

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590696

研究課題名(和文) 血球異形成をもたらす分子機構に迫る～骨髄異形成症候群の病態解明に向けて

研究課題名(英文) Approach to the molecular mechanisms of hematopoietic dysplasia aiming at elucidation of the pathogenesis of myelodysplastic syndromes

研究代表者

通山 薫 (Tohyama, Kaoru)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：80227561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：今回研究者は骨髄異形成症候群に見られる血球異形成の分子機構の一端を解明すべく、細胞形態にかかわる中間径フィラメントのビメンチンに着目した。ヒト白血病細胞株HL60を成熟好中球様に分化誘導したところビメンチン発現が減少したのに対して、マクロファージ様に分化誘導したところビメンチン発現は著増した。次にビメンチン遺伝子を遺伝子工学的手法でノックダウンしてその影響を調べた。ノックダウン細胞株は成熟細胞になると細胞運動の活発化・貪食能の亢進傾向が見られたことから、ビメンチンは本来食細胞機能を負に制御している可能性が示唆された。したがってビメンチンは血球機能の恒常性維持に重要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：I focused attention on vimentin, one of the intermediate filaments which support cell shape and might be involved in the mechanisms of hematopoietic dysplasia, and examined the change of vimentin expression during the differentiation process of human leukemic HL60 cell line. Vimentin expression was down-regulated in the process of neutrophil-like differentiation of HL60 cells, while it was extremely up-regulated in the process of macrophage-like differentiation.

Next, I established HL60 cell clones whose vimentin expression was knock-downed by transfer of a lentiviral vector harboring vimentin-shRNA. Such vimentin-knock-downed clones were induced to differentiation and revealed increased leukocyte activity such as cell movement and phagocytosis. These data suggested that vimentin regulates leukocyte function negatively.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：遺伝子ノックダウン法 血球異形成 食細胞機能

1. 研究開始当初の背景

血液疾患では、血球の形態学的判定がしばしば診断の決め手となる。なかでも骨髓異形成症候群(myelodysplastic syndromes; MDS)の場合は血球形態異常(異形成)が特徴であるが、その分子メカニズムは不明である。

2. 研究の目的

本研究は培養細胞実験系と分子生物学的・免疫学的手法によって、血球異形成をもたらす分子機構の一端の解明を目的とするものである。

本研究ではとりわけ血液細胞における意義がまだ十分に解明されていない分子として中間径フィラメントに着目してきたが、なかでも白血球系細胞に高発現している中間径フィラメント・ビメンチンの局在と役割を追求することとした。

3. 研究の方法

ヒト白血病細胞株HL60をレンチニン酸処理にて成熟好中球方向へ、フォルボールエステル処理にてマクロファージ様に分化誘導した際のビメンチン発現の変化をウェスタンブロット解析および免疫細胞染色によって検討した。さらに健康人骨髓CD34陽性細胞から分化誘導した際の変化も検討した。

次にHL60を用いてレンチウイルスベクター-shRNAの導入によってビメンチン遺伝子をノックダウンした変異株を樹立し、この変異細胞株を好中球へ、もしくはマクロファージ様に分化誘導した際の影響を検討した。

4. 研究成果

ヒト白血病細胞株HL60を成熟好中球様に分化誘導したところビメンチン発現が減少したのに対して、マクロファージ様に分化誘導したところビメンチン発現は著増した。この結果は健康人骨髓CD34陽性細胞から分化誘導した際にも再現された。

次にHL60を用いて恒常的にビメンチン遺伝子発現が著減した安定変異株(ノックダウン細胞株)を樹立することができた。ノックダウン細胞株は成熟細胞になると細胞運動の活発化・貪食能の亢進傾向が見られたことから、ビメンチンは本来食細胞機能を負に制御している可能性が示唆された。したがってビメンチンは血球機能の恒常性維持に重要と考えられた。

なおビメンチン遺伝子発現ノックダウンの細胞形態、とくに核形態への影響については明瞭な変化を見出すことができず、引き続き検討を要するテーマであった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計19件)

Kawakami T, He J, Morita H, Yokoyama K, Kaji H, Tanaka C, Suemori S, Tohyama K, Tohyama Y: Rab27a is essential for the formation of neutrophil extracellular traps (NETs) in neutrophil-like differentiated HL60 cells. PLoS One 9: e84704, 2014, 査読有.

DOI:10.1371/journal.pone.0084704

Rhyasen GW, Wunderlich M, Tohyama K, Garcia-Manero G, Mulloy JC, Starczynowski DT: An MDS xenograft model utilizing a patient-derived cell line. Leukemia 28: 1142-1145, 2014, 査読有.

DOI: 10.1038/leu.2013.372

通山 薫: [特集 造血器疾患—最新の治療戦略(赤血球系疾患)] 骨髓異形成症候群: 最新の治療戦略. 臨床血液 55: 12-21, 2014, 査読有.

通山 薫: [特集 臨床検査—ここまで進んだ検査の世界] 各論 血液(赤血球と白血球). 診断と治療 102: 93-99, 2014, 査読無.

Tsuijoka T, Yokoi A, Uesugi A, Kishimoto M, Tochigi A, Suemori S, Tohyama Y, Tohyama K: Effects of DNA methyltransferase inhibitors (DNMTIs) on MDS-derived cell lines. Exp Hematol 41: 189-197, 2013, 査読有.

DOI:10.1016/j.exphem.2012.10.006

通山 薫: [特集 白血病: 診断と治療の進歩] II. 診断へのアプローチ 1. FAB分類とWHO分類. 日本内科学会雑誌 102: 1667-1675, 2013, 査読無.

Tanaka C, Kaji H, He J, Hazama R, Yokoyama K, Kinoshita E, Tsuijoka T, Tohyama K, Yamamura H, Nishio H, Tohyama Y: Rab27b regulates c-kit expression by controlling the secretion of stem cell factor. Biochem Biophys Res Comm 419:368-373, 2012, 査読有.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.02.030

Matsuda A, Taniwaki M, Jinnai I, Harada H, Watanabe M, Suzuki K, Yanagita S, Suzuki T, Yoshida Y, Kimura A, Tsudo M, Tohyama K, Takatoku M, Ozawa K: Morphologic analysis in myelodysplastic syndromes with del(5q) treated with lenalidomide.

A Japanese multiinstitutional study. *Leuk Res* 36:575-580, 2012, 査読有.
DOI:10.1016/j.leukres.2011.11.011

Tohyama K: Utility of DNA methyltransferase inhibitors for the treatment of myelodysplastic syndromes. *Curr Pharm Design* 18: 3190-3197, 2012, 査読有.

Tsujioaka T, Matsuoka A, Tohyama Y, Tohyama K: Approach to new therapeutics: Investigation by the use of MDS-derived cell lines. *Curr Pharm Design* 18: 3204-3214, 2012, 査読有.

Inaba T, Yuki Y, Yuasa S, Fujita N, Yoshitomi K, Kamisako T, Torii K, Okada T, Urasaki Y, Ueda T, Tohyama K: Clinical utility of the neutrophil distribution pattern obtained using the CELL-DYN SAPPHERE hematology analyzer for the diagnosis of myelodysplastic syndrome. *Int J Hematol* 94: 169-77, 2011, 査読有.
DOI: 10.1007/s12185-011-0892-x

Tasaka T, Tohyama K, Ohyashiki K, Ozawa K: 5q- syndrome in Japan. *Int J Hematol* 93:827-829, 2011, 査読有.
DOI: 10.1007/s12185-011-0868-x

Starczynowski DT, Morin R, McPherson A, Lam J, Chari R, Wegrzyn J, Kuchenbauer F, Hirst M, Tohyama K, Humphries RK, Lam WL, Marra M, Karsan A: Genome-wide identification of human microRNAs located in leukemia-associated genomic alterations. *Blood* 117:595-607, 2011, 査読有.
DOI: 10.1182/blood-2010-03-277012

通山 薫: 第12回日本検査血液学会学術集会会長講演: MDSの過去、現在そして未来. *日本検査血液学会雑誌* 12: 378-389, 2011, 査読無.

通山 薫: 綜説シリーズ—現代医学の焦点「骨髄異形成症候群診療の展望」. *日本臨床* 69:2257-2266, 2011, 査読無.

通山 薫: MDS の新規治療. *臨床血液* 52:1535-1543, 2011, 査読無.

奥野菜々子, 近藤敏範, 岸本光代, 辻岡貴之, 末盛晋一郎, 松岡亮仁, 久山亜紀,

田坂大象, 大倉 貢, 野田幸代, 通山 薫: 骨髄増殖性腫瘍における JAK2-V617F 変異遺伝子比率と好中球アルカリホスファターゼスコアとの関連. *日本検査血液学会雑誌* 12: 170-176, 2011, 査読有.

松岡亮仁, 通山 薫: レナリドミドによる 5q - MDS 細胞の細胞分裂阻害. *血液内科* 62:208-214, 2011, 査読無.

通山 薫: 第 38 回内科学の展望「難治性内科疾患の克服に向けて」8. 特発性造血障害—特に MDS 診療の展望. *日本内科学会雑誌* 100:673-678, 2011, 査読無.

[学会発表](計 22 件)

通山 薫: 日本血液学会中四国地方会・教育セミナー「MDS の診断と治療」2014 年 2 月 28 日、徳島市(ザ・グランドパレス徳島)

通山 薫: 小酒井 望賞受賞講演「『白血病細胞の分化過程の解析と分化誘導の評価診断に関する研究』およびその後の進展—血液形態学から骨髄異形成症候群へのアプローチ」平成 25 年度 公益信託 臨床検査医学研究振興基金授賞式 2014 年 2 月 7 日、東京都(東京ジョンプル)

通山 薫: 特別講演「MDS の形態診断—異形成をどのように捉えるか」第 9 回 Kyoto Hematology Forum 2014 年 2 月 1 日、京都市(ウエスティン都ホテル京都)

通山 薫: 講演「骨髄異形成症候群 (MDS) の 形態的特徴から診断まで」静岡県臨床衛生検査技師会 第 14 回静岡血液フォーラム 2013 年 12 月 15 日、静岡市(市立静岡病院)

通山 薫: 特別講演「MDS の形態診断」第 12 回自治医大クリニカルヘマトロジーセミナー 2013 年 11 月 22 日、栃木県下野市(自治医科大学)

通山 薫: 特別講演「MDS の形態診断—特に特徴的な形態異常を的確に捉えることを目的に—」日本検査血液学会静岡支部 サーベイ報告会 2013 年 10 月 26 日、静岡市(静岡赤十字病院)

通山 薫: 教育講演「骨髄異形成症候群

の形態診断---骨髄判定を担うあなたのために」

第 19 回 関甲信支部・首都圏支部 合同血液検査研修会 2013 年 9 月 29 日、栃木県 (獨協医科大学)

通山 薫: 教育講演「骨髄異形成症候群の形態診断」第 11 回骨髄病理研究会 2013 年 9 月 1 日、倉敷市(川崎医科大学)

通山 薫: 講演「血球形態学への誘い(いざない)~そして骨髄像のプロフェッショナルへ~」 神奈川県臨床検査技師会血液研究班平成 25 年度研修会 2013 年 7 月 13 日、横浜市 (かながわ労働プラザ)

通山 薫: 特別講演「骨髄異形成症候群の形態学的診断」 東京血液レジデント勉強会 2013 年 4 月 26 日、東京都 (コートヤード・マリオット銀座東武ホテル)

通山 薫: 特別講演「MDS の形態診断」第 3 回神奈川 MDS 研究会 2013 年 1 月 25 日、横浜市 (ホテルキャメロットジャパン)

通山 薫: 特別講演「MDS---この難解な疾患の克服に向けて」 第 22 回群馬血液疾患研究会 2012 年 11 月 16 日、前橋市 (ロイヤルチェスター前橋)

通山 薫: 講演「MDS の最新情報」 第 3 回香川血液疾患フォーラム 2012 年 10 月 26 日、高松市 (JR ホテルクレメント高松)

通山 薫: 教育講演「骨髄不全症候群: 再生不良性貧血と MDS の鑑別---内科の立場から---」 第 74 回日本血液学会学術集会 2012 年 10 月 20 日、京都市 (国立京都国際会館)

通山 薫: 特別講演「MDS 診療の展望」 第 2 回 MDS・分子標的療法研究会 2012 年 6 月 29 日、東京都 (フォーシーズンズホテル)

通山 薫: パネルディスカッション---血液の機能を探る「赤血球---全身への酸素の運搬役---」第 32 回メディコピア教育講演シンポジウム 2012 年 1 月 8 日、東京都 (東京国際フォーラム)

通山 薫: 教育講演「骨髄異形成症候群---MDS の新規治療」

第 73 回日本血液学会学術集会 2011 年 10 月 15 日、名古屋市 (名古屋国際会議場)

通山 薫: 教育講演「MDS---どのように診断し、どのように治療するか」 第 29 回日本血液学会北陸地方会 2011 年 7 月 23 日、金沢市 (石川県立中央病院健康教育館)

通山 薫: 大会長講演「MDS の過去、現在そして未来」 第 12 回日本検査血液学会 2011 年 7 月 18 日、倉敷市 (川崎医療福祉大学)

20 大石 徹、中原貴子、山本博美、通山 薫: 蛍光顕微鏡を用いた新たな DNA 量解析法の試み---巨核球中の DNA ploidy の解析. 第 12 回日本検査血液学会学術集会 2011 年 7 月 18 日、倉敷市 (川崎医療福祉大学)

21 通山 薫: 特別講演「MDS - 最近の話題」 第 12 回東海難治性血液腫瘍研究会 2011 年 6 月 24 日、名古屋市 (名古屋東急ホテル)

22 通山 薫: 特別講演「MDS - 診断と治療の展望---」 第 22 回臨床血液セミナー 2011 年 5 月 13 日、大阪市 (北野病院)

〔図書〕(計 8 件)

通山 薫: I. 疾患編 第 3 章 血液・造血管器疾患 7. 骨髄異形成症候群. わかりやすい内科学第 3 版 (井村裕夫 総編集) p 275 - 276、文光堂 (東京) 2014 年

通山 薫: MDSにおけるリスク分類. 腫瘍病理鑑別診断アトラス・造血管器腫瘍(定平吉都・北川昌伸 編集) p 249 - 252、文光堂 (東京)、2013年

通山 薫: 骨髄穿刺/骨髄生検. プリンシプル血液疾患の臨床・ここまでの白血病/MDS治療 (金倉 讓 総編集、松村 到専門編集)、p 40 - 42、中山書店 (東京)、2013年

通山 薫: IV. 血液像 6. 造血管器腫瘍の WHO 分類 3. 骨髄異形成症候群. 顕微鏡検査ハンドブック---臨床に役立つ形態学 (菅野治重 他 編集)、医学書院

(東京)、p235-p237、2012年

通山 薫：骨髄異形成症候群。今日の治療指針（山口 徹、北原光夫、福井次矢 総編集）p588-p589、医学書院、2011年

通山 薫：主要な徴候と検査値異常 2. 貧血の鑑別。血液専門医テキスト（日本血液学会 編集）南江堂（東京）、p29-p32、2011年

通山 薫：5q - 症候群。症候群ハンドブック（井村裕夫 総編集、福井次矢・辻 省次 編集）p336、中山書店、2011年

松岡亮仁、通山 薫：骨髄異形成症候群 D. MDS に対する新規治療薬。白血病・リンパ腫・骨髄腫—今日の診断と治療—第4版（木崎昌弘 編著）中外医学社（東京）p244-p254、2011年

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

川崎医科大学 検査診断学教室ホームページ

<http://www.kawasaki-m.ac.jp/lh/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

通山 薫 (TOHYAMA, Kaoru)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：80227561

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

田坂大象 (TASAKA, Taizo)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80343309

辻岡貴之 (TSUJIOKA, Takayuki)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：50330551

末盛晋一郎 (SUEMORI, Shin-ichiro)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：60330552