

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461575

研究課題名(和文) 若年性骨髄単球性白血病の治療層別化を目指した白血病性幹細胞の網羅的遺伝子解析

研究課題名(英文) Leukemic stem cell and genetic analysis in Juvenile myelomonocytic Leukemia

研究代表者

坂下 一夫 (SAKASHITA, Kazuo)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：10345746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：若年性骨髄単球性白血病(JMML)は遺伝子解析により均一な疾患ではなく、治療抵抗性の症例から経過観察のみで血液学的に軽快する症例など様々な臨床経過を示すことが明らかとなった。我々はマウスストローマ細胞株である AGM-S3細胞株とJMML CD34陽性細胞をサイトカイン存在下で共培養することでJMML白血病幹細胞様細胞を培養増殖させ得る系を確立した。遺伝子の網羅的解析からプロトカドヘリン(PCDH17)に注目し解析を進め、急性リンパ性白血病においてはPCDH17のDNAメチル化が予後と関連あることを報告した。PCDH17の機能解析を行い、がん抑制遺伝子として作用していることを証明した。

研究成果の概要(英文)：Juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) is a rare myelodysplastic/myeloproliferative disorder that occurs during infancy and early childhood. Clonogenic JMML progenitors cannot be maintained in culture because they differentiate and the leukemic clone is lost within a few weeks. Here, we demonstrated that AGM-S3 in combination with hematopoietic growth factors expand CD34+CD38- cells in patients with JMML showing PTPN11, NRAS, or KRAS mutation in the fetal bovine serum-containing culture. From genome-wide DNA methylation analysis, we demonstrated that there was a significant correlation between methylation status of PCDH17 and event-free survival or overall survival in ALL. PCDH17 methylation at onset may be related to poor prognosis, and a new biomarker to predict relapse in ALL. PCDH17 gene may function as a tumor suppressor gene in leukemic cells. Now we examine the rule of PCDH17 gene in JMML.

研究分野：小児血液腫瘍

キーワード：若年性骨髄単球性白血病 白血病幹細胞 PCDH17

1. 研究開始当初の背景

若天性骨髄単球性白血病(JMML)は in vitro で GM-CSF に高感受性を示すことが特徴的な乳幼児に好発する難治性白血病である。近年、遺伝子の解析が行われ、RAS/MARK シグナル伝達関連の遺伝子異常が明らかになった。JMML 症例の約 35% に PTPN11 遺伝子異常、約 20% に RAS 遺伝子異常、約 15% に NF1 遺伝子異常、約 10~15% に CBL 遺伝子異常が報告されている。JMML は均一な疾患ではなく、治療抵抗性の症例から経過観察のみで血液学的に軽快する症例など様々な臨床経過を示すことが明らかとなった。治療に関する問題点として多くの JMML 例は診断後急速に病勢が進行するが、無治療または 6-mercaptopurine など non-intensive chemotherapy により血液学的寛解が得られる症例もみられることから、初診時に移植適応や時期を一律に決定することが困難となり、さらに経過観察できるのか否か判断に迷うなど治療方針に混乱が生じている。さらに、乳児に対して行われる移植は前処置による合併症が大きく、可能ならば成長を待って移植を行うべきである。従って、初診時に病態進展の予測ができれば患児にとってきわめて有益である。

2. 研究の目的

本研究では JMML の進行例や自然軽快例の白血病性幹細胞を用いてジェネティックおよびエピジェネティックの観点から網羅的遺伝子解析を行い、JMML 病勢の多様性を決定する遺伝子を同定し、JMML に対する治療の層別化・個別化のための指標を明らかにしたい。さらに、分子標的治療の標的遺伝子の同定を試みる。

3. 研究の方法

- (1) 培養で得られた細胞の白血病性幹細胞であることの証明について免疫不全マウスへの移植実験を行った。
- (2) 白血病性幹細胞と臨床像の比較検討。
- (3) 遺伝子網羅的解析を行い、候補遺伝子の抽出。
- (4) PCDH17 の造血器腫瘍における発現と発現調節についての解析。
- (5) PCDH17 の機能解析。

4. 研究成果

(1) JMML 白血病性幹細胞について
 現在まで JMML 由来の細胞株は樹立されていない。最近我々はマウスストローマ細胞株である aorta-gonad-mesonephros (AGM)-S3 細胞株と JMML CD34 陽性細胞をサイトカイン存在下で共培養することで JMML 白血病幹細胞様細胞である CD34+CD38-細胞を培養増殖させ得る系を確立した。造血幹細胞は胎生初期に AGM 領域で発生、増殖し、胎児肝さらに骨髄へと移

動すると考えられている。AGM 領域を胎生 10.5 日のマウス胚から採取し樹立したストローマ細胞株が AGM-S3 である。この培養系で得られた細胞を免疫不全マウスに移植したところ、JMML の病態が再現することが確認され、この培養系において JMML 白血病幹細胞が維持されていることが証明された。さらにストローマ細胞を OP-9 (新生児マウス骨髄由来ストローマ細胞株)、MS-5 (成人マウス骨髄由来ストローマ細胞株)に替えて検討を行ったところ、CD34+CD38-細胞の増殖割合は減少あるいは消失したことから JMML 白血病幹細胞の増殖には未熟な造血環境が非常に重要な役割を担っていることが推察される(図1)。以前我々は JMML 症例の出生時のガスリー検査のろ紙より DNA を採取し、JMML 発症と関連する PTPN11 遺伝子変異あるいは RAS 遺伝子変異が同定できるか、PCR 法を用いて検討したところ、7 例中 7 例で検出が可能であった。この結果より、JMML は胎生期にすでに発症し RAS 経路の遺伝子変異と伴に胎児期の造血環境が病態形成に重要な役割を担っていることが推察された。さらに無治療経過観察されている症例においては JMML 幹細胞の増殖能が低下していることを報告した(Sakashita et al, Leukemia 2015) (図2)。

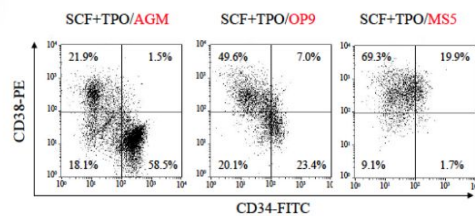


図1. ストローマ細胞の違いによる JMML 幹細胞の維持能。

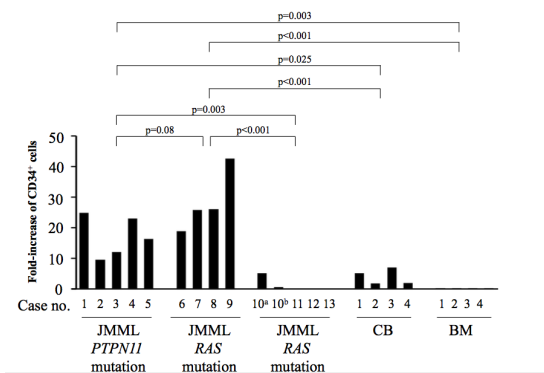


図2 遺伝子変異別の白血病性幹細胞の増殖能。Case no. 10 ~13 が経過観察例。

さらにこの培養系を用いて JMML の治療薬の有効性について解析を行ったところ、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が白血病性幹細胞の増殖能を低下させ、治療薬としての可能性を見出した（現在投稿中）。

（2）プロトカドヘリン（PCDH）17 のがん抑制遺伝子の可能性

遺伝子網羅的解析から PCDH17 に注目し解析を進めた。はじめに様々な造血器腫瘍について、発現や発現調節について検討したところ急性リンパ性白血病においては PCDH17 の DNA メチル化が予後と関連があることを報告した（Uyen NT, Sakashita, et al *Pediatr Blood Cancer*. 2016）（図 3）。PCDH17 の造血における役割の解析のため、白血病細胞株を利用し、shRNA で遺伝子をノックダウンあるいは PCDH17 の遺伝子導入を行い、PCDH17 役割の解析を行った。その結果、造血器腫瘍においてはがん抑制遺伝子として作用していることが明らかとなった（現在投稿中）。現在は JMML について解析行っている。

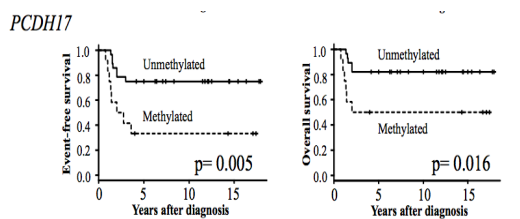


図 3 PCDH17 の DNA メチル化の有無による EFS と OS.

（3）今後の方針について

JMML は胎生期にすでに発症し RAS 経路の遺伝子変異と伴に胎児期の造血環境が病態形成に重要な役割を担っていることが推察された。PCDH17 など造血環境ニッチと JMML 白血病性幹細胞の細胞間作用が JMML 白血病性幹細胞の増殖に与える影響を解析することにより JMML の多様な病態を説明でき、分子標的のターゲットになるのではないと考えられた。この成果をもとに平成 29 年度科学研究費「造血微小環境に着目した若年性骨髄単球性白血病の新規治療法の開発」を獲得し、さらに新規治療法の開発を目指す。

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）

- 1: Uyen TN, Sakashita K, Al-Kzayer LF, Nakazawa Y, Kurata T, Koike K. Aberrant methylation of protocadherin 17 and its prognostic value in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2017 ;64. doi: 10.1002/pbc.26259. （査読：有）
- 2: Sakashita K, Matsuda K, Koike K. Diagnosis and treatment of juvenile myelomonocytic leukemia. *Pediatr Int*. 2016 ;58:681-90. doi: 10.1111/ped.13068. Review. （査読：有）
- 3: Nakazawa Y, Matsuda K, Kurata T, Sueki A, Tanaka M, Sakashita K, Imai C, Wilson MH, Koike K. Anti-proliferative effects of T cells expressing a ligand-based chimeric antigen receptor against CD116 on CD34(+) cells of juvenile myelomonocytic leukemia. *J Hematol Oncol*. 2016 Mar 16;9:27. doi: 10.1186/s13045-016-0256-3. （査読：有）
- 4: Sakashita K. [Juvenile myelomonocytic leukemia (JMML): recent advances in molecular pathogenesis and treatment]. *Rinsho Ketsueki*. 2016;57:137-46. doi: 10.11406/rinketsu.57.137. Review. （査読：無）
- 5: Sakashita K, Kato I, Daifu T, Saida S, Hiramatsu H, Nishinaka Y, Ebihara Y, Ma F, Matsuda K, Saito S, Hirabayashi K, Kurata T, Uyen LT, Nakazawa Y, Tsuji K, Heike T, Nakahata T, Koike K. In vitro expansion of CD34(+)CD38(-) cells under stimulation with hematopoietic growth factors on AGM-S3 cells in juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia*. 2015 Mar;29(3):606-14. doi: 10.1038/leu.2014.239. （査読：有）

〔学会発表〕(計1件)

1. Uyen NT, Sakashita K, Koike K.
Role of PCDH17 expression in pediatric
acute leukemia. 第77回日本血液学会
学術集会(10月16日～18日、2015 金
沢)

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂下 一夫 (SAKASHITA, Kazuo)
信州大学・医学部附属病院・特任研究員
研究者番号：10345746

(2)研究分担者

小池 健一 (KOIKE, Kenichi)
信州大学・医学部・特任教授
研究者番号：40143979