

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 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21790997

研究課題名（和文） 再発小児白血病におけるサイトカイン発現特異性の解明と早期予知法の開発

研究課題名（英文） Monitoring cytokine expressions prior to relapse in patients with pediatric acute lymphoblastic leukemia

研究代表者

古賀 友紀（KOGA YUHKI）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：60398071

研究成果の概要（和文）：

再発小児白血病におけるサイトカイン発現特異性の解明と再発早期予知法を探索した。再発例、非再発例（予後良好例）の初診時検体を用いた血清サイトカイン発現解析により、再発例は非再発例に比して初診時における炎症性サイトカイン TNF, IL-6 が有意に高値であることが判明した。

また、再発症例では初診時、再発時に炎症性サイトカイン発現が寛解時に比し上昇していた。炎症性サイトカインは初診時における予後予測および病勢を反映していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed the cytokine expression pattern in relapsed childhood leukemia. By serum cytokine expression analysis of relapse and non-relapse cases, we found that inflammatory cytokines TNF, IL-6 in relapse cases are significantly higher than in non-relapse cases.

In relapse cases, inflammatory cytokines was decreased at the time of remission, and increased at the time of relapse. Inflammatory cytokine levels of childhood leukemia at the initial diagnosis may predict their prognosis of leukemia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	1,200,000	360,000	1560,000
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：小児腫瘍

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学（7212）

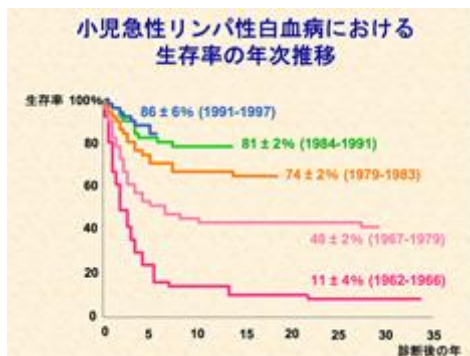
キーワード：小児がん、白血病、分子遺伝学、小児科学

1. 研究開始当初の背景

小児白血病の治療成績の向上は、臨床

および生物学的予後因子の抽出とそれによる治療の層別化によってもたらされた。特に、1990年代の後半以降、小児における急性リンパ性白血病の治療成績は5年無イベント生存率で80%台まで向上した(図)。

しかし、既存のリスク因子(初発時の白血球数、年齢、腫瘍細胞の遺伝子変異、腫瘍細胞の phenotype、初期ステロイド治療反応性)の予後予測力は未だ十分とは言えず、治療不応例や再発例の多くは依然不幸な転帰をとっているのが現状である。さらなる成績の向上のためには、個人の腫瘍の特性に合わせ有効で、かつ安全な治療がなされなければならない、行き詰まった小児白血病の治療率をさらに上昇させるためには、新たな予後予測因子の解明および再発の早期予知による治療法の改良が必要とされる。



2. 研究の目的

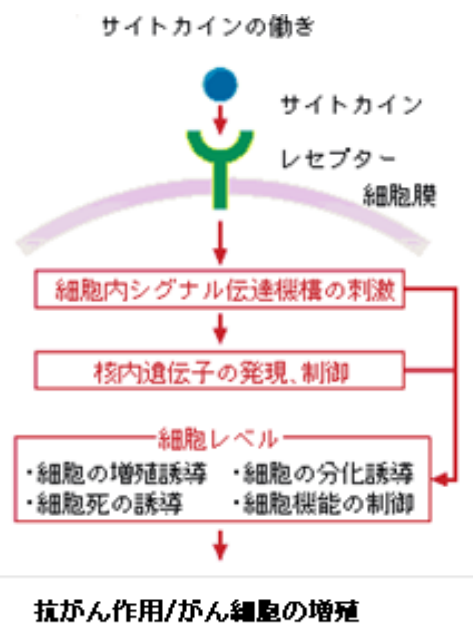
本研究では、小児白血病初発時、患者白血病細胞におけるサイトカイン遺伝子発現パターンおよび血清サイトカイン発現の詳細な解析を通じて再発白血病の特性を明らかにし、発現情報に基づいた再発早期予知法を開発する。

既存のリスク因子による治療層別化の成果は、治療法の開発には十分結び付いておらず、一部の症例では依然として治療成績が不良で予後の改善が得られていないのが現状である。また、治療成績が向上した白血病でも、再発例では根治の困難な病型がある。

このような小児白血病をめぐる現状を抜本的に克服するためには、従来同一と認識されているリスク群の中でもサイトカイン発現による生物学的差異に基づいた病型の新たな鑑別法の確立と治療戦略

の構築が焦点の課題である。

さらに、小児白血病は小児人口10万人に3~4人の割合でしか発症せず、決して common disease とはいえない。希少疾患ともいえる小児白血病予後予測因子スクリーニングシステムを構築し、基礎研究、臨床研究を推進することを目的とする。



サイトカインは免疫担当細胞間の情報伝達をになう物質であり、微量で強い活性を示すのが特徴で、それぞれのサイトカインがネットワークを形成し互いに制御しあっている。担癌患者自身の正常細胞による抗腫瘍作用という観点からは、強力な抗原提示細胞である樹状細胞、およびT細胞や単球・マクロファージ、NK細胞、NKT細胞、好中球などが重要であり、それらは様々な血清サイトカインにより、相互に複雑に関連したネットワークを形作っている。これらのサイトカインのバランスが腫瘍発生もしくは免疫監視機構~抗腫瘍効果に影響を及ぼすことは十分考え得る。

今回の研究では初発時の白血病細胞、正常細胞におけるサイトカイン遺伝子発現パターンを網羅的に解析し、さらに、血清中のサイトカイン蛋白を、特にインターフェロンを中心にしたサイトカインネットワークを解析する。

3. 研究の方法

再発小児白血病におけるサイトカイン発現特異性の解明と早期予知法の開発のために、初診時白血病細胞におけるサイトカイン遺伝子発現を、再発例、予後良好例（再発していない症例）の2群に分けて網羅的に解析する。

小児白血病患児より初発時に採取した骨髓白血病細胞および正常末梢血好中球、単核球、血清を対象とする。網羅的解析法としてフローサイトメトリーを用いたサイトカインFACS法、サイトカイン遺伝子を搭載したcDNA マイクロアレイ法を施行する。

小児 ALL 患者 60 例

血清 : SR 群 30 例 (うち 3 例再発)

HR 群 30 例 (うち 12 例再発)

cDNA : SR 群 11 例 (うち 1 例再発)

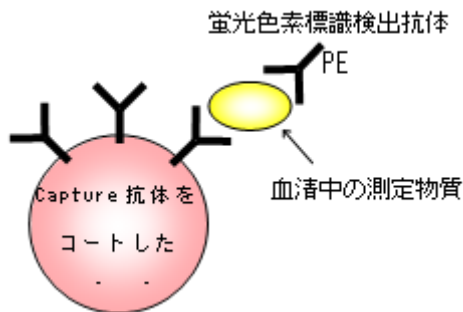
HR 群 19 例 (うち 5 例再発)

サイトカイン FACS 測定項目

IL-8, RANTES, MIG, MCP-1, IP-10, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF, IL-12 計 10 項目

cDNA 遺伝子定量も追加する。

ALL SR と HR 患者における初発時血清中サイトカイン発現の比較。(マンホイットニー)



発現の程度で2群に分け、leukemia free survival を検討 (ログランク検定)。このうち初発時骨髓白血病細胞 cDNA における遺伝子発現解析、サイトカイン発現との関連性解析 (ピアソンの相関解析)。

↓

ALL SR と HR 患者における骨髓白血病細胞 cDNA 遺伝子発現の比較 (マンホイットニー)。

発現の程度で2群に分け、leukemia free survival を検討 (ログランク検定)。さらにマイクロアレイでも遺伝子発現パターンを2群間で比較する。

4. 研究成果

九州大学病院小児科にて加療をうけた小児急性リンパ性白血病患者 60 例 (うち再発 15 例) の初診時血清サイトカイン (IL-8, RANTES, MIG, MCP-1, IP-10, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF, IL-12) を測定した。発現パターンにより高発現群 (high)、低発現群 (low) の2群に分け、ログランク検定により leukemia free survival (LFS) を検討した。MIG (p=0.02)、IL-6 (p=0.04)、TNF (p=0.002) において、それぞれ高発現群のほうが、有意に LFS が低いという結果が得られた。これは preliminary study とも相違ない結果であった。

さらに再発症例において、有意差のあったサイトカインについて初発時、寛解時、再発時のポイントにてこれらのサイトカイン測定施行。寛解時にはこれらサイトカインは正常レベルにまで低下し、再発時には再上昇を示した (p=0.003)。

ALL 初診時血清サイトカイン MIG、IL-6、TNF の3分子の発現の程度で2群に分けた検討において、leukemia free survival に有意差を認めた。しかしながら初発時骨髓におけるこれらの遺伝子発現とは相関はみられなかった。以上の結果より、患者正常細胞 (樹状細胞、T 細胞、単球・マクロファージ、NK 細胞、NKT 細胞) によるサイトカイン発現が予後を規定している可能性が示唆された。

次に小児白血病患児より初発時に採取した骨髓白血病細胞および正常末梢血好中球、単球・マクロファージ、NK 細胞、NKT 細胞、樹状細胞の分離を試み、これら白血病細胞と正常細胞におけるサイトカイン発現パターン解析を試みた。

正常末梢血好中球は初診時末梢血より分離。Polymorphoprep (1.113g/ml) により多核顆粒球浮遊球を採取した。さらに FITC-CD16、Anti-FITCmicrobeads を用いて、CD16 陽性細胞を positive selection。正常末梢血単球は初診時末梢血より分離。LSM で単核球を分離後 FITC-CD14、Anti-FITCmicrobeads を用いて CD14 陽性細胞を positive selection。同様に、NK 細胞は CD3 にて negative selection 後に CD56 陽性細胞を positive selection、NKT 細胞は CD3 にて positive selection 後に CD56 陽性細胞を positive selection することによりそれぞれの細胞を分離。正常末梢血樹状細胞は LSM にて単核球を分離し、Blood Dendritic Cell Isolation Kit を用いてプ

ロトコールに従って DC を分離を試みた (CD3、CD11b、CD16 による negative selection の後 CD4 による positive selection)。

初発時正常細胞検体は細胞数が非常に少なく、RNA の回収が難しく、現時点でマイクロアレイを行うに足りない状況であるが、症例の蓄積により白血病を取り巻くサテライトの細胞における網羅的サイトカイン発現が測定可能となる予定である。

今回の研究により初発時の血清サイトカイン (特に炎症性サイトカイン) を解析することにより、再発を予測できる可能性が示唆され、今後の治療層別化を用いた臨床研究に資するものになると思われる。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

IVIG 講演会, 免疫グロブリン療法
UP - TO - DATE—小児領域

古賀友紀

2010. 11. 6

福岡

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他] (計 0 件)

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古賀 友紀 (KOGA YUHKI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号: 60398071