

機関番号：32650

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591263

研究課題名(和文) ダウン症児における一過性骨髄増殖症の自然治癒機構に関する分子・細胞生物学的研究

研究課題名(英文) Molecular and cellular biological study on the mechanism of spontaneous remission of transient myeloproliferative disorder in children with Down syndrome

研究代表者

宮内 潤 (MIYAUCHI JUN)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：20146707

研究成果の概要(和文)：ダウン症候群新生児における一過性骨髄増殖症(TMD)は、急性白血病様の芽球増殖をきたすが自然に治癒する特殊な血液腫瘍である。TMD 芽球に及ぼす造血環境の果たす役割を実験的に解析した。TMD 芽球は造血因子存在下で増殖が刺激されるとともに好塩基球・肥満細胞・巨核球に分化し、*GATA1* 遺伝子変異に伴って産生される異常な *GATA1* 蛋白発現が分化に伴って低下することが証明された。また胎児肝の造血微小環境を構成する間質細胞が TMD 芽球の増殖を維持した。以上の結果から、TMD の自然治癒機構には芽球の分化能と胎児期の造血微小環境が関与する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Transient myeloproliferative disorder (TMD) in neonates with Down syndrome is a special leukemia that arises in fetal stage and spontaneously regresses after birth. We studied the role of hematopoietic microenvironment in spontaneous remission of TMD. In the presence of growth factors, TMD blasts differentiated into basophil/mast cell and megakaryocyte lineages and aberrant expression of *GATA1* protein due to *GATA1* mutations was shown to be down-regulated during differentiation. The growth of TMD blasts was maintained by stromal cells of the fetal liver. These data indicate that differentiation potential of TMD blasts and fetal hematopoietic microenvironment could be involved in spontaneous remission of TMD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：小児腫瘍学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：ダウン症候群、一過性骨髄増殖症、自然治癒、造血因子、造血微小環境、分化、*GATA1*、遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

ダウン症候群新生児における一過性骨髄増殖症 transient myeloproliferative disorder (TMD) は新生児期に末梢血に芽球が出現し、急性骨髄性白血病(AML)様の芽球増殖をきたすが、無治療で自然に治癒する特殊な疾患である。20-30%の TMD 症例では、自

然治癒後4年以内に急性巨核芽球性白血病 acute megakaryoblastic leukemia (AMKL) を起こす。TMD はダウン症候群にもとづく21トリソミーを基盤として *GATA1* 遺伝子変異が起こることで発症するが、永続的な増殖能は有さない特殊な白血病または一種の前白血病状態で、これに付加的遺伝子異常が起

こることで真の AMKL に移行すると考えられている。TMD の自然治癒機構はほとんど解明されていない。小児がんには自然治癒を来す疾患がいくつか知られているが、その自然治癒機構が解明できれば、小児がんの治療に大きな貢献が期待されるのみならず、成人のがんの新しい治療法の開発にも有用な情報をもたらすと考えられる。

2. 研究の目的

TMD の自然治癒機構の仮説として現在までに、以下のような可能性が考えられている。1) TMD は新生児期の疾患であり、胎児で発症する症例も知られていることなどから、通常の白血病と異なり、骨髄ではなく胎児の肝臓で発症する特殊な腫瘍と考えられる。腫瘍細胞の増殖が骨髄ではなく胎児肝の造血微小環境に依存しているため、生後に肝造血が終了して造血の場が骨髄に移行すると、骨髄の造血微小環境は TMD の増殖を維持できず、TMD の芽球の増殖が停止するという可能性 (環境要因説)、2) TMD の腫瘍細胞が胎児造血に関わる造血前駆細胞に由来するため、生後に胎児造血から成人造血に移行すると、遺伝子的制御プログラムが成人造血に切り替わることで、芽球の増殖が停止する可能性 (内因説)、3) TMD の芽球が骨髄系細胞の成熟球への分化能を有するために、生後に造血環境が変化することで分化が促進され、増殖が停止する可能性 (分化説) など。本研究ではこれらの仮説を *in vitro* の実験にて解析・検証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) TMD の芽球 (5 例) の増殖と分化に及ぼす造血微小環境の影響を解析するために、代表的な 6 種の遺伝子組換えヒト造血因子の作用を *in vitro* にて解析した。TMD 芽球の増殖に及ぼす作用はメチルセルロース培養を用いたコロニー形成率と液体培養における細胞数増加に対する効果で判定し、分化に及ぼす影響は液体培養における光顕ならびに電顕の形態観察、酵素細胞化学、免疫細胞化学およびフローサイトメトリーによる抗原発現解析にて解析した。

(2) 分化した細胞のクローン性解析には、*GATA1* 遺伝子の塩基配列を解析して変異を同定し、芽球と成熟細胞における遺伝子異常の有無と塩基配列の詳細を比較した。また *GATA1* 遺伝子変異にて産生される分子量の小さな *GATA1* 蛋白 (通常 *GATA1s* と呼ばれる) の異常発現を、ウェスタンブロット法にて解析した。

(3) 造血微小環境を構成する細胞が TMD 芽球の維持に及ぼす作用に関しては、ヒトの人工中絶胎児 2 例から得られた肝臓および骨髄の間質細胞を培養器底面にあらかじめ附着

させておき、この上に TMD 芽球を浮遊細胞として加えて共培養を行った。両者の細胞が接触可能な条件下、および多孔フィルター (Transwell) を用いて両者の接触を断ち、液性因子の交通のみが可能な条件下で共培養を行って、TMD 芽球に対する胎児の肝と骨髄の間質細胞の機能の違いを解析した。間質細胞の性状は免疫細胞化学等で解析した。

4. 研究成果

(1) TMD 芽球の増殖に対して、多能性幹細胞に作用する造血因子である interleukin-3 (IL-3), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) および stem cell factor (SCF) の 3 者が強い刺激作用を有することが判明した。これらは腫瘍性前駆細胞の増殖を刺激するばかりでなく、好塩基球への分化も誘導することが見出された。またこれらの造血因子の存在下で、TMD の芽球は肥満細胞と好塩基球の両者の性格を兼ね備えたハイブリッド細胞にも分化することを証明した。一方、thrombopoietin (TPO) の存在下で TMD の芽球は巨核球にも分化することが証明された。

(2) 培養後に出現するこれらの分化した細胞が腫瘍細胞に由来するか否かを確認するため、*GATA1* 遺伝子解析を行った結果、培養前の芽球と培養後の成熟細胞のいずれにも同一の *GATA1* 遺伝子変異が認められた。このことは培養中に出現する成熟血球が、混在する正常な造血前駆細胞に由来するものではなく、TMD の芽球が分化・成熟したものであることを証明する結果である。

(3) TMD では *GATA1* 遺伝子の変異のため、正常な全長型 *GATA1* 蛋白が産生されず、N 端側の転写活性化領域を欠く分子量の小さな *GATA1s* 蛋白が産生される。TMD 芽球の培養経過における *GATA1* 蛋白発現の推移をウェスタンブロット法にて解析した結果、IL-3, SCF, GM-CSF, TPO のいずれの造血因子を用いた培養でも、芽球の分化に伴って *GATA1s* の発現が低下・消失することが判明した。以上の結果は、TMD の自然治癒に芽球の分化が関与する可能性を示唆するものであり、さらに、腫瘍を規定する遺伝子異常が存在しても、その遺伝子産物である異常蛋白の発現レベルは環境因子によって可変であるという、腫瘍学上も大変興味ある事実が示されたといえる。

(4) 胎児期の肝臓と骨髄の造血微小環境を構成する間質細胞の存在下で TMD 芽球を共培養し、胎児肝および骨髄の間質細胞の造血維持機能を解析した。胎児肝由来間質細胞の存在下にて TMD 芽球の前駆細胞の増殖が維持されたが、胎児骨髄間質細胞にはこのような機能は乏しいことが判明した。以上の結果より、TMD 芽球の増殖は胎児の骨髄ではなく

胎児肝の間質細胞に選択的に依存していることが示され、TMD が胎児肝で発症するという仮説を支持する結果であった。ただし対照実験にて、成人の AML の芽球も同様に胎児肝由来間質細胞の存在下でより効率的に増殖が維持されたことから、胎児肝の微小環境の作用は TMD 芽球に特異的とはいえ、生後の造血微小環境の変化が TMD の自然治癒に直接関与するものか否かに関しては、さらに詳細な解析を要する。

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 16 件)

- 1) Ishigaki H, Miyauchi J, Yokoe A, Nakayama M, Yanagi T, Taga T, Ohta S, Itoh Y, Ogasawara K: Expression of megakaryocytic and myeloid markers in blasts of transient abnormal myelopoiesis in a stillbirth with Down syndrome: report of histopathological findings of an autopsy case. *Hum. Pathol.* 42: 141-145, 2011、査読有
- 2) Miyauchi J, Ito Y, Tsukamoto K, Takahashi H, Ishikura K, Sugita K, Miyashita T: Blasts in transient leukemia in neonates with Down syndrome differentiated into basophil/mast cell and megakaryocyte lineages *in vitro* in association with down-regulation of truncated form of GATA1. *Br. J. Haematol.* 148: 898-909, 2010、査読有
- 3) Muramatsu T, Hall GL, Hashimoto S, Miyauchi J, Shimono M: Clinico-Pathological Conference: Case 4. *Head and Neck Pathol.* 4:343-346, 2010、査読有
- 4) 宮内 潤: 巨核球の形態異常. *病理と臨床* Vol.28 (臨時増刊号:「病理形態学キーワード」):332-333, 2010、査読無
- 5) 浅野尚文、穴澤卯圭、堀田拓、山根淳一、宮内 潤、白石建: 著明な関節水腫を呈した樹枝状脂肪腫の 1 例. *整形外科* 61(1):66-67, 2010、査読有
- 6) 松崎達、寺嶋毅、小川里佳、内藤明日香、宮内 潤、森下鉄夫、石坂彰敏: 慢性関節リウマチ加療中に粟粒結核と急性呼吸促迫症候群を合併した 1 例. *日本呼吸器学会雑誌* 48(3):235-239, 2010、査読有
- 7) 松崎達、寺嶋毅、小川里佳、内藤明日香、宮内 潤、森下鉄夫: gefitinib 投与により 5 年間完全奏効を維持している進行肺腺癌の 1 例. *日本呼吸器学会雑誌* 48(8): 600-603, 2010、査読有
- 8) 宮内 潤、赤塚誠也: 先天性間葉芽細胞腫の 1 例. *小児がん* 47(1):157, 2010、査読無
- 9) 宮内 潤: チロシンキナーゼ阻害剤が有効な骨髄増殖性腫瘍: 慢性骨髄性白血病と慢性好酸球性白血病. *病理と臨床* 27(11):1052-1058, 2009、査読無
- 10) 宮内 潤: Calcifying aponeurotic fibroma の 1 例. *小児がん* 46(2): 242, 2009、査読無
- 11) Terashima T, Matsuzaki T, Ogawa R, Naitou A, Inokuchi S, Kaida S, Kishikawa H, Nishida J, Tanaka Y, Miyauchi J, Morishita T, Ishizaka A: Fulminant hepatic failure as the initial manifestation of small-cell lung cancer: Report of 2 cases. *Ann. Cancer Res. Therap.* 16(1):16-30, 2008、査読有
- 12) Kadin ME, Pinkus JL, Pinkus GS, Duran IH, Fuller CE, Onciu M, Kawaguchi H, Morris SW: Primary cutaneous ALCL with phosphorylated/activated cytoplasmic ALK and novel phenotype: EMA/MUC1+, cutaneous lymphocyte antigen negative. *Am. J. Surg. Pathol.* 32: 1421-1426, 2008、査読有
- 13) 宮内 潤、川口裕之: 乳幼児白血病の発症機序. *病理と臨床* 26(9):922-927, 2008、査読無
- 14) 宮内 潤、赤塚誠也: 大腿部 Spitzoid melanoma の 1 例. *小児がん* 45(2): 183, 2008、査読無
- 15) 松本晶、小村伸朗、遠山洋一、中田浩二、矢野文章、柳澤暁、小林進、宮内 潤: 逆流性食道炎による著明な食道狭窄により食道亜全摘を施行した一例 (病理解説). *千葉消化器疾患研究会抄録集(III)*: p.11-14, 2008、査読無
- 16) 庭瀬亜香、小林進、高山亘、矢野圭子、菅谷睦、角田慎輔、黄哲守、宮内 潤: 膝癌疑いにて膝体尾部切除を施行した 1 例 (病理解説). *千葉消化器疾患研究会抄録集(III)*: p.84-87, 2008、査読無

[学会発表] (計 26 件)

- 1) Illert A.L., Kawaguchi H., Albers C., Sickinger M., Keller U., Morris S.W., Peschel C., Duyster J.: NIPA Checkpoint Control In Oncogenic Transformation Is Dependent on p53. 52nd annual meeting of the American Society of Hematology (2010 年 12 月, Orlando, Florida, USA)
- 2) 堀江 弘、北條 洋、田中祐吉、中川温子、藤本純一郎、横山繁昭、中山雅弘、石田 剛、宮内 潤、大喜多肇、井上健、平戸純子、小林庸次、森川征彦、恒吉正澄、浜崎 豊、秦 順一: 新たな病理組織分類アトラスの作成と小児固形腫瘍の生物学的特異性の解明. 第 26 回日本小児がん学会学術集会 (2010 年 12 月 17 日~19 日、大阪市)
- 3) 森麻希子、川口裕之: 難治性 Evans 症候

- 群の 1 例. 第 52 回日本小児血液学会 (2010 年 12 月, 大阪)
- 4) 川口裕之, 森麻希子: 難治性免疫性血球減少症に対する造血幹細胞移植, 第 18 回小児 ITP 研究会 (2010 年 11 月, 東京)
 - 5) 森麻希子, 川口裕之: 難治性 Evans 症候群の 1 例. 第 18 回小児 ITP 研究会 (2010 年 11 月, 東京)
 - 6) 宮内 潤: Transient abnormal myelopoiesis (TAM) の死産児の一剖検例. 第 8 回骨髄病理研究会 (2010 年 9 月 7 日, 倉敷)
 - 7) 宮内 潤: 骨髄生検病理標本の見方. 第 7 回小児病理セミナー (2010 年 9 月 6 日, 大阪)
 - 8) 宮内 潤: ダウン症における transient abnormal myelopoiesis (TAM) の最近の知見: 芽球の増殖・分化と GATA1. 第 7 回小児病理セミナー (2010 年 9 月 6 日, 大阪市)
 - 9) 市川仁志, 貝田将郷, 岸川浩, 西田次郎, 森下鉄夫, 星本相淳, 松井淳一, 宮内 潤: 画像上腫瘍性病変を指摘できなかった粘液産生性胆管腫瘍の 1 例. 第 19 回日本癌病態治療研究会 (2010 年 6 月 30 日～71 日, 東京)
 - 10) 市川仁志, 貝田将郷, 岸川浩, 西田次郎, 森下鉄夫, 星本相淳, 松井淳一, 宮内 潤: 画像上腫瘍性病変を指摘できなかった粘液産生性胆管腫瘍の 1 例. 第 19 回日本癌病態治療研究会 (2010 年 6 月 30 日～71 日, 東京)
 - 11) 大久保寿樹, 野川茂, 菅貞郎, 宮内 潤, 森下鉄夫: 開頭減圧術を要し, 免疫吸着療法が有効であった型多発性硬化症の 1 例. 第 192 回日本神経学会関東地方会 (2010 年 3 月, 東京)
 - 12) 宮内 潤: ダウン症児における transient abnormal myelopoiesis (TAM) の芽球の増殖・分化と GATA1 異常蛋白の解析. 第 109 回小児血液腫瘍懇話会 (2009 年 12 月, 東京医科歯科大学)
 - 13) 北條 洋, 堀江 弘, 藤本純一郎, 浜崎豊, 秦 順一, 石田 剛, 小林庸次, 宮内 潤, 森川征彦, 中川温子, 中山雅弘, 田中祐吉, 恒吉正澄, 横山繁昭, 大喜多肇, 井上健, 平戸純子: 小児期固形腫瘍 2,052 例における種類別頻度の解析—日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会報告—. 第 25 回日本小児がん学会 (2009 年 11 月, 浦安市)
 - 14) 堀江 弘, 秦 順一, 恒吉正澄, 藤本純一郎, 北條 洋, 小林庸次, 浜崎 豊, 森川征彦, 横山繁昭, 中山雅弘, 石田 剛, 宮内 潤, 田中祐吉, 中川温子: 小児固形腫瘍の生物学的特異性の解明と新たな病理組織分類アトラスの作成. 第 25 回日本小児がん学会 (2009 年 11 月, 浦安市)
 - 15) 川口裕之, 江口博之, 佐々木悟郎, 三井俊賢, 山田佳之, 大西宏明, 石井照之, 宮内 潤: 著明な末梢血好酸球増多を呈した好酸球性胃腸炎と思われる 9 歳男児. 第 51 回日本小児血液学会 (2009 年 11 月, 浦安市)
 - 16) 有澤正義, 加藤弘之, 岡田麻衣子, 増永健, 瀧川逸朗, 宮内 潤: ダウン症における一過性骨髄異常増殖症(TAM)は巨核芽球の成熟により治る. 第 29 回日本小児病理研究会 (2009 年 9 月, 東京)
 - 17) 浅野尚文, 穴澤卯圭, 堀田択, 青山龍馬, 山根淳一, 望月義人, 宮内 潤, 新井健, 白石建: 樹枝状脂肪腫の 4 例. 第 42 回日本整形外科学会 骨軟部腫瘍学術集会 (2009 年 7 月)
 - 18) 宮内 潤: 小児の骨髄異形成症候群 (コンパニオンミーティング 11: 骨髄病理研究会「骨髄異形成症候群の病理診断—何を診てどう報告するか」). 第 98 回日本病理学会総会 (2009 年 5 月, 京都)
 - 19) 北條 洋, 堀江 弘, 藤本純一郎, 浜崎豊, 秦 順一, 石田 剛, 小林庸次, 宮内 潤, 森川征彦, 中川温子, 中山雅弘, 田中祐吉, 恒吉正澄, 横山繁昭: 小児期固形腫瘍 2,053 例における種類別頻度の解析—日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会報告—. 第 98 回日本病理学会総会 (2009 年 5 月, 京都)
 - 20) 里 梯子, 永見圭一, 田口暢彦, 宮内 潤: Cyanotic nephropathy を呈する 2 例の成人剖検例. 第 98 回日本病理学会総会 (2009 年 5 月, 京都)
 - 21) 磯野有章子, 川口裕之, 松本暁子, 三井俊賢, 篠原尚美, 佐々木悟郎, 江口博之: 抗 HPA-5b 抗体による新生児同種免疫性血小板減少症 (NAIT) の一例. 第 112 回日本小児科学会学術集会 (2009 年 4 月, 奈良)
 - 22) 磯野有章子, 川口裕之, 森麻希子, 石崎怜奈, 篠原尚美, 三井俊賢, 佐々木悟郎, 江口博之: 出生時から血小板減少症が遷延している 1 歳男児例. 第 17 回小児 ITP 研究会 (2009 年 11 月, 東京)
 - 23) 島村一步, 川口裕之, 佐々木悟郎, 三井俊賢, 篠原尚美, 磯野有章子, 石崎怜奈, 江口博之: 化学療法中に新型インフルエンザ (S-OIV) に罹患したランゲルハンス細胞組織旧称の 1 例. 第 57 回日本小児科学会東京都地方会 (2009 年 12 月, 東京)
 - 24) 石垣宏仁, 横江章, 別所美佐子, 伊藤靖, 小笠原一誠, 岸本宏志, 宮内 潤: Transient abnormal myelopoiesis (TAM) の死産児の一剖検例. 第 28 回日本小児病理研究会 (2008 年 9 月, 松本市)
 - 25) 森定 徹, 岸見有紗, 松岡美杉, 西村修, 宮越敬, 大久保和美, 福井谷達郎, 竹島

薫、宮内 潤：子宮筋腫手術にて偶発的に発見された乳癌の卵巣転移の一例．日本婦人科腫瘍学会学術講演会（2008年7月、名古屋市）

- 26) 宮内 潤：ダウン症児における一過性骨髄増殖症の自然治癒機構の解析：造血微小環境の関与について．第97回日本病理学会総会（2008年5月、金沢）

〔図書〕（計4件）

- 1) 宮内 潤、泉二 登志子（編集・執筆）：「骨髄疾患診断アトラス：血球形態と骨髄病理」、中外医学社（東京）、発行2010年12月15日、総ページ：273
- 2) 宮内潤（分担執筆）：「小児のMDSおよびMDS/MPD」、定平吉都（編）：「わかりやすい骨髄病理診断学：吸引クロット、生検組織の見方」、p.138-148、西村書店（東京）、2008年6月22日、総ページ：253
- 3) 宮内潤（分担執筆）：「組織球症」、定平吉都（編）：「わかりやすい骨髄病理診断学：吸引クロット、生検組織の見方」、p.234-237、西村書店（東京）、2008年6月22日、総ページ：253
- 4) 堀江 弘、藤本純一郎、浜崎 豊、秦 順一、平戸純子、北條 洋、井上 健、石田 剛、小林庸次、宮内 潤、森川征彦、中川温子、中山雅弘、大喜多肇、田中祐吉、恒吉正澄、横山繁昭：肝臓・胆嚢・膵臓腫瘍．日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会（編）、小児腫瘍組織カラーアトラス（第5巻）、金原出版（東京）、2010年6月、総ページ：109

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・教授
研究者番号：20146707

(2)研究分担者

川口裕之 (KAWAGUCHI HIROYUKI)
東邦大学・医学部小児科・講師
研究者番号：00313130