

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659273

研究課題名(和文) 白血病及び骨髄異形成症候群の新規予後因子を血液標本から検出するシステムの確立

研究課題名(英文) Establishment of new extraction system from bone marrow smear by laser microdissection

研究代表者

足立 壯一 (Adachi, Souichi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10273450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、白血病の診断のため、必ず施行される血液塗沫標本から芽球のみを抽出し、予後因子解析に必要な量のmRNA及びcDNAを採取する方法を確立した。TAM(ダウン症候群に合併した一過性骨髄増殖症)患者1症例の診断時の検体から、laser microdissection systemで解析可能な特殊フィルムをコーティングしたスライドグラスに血液標本を作製し、芽球のみを抽出し、cDNAからGATA1遺伝子変異が通常の骨髄液の解析時と同様に検出された。また、mRNA検体からGAPDHのバンドの同定及びCXCR4発現量の測定も定量PCR法にて可能であった。

研究成果の概要(英文)：We established a new laser microdissection system extracting cDNA and mRNA of leukemic blasts from smear of bone marrow samples of transient abnormal myelopoiesis (TAM) or acute myeloid leukemia with Down syndrome (AML-DS). We could detect same GATA1 mutation in the TAM patient both from bone marrow samples and from the microdissection system. We could also detect GAPDH from mRNA through this microdissection system and measured CXCR4 expression by RT-PCR. We will be able to detect new prognostic factors from AML or MDS patients by next generation sequencing through this microdissection system.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学

キーワード：遺伝子解析 血液標本 白血病 骨髄異形成症候群 新規予後因子

1. 研究開始当初の背景

日本の小児急性骨髄性白血病 (AML) の治療成績は世界のトップである (JCO, 27;4007, 2009) が予後因子の解析は遅れているのが現状である。骨髄異形成症候群 (MDS) や白血病の一部では芽球以外の細胞の混在により、正確な検査が施行できない症例もある。また、骨髄液採取が困難な白血病 (ダウン症候群に合併した急性骨髄性白血病 (AML-DS 等) では骨髄液の保存自体ができない場合も多い。

2. 研究の目的

本研究では、白血病の診断のため、必ず施行される血液塗抹標本から芽球のみを抽出し、予後因子解析に必要な量の mRNA 及び cDNA を採取する方法を確立する。本研究により、従来から報告されている予後因子のより正確な検討が可能になるだけでなく、新規の予後因子 (遺伝子発現量や変異) の同定が可能となる。

3. 研究の方法

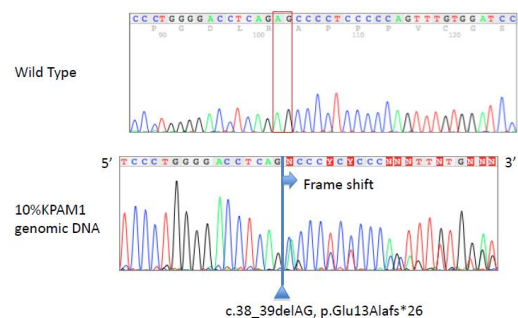
Laser microdissection system (LMD6500/7000; ライカマイクロシステムズ株式会社) にて解析可能なスライドグラス上に、AML-DS (京大小児科あるいは AML 委員会委員所属施設) 患者の初診時骨髄液を塗布、染色固定し、京都大学にて白血病細胞のみ同定 (京都大学医学部附属病院血液検査室技師) 抽出し、同一症例の骨髄液検体と同様に GATA1 変異 (AML-DS ではほぼ全例に検出) 解析可能かどうか確認する。

4. 研究成果

本研究は「急性骨髄性白血病および骨髄異形成症候群の新規予後因子探索」として、京都大学医学部医の倫理委員会に承認済み (承認番号 G-516) である。まず、研究代表者が樹立した AML-DS 患者由来細胞株 KPAM1 を 10%、AML-DS 以外の AML 細胞株 K052 の 90% を混在した検体からスミア標

本を作製し、KPAM1 のみを抽出して GATA1 変異を direct sequence 法で解析したところ KPAM1 細胞株と同様の GATA1 変異が同定された (図 1)。次に、患者保護者の同意を得て TAM (ダウン症候群に合併した一過性骨髄増殖症) 2 症例、及び AML-DS 患者 1 症例の診断時の検体から、laser microdissection system で解析可能な特殊フィルムをコーティングしたスライドグラスに血液標本を作製し、laser microdissection system で芽球のみを抽出し、cDNA から GATA1 遺伝子変異が通常の骨髄液の解析時と同様に検出された。KPAM1 を 10%、K052 の 90% を混在した検体からスミア標本を作製し、KPAM1 のみを抽出して GATA1 変異を次世代シーケンサー法で解析したところ、約半数で GATA1 変異が同定された。(図 3) KPAM1 細胞では、女兒より樹立された細胞株であり、ヘテロの変異であるため、半数で遺伝子変異が同定されるべき現象であるため、次世代シーケンサー法でも解析可能であることが証明された。また、mRNA 検体から GAPDH のバンドの同定及び CXCR4 発現量の測定も定量 PCR 法にて可能であった。以上より、mRNA 及び cDNA 抽出の系の確立に成功したことが証明された。

(図 1) KPAM1, 10%, K052, 90% の検体から作成した標本から KPAM1 のみを抽出した検体の GATA1 変異解析

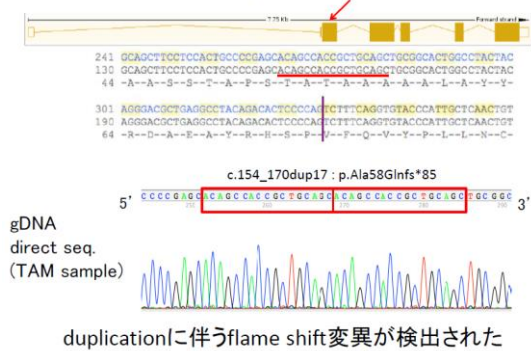


deletionに伴うframe shift変異が検出された

(図 2) TAM-10 登録症例の GATA1 変異

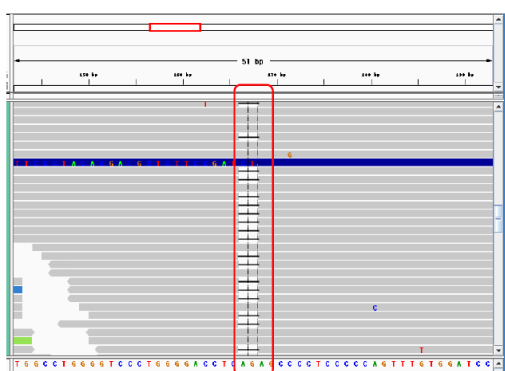
解析

GATA-1遺伝子変異解析結果



(図3)

NGS解析結果



約半数のリードにて2塩基のdeletionが検出された

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 6 件)

1. Shiba N, Adachi S, et al. DNMT3A mutations are rare in childhood acute myeloid leukaemia, myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukaemia. *Brit J Haematol* 156(3) 413-414, 2012
2. Shimada A, Adachi S, et al. High WT1 mRNA expression after induction chemotherapy and FLT3-ITD have prognostic impact in pediatric acute myeloid leukemia: a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Int J Haematol* 2012 Oct;96(4):469-476.

3. Gruber TA, Adachi S, et al. An inv(16)(p13.3;q24.3)-encoded *CBFA2T3-GLIS2* fusion protein defines an aggressive subtype of pediatric acute megakaryoblastic leukemia. *Cancer Cell* 2012 Nov 13; 22(5): 683-697.
4. Tomizawa D, Adachi S, et al. Excess treatment reduction including anthracyclines results in higher incidence of relapse in core binding factor acute myeloid leukemia in children. *Leukemia* 2013 Dec 27(12)2413-2416
5. Tomizawa D, Adachi S, et al. Appropriate dose reduction in induction therapy is essential for the treatment of infants with acute myeloid leukemia: a report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Int J Haematol* 2013 Nov;98(5)578-588
6. Matsuo H, Itoh H, Adachi S, et al. Prognostic implications of *CEBPA* mutations in pediatric acute myeloid leukemia: A report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Blood Cancer Journal in press*

[学会発表] (計 5 件)

1. Adachi S. JPLSG studies for AML. St. Jude Ground Rounds (招待講演) 2012年12月11日 Memphis, USA
2. Shiba N, Adachi S, et al. GATA2 mutations in Pediatric Acute Myeloid Leukemia: A Study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. American Society of Hematology 54th Annual Meeting, 2012年12月8日~2012年12月11日 Atlanta, USA

3. Shiba N, Adachi S, et al. NUP98-NSD1 Related Gene Expression Signature is Strongly Associated with a Poor Prognosis in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. American Society of Hematology 54th Annual Meeting, 2012 年12月8日～2012年12月11日 Atlanta, USA
4. Yoshida K, Adachi S, et al. Genetic Basis of Myeloid Proliferation Related to Down Syndrome. American Society of Hematology 54th Annual Meeting, 2012 年12月8日～2012年12月11日 Atlanta, USA
5. 松尾英将、池内絢香、志賀修一、土岐力、照井君典、伊藤悦朗、足立壮一；血液疾患の予後因子をスミア標本より検出するシステムの確立 第8回日本臨床検査学教育学会学術大会 2013年8月26日～2013年8月28日 大阪市

[図書] (計 2 件)

1. 足立壮一 直江知樹、堀部敬三監修 チーム医療のための血液がんの標準的化療療法 メディカル・サイエンスインターナショナル社 2013年第1版発行 279-293 頁
2. 足立壮一 金倉譲、松村到編集 プリンシプル血液疾患の臨床 ここまできた白血病/MDS治療 中山書店 2013年第1版発行 233～241 頁

[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

http://www.med.kyoto-u.ac.jp/organization-staff/research/human_health/mt0302/
<http://adachilab.web.fc2.com/member.htm>
1

6. 研究組織

(1) 研究代表者 足立 壮一

(ADACHI SOUICHI) 京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：10273450

(2) 研究分担者 なし

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 伊藤 洋志

(ITOU HIROSHI) 京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：20362387