

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860795

研究課題名(和文) 異種移植モデルを用いたダウン症候群関連白血病の病態解析および特異的治療の基盤開発

研究課題名(英文) Pathogenetic and therapeutic studies of myeloid leukemia with Down syndrome using xenograft model

研究代表者

才田 聡 (SAIDA, SATOSHI)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70638254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ダウン症候群に起こる一過性異常骨髄増殖症(TAM)と引き続いて起こる白血病(AMKL)は、前白血病状態から白血病への移行過程を観察し得るモデル疾患である。我々は、TAM臨床検体を移植したTAMモデルマウスと、そこから継代が可能であった白血病モデルマウスを確立した。TAMモデルマウスと白血病モデルマウスのそれぞれについて詳細な遺伝学的解析を行ったところ、TAMマウスと白血病マウスでは、DNA修飾因子および遺伝子の発現パターンがそれぞれで異なり、この結果は臨床検体を用いた解析結果と一致した。本モデルを用いた解析により、白血病化に関わる重要な因子が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Transient abnormal myelopoiesis (TAM) is a clonal pre-leukemic disorder in neonates of Down syndrome. In this study, we established a xenograft model of the leukemia, which mimicked the progression of TAM to myeloid leukemia (ML-DS). Using comprehensive genetic and epigenetic analyses in this xenograft model, we found an important factor in a progression from TAM to ML-DS.

研究分野：血液腫瘍

キーワード：白血病 ダウン症候群 一過性異常骨髄増殖症 急性巨核芽球性白血病

## 1. 研究開始当初の背景

小児悪性腫瘍はおよそ5千~1万人に1人の割合で発症し、全小児主要死因の7分の1を占める疾患群である。小児悪性腫瘍の最も多くを占める白血病(35%)の治癒率は改善されつつあるが、発症メカニズムについては依然として不明な点が多い。検査・診断法の進歩、化学療法や支持療法の発達、分子標的薬剤の開発や移植療法の発展により治癒率は改善されつつある。しかし治療抵抗例や再発例も多く存在し、このようなハイリスク症例における予後の層別化や発症メカニズムに即した新規治療戦略の構築が求められている。

近年「がん」の発症機構については、複数の遺伝子異常が蓄積することによって引き起こされる「多段階発がん説」が広く受け入れられており、これらは主に固形腫瘍における前がん病変からの発がん過程の観察において明らかにされてきた。一方で、一般に発症を予測することができない白血病において、このような前がん状態からのがんの進展機構についての解析はこれまでほとんどなされていない。

白血病において、この多段階発がん説を再現し得る疾患としてダウン症候群児に起こる一過性骨髄異常増殖症(TAM)が挙げられる。TAMはダウン症候群の新生児の10%に起こり、新生児期に未熟な巨核球・赤芽球系の細胞が一過性に増殖する疾患で、多くは生後3か月以内に自然消滅する。しかし約10~20%の症例は、自然消滅した後に急性巨核芽球性白血病(AMKL)を発症する。様々な薬剤において治療関連毒性が強く起こるダウン症候群において、TAM後の白血病発症リスクの層別化および治療関連合併症の少ない新規治療の開発のために、白血病進展機序の解明が求められている。TAMはダウン症候群に存在する21トリソミー(1stヒット)に転写因子GATA-1の異常(2ndヒット)が加わって発症することが知られており、さらにTAM細胞に何らかの遺伝的異常(3rdヒット)が加わりAMKLへと進展することが推測されている(下図)。



このようにTAM/AMKLは前白血病状態から白血病への移行過程を観察し得るモデル疾患と考えられる。

従来TAM細胞の培養は困難であり、in vitro, in vivoともに効率よく増殖させる手法が存在しなかった。我々は高度免疫不全マウスであるNOD/SCID/ null(NOG)マウスを用いることで、TAMの異種移植モデルを確立した。本モデルはヒト細胞を用いて前白血病から白血病への進展過程を前方視的に再現し得

るマウスモデルであり、次世代シーケンサーなどの新技術と組み合わせることで、網羅的かつ、経時的な遺伝子解析を行うことができる。これによりTAMの白血病発症リスクの層別化や、AMKL発症に関わる候補遺伝子を明らかとすることが期待できる。またこのTAM/AMKLモデルの解析は本疾患のみならず、ひいては他の白血病の発症メカニズムの解明にも寄与する可能性がある。

## 2. 研究の目的

従来モデルに比して圧倒的に高いヒト血球の生着率を達成できるNOD/SCID/ynullマウス(NOGマウス)を用い、前白血病状態である一過性骨髄増殖症(TAM)から急性巨核芽球性白血病(AMKL)への進展を前方視的に再現する動物モデルを確立する。

ヒト細胞を用いて前白血病から白血病への進展過程を前方視的に再現し得るマウスモデルの確立により、TAMの白血病発症リスクの層別化や、AMKL発症に関わる要因を明らかとする。またこのTAM/AMKLモデルの解析により、他の白血病の発症メカニズムの解明にも寄与する。本モデルを用いることにより、白血病への進展に関わる真の因子の同定し、白血病進展に関わる因子を標的とした新規治療法開発の基盤技術の確立を目指す。

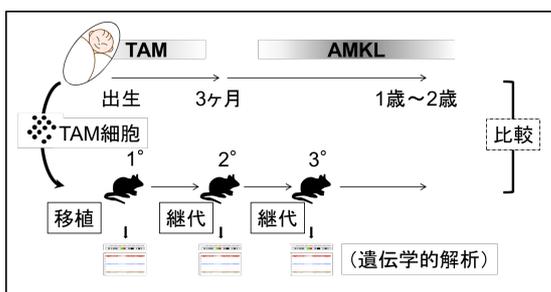
## 3. 研究の方法

全国の研究協力施設からTAM患者検体(TAM芽球が含まれる末梢血)および診断時の臨床データを収集する。診断時のTAM患者検体の末梢血から単核球分画を抽出し凍結保存する。その一部を免疫不全マウスであるNOGマウス(放射線照射済)に尾静脈経由で移植する( $1 \times 10^6$ 個/body)。

移植後のXenograftマウスの骨髄から定期的に骨髄液を回収し、ヒトCD45抗原(ヒト汎白血球抗原)およびヒトCD117抗原(c-kit: TAM細胞に高率に発現する)の発現の有無を調べる。これによりヒト由来細胞が生着していることを確認する。さらに元々の患者検体とマウス内で増殖しているTAM由来細胞について表面抗原解析、GATA1変異解析、染色体検査を施行する。これにより患者TAM検体がNOGマウス内で増殖していることを確認する。

生着が確認できたマウスについて、生着後12-18週時点で、次の世代のマウスへの継代移植を行った。継代移植で次世代マウスへ継代可能であったマウスは、白血病細胞の特徴である「自己複製能」を有していると考えられ、これらのマウスではTAMから白血病への進展過程が再現されていると考えられる。

白血病進展モデルの作製が可能であった症例については、TAM 由来細胞の動態と実際の TAM 患者の臨床経過の比較を行う。



さらに生着が得られた TAM モデルマウスおよび白血病進展モデルマウスについて、移植後 12-18 週の時点で、骨髄から細胞を回収する。回収した骨髄の細胞から、ヒト汎血球抗原である CD45 抗原に対する抗体(ビーズ)を用いて、TAM 由来細胞を抽出(ソーティング)する。これら回収したヒト TAM 由来細胞から DNA および mRNA を抽出した。これらの検体について SNP アレイ、全エクソン解析、エピゲノム解析(メチル化解析)および遺伝子発現解析(RNA シーケンス)を行った。

#### < 解析手法 >

##### SNP アレイおよび全エクソン解析

正常対照細胞(患者正常 T 細胞または寛解期の細胞)、患者 TAM/AMKL 細胞、およびマウス内 TAM 由来細胞(一次、二次、三次移植検体)について DNA を回収し、SNP アレイ解析を行った。同時に全エキソン配列の濃縮を行った後、次世代シーケンサーによる大量かつ並列の塩基配列決定を行った。

##### 白血病発症に関わる候補遺伝子の抽出

ヒトゲノム参照配列とは異なる腫瘍ゲノム配列から対照ゲノム配列に対して高いアレル頻度を示す 1 塩基変異(SNV)および微小挿入欠失(indel)を体細胞変異の候補とした。この解析を正常対照細胞に対し、実際の TAM/AMKL 患者検体、およびマウス内で増殖させた TAM 細胞(一次、二次、三次移植検体)について行った。

##### DNA メチル化解析

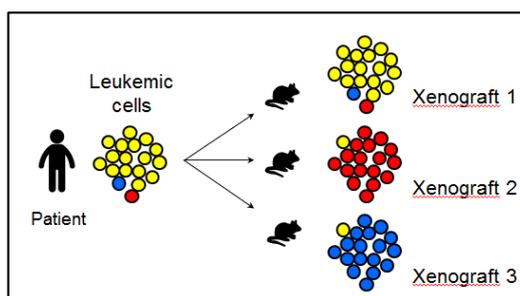
DNA を検体として、Infinium Human Methylation450 BeadChip キット(Illumina)を用いて全ゲノム包括的に DNA メチル化サイトの検出と定量を行った。

##### 遺伝子発現解析(RNA sequencing)

RNA を検体として、Illumina HiSeq 2000 を用いて包括的な遺伝子発現解析を行った。

#### 4. 研究成果

全 15 症例の TAM 患者検体の移植を行った。このうち、生着が確認されたのは 3 症例であった。これらマウス内で増殖している TAM 由来細胞は、遺伝的に異なるサブクローンが、それぞれのマウス内で特異的に増殖していた(下図)。「遺伝的に異なる」とは、同一患者検体において、GATA1 遺伝子変異が異なるクローンや、DNA コピー数が異なるものなどが含まれていた。このことは、同一患者検体中に含まれる TAM 細胞が、そもそも遺伝的に多様な集団であることを示している。



NOG マウスを用いた異種移植を用いることにより、患者検体由来 TAM 細胞を in vivo で長期にわたり維持・増殖させることができた。

さらに TAM 細胞の増殖が確認されたマウスについて、継代移植(次世代のマウスへの 2 次、3 次移植)を行った。これにより、TAM 臨床検体を移植した TAM モデルマウスと、そこから継代が可能であった白血病モデルマウスを確立した。すなわち患者 TAM 細胞および TAM 移植 1 代目マウスを TAM モデルとし、その後継代移植が可能であった継代後期のマウスを白血病モデルマウスとして、TAM モデルマウスと白血病モデルマウスのそれぞれについて解析を行った。

SNP アレイ解析により、TAM モデルマウスや白血病モデルマウスの中に、AMKL に特徴的とされる染色体の構造変化が指摘された。興味深いことに、継代移植が可能であった TAM 細胞は、なんらかの DNA コピー数異常を有していた。これらの異常は AMKL に特徴的な異常と一致しており、このことは臨床における観察(AMKL は TAM の時期に有していなかった染色体の構造異常を有すること)と一致する結果であった。

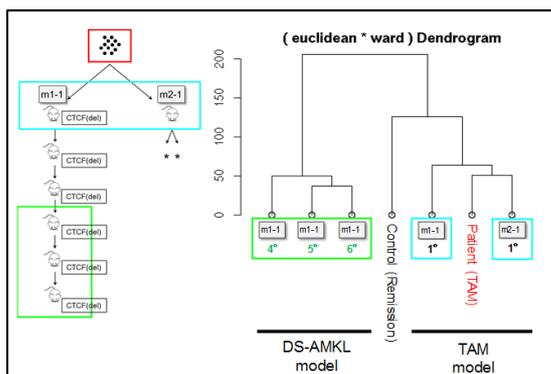
全エクソン解析では、マウス検体において、患者臨床検体中には指摘しない複数の異常を指摘したが、これまでに報告のある既知の白血病関連遺伝子や、白血病化に関わると考えられる新規の遺伝子異常は指摘されなかった。

これらの結果から、マウス内で増殖している TAM 由来細胞は染色体の構造異常を有することが明らかとなった。一方でエキソーム解析では、再現性のある遺伝子異常を指摘せず、白血病化に関わる決定的な因子を同定するには至らなかった。

臨床検体における解析で、TAM から AMKL

に至る過程においてエピゲノム修飾因子である CTCF や Cohesin 関連遺伝子に異常を指摘されていることから (Yoshida et al 2013 Nature)、エピゲノム異常に注目し、マウス検体を用いて DNA メチル化解析を行った。

DNA メチル化パターンの解析では、TAM モデルマウスと白血病モデルマウスで異なるパターンが観察された。さらに DNA メチル化におけるクラスタリング解析で TAM モデルマウスは白血病モデルマウスと異なるカテゴリーに分類され、さらにこれらの結果は、TAM および AMKL の患者臨床検体を用いた解析結果と一致した。



これらの結果から、TAM から白血病 (AMKL) へと進展する過程において DNA のメチル化が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

今回、本モデルで観察された事象は、臨床検体の解析においても再現されており、本モデルは TAM/AMKL の病態を忠実に反映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 4 件)

才田 聡、一過性骨髄異常増殖症における遺伝的多様性、臨床血液、査読有、1 巻、2015、56 巻 12 号、2434-40

Satoshi Saida. Evolution of myeloid leukemia in children with Down syndrome. Int J Hematol. 2016, 103(4), 365-72. 査読有

Atsushi Nemoto, Satoshi Saida, Itaru Kato, et al. Specific Antileukemic Activity of PD0332991, a CDK4/6 Inhibitor, against Philadelphia Chromosome Positive Lymphoid Leukemia. Mol Cancer Ther. 2016. 15(1):94-105. 査読有

Saida S, Umeda K, Yasumi T, Matsumoto A, Kato I, Hiramatsu H, Ohara O, Heike T, Adachi S. Successful reduced-intensity stem

cell transplantation for GATA2 deficiency before progression of advanced MDS. Pediatr Transplant. 2016, 20(2), 333-6. 査読有

[学会発表](計 3 件)

Saida S, Leukemic evolution in Down syndrome. The 6th Japanese society of hematology (JSH) International Symposium 2015. 口演・国際シンポジウム

Saida S, Masahiro N, Tsutomu T, Yoko A, Kiminori T, Kenichi Y, Seishi O, Tatsutoshi N, Toshio H, Ken-ichiro W, Akira W, and Etsuro I. Dysregulation of DNA Methylation Involves in Progression of Myeloid Leukemia in Down Syndrome. 57th Annual Meeting and Exposition of the American Society of Hematology (ASH) 2015/12/6 Orlando, FL 口演・国際学会・査読有

Etsuro I, Kenichi Y, Tsutomu T, Satoshi S, Kenichiro W, Masahiro N, Kiminori T, Tatsutoshi N, Akira W, Seishi O. Genetic and Epigenetic Alterations in Acute Megakaryoblastic Leukemia in Down Syndrome. The 5<sup>th</sup> JCA-AACR Special Joint conference 2016/7/13-15 口演・国際シンポジウム

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 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 0 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

才田聡 ( SAIDA, Satoshi )  
京都大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号： 70638254

(2)研究分担者

(3)連携研究者

伊藤悦朗 ( ITO Etsuro )  
弘前大学・小児科・教授  
研究者番号： 20168339

中畑龍俊 ( NAKAHATA Tatsutoshi )  
京都大学 iPS 細胞研究所・教授  
研究者番号： 20110744

小川誠司 ( OGAWA Seishi )  
京都大学・大学医医学研究科・教授  
研究者番号： 60292900

渡邊健一郎 ( WATANABE Ken-ichiro )  
京都大学・大学院医学研究科・臨床教授  
研究者番号： 20324634