

機関番号：11101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591241

研究課題名（和文） ダウン症候群の一過性骨髄増殖性疾患と急性巨核球性白血病における細胞増殖機構の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of abnormal cell proliferation in transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome

研究代表者

照井 君典（TERUI KIMINORI）

弘前大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00333740

研究成果の概要（和文）：

ダウン症候群の一過性骨髄増殖性疾患（TMD）と急性巨核球性白血病（DS-AMKL）における細胞増殖機構を解明するために本研究を行い、以下の成果を得た。

1. DS-AMKL の細胞株と TMD 患者検体から計 3 種類の *JAK3* 遺伝子変異を発見し、これらの変異が活性化変異であることを証明した。
2. *JAK3* 阻害薬が、*JAK3* 変異を持つ TMD と DS-AMKL に対する新規治療薬の有効な候補となりうることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We performed this study to clarify molecular mechanisms of abnormal cell proliferation in transient myeloproliferative disorder (TMD) and acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome (DS-AMKL), and found the following results.

1. We identified 3 novel *JAK3* mutations in a DS-AMKL cell line and a TMD patient, and demonstrated that these mutations were all activating mutations.
2. We showed that *JAK3* inhibitors would have therapeutic effects on TMD and DS-AMKL patients carrying activating *JAK3* mutations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児血液学、白血病、ダウン症候群、シグナル伝達、分子標的療法、*JAK3*

1. 研究開始当初の背景

(1) 21 番染色体の過剰により生じるダウン症候群（ダウン症）は白血病を高率に発症

し、その頻度は健常人の約 20 倍である。発症する白血病のほとんどが、一般には稀な急性巨核球性白血病（acute

megakaryoblastic leukemia, AMKL) である。ダウン症の新生児の約 10%に一過性骨髄増殖性疾患 (transient myeloproliferative disorder, TMD) と呼ばれる一過性の類白血病反応がみられ、その 20~30%が 4 年以内に AMKL を発症することから、TMD は前白血病状態と考えられている。重症の TMD と AMKL に対して抗癌剤を用いた化学療法が行われているが、ダウン症の患者では健常人に比べて抗癌剤に対する認容性が低く副作用が強く現れるため、治療関連死亡の割合が高いことが問題となっている。近年、慢性骨髄性白血病において、異常な細胞増殖を促進する疾患特異的キメラ蛋白 BCR-ABL を阻害する分子標的療法が実用化された。分子標的療法は従来の治療法と比べて毒性が低く、治療関連死亡が問題となるダウン症の TMD と AMKL において、非常に魅力的な治療法と考えられる。

- (2) AMKL の発症には、分化障害を生じる転写因子などの遺伝子変異に加え、細胞増殖を促進する遺伝子異常が必要と考えられている。そこで候補遺伝子の探索を行っていたところ、ダウン症関連 AMKL (DS-AMKL) から樹立された細胞株 CMK11-5 と 2 人の AMKL 患者 (1 人はダウン症) の白血病細胞において、細胞増殖に関わる細胞内シグナル伝達物質のひとつである JAK3 の活性化変異が報告された。我々も DS-AMKL 細胞株 MGS について JAK3 変異を解析したところ、2 種類の遺伝子変異を発見した。さらに DS-AMKL と TMD それぞれ 11 例の患者検体を用いて JAK3 変異の解析を行ったところ、DS-AMKL と TMD のそれぞれ 1 例において JAK3 変異を発見した。現在 JAK3 阻害薬の開発が進んでおり、JAK3 変異が高頻度に見られるようであれば、JAK3 阻害薬は TMD と DS-AMKL に対する分子標的療法の有力な候補になると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、TMD と DS-AMKL における細胞増殖促進機構を解明し、分子標的療法の実験的根拠を提示することである。

具体的には以下の 4 点に焦点を絞って研究を行う。

- (1) さらに多数例の TMD と DS-AMKL の患者検体を用いて JAK3 の遺伝子変異を解析し、変異の頻度、特徴を決定する。
- (2) 細胞株と患者から得られた変異 JAK3 遺伝子をサイトカイン依存性細胞株に導入し、変異が活性化変異であることを証明する。
- (3) JAK3 阻害薬により、変異 JAK3 を導入した細胞株の細胞増殖が抑制され、細胞死

が誘導されることを確認する。

- (4) DS-AMKL 細胞株 MGS を用いて、JAK3 が細胞増殖・生存において必須の役割を果たしていることを証明し、JAK3 阻害薬の効果を解析する。

3. 研究の方法

- (1) TMD と DS-AMKL の患者検体を用いた JAK3 遺伝子変異の解析
TMD と DS-AMKL 患者の末梢血または骨髄液から全 RNA を抽出し、cDNA を合成する。JAK3 の cDNA 全長にわたり PCR を行い、ダイレクトシーケンス法により遺伝子変異を確認する。
- (2) 変異 JAK3 遺伝子のサイトカイン依存性細胞株への導入と解析
レトロウイルスベクターに各種変異 JAK3 遺伝子または正常 JAK3 遺伝子を組み込み、サイトカイン依存性細胞株に遺伝子導入し、サイトカイン依存性が消失するかどうか解析する。ウエスタンブロット法により、変異 JAK3 と STAT 転写因子群の活性化を解析する。
- (3) 変異 JAK3 導入細胞株に対する各種 JAK 阻害薬の影響の解析
変異 JAK3 導入細胞株に汎 JAK 阻害薬、JAK3 特異的阻害薬などを添加し、細胞増殖・生存に対する影響を解析する。ウエスタンブロット法と RT-PCR 法により、STAT 転写因子群の活性化と細胞増殖・アポトーシスに関わる遺伝子群の発現レベルの変化を解析する。
- (4) DS-AMKL 細胞株 MGS の細胞増殖機構の解析
MGS において新たに発見された 2 種類の JAK3 変異により、JAK3 が恒常的にリン酸化されていることをウエスタンブロット法にて確認し、下流で活性化している STAT 転写因子の種類を同定する。汎 JAK 阻害薬、JAK3 特異的阻害薬などを添加し、JAK-STAT 経路が MGS の細胞増殖・生存に必須の役割を果たしていることを証明する。

4. 研究成果

- (1) TMD と DS-AMKL の細胞増殖機構における細胞内シグナル伝達物質 JAK3 の役割を明らかにするために、DS-AMKL の細胞株と TMD 患者検体を用いて JAK3 遺伝子変異の解析を行った。DS-AMKL の細胞株 MGS において、2 種類の JAK3 遺伝子変異 ($JAK3^{Q501H}$ 、 $JAK3^{R657Q}$) を見出した。Ba/F3 細胞にこれらの変異遺伝子を導入したところ、サイトカイン非依存性の細胞増殖が認められ、これらの変異が活性化変異であることを

証明した。TMD11 例中 1 例で *JAK3* の遺伝子変異 (*JAK3^{I87T}*) が認められ、この変異も活性化変異であった。これらの変異 *JAK3* を導入した Ba/F3 細胞では、STAT5 が恒常的にリン酸化されていることが明らかとなった。MGS および変異遺伝子を導入した Ba/F3 細胞を *JAK3* 阻害薬で処理したところ、細胞増殖の抑制が認められた。*JAK3* 阻害薬が、*JAK3* 変異を持つ DS-AMKL、TMD に対する新規治療薬の有力な候補となりうることを示唆された。

- (2) 先天性白血病患者の一部で、TMD と同様に自然寛解がみられることは以前より知られていたが、その機序はいまだに不明である。最近当科で経験した t(1;16;8) の染色体異常を持つ先天性急性骨髄性白血病の自然寛解例において FISH 法による解析を行ったところ、予後不良の成人 AML でみられる染色体異常 t(8;16) と同様に、*MOZ* 遺伝子と *CBP* 遺伝子が白血病の発症に関与していることが示唆された。RT-PCR 法により 2 種類の *MOZ-CBP* 融合遺伝子を検出したが、これらは今までに報告のない新規 variant であった。形成される融合タンパクの構造の違いにより、白血病の生物学的性状、予後が大きく変わる可能性が示唆された。
- (3) TMD のほぼ全例で *GATA1* 遺伝子変異を認める。いずれの変異も全長型の *GATA1* タンパクの発現を障害し、N 末端を欠いた短い *GATA1* タンパク (*GATA1s*) のみの発現を引き起こすが、遺伝子変異は多彩である。66 例の TMD について *GATA1* 変異のタイプと臨床像の関係を調べたところ、*GATA1s* の発現が低いタイプ (n=26) は、*GATA1s* の発現が高いタイプ (n=40) に比べて白血球数が少ない (39,000 vs 105,650 / μ l, p=0.004) が、高率に DS-AMKL に進展する (Gray 検定、p=0.001) ことが明らかとなった。*GATA1s* の発現量が TMD の細胞増殖促進機構に重要な役割を果たしていることが示唆されるとともに、著明な細胞増殖が必ずしも将来の DS-AMKL への進展に有利ではないことが明らかとなった。
- (4) ダウン症候群は AML のみならず急性リンパ性白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL) も高率に発症する。最近ダウン症候群 ALL (DS-ALL) の約 20% に *JAK2* の活性化変異がみられること、約 60% で サイトカインレセプターの 1 つである *CRLF2* の高発現がみられることが報告され、さらに *CRLF2* の高発現がみ

られる症例のほとんど (DS-ALL の約半数) で、*P2RY8-CRLF2* 融合遺伝子が形成されていることが明らかとなった。そこで本邦の DS-ALL 14 例について同様の解析を行ったところ、*JAK2* 変異は 1 例もみられず、*P2RY8-CRLF2* 融合遺伝子も 2 例で認められたのみであった。本邦における DS-ALL の遺伝子異常は欧米とは異なる可能性が示唆された。今後症例数を増やして遺伝子解析を行う必要があるため、high resolution melt analysis を用いて *JAK2* 変異の有無をスクリーニングする方法を確立した。

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 14 件)

- ① Zhao M, Kanegane H, Kobayashi C, Nakazawa Y, Ishii E, Kasai M, Terui K, Gocho Y, Imai K, Kiyasu J, Nonoyama S, Miyawaki T. Early and rapid detection of X-linked lymphoproliferative syndrome with *SH2D1A* mutations by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2011; 80: 8-13.
- ② Kudo K, Terui K, Sasaki S, Kamio T, Sato T, Ito E. Voriconazole for both successful treatment of disseminated *Trichosporon asahii* infection and subsequent cord blood transplantation in an infant with acute myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2011; 46: 310-311.
- ③ Ito E, Konno Y, Toki T, Terui K. Molecular pathogenesis in Diamond-Blackfan anemia. *Int J Hematol* 2010; 92: 413-418.
- ④ Kanazaki R, Toki T, Terui K, Xu G, Wang R, Shimada A, Hama A, Kanegane H, Kawakami K, Endo M, Hasegawa D, Kogawa K, Adachi S, Ikeda Y, Iwamoto S, Taga T, Kosaka Y, Kojima S, Hayashi Y, Ito E. Down syndrome and *GATA1* mutations in transient abnormal myeloproliferative disorder: mutation classes correlate with progression to myeloid leukemia. *Blood* 2010; 116: 4631-4638.
- ⑤ Terui K, Takahashi Y, Sasaki S, Kudo K, Kamio T, Ito E. Guillain-Barré syndrome mimicking acute methotrexate-associated encephalopathy in an adolescent patient with lymphoblastic lymphoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 2010; 32:

- 615-616.
- ⑥ Aikawa Y, Katsumoto T, Zhang P, Shima H, Shino M, Terui K, Ito E, Ohno H, Stanley ER, Singh H, Tenen DG, Kitabayashi I. PU.1-mediated upregulation of *CSF1R* is crucial for leukemia stem cell potential induced by MOZ-TIF2. *Nat Med* 2010;16: 580-585.
- ⑦ Konno Y, Toki T, Tandai S, Xu G, Wang R, Terui K, Ohga S, Hara T, Hama A, Kojima S, Hasegawa D, Kosaka Y, Yanagisawa R, Koike K, Kanai R, Imai T, Hongo T, Park MJ, Sugita K, Ito E. Mutations in the ribosomal protein genes in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Haematologica* 2010; 95: 1293-1299.
- ⑧ Minakawa S, Takeda H, Nakano H, Tono C, Takahashi Y, Sasaki S, Terui K, Ito E, Sawamura D. Successful umbilical cord blood transplantation for intractable eczematous eruption in hypohidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. *Clin Exp Dermatol* 2009; 34: e441-442.
- ⑨ 伊藤悦朗, 土岐力, 金崎理香, 佐藤知彦, 照井君典, 足立壮一. 小児科領域の血液疾患 一過性骨髄増殖性疾患. 日本検査血液学会雑誌 2009; 10: 457-464.
- ⑩ 土岐力, 照井君典, 伊藤悦朗. 一過性骨髄増殖症. 小児疾患診療のための病態生理. 小児内科増刊号 2009; 41: 1183-1186.
- ⑪ Terui K, Sato T, Kamio T, Kudo K, Sasaki S and Ito E. Two novel variants of *MOZ-CBP* fusion transcripts in spontaneously remitted congenital leukemia with t(1;16;8)(p13;p13;p11), a new variant of t(8;16)(p11;p13). *Haematologica* 2008; 93: 1591-1593.
- ⑫ Sato T, Toki T, Kanazaki R, Xu G, Terui K, Kanegane H, Miura M, Adachi S, Migita M, Morinaga S, Nakano T, Endo M, Kojima S, Kiyoi H, Mano H, Ito E. Functional analysis of *JAK3* mutations in transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukaemia accompanying Down syndrome. *Br J Haematol* 2008; 141: 681-688.
- ⑬ Kitamura H, Kaneko T, Nakano H, Terui K, Ito E, Sawamura D. Juvenile myelomonocytic leukemia presenting multiple painful erythematous lesions diagnosed as Sweet's syndrome. *J Dermatol* 2008; 35: 368-370.
- ⑭ 照井君典, 伊藤悦朗. ダウン症候群に合併する急性巨核芽球性白血病の発症メカニズム. 血液フロンティア 2008; 18: 583-590.
- [学会発表] (計 14 件)
- ① 土岐力, 伊藤悦朗. ダウン症候群に発症する一過性骨髄異常増殖症 (TAM) TAM にみられた *GATA1* 遺伝子異常の最近の話題. 第 52 回日本小児血液学会, 2010.12.17-19, 大阪.
- ② 佐野弘純, 朴明子, 外松学, 今野友貴, 土岐力, 伊藤悦朗, 林泰秀. 典型例とは異なる緩徐な臨床経過を示し、リボソームタンパク遺伝子 *RPL11* の変異の検出により診断した Diamond-Blackfan 貧血の 1 例. 第 52 回日本小児血液学会, 2010.12.17-19, 大阪.
- ③ 伊藤雅文, 木下明俊, 多賀崇, 宮地勇人, 滝智彦, 高橋浩之, 照井君典, 清河信敬, 出口隆生, 林泰秀, 多和昭雄, 太田秀明, 足立壮一. ダウン症候群に発症する急性骨髄性白血病病理中央診断の解析. 第 52 回日本小児血液学会, 2010.12.17-19, 大阪.
- ④ 伊藤悦朗, 照井君典, 佐藤知彦, 土岐力. 小児血液疾患の分子診断の進歩とその臨床応用 TAM 発症の分子診断. 第 113 回日本小児科学会, 2010.4.23-25, 盛岡.
- ⑤ Konno Y, Toki T, Tandai S, Xu G, Terui K, Ohga S, Kojima S, Yanagisawa R, Koike K, Hasegawa D, Kosaka Y, Kanei R, Imai T, Hongo T, Park MJ, Watanabe A, and Ito E. Mutations in ribosomal protein genes of Diamond-Blackfan anemia patients in Japan. 51st American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, 2009.12.5-8, New Orleans, LA.
- ⑥ 清水淳次, 多賀崇, 堀田真紀子, 野村明孝, 加藤博文, 太田茂, 竹内義博, 西澤嘉四郎, 照井君典. 17 歳発症の AML with multilineage dysplasia のダウン症例について. 第 51 回日本小児血液学会, 2009.11.27-29, 東京.
- ⑦ 濱麻人, 松本公一, 土岐力, 村松秀城, 西尾信博, 永田俊人, 高橋義行, 伊藤悦朗, 小島勢二. *GATA1*, *JAK3*, *JAK2* 変異を有するダウン症関連急性巨核芽球性白血病由来細胞株 (CHYNA) の樹立. 第 51 回日本小児血液学会, 2009.11.27-29, 東京.
- ⑧ 土岐力, 伊藤悦朗. 小児血液腫瘍の発症リスクと先天異常 ダウン症候群と血液腫瘍. 第 71 回日本血液学会, 2009.10.23-25, 京都.
- ⑨ 今野友貴, 丹代諭, 徐剛, 土岐力, 工藤耕, 照井君典, 大賀正一, 小島勢二, 長

谷川大一郎, 青木由貴, 金井理恵, 今井剛, 本郷輝明, 朴明子, 柳沢龍, 伊藤悦朗. 本邦のDiamond-Blackfan 貧血患者におけるリボゾームタンパク遺伝子の変異. 第 71 回日本血液学会, 2009. 10. 23-25, 京都.

- ⑩ 辻村朱音, 塩津行正, 清井仁, 石川裕一, 森裕美子, 石田広志, 新美圭子, 土岐力, 伊藤悦朗, 直江知樹. 新規 KIT 選択的阻害剤 KI-328 の抗白血病細胞効果の検討. 第 71 回日本血液学会, 2009. 10. 23-25, 京都.
- ⑪ 伊藤悦朗, 土岐力, 金崎里香, 佐藤知彦, 照井君典, 足立壮一. 小児科領域の血液疾患 一過性骨髄増殖性疾患. 第 10 回日本検査血液学会, 2009. 7. 3-4, 甲府.
- ⑫ 照井君典, 佐藤知彦, 神尾卓哉, 工藤耕, 佐々木伸也, 土岐力, 高橋良博, 菊地陽, 伊藤悦朗. t(1;16;8)を有する新生児AML の自然寛解例で認められた MOZ-CBP 融合遺伝子の新規 variant. 第 50 回日本小児血液学会, 2008. 11. 14-16, 千葉.
- ⑬ 佐藤知彦, 土岐力, 金崎里香, 徐剛, 照井君典, 金兼弘和, 三浦正義, 足立壮一, 右田昌宏, 森永信吾, 中野崇秀, 遠藤幹也, 小島勢二, 清井仁, 間野博行, 伊藤悦朗. ダウン症関連白血病および TMD における JAK3 遺伝子変異の機能解析. 第 70 回日本血液学会, 2008. 10. 10-12, 京都.
- ⑭ 土岐力, 金崎里香, 足立壮一, 徐剛, 佐藤知彦, 鈴木かほり, 田内久道, 遠藤幹也, 伊藤悦朗. ダウン症関連白血病細胞の増殖における Stem cell factor/KIT シグナリング. 第 70 回日本血液学会, 2008. 10. 10-12, 京都.

[図書] (計 1 件)

- ① 伊藤悦朗, 照井君典. Down 症候群患者に発症した M7 における GATA1 遺伝子突然変異. 血液腫瘍アトラス 第 4 版. 阿部達生編. 日本医事新報社, 183-186, 2009.

[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

<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~pedia/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

照井 君典 (TERUI KIMINORI)
弘前大学・医学部附属病院・講師
研究者番号 : 00333740

(2) 研究分担者

土岐 力 (TOKI TSUTOMU)
弘前大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号 : 50195731

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :