

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461419

研究課題名(和文) 骨髄系造血器腫瘍からの樹状細胞の分化とその意義の解析

研究課題名(英文) Dendritic cell differentiation from myeloid neoplasm

研究代表者

水木 満佐央 (Mizuki, Masao)

大阪大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80283761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウス造血幹細胞分画から樹状細胞(DC)分化を誘導する系を樹立し、FLT3やRas以外のtype Iの白血病関連遺伝子変異によりDC分化が障害され、conventional DC (cDC)がplasmacytoid DCに比して有意に誘導されることを示した。TEL-PDGFRbetaを有する白血病患者において、cDC分画が腫瘍クローン由来であることを明らかにした。次にDC分化を示す白血病例において、腫瘍特異抗原WT1に対するCD8+T細胞分画を認め、白血病由来DCによる腫瘍特異抗原の提示能を示した。また組織系不明の軟部腫瘍の全エクソーム解析によりMAP2K1変異を認め組織球系由来を支持した。

研究成果の概要(英文)：We have established the dendritic cell (DC) differentiation system from murine hematopoietic stem cell fraction. We have shown that type I leukemia-related gene abnormalities except for FLT3 and ras, blocked DC differentiation and preferentially induced the differentiation of conventional DC (cDC) compared to plasmacytoid DC. In patients with TEL-PDGFRbeta positive chronic myelomonocytic leukemia, cDC subset was found to be derived from leukemic clone. In patients with acute myelogenous leukemia showing spontaneous DC differentiation, there was a CD8+T cell subset, which reacted with leukemia-specific antigen, WT1, suggesting that leukemia-derived DC could present leukemia-specific antigens. Finally, origin-unknown soft tissue tumor was found to be histiocytic lineage, by whole exome sequencing which showed MAP2K1 mutation.

研究分野：造血器腫瘍学

キーワード：樹状細胞 白血病関連遺伝子 cDC pDC

1. 研究開始当初の背景

樹状細胞 (DC) は高い抗原提示能を有し、免疫反応の中核を担う細胞であり、抗腫瘍免疫においても中心的な役割を担っている。白血病治療においても、自己末梢血・骨髓から DC を誘導し、白血病細胞由来抗原をパルスした後に患者体内に戻すことで、白血病に対する抗腫瘍免疫を誘導する治療が試みられている。これらの DC 療法は DC の数が限られることや、白血病細胞特異的抗原の発現の点で効果は限定的である。一方、造血幹細胞もしくは前駆細胞レベルの腫瘍である急性白血病や慢性骨髄性白血病は、DC への分化能を有する腫瘍であり、実際に急性骨髄性白血病や慢性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群においては、患者末梢血に白血病細胞由来の DC の存在することが確認されている。これらの白血病由来 DC は、元の白血病細胞に内在する遺伝子異常に対応する白血病特異的抗原を発現しているはずであり、白血病由来抗原に対する免疫応答を生じることが可能である。これらの白血病由来 DC が抗腫瘍免疫において果たしている役割は明確でなく、これらの白血病細胞由来 DC が白血病発症や再発においてどのような意義を有しているかを明らかとすることは、白血病細胞特異的免疫療法の開発に重要なテーマといえる。

2. 研究の目的

白血病細胞からの DC 分化に着目し白血病細胞由来の DC の分化、成熟の障害について検討を行う。特に、DC には conventional DC と plasmacytoid DC の 2 種類の DC がそれぞれ機能分担は異なり、plasmacytoid DC には Treg の活性化能などから免疫寛容を誘導する作用があることも指摘されている。白血病由来 DC について、この 2 種類の DC 分化の実際を明らかとすることで、白血病細胞からの DC 分化及び機能障害の可能性を検討する。また、以上のような白血病由来 DC の分化、成熟障害の結果として、これらの白血病由来 DC が、白血病細胞に対する免疫を誘導することができるのか、もしくは免疫寛容を生じているのかを明らかとし、白血病特異的抗原に対する抗腫瘍免疫を生じる能力を有している白血病細胞由来 DC が存在しながら、白血病発症に至っている機序について検討する。

3. 研究の方法

(1) 骨髄系腫瘍関連遺伝子異常による DC 分化障害及び機能障害の検討：造血幹細胞や多能前駆細胞を含むと考えられているマウス KSL 細胞に、レトロウイルスベクターにより骨髄系腫瘍関連遺伝子である class I 変異 (細胞増殖を促進する遺伝子群)、class II 変異 (細胞分化を障害する遺伝子群) 導入を行う。定常状態に対応する FLT3 ligand による培養を行い DC 分化、機能を評価する。

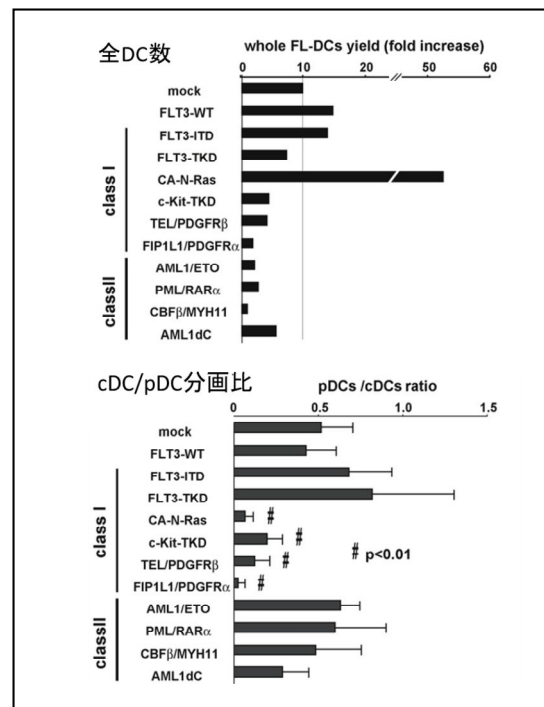
(2) 造血器腫瘍患者における腫瘍細胞由来 DC の存在、機能障害の検討  
造血器腫瘍患者の末梢血、骨髓液を採取し、DC 分画に対応する lin-CD11c;CD123-分画、lin-CD11c-CD123+分画を FACS にて sorting し形態、細胞数、遺伝子異常の有無、T 細胞刺激能について評価を行う。

(3) DC 及び組織球系腫瘍の診断  
DC 及び組織球系腫瘍はまれな腫瘍であり、一部に診断困難な例が存在する。最近、これらの腫瘍に共通する遺伝子異常が報告されている。組織系腫瘍が疑われる例で病理的検索では診断困難な例において、全ゲノム、全エクソーム解析を行い、遺伝子異常の特徴より組織系腫瘍診断の補助診断を行う。

4. 研究成果

① マウス造血幹細胞分画 LSK を FLT3 ligand のみで培養することにより、定常状態での DC 分化 (FL=DC) を誘導する系を樹立した。この系において LSK 分画に白血病関連遺伝子を導入し、DC 分化に及ぼす影響を検討した。その結果、FLT3 や Ras の活性化変異体を除く、type I の白血病関連遺伝子変異においては FL-DC 分化が障害され数が減少すること、cDC が pDC に比して有意に誘導されることが示された。

図 1



Type I 遺伝子異常の一つである TEL-PDGFRbea を有する慢性骨髄単球性白血病 (CMML) の末梢血において DC 分画を検討した結果、正常に比して DC 分画は 1/7 に低下しており、マウス LSK の実験結果と合致していたが、pDC/cDC 比は 8/3 と pDC 優位でありマウスの結果とは異なっていた。さらにこ

これらの DC 分画が真に腫瘍細胞由来であるかどうかを確認するために、各 cDC 分画、pDC 分画を sorting し、定量的 PCR により TEL-PDGFRbeta の発現を検討した。腫瘍細胞が濃縮されていると考えられる単球分画を sorting し、その分画での TEL-PDGFRbeta の発現量を基準に比較すると、cDC 分画の発現は 2 倍、pDC 分画は 0.6 倍の発現であった。この結果は、TEL-PDGFRbeta を有する CMMoL 例においては腫瘍クローン由来の c DC が存在すること、また pDC の一部は腫瘍クローンであるが一部は正常クローンが存在していることが示された。

②急性骨髄性白血病例で白血病細胞が CD11+CD4+CD14- を有し自然に DC 分化を示した例において、白血病細胞の DC としての機能の有無を評価した。本例は難治性のため、同種造血幹細胞移植を行ったが、その際に生着不全のために非血縁者由来の骨髄と臍帯血の両者が移植されることとなった。その後、day28 の時点で末梢血顆粒球の生着を確認し、day81 の時点で完全に臍帯血由来の造血回復を生じた。一方、末梢血の T 細胞においては、day175 まで臍帯血由来と非血縁者骨髄由来の細胞が共存した。本例は day91 の時点で骨髄、髄液に再発を認めたと、免疫抑制剤の減量によりその後白血病の再発は認めなかった。この例においては、腫瘍特異抗原として WT が存在していたので、WT1 に対する免疫応答について検討を行った。その結果、WT1 テトラマーに対する CD8+T 細胞分画を認めた。このことは、DC 分化を示した白血病細胞が有効に腫瘍特異抗原を T 細胞に提示できることを示している。また、CD4+T 細胞、CD8+T 細胞の各分画での臍帯血、骨髄のキメリズム解析から、腫瘍特異抗原に反応する T 細胞は、臍帯血 T 細胞内にあり、骨髄由来 T 細胞は、臍帯血由来 T 細胞の免疫応答を強化するものとして機能していた可能性が示唆された。

20 代の女性の肩関節から鎖骨上に発症した軟部腫瘍の組織球系分化について検討した。数年来の肩の痛みがあり緩徐に増悪傾向であったが、同部の違和感、運動障害、頸部リンパ節腫大を認めて受診。精査の結果、肩関節内、頸部から鎖骨下にかけて多数の腫瘍認めた。血液検査上は CRP4-7mg/dl、gIb23.8%と慢性炎症所見に合致する異常所見を認めた。肩関節部および鎖骨上の腫瘍組織の病理診断上は atypical epithelioid sarcoma の診断であった。各種免疫染色の解析からは、上皮系マーカー AE1+3、CAM5.2 は一部のみに陽性。神経系、筋肉系、melanoma、血管系、リンパ球系マーカー、顆粒球系マーカーは陰性であった。一方、組織球系マーカーは CD31+/-、CD4、CD68+/-、lysozyme+/-、CD21-、CD1a+/-、fascin-、TCL-1+/-、CD163+、CD23-と一部陽性が認められた。また、その他、INI-1+、Igh/TCR rearrange-であり、免

疫染色の結果からは総合的に組織球系分化が疑われた。診断困難な組織球系腫瘍として、本腫瘍の全エクソーム解析を行った結果、MAP2K1 変異 Glu51Val が認められ組織球系腫瘍の可能性が支持された。以後、ステロイド治療のみで継続し、炎症所見は改善、腫瘍病変も徐々に縮小傾向にある。肉腫の経過よりは、緩徐進行型の組織系腫瘍に合致する経過である。

表 1 主な遺伝子変異の解析

遺伝子名	変異
MAP2K1	Glu51Val
PI3KCA	-
B-RAF	-
A-RAF	-
JAK2	-
RB	-
P53	-
STAT3	-
STAT5	-
N-RAS	-
K-RAS	-
FGFR1	-
FGFR3	-
c-Kit	-
FLT3	-
PTEN	-
GAB1	-

## 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 4 件)

① Nishida T, Hiramatsu N, Mizuki M, Nagatomo I, Kida H, Tazumi K, Shinzaki S, Miyazaki M, Yakushijin T, Tatsumi T, Iijima H, Kiso S, Kanto T, Tsuji M, Takehara T. Managing hepatitis B virus carriers with systemic chemotherapy or biological therapy in the outpatient clinic. *Hepatol Res*, 査読あり、43,2013,339-346  
doi:10.1111/j.1872-034X.2012.01073.x.

② Maeda, Hosen N, Fukushima K, Tsuboi A, Morimoto S, Matsui T, Sata H, Fujita J, Hasegawa K, Nishida S, Nakata Y, Takashima S, Nakajima H, Fujiki F, Tatsumi N, Kondo T, Hino M, Oji Y, Oka Y, Kanakura Y, Kumanogoh A, Sugiyama H. *Blood Cancer J*. 査読あり、3、2013、e130  
doi:10.1038/bcj.2013.29.

Sata H, Shibayama H, Maeda I, Habuchi Y, Nakatani E, Fukushima K, Fujita J, Eoze S,

Tadokoro S, Maeda T, Mizuki M, Kosugi S, Nakagawa M, ueda S, Iida M, Tokumine Y, Azenishi Y, Mitsui H, Oritani K, Kanakura Y. Quantitative polymerase chain reaction analysis with allele-specific oligonucleotide primers for individual IgH VDJ regions to evaluate tumor burden in myeloma patients. Exp Hematol. 査読あり 43, 2015, 374-381  
doi; 10.1016/j.exphem.2015.01.002

Morio K, Mizuki M, Sozu T, Uejima E. Risk factors for cytarabine-induced cutaneous toxicity in patients with hematological malignancies. 査読あり 60, 2015, 168-173  
doi: 10.1159/000371839

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 4 件)

①水木満佐央、金倉讓：ここまでの白血病/MDS 治療 中山書店 2013 全頁 340 (85-93)

②水木満佐央：血液疾患 診断・治療指針 分子標的治療 中山書店 全頁 560 (112-120)

水木満佐央、金倉讓 IMiDs 基礎と臨床 2015 メディカルビュー社 2015 全頁 233(48-55)

水木満佐央、金倉讓 入門腫瘍内科学 慢性骨髄性白血病 篠原出版 2015 全頁 320 (259-261)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水木満佐央 (MIZUKI Masao)  
大阪大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号：80283761

### (2) 研究分担者

金倉讓 (KANAKURA Yuzuru)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：20177489

柴山浩彦 (SHIBAYAMA Hirohiko)  
大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：60346202

藤田二郎 (FUJITA Jiro)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：90608720