

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670445

研究課題名(和文) 臨床検体を用いたRNAiスクリーニングによる骨髄異形成症候群進展機序の網羅的解析

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms of myelodysplastic syndrome progression by RNAi screening.

研究代表者

黒川 峰夫 (Kurokawa, Mineo)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：80312320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的はRNAiスクリーニングを用いて、骨髄異形成症候群(MDS)の病態進展・治療抵抗性機序を網羅的に解析することである。
本研究で我々はヒト遺伝子に対するプール型shRNAプラスミドライブラリーであるCelllecta社のDECIPHERをMDS由来細胞株に導入し、Azacitidineで30日間処理した。処理後の細胞のDNAを次世代シーケンサーでシーケンスし、各shRNAコンストラクトに特異的なバーコード配列の頻度をAzacitidine処理群とControl群で比較した。その機能喪失によりAzacitidine耐性が誘導される候補遺伝子として158個の遺伝子を抽出することができた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the mechanism of resistance to treatment in myelodysplastic syndrome (MDS) patients by using RNA-interference technologies. We employed the small-hairpin RNA plasmid library from the Decipher (Celllecta, Mountain View, CA, USA) and transduced into MDS-derived human cell lines. Transduced cell lines were treated with azacitidine, a first-line drug for MDS patients, for 30 days. Then, we isolated genomic DNA and detected specific barcode sequences for each shRNA plasmid with next-generation sequencing. By comparing the clonal composition with or without azacitidine treatment, we identified 158 candidate genes that may induce the azacitidine resistance in MDS.

研究分野：血液内科学

科研費の分科・細目：血液腫瘍学

キーワード：骨髄異形成症候群 治療抵抗性 RNAiスクリーニング 網羅的ゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群(MDS)は最も頻度が高い造血器腫瘍の一つであり、1系統または多系統の無効造血により特徴付けられるクローン性の幹細胞疾患である。MDSは血球減少から骨髄性白血病の発症に至る経過を辿る場合が多い。近年、MDSに対する複数の新規薬剤が開発されているが、現在でも高リスクMDS患者に対する唯一の根治療法は同種造血幹細胞移植のみである。そのため、MDSの分子病態の解明およびそれに基づく分子標的療法の確立が急務であるが、MDSはヒト細胞株の樹立が困難であり、その病態を反映したマウスモデルも少ないため、現在までに十分な研究がなされていない。

近年、造血器腫瘍の研究においてRNAiスクリーニングにより、分子病態の解明や新規標的分子の探索が試みられており、急性骨髄性白血病においてBrd4やSyk、多発性骨髄腫においてIRF4、悪性リンパ腫においてアクチン動態や細胞運動の調節因子などが同定されている。しかし、MDSではRNAiスクリーニングに適した細胞株やマウスモデルがほとんどないため、このような手法による網羅的な探索はなされていない。

2. 研究の目的

MDSの病態進展の分子機序は明らかではない。本研究では、ヒトMDS細胞を用いてRNAiスクリーニングを行うことにより、MDSの病態進展に関与する遺伝子異常を網羅的に検索することを目的とする。さらにヒトMDS臨床検体やヒト骨髄性腫瘍細胞株、マウスMDSモデルにて同定された遺伝子を実験的にノックダウンすることにより、*in vitro*および*in vivo*における表現形に与える影響を評価する。同時に同定された遺伝子異常が創薬可能

な治療標的となり得るかを評価する。これらの解析を総合的に実施することによりMDSの病態進展機構を解明し、その白血化を抑制する新規分子標的薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

ヒトMDS臨床検体にレンチウイルスを用いてDECIPHER shライブラリーを遺伝子導入し、培養後に割合が増加するようなshRNAを同定しようと試みたが、有意な遺伝子は検出されなかった。そこでヒト骨髄性腫瘍細胞株に同様の方法でshライブラリーを遺伝子導入し、高リスクMDSで唯一生存期間を延長することが知られている治療薬である5-アザシチジン存在下で培養し、遺伝子導入直後、および10日間、30日間培養後の細胞からゲノムを抽出し、各shRNAコンストラクトに特異的なバーコード配列を次世代シーケンサーで検出した。各時点での比較、および薬剤非存在下での培養条件との比較により、5-アザシチジン存在下で有意に増幅するような遺伝子の同定を試みた。

4. 研究成果

機能喪失によりMDSに5-アザシチジン抵抗性が誘導される候補遺伝子として、158遺伝子が抽出された。癌抑制遺伝子であり星状細胞腫や多発性骨髄腫との関連が知られるAキナーゼアンカー蛋白、細胞周期チェックポイント関連蛋白などが含まれており、これらの遺伝子の機能喪失とMDSの病態進展・治療抵抗性との関係が示唆された。

現在ヒトMDS臨床検体および細胞株を用いて、これらの遺伝子の機能を解析中である。

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 22 件)

Honda A, Nakamura F, Nannya Y, Shintani Y, Fukayama M, Ichikawa M, and Kurokawa M.

Pulmonary lymphocyte-rich classical Hodgkin lymphoma with early response to ABVD therapy.

Ann Hematol 2013 Oct 31. [Epub ahead of print]

Kagoya Y, Yoshimi A, Kataoka K, Nakagawa M, Kumano K, Arai S, Kobayashi H, Saito T, Iwakura Y, and Kurokawa M.

NF- κ B/TNF- α positive feedback loop with active proteasome machinery supports myeloid leukemia initiating cell capacity.

J Clin Invest, 124(2): 528–542, 2014.

Kogure Y, Nakamura F, Nukina A, Kamikubo Y, Ichikawa M, Kamikubo Y, and Kurokawa M.

Catheter-related septic shock by Micrococcus in an autologous hematopoietic stem cell transplantation recipient.

Am J Infect Control 42(1):87, 2014.

Nakazaki K, Nannya Y, and Kurokawa M.

Distribution of serum erythropoietin levels in lower risk myelodysplastic syndrome cases with anemia.

Int J Hematol.99(1): 53-6, 2014

Nannya Y, Shinohara A, Ichikawa M, and Kurokawa M. Serial Profile of Vitamins and Trace Elements during the Acute Phase of Allogeneic Stem Cell Transplantation.

Biol Blood Marrow Transplant, 2013[Epub ahead of print]

Nukina A, Kagoya Y, Watanabe-Okochi N, Arai S, Ueda K, Yoshimi A, Nannya Y, and Kurokawa M.

Single-cell gene expression analysis reveals clonal architecture of blast-phase chronic myeloid leukaemia.

Br J Haematol 2014 [Epub ahead of print]

Ogura M, Ichikawa M, Masuda A, Kandabashi K, Nannya Y, and Kurokawa M.

A mixed-type autoimmune hemolytic anemia with immune thrombocytopenia related with myositis and post-transplantation lymphoproliferative disorder.

Ann Hematol. 2013 [Epub ahead of print]

Shinohara A, Imai Y, Nakagawa M, Takahashi T, Ichikawa M, and Kurokawa M.

Intracellular reactive oxygen species mark and influence the megakaryocyte-erythrocyte progenitor fate of common myeloid progenitors. Stem Cells. 32: 548-57, 2014

Toya T, Yoshimi A, Morioka T, Arai S, Ichikawa M, Usuki K, Kurokawa M.

Development of hairy cell leukemia in familial platelet disorder with predisposition to acute myeloid leukemia.

Platelets 2013 Aug 23. [Epub ahead of print]

Tsukamoto A, Nakamura F, Nannya Y, Kobayashi Y, Shibahara J, Ichikawa M, Fukayama M, Koike K, and Kurokawa M.

MALT lymphoma of the small bowel with protein-losing enteropathy.

Int J Hematol 2014 Jan 7. [Epub ahead of print]

Goyama S, Schibler J, Cunningham L, Zhang Y, Rao Y, Nishimoto N, Nakagawa M, Olsson A, Wunderlich M, Link KA, Mizukawa B, Grimes

- HL, Kurokawa M, Liu PP, Huang G, and Mulloy JC.
Transcription factor RUNX1 promotes survival of acute myeloid leukemia cells.
J Clin Invest. 123: 3876-88, 2013
- Ichikawa M, Yoshimi A, Nakagawa M, Nishimoto N, Watanabe-Okochi N, and Kurokawa M.
A role for RUNX1 in hematopoiesis and myeloid leukemia.
Int J Hematol. 97: 726-34, 2013
- Kobayashi T, Ichikawa M, Kamikubo Y, and Kurokawa M.
Acute myeloid leukemia with cryptic CBFβ-MYH11 type D.
Int J Clin Exp Pathol. 6: 110-2, 2013
- Kobayashi T, Ichikawa M, Nannya Y, and Kurokawa M.
The effect of decreased-dose idarubicin for elderly patients with acute myeloid leukemia.
Jpn J Clin Oncol. 43: 1047-51, 2013
- Kumano K, Arai S, and Kurokawa M.
Generation of iPS cells from normal and malignant hematopoietic cells.
Int J Hematol 98:145-52, 2013
- Shinohara A, Yoshiki Y, Masamoto Y, Hangaishi A, Nannya Y, and Kurokawa M.
Moxifloxacin is more effective than tosufloxacin in reducing chemotherapy-induced febrile neutropenia in patients with hematological malignancies.
Leuk Lymphoma. 54: 794-8, 2013
- Koya J, Nannya Y, Kobayashi H, Okugawa S, Moriya K, and Kurokawa M.
Simultaneous increase in 1,3-β-D-glucan and procalcitonin levels in Pseudomonas aeruginosa infection.
J Infect 67: 164-6, 2013.
- Morita K, Nannya Y, Yoshizato T, and Kurokawa M.
Simple but powerful prognostic scoring model for MALT lymphoma: a retrospective study.
Ann Hematol 92: 421-3, 2013.
- Morita K, Yoshimi A, Masuda A, Ichikawa M, Yatomi Y, and Kurokawa M.
Unique association of Waldenstrom macroglobulinemia with optic neuritis and monoclonal T cell expansion.
Int J Hematol 98: 247-9, 2013
- Toya T, Shinohara A, Tatsuno K, Seo S, Nannya Y, Ichikawa M, Makimura K, Moriya K, and Kurokawa M.
A case of Schizophyllum commune sinusitis following unrelated cord blood transplantation for acute lymphoblastic leukemia.
Int J Hematol 98: 261-3, 2013.
- Uni M, Yoshimi A, Maki H, Maeda D, Nakazaki K, Nakamura F, Fukayama M, and Kurokawa M.
Successful treatment with recombinant thrombomodulin for B-cell lymphoma-associated hemophagocytic syndrome complicated by disseminated intravascular coagulation.
Int J Clin Exp Pathol 6: 1190-4, 2013.
- Uni M, Nakamura F, Yoshimi A, Shinozaki-Ushiku A, Hosoi A, Nakazaki K, Nannya Y, Fukayama M, and Kurokawa M.
Transformation of follicular lymphoma in the retroperitoneal muscles demonstrated by

CT-guided needle biopsy of FDG-avid lesions;
case series.

Int J Clin Exp Pathol 7: 402-6, 2013.

〔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

黒川峰夫 (Kurokawa, Mineo)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号: 80312320

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

片岡 圭亮 (Kataoka, Keisuke)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号: 90631383