

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 4 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22591038

研究課題名（和文） 治療関連造血器腫瘍発症の予防を目指した病態および分子機序の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanism of the therapy-related myeloid neoplasms

研究代表者

原田 結花（HARADA YUKA）

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：50379848

研究成果の概要（和文）：

治療関連造血器腫瘍の頻度や遺伝子異常、原因となる薬剤について解析を行い、急性前骨髄球性白血病（APL）治療後の治療関連白血病に RUNX1 変異やキメラ遺伝子が関与することを示した。APL 治療プロトコルに含まれるエトポシドが造血幹細胞に対して MLL や RUNX1 遺伝子のゲノム障害を引き起こす可能性を示唆した。さらに RUNX1 変異が BMI1 と協調して治療関連 MDS/AML 発症に関わることを検証した。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed genetic abnormalities in the patients with therapy-related myeloid neoplasms (t-MN), and found that gene abnormalities of RUNX1 or MLL gene were the most common molecular abnormalities in t-MN after acute promyelocytic leukemia treated with VP16. VP16-treated cells showed rearrangement bands in both RUNX1 and MLL genes, suggesting that it may result in subsequent development of t-MN. Furthermore, we verified that RUNX1 mutant collaborates with BMI1 overexpression in the development of t-MDS/AML.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：治療関連造血器腫瘍、遺伝子異常、急性前骨髄球性白血病、RUNX1、骨髄異形成症候群、MLL、エトポシド、BMI1

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍に対する化学療法・放射線療法の進歩により、原発腫瘍の寛解率・治癒率は飛躍的に向上した。しかし一方で、治療関連の二次癌として急性骨髄性白血病（AML）や骨髄異形成症候群（MDS）が増加しており、特に

悪性リンパ腫や乳癌では非常に高率である。これらの治療関連 AML・MDS は治療抵抗性のことが多く、原発腫瘍の増悪を伴って全身状態が悪化し、急速に不幸な転帰をとることが多い。

2. 研究の目的

今後とも増え続けると予測される治療関連造血器腫瘍に対し、本研究計画では①どれ位の頻度で起きているのか(疫学的実態調査)、②どのような原因で治療関連 AML・MDS が起こるのか(遺伝子異常の検索)、③どのような治療と関連して起こるのか(薬剤量・放射線量の解析)について、治療関連 AML・MDS の後ろ向き調査および原発性腫瘍患者の追跡調査を行って、病態および分子機序を解明する。「腫瘍医」が脚光を浴び、原発腫瘍に対する強力な治療および急性期の対処に注目が集まる一方で、晩発性に発症する二次癌に対する意識は希薄である。本研究計画は、繰り返し悪性腫瘍に苦しむ患者を発生させない、よりの確な医療を目指すものである。

3. 研究の方法

- (1) 治療関連造血器腫瘍患者におけるマスター遺伝子異常の検出およびレトロスペクティブ解析
 - ①患者症例の集積…化学療法や放射線治療により生じたと考えられる AML・MDS 患者を診断し、研究への同意が得られた症例の臨床情報および遺伝子変異解析用のサンプルを収集した。
 - ②MDS および AML 患者の遺伝子変異の検出…患者サンプルから DNA・RNA を抽出して PCR で目的遺伝子を増幅し、変異を同定した。
 - ③原疾患ごとのマスター遺伝子異常の同定…患者臨床情報および遺伝子変異解析結果をデータベース化し、どのようなマスター遺伝子異常を獲得して二次性の AML・MDS を発症したかを解明した。
 - ④原発腫瘍発症時までさかのぼった後方的再評価…臨床検査や骨髄検査・染色体検査の所見を、原疾患診断時から経時的に解析し、治療により生じた変化を同定した。
- (2) 造血器腫瘍患者のプロスペクティブ解析
化学療法や放射線治療を開始する症例で、同意を得た上で観察研究を行った。
 - ①治療前評価および観察研究…治療前にマスター遺伝子異常が存在しないことを確認し、治療の各段階で、血液検査および骨髄検査などを施行し、新たな異常の有無を観察した。
 - ②治療内容の詳細な記録を行った。
- (3) 治療関連 AML・MDS のマスター遺伝子異常獲得の実証
 - ①造血幹細胞に対するゲノム障害実験…ヒト臍帯血から CD34 陽性細胞を分取して増幅し、抗がん剤 VP16 に曝露して一定期間培養した後、DNA を抽出した。
 - ②マスター遺伝子異常と関連した遺伝子異常の検出…MLL 遺伝子、AML1 遺伝子の転座切断点が集積する領域を、inverse PCR 法を用いて増幅してキメラ遺伝子を検出した。

(4) マスター遺伝子異常の白血病原生作用の確認

- ①導入ベクターの構築…RT-PCR で遺伝子変異体の cDNA を作成し、発現ベクター・レトロウイルスベクター pMXs に組み込んだ。
- ②ヒト造血幹細胞への導入および増殖能の検討…臍帯血由来 CD34 陽性細胞にレトロウイルスを感染させて分取し、各種サイトカイン存在下で培養して分化・増殖能、生存率、自己複製能を検討した。
- ③遺伝子プロファイリングの検討…遺伝子異常導入細胞と正常細胞の遺伝子発現の違いをマイクロアレイで解析した。

4. 研究成果

(1) 急性前骨髄球性白血病 (APL) 治療後造血器腫瘍

APL は治療成績が優れており予後良好で治療の期待できる白血病である。しかし近年、APL 治療後の AML・MDS の報告が相次いでいる。そこで APL 全症例の調査を行い、124 例中再発 10 例、治療関連 AML・MDS 11 例を解析した。治療関連 AML・MDS 例の腫瘍細胞は初発や再発 APL のものとは異なり、幼若な造血幹細胞から発生したものであった。遺伝子異常として RUNX1 点突然変異やキメラ遺伝子などが同定され、APL 白血病細胞とは異なる正常あるいは preAPL 造血幹細胞が APL に対する治療により遺伝子異常を獲得して発症していることが示唆された。

(2) エトポシドを用いた造血幹細胞に対するゲノム障害実験解析

ヒト臍帯血から CD34 陽性細胞を分取して増幅し、通常治療に用いる濃度のエトポシドに 1 時間曝露した後、様々な期間培養した。コントロール細胞も同様に培養を行い、曝露 3 時間後および 1-2 週間後に DNA を抽出した。MLL 遺伝子、AML1 遺伝子等の転座切断点が集積する領域を、inverse PCR 法を用いて増幅し、キメラ遺伝子の検出を行った。エトポシド曝露後 3 時間では、多数の再構成バンドが認められたことから、エトポシドにより DNA 切断後、修復機構が働くものかなりの確率で転座が生じていることが明らかになった。しかし 1-2 週間経過すると、再構成バンドは減少することから、クローン性に増殖していくものはまれで、ほとんどが淘汰されることが推測された。その一方で、コントロール細胞では 1-2 週間の培養後に再構成バンドが増加したことから、抗癌剤などの曝露がなくても、サイトカイン存在下で急速に増幅している造血幹細胞は、経過中に遺伝子再構成が起こりやすいことが示唆された。このことは胎児白血病やドナー由来白血病などの原因を考えるうえで重要な所見と考えられた。

(3) 治療関連 MDS/AML を発症させる原因遺伝

子異常 (RUNX1 変異) を導入したヒト造血幹細胞、およびマウス BMT モデルの解析
 RUNX1 の D171N 変異は治療関連 MDS/AML に最も高頻度にみられる変異である。この変異をヒト CD34 陽性細胞に導入すると、自己複製能の亢進、分化抑制、3 血球系の異形成、未分化性が認められるが、増殖能は欠いていた。この細胞では BMI1 が低発現であったが、RUNX1 変異を有する MDS 患者の CD34 陽性細胞では、BMI1 高発現であったことから、両者の協調作用を検討した。D171N 変異と BMI1 の共発現により、ヒト CD34 陽性細胞、マウスモデル共に増殖性の亢進が認められた。また、D171N 変異を導入した CD34 陽性細胞に後から BMI1 を導入すると、高リスク MDS 様の芽球増加を伴う緩やかな細胞増殖が認められた。以上のことから、BMI1 が RUNX1 変異と協調して治療関連 MDS/AML 発症に関与することが示された。

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 31 件)

1. Harada Y, Inoue D, Ding Y, Imagawa J, Doki N, Matsui H, Yahata T, Matsushita H, Ando K, Sashida G, Iwama A, Kitamura T, Harada H: RUNX1/AML1 mutant collaborates with BMI1 overexpression in the development of human and murine myelodysplastic syndromes. *Blood* (in press), 2013.
2. 原田結花, 原田浩徳: MDS に対するメチル化阻害剤による治療の現状と展望. *血液内科* 66(3):316-322, 2013. (査読無・総説)
3. 原田結花, 原田浩徳: 急性前骨髄球性白血病. 特集: 臨床血液学 今後の展望 (2013 年版) —骨髄系疾患—. *臨床血液* 54(1):49-60, 2013. (査読無・総説)
4. Imagawa J, Tanaka H, Matsumoto K, Morita K, Harada Y, Harada H: A sharp fluctuation in peripheral blood cells shortly after dasatinib administration. *Int J Hematol* 96(2):194-199, 2012. (査読有) DOI 10.1007/s12185-012-1138-2
5. Nitta H, Harada Y, Hyodo H, Kimura A, Harada H: Expansion of CD8⁺/perforin⁺ T-cells predicts response to ciclosporin A therapy in patients with erythroid hypoplasia/aplasia. *Br J Haematol* 157(5):641-645, 2012. (査読有) DOI10.1111/j.1365-2141.2012.09057.x
6. Oki T, Harada Y (12 人中 9 番目), Harada H (11 番目), Kitamura T: Aberrant expression of RasGRP1 cooperates with gain-of-function NOTCH1 mutations in T-cell leukemogenesis. *Leukemia* 26(5):1038-1045, 2012. (査読有) DOI 10.1038/leu.2011.328
7. Matsuda A, Harada H (14 人中 3 番目), Ozawa K: Morphologic analysis in myelodysplastic syndromes with del(5q) treated with lenalidomide. A Japanese multiinstitutional study. *Leuk Res* 36(5):575-580, 2012. (査読有) DOI10.1016/j.leukres.2011.11.011
8. Satoh Y, Matsumura I, Harada H (9 人中 4 番目), Harada Y (5 番目), Kanakura Y: C-terminal mutation of RUNX1 attenuates the DNA-damage repair response in hematopoietic stem cells. *Leukemia* 26(2):303-311, 2012. (査読有) DOI 10.1038/leu.2011.202
9. Doki N, Harada Y (16 人中 13 番目), Harada H (15 番目), Kitamura T: Fyn is not essential for Bcr-Abl-induced leukemogenesis in mouse bone marrow transplantation models. *Int J Hematol* 95(2):167-175, 2012. (査読有) DOI 10.1007/s12185-011-0994-5
10. 原田結花, 原田浩徳: RUNX1 異常による AML. 特集: 急性骨髄性白血病: 分子異常と予後. *最新医学* 67(10):2433-2439, 2012. (査読無・総説)
11. 原田結花, 原田浩徳: MDS の分子病態 [特集: MDS をめぐる最近の進歩—治療を目指して]. *血液内科* 65(3):300-307, 2012. (査読無・総説)
12. 北村俊雄, 大河内直子, 井上大地, 戸上勝仁, 内田智之, 鍵山侑希, 川畑公人, 千葉 滋, 原田結花, 原田浩徳, 北浦次郎, 中原史雄: 骨髄異形成症候群 (MDS) と慢性骨髄性白血病 (CML) における白血病移行の分子機構. 第 73 回日本血液学会学術集会シンポジウム 11. *臨床血液* 53(8):734-739, 2012. (査読無・総説)
13. 原田結花, 原田浩徳: MDS における遺伝子変異の臨床的意義 [特集: 造血不全症]. *血液内科* 64(5):551-556, 2012. (査読無・総説)
14. 原田結花, 原田浩徳: 治療関連白血病の病因・病態と治療. 造血器腫瘍学—基礎と臨床の最新研究動向—第 2 版, 金倉讓編. *日本臨牀* 70(suppl 2):699-703, 2012. (査読無・総説)
15. 原田結花, 原田浩徳: 造血器腫瘍における EZH2 変異とその機能的意義 [特集: 造血器腫瘍の新たな分子病態とその臨床的意義]. *血液内科* 64(2):139-144, 2012. (査読無・総説)

16. Harada Y, Harada H: Molecular mechanisms that produce secondary MDS/AML by RUNX1/AML1 point mutations. *J Cell Biochem* 112(2): 425-432, 2011. (査読有) DOI 10.1002/jcb.22974
17. Kato N, Harada Y (13人中11番目), Harada H (12番目), Kitamura T: Two types of C/EBP mutations play distinct but collaborative roles in leukemogenesis: lessons from clinical data and BMT models. *Blood* 117(1): 221-233, 2011. (査読有) DOI 10.1182/blood-2010-02-270181
18. Nitta H, Harada Y, Okikawa Y, Fujii M, Arihiro K, Kimura A, Harada H: Good's syndrome-associated pure red cell aplasia with myelodysplastic syndrome. *Intern Med* 50(18): 2011-2014, 2011. (査読有) DOI 10.2169/internalmedicine.50.5709
19. 原田結花, 原田浩徳: 放射線発がん(骨髄異形成症候群・白血病)の分子病態. 特集「放射線の人体影響～原爆・チェルノブイリの知見とフクシマ～」. *血液フロンティア* 21(12): 1775-1781, 2011. (査読無・総説)
20. 原田結花, 原田浩徳: MPNと遺伝. 特集: 骨髄増殖性腫瘍(MPN)の最新の進歩. *最新医学* 66(11): 2552-2557, 2011. (査読無・総説)
21. 原田浩徳: MDS「分子病態」. 第73回日本血液学会学術集会教育講演特集号. *臨床血液* 52(10): 1525-1534, 2011. (査読無・総説)
22. 原田結花, 原田浩徳: [解説] APL治療後の二次性骨髄性腫瘍とその特徴. *血液内科* 63(3): 382-288, 2011. (査読無・総説)
23. 原田結花, 今川 潤, 原田浩徳: メチル化阻害剤の作用機構. *血液フロンティア* 21(9): 1291-1298, 2011. (査読無・総説)
24. Imagawa J, Harada Y, Shimomura T, Tanaka H, Okikawa Y, Hyodo H, Kimura A, Harada H: Clinical and genetic features of therapy-related myeloid neoplasms after chemotherapy for acute promyelocytic leukemia. *Blood* 116(26): 6018-6022, 2010. (査読有) DOI 10.1182/blood-2010-06-289389
25. Imagawa J, Harada Y, Yoshida T, Sakai A, Sasaki N, Kimura A, Harada H: Giant granulocytic sarcoma of the vagina concurrent with acute myeloid leukemia with t(8;21)(q22;q22) translocation. *Int J Hematol* 92(3), 553-555, 2010. (査読有) DOI 10.1007/s12185-010-0676-8
26. Komeno Y, Harada Y (13人中7番目), Harada H (8番目), Kitamura T: AID-induced T-lymphoma or B-leukemia/lymphoma in a mouse BMT model. *Leukemia* 24(5): 1018-1024, 2010. (査読有) DOI 10.1038/leu.2010.40
27. Nakahara F, Harada Y (14人中8番目), Harada H (9番目), Chiba S: Hes1 immortalizes committed progenitors and plays a role in blast crisis transition in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 115(14): 2872-2881, 2010. (査読有) DOI 10.1182/blood-2009-05-222836
28. 原田結花, 原田浩徳: レナリドミド～骨髄異形成症候群の治療～. *血液フロンティア* 2010年別冊 20(S-1), 1733-1740, 2010. (査読無・総説)
29. 今川 潤, 原田浩徳: DNAメチル化阻害剤～急性骨髄性白血病に対する効果～. *血液フロンティア* 2010年別冊 20(S-1): 1513-1519, 2010. (査読無・総説)
30. 原田結花, 原田浩徳: MDSに対するレナリドミド治療とその感受性因子. *血液・腫瘍科* 61: 690-698, 2010. (査読無・総説)
31. 原田結花, 原田浩徳: 骨髄増殖性腫瘍における白血病移行の分子機構. *血液・腫瘍科* 61: 143-150, 2010. (査読無・総説)
- [学会発表] (計18件)
1. Harada H, Inoue D, Doki N, Ding Y, Harada Y, Kitamura T: RUNX1/AML1 mutants collaborate with BMI1 in the development of myelodysplastic syndromes (MDS) / acute myeloid leukemia (AML) in a mouse BMT model. The 54th ASH Annual Meeting and Exposition, 2012.12.8-11, Atlanta, GA, USA.
 2. Harada H, Inoue D, Ding Y, Imagawa J, Harada Y, Kitamura T: RUNX1/AML1 mutants collaborate with BMI1 in the development of myelodysplastic syndromes. The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, 2012.10.19-21, Kyoto, Japan.
 3. Harada H, Harada Y, Inoue D, Kitamura T: RUNX1/AML1 mutants collaborate with BMI1 in the development of myelodysplastic syndromes. The 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2012.9.19-21, Sapporo, Japan.
 4. Harada H, Harada Y, Inoue D, Kitamura

- T: RUNX1/AML1 mutants collaborate with BMI1 in the development of myelodysplastic syndromes. ISEH 41st Annual Scientific Meeting, 2012. 8. 23-26, Amsterdam, Netherland.
5. 原田浩徳: 放射線関連 MDS・白血病の発症機序における RUNX1/AML1 変異の役割「放射線障害と血液疾患」. 第 52 回日本リンパ網内系学会総会, 2012. 6. 14-16, 福島.
 6. Harada H, Harada Y: Molecular mechanisms of myelodysplastic syndromes by RUNX1/AML1 mutations. The 3rd JSH International Symposium 2012 in Kawagoe, 2012. 5. 26-27, Kawagoe, Japan.
 7. Harada H, Ding Y, Imagawa J, Miyama T, Kimura A, Harada Y: BMI1 Collaborates with RUNX1/AML1 Mutants in the Development of Human Myelodysplastic Syndrome (MDS) / Acute Myeloid Leukemia (AML). The 53rd ASH Annual Meeting, 2011. 12. 10-13, San Diego, CA, USA
 8. 原田浩徳, 丁 曄, 木村昭郎, 原田結花: 造血器腫瘍における RUNX1, MLL キメラ遺伝子発生プロセスの解明. 第 73 回日本血液学会学術集会, 2011. 10. 14-16, 名古屋.
 9. 原田浩徳: 教育講演 MDS「分子病態」. 第 73 回日本血液学会学術集会, 2011. 10. 14-16, 名古屋.
 10. Harada H, Harada Y: Molecular mechanism to produce myeloid neoplasms by RUNX1 or MLL chimeras in human CD34+ cells. The 18th International RUNX Workshop, 2011. 8. 14-17, San Diego, CA, USA.
 11. 原田結花, 木村昭郎, 原田浩徳: 放射線・化学療法関連骨髄系腫瘍の発症に関わる RUNX1/AML1 遺伝子点突然変異. 第 52 回原子爆弾後障害研究会, 2011. 6. 5, 広島.
 12. Imagawa J, Harada Y, Kimura A, Harada H: Clinical and genetic features of therapy-related myeloid neoplasms after chemotherapy for acute promyelocytic leukemia. The 2nd JSH International Symposium, 2011. 4. 23-24, Nagasaki, Japan.
 13. 原田浩徳: 放射線関連 MDS・白血病の発症機序における AML 1 点突然変異の役割. 日本放射線影響学会第 53 回大会, 2010. 10. 20, 京都.
 14. Harada H, Harada Y, Imagawa J, Kimura A: Molecular mechanisms to produce MDS/AML by C-terminal truncated type of AML1/RUNX1 mutations. 第 72 回日本血液学会学術集会, 2010. 9. 26, 横浜.
 15. Sakurai M, Watanabe N, Harada H, Harada Y, Sadahira K, Fukuchi Y, Tsukada Y, Yokoyama K, Okamoto S, Nakajima H: A case of FPD/AML with a novel RUNX1 mutation. 第 72 回日本血液学会学術集会, 2010. 9. 24, 横浜.
 16. Harada H, Harada Y: Molecular mechanism to produce MDS/AML by C-terminal truncated type of AML1/RUNX1 mutations. The 17th international RUNX workshop, 2010. 7. 14, Hiroshima.
 17. 丁 曄, 原田結花, 原田浩徳: 慢性骨髄増殖性腫瘍からの白血病移行メカニズムの解明. 第 6 回麒麟塾, 2010. 6. 5, 東京.
 18. 丁 曄, 原田結花, 今川 潤, 木村昭郎, 原田浩徳: 骨髄増殖性腫瘍からの白血病移行メカニズムの解明. 第 107 回日本内科学会講演会, 2010. 4. 10, 東京.
- 〔図書〕 (計 5 件)
1. Harada H, Harada Y: Molecular mechanisms that produce radiation-induced or therapy-related MDS/AML by RUNX1/AML1 point mutations. A New Challenge of Radiation Health Risk Management. Nakashima M, et al, (Eds.). pp151-160 (276), Nagasaki Newspaper Publish, Nagasaki, 2012.
 2. 原田結花, 原田浩徳: MDS に対する新規治療薬の適応と治療成績. EBM 血液疾患の治療 2012-2013, 金倉 譲, 木崎昌弘, 鈴木律朗, 神田善伸編. pp30-36 (590), 中外医学社, 東京, 2012.
 3. 原田結花, 原田浩徳: DNA メチル化阻害剤の開発と作用機構. 造血器腫瘍とエピジェネティクス—治療への応用と新たな展開—, 木崎昌弘編. pp49-58 (251), 医薬ジャーナル社, 大阪, 2012.
 4. 原田結花, 原田浩徳: 骨髄性白血病の発症機構. 「I 章. 造血システムと腫瘍化」血液専門医テキスト, 日本血液学会編. pp10-14 (556), 南光堂, 東京, 2011.
 5. 原田結花, 原田浩徳: 治療 レナリドミド. 骨髄異形成症候群 (MDS) 診療 up-to-date, 松田 晃編. pp135-151 (183), 中外医学社, 東京, 2011.
6. 研究組織
 (1) 研究代表者
 原田 結花 (HARADA YUKA)
 広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教
 研究者番号: 50379848

(2)研究分担者

原田 浩徳 (HARADA HIRONORI)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・講師

研究者番号：10314775

(3)連携研究者

()

研究者番号：