明し骨髄線維症に対する分子標的療法を開発するために、BACH1 トランスジェニックマウス（骨髄線維症モデルマウス）を用いて以下の研究を進めた。

1. 巨核球におけるBACH1の標的遺伝子としてthromboxane A synthaseを同定した。
2. 骨髄線維症に対し、様々な組織の線維化を抑制する機能を有する肝細胞増殖因子の治療効果について解析を行った。しかし、明らかな有効性は得られなかった。

研究成果の概要（英文）：

We performed this study using BACH1 transgenic mice (model mice for myelofibrosis) to understand the mechanism of myelofibrosis and develop the molecular target therapy, and found the following results.

1. We identified the thromboxane A synthase gene as a BACH1 target in megakaryocytes.
2. We investigated the anti-myelofibrosis effects of hepatocyte growth factor, which has a function of suppressing fibrosis of various tissues, on BACH1 transgenic mice. However, no significant effects were observed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,300,000	390,000	1,690,000
23年度	1,100,000	330,000	1,430,000
24年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児血液学、骨髄線維症、BACH1

1. 研究開始当初の背景

| 原発性骨髄線維症は最も重症な骨髄増

殖性疾患であり、予後不良である。約40%は原因不明で、また有効な治療法は未だに開発されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が開発した骨髄線維症のモデルマウスを用いて、原発性骨髄線維症発症の分子機構の解明と分子標的療法の開発をすることである。

3. 研究の方法

(1) BACH1 トランスジェニックマウスにおける骨髄線維症の発症機序解明。

受精後 13.5 日のマウス胎児から肝を採取し、TPO 存在下に液体培養し、巨核球を大量に得た。Mac-1, GR-1, TER-119 抗体、次に IgG 抗体でコートされた磁気ビーズに反応させた後、MACS カラムを通して、巨核球以外の細胞を除いて巨核球を純化し、RNA を抽出する。次に、BACH1 TG とコントロールマウスの巨核球における遺伝子の発現量の差を DNA マイクロアレイ法と定量的 PCR 法 (real time-RT-PCR 法) で行う。次に、ChIP アッセイ法により、BACH1 の直接の標的遺伝子を明らかにする。

(2) 原発性骨髄線維症に対する分子標的療法の開発。

様々な組織の線維化を抑制する機能を有する Hepatocyte growth factor (HGF) が BACH1 トランスジェニックマウスの骨髄線維症を抑制可能か in vivo の系で解析する。

4. 研究成果

(1) 骨髄線維化を誘導する遺伝子を同定するために、BACH1 トランスジェニックマウスとコントロールマウスの巨核球における遺伝子発現量の差を DNA マイクロアレイ法と定量的 PCR 法を用いて解析した。その結果、thromboxane A synthase (TXAS) などの遺伝子の発現が有意に低下していることが観察された。さらに、興味深いことに Irf7, Ifi203, Ifi202b, Ifi35 などのインターフェロンによって制御される遺伝子群の有意な発現誘導が認められた。しかし、BACH1 は転写抑制因子と考えられていることから、インターフェロンによって制御される遺伝子群の発現誘導は、BACH1 の過剰発現による間接的な効果と考えられた。

(2) 直接の標的遺伝子の候補である TXAS

遺伝子などについて解析を行った。ChIP アッセイの結果、BACH1 が巨核球系細胞株の中で、TXAS 遺伝子のプロモーターとエンハンサーに結合していることが明らかになった。そこで、次に、BACH1 が TXAS 遺伝子の発現を直接抑制しているかどうかをみるために、TXAS 遺伝子をルシフェラーゼ遺伝子に結合したレポータープラスミドと BACH1 発現ベクターを巨核球系細胞株に遺伝子導入した。その結果、BACH1 は量依存的に TXAS 遺伝子の発現を抑制することが明らかになった。

(3) BACH1 の標的遺伝子の内、どれが線維化の原因になっているかを明らかにするために、BACH1 TG を骨髄線維化の高度な群と軽度な群に分類して、これらの遺伝子の発現量を検討した。しかし、いずれの遺伝子の発現も両群で有意差を認めなかった。

(4) HCG は、様々な組織の線維化を抑制する機能をもつ。一方、PDGF および TGF β は組織の線維化を促進する。肝線維症を高率に合併する TAM および骨髄線維症を合併する骨髄急性巨核球性白血病 (AMKL) 細胞株におけるこれらの遺伝子の発現量を real time-RT-PCR 法で解析した。コントロールとして小児急性リンパ性白血病 5 検体を用いた。その結果、解析した 12 例の TAM 芽球および 8 種の AMKL 細胞株における TGF β 、PDGFA および PDGFB の有意な発現を認めた。しかし、HGF の発現は認められなかった。

(5) 骨髄線維症に対する分子標的療法を開発するために、肝線維症に対して有効な HGF について解析を行った。BACH1 TG (16 匹) およびコントロールマウス (22 匹) における HGF 血中濃度と血小板数を測定し、両者の関係について解析した。その結果、HGF 濃度と血小板数に有意な相関がないことが明らかになった。一方、予想通り、TPO は血小板数の少ない BACH1 TG で有意に高値であった。そこで、HGF (500 μ g/kg/day) および saline を BACH1 TG 各 7 匹に 21 日間連日投与した。しかし、血小板増加も骨髄線維症も改善が認められなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

1. Sasaki S, Kamio T, Kudo K, Sato T, Tono C, Takahashi T, Terui K, Ito E. Hypercalcemia following umbilical cord blood transplantation to correct osteopetrosis associated with the *NEMO* mutation. *Hirosaki Med. J.* 2013;64 p. S86-S89.
URL: <http://hdl.handle.net/10129/4872>.
2. Kawai T, Nishikomori R, Izawa K, Murata Y, Tanaka N, Sakai H, Saito M, Yasumi T, Takaoka Y, Nakahata T, Mizukami T, Nunoi H, Kiyohara Y, Yoden A, Murata T, Sasaki S, Ito E, Akutagawa H, Kawai T, Imai C, Okada S, Kobayashi M, Heike T. Frequent somatic mosaicism of *NEMO* in T cells of patients with X-1 linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. *Blood.* 2012;119(23):5458-66.
DOI: 10.1182/blood-2011-05-354167.
査読あり.
3. Kudo K, Terui K, Sasaki S, MD, Kamio T, Sato T, Ito E. CD7-positive acute myelomonocytic leukemia with trisomy 21 as a sole acquired chromosomal abnormality in two adolescents. *Leuk Res.* 2011;35(9): e167-8.
DOI: 10.1016/j.leukres.2011.04.016.
査読あり.
4. Kudo K, Terui K, MD, Sasaki S, Kamio T, Sato T, and Ito E. Voriconazole for both successful treatment of disseminated *Trichosporon asahii* infection and subsequent cord blood transplantation in an infant with acute myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2011;46(2):310-1.
DOI: 10.1038/bmt.2010.96. 査読あり.
5. Terui K, Takahashi Y, Sasaki S, Kudo K, Kamio T, Ito E. Guillain-Barre Syndrome mimicking acute methotrexate-associated encephalopathy in an adolescent patient with lymphoblastic lymphoma. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2010;32(8):615-6.
DOI: 10.1097/MPH.0b013e3181d204b1.
査読あり.

6. Matsuda K, Sakashita K, Taira C, Tanaka-Yanagisawa M, Yanagisawa R, Shiohara M, Kanegane H, Hasegawa D, Kawasaki K, Endo M, Yajima S, Sasaki S, Kato K, Koike K, Kikuchi A, Ogawa A, Watanabe A, Sotomatsu M, Nonoyama S, Koike K.
Quantitative assessment of PTPN11 or RAS mutations at the neonatal period and during the clinical course in patients with juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2010; 148(4): 593-9.
DOI:10.1111/j.1365-2141.2009.07968.x.
査読あり.

[学会発表] (計9件)

- ①佐藤知彦、中村多一郎、佐々木伸也、照井君典、伊藤悦朗. 腎明細胞肉腫治療後、早期に治療関連骨髄性腫瘍を発症した一例. 第54回日本小児血液・がん学会学術総会、2012年11月30日、横浜
- ②佐々木伸也、廣瀬千穂、中村多一郎、佐藤知彦、神尾卓哉、照井君典、伊藤悦朗. 自己免疫性溶血性貧血発症後に診断された慢性肉芽腫症の1例. 第64回北日本小児科学会、2012年9月8日、新潟
- ③神尾卓哉、千葉奈歩、佐藤知彦、佐々木伸也、照井君典、伊藤悦朗. 慢性GVHDの治療中に発症したクリプトコッカス髄膜炎の1例. 第115回日本小児科学会学術集会、2012年4月20日、福岡
- ④佐々木伸也、佐藤知彦、神尾卓哉、照井君典、伊藤悦朗、遠野千佳子、高橋良博. NEMO異常症患者に認められた臍帯血移植後の変化(消化管病変を主に). 第34回日本造血細胞移植学会、2012年2月25日、大阪
- ⑤花田勇、照井君典、土岐力、工藤耕、佐藤知彦、神尾卓哉、佐々木伸也、高橋良博、林泰秀、杉田完爾、小島勢二、小池健一、小阪嘉之、小林正夫、伊藤悦朗. ダウン症候群関連ALLの発症におけるJAK2, およびCRLF2遺伝子異常の解析. 第53回日本小児血液・がん学会学術集会、2011年11月25日、前橋
- ⑥堤修一、王凌华、朴明子、照井君典、佐々木伸也、伊藤悦朗、林泰秀、油谷浩幸. MLL遺伝子再構成陽性の小児急性リンパ性白血病のエクソーム解析. 第53回日本小児血液・がん学会学術集会、2011年11月25日、

前橋

⑦佐藤知彦、神尾卓哉、佐々木伸也、照井君典、土岐力、伊藤悦朗. Diamond-Blackfan anemia (DBA) 乳児への Deferasirox の使用. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会、2011 年 11 月 25 日、前橋

⑧佐々木伸也、佐藤知彦、神尾卓哉、照井君典、伊藤悦朗. 当科で経験した小児成熟 B 細胞性腫瘍の 9 例. 第 52 回日本小児血液学会総会、2010 年 12 月 17 日、大阪

⑨佐々木伸也、佐藤知彦、神尾卓哉、照井君典、伊藤悦朗、大山力、袴田健一、須貝道博、棟方博文. 遠隔転移を伴った Xp11 転座小児腎細胞癌の 1 例. 第 62 回北日本小児科学会、2010 年 9 月 11 日、札幌

〔図書〕 (計 1 件)

佐々木伸也、伊藤悦朗. 血液系疾患の検査
白血病. 総合医学社、小児科学レクチャー
2, 2013, pp352-357.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 伸也 (SASAKI SHINYA)
弘前大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：1 0 3 4 4 5 9 0

(2) 研究分担者

照井 君典 (TERUI KIMINORI)
弘前大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：0 0 3 3 0 7 4 0

伊藤 悦朗 (ITO ETSURO)
弘前大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・
教授
研究者番号：2 0 1 6 8 3 3 9

(3) 連携研究者

なし