

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390302

研究課題名（和文） 胎生期における疾患原因の作用と小児造血器疾患

研究課題名（英文） Pediatric hematological disorder caused by in utero factors

研究代表者

水谷 修紀（MIZUTANI SHUUKI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：60126175

研究成果の概要（和文）：小児白血病の発症機序解明に向けて胎児環境と遺伝の視点から解明を試みた。妊娠マウスに DNA 損傷刺激としてエトポシドを母体腹腔内に投与し、胎児造血細胞の状態の経時変化を追跡した。比較対象として母体マウスの骨髄を用いた。DNA 損傷の程度を胎児肝、母体骨髄で解析した結果、胎児肝がはるかに強い DNA 損傷応答を示すことが分かった。以上から DNA 損傷刺激に対しては胎児の方が母体より強いことが判明した。染色体異常においても ATM+/+、ATM+/-、ATM-/- の遺伝的背景の中で ATM-/- では顕著な増加が認められた。発がん遺伝子の効果を ATM 遺伝子の遺伝的背景の中で比較した。その結果、ATM の haploinsufficiency が発がん効果を発揮することを証明した。

研究成果の概要（英文）：Genetic and environmental factors on the fetus were studied for the possible causative mechanism of childhood leukemia. As the experimental model etoposide was injected into pregnant mice and DNA damage response was monitored in mononuclear cells in fetal liver and bone marrow of the mother. As the result DNA damage was much more extensive in fetal liver than the corresponding mother's bone marrow. Oncogenic effect by active oncogene was analyzed in ATM+/+ and ATM+/- mice. As the result haploinsufficiency of ATM was shown to cause higher frequency of leukemia than wild type background. This was the first evidence to demonstrate the biological effect of haploinsufficiency of ATM in vivo.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2009年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 胎児・新生児医学

キーワード：ATM, BCR/ABL, CML, γ δ T細胞, LOH, DNA damage

1. 研究開始当初の背景

小児造血器腫瘍の主たる要因として染色体転座を含むゲノム構成異常が知られているが、そうした異常は生殖細胞系列由来よりむしろ体細胞系列由来と考えられている。しかしながらゲノム構成異常がどのようなメカニズムで、どのような時期に起こるかということについては未だ解明されてはいない。新生児期にはすでに特定の染色体転座がすでに体内に存在しているというケースも報告がなされており、造血器疾患の起源を胎児期に求めることもできる。そこで我々は、胎児期におけるゲノム不安定性がその後の疾患発症要因としていかなる作用を及ぼすか明らかにするために、マウスモデルの構築し小児造血器腫瘍の発生するメカニズムの解明を試みた。

2. 研究の目的

(1) 胎児期ゲノム不安定に寄与する作用因子についての研究

我々は上記の作用因子について大きく 2 つの構成成分があると考えている。一つは先天的ゲノム異常のような内的要因。もう一つはゲノム異常を誘発する外的要因である。本件研究では先天的ゲノム異常として毛細血管拡張性小脳運動失調症の責任遺伝子 ATM の欠失、外的要因としては天然に存在し、乳児白血病の外的要因の候補の一つとされるトポイソメラーゼ II 阻害化合物に着目した。ATM 遺伝子に着目した理由は、AT 患者は高発がん性であり、ATM ノックアウトマウスがリンパ性白血病モデルマウスとしてすでに確立されていること。さらに我々の研究で以前に乳児白血病患者の 7 例中 2 例において ATM 遺伝子の germline 変異を発見し、報告しており、さらには *in vitro* の研究において ATM 遺伝子がゲノムの安定化に寄与していることを報告しているからである。

① トポイソメラーゼ II 阻害剤の *In vivo* 作用機序に関する研究

前述したように乳児白血病の外的要因の一つとしてトポイソメラーゼ II 阻害剤が提唱されている。真核生物細胞内には、二本鎖 DNA の立体配置を切断・再接合活性によって変換する酵素：トポイソメラーゼ II が存在し、細胞分裂の過程においては必須の

protein である。細胞周期依存的にその発現量は制御されており、S から G2/M 期にかけて最大となる。トポイソメラーゼ II 阻害剤の一つである VP16(エトポシド)は、トポイソメラーゼ II の再結合活性を阻害し、二本鎖 DNA の切断 DSBs: double strand breaks を引き起こす。細胞分裂が活発であればトポイソメラーゼ II 活性も相関して高いことから、VP16(エトポシド)を代表とするトポイソメラーゼ II 阻害剤は抗がん剤として用いられている。これと類似した作用機序を有するトポイソメラーゼ II 阻害剤様化合物は天然にも豊富に存在し、大豆に含まれるイソフラボン的一种、ゲネステインもその一つであり、乳児白血病の外的要因の一つとして提唱されつつある。しかしながらこうした DNA 障害剤としての作用機序は *In vitro* では解明されてはいるものの、*In vivo* で、しかも胎児期にどのような挙動を示すかについては全く不明である。そこで我々はトポイソメラーゼ II 阻害剤が胎児造血器細胞にあたる作用機序について明らかにするために、妊娠マウスへのエトポシド投与実験を行った。

② トポイソメラーゼ II 阻害剤と胎児期 DNA 損傷応答における ATM 遺伝子の役割に関する研究

前述したように体細胞 DNA 損傷応答における ATM 遺伝子の役割については数多くの報告が蓄積されてきてはいるが、発生過程における ATM 遺伝子の役割については明らかにされていない。我々は胎児期造血器細胞の DNA 損傷応答における ATM 遺伝子の役割を明らかにするために ATM 野生型 (+/+), ATM ノックアウトヘテロ接合体 (+/-), ATM ノックアウトホモ接合体 (-/-) の胎児マウスを用いた解析を行った。

③ トポイソメラーゼ II 阻害剤への胎児期暴露と ATM 異常がマウス臨床像に与える影響の解析

研究目的①、②を臨床例として総合的に包括するために、生存曲線解析を行った。

(2) ATM 遺伝子異常と癌遺伝子 BCR/ABL1 複合効果がマウス臨床像に与える影響について

ATM 遺伝子のホモ欠損による腫瘍発症

へのインパクトは強力であり、単独異常でその機能を表すのに十分であるが、片方欠損 (LOH) では不十分であることが知られており、事実本件研究成果 (1) ②、③からも ATM+/-マウスでの腫瘍感受性増加については証明することはできなかった。しかしながらヒトリンパ性白血病・リンパ腫では ATM 遺伝子の LOH がしばしば認められていることから、造血器腫瘍発症のリスク因子となっている可能性は十分にある。しかしながら ATM ハプロ不全の機能は単独では表現型として発現しにくいという仮説が考えられ、そこで癌遺伝子として知られている BCR/ABL1 キメラ遺伝子の存在下でその役割が表出してくるか検討・解析を行った。

3. 研究の方法

(1)

- ① エトポシド投与実験には C57BL6 妊娠マウス (E13.5) を用いた。エトポシド粉末を 10%DMSO/PBS に溶解し、終濃度 10mg/kg になるように調整した。単回腹腔内投与を行い、30 分、1 時間、2 時間、4 時間、8 時間後にエーテル麻酔・頸椎脱臼法による殺処分後すぐに解剖を開始し、母体マウスの大腿骨より骨髓細胞を、胎児肝より造血器細胞を冷 2%FBS/PBS にて採取し、遠心後、パラホルムアルデヒド固定を行った。さらに 80%エタノールによる脱水・侵透処理を行い、抗体・PI による二重染色後、フローサイトメトリーによる解析を行った。
- ② 妊娠マウスより胎児を摘出し、胎児肝由来造血前駆細胞 (cKit 陽性) をマグネットビーズ法でソートし、適切なサイトカイン存在下 (SCF, IL3, IL6) で 24 時間刺激・培養した。その後コルセミド処理を行いながら、エトポシドに 4 時間暴露させ、その後一般的なカルノア固定による metaphase spread 解析を DAPI 染色法で行った。
- ③ 妊娠マウスに 0.5mg/kg 濃度のエトポシドを連日単回腹腔内投与 (E12.5, E13.5, E14.5, E15.5) を施し、生後マウスの経過観察を実施した。エトポシド濃度振り試験は ET0.5mg/kg, 3mg/kg, 10mg/kg

で実施した。ChIP アッセイは一般的なパラホルムアルデヒド固定法、超音波破碎法による前処理工程の後、抗 γ H2AX 抗体-マグネットビーズ (MACS 社) による免疫沈降を行い、MLL 遺伝子に対する PCR primer を用いて PCR を行った。

(2) BCR/ABL1 トランスジェニックマウスと ATM+/-マウスを交配させ、BATg ATM+/+ BATg ATM+/- BATg ATM-/-を作製、経過観察および腫瘍解析を実施した。

4. 研究成果

(1) ①妊娠マウスにエトポシドを単回腹腔内投与し、細胞内染色・FACS 解析によって、胎児造血細胞の状態の経時変化を追跡した。比較対象として母体マウスの骨髓を用いた。

DNA 損傷のマーカーとして知られるリン酸化 H2AX (γ H2AX) の量を追跡した。非投与マウスの状態をコントロールラインとして、 γ H2AX の相対強度を継時的に示した。FL: 青が胎児肝造血器細胞、BM: 桃色が母体骨髓細胞。DNA 損傷応答の経時変化は FL、BM ともに同様に投与後 30 分ですでに強い反応が認められたが、FL の方がはるかに強い DNA 損傷応答を示すことが分かった。(図 1) PI 染色による死細胞集団 (SubG1 期) の割合を継時的に観察した。図 1 の DNA 損傷と相関して FL、BM ともに死細胞の割合が 2 時間後付近で増加してくるが、FL の方がはるかに顕著であり、8 時間以降も増加傾向にあった。(図 2) 以上からエトポシドの薬効動態は胎児と母体ともに類似した挙動を示す。しかしながら感受性に関しては胎児の方が強いことが判明した。

図 1

γ H2AX intensity of S/G2/M phase

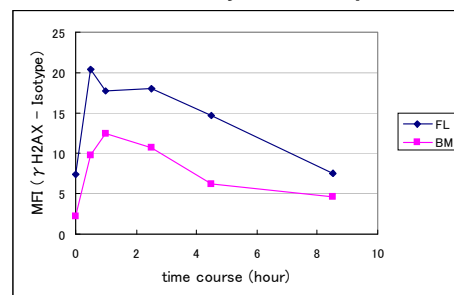
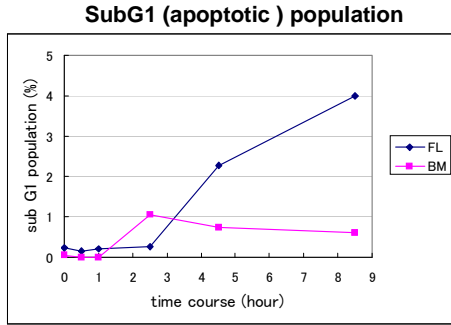


図 2



② エトポシドによる胎児肝造血器前駆細胞のゲノム不安定性解析。DAPI染色による染色体観察を行った。左図はエトポシドなし、右図は $1\mu\text{M}$ で暴露。ATM $^{-/-}$ の図のみ示してある(図3)。ATM $^{+/+}$ 、ATM $^{+/-}$ 、ATM $^{-/-}$ それぞれにおける染色体の切断数を観察した。その結果 ATM $^{-/-}$ では顕著なゲノム不安定性が認められた。以上より ATM 遺伝子は胎児造血器においてもゲノム安定性に寄与していることが判明した。(表1)

図 3

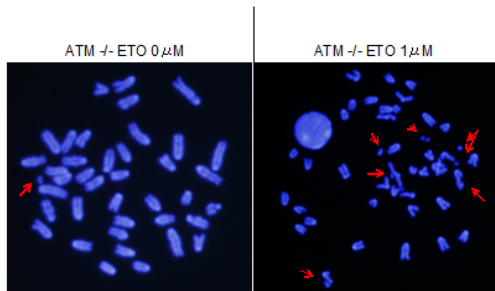


表 1

[result]

chromosomal or chromatid breaks per metaphase

ETO 4hrs	ATM $^{+/+}$	ATM $^{+/-}$	ATM $^{-/-}$
0 μM	4/50 (0.08)	2/50 (0.04)	25/50 (0.52)
1 μM	19/50 (0.38)	13/35 (0.36)	30/11 (2.70)

(分子は breaks 数、分母は解析細胞数)

③ In vivo でエトポシドが胎児肝 DNA にダメージを与える最小濃度を決定した。濃度振り実験の結果、FACS による γH2AX の検出限界は 0.5mg/kg であった (not data shown)。この結果はもっとも感度が良いと考えられる Chip アッセイによって確認された。(図4) 0.5mg/kg 濃度のエトポシドを妊娠マウスに連日単回腹腔内投与

し、生まれてきた各遺伝子型マウスについて経過観察を行った。ATM $^{-/-}$ では3カ月以降でリンパ性腫瘍を発症するもののエトポシドによる効果の判定は不明であった。また ATM $^{+/-}$ マウスではいずれも腫瘍の発症は認められなかった (CTRL n=9 ETO n=10)。(図5):

以上より In vitro によるエトポシド感受性は In vivo で再現することはできなかった。エトポシド感受性と腫瘍感受性をつなぐにはさらなる要素が必要であることを示唆しており、In vivo における腫瘍感受性はより高度なメカニズムによって制御されていると考えられた。

図 4

[ChIP assay in fetal liver MII]

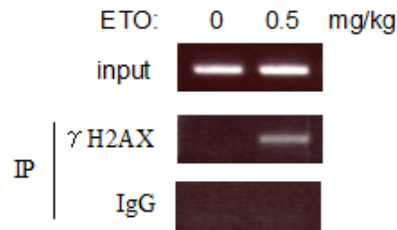
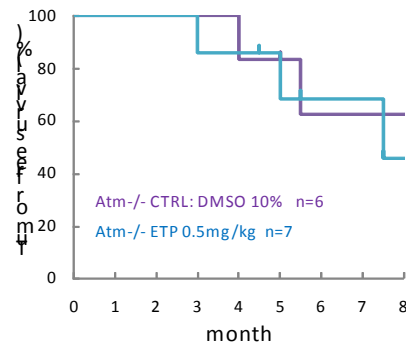


図 5



(2) ATM 遺伝子異常と癌遺伝子 BCR/ABL1 複合効果がマウス臨床像に与える影響について比較するために生存曲線解析を行った。

Kaplan-Meier解析の結果、BCR/ABL1 (BA) 存在下では ATM $^{+/+}$ に比して ATM $^{+/-}$ の方が早く腫瘍を発症することが判明した。ATM $^{-/-}$ については差が認められなかった(図6)。BATg ATM $^{+/-}$ マウスの腫瘍細胞の FACS 解析を示す。 $\gamma\delta$ 型 T の特徴を有することが判明した。この特徴は BATg ATM $^{+/+}$ でも同様であり、本件研究で用いた

BATg マウス特有の phenotype であると思われる(図7)。以上より BCR/ABL1 による腫瘍発症能が ATM ハプロ不全によって修飾されることが判明した。
図6

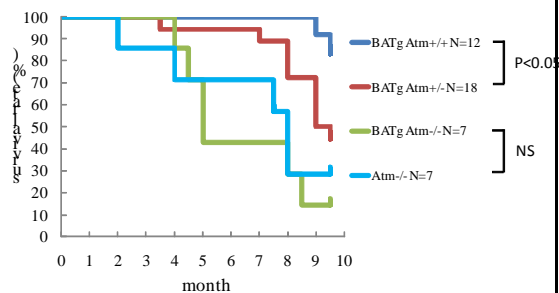
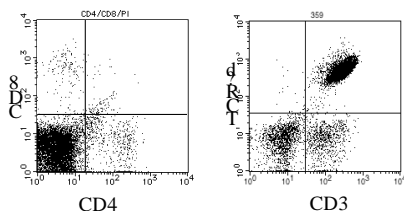


図7

[Tumor/Thymus of BATg Atm+/-]



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 31 件)

1. Sato M, Takagi M, Mizutani S. Attenuation of p53 accumulation after irradiation in cells with C465T polymorphism. *J Med Dent Sci*. 2010;57 : 139-45.
2. Takagi M, Mizutani S. et al. Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome Like Disease With Somatic KRAS Mutation. *Blood* 2010; Nov 9, Epub ahead of print.
3. Ichijima Y, Mizutani S. et al. DNA lesions induced by replication stress trigger mitotic aberration and tetraploidy development. *PLoS One*. 2010;5(1) : e8821.
4. Mizutani S, Takagi M. Autoimmune phenomena in Noonan syndrome; a possible link with RALD. *Blood*. e-letter. 2010 Dec 1.
5. Isoda T, Mizutani S. et al. Immunologically silent cancer

clone transmission from mother to offspring. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009;106(42):17882-5

6. Morio T, Mizutani S. et al. Phenotypic Variations between Affected Siblings with Ataxia-Telangiectasia: Ataxia-Telangiectasia in Japan. *Int. J. Hematol.* 2009;90:455-62.
7. Uchisaka N, Mizutani S. et al. Two brothers with ataxia-telangiectasia - like disorder with lung adenocarcinoma. *J. Pediatr.* 2009;155:435-8.
8. Honda M, Takagi M, Chessa L, Morio T, Mizutani S. Rapid diagnosis of ataxia-telangiectasia by flow cytometric monitoring of DNA damage-dependent ATM phosphorylation. *Leukemia*. 2009;23: 409-14.
9. 水谷修紀. 毛細血管拡張性運動失調. 日本臨床(別冊)新領域別症候群(10)呼吸器症候群第2版 p669-72, 日本臨床社, 2009 (3月)

[学会発表] (計 109 件)

1. Mizutani S. Regulation of DNA damage response network and clinico-pathological features in childhood genetic diseases. 第33回分子生物学会年会第83回日本生化学会大会 合同大会 シンポジウム 2010年12月10日 神戸
2. Koh K, Mizutani S, et al. Early phase administration of hematopoietic stem cell transplantation to prevent early relapse for infants with acute lymphoblastic leukemia and MLL gene rearrangement; a report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG) trial MLL03. 52nd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orlando, USA, Dec. 2010.

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/med/ped/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水谷修紀（教授）

研究者番号：60126175

(2) 研究分担者

高木正稔（講師）

研究者番号：10406247