

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591539

研究課題名(和文) 小児急性リンパ性白血病の微小残存病変を用いた白血病幹細胞特性解析の試み

研究課題名(英文) Characteristics of leukemic stem cell activity in minimal residual disease of pediatric acute lymphoblastic leukemia

研究代表者

出口 隆生 (Deguchi, Takao)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70345990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：デキサメサゾン受性急性リンパ性白血病細胞株から耐性株を誘導した。耐性細胞ではBim mRNAやタンパク質発現が低下した。またグルココルチコイド受容体サブユニット(GR α)発現も耐性株では低下した。Bim発現を抑制するmiR-17-92クラスターやGR α 発現を抑制するmiR142-3pは耐性株で発現が上昇した。miR142-3p mimicとinhibitor導入では細胞の増殖や生存への影響を認めなかった。GR α 発現に応じたmimic/inhibitor投与時期の検討や導入効率改善が必要であると考えられた。治療中の新鮮白血病MRD細胞からは十分なmRNA量が得られるよう系の改良を行っている。

研究成果の概要(英文)：Dexamethazone resistant acute lymphoblastic leukemia cell lines were established from sensitive cell lines. Both mRNA and protein expression of Bim showed marked reduction, and the expression of GR α subunit also decreased. Expressions of both miR17-92 cluster which inhibits Bim expression and miR142-3p which inhibits GR α expression indicated remarkable increase. Administration of mimic (agonist) or inhibitor for miR142-3p to the resistant cell lines did not indicate alteration in cell proliferation or survival. It was supposed that adequate time of mimic/inhibitor administration according to GR α expression should be considered, and also efficacy of mimic/inhibitor transfection should be improved. We could not get sufficient mRNA dose from freshly isolated minimal residual cells in bone marrow from leukemia patients, so still we are trying to improve the experimental procedure.

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：小児科学

キーワード：小児血液学 白血病 アポトーシス 微小残存病変 microRNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 小児急性リンパ性白血病 (ALL) ではグルココルチコイド (GC) 投与による治療の歴史はすでに半世紀にも及ぶ。現在までの多くの治療研究で、わずか7日間のGC単剤治療、あるいはGCを中心とした7日間の多剤併用療法が臨床予後と強く相関することが示されている。このようにGCによる治療効果が臨床予後の予測に重要であることは明らかであるが、そのメカニズムは近年まで不明であった。ようやく最近GCによる細胞死誘発メカニズムについて報告があり、その機序が解明されつつある。しかし実際には、患者の治療場面においてはGC投与によってALL細胞減少はほとんどの症例で引き起こされており、ほとんどの症例で治療開始15日目の骨髓 (day 15 BM) 中の白血病細胞は絶対数として1%未満に減少している。即ち、ほとんどの白血病細胞は治療に対して反応性を有しているが、ごく一部の細胞のみが耐性機序を有しており、白血病細胞の持続的残存に貢献していると考えられる。このことはGreaves Mらが報告している白血病細胞のクローナルな変化が重要であるという考え方にも合致していると考えられる。即ち、高い薬剤耐性化と生存能力を有する白血病幹細胞としての役割を果たすクローンが基本となり、クローナルな変化が重なることで増殖活性の高い集団が増えて白血病が発症する。治療を受けると、薬剤感受性の高い細胞は死滅していくものの、白血病幹細胞としての役割を果たす基本クローンだけは生存を続けると考えられる。これらの基本クローンを見いだすことは実際には容易ではないが、骨髓中の微小残存病変 (MRD) を用いることは非常に有用な手段であると考えられる。

(2) 小児 ALL の MRD 測定は大きく3種類の方法が用いられる。キメラ遺伝子 RNA を用いる方法、T細胞受容体や免疫グロブリン遺伝子の特異的再構成を検出する方法、フローサイトメトリー (FCM) による方法である。前2者は検体全てから核酸を抽出して使用するため、バックグラウンドとして正常細胞由来の核酸が多く存在しており、残存する白血病細胞のみについて解析することは不可能である。しかし FCM を用いた方法では、MRD 細胞一つ一つについてのタンパク発現を同時に解析することも可能である。あるいは MRD 細胞だけをソーティングして取り出して、顕微鏡で観察、あるいは核酸を抽出しての解析も可能であり、非常に有用な手段であると考えられる。

(3) 近年明らかになった ALL に対する GC の細胞死誘発機構は以下がある。GC 誘発細胞死にはオートファジーが関連しており、その経路には Bim の発現が重要である。また Bim が実際に働くためには Mcl-1 との関係が重要であり、さらに Bim の発現調節には GSK3 が重要である、等の報告がある。さらに、GC による細胞死への耐性化には、Bim

のエピジェネティックなサイレンシングが重要であるという報告や、またそれらとは別に microRNA による発現調節の報告もされてきている。これらの報告はほとんどが ALL 細胞株を用いて示されており、また新鮮検体で使用されていたとしても治療開始前の白血病細胞である。これらを治療開始前後の検体を用いて確認することは、実際の耐性化への重要性が明らかにできる。

2. 研究の目的

(1) 小児急性リンパ性白血病細胞が、GC を中心とした化学療法で生存する際に必要となる分子機構を明らかにする。すなわち、アポトーシス分子機構、DNA メチル化による不活化、ヒストン脱アセチル化による転写制御、microRNA による転写制御など、遺伝子発現やエピゲノム分子機構が細胞の生存にどのように関わっているかを調べる。

(2) 初発時の白血病細胞は、実際には化学療法でほとんどが細胞死を来し、ごく一部のみが MRD となって生存を続けて再発に至る原因となる。そのため、発症時のサンプルのみならず、化学療法実施後の細胞についても調べることで、生存により重要なメカニズムを発見する。

3. 研究の方法

(1) GC によって細胞死が誘導される GC 感受性 ALL 細胞株 (小児患者から樹立されたものを含む) から GC 耐性株を誘導し、それらの間で GC 投与による Bim, Bax/Bak, FOXO, GSK3, Akt, ERK, Mcl-1 などの細胞死関連タンパク・遺伝子の発現変化を比較して明らかにする。

(2) GC 感受性のある親株と GC 耐性株の双方で、DNA メチル化阻害剤やヒストン脱アセチル化 (HDAC) 阻害剤を用いて、GC 誘発細胞死への関与を明らかにする。また Bim 遺伝子等のプロモーター領域の DNA メチル化の状態を直接調べて変化を明らかにする。

(3) GC 感受性のある親株と GC 耐性株の双方で、GC 誘発細胞死に関連すると考えられる microRNA の発現変化を調べる。変化のあった microRNA については、感受性株に対する microRNA agonist (mimic) 導入、あるいは耐性株に対する microRNA inhibitor 導入による細胞の増殖や生存に変化が生じるかを調査する。

(4) 新鮮検体および MRD 細胞を用い、上記で明らかになったメカニズムについて調査できる項目について検討する。可能であれば分離された MRD 細胞から mRNA を分離し、初発時と遺伝子発現を比較するアレイ解析への足がかりを得る。

4. 研究成果

(1) 白血病の重要な治療薬剤である GC のひとつであるデキサメサゾン (DEX) で細胞

死が誘発される急性リンパ性白血病細胞株（小児患者から樹立されたものを含む）を選んだ。その培養液中に DEX をごく少量加え、徐々に増加させることで、通常の細胞死誘発濃度 $1 \times 10^{-7} \mu\text{mol/L}$ を上回る $1 \times 10^{-6} \mu\text{mol/L}$ の濃度でも細胞死が誘発されない DEX 耐性細胞株を 4 株誘導（697, NaIm-16, および三重大学小児科で患者から樹立した 2 株）した。親株および耐性細胞株から各々タンパク質や mRNA を抽出し、Bim やカスパーゼなどの細胞死関連蛋白の発現を調べて比較した。親株では DEX の投与により Bim の mRNA やタンパクの発現が誘導されたが、耐性株では発現は誘導されず、Bim の遺伝子発現調節以前の段階で耐性化が生じていると考えられた。耐性化細胞を DEX 抜きで培養を継続したところ、可逆的な性質を示したものは 1 株に過ぎず、残る 3 株は半年あまり培養を行っても再び細胞死を誘導できるようにはならなかった。

（2）次に親株・耐性細胞株における Bim 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化プロファイルを調べたが有意な結果は得られなかった。そこで耐性細胞株に対して DNA メチル化阻害剤 5-AZA や HDAC 阻害剤 SAHA を添加して効果を調べたところ、一定の効果を認めたため DNA メチル化やヒストン脱アセチル化の関与は否定できなかった。

（3）次に Bim 遺伝子プロモーターのメチル化以外の遺伝子発現調節機構として、近年 microRNA の関与が示唆されているため、Bim の遺伝子発現に関連すると考えられている miR-17-92 クラスターの発現解析を行うとともに、GR 発現抑制作用が考えられている miR-142-3p についても発現の解析を行った。その結果、いずれも耐性株では microRNA の発現が上昇しており、DEX 誘発細胞死の抑制機構への関与が疑われた。

（4）次に miR-142-3p について、agonistic な働きを有する mimic、および阻害作用を示す inhibitor のトランスフェクションの実験を行ったが、いずれも DEX 誘発細胞死への影響は認めなかった。GC 耐性誘導で GR の発現は低下し、miR-142 の発現も著明に上昇しており、耐性化機序において miR 関与の可能性が示唆されたにもかかわらず miR-142-3p 導入で細胞死誘導は低下しなかったのは、GR 発現を時系列で確認し GC 投与時期を決める必要があった可能性もある。また miR-142-3p 阻害で細胞死は増加しなかったが、miR-17-92 (Bim 抑制) 等、他の miR の関与により細胞死が抑制されている可能性がある。また miR-142-3p 導入効率の改善で細胞死誘導の低下が生じる可能性があると考えられた。

（5）新鮮サンプルにおけるソーティングについては、細胞数やバイアビリティーの影響で十分な mRNA 量が得られなかったため、さらに系の改良をおこなっていく予定である。

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 5 件)

Asai D, Imamura T, Yamashita Y, Suenobu S, Saito A, Hasegawa D, Deguchi T, Hashii Y, Endo M, Hatakeyama N, Kawasaki H, Hori H, Horibe K, Yumura-Yagi K, Hara J, Watanabe A, Kikuta A, Oda M, Sato A.

Outcome of 82 patients with TCF3-PBX1 positive pediatric acute lymphoblastic leukemia treated with JACLS ALL02 protocol

Cancer Med. in press. (査読有)

Qi L, Toyoda H, Shankar V, Sakurai N, Amano K, Kihira K, Iwasa T, Deguchi T, Hori H, Azuma E, Gabazza EC, Komada Y. Heterogeneity of neuroblastoma cell lines in insulin-like growth factor 1 receptor/Akt pathway-mediated cell proliferative responses.

Cancer Sci. 2013 Sep;104(9):1162-1171. (査読有)

Asai D, Imamura T, Suenobu S, Saito A, Hasegawa D, Deguchi T, Hashii Y, Matsumoto K, Kawasaki H, Hori H, Iguchi A, Kosaka Y, Kato K, Horibe K, Yumura-Yagi K, Hara J, Oda M.

IKZF1 deletion is associated with a poor outcome in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in Japan.

Cancer Med. 2013 Jun;2(3):412-419. (査読有)

岩本彰太郎、出口隆生

フローサイトメトリー法による小児急性白血病的微小残存病変の検出

医学のあゆみ. 2013 245(12): 1003-1009. (査読無)

Flow cytometric analysis of de novo acute lymphoblastic leukemia in childhood: report from the Japanese Pediatric Leukemia/ Lymphoma Study Group.

Iwamoto S, Deguchi T, Ohta H, Kiyokawa N, Tsurusawa M, Yamada T, Takase K, Fujimoto J, Hanada R, Hori H, Horibe K, Komada Y.

Int J Hematol. 94(2):185-192, 2011. (査読有)

〔学会発表〕(計 13 件)

出口隆生、櫻井直人、清河信敬、堀部敬三、駒田美弘

小児急性白血病における 7.1 発現の意義

平成 25 年 11 月 29 日 第 55 回日本小児血

液・がん学会学術集会(福岡)
日本小児血液・がん学会誌 プログラム・総
会号 p204, 2013

佐藤篤、井口晶裕、出口隆生、橋井佳子、
松本公一、河崎裕英、齋藤明子、遠藤幹也、
堀 浩樹、原 純一、八木啓子、堀部敬三、
小田 慈
JACLS ALL02 プロトコール治療における
再発症例の検討
平成 25 年 11 月 29 日 第 55 回日本小児血
液・がん学会学術集会(福岡)
日本小児血液・がん学会誌 プログラム・総
会号 p203, 2013

櫻井直人、中村晴奈、岩佐正、澤田博文、
豊田秀実、岩本彰太郎、小池勇樹、井上幹大、
内田恵一、出口隆生、平山雅浩、堀 浩樹、
東英一、駒田美弘
シスプラチン単独治療を行った先天性肝芽
腫の一例
平成 25 年 11 月 29 日 第 55 回日本小児血
液・がん学会学術集会(福岡)
日本小児血液・がん学会誌 プログラム・総
会号 p269, 2013

岩本彰太郎、岩佐正、豊田秀実、内藤広
匡、森山貴也、貝沼圭吾、木平健太郎、出口
隆生、平山雅浩、東英一、堀 浩樹、駒田美
弘
フローサイトメトリー法で MRD をモニタリ
ングできた再発 AML の 2 例
平成 25 年 12 月 1 日 第 55 回日本小児血液・
がん学会学術集会(福岡)
日本小児血液・がん学会誌 プログラム・総
会号 p319, 2013

木平健太郎、岩佐正、豊田秀実、岩本彰
太郎、出口隆生、平山雅浩、堀 浩樹、東英
一、駒田美弘
再発 B 前駆細胞型急性リンパ性白血病の非
寛解期において造血細胞移植を施行した 4 例
平成 25 年 12 月 1 日 第 55 回日本小児血液・
がん学会学術集会(福岡)
日本小児血液・がん学会誌 プログラム・総
会号 p334, 2013

出口隆生、村松秀城、林 泰秀、菊池 陽、
駒田美弘
TAM 芽球における CD117 発現と末梢血中芽
球割合の相関
平成 24 年 12 月 2 日 第 54 回日本小児血液・
がん学会学術集会(横浜)
日本小児血液・がん学会誌 プログラム・総
会号 p282, 2012

浅井大介、今村俊彦、末延聡一、長谷川
大一郎、出口隆生、橋井佳子、松本公一、河
崎裕英、堀 浩樹、堀部敬三、八木啓子、原
純一、小田 慈

JACLS ALL02 ER 登録 IKZF1 欠失症例にお
ける第一寛解期での造血幹細胞移植の意義
について

平成 24 年 12 月 2 日 第 54 回日本小児血液・
がん学会学術集会(横浜)
日本小児血液・がん学会誌 プログラム・総
会号 p286, 2012

Asai D, Imamura T, Suenobu S, Saito S,
Hasegawa D, Deguchi T, Hashii Y,
Matsumoto K, Tokimasa S, Sato A, Iguchi
A, Kosaka Y, Imaizumi M, Shima M,
Hamasaki Y, Kawasaki H, Hori H, Yagi K,
Horibe K, Hara J, Oda M
IKZF1 deletion is associated with a poor
prognosis in pediatric BCP-ALL with
TCF3-PBX1 fusion
平成 24 年 10 月 21 日 第 74 回日本血液学会
学術集会(京都)
臨床血液 第 74 回日本血液学会学術集会
プログラム・抄録集 p337, 2012

Kinoshita A, Miyachi H, Matsushita H,
Yabe M, Taki T, Saito A, Tomizawa D,
Kiyokawa N, Taga T, Deguchi T, Hashii Y,
Terui K, Takahashi H, Hayashi Y, Tawa A,
Horibe K, Adachi S
Myelodysplasia-Related Changes Have
Adverse Prognostic Significance in
Children with Acute Myeloid Leukemia; A
Report From the Japanese Pediatric
Leukemia/Lymphoma Study Group
(JPLSG)
平成 24 年 12 月 9 日 第 54 回アメリカ血液
学会総会(アトランタ)
[https://ash.confex.com/ash/2012/webprogra
m/Paper47383.html](https://ash.confex.com/ash/2012/webprogram/Paper47383.html)

出口隆生、櫻井直人、出口美智子、雨宮
喜雄、岩本彰太郎、駒田美弘
小児 ALL 初発例におけるフローサイトメト
リーを用いた MRD と予後
平成 23 年 11 月 25 日 第 53 回日本小児血
液・がん学会学術集会(前橋)
日本小児血液・がん学会誌 プログラム・総
会号 p247, 2011

浅井大介、今村俊彦、末延聡一、長谷川
大一郎、出口隆生、橋井佳子、松本公一、河
崎裕英、堀 浩樹、堀部敬三、八木啓子、原
純一、小田 慈
JACLS ALL02 コホートにおける
IKZF1/CRLF2 遺伝子解析
平成 23 年 11 月 25 日 第 53 回日本小児血
液・がん学会学術集会(前橋)
日本小児血液・がん学会誌 プログラム・総
会号 p174, 2011

木下明俊、宮地勇人、滝 智彦、松下弘
道、矢部みはる、清河信敬、照井君典、太田

秀明、出口隆生、高橋浩之、多賀 崇、林 泰
秀、多和昭雄、足立壯一
JPLSG AML-05 臨床試験における WHO 分
類に基づいた小児急性骨髄性白血病の中央
診断
平成 23 年 11 月 25 日 第 53 回日本小児血
液・がん学会学術集会（前橋）
日本小児血液・がん学会誌 プログラム・総
会号 p203, 2011

本間 仁、豊田秀実、岩佐 正、岩本彰
太郎、出口隆生、平山雅浩、堀 浩樹、東 英
一、駒田美弘、井出正造、小池勇樹、井上幹
大、内田恵一、楠 正人、水野修吾、伊佐地
秀司
術前化学療法が奏功し脾動静脈合併脾温存
脾体尾部切除術にて全摘し得た脾芽腫の一
例
平成 23 年 11 月 26 日 第 53 回日本小児血
液・がん学会学術集会（前橋）
日本小児血液・がん学会誌 プログラム・総
会号 p238, 2011

〔図書〕(計 2 件)

出口隆生. 小児造血器腫瘍の診断の手引
き. 5. フローサイトメトリーによる MRD
測定. p53-59 堀部敬三・鶴澤正仁編 発
行: 2012 年 9 月 25 日 総ページ数 63 日
本医学館社

出口隆生. 小児がん診療ハンドブック～
実地診療に役立つ診断・治療の理念と実践～
II 章 診断的アプローチ 2. 免疫学的診断
p75-80 堀部敬三編 発行: 2011 年 8 月 25
日 総ページ数 519 医薬ジャーナル社

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

出口 隆生 (DEGUCHI, Takao)
三重大学・医学部附属病院小児科・講師
研究者番号: 2070345990

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: