

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 4 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659193

研究課題名（和文）小児後天性骨髄不全症候群におけるエピジェネティック情報に基づく新規分類の開発

研究課題名（英文）Development of a new classification depend on epigenetic information in pediatric acquired bone marrow failure syndrome

研究代表者

小島 勢二 (Seiji Kojima)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20313992

研究成果の概要（和文）：

再生不良性貧血（AA）と低形成骨髄異形性症候群（MDS）の鑑別、特に AA と refractory cytopenia of childhood (RCC) の鑑別は困難である。我々はレーザーマイクロダイゼクションを用いて、TP53 陽性細胞を切り出したところ、RCC では 9 例中 6 例で TP53 遺伝子変異がみられたが、AA では変異はみられなかった。また 5 例中 2 例の RCC で p16 遺伝子のプロモーター領域の高メチル化がみられたが、AA から MDS に移行がみられた 4 例においては、MDS/AML 移行後に *Evi-1* や *GATA2*、*AML1/RUNX1* の発現の増加はみられ、2 例においては、*AML1/RUNX1* の遺伝子変異が確認された。

研究成果の概要（英文）：

The differential diagnosis between aplastic anemia (AA) and hypoplastic myelodysplastic syndrome (MDS), especially, refractory cytopenia of childhood (RCC) is still difficult. Six of 9 RCC specimens showed the TP53 gene mutation in TP53 positive stained cells cut by lazer microdissection system, however, there is no TP53 mutation in AA specimens. Furthermore, 2 of 5 RCC specimens showed the highly methylated status in the promotor region of p16 gene, but not in AA specimens. Higher expression of *Evi-1*, *GATA-2* and *AML1/RUNX1* were found than those at AA/MDS phase. We also found *AML1/RUNX1* and *N-RAS* mutations occurred in this process.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	0	1,300,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	330,000	2,730,000

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：内科系臨床医学・小児科学

再生不良性貧血、エピジェネティクス、骨髄異形成症候群、パイロシークエンス

1. 研究開始当初の背景

2008 年の新 WHO 分類で、あらたに小児 MDS の病型として、refractory cytopenia of

childhood (RCC) が提唱された。実際、小児造血不全 78 例を新分類にしたがい診断すると、45 例が AA、33 例が RCC と診断されたが、

AA と RCC の鑑別は容易ではない。特に、両疾患の鑑別は、これまで骨髓塗抹標本や生検標本の形態や染色体分析の結果に基づいておこなわれてきたが、専門医の間でもその一致度は高いものではない。両疾患の違いについて、RCC では TP53 染色陽性細胞の増加や、micromegakaryocyte の増加がみられるなどの病理学的情報が得られたが、genetic/epigenetic な違いについては明らかとなっていない。いっぽうでは、AA から MDS/AML への病型移行も知られているが、その分子基盤も明らかではない。

2. 研究の目的

小児 AA と RCC の genetic/epigenetic な相違を検討し、鑑別診断に有用であるか検討する。また、AA から MDS へ病型が移行する症例を早期に発見するに有用な遺伝子を検討する。

3. 研究の方法

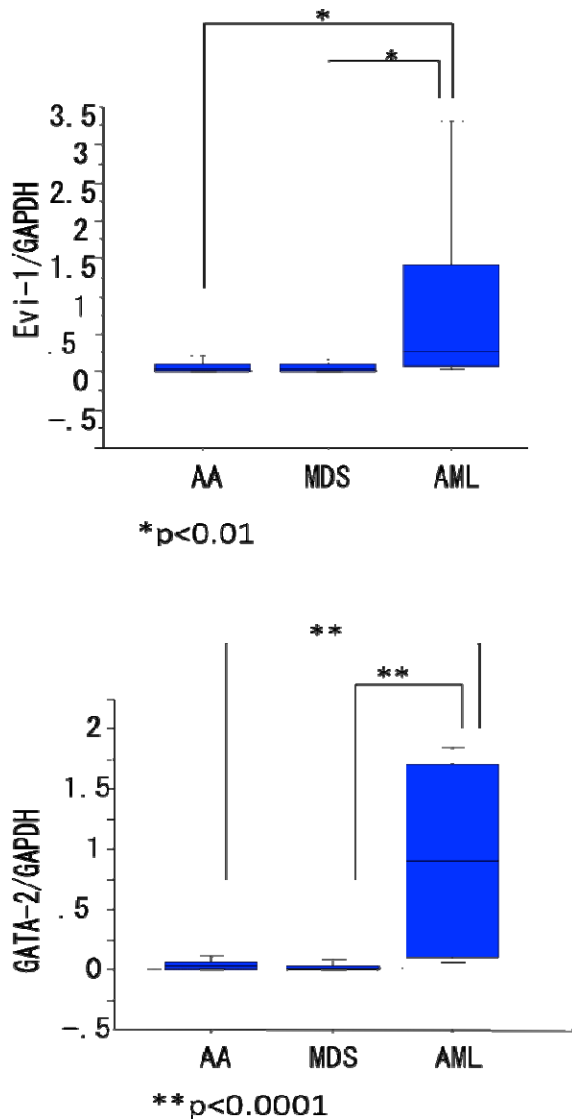
AA、RCC の残余骨髓単核球検体より DNA を抽出し、常法通り TP53 遺伝子について PCR、ダイレクトシーケンスを行った。また骨髓クロット標本を用いて、TP53 の免疫染色を行い、レーザーマイクロダイゼクションシステムにて、TP53 陽性細胞を切り出し、DNA 抽出、PCR、シーケンスを行った。メチル化解析については、抽出した DNA を用いて、p16 と GATA2 のプロモーター領域のメチル化解析を行った。また、AA から MDS に移行がみられた 4 例について、AA および MDS/AML 時期の残余骨髓単核球検体から RNA を抽出し、定量的 PCR 法で *Evi-1*, *GATA-2* and *AML1/RUNX1* の発現を検討した。同時に抽出した DNA 検体を用いて、*Evi-1*, *GATA-2* and *AML1/RUNX1* 遺伝子の変異の有無についても検討をおこなった。なお、本研究の実施については、名古屋大学医学部附属病院の倫理委員会での承認を得ている。

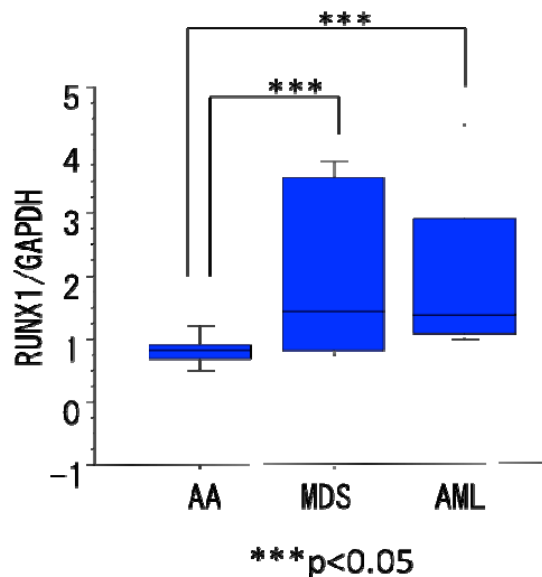
4. 研究成果

TP53 変異について解析を行ったところ、通常の骨髓単核細胞由来 DNA からは RCC、AA ともに変異は検出されなかった。また advanced stage の MDS 症例でも検討したが、従来の報告通り、小児 MDS では TP53 変異はみられなかった。しかしながら、レーザーマイクロダイゼクションを用いて、TP53 陽性細胞を切り出し、解析したところ、RCC では 9 例中 6 例で変異がみられたが、AA では免疫染色で TP53 陽性細胞はみられず、遺伝子変異もみられなかった。今回得られた結果

は AA と RCC の分子病態の違いを示す代表的な変化と考えられ、両疾患の鑑別に有用である。またパイロシーケンス法で p16 遺伝子のプロモーター領域のメチル化異常について検討したところ、5 例中 2 例の RCC で高メチル化がみられたが、AA ではみられなかった。また AA で発現低下のみられる GATA2 遺伝子についてそのプロモーター領域の解析を行ったところ、正常骨髓に比して、AA では高メチル化がみられた。また、AA から MDS に移行がみられた 4 例においては、MDS/AML 移行後に *Evi-1* や *GATA2*、*AML1/RUNX1* の発現の増加はみられ、2 例においては、*AML1/RUNX1* の遺伝子変異が確認された。

(図：再生不良性貧血から骨髓異形成症候群/急性骨髄性白血病への移行前後における転写因子発現の変化)





結論

分子生物学的手法は AA と MDS の鑑別、病型移行の早期発見に有用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 33 件) 全て査読有り

- 1) Kimura H, Takahashi Y (13 人中 5 番目), Kojima S (13 人中 6 番目), et al. Epstein - Barr virus (EBV)-associated T/NK lymphoproliferative diseases in non - immunocompromised hosts : prospective analysis of 108 cases. *Blood*. 2012 ;119(3):673-86.
- 2) Yagasaki H, Kojima S (11 人中 2 番目), et al. Acceptable HLA-mismatching in unrelated donor bone marrow transplantation for patients with acquired severe aplastic anemia. *Blood*. 2011;118(11):3186-3190.
- 3) Kojima S (12 人中 1 番目), et al. The Third Consensus Conference on the treatment of aplastic anemia. *Int J Hematol*. 2011;93(6):832-7.
- 4) Nishio N, Takahashi Y (11 人中 2 番目), Muramatsu H (11 人中 9 番目), Kojima S (11 人中 11 番目), et al. Aberrant phosphorylation of STAT5 by granulocyte -macrophage colony -stimulating factor in infant cytomegalovirus infection mimicking juvenile myelomonocytic leukemia. *Leuk Res*. 2011;35(9):1261-4.
- 5) Kamio T, Muramatsu H (21 人中 11 番目) Kojima S (21 人中 20 番目), et al. Relapse of aplastic anemia in children after immunosuppressive therapy: a report from the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. *Haematologica*. 2011;96(6):814-9.
- 6) Yoshida N, Takahashi Y (12 人中 4 番目), Kojima S (12 人中 12 番目), et al. Predicting response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. *Haematologica*. 2011;96(5):771-4.
- 7) Nishio N, Takahashi Y (9 人中 2 番目), Muramatsu H (9 人中 5 番目), Kojima S (9 人中 9 番目), et al. Reduced-intensity conditioning for alternative donor hematopoietic stem cell transplantation in patients with dyskeratosis congenita. *Pediatr Transplant*. 2011;15(2):161-6.
- 8) Takagi M, Muramatsu H (15 人中 7 番目), Kojima S (15 人中 13 番目), et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease with somatic KRAS mutation. *Blood*. 2011;117(10) : 2887-90.
- 9) Pulsipher MA, Kojima S (17 人中 8 番目), et al. Optimization of Therapy for Severe Aplastic Anemia Based on Clinical, Biological and Treatment Response Parameters: Conclusions of an International Working Group on Severe Aplastic Anemia Convened by the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network, March 2010. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17(3):291-9.
- 10) Nishio N, Kojima S. Recent progress in dyskeratosis congenita. *Int J Hematol*. 2010 ;92(3):419-24.
- 11) Kanazaki R, Kojima S (20 人中 18 番目), et al. Down syndrome and GATA1 mutations in transient abnormal myeloproliferative disorder: mutation classes correlate with progression to myeloid leukemia. *Blood*. 2010 ;116(22):4631-4638.
- 12) Yagasaki H, Takahashi Y (13 人中 2 番目), Muramatsu H (13 人中 6 番目), Kojima S (13 人中 13 番目), et al. Comparison of matched-sibling donor BMT and unrelated donor BMT in children and adolescent with acquired severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant*. 2010 ;45(10):1508-13.

- 13) Konno Y, Kojima S (20 人中 10 番目), et al. Mutations in the ribosomal protein genes in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Haematologica*. 2010 ;95(8):1293-9.
- 14) Villalobos IB, Takahashi Y (11 人中 2 番目), Muramatsu H (11 人中 4 番目), Kojima S (11 人中 11 番目), et al. Relapse of leukemia with loss of mismatched HLA resulting from uniparental disomy after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2010;115(15):3158-61.
- 15) Muramatsu H (14 人中 1 番目), Takahashi Y (14 人中 10 番目), Kojima S (14 人中 13 番目), et al. Mutations of E3 ubiquitin ligase Cbl family members but not TET2 mutations are pathogenic in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2010;115(10):1969-75.

[学会発表] (計 32 件)

- 1) Hama A. Comparison of clinical outcome between children with aplastic anemia and refractory cytopenia of childhood who received immunosuppressive therapy with antithymocyte globulin and cyclosporine. The 53rd ASH Annual Meeting. Dec. 11, 2011. San Diego, USA.
- 2) Muramatsu H. Allogeneic bone marrow transplantation from HLA mismatched family donors in children with aplastic anemia. The 53rd ASH Annual Meeting. Dec. 12, 2011. San Diego, USA.
- 3) Kojima S (招待演者). Advances in Pediatric Leukemia, Bone Marrow Failure and Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Japan: Past, Present and Future. Texas Children's Cancer Center weekly research seminar series. Dec. 9, 2010. Texas Children's Cancer Center (Houston, USA)
- 4) Kojima S (招待演者). Unmanipulated haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. Haploidentical Transplantation-Asia Pacific Meeting Seminar 2010. Sep. 23, 2010. Asan Medical Center (Seoul, Korea)

[図書] (計 5 件)

- 1) 小島勢二、他. 血液専門医テキスト:小児特発性再生不良性貧血. p181-184, 南江堂. 2011.
- 2) 小島勢二、他. 難治性貧血の診療ガイド: 先天性骨髄不全症候群. P195-236, 南江堂. 2011.
- 3) 小澤敬也、小島勢二、他. 最新医学別冊 新しい診断と治療の ABC72 血液 8 再生不良性貧血. 全 28 ページ, 最新医学. 2011

[その他]

ホームページ等
研究結果がまとめ次第掲載予定

6. 研究組織

(1)研究代表者

小島 勢二 (Kojima Seiji)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 20313992

(2)研究分担者

高橋 義行 (Takahashi Yoshiyuki)
名古屋大学・大学院医学系研究科・準教授
研究者番号: 40 432273

村松 秀城 (Muramatsu Hideki)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 00572570

(3)連携研究者 なし ()

研究者番号: