

令和 2 年 9 月 15 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10105

研究課題名(和文)造血微小環境に着目した若年性骨髄単球性白血病の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new treatment for juvenile myelomonocytic leukemia focusing on hematopoietic microenvironment

研究代表者

坂下 一夫 (Sakashita, Kazuo)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：10345746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではJMMLの発症あるいは進展に関わる造血微小環境分子(サイトカイン、接着分子、細胞外マトリックス)を明らかにし、多彩な臨床像との関連及び標的とした新規分子標的治療薬の開発を試みることを目標としている。これまでに接着分子であるプロトカドヘリン(PCDH)17遺伝子が白血病の進展に関わっていることを報告した。またPCDH17は造血器腫瘍においてがん抑制遺伝子の働きをしていることを見出し、新規分子治療の標的としての可能性を報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、腫瘍においては増殖シグナルや腫瘍特異的発現分子を標的とした治療薬の開発がはが盛んに行われている。今回の研究の成果は従来細胞間接着分子として働いていると考えられているPCDH17が細胞増殖に深く関与し、がん抑制遺伝子としての働きがあることをみいだした。このことはPCDH17が新規の分子標的治療薬としての可能性を示したことは学術的に大きな意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim is to clarify the hematopoietic microenvironmental molecules involved in the onset or progression of JMML, and to try to develop a novel molecular targeted therapeutic drug that is related to various clinical features. We reported that the adhesion molecule; protocadherin (PCDH) 17 gene is involved in the development of leukemia. We also found that PCDH17 acts as a tumor suppressor gene in hematopoietic tumors, and reported its potential as a target for novel molecular therapy

研究分野：小児血液

キーワード：PCDH17

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

若年性骨髄単球性白血病(JMML)は、RAS/MARK シグナル伝達関連の遺伝子異常で発症し、遺伝学的解明が進んだ。治療においては造血幹細胞移植が唯一の根治的治療であるが、治療成績は5割前後で進歩が認められず、新たな治療法の登場が待たれている。我々の研究グループはJMML 白血病幹細胞の増殖には未熟な造血環境が非常に重要な役割を担っていることを報告した (Sakashita et.al Leukemia,2015)。造血幹細胞は胎生初期に AGM 領域で発生、増殖し、胎児肝さらに骨髄へと移動すると考えられている。AGM 領域を胎生 10.5 日のマウス胚から採取し樹立したストローマ細胞株が AGM-S3 である。JMMLCD34 陽性細胞の幹細胞を AGM-S3 とサイトカインで共培養すると CD34+CD38-細胞の増殖が認められ、ストローマ細胞を OP-9 (新生児マウス骨髄由来ストローマ細胞株), MS-5 (成人マウス骨髄由来ストローマ細胞株)に替えて検討を行ったところ、CD34+CD38-細胞の増殖割合は減少あるいは消失したことから JMML 白血病幹細胞の増殖には未熟な造血環境が非常に重要な役割を担っていることが推察された (Sakashita et.al Leukemia,2015)。以上のことから AGM-S3 と JMML 白血病性幹細胞の細胞間作用が JMML 白血病性幹細胞の増殖に与える影響を解析することにより JMML の発症および治療に結びつく可能性があり解析を開始した。

2. 研究の目的

造血幹細胞ニッチと JMML 白血病性幹細胞の細胞間作用が JMML 白血病性幹細胞の増殖に与える影響を解析することにより JMML の発症および治療に結びつく可能性があり解析を開始した。その中で細胞接着分子であるカドヘリンスーパーファミリーに属するプロトカドヘリン 17 (PCDH17) に着目し白血病発症、進展における役割について解析を行った。

3. 研究の方法

- (1) 白血病における PCDH17 の DNA メチル化について臨床検体を用いて解析を行った。
- (2) 白血病細胞株を使用し PCDH17 の発現をノックダウンあるいは過剰発現させ機能解析を行った。
- (3) (2) で観察されたことが正常血球においても確認できるか臍帯血を用いて検討を行った。
- (4) HDAC 阻害剤を使用し JMML での治療の可能性について検討を行った。

4. 研究成果

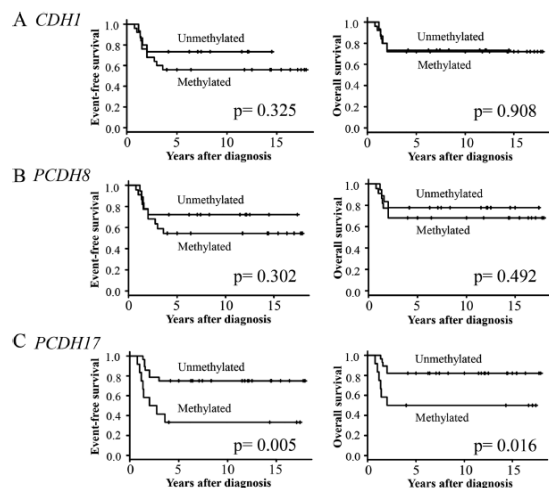


図1 PCDH17 メチル化の生存曲線 (Uyen, Sakashita et al, Pediatr Blood Cancer 2017)

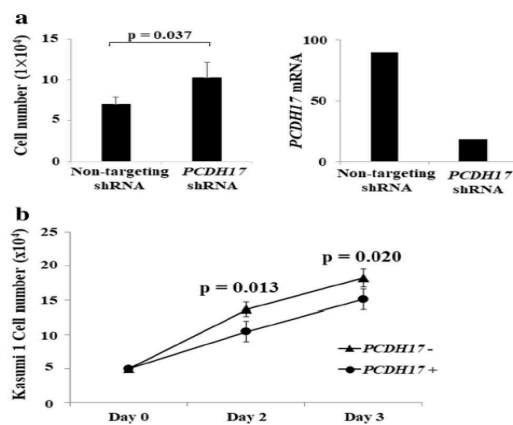


図2 白血病細胞株を用いた PCDH17 機能解析 (Uyen, Sakashita et al, Int J Hematol.2019)

急性リンパ性白血病においては *PCDH17* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化の役割について解析し報告 (Uyen, Sakashita et al, *Pediatr Blood Cancer* 2017) した (図1)。

この中で *PCDH17* 遺伝子のメチル化が予後と関連していることを報告した。さらに *PCDH17* の発現を急性リンパ性白血病(ALL)、急性骨髄性白血病(AML)、慢性骨髄性白血病、および正常血球について解析した。正常においては末梢血 CD33 陽性細胞に発現を認め、臍帯血 CD34 陽性細胞を用いサイトカインを用いて増殖分化させると発現が高まる。また、ALL, AML とともに正常と比べ低発現であった。白血病細胞株を用いて *PCDH17* をノックダウンさせると増殖能が上がり、過剰発現させると増殖が抑制された(図2)。さらに臍帯血 CD34 陽性細胞を用いて同様にノックダウンさせると増殖能が上がり、過剰発現させると増殖能が抑制された (図3)。

以上のことよりその機能はがん抑制遺伝子である可能性 (Uyen, Sakashita et al, *Int J Hematol*.2020) を報告した。

次に JMML で *PCDH17* の発現を検討したところ有意差を認めなかったが、高発現症例の予後が良い傾向を認めた。この結果を基に発現に影響を与える様々な薬剤について現在検討中である。また、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である panobinostat を用い JMML 幹細胞を増殖させる系を使用して解析したところ、薬剤は CD34+CD38-細胞の増幅能を抑制する働きがあることが明らかとなった。さらに JMML で使用される Azacitidine については CD34+CD38-細胞の増幅能に影響を与えていないことを明らかにし報告した (Kurata T, Sakashita K, et al. *Pediatr Blood Cancer*. 2018)。

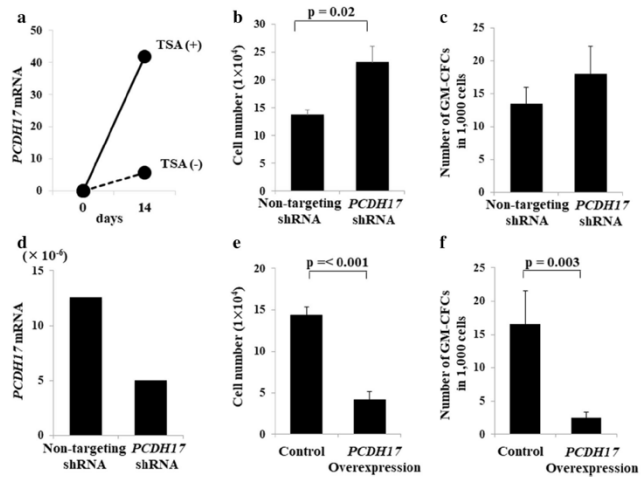


図3 正常臍帯血における *PCDH17* 遺伝子の役割 (Uyen, Sakashita et al, *Int J Hematol*.2020)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kurata T, Matsuda K, Hirabayashi K, Shigemura T, Sakashita K, Nakahata T, Koike K.	4. 巻 65
2. 論文標題 Panobinostat inhibits the proliferation of CD34(+) CD38(-) cells under stimulation of hematopoietic growth factors on AGM-S3 cells in juvenile myelomonocytic leukemia. <i>Pediatr Blood Cancer.</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 <i>Pediatr Blood Cancer.</i>	6. 最初と最後の頁 e27261
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pbc.27261	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shigemura T, Matsuda K, Kurata T, Sakashita K, Okuno Y, Muramatsu H, Yue F, Ebihara Y, Tsuji K, Sasaki K, Nakahata T, Nakazawa Y, Koike K.	4. 巻 187
2. 論文標題 Essential role of PTPN11 mutation in enhanced haematopoietic differentiation potential of induced pluripotent stem cells of juvenile myelomonocytic leukaemia.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 <i>Br J Haematol.</i>	6. 最初と最後の頁 163-173
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bjh.16060	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Thanh Nha Uyen L, Amano Y, Al-Kzayer LFY, Kubota N, Kobayashi J, Nakazawa Y, Koike K, Sakashita K.	4. 巻 111
2. 論文標題 PCDH17 functions as a common tumor suppressor gene in acute leukemia and its transcriptional downregulation is mediated primarily by aberrant histone acetylation, not DNA methylation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 <i>Int J Hematol.</i>	6. 最初と最後の頁 451-462
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-019-02799-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大園秀一、坂下一夫、吉田奈央、角田治美、百名伸之、中山秀樹、渡邊健一郎、前田美穂、
2. 発表標題 若年性骨髄単球性白血病における晩期合併症全国調査
3. 学会等名 日本小児血液がん学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Noriko Kubota, Kazuo Sakashita, Nao Yoshida, Koshi Akahane, Takeshi Mori, Nobuhisa Takahashi, Atsushi Kikuta, Jun Kobayashi, Takashi Kurata, Eiko Hidaka,
2. 発表標題 2.MRD assessment of juvenile myelomonocytic leukemia using next-generation sequencing
3. 学会等名 日本血液学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中沢 洋三 (Nakazawa Yozo) (60397312)	信州大学・学術研究院医学系・教授 (13601)	