

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5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591224

研究課題名（和文）白血病幹細胞化における細胞分化段階と遺伝子異常の関係

研究課題名（英文）Genetic abnormality require their specific differentiation stage in leukemogenesis

研究代表者

松下 弘道 (MATSUSHITA HIROMICHI)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：50286481

研究成果の概要（和文）：

本研究では、急性骨髄性白血病（AML）から同定された2種類の遺伝子異常、細胞増殖を促進する class I 異常と分化抑制に作用する class II 異常を導入したヒト臍帯血由来造血細胞を超免疫不全マウスに移植し、白血病を発症するか検討した。class I 異常として *FLT3-ITD* を、class II 異常として *PML-RARA* を用いた場合には、*FLT3-ITD* の共存の有無に関わらず、表現系としても遺伝子発現の面でもヒト急性前骨髄球性白血病（APL）に極めて近い白血病を発症した。本モデルは APL 発症機構の解析に有用と考えられた。

研究成果の概要（英文）：

This study aimed to see whether human hematopoietic cells harboring these genetic abnormalities cause AML in immunodeficient mice. When *FLT3-ITD* as a class I mutation and *PML-RARA* mutant as a class II mutation were applied, leukemia occurred regardless of co-transduction of *FLT3-ITD*. The leukemia recapitulated human acute promyelocytic leukemia phenotypically and genetically, suggesting this is a good in vivo model for analyzing APL pathogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011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：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 - 血液内科学

キーワード：急性骨髄性白血病、class I 異常、class II 異常、ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞、NOG マウス

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病（acute myeloid leukemia: AML）は、未熟な骨髄芽球が自律性に増殖する腫瘍性疾患である。これまでに

同定されてきた遺伝子異常は、細胞増殖・不死化を促進する異常（class I 異常）と細胞分化を抑制する異常（class II 異常）の2つに分類され、AML 発症に重要であることが *in*

vitro および *in vivo* で明らかにされてきた。

近年開発された超重症免疫不全マウスである NOG (NOD/Shi-scid,IL-2R γ KO) マウスは、T 細胞、B 細胞、NK 細胞の欠損に加え樹状細胞や補体活性も極めて低く、ヒト由来細胞を移植してヒト化 *in vivo* モデルを作製することが容易である。これまでにヒト腫瘍細胞を NOG マウスに移植することにより、未熟な“腫瘍幹細胞”が腫瘍組織を維持することが明らかとされてきた。しかし正常細胞が腫瘍幹細胞化するプロセスを解析するためには、正常細胞に腫瘍化に重要な遺伝子を導入して経時的に追跡する必要がある。

2. 研究の目的

本研究は、class I 異常および class II の遺伝子異常をヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞に遺伝子導入して NOG マウスに移植することにより、AML を発症するか、どの分画の細胞が標的となるのか、どの分画が腫瘍幹細胞として腫瘍の維持に働くのか、AML の発症に必要な付加的遺伝子異常は何か、について検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト臍帯血CD34 陽性細胞への各遺伝子導入システムの確立

class I 異常は mOrange を発現するレトロウイルスベクター pMY-IRES-mOrange へ、class II 異常は EGFP を発現するレトロウイルスベクター MIGR1 へ挿入して各発現ベクターを作製した。ウイルス液は packaging cell line Plat-gp 細胞 (東京大学医科学研究所 北村俊雄教授より供与) を用いて作製し、ウイルス液を用いてヒト臍帯血 CD34 陽性細胞に遺伝子導入した。

(2) *in vivo* AML発症システムの確立

遺伝子異常を導入されたヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を、半致死量の放射線を照射した NOG マウスの静脈内に注入した。経時的に末梢血または骨髄を採取し、フローサイトメトリーによりキメリズムの状況を確認した。白血病発症が疑われた場合には、末梢血および骨髄血を採取し、RT-PCR による導入遺伝子の発現の確認、サイトスピン標本の観察、細胞表面マーカー検索を行った。

(3) 白血病発症・維持に関与する細胞分画の同定

ヒト CD34 陽性細胞を、CD34+/CD38-、CD34+/CD38+、CD34-/CD33+/CD38+ の 3 つに分けて遺伝子導入を行い、NOG マウスに移植した。CD34+/CD38+ については、さらに CMP、GMP、MEP の 3 つの分画に分けて同様の検討を行った。

(4) AML発症時の付加的遺伝子異常・遺伝子発現の変化

Microarray は、sorting により回収した白血病細胞から total RNA を抽出して行った。付加的遺伝子異常については、遺伝子導入前の CD34 陽性細胞および発症した白血病細胞から DNA を抽出し、SNP array を用いた遺伝子変異解析 (copy number alteration: CNA) および Exome 解析を行った。

4. 研究成果

本研究では、class I として *FLT3*-ITD を、class II として急性前骨髄球性白血病 (APL) に特異的な *PML-RARA* および AML の約 30% に認められる *NPM* mutant を用いた。

(1) ヒト臍帯血CD34 陽性細胞への各遺伝子導入システムの確立

PML-RARA 遺伝子をヒト臍帯血 CD34 陽性細胞に遺伝子導入し *in vitro* で培養したと

ころ、微細なアズール顆粒を有する骨髓芽球様の形態を呈した。これらの細胞におけるPMLの核内分布は微細顆粒状であったが、ATRA投与により斑状分布を呈した。colony assayを行ったところ、colony形成の抑制とCFU-GMの相対的な増加を認めた。

(2) in vivo AML発症システムの確立

PML-RARA遺伝子を導入したヒト臍帯血CD34陽性細胞を、半致死量の放射線照射を受けたNOGマウスの尾静脈より移植したところ、約66%のマウスで1-4か月後に生着が確認された。これらの細胞はAPL細胞様の形態を呈しており、細胞表面マーカー解析ではCD13+/CD33+/CD34+/CD117+/HLA-DR-であった。その生着率はFLT3-ITD遺伝子異常の有無で差がなかった。単離した白血病細胞をATRA存在下で培養したところ、成熟好中球への分化が誘導された。また、発症したAPLマウスにATRAを腹腔内投与したところ、一過性の分化誘導を認めた。以上から、このマウスモデルはヒトAPLを模倣していると考えられた。

なお、NPM mutantを遺伝子導入したヒト臍帯血CD34陽性細胞は、FLT3-ITD遺伝子異常の有無に関わらず、生着を認めなかった。

(3) 白血病発症・維持に関与する細胞分画の同定

PML-RARAキメラ遺伝子の導入細胞をCD34+/CD38-、CD34+/CD38+、CD34-/CD33+の3つの分画に分けてしたところ、CD34+/CD38+で効率的に白血病が発症した。さらに詳細に分画したところ、CMPを用いた場合に最も効率的であった。また、本モデルから得られるAPL細胞はCD34であり、2次移植における生着にCD34の発現は必ずしも必須ではないと考えられた。

(4) AML発症時の付加的遺伝子異常・遺伝子発現の変化

本モデルで発症したAPLの遺伝子発現は、臨床検体と同様のプロファイルを呈することから、本モデルが遺伝子レベルにおいてヒトAPLに類似することが明らかになった。CNA解析およびExome解析からはいくつかの異常が検出されたが、症例数が少ないため症例数の蓄積が必要であると考えられた。

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27件)

1. Matsushita H, Nakamura N, Tanaka Y, Ohgiya D, Tanaka Y, Damdinsuren A, Asai S, Yabe M, Kawada H, Ogawa Y, Ando K, Miyachi H. Clinical and pathological features of B-cell non-Hodgkin lymphomas lacking the surface expression of immunoglobulin light chains. Clin Chem Lab Med, 査読有, *in press*
2. Asai S, Okami K, Nakamura N, Shiraishi S, Yamashita T, Anar D, Matsushita H, Miyachi H. Sonographic appearance of the submandibular glands in patients with immunoglobulin G4-related disease. J Ultrasound Med, 査読有, Vol. 31, No.3, 2012, pp.489-493
3. 坂入和豊, 松下弘道. 末梢血液像—この細胞をどう読むか? ⑪. Medical Technology, 査読無, Vol.40, No.3, 2012, pp.294-298
4. 峯尾和美, 松下弘道. 末梢血液像—この細胞をどう読むか? ⑫. Medical Technology, 査読無, Vol.40, No.4, 2012, pp.392-395
5. Matsushita H, Gondo K, Tanaka Y, Miyachi H. "Triage" of lymphoid malignancies in the peripheral blood using the Extended Immunofluorescent Application of the CELL-DYN Sapphire automated hematology analyzer. Clin Chem Lab Med, 査読有, Vol.49, No.5, 2011, pp.933-935

6. Muguruma Y, **Matsushita H**, Yahata T, Yumino S, Tanaka Y, Miyachi H, Ogawa Y, Kawada H, Ito M, **Ando K**. Establishment of xenograft model of human myelodysplastic syndromes. *Haematologica*, 査読有, Vol.96, No.4, 2011, pp.543-551
7. 飯田順子、田中由美子、**松下弘道**、宮地 勇人. 血液像自動分類システム CellaVisionDM96 における悪性リンパ腫細胞の検出性能の評価. *日本検査血液学会雑誌*, 査読有, Vol.12, No.3, 2011, pp.339-345.
8. 権藤和美, 田中由美子, 廣田日出子, 田中雄三, **松下弘道**, 宮地勇人. 全自動血液分析装置セルデザインサファイアFCS機能による末梢血のリンパ系腫瘍細胞の検出. *日検血会誌*, 査読有, Vol.12, No.1, 2011, pp.44-51
9. **松下弘道**, 浅井さとみ, 宮地勇人ら (5人中1番目). 造血器腫瘍の新WHO分類と血液総合診断. *臨床病理*, 査読無, Vol.59, No.1, 2011, pp.65-74
10. 浅井さとみ, **松下弘道**, 宮地勇人. 悪性リンパ腫の診断プロセスにおける超音波検査の有用性. *臨床病理*, 査読無, Vol.59, No.1, 2011, 89-96
11. 宮地勇人, **松下弘道**, 浅井さとみ. 白血病における抗がん剤耐性の分子機構. *血液内科*, 査読無, Vol.63, No.5, 2011, pp.493-497
12. 田中雄三, **松下弘道**. 末梢血液像—この細胞をどう読むか? ⑤. *Medical Technology*, 査読無, Vol.39, No.9, 2011, pp.926-930
13. 田中雄三, **松下弘道**. 末梢血液像—この細胞をどう読むか? ⑥. *Medical Technology*, 査読無, Vol.39, No.10, 2011, pp.1066-1070
14. 高橋二美子, **松下弘道**. 末梢血液像—この細胞をどう読むか? ⑦. *Medical Technology*, 査読無, Vol.39, No.11, 2011, pp.1196-1199
15. 坂入和豊, **松下弘道**. 末梢血液像—この細胞をどう読むか? ⑧. *Medical Technology*, 査読無, Vol.39, No.12, 2011, pp.1310-1314
16. Asai S, Okami K, Nakamura N, Ogawa Y, Ohta Y, Ogase Y, Jin G, **Matsushita H**, Miyachi H. The tortoiseshell pattern in one or both sides of the submandibular glands in mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma is related to chromosomal aberrations and the disease extent. *J Ultrasound Med*, 査読有, Vol.29, No.1, 2010, pp.111-115
17. 峯尾和美, 田中由美子, 田中雄三, 権藤和美, 川田勉, 佐藤薫, 加藤俊一, **松下弘道**, 矢部みはる, 宮地勇人. 臍帯血バンクの検査から判明した一過性異常骨髄増殖症. *日検血会誌*, 査読有, Vol.11, No.1, 2010, pp.34-38
18. **松下弘道**, 矢部みはる, 宮地勇人. WHO分類第4版における変更点—急性骨髄性白血病を中心に—. *日小血会誌*, 査読無, Vol.24, No.3, 2010, pp.175-181
19. **松下弘道**, 安藤潔. AML幹細胞に対する分子標的療法—基礎研究の進展. *血液・腫瘍科*, 査読無, Vol.61, No.4, 2010, pp.466-472
20. **松下弘道**. 造血器腫瘍のWHO分類 第4版の骨髄性腫瘍領域に関する変更点. *Medical Technology*, 査読無, Vol.38, No.8, 2010, pp.760-766
21. 田中由美子, **松下弘道**. 骨髄検査のすべて—新WHO分類をふまえて 各論3. フローサイトメトリー (flow cytometry: FCM) 検査. *Medical Technology*, 査読無, Vol.38, No.8, 2010, pp.783-790
22. **Matsushita H**, Masukawa A, Arakawa S, Ogawa Y, Asai S, Yabe M, **Ando K**, Miyachi H. Persistence of derivative chromosome 22 after achieving a major molecular response in chronic myeloid leukemia with a cryptic BCR-ABL1 fusion gene. *Int J Hematol*, 査読有, Vol.90, No.5, 2009, pp.623-626
23. **Matsushita H**, Yamamoto M, Tsuboi K, Masukawa A, Arakawa S, Asai S, Ogawa Y, **Ando K**, Miyachi H. A novel aberrant form of e13a2 BCR-ABL1 transcript in chronic myelogenous leukemia undetectable with the standardized real-time quantitative polymerase chain reaction from the Europe Against Cancer Program. *Clin*

Chem Lab Med, 査読有, Vol.47, No.7, 2009, pp.885-887

24. Jin G, **Matsushita H**, Asai S, Tsukamoto H, Ono R, Nosaka T, **Yahata T**, Takahashi S, Miyachi H. FLT3-ITD induces ara-C resistance in myeloid leukemic cells through the repression of the ENT1 expression. Biochem Biophys Res Commun, 査読有, Vol.390, No.3, 2009, pp.1001-1006
 25. **松下弘道**, 矢部みはる, 田中由美子, 宮地 勇人. JPLSG-AML中央形態診断の現状と課題. 日小血会誌, 査読無, Vol.23, No.4, 2009, pp.308-314
 26. **松下弘道**, 宮地 勇人. 検体二次利用の背景と当院での取り組み. 臨床病理, 査読無, Vol.57, No.7, 2009, pp.678-682
 27. 増川敦子, **松下弘道**, 宮地 勇人. 各種遺伝子検査法の特徴 - 核酸増幅法を中心に. 検査と技術, 査読無, Vol.38, No.3, 2009, pp.195-202
- [学会発表] (計 25 件)
1. **松下弘道**, **安藤潔**. 白血病細胞の遺伝子発現検出におけるRNA品質の評価と測定への影響. 第 16 回 造血器腫瘍研究会, 2012年1月29日, 国立がん研究センター研究所 (東京都)
 2. 田中由美子, 田中雄三, 和田典子, 榎藤和美, 丸木佳子, 近藤民章, 浅井さとみ, **松下弘道**, 宮地 勇人. 多項目自動血球分析装置XNシリーズの新機能の性能評価 - 白血球数低値域 (低濃度白血球モード) -. 第 73 回 日本検査医学会学術集会, 2011年11月18日, 岡山コンベンションセンター (岡山県)
 3. 増川敦子, 荒川聡, 蓮沼裕也, 大橋茉耶, **松下弘道**, 浅井さとみ, 宮地 勇人. 白血病細胞の遺伝子発現検出におけるRNA品質の評価と測定への影響. 2011年11月19日, 岡山コンベンションセンター (岡山県)
 4. Ohgiya D, **Matsushita H**, Onizuka M, Nakamura N, Kawada H, Ogawa Y, **Ando K**. Analysis of the biological role of PML in myeloma cells. 第 73 回 日本血液学会学術集会, 2011年10月14日, 名古屋国際会議場 (愛知県)
 5. **Matsushita H**, **Yahata T**, Nakamura Y,

Sheng Y, Muguruma Y, Matsuzawa H, Uno T, Takanashi T, Satou T, Tanaka M, Hayashi H, Miyachi H, **Ando K**. CD34+/CD38+ cells from human cord blood initiate APL by induction of PML-RARA. 第 73 回 日本血液学会学術集会, 2011年10月16日, 名古屋国際会議場 (愛知県)

6. **松下弘道**. 新WHO分類時代の急性骨髄性白血病の形態診断. 第 12 回 日本検査血液学会学術集会, 2011年7月17日, 川崎医療福祉大学 (岡山県)
7. 田中雄三, 田中由美子, 坂入和豊, 三枝光子, 畠中渚, 丸木佳子, 榎藤和美, **松下弘道**, 宮地 勇人. 多項目自動血球分析装置(シスメックス社製・試作機)の基礎的測定性能の評価. 第 12 回 日本検査血液学会学術集会, 2011年7月18日, 川崎医療福祉大学 (岡山県)
8. 飯田順子, 田中由美子, 松本耕一, **松下弘道**, 宮地 勇人. 血液像自動分類装置システム CellaVision DM96 を用いた悪性リンパ腫細胞の検出の検討. 第 12 回 日本検査血液学会学術集会, 2011年7月18日, 川崎医療福祉大学 (岡山県)
9. **松下弘道**, **安藤潔**. *in vivo*モデルを用いたヒト骨髄異形成症候群の解析. 第 15 回 造血器腫瘍研究会, 2011年2月11日, 奈良女子大学 (奈良市)
10. **松下弘道**, 田中雄三, 田中由美子, 浅井さとみ, 宮地 勇人. 当院における免疫グロブリン軽鎖非発現B細胞性リンパ腫. 第 57 回 日本臨床検査医学会学術集会, 2010年9月10日, 京王プラザホテル (東京)
11. 増川敦子, **松下弘道**, 荒川聡, 浅井さとみ, 宮地 勇人. 骨髄増殖性腫瘍における JAK2-V617F 変異検出の測定法の検討. 第 57 回 日本臨床検査医学会学術集会, 2010年9月10日, 京王プラザホテル (東京)
12. 浅井さとみ, **松下弘道**, 宮地 勇人. IgG4 関連疾患における顎下腺の超音波検査所見. 第 57 回 日本臨床検査医学会学術集会, 2010年9月10日, 京王プラザホテル (東京)
13. 坂入和豊, 田中由美子, 榎藤和美, 畠中渚, 國島伸治, **安藤潔**, **松下弘道**, 宮地 勇人. 当院で経験した先天性巨大血小板

- 性血小板減少症の5例. 第11回 日本検査血液学会学術集会, 2010年7月25日, 東京ビッグサイト(東京)
14. 権藤和美、田中由美子、廣田日出子、田中雄三、松下弘道、宮地勇人. 全自動血液分析装置セルダインスファイアFCS機能を用いた末梢血リンパ系腫瘍細胞の細胞表面マーカー自動測定の基礎的検討. 第11回 日本検査血液学会学術集会, 2010年7月24日, 東京ビッグサイト(東京)
 15. 松下弘道、浅井さとみ、矢部みはる、田中由美子、宮地勇人. 造血器腫瘍の新WHO分類と血液総合診断. 第67回 日本臨床検査医学会、関東甲信越支部例会 / 第21回 神奈川県臨床検査医学会, 2010年5月29日, 神奈川県総合医療会館(横浜市)
 16. 浅井さとみ、松下弘道、宮地勇人. 超音波検査による悪性リンパ腫の鑑別. 第67回 日本臨床検査医学会、関東甲信越支部例会 / 第21回 神奈川県臨床検査医学会, 2010年5月29日, 神奈川県総合医療会館(横浜市)
 17. 松下弘道、浅井さとみ、矢部みはる、宮地勇人、増川敦子、荒川聡、小川吉明、安藤潔. Persistence of the der(22) after achieving MMR in CML with cryptic BCR-ABL1 fusion gene. 第71回日本血液学会学術集会. 2009年10月11日, 国立京都国際会館(京都市)
 18. 金貴蘭、松下弘道、浅井さとみ、宮地勇人. 白血病細胞の抗癌剤耐性におけるFLT3/ITDの役割. 第56回 日本臨床検査医学会学術集会, 2009年8月28日, 札幌コンベンションセンター(札幌市)
 19. 松下弘道、田中由美子、宮地勇人. 骨髄異形成症候群in vivoモデルの作製. 第56回 日本臨床検査医学会学術集会, 2009年8月28日, 札幌コンベンションセンター(札幌市)
 20. 浅井さとみ、中村直哉、尾ヶ瀬葉子、金貴蘭、松下弘道、宮地勇人. 頭頸部表在臓器MALTリンパ腫の超音波検査所見の特徴. 第56回 日本臨床検査医学会学術集会, 2009年8月27日, 札幌コンベンションセンター(札幌市)
 21. 山本美紀、増川敦子、荒川聡、大島利夫、松下弘道、宮地勇人. 造血器腫瘍遺伝子検査におけるRNA凍結保存の影響. 第58回 日本医学検査学会, 2009年8月1日, パシフィコ横浜(横浜市)
 22. 飯田順子、島中渚、田中雄三、坂入和豊、田中由美子、松下弘道、宮地勇人、松本耕一. 血液像分析装置CellaVisionDM96の細胞分類能力の検討. 第10回日本検査血液学会学術集会, 2009年7月4日, 山梨大学甲府キャンパス(甲府市)
 23. 荒川聡、増川敦子、山本美紀、田中由美子、大島利夫、浅井さとみ、松下弘道、矢部みはる、宮地勇人. 急性白血病における再発時の染色体核型変化. 第10回日本検査血液学会学術集会, 2009年7月4日, 山梨大学甲府キャンパス(甲府市)
 24. 廣田日出子、田中雄三、峯尾和美、坂入和豊、権藤和美、田中由美子、松下弘道、宮地勇人. 末梢血液像の巨大単球が診断契機となったAML(M2)の1例. 第10回日本検査血液学会学術集会, 2009年7月4日, 山梨大学甲府キャンパス(甲府市)
 25. 松下弘道. 中央形態診断 —病型診断における細胞形態観察の重要性—. 第5回JPLSG研究会, 2009年6月21日, 独立行政法人 名古屋医療センター(名古屋)
- [図書] (計1件)
1. 松下弘道、宮地勇人. 9. 代謝 ④ 乳酸アシドーシス. 大江裕一郎 新海哲 高橋俊二(編) がん救急マニュアル Oncologic Emergency. 2011年4月発行, メジカルビュー社
- ## 6. 研究組織
- (1)研究代表者
- 松下 弘道 (MATSUSHITA HIROMICHI)
 東海大学・医学部・講師
 研究者番号: 50286481
- (2)連携研究者
- 安藤 潔 (ANDO KIYOSHI)
 東海大学・医学部・教授
 研究者番号: 70176014
- 八幡 崇 (YAHATA TAKASHI)
 東海大学・医学部・講師
 研究者番号: 10398753