

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15329

研究課題名(和文) 骨髄異形成症候群の新規診断薬候補・ACVR2Bの有用性検討

研究課題名(英文) Development of diagnostic kit for myelodysplastic anemia

研究代表者

杉山 大介 (Sugiyama, Daisuke)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：00426652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄異形成症候群(MDS)は血球の形態異常と分化・成熟障害を主徴とし、その20-30%が急性白血病へ移行する前白血病状態の疾患群である。高齢者に多発するため、超高齢社会の日本において今後増加が予測される。

申請者は、正常な血球の分化・成熟機構の解析からMDSのバイオマーカーとして有用である細胞表面マーカーを発見した(PCT/JP2013/072335)。本研究では、MDS患者血球における遺伝子発現を解析し、MDS診断における有用性およびその機能について解析した結果、MDS患者において新規マーカーの発現が上昇する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Myelodysplastic syndromes (MDS) are the group of clonal myeloid neoplasms characterized by dysplasia of all kinds of hematopoietic cells and ineffective hematopoiesis. Twenty to thirty percent of MDS patients transform into acute leukemia. To approach the ineffective hematopoiesis status in MDS patients, we focused on late stage of hematopoiesis and established the flow cytometry method. With this methods, we found the activin receptor type 2B (ACVR2B) as a biomarker for immature erythroid cells based on a sequence of microarray analysis followed by qPCR validation in those fractions. It is described that the percentage of ACVR2B-expressing cells was higher in peripheral blood of MDS patients than that of controls (normal subjects).

研究分野：血液内科学

キーワード：骨髄異形成症候群 バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群(MDS)は、血球の形態異常と分化・成熟障害を特徴とし、患者の約20-30%が急性白血病へ移行する前白血病状態の疾患群である。患者数は日本で9千人・全世界では30万人にも及び、70歳代の高齢者が主な患者層であることから、超高齢化社会の日本において患者の増加が見込まれる。MDS患者では、末梢血中の赤血球、白血球、血小板のいずれか、もしくは全ての血球が減少する一方で骨髄は過形成となることから、無効造血と呼ばれる状態に陥る。現状では、患者に負担の大きい骨髄穿刺により得られた骨髄細胞の形態学的観察により診断されているため、より客観的で非侵襲的に診断が可能なバイオマーカーの開発が必要である。MDSにおける血球の分化・成熟障害は正常状態からの逸脱である。

これまで、生理的な正常造血は積極的に解析されてきたものの、既存の方法ではMDSの病態へアプローチすることが困難であった。申請者はこれまで一貫して造血発生研究に従事し、胎生期の主要な造血器官であり活発な赤血球造血が行われる胎仔肝臓の造血制御機構を明らかにしてきた(Sugiyama et al., Biochem Biophys Res Commun. 2011; Mech Dev. 2013; Tan et al., Biol Open. 2015)。Gata1-GFP トランスジェニックマウスの胎仔肝臓細胞を、既存の赤血球マーカー・Ter119及び核染色色素・DRAQ5を組み合わせてFlow cytometry法で解析したところ、これまで分離が困難だった赤血球造血の成熟・分化最終過程の細胞を、3つの細胞集団に分離することに成功した。これら3つの細胞集団は、形態学的には正染性赤芽球・網赤血球・成熟赤血球に相当する集団と考えられたことから、Flow cytometry法により正染性赤芽球及び網赤血球集団を純化・採取してMicroarray法で解析し、データベースを構築した。細胞表面抗原に注目してin silico解析を行い、real-time PCR法でvalidationすることにより、IFNAR1及びACVR2Bを同定した。MDS患者血球におけるIFNAR1及びACVR2Bの発現をFlow cytometry法で解析したところ、ACVR2BがMDSのバイオマーカーとして有用であるプレデータを得た(PCT/JP2013/072335)。

## 2. 研究の目的

MDS患者血球におけるACVR2Bの発現を解析し、MDS診断における有用性に関して検討する。さらに、MDS患者のACVR2B遺伝子に変

異を認めるか解析し、その生理的意義を検討する。

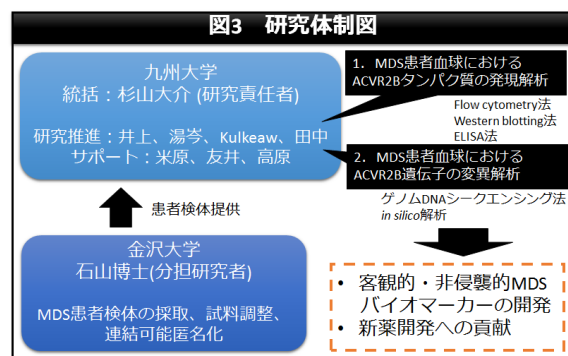
## 3. 研究の方法

(1)MDS患者血球におけるACVR2Bタンパク質の発現解析

MDS患者検体は、共同研究者である金沢大学・石山博士が採取し、遠心分離などの操作を行う。申請者グループは、金沢大学において連結可能匿名化された検体を用いる。

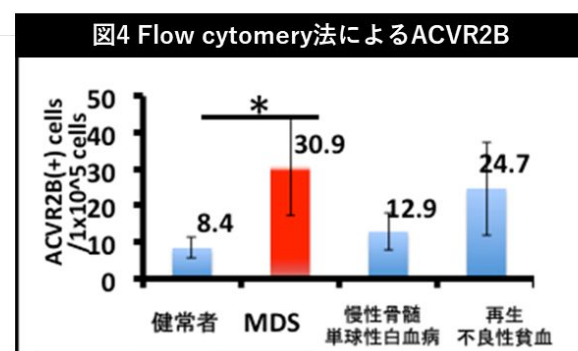
本解析では、独自に作製した抗ヒトACVR2Bモノクローナル抗体を使用する。既に、epitopeの異なる抗体を2種類(クローン名: 8E2、29F7)保有している。

研究体制図を図3に示す。



### (1)-1 Flow cytometry 法

図2に示したように、市販の抗体を用いて、既に2症例のMDS患者血球をFlow cytometry法を用いて解析したところ、ACVR2Bの発現はコントロールより高いプレデータが得られている。また、独自に作製した抗体では、感度が下がったものの、6症例の解析で、コントロールよりも高い発現を示している(図4)。そこで、20症例を目標に解析数の集積を行う。



### (1)-2 Western blotting 法

既に4症例のMDS患者血球をWestern blotting法を用いて解析したところ、ACVR2Bの発現はコントロールより高いプレデータが得られている(図5)。そこで、20症例を目標に解析数の集積を行う。

#### (1)-3 ELISA 法

市販の ELISA プレート構築キットを用いて、ELISA プレートを構築する。作製終了まで、3-4 ヶ月を見込んでいます。同様に、20 症例を目標に解析数の集積を行う。

症例数が予想以上に多く集積し、データを統計学的に解析する必要がある場合は、九州大学 ARO 次世代医療センターへ相談する。

#### (2) MDS 患者血球における ACVR2B 遺伝子の変異解析

血球成分から DNA を抽出し、ゲノム DNA シークエンシング法により、ゲノム配列を解析する。

次に、ソフトウェアにより *in silico* 解析し、点変異・欠失・重複・逆位・挿入・転座などの変異同定を試みる。

変異を認めた場合、ACVR2B タンパク質の発現と相関するか検討する。

#### < 予想される問題点と解決法 >

1. Flow cytometry 法及び Western blotting 法によるタンパク質発現解析のプレデータでは、既に良好な結果が得られている。しかしながら、ELISA 法での解析は行っておらず、ELISA プレートの作製が困難な場合は、外部委託を検討する。

2. EGFR は様々ながんで高発現する細胞表面受容体である。肺がんにおいては、EGFR 遺伝子変異が分子標的薬・ゲフィニチブの薬効予測に役立っている。本研究提案で推進する ACVR2B に関しては、分子標的薬開発は途上であるが、既に ACVR2B の下流において、複数の候補因子を同定している。

#### 4 . 研究成果

骨髄異形成症候群(MDS)は血球の形態異常と分化・成熟障害を主徴とし、その 20-30%が急性白血病へ移行する、前白血病状態の疾患群である。国内における患者は約 9,000 人であり、高齢者に多発するため(国内 9,000 人罹患)、高齢社会の日本において今後増加が予測される。現状では、MDS は骨髄穿刺で得られた骨髄細胞の形態学的観察により診断される。従って、より客観的で非侵襲的に診断が可能 なバイオマーカーの開発が必要である。申請者は、正常な血球の分化・成熟機構の解析から MDS のバイオマーカーとして有用である 細胞表面マーカーを見つけ、プレ

データを得ている(PCT/JP2013/072335)。そこで本研究提案では、MDS 患者血球における発現を解析し、MDS 診断における有用性およびその機能について解析した。申請者はこれまでの研究においてヒト末梢血における新規マーカーの発現を検討する為、モノクローナル抗体を作製している。ハイブリドーマ細胞をマウスに移植する事で抗体を生産させ、腹腔液を回収してそれをさらに精製する事で抗体を得た。骨髄異形成症候群含む貧血患者約 20 症例から末梢血を採取し、精製した抗体に蛍光色素を結合させてフローサイトメトリーの解析を行った。さらに新規マーカーを末梢血中の血球より効率よく抽出する為、抽出温度や界面活性剤等の検討を行い、至適条件を決定した。ELISA を構築し、リコンビナント新規マーカーを測定することで、測定条件の決定を行った。上記の結果、MDS 患者において新規マーカーの発現が上昇する結果を得た。今後は、再現性の検証を行う予定である。

#### 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 0 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 0 件 )

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 大介 (SUGIYAMA Daisuke)  
九州大学大学院医学研究院  
教授

研究者番号：00426652

(2) 研究分担者

石山 謙 (ISHIYAMA Ken)  
金沢大学付属病院・講師

研究者番号：60377380

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )