

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591552

研究課題名(和文) ダウン症児における一過性骨髄増殖症の発症と自然治癒機構の分子・細胞生物学的解析

研究課題名(英文) Molecular/cellular biological analysis of pathogenesis and spontaneous remission mechanism in Down syndrome transient myeloproliferative disorder

研究代表者

宮内 潤 (Miyuchi, Jun)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：20146707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：ダウン症候群の新生児期には、急性骨髄性白血病と類似した血液異常がみられる場合があるが、通常自然に治癒する。一過性骨髄増殖症(TMD)と呼ばれるこの疾患は、胎児の肝臓で起こる特殊な腫瘍と考えられている。その自然治癒の理由は現在不明である。本研究では細胞培養の実験系を用いて、胎児肝臓の造血微小環境を構成する間質細胞がTMDの腫瘍細胞の増殖を維持すること、そしてこの間質細胞が産生する造血因子の1つである顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)が重要な役割を果たすことを明らかにした。この結果はTMDの発症・進展と自然治癒に、胎児期の造血微小環境が関与することを示すものである。

研究成果の概要(英文)：In neonates with Down syndrome, hematological abnormalities similar to acute myeloid leukemia may be seen but usually spontaneously disappear. This disorder, called transient myeloproliferative disorder (TMD), is thought to be a unique myeloid neoplasm arising in the fetal liver. The mechanism of its spontaneous remission is unclear. In this study, using cell culture techniques, we demonstrated that stromal cells constituting microenvironment of the fetal liver support the growth of TMD blasts and that one of the hematopoietic growth factors, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), produced by the stromal cells play an important role. These results indicate that fetal hematopoietic microenvironment is involved in the onset, progression and spontaneous remission of TMD.

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：一過性骨髄増殖症 ダウン症候群 造血微小環境 造血因子 胎児造血 胎児肝間質細胞 自然治癒

## 1. 研究開始当初の背景

ダウン症候群 Down syndrome (DS)は高い白血病発症リスクを有する先天異常である。低年齢のDS患児においては、一般の小児と異なり、急性骨髄性白血病 acute myeloid leukemia (AML)の頻度が高く、とくに非DS小児には非常に稀なAMLの一病型である急性巨核芽球性白血病 acute megakaryoblastic leukemia (AMKL)が大部分を占める。またDSの新生児期にはAMKLの芽球と区別困難な芽球が末梢血中に出現する血液学的異常を呈するも、無治療で自然に治癒するユニークな病態がみられ、一過性骨髄増殖症 transient myeloproliferative disorder (TMD)などと呼ばれている。

DS児におけるTMDとAMKLの芽球はきわめて類似した細胞形態と免疫学的表現型を示し、巨核球・赤芽球等の造血に関わる転写因子をコードする *GATA1* 遺伝子の異常が両疾患の芽球に特異的に認められる。このような特徴から、両者はかつて“myeloid leukemia of Down syndrome”と一括して呼ばれてきたが、TMDは自然治癒を来す特殊な腫瘍であるのに対し、AMKLは自然治癒を来さず、無治療では致死性の経過をたどる急性白血病である。

両疾患の起こる機序として、ダウン症候群における過剰な21番染色体上の遺伝子異常を背景として、胎児期の造血幹細胞に *GATA1* 遺伝子変異が起こることで新生児期にTMDが発症し、何らかの機序でTMDが自然治癒を来した後に、残存する微小なTMDの芽球クローンにさらに第三の遺伝子変異が加わることで、生後にAMKLが起こると考えられている。

## 2. 研究の目的

TMDは自然治癒をきたす稀な骨髄性腫瘍であるが、小児がんには神経芽腫をはじめとして自然に治癒する腫瘍がほかにもある。しかし、それらの自然治癒機構に関する確実な証拠は現在まで得られておらず、その機序は現在詳細不明である。

TMDは新生児期にみられる疾患であり、疾患

自体は胎児期に起こると考えられる。TMDの自然治癒の機序に関する可能性として、腫瘍細胞が胎児造血に関与する造血幹細胞に由来するために、生後にはその使命を終えて自然に消失するよう運命づけられている可能性が考えられる(胎児造血の遺伝子発現プログラムにもとづく内因性仮説)。別の可能性として、TMDが胎児期に生じる腫瘍であるために、腫瘍細胞の増殖が胎児期の主たる造血臓器である肝臓の微小環境に依存しており、生後に造血の場が肝臓から骨髄に移行することにより、TMDの芽球増殖に必要な環境が消失することで、腫瘍細胞の増殖が停止する可能性が考えられる(造血微小環境の変化にもとづく外因性仮説)。本研究の目的は、TMDの芽球増殖と造血微小環境との関係を *in vitro* の実験で明らかにすることで、TMDの発症・進展と自然治癒に胎児期の造血微小環境が関与するか否かを検証することにある。

## 3. 研究の方法

### (1) TMD芽球と間質細胞の共培養

TMDの芽球増殖が胎児期の造血微小環境に依存しているか否か、また依存している場合にはどの臓器が重要な役割を果たすかを検討するため、人工中絶児の胎児から肝臓と骨髄の間質細胞を採取し、これを培養器の壁付着細胞として、TMDの芽球(浮遊細胞)との共培養を行った。共培養は両者の細胞が接触可能な培養条件と、細胞接触は不可能で微小孔を介して液性因子のみの交通が可能なTranswellを使用した培養条件の2通りで行った。7日間の共培養後に芽球を回収し、さらに造血因子の存在下でコロニー培養を施行してコロニー形成細胞の実数を求めた。

### (2) 造血因子の定量

培養上清中に産生される各種造血因子の濃度は、市販のELISA法キットを使用して測定した。

### (3) 間質細胞の抗原発現解析

間質細胞の性状は免疫組織化学にて検討した。間質細胞はスライドウェルにて培養し、培養後に細胞を固定した標本を使用した。間葉系細胞、上皮

細胞、肝細胞、内皮細胞、Kupffer細胞、造血細胞等のマーカーに対する各種抗体は市販の抗体を使用した。

#### (4) 中和抗体の効果判定

各種造血因子に対する中和抗体の存在下で、胎児肝臓の間質細胞培養上清をTMDの芽球に加え、その影響を液体浮遊培養とメチルセルロースを用いたコロニー培養法にて検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 間質細胞の性状

実験に使用した胎児の肝臓と骨髄の間質細胞の性状を免疫組織化学にて検討した結果、肝臓・骨髄の間質細胞はともに一般的な間葉系細胞マーカーであるvimentinと $\alpha$ -smooth muscle actinが陽性を示したほかに、近年、間葉系幹細胞のマーカーとして知られているnestin、CD146をつよく発現した。間葉系幹細胞は多系統の間葉細胞への分化能を有する細胞で、造血幹細胞による造血を支持する作用を有することも報告されており、今回使用した胎児の肝臓と骨髄の間質細胞もそのような細胞と考えられる。胎児肝の間質細胞は上記の間葉系マーカーに加え、一部の細胞が上皮性抗原cytokeratin 18陽性を示した。このことから、胎児肝の間質細胞は上皮間葉転換epithelial-mesenchymal transition (EMT)の能力を有する細胞と考えられる。近年、マウスにおける胎児造血に関与する胎児肝間質細胞はこのようなEMTの性格を有する細胞であることが報告されており、今回我々が用いたヒト胎児肝の間質細胞も同様の細胞と考えられる。一方、骨髄の間質細胞には上皮性抗原の発現は認められず、骨髄細胞で発現されるCD10が陽性を示した。肝臓・骨髄の間質細胞はともに、その他の肝細胞・内皮細胞・Kupffer細胞・造血細胞のマーカーは陰性であった。

#### (2) TMD芽球と間質細胞の共培養

TMD芽球と胎児肝臓の間質細胞との共培養を行ったところ、使用した4例のTMD症例と2例の間質細胞のいずれの組み合わせにおいても、

TMD芽球の増殖は顕著に刺激され、増殖が維持された。一方、胎児骨髄の間質細胞にはこのような作用はほとんど認められなかった。したがってTMD芽球は胎児の骨髄ではなく、肝臓の造血微小環境に増殖を依存していることが示された。この結果はTMDが胎児の肝臓で発生する特殊な腫瘍であるという仮説を支持する結果であり、TMDが自然治癒する機序として、生後に造血微小環境が肝臓から骨髄に移行することが関与することを示唆する結果ともいえる。

#### (3) 間質細胞の培養上清中の造血因子定量

ELISA法にて胎児肝臓と骨髄の間質細胞の培養上清中の造血因子を測定した。その結果、両者の培養上清中にはともにいくつかの造血因子が高濃度で含まれていることが判明した。この中で、stem cell factor (SCF)、insulin-like growth factor (IGF)-2は両者間で一定した濃度差は認められず、前述の肝臓と骨髄の間質細胞の機能的差異を説明することはできない。一方、granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)とgranulocyte-CSF (G-CSF)は、骨髄に比して肝臓の間質細胞培養上清中に有意に高い濃度で検出された。interleukin-3 (IL-3)とthrombopoietin (TPO)は検出感度以下であった。以上の結果から、GM-CSFとG-CSFが肝臓と骨髄の間質細胞の機能的差異に関与している可能性が考えられるが、我々の過去の研究結果にて、G-CSFはTMD芽球の増殖を刺激する作用は微弱であることが判明していることから、TMDの芽球増殖に関与する造血因子として、GM-CSFの可能性が高いと推測された。この点を明らかにするために、下記のごとく各種造血因子に対する中和抗体の作用を検討した。

#### (4) 造血因子に対する中和抗体の影響

胎児肝臓間質細胞の培養上清と各種造血因子に対する中和抗体の存在下でTMD芽球を7日間培養し、液体培養における細胞数の増減とコロニー培養におけるコロニー形成細胞の数を解析した。SCF、TPO、G-CSF、GM-CSFに対する中和抗体を検討した結果、GM-CSFに対する中和抗

体は、胎児肝間質細胞の培養上清が有する TMD 芽球の増殖刺激作用を完全に阻害したが、他の 3 者の抗体存在下では何の影響も認められなかった。したがって、GM-CSF が胎児肝間質細胞から産生されて TMD 芽球の増殖を支持する造血因子の中で、もっとも重要な役割を果たすものであることが示された。

TMD 芽球の増殖・分化に及ぼす *in vitro* における造血因子の作用を解析した我々の過去の研究結果(Br. J. Haematol. 148:898, 2010)にて、TMD 芽球の増殖には IL-3、GM-CSF、SCF の 3 者がつよい増殖刺激作用を示す造血因子であることが示されている。今回の中和抗体を用いた実験結果から、肝臓の間質細胞から産生される SCF は TMD の芽球増殖に深く関与するものでなく、IL-3 は培養上清からは検出されなかったことから、GM-CSF が生体内で TMD 芽球の増殖維持に関わる重要な造血因子であると考えられる。しかし TMD 芽球は AMKL と同様に巨核芽球の表現型を有するが、GM-CSF は巨核球の分化に大きく関与する造血因子ではなく、TMD の巨核球系統への分化には、肝細胞から産生される TPO が関与する可能性が考えられる。

今回の研究にて、胎児期の主たる造血臓器である肝臓の間質細胞が、TMD の腫瘍細胞の増殖維持にきわめて重要な細胞であることが示されたことから、TMD の発症・進展とひいては自然治癒に、胎児期の造血微小環境が深く関わっているものと考えられる。本研究のごとく造血微小環境と TMD の関係に焦点をあてた研究は世界的にもきわめて数少ないが、TMD のより詳細な病態解明にはこうした研究が今後も不可欠と考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 25 件)

1. [Miyachi J](#), [Kawaguchi H](#): Fetal liver stromal cells support blast growth in transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome through GM-CSF. *Journal of Cellular Biochemistry* 115:1176-1186, 2014 査読有,

DOI: 10.1002/jcb.24764

2. [Miyachi J](#), Asahara F, Matsui J: Collision lymph node metastasis of rectal and prostate adenocarcinomas. *Pathology International* 63: 425-427, 2013, 査読有, DOI: 10.1111/pin.12084
3. Fukuzawa R, Komori K, Kohno T, Hirose S, [Miyachi J](#): Bilateral intralobar sequestration of the lung with a bridging isthmus: pathologic and radiologic findings. *Pediatric Developmental Pathology* 17:55-58, 2014, 査読有, DOI: 10.2350/13-08-1371-CR.1.
4. Ishigaki H, [Miyachi J](#), Yokoe A, Nakayama M, Yanagi T, Taga T, Ohta S, Itoh Y, Ogasawara K: Expression of megakaryocytic and myeloid markers in blasts of transient abnormal myelopoiesis in a stillbirth with Down syndrome: report of histopathological findings of an autopsy case. *Human Pathology* 42:141-145, 2011, 査読有, DOI: 10.1016/j.humpathol.2010.06.012
5. Takagi M, Piao J, [Kawaguchi H](#), Imai C, Ogawa A, Watanabe A, Akiyama K, Kobayashi C, Mori M, Ko K, Mizutani S: Autoimmunity and persistent RAS-mutated clones long after the spontaneous regression of JMML. *Leukemia* 27:1926-1928, 2013, 査読有, DOI:10.1038/leu.2013.82.
6. Illert AL, [Kawaguchi H](#), Antinozzi C, Bassermann F, de Fend LQ, von Klitzing C, Hiwatari M, Peschel C, de Rooij DG, Morris SW, Barchi M, Duyster J: Targeted inactivation of nuclear interaction partner of ALK (NIPA) disrupts meiotic prophase. *Development* 139: 2523-2534, 2013, 査読有, DOI: 10.1242/dev.073072
7. Doisaki S, Muramatsu H, Shimada A,

- Takahashi Y, Esaki M, Sato M, Kawaguchi H, Kinoshita A, Sotomatsu M, Hayashi Y, Furukawa-Hibi Y, Yamada K, Hoshino H, Kiyoi H, Yoshida N, Sakaguchi H, Narita A, Wang X, Ismael O, Xu Y, Nishio N, Tanaka M, Hama A, Koike K, Kojima S: Somatic mosaicism for oncogenic NRAS mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood* 120:1485-1488, 2012, 査読有, DOI: 10.1182/blood-2012-02-406090.
8. 宮内 潤: ダウン症候群関連骨髄増殖性疾患: 自然経過と造血微小環境の役割. *東京女子医科大学雑誌*, 8(Extra 2) E257-267, 2014, 査読有
  9. 宮内 潤, 松本公宏: リンパ腫の病期診断と骨髄浸潤. *日本臨床「リンパ腫: 検査・診断と治療の最新動向」* 72: 456-461, 2014, 査読無
  10. 宮内 潤, 赤塚誠也: 肝臓の乳児性血管内皮腫の1例. *日本小児血液・がん学会誌* 50:155, 2013, 査読無
  11. 川口裕之, 宮内 潤: 小児の MDS: その特徴と診断上の注意点. *病理と臨床* 30: 848-855, 2012, 査読無
  12. 宮内 潤, 赤塚誠也: 乳腺葉状腫瘍の1女児例. *小児血液・がん学会誌* 49:184, 2012, 査読無
  13. 露無圭子, 中谷 綾, 宮内 潤, 岡本真一郎: 急性リンパ性白血病地固め療法中に肺病変より脊椎硬膜外膿瘍を発症した接合菌症. *臨床血液* 52:718-721, 2011, 査読有
- [学会発表] (計 20 件)
1. Miyauchi J, Kawaguchi H: The role of fetal hematopoietic micro- environment in the growth of blast progenitors in transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会 (2013 年 11 月 29 日、福岡市)
  2. 宮内 潤: ダウン症児の一過性骨髄造血異常症 (TAM) における芽球の増殖は胎児間質細胞が産生する GM-CSF に依存する. 第 102 回日本病理学会総会 (2013 年 6 月 8 日、札幌市)
  3. 宮内 潤, 浅原史卓, 松井淳一, 赤塚誠也, 馬場秀雄: 直腸癌と前立腺癌のリンパ節転移衝突癌の2例. 第 101 回日本病理学会総会 (2012 年 4 月 26 日、東京)
  4. Okada S, Watanabe T, Hirose T, Miura K, Katoh M, Yamafuji K, Akatsuka S, Miyauchi J, Mori S, Kikuchi M, Kanda Y: A case of splenectomy to stage IV splenic DLBCL with PET-positive residual disease before auto PBSCT. 第 73 回日本血液学会学術集会 (2011 年 10 月 14 ~ 16 日、名古屋市)
  5. 宮内 潤: 若年性骨髄単球性白血病の発症機序に関する最近の知見 (コンパニオンミーティング 10: 骨髄のトピックス). 第 100 回日本病理学会総会 (2011 年 4 月 28 日 ~ 30 日、横浜市)
  6. 宮内 潤: TAM 芽球の増殖・分化に及ぼす造血因子と造血微小環境の影響. 厚生労働省科学研究費補助金: 「ダウン症候群でみられる一過性骨髄異常増殖症の重症度分類のための診断基準と治療指針の作成に関する研究」(研究代表者: 林泰秀) 平成 23 年度第 1 回班会議. (2011 年 11 月 4 日、名古屋市)
  7. 野村 智章, 川口裕之, 中村 麻里, 横山光紀, 山本 かずな, 濱本 学, 草野 智佳子, 中川 紀子, 川村 陽一, 野々山 恵章: 複数の腫瘍性髄外病変を認めた急性巨核芽球性白血病の1歳女児例. 第 117 回日本小児科学会 (2014 年 4 月 11 ~ 13 日、名古屋市)

8. 磯部清孝、川口裕之、野々山恵章:髄液細胞中に反応性 T 細胞の増多をきたし、治療中の中枢神経再発を疑われた標準リスク B 前駆細胞型 ALL の一例. 第 55 回日本小児血液・がん学会、(2013 年 11 月 30 日、福岡市)

(図書)(計 5 件)

1. Miyauchi J: Unique myeloid leukemias in young children with Down syndrome: Cell origin, association with hematopoietic microenvironment and leukemogenesis. in: "Prenatal Diagnosis and Screening for Down Syndrome", edited by Subarata Dey, InTech Open Access Publisher (Rijeka, Croatia), pp.107-128, 2011 年、総ページ数 232
2. 宮内 潤(分担執筆):「近医にて赤血球増加の指摘」p.37-44、「健診にて白血球増多の指摘」p.165-171、北川昌伸・定平吉都・伊藤雅文(編):「見逃してはならない血液疾患(病理からみた 44 症例)、医学書院(東京)、2014 年、総ページ数 278
3. 藤本純一郎、浜崎 豊、平戸純子、北條洋、堀江 弘、井上 健、石田 剛、宮内 潤、森川征彦、中川温子、中山雅弘、小田義直、大喜多肇、横山繁昭:中枢神経系腫瘍. 日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会(編)、小児腫瘍組織カラーアトラス(第 6 巻)、金原出版(東京)、2013 年、総ページ数 125
4. 宮内 潤(分担執筆):「小児の骨髄と白血病の特徴」p.45-49、「BCR-ABL1 陽性慢性骨髄性白血病」p.52-57、「Down 症候群関連骨髄増殖性疾患」p.180-184、「巨核球の形態異常をきたす骨髄性腫瘍の鑑別」p.208-213、定平吉都・北川昌伸(編):造血器腫瘍(腫瘍病理鑑別診断アトラス)、文光堂(東京)、2013 年、総ページ数:290
5. 宮内 潤(分担執筆):「急性好塩基球性白

血病」p.228-231、「形質細胞白血病」p.232-235、「若年性骨髄単球性白血病」p.284-288、別冊日本臨床:新領域別症候群シリーズ No.23 「血液症候群(第 2 版)」、日本臨床社(東京)、2013 年、総ページ数 767

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮内 潤 (MIYAUCHI, Jun)  
東京歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号:20146707

### (2) 研究分担者

川口 裕之(KAWAGUCHI, Hiroyuki)  
防衛医科大学校・小児科・講師  
研究者番号:00313130