

16-3 小児の難治性白血病、骨髄異形成症候群のゲノム異常の解析と治療法に関する研究

京都大学大学院医学研究科発生発達医学 中畑 龍俊

研究成果の要旨

(1) 放射線感受性を示す複合型免疫不全症の原因遺伝子であるArtemisの欠損は染色体不安定を誘導し、発癌と関与する。DNA損傷により、ArtemisがATMならびにNBS依存性にS645でリン酸化を受け、NBS複合体を形成した。(2) 小児白血病の遺伝的素因を検索するため、白血病患者からEBV-LCLを樹立し解析した。染色体が不安定で放射線感受性を示す場合があり、DNA二重鎖切断修復に重要なATM,TP3,CHK2変異が見られた。(3) ヒト造血幹細胞や腫瘍細胞を容易に受け入れるモデルマウス(NOGマウス)を開発し、このマウスにJMML細胞の生着を得、リンパ球のclonality解析を行った。またCML細胞も骨髄と脾臓に腫瘍細胞の生着を得た。(4) 小児AML患者においてFLT3-ITDの発現は予後不良因子であることを見出し、次期プロトコールでは予後不良群として治療を行うこととした。またNOGマウスは白血病性幹細胞の測定や白血病のin vivoにおける進展機構の解明、治療法の開発等に利用可能であると考えられ、現在そのための基盤的検討を行っている。

研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名
中畑 龍俊	京都大学大学院医学研究科発生発達医学講座教授
水谷 修紀	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発達病態小児科学教授
清水喜美子	国立がんセンター分子腫瘍学部主任研究員
林 泰秀	群馬県立小児医療センター副院長
月本 一郎	東邦大学医学部第一小児科教授
小池 健一	信州大学医学部小児科教授

*1:平成16年4月1日～平成17年3月31日

総括研究報告

1 研究目的

小児の難治性白血病及び骨髄異形成症候群の病因を明らかにし、新たな予後因子の同定と治療法への応用を目指す。

分担研究課題

In vivo modelを用いた小児難治性白血病、骨髄異形成症候群における病態解析及び治療法の開発に関する研究
小児の難治性造血器腫瘍の遺伝的生物学的特性

小児の難治性白血病のゲノム解析

小児難治性白血病および骨髄異形成症候群のゲノム異常に関する研究

小児AMLの治療法に関する研究

小児難治性白血病の細胞周期とその異常に関する研究

2 研究成果

1. 小児白血病における遺伝的背景の研究

ATMは小児白血病の遺伝的背景を形作る重要な分子である。ArtemisはDNA-PKcsの存在下においてヘアピンオープニングにおける抗原レセプターのVDJ再結合に非常に重要な働きをする。このArtemisの欠損はATM欠損症と同様人体を放射線に対する高感受性と重症複合免疫不全に陥らせる。Artemis欠損患者もArtemis欠損マウス細胞も染色体の不安定性を呈するが、DNA損傷に対するArtemisの詳細な機能は未だ明らかにされていない。Artemisが小児白血病の遺伝的背景を形成する可能性もあるという立場からATMとArtemisの関係を検討した。健康人、AT患者、NBS患者からそれぞれ樹立したEBV-LCL株を用い

16-3小児の難治性白血病、骨髄異形成症候群のゲノム異常の解析と治療法に関する研究

て以下の結果を得た。(1) ArtemisはDNA損傷に反応して過リン酸化される

(2) DNA-PKcsは放射線照射(IR)による過リン酸化には関与しない。(3) IRによるDSBsに対するArtemisの過リン酸化はATM依存性である。(4) ArtemisはDNA損傷に対してATM下流の基質である。(5) Ser645はIRで誘導されたDSBsにおけるArtemisの過リン酸化サイトに対応するSQ/TQである。(6) Artemisの過リン酸化にはChk2ではなくNbs1が必要である。(7)過リン酸化したArtemisはIRで誘起したDSBsに対応してMre11/Rad50/Nbs1複合体とATMに依存した形で物理的な相互作用をする。本研究ではArtemisが放射線照射(IR)に反応して、ATM及びNbs1依存性にリン酸化されることを示した。Artemisのリン酸化はATM及びNbs1が発現していない細胞では著しく減少する。ATMまたはNbs1に欠陥を持った細胞にそれぞれ正常のATMまたはNbs1を発現させると、Artemisリン酸化は回復する。また、S645はIRにおけるArtemisの泳動遅れに貢献している。リン酸化したArtemisはIRによるDNAの二本鎖切断(DSBs)においてMre11/Rad50/Nbs1複合体とATMに依存する形で物理的な相互作用をすることは、これらの分子の機能的な連関を裏付けている。DNA-PKcsまたはATMの欠損は、IRによるDSBs修復に異常を有することから、ArtemisはIRによるDSBsの修復において、DNA-PKcsとATM下流のsignaling crossroadに位置づけることができることが明らかにされた。以上の結果、今後小児白血病の遺伝的背景にArtemis異常の関与も示唆される。

2. 小児の白血病、骨髄異形成症候群におけるゲノム解析を通じた遺伝的背景の探索

白血病は急性骨髄性白血病におけるt(8;21)転座に代表されるように均衡型の染色体転座が多いという特異性から、ゲノムの安定性を規定する遺伝子に着目し、germline mutationや稀なcSNP検索を行った。小児の白血病という稀な疾患に対してゲノム網羅的な解析を行うにあたり、必要な試料を得るため、および、germlineの解析のために、寛解期の患者の末梢血5mlを採取し、EBウィルスによる形質転換を行いB細胞株を樹立した。解析遺伝子を絞り込む目的と転写調節領域の変異も検出できる可能性をも考慮して網羅的な発現解析を行った。小児患者由来細胞29例、成人白血病患者由来細胞10例、健康人由来細胞19例、遺伝的素因と染色体不安定性を示す代表的な細胞としてLi-Fraumeni患者由来細胞5例を用いた。得られた発現データの統計学的解析として、主成分分析(GeneMathソフトウェア)を行ったところ、小

児患者由来細胞の発現は偏りを示すことが見出された。クラスター解析のためにはunsupervised learningで遺伝子を絞り込んだ後にSAM(significance analysis of microarray)またはt-testで小児白血病患者由来細胞株と健康人由来細胞とで有意に差のある遺伝子を抽出した。それらの遺伝子のなかにはDNA二重鎖切断修復に重要なATM、BRCA1などが含まれていた。有意に差のある遺伝子セットに関してクラスター解析を行うと、当然ながら2つのクラスターに分かれ、小児患者群のほとんどが1つのクラスターに組分けされた。Li-Fraumeni患者由来細胞は小児患者群で構成されるクラスターに分類されることが判明している。一方、成人患者細胞は2つのクラスターに分散することが判明した。このことから、p53変異による遺伝子発現調節の異常と患者由来細胞における発現の偏りとの間には一部、類似した経路の存在が示唆される。ゲノムDNAを抽出し、ゲノムの安定性に関わる遺伝子の中から、DNA二重鎖切断修復の主要な経路である、ATM、TP53(p53)、CHK2のexon-intron junctionを含むcDNA全長に関して、小児の白血病、骨髄異形成症候群の患者(慶応大学病院、東京医科歯科大学病院、成育医療センター、乳児白血病共同研究会による)53検体、および、80例の健康人由来DNAの塩基配列を決定した。その結果、ATMでは患者53例中5例に、健康人では80例中2例にアミノ酸変異を伴うgerm-line mutationを見出した。この結果は統計学的には有意な差とは認められないが、小児リンパ腫でATMのgerm-line mutationが多数報告されていることもあり、無視出来ない結果である。さらに、p53では53例中2例にgerm-line mutationが見出されたが、健康人には全く認められなかった。CHK2についても同一のgerm-line mutation(稀なSNPと考えられる)が3例に見出されたが、健康人にはなかった。このように、患者群には3遺伝子について解析しただけでもこのようにgerm-line mutationが見出され、広くDNA障害修復遺伝子に変異が蓄積していることが示唆される。

3. 小児難治性白血病の細胞周期とその異常に関する研究

本研究では、GM-CSFによるメチル化誘導機構をGM-CSF依存性白血病細胞株であるM07e細胞株を用いて検討した。M07eのp15のプロモーター領域の27個のCpG sitesはGM-CSF存在下でほとんどすべてのalleleがメチル化されていた。しかし、GM-CSFとFBSを除去すると、time-de

16-3小児の難治性白血病、骨髄異形成症候群のゲノム異常の解析と治療法に関する研究

pendentにメチル化率は低下した。脱メチル化は方向、場所、範囲において種々のpatternを示した。GM-CSF非存在下で48hr培養後、GM-CSFを再添加するとメチル化率は増加し、24hr後ほぼすべてのalleleはメチル化された。p15の蛋白質はメチル化率と逆相関していた。即ち、GM-CSF存在下ではp15の発現はほとんどみられなかったが、GM-CSF非存在下では増強した。

GM-CSFとFBS非存在下で5-AzaとTSAの両者を同時に添加すると、メチル化は完全に消失したことから、GM-CSFはDNMTとHDACの単独或いは両者を用いてメチル化を誘導することが明らかとなった。またGM-CSFはde novoメチル化誘導能を有する判明した。このde novoメチル化に対する5-AzaとTSAの単独あるいは両者に対する反応は上記の結果と同様であった。これらの結果から、1) M07e細胞はGM-CSFによるp15遺伝子のメチル化を検討するのに有用であった。2) GM-CSFはDNMTとHDACを単独あるいは両者を用いてde novoメチル化を誘導することが明らかとなった。

次いで、若年性骨髄単球性白血病(JMML)におけるp15のエピジェネティックコードによる遺伝子発現の制御機構を検討した。GM-CSFとSCF刺激により産生されたDay7の骨髄系細胞は、正常対照においては40%-70%の頻度で全例にp15遺伝子のメチル化がみられたが、JMML患者の骨髄CD34陽性細胞から産生されたDay7細胞のp15遺伝子は6例中、すべての例でほぼすべてのCpG部位が非メチル化状態を示した。p15 mRNAの発現をreal-time PCR法を用いて検討したところ、JMML患者において有意に高い発現が認められた。これらのことから、JMMLにおけるエピジェネティックコードによる遺伝子発現の制御異常が示唆された。また、本症における診断基準の1つとなっているGM-CSF hypersensitivityはウイルス感染でも認められるとの報告があるが、メチル化の有無を同時に解析することはより正確な診断を下す上で有用であると思われる。

4. 小児AMLの治療法に関する研究及びゲノム異常に関する研究

AML99プロトコルで治療した240例の寛解導入率は94%、3年生存率は81%、DFSは67%、EFSは64%であった。リスク別の3年生存率とDFSはおおよそ、LR群90%と72%、IR群では83%と63%、HR群では60%と60%であった。LR群とIR群の化学療法を行なったものの再発例の多くは、SCTにより救済されており、QOLの向上を目標とした目的は果たさ

れている。MRDをみるためにWT1の推移を検討したところ、再発例では強化終了直前から異常値を示すものがみられ、早期に再発を予知する可能性がみられた。染色体検査では11q23転座を有するもののうち、t(9;11)は予後良好因子である可能性が高かった。FLT3遺伝子異常の有無は、新たな予後不良因子となることが明らかになり、次期プロトコルの層別化治療に組入れることとなった。

(1) WT-1遺伝子の推移；治療後異常値を示すものの割合は、それぞれ初診時84/119(71%)と37/46(80%)、寛解導入後16/60(27%)と10/36(28%)、強化3前6/61(10%)と3/28(11%)、強化5前2/48(4%)と5/20(25%)、治療終了時3/51(6%)と6/26(23%)であった。また、治療終了3ヵ月後では2/29(7%)と5/11(45%)、6ヵ月後1/22(5%)と0/4(0%)であった。再発例では強化療法5コース前、治療終了時および治療終了後3ヵ月目のWT-1の値が高い傾向がみられた。(2) 染色体異常と生存率；染色体異常別のEFSはinv(16)で $91.7 \pm 8.0\%$ 、t(8;21)は $81.2 \pm 4.8\%$ と高い。一方、正常核型 $55.1 \pm 9.2\%$ 、11q23 $53.5 \pm 9.1\%$ 、その他の異常 $51.7 \pm 8.7\%$ であった。11q23を有する41例の中ではt(9;11)の15例は $77.8 \pm 11.4\%$ 、t(9;11)以外の26例は $38.4 \pm 11.5\%$ と、両者の生存率の間に優位差がみられた。したがって、新たな予後良好因子としてt(9;11)があげられた。

(3) *Fms related-tyrosine kinase 3 (FLT3)*遺伝子異常は成人AMLにおいて最も高頻度に認められる予後不良因子である。Juxtamembrane(JM)領域の一部が重複して繰り返されるinternal tandem duplication (ITD)と、キナーゼ領域に位置する835番目のAsp残基(D835)の点変異(D835Mt)が知られている。今回AML99プロトコルに登録された小児AML158症例についてFLT3遺伝子異常の解析を行った。158例中ITDを20例(12.7%)、D835Mtを11例(7.0%)に認めた。ITD、D835Mtともに初診時年齢が高く、白血球数が多い傾向がみられた。FAB分類でITDはM3 3/13例(23%)、M5 5/25例(20%)、M1 4/24例(16.7%)に多くみられ、D835MtはM3 4/15例(23%)に多くみられた。AML99のリスク分類別でITDは、Low Risk(LR)群 2/62例(3.2%)、Intermediate Risk (IR)群8/57例(14.0%)、High Risk(HR)群 2/10例(20.0%)、M3 3/13例(23.0%)、D835MtはLR群 3/62例(4.8%)、IR群 4/57例(7.0%)、HR群 0/10例、FAB/M3 3/13例(23.0%)であった。非寛解の6例中5例(83.3%)でITDが認められた。なおM3、Down症例を除き、寛解導入率はwild type(WT) 97.8%、ITD 75.0%、D835Mt 91.7%であった。3年粗生存率はWT 89.1%、ITD 34.3%

16-3小児の難治性白血病、骨髄異形成症候群のゲノム異常の解析と治療法に関する研究

($p < 0.0001$, Hazard ratio=9.07)、D835Mt例は100%であった。3年無病生存率はWT 71.5%、ITD 38.5% ($p = 0.0001$, Hazard ratio=3.7)であった。WBC<10万、年齢2歳以上のIR群49例について解析したところ3年EFS率はWT 65.7%、ITD 33.3% ($p = 0.014$)で、3年再発率はWT 28.8%、ITD 61.3% ($p = 0.0037$)とITDはIR群の予後を悪化させていた。核型別で正常核型35例中ITD例は9例(25.7%)と最も多く含まれ、ITD 20例中9例(45%)は正常核型であった。M3ではWTで早期死亡の1例を除き全例生存していた。All o-SCTがITD17例中12例で行われていた。生存例は第1寛解で実施された5例中4例のみで、第2寛解で実施された1例、非寛解で実施された6例は全例死亡していた。考案) ITD、D835Mtの頻度は諸外国の小児AMLの報告と大差なく、成人AMLに比し少なかった。小児AMLの約13%を占めるFLT3-ITDは独立した予後不良因子であり、特に従来のIR群や正常核型群で顕著であった。D835Mt例は全例生存しており予後とは相関しなかった。ITD群は第1寛解期での移植が望ましいと考えられた。

5. In vivo modelを用いた小児難治性白血病、骨髄異形成症候群における病態解析及び治療法の開発に関する研究

NOD/SCIDマウスのNK活性を完全に抑える目的でNOD/Shi-scidマウスとcommon g 鎖ノックアウトマウスをかけあわせた新たなNOD/SCID/ g_c^{null} マウス(NOGマウス)を作成した。common g 鎖ノックアウトマウスはT細胞の極端な減少とNK細胞の欠損を生じることがわかっていたが、期待通り、新たに作成したNOGマウスは従来のNOD/SCIDマウスの免疫異常に加えて完全にNK活性を消失していた。そこで臍帯血由来CD34陽性細胞を 1×10^5 個ずつ移植して経時的にヒト血球の割合を従来のNOD/SCIDマウスと比較したところ、移植後4週目では8.6% vs 1.3%、8週目において37.1% vs 6.6%とNOGマウスにおいて圧倒的に高いキメラ率が得られた。移植後3ヶ月でのNOGマウスの骨髄、脾臓ではそれぞれ63.4%、66.6%という極めて高いヒト血球のキメラ率を得た。生着したヒト細胞のlineage解析をフローサイトメトリーを用いて行ったところ、従来のNOD/SCIDと同様に骨髄球系、赤芽球系、巨核球系など様々な血球系譜への分化を認め、さらに注目すべきことにB細胞のほかT細胞の出現を認め、経時的な解析からこのT細胞はマウス胸腺において分化増殖したものであることを確認した。このことはこのマウスモデルがすべての血球系への分化を支持できる極めてユニークなモデル

であることを示している。さらに移植CD34陽性細胞数を1000個にしてもヒト血球の生着が確認され、100個まで減らした場合においても1/3のマウスに生着がみられたことからこのマウスモデルはすべてのlineageへの分化を解析できると同時にきわめて鋭敏なヒト造血幹細胞のアクセシ系であることを確認した。本マウスは正常造血幹細胞のin vivoでの増殖・分化機構の解析に有用であるのみならず、白血病性幹細胞の測定や白血病のin vivoにおける進展機構の解明、治療法の開発等に利用可能であると考えられる。現在そのための基盤的検討を行っている。

3 倫理面への配慮

臨床検体の遺伝子及びゲノム解析についてはJPLSGの倫理ワーキンググループの倫理規定に従い、各施設の倫理委員会に承認された研究計画書に沿って行う。また、白血病細胞の保存および利用についても同意をえた。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Adachi S., Nakahata T., et al., Apoptosis induced by molecular targeting therapy in hematological malignancies. *Acta Haematol*, 111:107-123, 2004.
2. Kambe N., Nakahata T., et al., Development of both human connective tissue-type and mucosal-type mast cells in mice from hematopoietic stem cells with identical distribution pattern to human body. *Blood*, 103:860-867, 2004.
3. Umeda K., Nakahata T., et al., Development of primitive and definitive hemayopoiesis from nonhuman primate embryonic stem cells in vitro. *Development* 131:1869-1879, 2004.
4. Yasumi T, Nakahata T., et al., Differential Requirement of the Cd40-CD154 costimulatory pathway during Th cell priming by CD8a+ and CD8a- murine dendritic cell subsets. *J Immunol*, 172:4826-4833, 2004.
5. Okada M, Nakahata T., et al., A novel mechanism for imatinib mesylate-induced cell death of BCR-ABL positive human leukemic cells - caspase-independent, necrosis-like programmed cell death mediated by serine protease activity. *Blood*, 103:2299-2397, 2004.
6. Nishikomori R., Nakahata T., et al., X-linked ectoderm

16-3小児の難治性白血病、骨髄異形成症候群のゲノム異常の解析と治療法に関する研究

- al dysplasia and immunodeficiency caused by reversion mosaicism of NEMO reveals a critical role for NEMO in human T-cell development and/or survival. *Blood*, 103:4565-4572, 2004.
7. Yagasaki H., Nakahata T., et al., Identification and characterization of novel mutations of the major Fanconi anemia gene FANCA in the Japanese population. *Human Mutat*, 24:481-490,2004.
8. Iida M., Nakahata T., et al., Identification of cardiac stem cells with FLK1 expression during embryonic stem cell differentiation. *FASEB J.* 19:371-378, 2004.
9. Kanatsu-Shinohara M., Nakahata T., et al., Generation of multipotent stem cells from postnatal mouse testis. *Cell*, 119:1001-1012, 2004.
10. Matsubara H., Nakahata T., et al., Successful allogeneic bone marrow transplantation in a patient with acute myelogenous leukemia and cytomegalovirus retinitis. *Int. J. Hematol*, 80:190-192,2004.
11. Yasumi T, Nakahata T., et al., Limited ability of antigen-specific Th1 responses to inhibit Th2 cell development in vivo. *J Immunol*, 177:1325-1331. 2005.
12. Kanazawa N., Nakahata T., et al., Early-onset sarcoidosis and *CARD15* mutations: common genetic etiology with Blau syndrome. *Blood*, 105:1195-1197, 2005.
13. Tanaka A., Nakahata T., et al., A novel NF- κ B inhibitor, IMD-0354, suppresses neoplastic proliferation of human mast cells with constitutively activated c-kit receptors. *Blood*, 105:2324-2331, 2005.
14. Sawada J., Nakahata T., et al., Stem cell factor has a suppressive activity to IgE-mediated chemotaxis of mast cells. *J Immunol*, 174:3626-3632,2005, 2005.
15. Kimura S., Nakahata T., et al., Inhibition of leukemia cell growth by a novel anti-cancer drug (GUT-70) from *Calophyllum brasiliense* that acts by induction of apoptosis. *Int. J. Cancer* 133:158-165, 2005.
16. Tsuchiya A., Nakahata T., et al., Characterization of mouse hepatic stem/progenitor cells in a novel culture system. *Gastroenterology* in press.
17. Hasegawa D., Nakahata T., et al., Methylation status of the p15 and p16 genes in paediatric myelodysplastic syndrome and juvenile myelomonocytic leukaemia. *Brit J Haematol* in press.
18. Yoshimoto M., Nakahata T., et al., Two different roles of purified Cd45⁺ hematopoietic stem cells after transplantation in muscles. *Stem Cell* in press
19. Kawamura T., Nakahata T., et al., Acetylation of GATA-4 is involved in the differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *J Biol Chem* in press.
20. Kosaka Y., Mizutani S., et al., Infant acute lymphoblastic leukemia with MLL gene rearrangements: outcome following intensive chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 104:3527-3534, 2004.
21. Asada M., Mizutani S., et al., Brap2 Functions as a Cytoplasmic Retention Protein for p21 during Monocyte Differentiation. *Mol Cell Biol*, 18:8236-8243, 2004.
22. Asada M., Mizutani S., et al., Brap2 Functions as a Cytoplasmic Retention Protein for p21 during Monocyte Differentiation. *Mol Cell Biol*, 18:8236-8243, 2004.
23. Chen L., Mizutani S., et al., ATM dependent Artemis Phosphorylation in response to DNA damage. *Cancer Science* in press.
24. Taketani T., Hayashi Y., et al., FLT3 mutations in the activation loop of tyrosine kinase domain are frequently found in infant acute lymphoblastic leukemia (ALL) with MLL rearrangement and pediatric ALL with hyperdiploidy. *Blood*, 103: 1085-1088, 2004.
25. Ono R, Hayashi Y., et al., Two-step model of leukemogenesis in multiple lineages by dimerization of MLL fusion protein. *J Clin Invest* in press.
26. Takagi M., Shimizu K., et al., Identification and characterization of polymorphic variations of the ataxia telangiectasia mutated (ATM) gene in childhood Hodgkin disease. *Blood*. 103:283-290, 2004
27. Shimada H., Shimizu K., et al., First case of aplastic anemia in a Japanese child with a homozygous missense mutation in the NBS1 gene (I171V) associated with genomic instability. *Hum Genet.* 115 : 372-376, 2004
28. Matsuzaki S., Koike K., et al., Development of two cytogenetically abnormal clones from multipotential hematopoietic stem cells in a patient with juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia Res* in press.
29. Ohga S., Tsukimoto I., et al., Diamond-Blackfan anemia in Japan: Clinical outcome of prednisolone therapy And hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol*

16-3小児の難治性白血病、骨髄異形成症候群のゲノム異常の解析と治療法に関する研究

ol 79:22-30,2004

日本語論文

1. 多和昭雄、月本一郎：急性骨髄性白血病のリスク分類に基づいた層別化治療。 日小血会誌、18：202-209,2004