

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：13601
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591154
 研究課題名（和文）ヒストン修飾の制御による若年性骨髄単球性白血病に対する新規治療法の開発
 研究課題名（英文）Histone modification change of Juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) and establishment of JMML stem cell expansion system
 研究代表者
 坂下 一夫（SAKASHITA KAZUO）
 信州大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：10345746

研究成果の概要（和文）：

若年性骨髄単球性白血病(JMML)の末梢血から CD34 陽性細胞を分画し、マウスストローマ細胞である AGM 細胞と GM-CSF または SCF+TPO のサイトカイ存在下で共培養することにより CD34 陽性細胞が増幅できる系の開発に成功した。さらにヒストンアセチル化酵素阻害剤は JMML 幹細胞の増幅能を低下させ、アポトーシスを誘導することがあきらかとなり、治療薬としての有効性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We established the JMML CD34+CD38- cell expansion system. This method may be useful for the development of a new therapeutic method for leukemia stem cells in JMML. And we demonstrated that histone acetyltransferase inhibitor may be useful for JMML treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：若年性骨髄単球性白血病、白血病幹細胞、ヒストン修飾

1. 研究開始当初の背景

若年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白血病で、難治性であることが知られている。近年、遺伝子異常の解析が行われ RAS/MARK シグナル伝達関連の遺伝子異常が明らかとなってきている。JMML 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 c-CBL 遺伝子異常

が報告されている。JMML の病因や診断に関する研究が進歩する一方で、治療に関してはさまざまな問題点が存在している。

①JMML と診断後急速に病勢が進行する症例が多い中で無治療または 6-mercaptopurine(6MP)など non-intensive chemotherapy により血液学的異常をコントロールできる症例もあり、移植の適応や時期を一律に決定することは困難である。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。したが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本症に対する根治療法は造血幹細胞移植であるが、生存率は6割にとどまっている。さらには晩期障害の問題がある。このため、造血幹細胞移植を回避できるような治療薬の開発は必須である。

この様な状況の中で最近、脱メチル化剤(5-AZA)の投与によって病状がコントロールできたJMMLの1症例の報告があった。5-AZAがどの遺伝子に作用することによって治癒に結びついたか明らかではないが有望な治療薬の候補であることが示された(Furlan I, et al. Blood 2009)。これらの知見を踏まえ、我々はJMMLにおけるRASおよびPTPN11遺伝子などの変異がDNAメチル化やヒストン修飾などを介してエピゲノムに影響し、これらのエピゲノムへの影響が症例間における臨床的差異となっているのではないかと仮説を立てた。これまでに申請者らのグループはサイトカインの造血に与えるエピジネティクスの影響や白血病のヒストン修飾の異常に関する解析を行ってきた(Sakashita K. et al. J Clin Invest. 2001, Zho XY, Sakashita K, et al. Cytokine. 2005. Ogawa M, Sakashita K et al. Leuk. Res. 2007)。その過程でJMML細胞はGM-CSFによりヒストンH3の過剰化(hyperacetylation)がおこる症例があることを見出した。ヒストンH3のhyperacetylationは細胞増殖と深く関連があることが報告されており、JMMLにおけるGM-CSFに対する異常増殖はこのヒストンH3のhyperacetylationが一因であることが示唆された。このヒストンH3のhyperacetylationを調節することができれば、JMML細胞の増殖を抑制しうると思われる。ヒトにおけるヒストンH3のヒストンアセチル化酵素(HAT)は多数知られているが、主にPCAFとdGCN5が関連していることが示されている。またAnacardiac acidやGaracinolという物質がHAT活性阻害薬であることが示されている(Balashubramanyam K, et al. J Biol. Chem., 2003)。我々の得られた結果からこれらのHAT阻害薬は有力なJMMLの治療薬の候補になる可能性がある。また、最近ヒストンH3アセチル化はDNA修復と関連していることが報告されている。従ってなぜヒストンH3のhyperacetylationが起きるのかを究明でき、DNA修復とどのような関連があるのか、そしてhyperacetylationが起きている遺伝子を同定できればJMMLの病態解析だけでなく、それらを指標とした分子標的治療薬になりうる可能性があり、さらには遺伝子治療に役立てることが可能と考

えられる。

2. 研究の目的

若年性骨髄単球性白血病(JMML)のGM-CSFによる過剰反応の一因としてヒストンH3の過剰なアセチル化が起きていることを見出した。今回ヒストンH3のアセチル化に着目し、JMMLの治療反応性・予後・再発危険度を予測できるような因子を究明し、探索する。さらにヒストンH3にアセチル化を誘導する酵素に対するヒストンアセチル化酵素(HAT)阻害薬に注目し、新規治療薬としての可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) JMML 白血病幹細胞

マウスストローマ細胞とSCF+TPO存在下でJMMLCD34陽性細胞と共培養を行い、CD34陽性細胞の増幅能と細胞表面化マーカーの検索を行う。

(2) ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤のJMML幹細胞へ与える影響について検討を行う。

4. 研究成果

若年性骨髄単球性白血病(JMML)の末梢血からCD34陽性細胞を分画し、マウスストローマ細胞であるAGM細胞とGM-CSFまたはSCF+TPOのサイトカイ存在下で共培養することによりCD34陽性細胞が増幅できる系の開発に成功した。

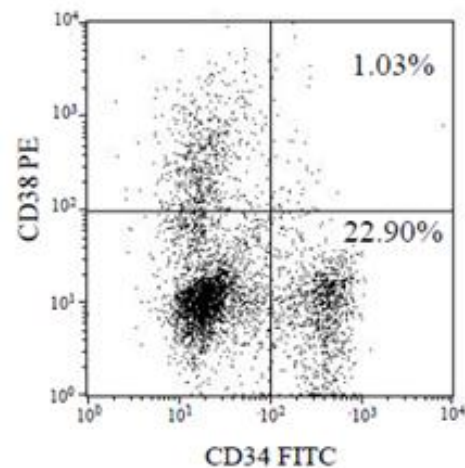


図1、培養開始後14日目におけるCD34陽性CD38陰性細胞

増幅されたCD34陽性細胞はCD38が陰性であった(図1)。さらにCD123, CD116, CD117が陽性であり、表面マーカーからは幹細胞様であった。この幹細胞の増幅率はJMMLで認められるPTPN11変異例とRAS変異例では違いが認められなかった。無治療で経過観察されているRAS症例においてはこの幹細胞増

幅率が低値であった(図2)。JMMLの治療は造血幹細胞移植が選択されるが、RAS遺伝子変異を持つ一部の症例において無治療あ

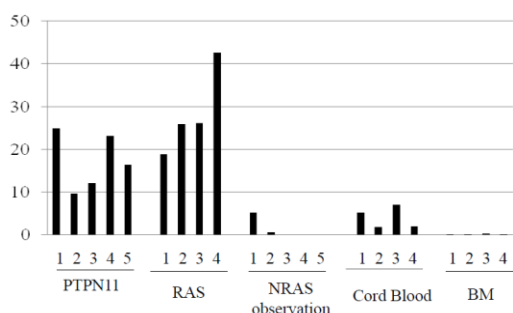


図2. CD34陽性細胞の増幅率

るいは6MP内服で経過観察できる症例が存在している。しかし初診時においてどの症例が経過観察できるか現時点では選別は不可能である。今回我々が開発した系を用いてCD34陽性細胞の増幅率を調べることで選別が可能であることが示唆され、今後症例数を増やして検討を行う。さらにこのCD34陽性細胞が幹細胞であるか証明するためにSCIDマウスに移植を行った。結果は生着を認めなかった。これらのことから、この培養系はJMML幹細胞の増幅能を解析するうえで有用と考えられた。

次にこの系を用いてヒストンアセチル化阻害剤(anacardic acid, AA)のJMML様幹細胞に対する作用について検討を行ったところ、JMML幹細胞自己複製能の低下およびアポトーシスの誘導が観察され、ヒストンアセチル化酵素阻害剤はJMMLに対して有望な治療薬となる可能性が示唆された。

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19件)

- ① Kobayashi S, Sakashita K (他3名、3番目), Ewing sarcoma of the thoracic epidural space in a young child. *Eur Spine J.* 22, 373-9, 2013. 査読有
doi: 10.1007/s00586-012-2481-y.
- ② Hirabayashi K, Sakashita K (他8人、8番目), Successful ganciclovir therapy in a patient with human herpesvirus-6 encephalitis after unrelated cord blood transplantation: usefulness of longitudinal measurements of viral load in cerebrospinal fluid. *Infection.* 41, 219-23, 2013, 査読有, doi: 10.1007/s15010-012-0329-3.
- ③ Yanagisawa R, Sakashita K (他15名、12番目), Replaced platelet concentrates containing a new additive solution, M-sol: safety and efficacy for pediatric patients. *Transfusion.* 2012, 査読有.
doi: 10.1111/trf.12025.
- ④ Sakashita K, Koike K. (他15名、1番目), Food allergy after cord blood transplantation in children. *Br J Haematol.* 158, 672-6, 2012, 査読有.
doi: 10.1111/j.1365-2141.2012.09204.x.
- ⑤ Taira C, Sakashita K (他5名、4番目), Application of allele-specific quantitative PCR using genomic DNA to monitor minimal residual disease based on mutant gene levels following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with hematological malignancies: comparison of mutant levels with autologous DNA percentage by short tandem repeat-PCR. *Clin Chim Acta.* 18, 516-9, 2012, 査読有.
doi: 10.1016/j.cca.2011.11.017.
- ⑥ Matsuda K, Sakashita K (他5名、5番目), Long-term haematological improvement after non-intensive or no chemotherapy in juvenile myelomonocytic leukaemia and poor correlation with adult myelodysplasia spliceosome-related mutations. *Br J Haematol.* 157, 647-50, 2012, 査読有.
doi: 10.1111/j.1365-2141.2012.09063.x.
- ⑦ Hirabayashi K, Sakashita K (他11名、12番目), Critical illness polyneuropathy and myopathy caused by *Bacillus cereus* sepsis in acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 34, e110-3, 2012, 査読有.
doi: 10.1097/MPH.0b013e318234620b.
- ⑧ Al-Kzayer LF, Sakashita K (他13名、2番目), Genetic evaluation of childhood acute lymphoblastic leukemia in Iraq using FTA cards. *Pediatr Blood Cancer.* 59, 461-7, 2012, 査読有.
doi: 10.1002/pbc.24055.
- ⑨ Saito S, Sakashita K, (他8名、8番目), Genetic analysis of TP53 in childhood myelodysplastic syndrome and juvenile myelomonocytic leukemia. *Leuk Res.* 235, 1578-84, 2011, 査読有.
doi: 10.1016/j.leukres.2011.06.027.
- ⑩ Hirabayashi K, Shiohara M, Takahashi D, Saito S, Tanaka M, Yanagisawa R, Sakashita K, Nakamura T, Ishii E, Koike K. (他8名、7番目), Retrospective analysis of risk factors for development of liver dysfunction in transient leukemia of Down syndrome. *Leuk Lymphoma.* 52, 1523-7, 2011, 査読有.
doi: 10.3109/10428194.2011.573888.
- ⑪ Shigemura T, Sakashita K (他6名、4番

- 目) , A case of Behcet's disease associated with myelodysplastic syndrome involving trisomy 8 and a gain-of-function mutation in SHP-2. *Rheumatology (Oxford)*. 50, 1342-4, 2011, 査読有.
doi: 10.1093/rheumatology/ker137.
- ⑫ Taira C, **Sakashita K** (他 7 名、4 番目) , Quantitative monitoring of single nucleotide mutations by allele-specific quantitative PCR can be used for the assessment of minimal residual disease in patients with hematological malignancies throughout their clinical course. *Clin Chim Acta*. 14, 53-8, 2011, 査読有.
doi: 10.1016/j.cca.2010.09.011.
- ⑬ Yanagisawa R, **Sakashita K** (他 8 名、3 番目) , Disappearance of minimal residual disease after the early withdrawal of immunosuppressants in a patient with juvenile myelomonocytic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 56, 501-2, 2011, 査読有.
doi: 10.1002/pbc.22849
- ⑭ Yanagisawa R, **Sakashita K** (他 7 名、7 番目) , Engraftment syndrome, but not acute GVHD, younger age, CYP3A5 or MDR1 polymorphisms, increases tacrolimus clearance in pediatric hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 46, 90-, 2011, 査読有.
doi: 10.1038/bmt.2010.64.
- ⑮ Motoki N, **Sakashita K** (他 10 名、9 番目) , Increased pretransplant QT dispersion as a risk factor for the development of cardiac complications during and after preparative conditioning for pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Transplant*. 14, 986-92, 2010, 査読有.
doi: 10.1111/j.1399-3046.2010.01389.x.
- ⑯ Matsuda K, **Sakashita K** (他 11 名 3 番目) , Long-term survival after nonintensive chemotherapy in some juvenile myelomonocytic leukemia patients with CBL mutations, and the possible presence of healthy persons with the mutations. *Blood*. 115, 5429-31, 2010, 査読有.
doi: 10.1182/blood-2009-12-260729.
- ⑰ Hirabayashi K, **Sakashita K** (他 10 名、11 番目) , Polymyxin-direct hemoperfusion for sepsis-induced multiple organ failure. *Pediatr Blood Cancer*. 55, 202-5, 2010, 査読有.
doi: 10.1002/pbc.22447.
- ⑱ Matsuda K, **Sakashita K**, (他 18 名、2 番目) , Quantitative assessment of PTPN11 or RAS mutations at the neonatal period and during the clinical course in patients with juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 148, 593-9, 2010, 査読有.
doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.07968.x.
- ⑲ Katoh N, **Sakashita K** (他 5 名、6 番目) , Primary AL amyloid polyneuropathy successfully treated with high-dose melphalan followed by autologous stem cell transplantation. *Muscle Nerve*. 41, 138-43, 2010, 査読有.
doi: 10.1002/mus.21483.
- [学会発表] (計 5 件)
- ① 若年性骨髄単球性白血病患者由来の iPS 細胞の樹立. 重村倫成、中沢洋三、松田和之、**坂下一夫**、**小池健一**. 第 54 回日本小児血液・がん学会総会. 2012 年 11 月 27 日、横浜
- ② 小児期同種造血幹細胞移植経験者における晩期耐糖能異常の発症および危険因子. 平林香佳奈枝、**坂下一夫**、**小池健一**、他. 第 54 回日本小児血液・がん学会総会. 2012 年 11 月 27 日、横浜
- ③ In vitro expansion of leukemia stem cells in juvenile myelomonocytic leukemia. **Kazuo Sakashita**, 他. 第 74 回日本血液学会総会. 2012 年 10 月 19 日、京都
- ④ Long-term hematological improvement and poor correlation with spliceosome-related mutations in JMML. Kazuyuki Matsuda, **Kazuo Sakashita**, 他. 第 74 回日本血液学会総会. 2012 年 10 月 19 日、京都
- ⑤ Genetic evaluation of Iraqi pediatric acute myeloid leukemia using FTA cards. Lika'a F. Al-Kzayer, **Kazuo Sakashita**, 他. 第 74 回日本血液学会総会. 2012 年 10 月 19 日、京都
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・助教
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・教授
研究者番号：40143979