

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09729

研究課題名(和文)胎児性白血病の発症・進展・自然治癒と造血微小環境の関連に関する研究

研究課題名(英文)The role of hematopoietic microenvironment in the pathogenesis and spontaneous remission of fetal leukemia

研究代表者

宮内 潤 (Miyuchi, Jun)

東京歯科大学・歯学部・客員教授

研究者番号：20146707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ダウン症候群新生児にみられる一過性白血病は、胎児期の主たる造血臓器である肝臓で生じ、生後に自然治癒する独特な胎児性白血病である。その病態発生には胎児の造血微小環境が深く関わると考えられる。胎児肝臓の造血微小環境を構成する肝芽細胞が一過性白血病細胞に及ぼす影響を、両者の共培養を主とする実験にて解析した。肝芽細胞は幹細胞因子等の造血因子を産生し、一過性白血病細胞の増殖を促進するとともに、巨核球への成熟も誘導した。一過性白血病の発症と進展には、胎児肝臓の造血微小環境から産生される造血因子が重要な役割を果たすことが明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：Transient leukemia (TL) in neonates with Down syndrome is a unique fetal leukemia, which arises in fetal liver and spontaneously resolves after birth. Prenatal hematopoietic microenvironment is thought to be relevant to the pathogenesis of TL. We analyzed the functions of hepatoblasts, one of the major constituents of fetal liver hematopoietic microenvironment, on TL cells by using co-culture system. The hepatoblasts produced several human hematopoietic growth factors, including stem cell factor, and stimulated growth and induced megakaryocytic differentiation of TL cells. These data indicate that hematopoietic growth factors produced from fetal liver hematopoietic microenvironment play an important role in the pathogenesis of TL.

研究分野：胎児・新生児医学

キーワード：ダウン症候群 胎児性白血病 一過性白血病 自然治癒 造血微小環境 胎児造血 造血因子 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

胎児性腫瘍には成人のがんにはきわめて稀な自然治癒という現象がしばしばみられる。ダウン症候群患児の新生児期にみられる一過性白血病 transient leukemia (TL) は、生後無治療で自然に治癒する特殊な胎児性白血病である。造血は胎芽期に卵黄嚢にて始まり、胎児期に肝臓へ移行し、生後は骨髄へ移行するため、胎児期に発生する胎児性白血病の進展と自然治癒には、胎生期から生後に及ぶ造血の場の変遷が深く関わる可能性が考えられる。

筆者らは TL の剖検例の病理学的検討から、TL は肝臓にしばしば肝線維症を合併することを報告した [1]。この理由として、TL は胎児期の主たる造血臓器である肝臓にて生じる特殊な白血病であり、肝臓に存在する白血病細胞が産生するサイトカインを介して、肝臓に線維化を起こすという仮説を提唱した。主たる造血臓器は生後に肝臓から骨髄に移行することから、TL の自然治癒には、こうした造血微小環境の変化が関わる可能性も考えられる。

TL が胎児の肝臓にて生じる疾患であることを検証するため、筆者らは過去の研究にて、胎児肝臓の間質細胞と TL 細胞の *in vitro* の共培養実験を行い、TL 細胞が実際に、骨髄の間質細胞よりも胎児肝臓の間質細胞に増殖を依存していること、そして胎児肝臓の間質細胞から産生される顆粒球マクロファージ・コロニー刺激因子(GM-CSF)が TL 細胞の増殖維持に重要であることを明らかにした [2]。

2. 研究の目的

本研究は上記の結果をもとに、胎児期の造血微小環境が TL 細胞に与える影響をさらに詳細に検討し、TL の発症・進展・自然治癒および病態形成に果たす胎児造血微小環境の役割を解明することを主たる目的とする。

具体的には以下の研究を行う。

(1) 胎児期の肝臓の造血微小環境を構成する細胞の中で、間質細胞とともに重要な構成細胞である肝芽細胞が TL 細胞の増殖・分化にいかなる影響を及ぼすか、またどのような造血因子を介してその機能を発揮するのかを *in vitro* にて解析する。

(2) 胎児期の肝臓における TL 細胞の増殖と分化の場を病理組織学的に同定する。また造血微小環境構成細胞から産生される造血因子も病理学的に明らかにし、*in vivo* における TL 細胞と造血微小環境構成細胞の形態学的な関係を明らかにする。

(3) TL 患者に重篤な合併症である肝線維症が起こる機序に関して、胎児肝臓の造血微小環境から産生されるサイトカインの意義とその産生細胞を同定する。

3. 研究の方法

(1) 胎児肝臓の造血微小環境を構成する主要な細胞の一つである肝芽細胞に由来する細胞株 (HUH-9, HepG2) を培養器底面に壁附着細胞として培養し、この上に TL 細胞を浮遊細胞として加え、Transwell による多孔膜を介して両者の分離共培養を行う。肝芽細胞から産生される液性因子が TL 細胞の増殖・分化に及ぼす影響を解析する。

(2) 肝芽細胞株の培養上清を回収し、ELISA 法キットを使用して、上清中に含まれる各種ヒト造血因子、すなわち顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、顆粒球マクロファージ・コロニー刺激因子 (GM-CSF)、トロンボポエチン (TPO)、幹細胞因子 (SCF)、インターロイキン 3 (IL-3)、Insulin-like growth factor 2 (IGF2) の濃度を測定する。

(3) 肝芽細胞株の培養上清の存在下で TL 細胞を培養し、ヒト造血因子に対する中和抗体をこの中に加えることにより、肝芽細胞から産生される造血因子の中で、TL 細胞の増殖に關与する造血因子を同定する。

(4) TL ではほぼ全例に疾患特異的な *GATA1* 遺伝子の変異が認められる。患者ごとに異なる多様な変異が認められることから、既知の *GATA1* 遺伝子変異を有する症例について、変異アレル特異的な塩基配列を認識する PCR プライマーを作製し、in situ PCR 法を用いて、*GATA1* 変異を有する腫瘍細胞を病理切片上で同定する。また造血微小環境構成細胞から産生される造血因子を免疫組織化学にて証明する。

(5) 膠原線維産生細胞として知られる肝臓星細胞に由来する細胞株 LX-2 を使用し、線維化に参与することが知られている monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の LX-2 細胞に対する作用を in vitro にて解析し、肝線維症発症における両者の役割を解明する。

4. 研究成果

(1) 肝芽細胞株と TL 細胞の分離共培養の結果、肝芽細胞（とくに HUH-9）は、胎児肝臓間質細胞に比して活性は弱いながら、TL 細胞に対して一定の増殖刺激作用を示した。また肝芽細胞存在下で形態的に巨核球の増加が見られ、FACS 解析でも CD41 陽性細胞の維持または増加が認められ、上記の形態的観察を裏付ける結果であった。以上の結果から、肝芽細胞は TL 細胞の増殖維持に関与し、巨核球への分化にも関わることが示された。TL の発症・進展には胎児肝臓の間質細胞とともに、肝芽細胞も一定の役割を果たすものと考えられる。

(2) 肝芽細胞株の培養上清から ELISA 法にて、高濃度の SCF と IGF2、低濃度の TPO の産生が確認された。G-CSF、GM-CSF、IL-3 は検出感度以下であった。肝芽細胞は TL 細胞の増殖・分化に、これらの造血因子産生を介して関わると考えられた。

(3) 肝芽細胞から産生される造血因子のいずれが TL 細胞の増殖につよく関与するかを調べるため、造血因子に対する中和抗体の効果

を検討した。TL 細胞に対する IGF2 の増殖刺激作用は微弱であることが過去の筆者らの研究にて明らかにされていることから、肝芽細胞株の培養上清に対する SCF および TPO 中和抗体の作用を検討した。この結果、SCF 中和抗体の存在下で培養上清の活性がほぼ消失したことから、肝芽細胞の産生する造血因子の中で、SCF が TL 細胞の増殖に深く関わることを判明した。

(4) 患者検体から採取された genomic DNA を用いて、*GATA1* 遺伝子のアレル特異的 PCR 法の条件設定を施行したところ、タッチダウン PCR 法にて特異的な PCR 増幅が得られた。この条件にて TL 剖検例の組織切片から抽出した DNA によるアレル特異的 PCR 法を施行したが、いずれの症例でも増幅バンドは検出されなかった。おそらく剖検標本の長時間ホルマリン固定の影響と考えられ、この解析は不成功であった。胎児肝臓の微小環境における造血因子産生細胞の免疫組織化学による検出は現在検討中である。

(5) 肝臓の星細胞株 LX-2 は MCP-1 の刺激にて細胞増殖が亢進するとともに、膠原線維の産生も亢進した。また transforming growth factor β による前処置にて、LX-2 細胞自身が MCP-1 を長時間継続して産生するとともに、LX-2 細胞の増殖と膠原線維産生も持続して認められた。これらの結果から、肝線維症の発生には肝星細胞と MCP-1 が重要な役割を果たすことが明らかとなった。TL 患児の肝線維症治療法として抗サイトカイン療法も期待される。

< 引用文献 >

Miyauchi J, et al.: Unusual diffuse liver fibrosis accompanying transient myeloproliferative disorder in Down's syndrome: a report of four autopsy cases and proposal of a hypothesis. *Blood* 80:1521-1527, 1992

Miyauchi J, Kawaguchi H: Fetal liver

stromal cells support blast growth in transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome through GM-CSF. *J. Cell. Biochem.* 115:1176-1186, 2014

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 27 件)

宮内 潤: ダウン症候群関連骨髄増殖性疾患と造血微小環境 . *東京歯科大学会誌* 2017; 117:93-103、査読有、DOI: 無し

Kobayashi K, Yoshioka T, Miyauchi J, Nakazawa A, Kiyokawa N, Maihara T, Usami I: Role of monocyte chemoattractant protein-1 in liver fibrosis with transient myeloproliferative disorder in Down syndrome. *Hepatology Communications* 2018; 2:230-236、査読有、DOI: 10.1002/hep4.1150

Kobayashi K, Yoshioka T, Miyauchi J, 他 27 名: Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) as a potential therapeutic target and a noninvasive biomarker of liver fibrosis associated with transient myeloproliferative disorder in Down syndrome. *J Pediatr Hematol. Oncol.* 2017; 39: e285-e289、査読有、

DOI: 10.1097/MPH.0000000000000809
Kawaguchi H, Tamura Y, Suzuki S, Asano-Murakoshi T, Nonoyama S: Cytomegalovirus infection- and dasatinib-induced proteinuria in Ph+ALL. *Pediatr. Int.* 2017; 59(6):740-741、査読有、DOI: 10.1111/ped.13251

Kobayashi K, Isobe K, Hanada R, Kawaguchi H, Iwata T, Kawamura M: CD66c (KOR-SA3544) antigen expression of leukemic blasts in pediatric acute myeloid leukemia with TLS/FUS-ERG fusion transcript. *Int. J.*

Lab. Hematol. 2017; 9(6):e147-e150、査読有、DOI: 10.1111/ijlh.12714

Mitsui-Sekinaka K, Sekinaka Y, Ogura Y, Honda M, Ohyama R, Oyama C, Isobe K, Mori M, Arakawa Y, Koh K, Hanada R, Nonoyama S, Kawaguchi H: A pediatric case of acute megakaryocytic leukemia with double chimeric transcripts of CBFA2T3-GLIS2 and DHH-RHEBL1. *Leuk. Lymphoma* 2017; Oct 18: 1-3 [Epub ahead of print]、査読有、

DOI: 10.1080/10428194.2017.1387901
Yanagisawa H, Ishii T, Endo K, Kawakami E, Nagao K, Miyashita T, Akiyama K, Watabe K, Komatsu M, Yamamoto D, Eto Y: L-leucine and SPNS1 coordinately ameliorate dysfunction of autophagy in mouse and human Niemann-Pick type C disease. *Sci. Rep.* 2017; 7:15944、査読有、DOI: 10.1038/s41598-017-15305-9

Ikemoto Y, Takayama Y, Fujii K, Masuda M, Kato C, Hatsuse H, Fujitani K, Nagao K, Kameyama K, Ikehara H, Toyoda M, Umezawa A, Miyashita T: Somatic mosaicism containing double mutations in *PTCH1* revealed by generation of induced pluripotent stem cells from nevoid basal cell carcinoma syndrome. *J. Med. Genet.* 2017; 54: 579-584、査読有、

DOI: 10.1136/jmedgenet-2016-104490
Shiohama, T, Fuji K, Miyashita T, Mizuochi H, Uchikawa H, Shimojo N: Brain morphology in children with nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Am. J. Med. Genet. A* 2017; 173: 946-952、査読有、DOI: 10.1002/ajmg.a.38115

Mitani A, Fukuda A, Miyashita T, Umezawa A, Akutsu H: N-terminal transactivation domain is crucial for Oct4 function in mice.

Zygote 2017; 25: 197-204、査読有、
DOI:10.1017/S0967199417000053
Kato C, Fujii K, Arai Y, Hatsuse H, Nagao K,
Takayama Y, Kameyama K, Fujii K,
Miyashita T: Nevoid basal cell carcinoma
syndrome caused by splicing mutations in the
PTCH1 gene. Fam. Cancer 2017; 16: 131-138、
査読有、
DOI 10.1007/s10689-016-9924-2
Kato C, Fujii K, Arai Y, Hatsuse H,
Nagao K, Takayama Y, Kameyama K,
Fujii K, Miyashita T: Nevoid basal cell
carcinoma syndrome caused by splicing
mutations in the *PTCH1* gene. Fam.
Cancer 2017; 16: 131-138、査読有、
DOI: 10.1007/s10689-016-9924-2
Miyauchi J, Yoshida F, Akatsuka S,
Nakano M: Juvenile fibroadenoma with
features of phyllodes tumor showing
intraductal growth and prominent
epithelial hyperplasia in an 11-year-old
girl. Hum. Pathol.: Case Reports 2016;
4:18-22、査読有、
DOI: org/10.1016/j.ehpc.2015.07.001
Hoshimoto S, Matsui J, Miyata R,
Takigawa Y, Miyauchi J: Anaplastic
carcinoma of the pancreas: Case report
and literature review of reported cases
in Japan. World J. Gastroenterol. 2016;
22:8631-8637、査読有、
DOI: 10.3748/wjg.v22.i38.8631
Baba A, Yamazoe S, Dogru M, Ogawa M,
Takamatsu K, Miyauchi J: Clear cell
adenocarcinoma arising from adeno-
myotic cyst: a case report and literature
review. J. Obstet. Gynecol. Res. 2016;
42:217-223、査読有、DOI: 無し
Akizawa, Y., Miyashita, T., Sasaki, R.,
Nagata, R., Aoki, R., Ishitani, K.,
Nagashima, Y., Matsui, H. and Saito,

K. : Gorlin syndrome with an ovarian
leiomyoma associated with a *PTCH1*
second hit. Am. J. Med. Genet. A 2016;
170A: 1029-1034、査読有、
DOI: 10.1002/ajmg.a.37517
Miyauchi J: (Editorial) Pediatric
leukemia and hematopoietic micro-
environment: Is spontaneous remission
due to extrinsic or intrinsic mechanism?
Austin J. Pathol. Lab. Med. 2015;
2:1013, 2015、査読無、
DOI: 無し
Kobayashi Y, Miyoshi T, Matsuyama T,
Miyauchi J, Miyashita T,
Ishibashi-Ueda H, Yoshimatsu J: Mirror
syndrome associated with fetal
transient abnormal myelopoiesis in
Down syndrome. Pathol. Int. 2015; 65:
443-445、査読有、DOI: 10.1111/pin.12291
Kishikawa H, Kimura K, Ito A, Asahata
K, Takarabe S, Kaida S, Miyauchi J,
Miura S, Nishida J: Predictors of gastric
neoplasia in cases negative for *Helico-*
bacter pylori antibody and with normal
pepsinogen. Anticancer Res. 2015;
35:6765-6772、査読有、
DOI: 無し (PMID: 26637894)
Nomura Y, Miyauchi J, Ota E, Yanai F,
Miyashita T, Terui K, Ito E, Hirose S:
Transient abnormal myelopoiesis of
extremely immature infant followed by
blast cell resurgence two months later:
a case study. Jap. J. Pediatr.
Hematol./Oncol. 2015; 52:36-39、査読有、
DOI: 無し

〔学会発表〕(計 63 件)

川口 裕之, 小倉 友美, 關中 佳奈子, 關
中 悠仁, 野々山 恵章 ハイドロキシウ
レアにより良好にコントロールされてい
る鎌状赤血球症の14歳女兒. 第120回日

本小児科学会学術集会、2017年

宮下 俊之、高山吉永、藤井 克則、梅澤 明弘：疾患特異的 iPS 細胞の解析を契機に発見された母斑基底細胞癌症候群のモザイク症例。第 23 回日本家族性腫瘍学会学術集会、2017年

關中悠仁、關中-三井 佳奈子、川口 裕之：小児 aCML 症例の分子生物学的検討。第 75 回日本癌学会学術総会、2016年

關中佳奈子、關中悠仁、小倉友美、本田護、武純也、野々山 恵章、川口 裕之：Antitumorigenic effects of azacitidine via up-regulation of CDH1 transcription in childhood AML。第 78 回日本血液学会学術集会、2016年

川口 裕之、小倉 友美、關中悠仁、三井-關中佳奈子、野々山 恵章、宮内 潤：NIPA (Nuclear interacting partner gene with ALK) の転写抑制による小児固形腫瘍細胞株の増殖態度の変化の検討。第 57 回小児血液・がん学会、2015年

關中悠仁、川口 裕之、本田 護、關中-三井佳奈子、小倉友美、宮内 潤、野々山 恵章：経過中にヘモグロビン F 上昇を認めた ML-DS の 2 症例。第 57 回小児血液・がん学会、2015年

關中佳奈子、原勇介、川口 裕之、關中悠仁、小倉友美、小山千草、荒川ゆうき、康勝好、林泰秀、野々山 恵章：デジタル PCR による MRD 解析を行った CBFA2T3-GLIS2/DHH-THEBL1 陽性 AMkL の 1 例。第 57 回小児血液・がん学会、2015年

小倉友美、川口 裕之、關中悠仁、關中佳奈子、野々山 恵章：次世代シーケンサーを用いた血小板異常症の迅速遺伝子診断法の確立。第 57 回小児血液・がん学会、2015年

Sekinaka K, Kawaguchi H :

Tumor-suppressive mechanism with

azacitidine in a pediatric case of acute megakaryoblastic leukemia。第 74 回日本癌学会学術総会、2015年

關中佳奈子、小山千草、荒川ゆうき、關中悠仁、小倉友美、康勝好、川口 裕之、野々山 恵章：移植後再発に対しアザシチジン投与が有効であった小児急性巨核芽球性白血病の 1 例。第 3 回日本血液学会関東甲信越地方会、2015年

濱本 学、川口 裕之、關中 悠仁、關中-三井 佳奈子、小倉 友美、川村 陽一、野々山 恵章：維持療法中に免疫性血小板減少症を発症した急性リンパ球性白血病の 1 例。第 118 回日本小児科学会、2015年

〔図書〕(計 1 件)

井上 健、大喜多肇、小田義直、中澤温子、中山雅弘、浜崎 豊、平戸純子、藤本純一郎、北條 洋、堀江 弘、宮内 潤、森川征彦、横山繁昭：胚細胞腫瘍およびその他の臓器特異的希少腫瘍。小児腫瘍組織カラーアトラス(第 7 巻)、金原出版、2017年、総ページ数 114、ISBN 978-4-307-17071-0

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮内 潤 (MIYAUCHI, Jun)
東京歯科大学・歯学部・客員教授
研究者番号：20146707

(2) 研究分担者

川口 裕之(KAWAGUCHI, Hiroyuki)
防衛医科大学校・小児科学・准教授
研究者番号：00313130

(3) 研究分担者

宮下 俊之(MIYASHITA, Toshiyuki)
北里大学・医学部・教授
研究者番号：60174182