

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：13601
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21390308
 研究課題名（和文） 疾患特異的 iPS 細胞を用いた難治性小児骨髄異形成症候群の発症機構の解析
 研究課題名（英文） Analysis of pathogenesis of refractory childhood myelodysplastic syndrome using disease-specific iPS cells
 研究代表者
 小池 健一（KOIKE KENICHI）
 信州大学・医学部・教授
 研究者番号：40143979

研究成果の概要（和文）：

若年性骨髄単球性白血病（JMML）患者の cultured CD34 陽性細胞に山中 4 因子を導入し、マウス胎児線維芽細胞上で培養した。2-3 週後、CD34 陰性で RAS 変異を持つ細胞集塊が多数形成された。これらの細胞は iPS 細胞に compatible であった。マウスストローマ細胞上で、サイトカインと培養したところ、骨髄系細胞と CD34 陽性細胞が産生された。JMML の発症機構や白血病性幹細胞の特性を明らかにしていきたい。

研究成果の概要（英文）：

The cultured CD34-positive cells of juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) patient were transfected the Yamanaka 4 genes, and cultured on mouse embryonic fibroblasts. Two-3 weeks later, many cell clusters with the RAS mutation were formed and negative for CD34. These cells were compatible with induced pluripotent (iPS) stem cells. We succeeded the establishment of iPS cells with myeloid differentiation potential from the cultured JMML CD34-positive cells. We are going to elucidate pathogenesis of JMML and properties of the leukemic stem cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2010 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	1,7810,000

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

1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群（MDS）は、造血幹細胞の異常に起因する代表的な小児科領域の難治性血液疾患である。小児の MDS の中で、若年性骨髄単球性白血病（JMML）は最も多い病型で、乳幼児期に好発する。放射線照射 severe combined immunodeficient (SCID) マウスへの JMML 細胞の移植実験から、CD34 陽性 CD38 陰性細胞分画が白血病発症に関与

すると報告されている（Lapidot et al, Blood, 88:2655, 1996）。本症の特徴は顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）に対する高感受性で、NF1、RAS、PTPN11 等の遺伝子異常が恒常的に GM-CSF 受容体-RAS/MAPK シグナルの活性化を引き起こした結果と考えられている。唯一の根治療法は造血幹細胞移植であるが、約 30-60%に達する移植後再発により 2-5 年の無病生存率

は約 25-50%にとどまっております、白血病性幹細胞を標的とした新たな治療法の開発が望まれる。

JMML における白血病性幹細胞を詳細に解析するには、患者から樹立した株化細胞が有用であるが、白血病性幹細胞自身の分化能のために未だ樹立されていない。JMML 細胞を non-obese diabetic/SCID / γc^{null1} (NOG) マウスへ移植することにより、生着は得られるが、解析に十分量の CD34 陽性 CD38 陰性細胞を得ることは困難である (Nakamura et al, Br J Haematol 130, 51, 2005)。そこで、JMML 患者から iPS 細胞が樹立できれば、CD34 陽性 CD38 陰性の白血病性幹細胞が無限に増殖することが期待され、詳細な病態解析に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

JMML 患者から iPS 細胞を樹立し、白血病の発症機構や白血病性幹細胞の特性を明らかにするため、RAS あるいは *PTPN11* 遺伝子異常を持つ JMML 患者細胞から iPS 細胞を樹立する。これらの iPS 細胞を用いて、遺伝子異常の種類と JMML の発症および進展との関連や本症の白血病性幹細胞の特性を明らかにする。

3. 研究の方法

患者の皮膚線維芽細胞や CD34 陽性細胞等から iPS 細胞を樹立し、iPS 細胞から産生される血球系細胞、コロニー形成能や移植後のマウスにおける白血病発症を検討する。また、CD34 陽性 CD38 陰性白血病性幹細胞の特性を明らかにする。

4. 研究成果

Wellcome Trust Sanger Institute (UK) より供与された OCT3/4、SOX2、c-MYC、KLF4、green fluorescent protein (GFP) の cDNA を含むトランスポゾン-プラスミドを用いて末梢血単核球に transfection を試みたが、導入効率は 17-18%と低値であった。高い導入効率を得るにはレトロウイルスベクターがよいが、細胞核内の染色体に積極的に入り込んだり、あるいは染色体 DNA と遺伝的組換えを起こす恐れがあり、さらに、挿入近傍のがん遺伝子が活性化される可能性もある。このため、細胞核の中に入らず、細胞質内で自らのゲノムを複製して大量のタンパク質を作り出すセンダイウイルスベクターを用いて transfection を試みた。*RAS* 遺伝子変異を有する JMML 患者の cultured CD34 陽性細胞に 4 遺伝子を transfect し、放射線照射マウス胎児線維芽細胞を feeder 細胞として、20% knockout serum replacement と 5 ng/ml basic fibroblast growth factor を含む human ES medium で培養した。2-3 週後、CD34 陰性で

PTPN11 遺伝子変異が陽性の細胞集塊が多数形成された。これらの細胞は OCT3、NANOG の CpG 部位がほとんど unmethylated であった。ES 細胞に特徴的な分子とされる NANOG、GDF3、DPPA4 の発現が認められた。また、明らかなテロメラーゼ活性を示したことから、iPS 細胞に compatible と考えられた。AGM-S3 細胞上で、day 0-4 までは BMP4 40ng/ml、day 4-6 は SCF 50ng/ml、VEGF 40ng/ml 内で培養し、day 6 以降は SCF 50ng/ml、TPO 10ng/ml、GM-CSF 10 ng/ml で培養した。Day 20 に産生された培養細胞を flow cytometry で解析したところ、86%の細胞が CD45 陽性で、70%の細胞は CD45 陽性 CD14 陽性で骨髄系抗原を発現していた (図 1)。CD34 陽性細胞はほとんど認められなかった。一方、SCF+TPO 上では CD45 陽性細胞は約 20%にとどまったが、約 7%の細胞は CD34 陽性であった (図2)。また、SCF+TPO+GM-CSF により産生された細胞の中に、顆粒球-マクロファージ系前駆細胞や赤芽球系前駆細胞が含まれていた。現在、症例数を増やして実験を進めている。

図 1

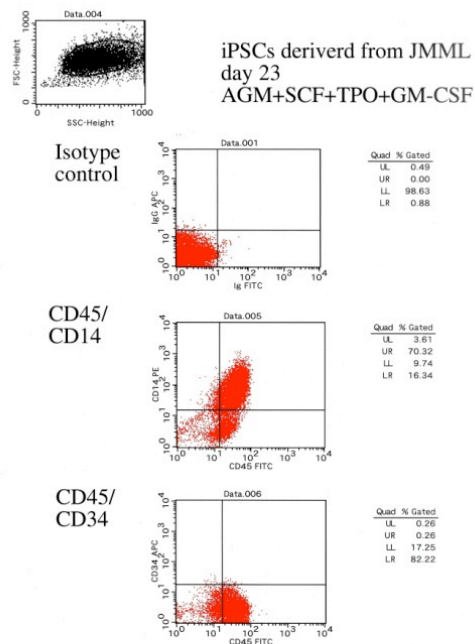
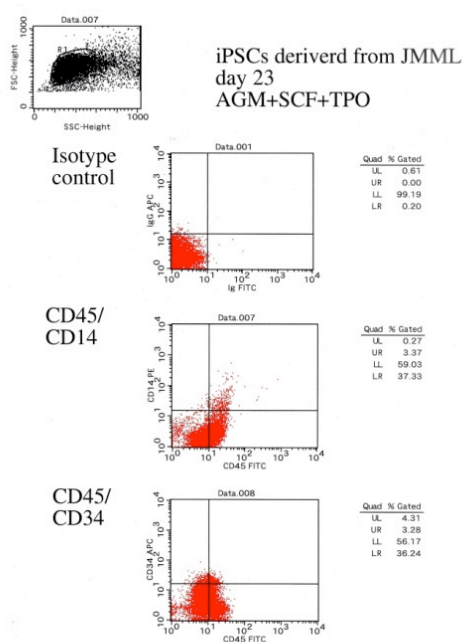


図2



CD34陽性細胞が増殖できる培養システムの確立も同時に進めた。9例のJMML (PTPN11, 5例; RAS, 4例) の末梢血を用いて、CD34⁺細胞を分離後、SCF+TPOを含むAGM-S3マウスストローマ細胞と共培養を行った。全例においてCD34⁺細胞が増殖し、14日目における増幅率は 22.5 ± 9.9 (9.5~42.6)倍であった (PTPN11群, 17.8 ± 7.6 倍; RAS群, 28.3 ± 10.1 倍, $p=0.117$)。増幅されたCD34⁺細胞の90%以上はCD38陰性であり、GM-CSF receptor (CD116) およびc-kit (CD117) が陽性であった。このday 14 CD34⁺CD38⁻細胞は冷凍保存が可能であった。現在、NOGマウスの移植実験を行なっている。

JMML患者からのiPS細胞を作成する上で重要な点は生下時に異常細胞が存在するか否かである。これを検討するため、PTPN11遺伝子あるいはRAS遺伝子変異を有するJMML 13例において、遺伝子変異を指標にロック核酸を用いたreal-time PCR法の確立し、検討した。全例で変異DNAの定量が可能で、検出限界は診断時の 10^{-2} から 10^{-4} であった。ガスリー血が入手できたJMML 7例すべてから、診断時変異DNA量の 3×10^{-3} から 6.5×10^{-1} の腫瘍量が検出され、本症の一部は胎児期発症である可能性が考えられた。7例中5例の変異DNA量は 1×10^{-1} 以上であったことから、これらの症例は生下時すでにsubclinical statusに達していたと推定された (Matsuda, Koike, et al., Br J Haematol, 2009)。

NRAS, KRAS, PTPN11 遺伝子が野生型であり、

神経線維腫症 I 型の臨床像を示さなかった12名のJMML患者において、CBL変異のスクリーニングを行ったところ、4名に変異が認められた。このうち、2例は、6-MPなどのnon-intensive化学療法のみで、15年~28年間血液学的改善が得られている。即ち、CBL変異を持つJMML患者の予後が必ずしも不良ではないことが明らかにした (Matsuda, Koike, et al., Blood, 2010)。また、JMML患者ではTP53変異を認めず、病態には深く関与していないこと等を明らかにした (Saito, Koike, et al., Leukemia Res, 2011)。さらに、JMMLの造血幹細胞移植後のminimal residual diseaseは免疫抑制薬の早期の減量・中止により血液学的寛解が得られることを報告した (Yanagisawa, Koike, et al., Pediatr Blood Cancer, 2011)。

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 19 件)

- ①Matsuda K, Yoshida N, Miura S, Nakazawa Y, Sakashita K, Hyakuna N, Saito M, Kato F, Ogawa A, Watanabe A, Sotomatsu M, Kobayashi C, Ito T, Ishida F, Manabe A, Kojima S, Koike K. Long-term haematological improvement after non-intensive or no chemotherapy in juvenile myelomonocytic leukaemia and poor correlation with adult myelodysplasia spliceosome-related mutations. Br J Haematol. 2012 157:647-50. doi: 10.1111/j.1365-2141 査読あり
- ②Al-Kzayer LF, Sakashita K, Matsuda K, Al-Hadad SA, Al-Jadiry MF, Abed WM, Abdulkadhim JM, Al-Shujairi TA, Hasan JG, Al-Abdullah HM, Al-Ani MH, Saber PA, Inoshita T, Kamata M, Koike K. Genetic evaluation of childhood acute lymphoblastic leukemia in Iraq using FTA cards. Pediatr Blood Cancer. 2012 doi: 10.1002/pbc.24055 査読あり
- ③Hirabayashi K, Shiohara M, Suzuki T, Saito S, Tanaka M, Yanagisawa R, Tsuruta G, Fukuyama T, Hidaka Y, Nakazawa Y, Shimizu T, Sakashita K, Koike K. Critical illness polyneuropathy and myopathy caused by bacillus cereus sepsis in acute lymphoblastic leukemia. J Pediatr Hematol Oncol. 2012 34:e110-3. 査読あり
- ④Higuchi K, Nakazawa Y, Sakata N, Takizawa M, Ohso K, Tanaka M, Yanagisawa R, Koike K. Telecommunication system for children undergoing stem cell transplantation. Pediatr Int., in press. 査読あり
- ⑤Saito S, Matsuda K, Taira C, Sano K, Tanaka-Yanagisawa M, Yanagisawa R, Nakazawa Y, Sakashita K, Shiohara M, Koike K. Genetic analysis of TP53 in childhood

myelodysplastic syndrome and juvenile myelomonocytic leukemia. *Leuk Res.*, 2011 35:1578-84. 査読あり

⑥Hirabayashi K, Shiohara M, Takahashi D, Saito S, Tanaka M, Yanagisawa R, Sakashita K, Nakamura T, Ishii E, Koike K. Retrospective analysis of risk factors for development of liver dysfunction in transient leukemia of Down syndrome. *Leuk Lymphoma*. 2011 52:1523-7. 査読あり

⑦Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsuiki N, Takagi M, Matsuda K, Muramatsu H, Doisaki S, Nagasawa M, Morio T, Kasahara Y, Koike K, Kojima S, Takao A, Mizutani. Autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease with somatic KRAS mutation. *Blood*, 2011 117: 2887-90 査読あり

⑧Yanagisawa R, Katsuyama Y, Shigemura T, Saito S, Tanaka M, Nakazawa Y, Sakashita K, Shiohara M, Koike K. Engraftment syndrome, but not acute graft-versus-host disease, younger age, CYP3A5 or MDR1 polymorphisms, increases tacrolimus clearance in pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 2011 46, 90-97. 査読あり

⑨Yanagisawa R, Matsuda K, Sakashita K, Nakazawa Y, Tanaka M, Saito S, Yoshikawa K, Kamijo T, Shiohara M, Koike K. Disappearance of minimal residual disease after the early withdrawal of immunosuppressants in a patient with juvenile myelomonocytic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2011 56:501-2 doi:10.1002/pbc 査読あり

⑩Motoki N, Shimizu T, Akazawa Y, Saito S, Tanaka M, Yanagisawa R, Motoki H, Nakazawa Y, Sakashita K, Iwasaki Y, Shiohara M, Koike K. Increased pretransplant QT dispersion as a risk factor for the development of cardiac complications during and after preparative conditioning for pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Transplant*. 2010 14:986-92.doi:10.1111/j 査読あり

⑪Matsuda K, Taira C, Sakashita K, Saito S, Tanaka-Yanagisawa M, Yanagisawa R, Nakazawa Y, Shiohara M, Fukushima K, Oda M, Honda T, Nakahata T, Koike K. Long-term survival after non-intensive chemotherapy in some juvenile myelomonocytic leukemia patients with *CBL* mutations, and the possible presence of normal individuals with the mutations. *Blood*. 2010 115:5429-31. 査読あり

⑫Konno 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 95:1293-9. 査読あり

⑬Hirabayashi K, Shiohara M, Saito S, Tanaka M, Yanagisawa R, Tsuruta G, Fukuyama T, Hidaka Y, Nakazawa Y, Shimizu T, Sakashita K, Koike K. Polymyxin-direct hemoperfusion for sepsis-induced multiple organ failure. *Pediatr Blood Cancer*. 2010 ;55:202-5. 査読あり

⑭Matsuda K, Sakashita K, Taira C, Tanaka-Yanagisawa M, Yanagisawa R, Shiohara M, Kanegane H, Hasegawa D, Kawasaki K, Endo M, Yajima S, Sasaki S, Kato K, Koike K, Kikuchi A, Ogawa A, Watanabe A, Sotomatsu M, Nonoyama S, Koike K. Quantitative assessment of PTPN11 or RAS mutations at the neonatal period and during the clinical course in patients with juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2009 141: 567-75. 査読あり

⑮Shiohara M, Shigemura T, Saito S, Tanaka M, Yanagisawa R, Sakashita K, Asada H, Ishii E, Koike K, Chin M, Kobayashi M, Koike K. *Ela2* mutations and clinical manifestations in familial congenital neutropenia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2009 31:319-24. 査読あり

⑯Matsuda K, Tanaka M, Araki S, Yanagisawa R, Yamauchi K, Koike K. Cryptic insertion into 11q23 of MLLT10 on 10p12 not involved in t(1;15;11;10)(p36;q11;q23;q24) generated MLL/MLLT10 fusion transcript in infant acute biphenotypic leukemia: application of genomic MLL rearrangement to quantification of minimal residual disease. *Cancer Genet Cytogenet.*, 2009 190:113-20. 査読あり

⑰Yoshida N, Yagasaki H, Xu Y, Matsuda K, Yoshimi A, Takahashi Y, Hama A, Nishio N, Muramatsu H, Watanabe N, Matsumoto K, Kato K, Ueyama J, Inada H, Goto H, Yabe M, Kudo K, Mimaya J, Kikuchi A, Manabe A, Koike K, Kojima S. Correlation of clinical features with the mutational status of GM-CSF signaling pathway-related genes in juvenile myelomonocytic leukemia. *Pediatr Res*. 2009 65:334-40. 査読あり

⑱Yanagisawa R, Nakazawa Y, Sakashita K, Tanaka M, Shikama N, Kamijo T, Shiohara M, Koike K. Low toxicity of a conditioning with 8-Gy total body irradiation, fludarabine and cyclophosphamide as preparative regimen for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric hematological malignancies. *Pediatric Transplantation*, 2009 13:737-45. 査読あり

⑲Nakazawa Y, Suzuki T, Fukuyama T, Katsuyama Y, Tanaka M, Yanagisawa R, Sakashita K, Shiohara M, Koike K. Urinary

excretion of ganciclovir contributes to improvement of adenovirus-associated hemorrhagic cystitis after allogeneic bone marrow transplantation. *Pediatric Transplantation*, 2009 13:632-5. 査読あり

〔学会発表〕(計 8 件)

- ①重村倫成、中沢洋三、松田和之、小池健一 トランスポゾンを用いた慢性肉芽腫症に対する新たな遺伝子治療法の開発、第 115 回日本小児科学会学術集会、2012 年 4 月 20～22 日、福岡
- ②小池健一 チェルノブイリ原発事故と福島第一原発事故-人体への影響-、第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会、2011 年 11 月 25～27 日、前橋
- ③柳沢俊光、小池健一他 T 細胞性悪性リンパ腫再発に対してネフラビント臍帯血移植を併用した 1 例、第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会、2011 年 11 月 25～27 日、前橋
- ④重村倫成、中沢洋三、小池健一他 PiggyBac トランスポゾン法を用いて遺伝子修復した X 連鎖慢性肉芽腫症患者 T 細胞からの iPS 細胞の樹立、第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会、2011 年 11 月 25～27 日、前橋
- ⑤Al Kzayer, Sakashita K, Koike K, et al. FTA cards for genetic evaluation of childhood ALL in Iraq, 第 73 回日本血液学会学術集会、2011 年 10 月 14～16 日、名古屋
- ⑥Sakashita K, Koike K, et al. 小児同種造血幹細胞移植後再発の予後に関する検討、第 73 回日本血液学会学術集会、2011 年 10 月 14～16 日、名古屋
- ⑦小池健一、松田和之 若年性骨髄単球性白血病の遺伝子異常と MRD 検索、第 51 回日本小児血液学会総会、2009 年 11 月 27～29 日、東京
- ⑧松田和之、小池健一他 遺伝子変異特異的定量 PCR 法を用いた若年性骨髄単球性白血病の発症時期の検討、第 71 回日本血液学会学術集会、2009 年 10 月 23～25 日、京都

〔図書〕(計 2 件)

- ①小池健一、ほか 科学評論社、血液・腫瘍科、若年性慢性骨髄単球性白血病の分子病態解明の進歩、2010、61：184-190
- ②小池健一、松崎聡、松田和之 医薬ジャーナル社、標本に学ぶ血液疾患症例、2 種類の染色体異常を認めた若年性慢性単球性白血病 - juvenile myelomonocytic leukemia(JMML) の 1 例、178-184、2012

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池 健一 (KOIKE KENICHI)
信州大学・医学部・教授
研究者番号：40143979

(2) 研究分担者

塩原 正明 (SHIOHARA MASAOKI)
信州大学・医学部・准教授
研究者番号：00293514

(3) 連携研究者

坂下 一夫 (SAKASHITA KAZUO)
信州大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：10345746