

機関番号：35303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590591

研究課題名（和文） 骨髄異形成症候群の血球形態異常をもたらす分子機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the molecular mechanism leading to the dysplasia of blood cells in the 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

研究成果の概要（和文）：骨髄異形成症候群（MDS）における血球異形成の分子機構の解明を目指して、とくに 5q- を有する MDS-L 細胞株を新薬レナリドミドで処理した際の変化を解析した。MDS-L は細胞質分裂が阻害され、その際に染色体 5q 領域に存在する KIF20A をはじめとする細胞周期関連遺伝子が影響されることがわかった。さらに RNA 干渉法にて KIF20A の発現を阻害すると、血球の増殖や形態に影響をもたらす可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）： Aiming at the elucidation of the molecular mechanism leading to the dysplasia of blood cells in the myelodysplastic syndromes, we studied the effect of lenalidomide on MDS-L cell line which shows a deletion of chromosome 5q. As a result, MDS-L cells revealed an inhibition of cytokinesis and a reduction of gene expression of cell cycle-related genes including KIF20A which was located at chromosome 5q. RNA interference study suggested that inhibition of KIF20A expression affects the growth and morphology of blood cells.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2009年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2010年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

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：血液学、遺伝子、マイクロアレイ、プロテオーム、細胞分化

1. 研究開始当初の背景

臨床検査では、血液塗抹標本を用いて細胞のサイズ、核の形と大きさ、核内のクロマチン構造や核小体、細胞質の色調などを観察して細胞の幼若性や形態異常を判定するが、ど

のような遺伝子産物や分子の変化を見ているのか、実はよくわかっていない。

MDS ではしばしば巨赤芽球性貧血やペルゲル核異常症に酷似した形態異常が現れるが、分子機構は未解明である。MDS の形態

異常がおこるメカニズムを解明することは、この難病を正しく診断し治療する上できわめて重要である。

MDS の形態異常の解明に向けては若干の手がかりがある。MDS の一病型である 5q- 症候群は骨髄染色体分析で 5 番染色体長腕欠失 (5q-) が特徴であるが、本来多核であるべき骨髄巨核球が単核化する。欠失領域には 40 余の遺伝子が局在しており、MDS の原因遺伝子候補もいくつか提唱されているが、形態異常を説明できるものは報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では応募者が独自に樹立した MDS 細胞培養実験系と分子生物学的・免疫学的手法によって、MDS の形態異常をもたらす分子機構の一端を解明し、通常の染色標本では曖昧にしかわからなかった形態変化を分子の変化として捉えなおす。とくに 5q- を有する MDS 細胞株を新薬レナリドミドで処理した際の細胞学的・分子生物学的変化に注目する。新規かつ高精度な形態学的診断法確立に向けての基盤を作ることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

MDS 患者骨髄から樹立した細胞株 (MDS92 と MDS-L) を主たる研究材料とした。ともに 5q- を有しているが、MDS92 は培養中に顕著な核形態異常を示す成熟細胞が出現するので、形態異常と細胞内分子の関係を調べるのに適したモデルとなる。前述のレナリドミド (10 μ M) を MDS92 や MDS-L に連日添加して数日間培養すると増殖が阻害されることを確認しているが、この現象はレナリドミドが 5q- を有する MDS に特異的に奏効する事実を細胞レベルで表していると考えられる。

それを細胞レベル・分子レベルで解明するために、今回主に MDS-L 細胞株を用いて、以下に示す検討をおこなった。

(1) 細胞レベルでの解析

MDS-L に 10 μ M lenalidomide を連日添加し、週 2 回の割合で細胞増殖の評価、May-Gruenwald-Giemsa (MGG) 染色による形態学的評価、フローサイトメトリーを用いた DNA ploidy 解析を行った。

(2) DNA マイクロアレイ解析

①培養中の MDS-L から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ GeneChip と反応させる (Affymetrix Gene chip human genome U133 plus 2.0 array を使用)

②遺伝子発現プロファイルを解析 (5q 欠失領域に局在する遺伝子群の発現低下に注目)

③レナリドミド処理した MDS-L から RNA 抽出し、同様に遺伝子発現プロファイル解析

④レナリドミド処理/未処理によって発現が変化する遺伝子を同定

(3) プロテオーム解析

①レナリドミド処理した MDS-L と未処理の MDS-L から、それぞれ蛋白を抽出

②2 次元電気泳動をおこない、展開された蛋白スポットのパターンを画像解析

③レナリドミド処理/未処理により変化の見られたスポット部分から蛋白を回収

④アミノ酸配列を決定し、レナリドミド処理によって変化する蛋白を同定

遺伝子発現解析はレナリドミド処理後 7~9 日目に独立して 3 回施行した平均値を示し、プロテオーム解析はレナリドミド処理後 9 日目に施行した。

解析結果を統合して、MDS-L に特有の遺伝子発現プロファイルを見出し、次にレナリドミド処理によって影響を受ける『レナリドミド作用関連遺伝子』を抽出した。

(4) さらに細胞内遺伝子導入による RNA 干渉法を用いて該当遺伝子発現をノックダウンすることによる細胞学的変化、ならびにレナリドミド添加による変化を解析した。

4. 研究成果

MDS-L にレナリドミドを添加すると複数核細胞の増加を認めた。添加 4 日目には主に 2 核細胞が出現したが、フローサイトメトリーでは tetraploid (4N) 細胞が増加していた。さらに 4 日目以降 4 核以上の細胞が増加するとともに 8N 細胞が増加し、10 日目では約半数の細胞が複数核を呈していた。また上記複数核細胞の増加とともに、4 日目以降細胞増殖が抑制され、フローサイトメトリーでも subdiploid 分画が増加した。一般に DNA の合成や有糸分裂は正常に行われるが、その後の細胞質分裂に異常を来すことにより 2 核細胞が出現すると考えられており、MDS-L における 2 核細胞の出現も細胞質分裂障害の可能性がある。このことを検証するため、我々はタイムラプス顕微鏡を用いて細胞質分裂が

阻害される様子を確認しえた。

これらの分子基盤を検証するためにマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を施行したところ、5q31-33に局在し、レナリドミドにて発現が上昇した分子として EGR1 (early growth response1)、CSF1R (macrophage colony-stimulating factor receptor)などを同定し、発現が減少する分子として IRF-1 (interferon regulatory factor-1)や KIF20A (kinesin family member 20A)を同定した。また Gen MAPP を用いた Gene ontology (GO)解析において細胞周期、特に MYH10 (non-muscle myosin heavy chain IIB)、PLK1 (polo-like kinase 1)、CIT (citron kinase)、AURKB (aurora kinase B) など分裂期関連分子の発現低下を認めた。

MYH10、PLK1、AURKB、CIT はいずれも 5q に局在しないが、細胞質分裂に関与する分子であり、これらの遺伝子発現の低下はレナリドミドの作用機序の一端になる可能性がある。一方で 5q31-33 に局在し、レナリドミドにて発現が上昇する分子として EGR1、逆に低下する分子として KIF20A を同定した。ただしプロテオーム解析の結果とマイクロアレイ解析の結果とは、まだ整合性を見出すようなデータが得られていない。これは今後の検討課題である。

なお 5q- を有する他の細胞株である HL-60 と KG-1 においてはレナリドミドを添加しても複数核細胞の出現や細胞増殖抑制効果は得られなかったことから、レナリドミドの MDS-L 選択性の評価も今後の課題である。

次にレナリドミド処理によって発現が著明に低下した遺伝子の中で、5q領域に存在する遺伝子である KIF20A に着目した。そこで正常血液細胞 (CD34陽性分画、好中球、リンパ球、単球) における KIF20A の発現様式、他の細胞株を用いて分化誘導過程における発現動態、さらにレンチウイルス法により KIF20A のノックアウト変異株を作成して、その細胞動態の検討を開始した。これまでに得られた検討から、KIF20A は比較的幼若な段階で発現することや、血液細胞の分化あるいは活性化の段階で重要な役割をもっている可能性、さらに細胞の基本形態維持にも関わる可能性が考えられ、この遺伝子機能異常が血球異形成につながる可能性が示唆され

た。血液細胞における KIF20A の機能について、さらに継続的に検討中である。

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 7 件)

(1) Matsuoka A, Tochigi A, Kishimoto M, Nakahara T, Kondo T, Tsujioka T, Tasaka T, Tohyama Y, Tohyama K: Lenalidomide induces cell death in an MDS-derived cell line with deletion of chromosome 5q by inhibition of cytokinesis. *Leukemia* 24: 748-755, 2010, 査読有

(2) Tamura H, Dan K, Yokose N, Iwakiri R, Ohta M, Sakamaki H, Tohyama K, Kondo A, Hyodo H, Nakamura K, Yamashita T, Elisseeva OA, Oka Y, Oji Y, Sugiyama H, Ogata K: Prognostic significance of WT1 mRNA and anti-WT1 antibody levels in peripheral blood in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research* 34: 986-990, 2010, 査読有

(3) Akiyama N, Miyazawa K, Kanda Y, Tohyama K, Omine M, Mitani K, Ohyashiki K: Multicenter phase II trial of vitamin K₂ monotherapy and vitamin K₂ plus 1 α -hydroxyvitamin D₃ combination therapy for low-risk myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research* 34: 1151-1157, 2010, 査読有

(4) Harada H, Watanabe M, Suzuki K, Yanagita S, Suzuki T, Yoshida Y, Kimura A, Tsudo M, Matsuda A, Tohyama K, Taniwaki M, Takeshita K, Takatoku M, Ozawa K: Lenalidomide is active in Japanese patients with symptomatic anemia in low- or intermediate-1 risk myelodysplastic syndromes (MDS) with a deletion 5q abnormality. *International Journal of Hematology* 90:353-360, 2009, 査読有

(5) 松岡亮仁、通山 薫: MDS 診療の最近の進歩「5q-症候群の責任遺伝子とレナリドマイ

ドの分子作用機序」、血液・腫瘍科
59:33-39、2009、査読無

(6) 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
(MDS) with chromosome 5 abnormalities: a
nation-wide survey in Japan. *Leukemia*
22:1874-1881, 2008, 査読有

(7) Starczynowski DT, Vercauteren S,
Telenius A, Sung S, Tohyama K,
Brooks-Wilson A, Spinelli JJ, Eaves CJ,
Eaves AC, Horsman DE, Lam WL, Karsan
A: High-resolution whole genome tiling
path array CGH analysis of CD34+ cells
from patients with low-risk
myelodysplastic syndromes reveals cryptic
copy number alterations and predicts
overall and leukemia-free survival. *Blood*
112:3412-3424, 2008, 査読有

[学会発表] (計3件)

(1) 通山 薫: 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の診療と
展望、
日本内科学会学術集会 第38回内科学の展
望、2010年12月5日、国立京都国際会館 (京
都市)

(2) 通山 薫: 骨髄異形成症候群の
WHO-2008分類、第58回日本医学検査学会、
2009年8月1日、パシフィコ横浜 (横浜市)

(3) 松岡亮仁、近藤敏範、辻岡貴之、中
原貴子、栃木亜紀、田坂大象、通山 薫
: 骨髄異形成症候群由来細胞株MDS-Lに対
するlenalidomideの影響、第70回日本血液
学会総会、2008年10月10日、国立京都
国際会館 (京都市)

[図書] (計2件)

(1) 通山 薫 (分担執筆)、医薬ジャーナル社、
WHO血液腫瘍分類 ~WHO分類2008をう
まく活用するために~、2010、587 ページ (担
当 pp.133-134)

(2) 通山 薫 (分担執筆)、中外医学社、WHO
分類第4版による白血病・リンパ系腫瘍の病
態学、2009、433 ページ (担当 pp.87-102)

[その他]

ホームページ等

<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

田坂 大象 (TASAKA TAIZO)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号: 80343309

(2008年度~2009年度)

辻岡 貴之 (TSUJIOKA TAKAYUKI)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号: 50330551