

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591411

研究課題名(和文) In vivo ヒト白血病発症モデルを用いたエピジェネティック関連遺伝子異常の解析

研究課題名(英文) In vivo analysis of gene mutations related to epigenetic alterations in acute myeloid leukemia

研究代表者

松下 弘道 (MATSUSHITA, Hiromichi)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：50286481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、急性骨髄性白血病(AML)に近年同定されたエピジェネティック関連遺伝子変異の生体内での機能解析を目的としたものである。これらの遺伝子変異の中で、DNMT3A変異R882Hを中心に解析を行った。これをヒト造血幹細胞(CD34陽性細胞)に導入したところ、controlに比べ骨髄単球系分化マーカーの発現は抑制され、colony assay法では骨髄単球系コロニーは減少した。この細胞をNOGマウスに移植したが、長期に経過観察しても白血病発症は確認できなかった。これらの結果から、DNMT3A変異は単独では白血病を発症させるのには不十分であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to see the in vivo function of genetic mutations that are related to the epigenetic alterations in acute myeloid leukemia (AML). We focused on the DNMT3A R882H mutation among them. Human CD34+ cells transduced with DNMT3A R882H reduced the expression of myelomonocytic markers such as CD14 and the formation of CFU-mix and CFU-GM in the colony formation assays. However, these cells could not develop AML in NOG mice when they were transplanted. Taken together, these findings suggest that the transduction of DNMT3A R882H was not enough for the development of AML in vivo.

研究分野：医歯薬学

キーワード：急性骨髄性白血病 epigenetics 遺伝子変異 ヒトCD34陽性細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年の網羅的遺伝子解析技術を用いた研究から、急性骨髄性白血病 (AML) に種々の epigenesis に関与する遺伝子異常が新たに同定された。同時に AML における DNA メチル化やヒストンメチル化・アセチル化などの網羅的解析が進み、epigenesis の異常が AML 発症に重要であることが示唆されてきた。経時的な臨床検体を用いた解析から、AML は造血幹細胞あるいは前駆細胞にこれらの遺伝子異常がまず生じ、引き続いて細胞増殖・不死化を促進する class I 異常や細胞分化を抑制する class II 異常が獲得されることで発症すると考えられている。

(2) 我々はこれまでに、超重症免疫不全マウスである NOG (NOD/Shi-scid,IL-2RyKO) マウスに、増殖性の低い骨髄異形成症候群 (MDS) の骨髄細胞を生着させることに成功した (Haematologica 2011)。さらに、AML の 1 病型で、やはり増殖性の低い急性前骨髄球性白血病 (APL) に特徴的な融合遺伝子 *PML-RARA* を遺伝子導入したヒト CD34 陽性細胞を NOG マウスに移植することにより、高率に APL を発症するマウスモデルを作製した (PLoS One 2014)。本モデルは白血病の発症過程を解析することを可能にするものである。

2. 研究の目的

epigenesis に関連する AML の種々の遺伝子異常の中で、DNA メチル化に関与する遺伝子として、cytosine をメチル化して 5-methyl cytosine (5-mC) にする DNMT3A、5-mC をさらに 5-OH mC にする TET2、2-hydroxyglutarate を介して TET2 を阻害する IDH1/2 がある。de novo AML で頻度の高いこれらの遺伝子異常について、*in vitro* における機能解析に加え、NOG マウスとヒト CD34 陽性細胞を用いて *in vivo* での白血病発症能の検討を目的とする。

3. 研究の方法

(1) レトロウイルスベクターの作製

DNMT3A 変異 (R882H)、IDH1 変異 (R132H)、IDH2 変異 (R172K)、TET2-shRNA 発現ベクターは、購入した遺伝子、あるいは site-directed mutagenesis を用いて変異を導入したものをレトロウイルスベクターに挿入して作製する。比較検討のために、正常核型で頻度が高い変異である *NPM1* 変異および *FLT3-ITD* 変異を発現するベクターを同時に作製する。

(2) *in vitro* における機能解析

白血病細胞株 (HL-60、U937、K562)、臍帯血由来ヒト CD34 陽性細胞あるいは 5-FU 処理したマウスより採取した骨髄細胞

に(1)で作製したレトロウイルスベクターを感染させ、DNA メチル化阻害薬 azacitidine 存在下での細胞増殖や分化に対する影響を検討する。

(3) *in vitro* における機能解析

(2)で作製した細胞を半致死量の放射線で処理した NOG マウス、あるいは同系マウスに移植し、定期的に採血あるいは骨髄採取をして白血病発症能を検討する。

4. 研究成果

(1) *in vitro* における機能解析

DNMT3A 変異、IDH1 変異、IDH2 変異、*NPM1* 変異、*FLT3-ITD* 変異は sequence で確認後、293T 細胞に lipofection で発現させ、RT-PCR および Western blot で確認した。

TET2-shRNA 発現ベクターについては TET2 遺伝子の発現抑制を確認した (約 70%)。

NPM1 変異と *FLT3-ITD* 変異はしばしば同時に認めるため、1つのベクターで発現できるように、2A peptide (J Mol Med 2008;86:573-83) を挟んだ形の発現ベクターも作製した。しかし *NPM1* 変異の十分な発現を得ることができなかった。

(2) *in vitro* における機能解析

DNMT3A 変異を種々の白血病細胞株に導入し、種々の細胞分化に伴う遺伝子発現や azacytidine 存在下での細胞増殖能について評価したが、細胞株によって異なり一定の傾向が得られなかった。

DNMT3A 変異をヒト CD34 陽性細胞に導入し *FLT3 / SCF / TPO* 存在下で培養したところ、contorl に比し CD14 の発現低下を認めた。この際、骨髄系転写因子の発現レベルに変化はなかったが、リンパ系転写因子の発現は増加した。colony assay では BFU-E は維持されたが、CFU-GM や CFU-mix は減少しており、骨髄細胞の分化成熟に対し抑制的に作用することが明らかになった。

(3) *in vitro* における機能解析

(2)で作製した、DNMT3A 変異ヒト CD34 細胞を移植した NOG マウスに白血病の発症を認めなかった。この時の遺伝子導入効率は 2%以下であった。マウス骨髄細胞を用いた場合にも白血病を発症しなかった。*FLT3-ITD* と *NPM1* 変異を同時に遺伝子導入したヒト CD34 細胞を移植した場合にも白血病を発症しなかったが、この際も遺伝子導入効率は 1%以下であった。

これらの結果は、DNMT3A 変異単独では白血病を発症させるのには不十分である可能性を示す一方で、遺伝子導入効率を向上させて再検討する必要性を示唆していると考えられた。

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 23 件)

1. **Matsushita H**, Yahata T, Ando K, 他 12 名 (1 番目). Establishment of a humanized APL model via the transplantation of *PML-RARA*-transduced human common myeloid progenitors into immunodeficient mice. *PLoS One*, 査読有, Vol. 9, No. 11, 2014, e111082. doi: 10.1371/journal.pone.0111082. eCollection 2014.
2. Kawai H, **Matsushita H**, Ando K, 他 9 名 (2 番目). Functional analysis of the *SEPT9-ABL1* chimeric fusion gene derived from T-prolymphocytic leukemia. *Leukemia Res*, 査読有, Vol. 38, No. 12, 2014, pp. 1451-9. doi: 10.1016/j.leukres.2014.08.015.
3. Suzuki R, **Matsushita H**, Ando K, 他 6 名 (2 番目). Identification of a novel *SEPT9-ABL1* fusion gene in a patient with T-cell prolymphocytic leukemia. *Leukemia Res Rep*, 査読有, Vol. 3, No. 2, 2014, pp. 54-7. doi: 10.1016/j.lrr.2014.06.004.
4. Murayama H, **Matsushita H**, Ando K, 他 1 名 (2 番目). Erythrophagocytosis by blasts in acute myeloid leukaemia harbouring the *BCR-ABL1* fusion gene. *Br J Haematol*, 査読有, Vol. 167, No. 5, 2014, pp. 586. doi: 10.1111/bjh.13139.
5. Kinoshita A, **Matsushita H**, 他 15 名 (3 番目). Acute myeloid leukaemia with myelodysplastic features in children: a report of Japanese Paediatric Leukaemia/Lymphoma Study Group. *Br J Haematol*, 査読有, Vol. 167, No. 1, 2014, pp. 80-6. doi: 10.1111/bjh.12993.
6. Tanaka Y, **Matsushita H**, 他 6 名 (7 番目). Performance Evaluation of Platelet Counting by Novel Fluorescent Dye Staining in the Automated Hematology Analyzers XN-Series. *J Clin Lab Anal*, 査読有, Vol. 28, No. 5, 2014, pp. 341-8. doi: 10.1002/jcla.21691.
7. Tanaka Y, **Matsushita H**, 他 5 名 (2 番目). Elimination of Interference by Lipids in the Low WBC Counts in the Automated Hematology Analyzer XN-2000. *Int J Lab Hematol*, 査読有, Vol. 36, No. 4, 2014, pp. e50-4. doi: 10.1111/ijlh.12163.
8. Tanaka Y, **Matsushita H**, 他 5 名 (2 番目). Evaluation of the Body Fluid Mode of Automated Hematology Analyzer XN-Series for Extremely Low Peripheral White Blood Cell Counts. *Int J Lab Hematol*, 査読有, Vol. 36, No. 1, 2014, pp. e3-7. doi: 10.1111/ijlh.12114.
9. Kojima M, **Matsushita H**. Hepatosplenic T-cell lymphoma appearing in the peripheral blood. *Blood*, 査読有, Vol. 122, No. 7, 2013, pp. 1103. doi: http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-01-478404.
10. Murayama H, **Matsushita H**, Ando K. Atypical chronic myeloid leukemia harboring NUP98-HOXA9. *Int J Hematol*, 査読有, Vol. 98, No. 2, 2013, pp. 143-4. doi: 10.1007/s12185-013-1381-1.
11. Harada Y, **Matsushita H**, Ando K, 他 10 名 (8 番目). RUNX1/AML1 mutant collaborates with BMI1 overexpression in the development of human and murine myelodysplastic syndromes. *Blood*, 査読有, Vol. 121, No. 17, 2013, pp. 3434-46. doi: 10.1182/blood-2012-06-434423.
12. Kawada H, **Matsushita H**, Ando K, 他 5 名 (7 番目). High concentrations of L-ascorbic acid specifically inhibit the growth of human leukemic cells via downregulation of HIF-1 α transcription. *PLoS One*, 査読有, Vol. 8, No. 4, 2013, e62717. doi: 10.1371/journal.pone.0062717.
13. Asai S, **Matsushita H**, 他 8 名 (8 番目). Localized or diffuse lesions of the submandibular glands in immunoglobulin g4-related disease in association with differential organ involvement. *J Ultrasound Med*, 査読有, Vol. 32, No. 5, 2013, pp. 731-6. doi: 10.7863/ultra.32.5.731.
14. Ohgiya D, **Matsushita H**, Ando K, 他 1 名 (2 番目). Huge multinucleated megaloblasts found in a patient with refractory anemia with excess blasts-1.

- Int J Hematol, 査読有, Vol. 96, No. 5, 2012, pp. 531-2. doi: 10.1007/s12185-012-1212-9.
15. Ohgiya D, **Matsushita H**, Ando K, 他 7 名 (2 番目) . Association of promyelocytic leukemia protein with expression of IL-6 and resistance to treatment in multiple myeloma. Acta Haematol, 査読有, Vol. 128, No. 4, 2012, pp. 213-22. doi: 10.1159/000339486.
 16. Yabe M, **Matsushita H**, 他 4 名 (6 番目) . Systemic mastocytosis associated with t(8;21) acute myeloid leukemia in a child: detection of the D816A mutation of KIT. Pediatr Blood Cancer, 査読有, Vol. 59, No. 7, 2012, pp. 1313-6. doi: 10.1002/pbc.24250.
 17. **Matsushita H**, Nakamura N, Ando K, 他 9 名 (1 番目) . Clinical and pathological features of B-cell non-Hodgkin lymphomas lacking the surface expression of immunoglobulin light chains. Clin Chem Lab Med, 査読有, Vol. 50, No. 9, 2012, pp. 1665-70. doi: 10.1515/cclm-2011-1854.
 18. Asai S, **Matsushita H**, 他 6 名 (7 番目) . Sonographic appearance of the submandibular glands in patients with immunoglobulin G4-related disease. J Ultrasound Med, 査読有, Vol. 31, No. 3, 2012, pp. 489-93. <http://www.jultrasoundmed.org/content/31/3/489.long>
 19. 二見恭子, **松下弘道**, 他 4 名 (5 番目) . 表面免疫グロブリン、鎖のそれぞれにクロナリティを認めた白血化 B-cell Lymphoma の 1 例. Cytometry Research, 査読無, Vol. 24, No. 1, 2014, pp. 25-7.
 20. 宮地勇人, **松下弘道**, 他 4 名 (6 番目) . 血液総合診断システムの運用と展開. 日検血会誌, 査読有, Vol. 14, No. 3, 2013, pp. 422-32.
 21. 宮地勇人, 浅井さとみ, **松下弘道**. - 骨髓像診断加算: 臨床検査専門医の役割と実践-付加価値のある骨髓像の文書報告と運用効果. Laboratory and Clinical Practice, 査読無, Vol. 31, No. 1, 2013, pp. 22-9.
 22. 白杉由香里, 大間知謙, **松下弘道**. 専門医部会 考えてみよう 臨床クイズ 問題 溶血性貧血によりうっ血性心不全を繰り返す 79 歳の男性. 日内会誌, 査読有, Vol. 101, No. 12, 2012, pp. 3598-9 & pp. 3610-2. https://www.jstage.jst.go.jp/article/naiika/101/12/101_3598/_pdf
 23. 宮地勇人, **松下弘道**, 他 2 名 (2 番目) . 白血病の分子標的治療と遺伝子検査: 慢性骨髄性白血病の BCR-ABL 検査の精度保証と適正利用. 臨床病理, 査読無, Vol. 60 No. 10, 2012, pp. 982-7.
- [学会発表] (計 27 件)
1. **Matsushita H**, Yahata T, 他 13 名 (1 番目) . *In vivo* analysis of PML-RARA in a humanized mouse model. 第 56 回 米国血液学会学術集会, 2014 年 12 月 5-8 日, サンフランシスコ (米国カルフォルニア州)
 2. Tabe Y, **Matsushita H**, 他 9 名 (4 番目) . The mTOR kinase inhibitor AZD-2014 effectively reverses XPO1/CRM1 antagonist KPT-185-induced glycolysis / gluconeogenesis, enhancing antitumor effects in mantle cell lymphoma. 第 56 回 米国血液学会学術集会, 2014 年 12 月 5-8 日, サンフランシスコ (米国カルフォルニア州)
 3. Tabe Y, **Matsushita H**, 他 11 名 (7 番目) . Bone marrow adipocyte-derived free fatty acids induce gene signature linking transcription with metabolic changes that contribute to survival of acute monocytic leukemia cells. 第 56 回 米国血液学会学術集会, 2014 年 12 月 5-8 日, サンフランシスコ (米国カルフォルニア州)
 4. Takahashi H, **Matsushita H**, 他 23 名 (13 番目) . Sufficient reduction of anthracycline doses in the treatment of childhood acute promyelocytic leukemia: A nationwide prospective study by the Japanese Pediatric Leukemia / Lymphoma Study Group (JPLSG). 第 56 回 米国血液学会学術集会, 2014 年 12 月 5-8 日, サンフランシスコ (米国カルフォルニア州)
 5. **松下弘道**. 日本臨床検査医学会 学会賞受賞講演「白血病関連遺伝子異常の病態と検査への応用」. 第 61 回 日本臨床検査医学会学術集会, 2014 年 11 月 22-25 日, 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)
 6. Kinoshita A, **Matsushita H**, 他 15 名 (3 番目) . The prognostic relevance of the

- 2008 WHO classification of myeloid neoplasms in childhood acute myeloid leukemia. 第 19 回 欧州血液学会学術集会, 2014 年 6 月 12-15 日, ミラノ (イタリア)
7. Tanaka Y, **Matsushita H**, 他 6 名 (2 番目). Elimination of interference by lipids in the Low WBC mode in the automated hematology analyzer XN-2000. The 9th Cherry Blossom Symposium, 2014 年 4 月 17-19 日, 横浜赤レンガ倉庫 (神奈川県・横浜市)
 8. Kawai H, **Matsushita H**, **Ando K**, 他 7 名 (2 番目). Functional analysis of SEPT9-ABL1 chimeric fusion gene derived from T-prolymphocytic leukemia. 第 55 回 米国血液学会学術集会, 2013 年 12 月 7-10 日, ニューオーリンズ (米国ルイジアナ州)
 9. Tabe Y, **Matsushita H**, 他 8 名 (5 番目). Molecular mechanisms of inhibition of ribosomal biogenesis and translational flux by the selective Inhibitor of nuclear export (SINE) XPO1/CRM1 antagonist KPT-185 in mantle cell lymphoma. 第 55 回 米国血液学会学術集会, 2013 年 12 月 7-10 日, ニューオーリンズ (米国ルイジアナ州)
 10. Tabe Y, **Matsushita H**, 他 7 名 (5 番目). Molecular mechanisms of adipocyte-leukemia interactions revealed by the quantitative proteomics technology: pro-survival function of adipocyte-derived free fatty acids on acute monoblastic leukemia mitochondrial biogenesis. 第 55 回 米国血液学会学術集会, 2013 年 12 月 7-10 日, ニューオーリンズ (米国ルイジアナ州)
 11. Tabe Y, **Matsushita H**, 他 9 名 (4 番目). Metabolic shift in hypoxia-adapted CML cells and mechanisms of acquired dasatinib resistance uncovered by proteomic iTRAQ profiling. 第 55 回 米国血液学会学術集会, 2013 年 12 月 7-10 日, ニューオーリンズ (米国ルイジアナ州)
 12. Tabe Y, **Matsushita H**, 他 10 名 (4 番目). Integrative genomic and proteomic analysis of low-dose ionizing irradiation effects on bone marrow stromal microenvironment and on survival of pre-leukemic cells. 第 55 回 米国血液学会学術集会, 2013 年 12 月 7-10 日, ニューオーリンズ (米国ルイジ
 - アナ州)
 13. Tabe Y, **Matsushita H**, 他 10 名 (4 番目). Efficacy and mechanisms of the mTOR inhibitor AZD2014 combined with L-Asparaginase or JAK2 inhibitor TG101348 in ALL. 第 55 回 米国血液学会学術集会, 2013 年 12 月 7-10 日, ニューオーリンズ (米国ルイジアナ州)
 14. ダムディンスレン アナラ, **松下弘道**, 他 2 名 (2 番目). The role of FLT3-ITD in the chemoresistance of AML. 第 60 回 日本臨床検査医学会学術集会, 2013 年 10 月 31 日-11 月 3 日, 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)
 15. Takahashi H, **Matsushita H**, 他 12 名 (2 番目). A diversity of cases in AML with promyleocytic differentiation: A report from JPLSG. 第 75 回 日本血液学会学術集会, 2013 年 10 月 11-13 日, ロイトン札幌 (北海道・札幌市)
 16. Damdinsuren A, **Matsushita H**, 他 8 名 (2 番目). Downstream targets of FLT3-ITD in Ara-C resistance of leukemic cells. 第 75 回 日本血液学会学術集会, 2013 年 10 月 11-13 日, ロイトン札幌 (北海道・札幌市)
 17. 小笠原篤, **松下弘道**, 他 4 名 (5 番目). 総合血液学検査装置 ADVIA2120 を用いた血小板関連項目における基礎的検討. 第 14 回 日本検査血液学会学術集会, 2013 年 7 月 27-28 日, 京王プラザホテル (東京都・新宿区)
 18. 荒川聡, **松下弘道**, 他 6 名 (6 番目). AML with myelodysplasia-related changes (AML/MRC)における骨髄異形成と後天性染色体異常の関係について. 第 14 回 日本検査血液学会学術集会, 2013 年 7 月 27-28 日, 京王プラザホテル (東京都・新宿区)
 19. 日下拓, **松下弘道**, 他 8 名 (7 番目). 当院における CD34、HLA-DR 陰性 AML38 例の検討. 第 14 回 日本検査血液学会学術集会, 2013 年 7 月 27-28 日, 京王プラザホテル (東京都・新宿区)
 20. 二見恭子, **松下弘道**, 他 5 名 (6 番目). 表面免疫グロブリン κ , λ 鎖のそれぞれにクロナリティを認めた白血化 B-cell lymphoma の 1 例. 第 23 回 日本サイトメトリー学会学術集会, 2013 年 6 月 22-23 日, 日本医科大学 (東京都・文京区)
 21. **松下弘道**, 安藤潔. SEPT9-ABL1 融合遺

伝子による白血病発症機構について. 第 17 回 造血器腫瘍研究会, 2013 年 2 月 2-3 日, 宮崎シーガイア(宮崎県・宮崎市)

22. Tabe Y, **Matsushita H**, 他 9 名(6 番目). Analysis of Dasatinib-Induced Molecular Mechanisms of Apoptosis in Hypoxia-Adapted CML Cells Utilizing Quantitative Proteomics Technology. 第 54 回 米国血液学会学術集会, 2012 年 12 月 8-11 日, オーランド(米国フロリダ州)
23. Kinoshita A, **Matsushita H**, 他 16 名(3 番目). Myelodysplasia-Related Changes Have Adverse Prognostic Significance in Children with Acute Myeloid Leukemia: A Report From the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG). 第 54 回 米国血液学会学術集会, 2012 年 12 月 8-11 日, オーランド(米国フロリダ州)
24. Damdinsuren A, **Matsushita H**, 他 2 名(2 番目). Analysis of chemotherapy-resistance of AML cells with FLT3-ITD. 第 59 回 日本臨床検査医学会学術集会, 2012 年 11 月 29 日-12 月 2 日, 国立京都国際会館(京都府・京都市)
25. **Matsushita H**, Ando K, 他 9 名(1 番目). Functional analysis of SEPT9-ABL1 chimeric fusion gene derived from T-prolymphocytic leukemia. 第 74 回 日本血液学会学術集会, 2012 年 10 月 19-21 日, 京都国際会議場(京都府・京都市)
26. 二見恭子, **松下弘道**, 他 7 名(6 番目). 慢性骨髄性白血病に対するダサチニブ投与後に出現する大顆粒リンパ球の検討. 第 13 回 日本検査血液学会学術集会, 2012 年 7 月 28-29 日, 高槻現代劇場(大阪府・大阪市)
27. **Matsushita H**, Yahata T, Ando K, 他 10 名(1 番目). Humanized in vivo APL model using human cord blood initiate by induction of PML-RARA. The 3rd JSH International Symposium 2012 in Kawagoe, 2012 年 5 月 26-27 日, 川越プリンスホテル(埼玉県・川崎市)

〔図書〕(計 1 件)

1. 松下弘道. 末梢血検査, 血小板・凝固機能の検査, 生化学検査, 免疫機能検査, 染色体・遺伝子検査, 骨髄検査(pp. 29-53). 安藤潔 横田弘子(編) 血液・造

血器疾患エキスパートナーシング. 2015 年 3 月発行, 南江堂

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下 弘道 (MATSUSHITA, Hiromichi)
東海大学・医学部・講師
研究者番号: 50286481

(2) 研究分担者

安藤 潔 (ANDO, Kiyoshi)
東海大学・医学部・教授
研究者番号: 70176014

(3) 連携研究者

八幡 崇 (YAHATA Takashi)
東海大学・医学部・講師
研究者番号: 10398753