

平成21年5月9日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18591193
 研究課題名（和文） 小児白血病の骨髄血管内皮細胞の発現遺伝子のマイクロアレイ法による解析
 研究課題名（英文） Gene expression profile of endothelial cells in bone marrow in childhood leukemia.
 研究代表者
 岡本 康裕（OKAMOTO YASUHIRO）
 鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師
 研究者番号：30398002

研究成果の概要：

小児白血病の初発時の骨髄から抗トロンボモジュリン抗体を用いて血管内皮細胞を単離し、マイクロアレイ法を用いて発現する遺伝子を測定し、発現パターンを解析した。このうち、骨髄血管内皮細胞におけるCD13、CD54、CD133の発現量をスコア化した。スコアの平均は0.94で、既知のリスク因子（リスク分類、染色体異常、FAB分類、治療反応性）とは相関関係はなく、最終確認時点での転帰との相関も認めなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：小児科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：急性白血病、血管内皮、マイクロアレイ法、ALL

1. 研究開始当初の背景

小児 ALL のリスク因子は、診断時の白血球数や、微小残存病変 (minimal residual disease) など、患者から取り出した白血病細胞の性質に注目し、一定の成果を上げているが、実際に治療を受けるヒトの正常細胞に起因する因子は見過ごされている。最近、腫瘍細胞が骨髄中で分裂・増殖する分子機序についての検討がなされ、腫瘍細胞でも、正常細胞でも骨髄の血管内皮細胞との相互作用によって細胞周期、増殖、アポトーシスの制御

が行われていることがわかっている。

2. 研究の目的

本研究では、腫瘍細胞が増殖する環境因子も重要なリスク因子であるという考えに基づき、小児 ALL において、骨髄血管内皮細胞の遺伝子の発現をマイクロアレイ法で検討し、新しいリスク因子を同定・確立し、治療に応用することを目的とする。具体的には、1) 小児 ALL 患者の骨髄血管内皮細胞の遺伝子発現をマイクロアレイ法で測定する。2) 遺

伝子発現のパターンによって、小児 ALL を分類する。3) 特定の遺伝子を選んでスコア化し、予後因子として確立する。

3. 研究の方法

1. サンプル

1) サンプル（骨髄液）の採取（岡本、伊地知）：対象は、当科において2002年以降に診断され、保存されている骨髄液(30例)、または新しく発症する小児ALLの初診時（治療前）の診断に用いる骨髄液の一部を用いる（2年間で20例）。具体的には、患者の痛みをとるために、十分な鎮痛薬または麻酔薬を投与する。腹臥位にて、腸骨から骨髄穿刺によって骨髄液を採取する。

2) 骨髄血管内皮細胞の純化

① 保存されている骨髄液または、新しく採取した骨髄液を、FCSを含むRPMI培養液で希釈した後、Ficollを用いた比重遠心法によって、骨髄液から単核球層に含まれる細胞を分離する。

② この細胞を2回洗浄した後、RPMI培養液に再浮遊する。

③ 血管内皮に特異的に発現する蛋白(トロンボモジュリン)に対する抗体を細胞と反応させる。

④ これらの細胞から、フローサイトメーターによって、血管内皮細胞を純化する。

2. 遺伝子発現の解析

1) RNAの抽出

純化された血管内皮細胞から、Acid guanidinium-Phenol-Chloroform法を応用したキットを用いてRNAを抽出する。Amino allyl-UTPの取り込みを行った後、カップリング反応で色素標識を行う。得られたaRNAを断片化し、精製・濃縮する。

2) マイクロアレイ法

マイクロアレイは、既成のオリゴDNAチップ（遺伝子数約41000、1サンプル当たり55000円）を用い、aRNAをテストアレイにハイブリダイズさせる。オリゴDNAチップの41000の遺伝子のうちには、接着因子、細胞周期に関与する遺伝子、アポトーシスに関与する遺伝子が網羅されている。

解析

ハイブリダイズしたチップを、DNAアレイマイクロスキャナにて、蛍光の検出を行う。その後画像解析ソフトによってスポットシグナルの数値化を行う。発現遺伝子の解析には、専

用のコンピュータと遺伝子発現解析ソフトウェアを用いる。遺伝子発現情報の統計的解析、Pathway解析を行い、小児ALLを分類する。

4. 研究成果

平成18年4月から平成20年12月までに、鹿児島大学小児科で新規に白血病と診断した32例（急性リンパ性白血病25例、急性骨髄性白血病7例）を対象に今回の検討を行った。

表1 対象

診断	ALL	22
	AML	7
年齢（中央値）		7
性別	M	14
	F	18
リスク	SR	15
	HR	14
	Infant	3

骨髄中の血管内皮細胞：抗トロンボモジュリン抗体を用いて寛解期の骨髄血管内皮細胞の割合を測定した。0.43+/-0.17%の細胞が抗トロンボモジュリン抗体陽性細胞であった。

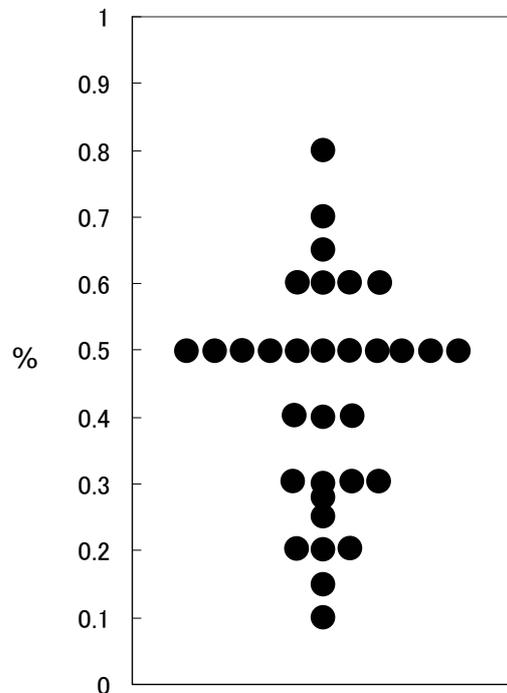


図1. 骨髄穿刺細胞中の抗トロンボモジュリン抗体陽性細胞割合 (%)

これをソーティングし、純化された抗トロンボモジュリン抗体E陽性の血管内皮細胞から抽出されたRNAは、 $0.22 \pm 0.16 \mu\text{g}$ であった。

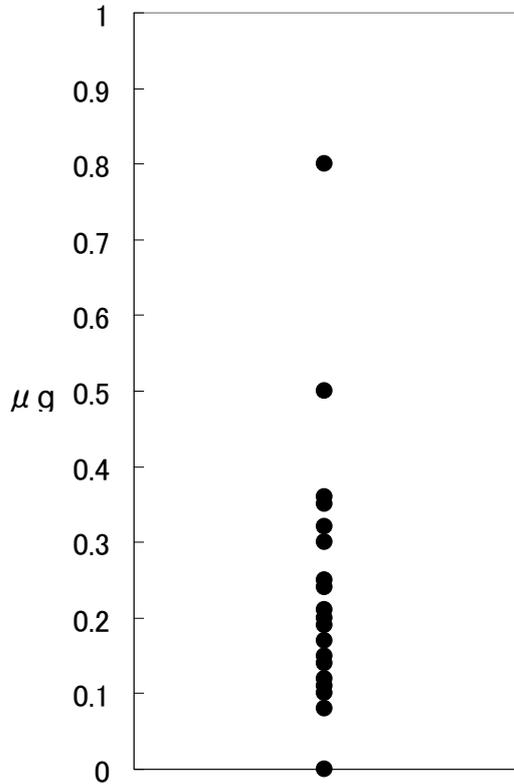


図2. 抗トロンボモジュリン抗体陽性細胞から抽出したRNA量 (μg)

18検体を用いて、マイクロアレイ法によって発現するRNAを測定した。

治療成績

33例中、29例が寛解となり、最終観察時点(平成20年12月31日)における2年無病生存率 (EFS) は、 $75.1 \pm 8.9\%$ で、2年全生存率(OS) は、 $76.8 \pm 8.6\%$ であった。(図3, 4)

これらの臨床経過と発現遺伝子との関係に関する検討は全症例の治療が終了した時点で行う。

さらに抗トロンボモジュリン抗体陽性血管内皮細胞における、CD13、CD54、CD133 の発現量をスコア化した。スコアの平均は 0.94

(範囲 $-3 \sim 5$)で、既知のリスク因子 (リスク分類、染色体異常、FAB 分類、治療反応性) とは相関関係はなかった ($r = -0.118 \sim 0.147$, $p > 0.05$)。またスコアと最終確認時点での転帰との相関も認めなかった ($r = 0.214$, $p > 0.05$)。

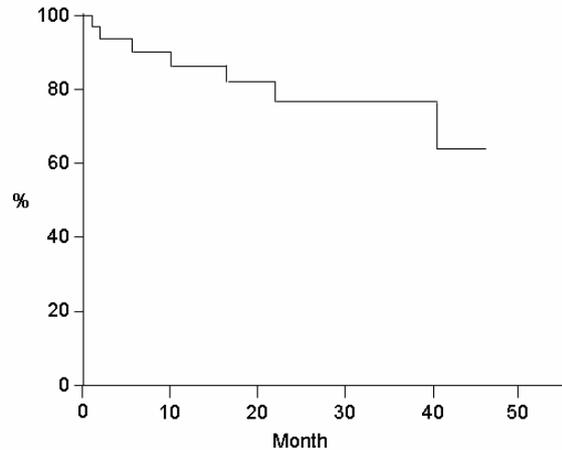


図3. 2年EFS

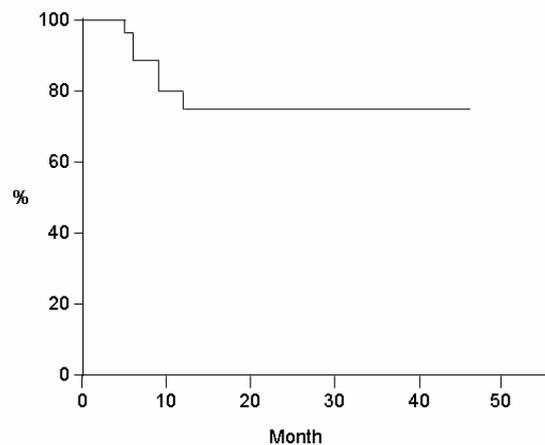


図4. 2年OS

その他にも発現している遺伝子は多数あるので、転帰が確定した時点で、マイクロアレイ法の結果を更に詳細に検討し、適切なスコア化を確立する必要があると考えられる。

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 6 件)

- ① Okamoto Y, Watanabe T, Watanabe H, Onishi T, Kawano Y. Double apheresis of peripheral blood stem cells in a single day in children mobilized by granulocyte

colony-stimulating factor for transplantation. Ped Transplantation 13:440-443, 2009 査読有り

- ② Watanabe T, Okada T, Okada C, Onishi T, Watanabe H, Okamoto Y, Kitamura Y, Manabe S, Matsubara S, Kageji T, Iwai A. An aspergillotic aneurysm of the internal carotid artery following allogeneic bonemarrow transplantation: successful management with catheter coil embolization and long-term antifungal agents. Transpl Infect Dis 11: 49-53, 2009 査読有り
- ③ Nishikawa T, Okamoto Y, Tanabe T, Shinkoda Y, Kodama Y, Tsuru Y, Kawano Y. Calcineurin-inhibitor-induced pain syndrome after a second allogeneic bone marrow transplantation for a child with aplastic anemia. Ped Transplant (Accepted) 査読有り
- ④ Kodama Y, Okamoto Y, Ijichi O, Shinkoda Y, Nishikawa T, Tanabe T, Yoshioka T, Tashiro Y, Mougji H, Kawano Y. Continued complete remission without systemic therapy for isolated testicular relapse after bone marrow transplantation in a boy with acute lymphoblastic leukemia. Ped Transplant (Accepted) 査読有り
- ⑤ Nishikawa T, Kawakami K, Kumamoto T, Tonooka S, Abe A, Hayasaka K, Okamoto Y, Kawano Y. Severe neurotoxicities in a case of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 caused by vincristine for acute lymphoblastic leukemia. J Pediatr Hematol Oncol. 30:519-521, 2008. 査読有り
- ⑥ Kageji T, Nagahiro S, Matsuzaki K, Kanematsu Y, Nakatani M, Okamoto Y, Watanabe T.: Successful neoadjuvant synchronous chemo- and radiotherapy for disseminated primary intracranial choriocarcinoma: case report J Neurooncol 83:199-204, 2007 査読有り

[学会発表] (計7件)

- ① 岡本康裕, 田邊貴幸, 児玉祐一, 西川拓朗, 新小田雄一, 河野嘉文 当科における臍帯血移植の経験 第31回日本造血細胞移植学会 2009/2/6 札幌

- ② 岡本康裕, 西川拓朗, 田邊貴幸, 児玉祐一, 新小田雄一, 八牧愉二, 河野嘉文 無治療で経過観察中の再燃期 Langerhans Cell Histiocytosis の臨床経過 第70回日本血液学会 2008/10/10 京都
- ③ 岡本康裕, 田邊貴幸, 新小田雄一, 児玉祐一, 西川拓朗, 八牧愉二, 倉内宏一郎, 野村裕一, 河野嘉文. 造血幹細胞移植の医師チーム制による管理. 第30回日本造血細胞移植学会 2008/3/1 大阪
- ④ 岡本康裕, 水流由美子, 根路銘安仁, 田邊貴幸, 新小田雄一, 中目和彦, 下野隆一, 加治建, 田原博幸, 高松英夫, 河野嘉文 短腸症候群に抗胃壁抗体異常を合併したビタミン B12 欠乏性巨赤芽球性貧血の1例 第49回日本小児血液学会 2007/12/14 仙台
- ⑤ 岡本康裕, 八牧愉二, 豊島光雄, 児玉祐一, 西川拓朗, 田邊貴幸, 新小田雄一, 河野嘉文 同種造血幹細胞移植後に PRES を発症した再生不良性貧血1例 第49回日本小児血液学会 2007/12/14 仙台
- ⑥ 岡本康裕, 田邊貴幸, 新小田雄一, 児玉祐一, 西川拓朗, 八牧愉二, 倉内宏一郎, 河野嘉文 地方施設における再生不良性貧血に対する同種骨髄移植の後方視的検討 第69回日本血液学会 2007/10/11 横浜
- ⑦ 岡本康裕, 田邊貴幸, 児玉祐一, 西川拓朗, 新小田雄一, 河野嘉文 当科における臍帯血移植の経験. 第138回日本小児科学会鹿児島地方会 2008/6/8 鹿児島

〔図書〕（計1件）

岡本康裕、がんの子供を守る会、子どものがん、2008年、153ページ(12-14ページ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 康裕 (OKAMOTO YASUHIRO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：30398002

(2) 研究分担者

河野 嘉文 (KAWANO YOSHIFUMI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：20260680

田邊 貴幸 (TANABE TAKAYUKI)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：80444892