

201438014A

厚生労働科学研究委託費

革新的がん医療実用化研究事業

「ゲノミクス解析に基づく造血器悪性腫瘍の病態解
明」に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 間野 博行

平成27(2015)年 3月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業（革新的がん医療実用化研究事業）による委託業務として、国立大学法人 東京大学総長 濱田純一が実施した平成26年度「ゲノミクス解析に基づく造血器悪性腫瘍の病態解明」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I.	委託業務成果報告（総括）	
	「ゲノミクス解析に基づく造血器悪性腫瘍の病態解明」に関する研究 東京大学・大学院医学系研究科・細胞情報学分野 間野博行 ……………	1
II.	委託業務成果報告（業務項目）	
1.	「次世代シーケンサーによる造血器悪性腫瘍大規模リシーケンス」に関する研究 東京大学・大学院医学系研究科・細胞情報学分野 間野博行 ……………	5
2.	「急性骨髄性白血病におけるDNAメチル化によるMPO発現調節の検討」に関する研究 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 宮崎 泰司 ……………	7
3.	「ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬 romidepsin に対する耐性機序の解析」に関する研究 自治医科大学・医学部・血液内科 永井正 ……………	10
4.	「白血球に発現するG蛋白質共役型受容体」に関する研究 岡山理科大学・理学部・臨床生命科学科 中村元直 ……………	13
5.	「白血病関連変異遺伝子の機能的意義の解明」に関する研究 愛知県がんセンター研究所 都築忍 ……………	15
III.	学会等発表実績 ……………	17
IV.	研究成果の刊行物・別冊 ……………	25

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（総括）

「ゲノミクス解析に基づく造血器悪性腫瘍の病態解明」に関する研究

業務主任者： 間野 博行 東京大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨：我々は広く白血病患者骨髄より造血幹細胞相当分画のみを純化し保存する「Blast Bank」を設立し既に1000例を越えるサンプル収集に成功している。またこれら臨床検体から一度の次世代シーケンサー解析でゲノムの点突然変異、挿入・欠失のみならず融合遺伝子も併せ検出可能な手法としてcDNAキャプチャー法を開発した。収集した検体の中に家族性血小板異常症の症例群があった。これら検体を全エクソンシーケンスすることにより、高頻度にCDC25C遺伝子変異を見いだした。CDC25C変異の結果G2/Mチェックポイント機構が破綻し、細胞周期が異常に加速することが明らかになった。急性骨髄性白血病では白血球芽球が活性酸素反応関連酵素であるミエロペルオキシダーゼ(MPO)を発現しているが、その遺伝子発現はMPO遺伝子のメチル化と関連していることを示した。さらに白血球表面のGタンパク共役型受容体のpH依存性リサイクリングなどの知見を得た。

担当責任者

間野博行	東京大学大学院医学系研究科・教授
宮崎泰司	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授
永井正	自治医科大学医学部・准教授
中村元直	岡山理科大学理学部・教授
都築忍	愛知県がんセンター・室長

A 研究目的

白血病は様々な遺伝子異常によって生じるヘテロな疾患群であり、PML-RARAやBCR-ABLのように具体的な発がん原因遺伝子・治療対象分子が明らかな例はまれである。有効な分子標的療法を新たに開発するためには、それぞれの白血病サブグループの主たる発症原因遺伝子を明らかにすることが重要であり、そのためにはゲノミクス解析が有用なツールと考えられる。

我々はこれまでの第3次対がん総合戦略研究事業において、(1) 広く我が国の白血病症例からCD133陽性白血球芽球分画のみを純化保存するバンク事業を行い既に1000例に及ぶ芽球ストックを整備した(*Blood* 98:422)と共に、

(2) 微量の臨床検体からでもマイクロRNA(miRNA)を大量にクローニングする手法を開発し(*Nature Protocols* 2:3136)、上記白血球芽球におけるmiRNA配列の大規模取得技術を確立した。さらに我々は、一般の方法とは異なり、エラー率の極めて低い次世代シーケンサ

ー解析技術を新たに開発した(未発表データ)。

そこで本研究計画では、次世代シーケンサーを用いて上記検体バンクを大規模にリシーケンスし、配列異常の面から造血器腫瘍の新たな分子診断マーカーおよび発症原因異常の探索を目指すとともに、白血病に存在する遺伝子異常がどのようなメカニズムで造腫瘍性を獲得するかを検討する。

B 研究方法

1) 各検体試料よりmRNAを抽出して断片化した後、SureSelectシステム(Agilent社)を用いてエクソン領域のみを高効率に純化した。これを次世代シーケンサーによる配列解析を行い、試料毎に約50 Gbpの大量の塩基配列を得た。それを独自のコンピューターパイプラインによって非同義変異のリストを得た。

2) 急性骨髄性白血病(AML)患者検体より、CD34陽性細胞をカラム法にて分離し、それらのMPO発現を蛋白質レベル、遺伝子レベルで検討した。さらに、MPO遺伝子のメチル化状態についても検討した。MPO遺伝子メチル化と関連してメチル化を受けている遺伝子を検討するために、Illumina Infinium assayを用いてAML細胞におけるゲノムワイドの遺伝子メチル化パターンを調べた。

3) 樹立したAZA/romidepsin耐性株を用いて、romidepsinによるアポトーシス誘導機序の欠落等について検討した。

(倫理面への配慮)

検体収集に関しては東京大学医学部ヒトゲノ

ム・遺伝子解析研究倫理委員会、自治医科大学遺伝子解析研究倫理審査委員会及び長崎大学医学部歯学部の生命倫理委員会認可を受けている。

C 研究結果

1) 家族性血小板異常症のゲノム解析

家族性血小板異常症患者の骨髄及び頬粘膜細胞よりゲノムDNAを抽出し、全エクソシークエンスを行った。興味深いことに全検体中53%の頻度でCDC25Cの非同義変異を発見した。中でもD234G変異はrecurrentであった。

CDC25Cはdual phosphataseであり、その活性により細胞周期のG2/Mチェックポイントを制御することが知られており、その異常がG2/Mチェックポイントの破綻につながることで予想される。実際、変異CDC25CはTAK1によるリン酸化を受けず、14-3-3タンパクに結合しないことがわかった。その結果活性が高進し、変異CDC25Cを持つ細胞はG2/Mチェックポイントを受けず、細胞周期が異常に更新することが明らかになった。そのためCDC25C変異細胞はDNAダメージ存在下でも細胞周期停止・アポトーシスにならず、DNA変異を蓄積しやすいことが明らかになった。

2) MPO遺伝子のメチル化解析

AML検体（18検体）からCD34陽性細胞を分離し、MPO発現とMPO遺伝子メチル化との関連を検討したところ、負の相関が認められた。MPO遺伝子の低メチル化群はDNMT3A遺伝子の高メチル化が認められた。

3) Romidepsin耐性機序の解析

THP-1/AR よりAZA/romidepsin耐性株TAR/RRを樹立した。TAR/RRにおけるromidepsinのIC50値はTHP-1/ARの9.77倍であり、TAR/RRが高度のromidepsin耐性を有することが示されたTAR/RRではromidepsinによるアポトーシス誘導が抑制されており、実際romidepsin添加後もcleaved-caspase蛋白量の増加が認められなかった。

4) G2Aのリサイクリング

Gタンパク共役型受容体G2Aはヒト前骨髄球性白血病細胞株HL-60に高発現しており、細胞生理的pH下では細胞内シグナリングは全く起こさないが、低pH環境下に曝すとGi型G蛋白質を介してイノシトール3リン酸の産生を惹起する。G2Aは小胞体合成後、形質膜上発現→初期エンドソーム移行→リサイクルによる形質膜再発現の順路で挙動するが、生理的pHでは酸

性下よりも細胞内取込み速度が顕著に速いことから結果的に細胞表面局在量が低減していることが推察された。

D&E. 考察及び結論

家族性血小板異常症は、高頻度に急性骨髄性白血病・骨髄異形成症候群に移行することが知られており、その原因は不明であった。CDC25C変異が家族性血小板異常症の約半数に見つかったことは、細胞周期異常がその原因であると考えられ、より早期からの末梢血の遺伝子スクリーニングの重要性を示唆する。

またAML芽球におけるMPOの発現レベルを規定する機構としてプロモーター領域のメチル化が明らかになった。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

間野博行

- 1) Yoshimi A, Toya T, Kawazu M, Ueno T, Tsukamoto A, Iizuka H, Nakagawa M, Nannya Y, Arai S, Harada H, Usuki K, Hayashi Y, Ito E, Kirito K, Nakajima H, Ichikawa M, Mano H & Kurokawa M. "Recurrent CDC25C mutations drive malignant transformation in FPD/AML" *Nat Commun* **5**: 4770, 2014.
- 2) Yasuda T, Ueno T, Fukumura K, Yamato A, Ando M, Yamaguchi H, Soda M, Kawazu M, Sai E, Yamashita Y, Murata M, Kiyoi H, Naoe T & Mano H. "Leukemic evolution of donor-derived cells harboring IDH2 and DNMT3A mutations after allogeneic stem cell transplantation" *Leukemia* **28**: 426-8, 2014.
- 3) Nakamura Y, Taniguchi H, Mizoguchi K, Ikeda T, Motoshima K, Yamaguchi H, Nagashima S, Nakatomi K, Soda M, Mano H & Kohno S. "Secondary EML4-ALK-positive lung adenocarcinoma in a patient previously treated for acute lymphoblastic leukemia in childhood: a case report" *Jpn J Clin Oncol* **44**: 593-6, 2014.

宮崎泰司

- 1) Itonaga H, Imanishi D, Wong YF, Sato S, Ando K, Sawayama Y, Sasaki D, Tsuruda K, Hasegawa H, Imaizumi Y, Taguchi J, Tsushima H, Yoshida S, Fukushima T, Hata T, Moriuchi Y, Yanagihara K, Miyazaki Y. "Expression of myeloperoxidase in acute myeloid leukemia

- blasts mirrors the distinct DNA methylation pattern involving the downregulation of DNA methyltransferase DNMT3B." *Leukemia*, **28**:1459-1466, 2014
- 2) Kihara R, Nagata Y, Kiyoi H, Kato T, Yamamoto E, Suzuki K, Chen F, Asou N, Ohtake S, Miyawaki S, Miyazaki Y, Sakura T, Ozawa Y, Usui N, Kanamori H, Kiguchi T, Imai K, Uike N, Kimura F, Kitamura K, Nakaseko C, Onizuka M, Takeshita A, Ishida F, Suzushima H, Kato Y, Miwa H, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Naoe T. "Comprehensive analysis of genetic alterations and their prognostic impacts in adult acute myeloid leukemia patients." *Leukemia*, **28**:1586-1595, 2014
 - 3) Wong YF, Micklem CN, Taguchi M, Itonaga H, Sawayama Y, Imanishi D, Nishikawa S, Miyazaki Y, Jakt LM. "Longitudinal Analysis of DNA Methylation in CD34+ Hematopoietic Progenitors in Myelodysplastic Syndrome." *Stem Cells Transl Med*, **3**: 1188-1198, 2014
 - 4) Shinagawa K, Yanada M, Sakura T, Ueda Y, Sawa M, Miyatake J, Dobashi N, Kojima M, Hatta Y, Emi N, Tamaki S, Gomyo H, Yamazaki E, Fujimaki K, Asou N, Matsuo K, Ohtake S, Miyazaki Y, Ohnishi K, Kobayashi Y, Naoe T. "Tamibarotene As Maintenance Therapy for Acute Promyelocytic Leukemia: Results From a Randomized Controlled Trial." *J Clin Oncol*, **32**:3729-3735, 2014
 - 5) Hata T, Imanishi D, Miyazaki Y. "Lessons from the Atomic Bomb About Secondary MDS." *Curr Hematol Malig Rep*, **9**:407-411, 2014
 - 6) Taguchi M, Imaizumi Y, Sasaki D, Higuchi T, Tsuruda K, Hasegawa H, Taguchi J, Sawayama Y, Imanishi D, Hata T, Yanagihara K, Yoshie O, Miyazaki Y. "Molecular analysis of loss of CCR4 expression during mogamulizumab monotherapy in an adult T cell leukemia/lymphoma patient." *Ann Hematol*, 2014 Oct 23.
 - 7) Iriyama N, Asou N, Miyazaki Y, Yamaguchi S, Sato S, Sakura T, Maeda T, Handa H, Takahashi M, Ohtake S, Hatta Y, Sakamaki H, Honda S, Taki T, Taniwaki M, Miyawaki S, Ohnishi K, Kobayashi Y, Naoe T. "Normal karyotype acute myeloid leukemia with the CD7+ CD15+ CD34+ HLA-DR + immunophenotype is a clinically distinct entity with a favorable outcome." *Ann Hematol*, **93**:957-963, 2014
- 永井正
- 1) Sripayap P, Nagai T, Uesawa M, Kobayashi H, Tsukahara T, Ohmine K, Muroi K, Ozawa K. "Mechanisms of resistance to azacitidine in human leukemia cell lines" *Exp Hematol* **42**: 294-306, 2014
 - 2) Hatano K, Nagai T, Matsuyama T, Sakaguchi Y, Fujiwara S, Oh I, Muroi K, Ozawa K. "Leukemia cells directly phagocytose blood cells in AML-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis: a case report and review of the literature" *Acta Haematologica* **133**: 98-100, 2014
 - 3) Tataru R, Sato M, Fujiwara S, Oh I, Muro K, Ozawa K, Nagai T. "Cytokine adsorption therapy for Hodgkin lymphoma-associated haemophagocytic lymphohistiocytosis" *Internal Med* **53**: 2365-2368, 2014
 - 4) Fujiwara S, Muroi K, Tataru R, Ohmine K, Matsuyama T, Mori M, Nagai T, Ozawa K. "Intrathecal Administration of High-Titer Cytomegalovirus Immunoglobulin for Cytomegalovirus Meningitis" *Case Reports in Hematol* Article ID 272458, 2014.
 - 5) Okabe H, Suzuki T, Uehara E, Ueda M, Nagai T, Ozawa K. "The bone marrow hematopoietic microenvironment is impaired in iron-overloaded mice" *Eur J Haematol* **93**: 118-128, 2014
 - 6) Fujiwara S, Muroi K, Tataru R, Matsuyama T, Ohmine K, Suzuki T, Mori M, Nagai T, Tanaka A, Ozawa K. "Clinical features of de novo CD25-positive follicular lymphoma" *Leuk Lymphoma* **55**: 307-313, 2014
 - 7) Muroi K, Fujiwara S, Tataru R, Sato K, Oh I, Ohmine K, Suzuki T, Nagai T, Ozawa K, Kanda Y. "Two granulocytic regions in bone marrow with eosinophilia evaluated by flow cytometry" *J Clin Exp Hematop* **54**: 243-245, 2014
 - 8) Suzuki T, Oh I, Ohmine K, Meguro A, Mori M, Fujiwara S, Yamamoto C, Nagai T, Ozawa K. "Distribution of serum erythropoietin levels in Japanese patients with myelodysplastic syndromes" *Int J Hematol* **101**: 32-36, 2015
- 中村元直
- 1) Sumida H, Yanagida K, Kita Y, Abe J, Matsushima K, Nakamura M, Ishii S, Sato S, & Shimizu T. "Interplay between CXCR2 and BLT1 Facilitates Neutrophil Infiltration and Resultant Keratinocyte Activation in a Murine

Model of Imiquimod-Induced Psoriasis” *J.*

Immunol., **192(9)**: 4361, 2014

- 2) Lan W, Yamaguchi S, Yamamoto T, Yamahira S, Tan M, Murakami N, Zhang J, Nakamura M, & Nagamune T. “Visualization of the pH-dependent dynamic distribution of G2A in living cells” *The FASEB J.*, **28**: 3965, 2014

都築忍

- 1) Yoshida N, Karube K, Utsunomiya A, Tsukasaki K, Imaizumi Y, Taira N, Uike N, Umino A, Arita K, Suguro M, Tsuzuki S, Kinoshita T, Ohshima K, Seto M. “Molecular characterization of chronic-type adult T-cell leukemia/lymphoma” *Cancer Res.* **74**: 6129-6138, 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）

委託業務成果報告（業務項目）

「次世代シーケンサーによる造血器悪性腫瘍大規模リシーケンス」に関する研究

担当責任者： 間野博行 東京大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨：我々は広く白血病患者骨髄より造血幹細胞相当分画のみを純化し保存する「Blast Bank」を設立し既に1000例を越えるサンプル収集に成功している。またこれら臨床検体から一度の次世代シーケンサー解析でゲノムの点突然変異、挿入・欠失のみならず融合遺伝子も併せ検出可能な手法としてcDNAキャプチャー法を開発した。収集した検体の中に家族性血小板異常症の症例群があった。これら検体を全エクソンシーケンスすることにより、高頻度にCDC25C遺伝子変異を見いだした。CDC25C変異の結果G2/Mチェックポイント機構が破綻し、細胞周期が異常に加速することが明らかになった。

A 研究目的

白血病は様々な遺伝子異常によって生じるヘテロな疾患群であり、PML-RARAやBCR-ABLのように具体的な発がん原因遺伝子・治療対象分子が明らかでない例はまれである。有効な分子標的療法を新たに開発するためには、それぞれの白血病サブグループの主たる発症原因遺伝子を明らかにすることが重要であり、そのためにはゲノミクス解析が有用なツールと考えられる。

我々はこれまでの第3次対がん総合戦略研究事業において、(1) 広く我が国の白血病症例からCD133陽性白血病芽球分画のみを純化保存するバンク事業を行い既に1000例に及ぶ芽球ストックを整備した（Blood 98:422）と共に、(2) 微量の臨床検体からでもマイクロRNA（miRNA）を大量にクローニングする手法を開発し（Nature Protocols 2:3136）、上記白血病芽球におけるmiRNA配列の大規模取得技術を確立した。さらに我々は、一般の方法とは異なり、エラー率の極めて低い次世代シーケンサー解析技術を新たに開発した（未発表データ）。

そこで本研究計画では、次世代シーケンサーを用いて上記検体バンクを大規模にリシーケンスし、配列異常の面から造血器腫瘍の新たな分子診断マーカーおよび発症原因異常の探索を目指す。

B 研究方法

各検体試料よりmRNAを抽出して断片化した後、SureSelectシステム（Agilent社）を用いてエクソン領域のみを高効率に純化した。これを次世代シーケンサーによる配列解

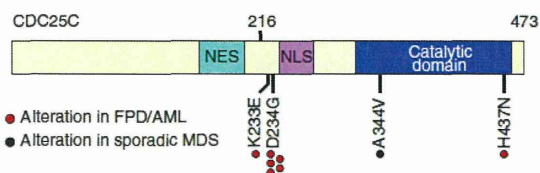
析を行い、各試料毎に約50 Gbpの大量の塩基配列を得た。それを独自のコンピューターパイプラインによって非同義変異のリストを得た。（倫理面への配慮）

本研究計画は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠した東京大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の認可を受けている。またサンプル採取に際しては研究計画説明書を患者さんに渡して担当医が説明すると共に、試料提供の同意書に署名をいただいている。

C 研究結果

我々が集めた検体の中に、家族性血小板異常症の患者群があった。それら症例の骨髄及び頬粘膜細胞よりゲノムDNAを抽出し、全エクソンシーケンスを行った。

興味深いことに全検体中53%の頻度でCDC25Cの非同義変異を発見した。中でもD234G変異はrecurrentであった（下図）。



CDC25Cはdual phosphataseであり、その活性により細胞周期のG2/Mチェックポイントを制御することが知られており、その異常がG2/Mチェックポイントの破綻につながる事が予想される。実際、変異CDC25CはTAK1によるリン酸化を受けず、14-3-3タンパクに結合

しないことがわかった。その結果活性が高進し、変異CDC25Cを持つ細胞はG2/Mチェックポイントを受けず、細胞周期が異常に更新することが明らかになった。そのためCDC25C変異細胞はDNAダメージ存在下でも細胞周期停止・アポトーシスにならず、DNA変異を蓄積しやすいことが明らかになった。

なし

D&E. 考察及び結論

家族性血小板異常症は、高頻度に急性骨髄性白血病・骨髄異形成症候群に移行することが知られており、その原因は不明であった。CDC25C変異が家族性血小板異常症の約半数に見つかったことは、細胞周期異常がその原因であると考えられ、より早期からの末梢血の遺伝子スクリーニングの重要性を示唆する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshimi A, Toya T, Kawazu M, Ueno T, Tsukamoto A, Iizuka H, Nakagawa M, Nannya Y, Arai S, Harada H, Usuki K, Hayashi Y, Ito E, Kirito K, Nakajima H, Ichikawa M, Mano H and Kurokawa M. “Recurrent CDC25C mutations drive malignant transformation in FPD/AML” *Nat Commun.* 2014; **5**: 4770.
- 2) Yasuda T, Ueno T, Fukumura K, Yamato A, Ando M, Yamaguchi H, Soda M, Kawazu M, Sai E, Yamashita Y, Murata M, Kiyoi H, Naoe T and Mano H. “Leukemic evolution of donor-derived cells harboring IDH2 and DNMT3A mutations after allogeneic stem cell transplantation” *Leukemia.* 2014; **28**: 426-8.
- 3) Nakamura Y, Taniguchi H, Mizoguchi K, Ikeda T, Motoshima K, Yamaguchi H, Nagashima S, Nakatomi K, Soda M, Mano H and Kohno S. “Secondary EML4-ALK-positive lung adenocarcinoma in a patient previously treated for acute lymphoblastic leukemia in childhood: a case report” *Jpn J Clin Oncol.* 2014; **44**: 593-6.

H. 知的財産権の出願・登録状況

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

「急性骨髄性白血病における DNA メチル化による MPO 発現調節の検討」
担当責任者： 宮崎 泰司 長崎大学大学原爆後障害医療研究所 教授

研究要旨：急性骨髄性白血病（AML）では白血病芽球が活性酸素反応関連酵素であるミエロペルオキシダーゼ（MPO）を発現している。MPO 発現は、一定の遺伝子異常や化学療法反応性と関連しているが、その発現調節機構は十分に解明されていない。本研究では、AML の CD34 陽性細胞における MPO 蛋白質発現が *MPO* 遺伝子発現と関連していること、その遺伝子発現は *MPO* 遺伝子のメチル化と関連していることを示した。興味深いことに *MPO* 遺伝子メチル化レベルと関連してメチル化を受けている遺伝子群（33 遺伝子）が同定され、その中に DMN メチル化を司る *DNMT3B* 遺伝子が含まれていた。臨床検体を用いて検討したところ、AML の CD34 陽性細胞において *MPO* 遺伝子と *DNMT3B* 遺伝子発現は逆相関しており、*DNMT3B* 遺伝子高メチル化例では *MPO* 遺伝子発現が高いという結果を支持していた。さらに、MPO 発現レベルは他の治療反応性関連遺伝子や分化マーカー遺伝子のメチル化とも関連しており、MPO 発現は AML におけるメチル化パターンのマーカーとなりうる可能性が示唆された。

A 研究目的

急性骨髄性白血病（AML）は、造血（幹/前駆）細胞が種々の遺伝子異常、エピゲノム異常を獲得して発症に至ると考えられており、AML の病態の根幹をなしている。一方で、臨床的には様々な予後/治療反応予測因子が同定されており、AML 芽球に発現するミエロペルオキシダーゼ(MPO)もその一つである。MPO 高発現 AML では化学療法感受性が良好であることが知られており、予後良好染色体異常[t(8;21), inv(16), t(15;17)]を有する AML ではいずれも MPO を高発現している。また、正常核型で MPO 高発現の一群では CEBPA 変異が見られ、これらも予後良好であることが知られている。大変興味深いことにいずれも正常造血での *MPO* 遺伝子転写に関する転写因子(AML1, CBFβ, RARA, CEBPA)の機能喪失型の変異である。これより、正常造血とは異なり、AML 芽球における MPO 発現調節は転写因子以外の機構が大きな役割を果たしている可能性が考えられる。

造血細胞における *MPO* 遺伝子発現調節は、細胞系統および分化段階に極めて特異的な調節を受けており、その機構では種々の転写因子の活性化に加えて、遺伝子メチル化の重要性も指摘されている。

本研究では、AML における *MPO* 遺伝子発現と遺伝子メチル化の関連を検討した。

B 研究方法

MPO 発現レベルの異なる 10 種の白血病細胞株 (AML 由来、ALL 由来、CML 由来) を用いて *MPO* 遺伝子発現レベルを定量的 PCR 法で測定すると共に、それぞれの *MPO* 遺伝子（プロモーター領域を含む）のメチル化状態を bisulfite 法で検討した。これらをメチル化酵素阻害薬で処理した後の *MPO* 発現、遺伝子メチル化についても同様に検討した。

AML 患者検体より、CD34 陽性細胞をカラム法にて分離し、それらの *MPO* 発現を蛋白質レベル、遺伝子レベルで検討した。さらに、*MPO* 遺伝子のメチル化状態についても検討した。*MPO* 遺伝子メチル化と関連してメチル化を受けている遺伝子を検討するために、Illumina Infinium assay (HM 450 BeadChips)を用いて AML 細胞におけるゲノムワイドの遺伝子メチル化パターンを調べた。

MPO 遺伝子メチル化と関連の見られた遺伝子の発現については定量 PCR を用いて検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は施設において倫理委員会での承認が得られている。また、対象者には研究の参加については説明文書を用いて説明し、文書による同意を得た。得られた個人情報の管理に

は十分な配慮を行った。

C 研究結果

1) 白血病細胞株での検討

いずれの細胞株においても(10株)、*MPO* 遺伝子発現と *MPO* 遺伝子のメチル化には有意な相関が見られた。すなわち *MPO* 高発現では低メチル化であり、これらの細胞をメチル化阻害薬で処理すると、*MPO* 低発現細胞株の一部では *MPO* 遺伝子のメチル化低減と共に *MPO* 遺伝子発現が誘導された。これらより、白血病細胞株における *MPO* 遺伝子発現調節には DNA メチル化が重要な役割を果たしていると考えられた。

2) AML 検体の検討

AML 検体(18検体)から CD34 陽性細胞を分離し、*MPO* 発現と *MPO* 遺伝子メチル化との関連を検討したところ、細胞株で見られたのと同様の関連が観察された。さらに、*MPO* 遺伝子発現レベルは AML における *MPO* 蛋白質発現レベルとも相関していた。

3) *MPO* 遺伝子メチル化とゲノムメチル化との関連解析

MPO 遺伝子メチル化とゲノム全体のメチル化との関連を検討するため AML 20 例について Illumina Infinium assay を用いてゲノムメチル化パターンを調べたところ、プロモーター領域に高メチル化が見られる 45 遺伝子、遺伝子本体について高メチル化が見られる 68 遺伝子が挙がってきた。それらのうちプロモーター領域、遺伝子本体の両方で高メチル化されていたのは 33 遺伝子であり、これらを *MPO* 高発現 AML に特異的にメチル化の見られる遺伝子とした。このメチル化パターンはゲノム全体のメチル化状態を反映する LINE-1 のメチル化との相関はなく、*MPO* 高発現状態に特異的と考えられた。ここには、細胞分化、エピゲノム調節などに関連する遺伝子が含まれていたが、この中に DNA メチル化酵素である *DNMT3B* が存在していた。すなわち、*MPO* 高発現例では *DNMT3B* 遺伝子が強くメチル化を受けており、*MPO* 遺伝子と *DNMT3B* 遺伝子のメチル化状態は反対にな

っていた。

4) *MPO* と *DNMT3B* の発現の検討

(3)に見られた関連を検証するため、AML 検体を用いて *MPO*, *DNMT3B* 遺伝子発現を定量 PCR 法によって検討したところ、両者には逆相関が見られた。正常核型症例に限ってもその相関は有意であった。

D&E. 考察及び結論

本研究によって、AML 芽球における *MPO* 発現調節には *MPO* 遺伝子のメチル化状態が重要な役割を担っていることが示された。さらに、*MPO* 発現レベルはたの遺伝子のメチル化パターンとも有意な関連があった。これはゲノム全体のメチル化状態の反映ではなく、*MPO* 発現状態に特異的な者と考えられる。

興味深いことに DNA メチル化酵素をコードしている *DNMT3B* 遺伝子の高メチル化と *MPO* 遺伝子の高発現、すなわち低メチル化状態が関連しており、更にこれの反映と考えられる遺伝子発現については、臨床検体で両遺伝子の発現が有意な逆相関を示していた。このことは、*MPO* 遺伝子メチル化に *DNMT3B* が何らかの関与を持つ可能性を示唆している。これまで報告されているように、AML における高頻度の *DNMT3A* 遺伝子変異を考えると、AML の病態と DNA メチル化酵素群とは深い関連を持つことが予想される。*DNMT3A* 遺伝子変異状況と *MPO* 発現、*DNMT3B* 遺伝子メチル化など、今後、更に検討が必要と考えられる。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Itonaga H, Imanishi D, Wong YF, Sato S, Ando K, Sawayama Y, Sasaki D, Tsuruda K, Hasegawa H, Imaizumi Y, Taguchi J, Tsushima H, Yoshida S, Fukushima T, Hata T, Moriuchi Y, Yanagihara K, Miyazaki Y. “Expression of

myeloperoxidase in acute myeloid leukemia blasts mirrors the distinct DNA methylation pattern involving the downregulation of DNA methyltransferase DNMT3B." *Leukemia*, 28:1459-1466, 2014

2) Kihara R, Nagata Y, Kiyoi H, Kato T, Yamamoto E, Suzuki K, Chen F, Asou N, Ohtake S, Miyawaki S, Miyazaki Y, Sakura T, Ozawa Y, Usui N, Kanamori H, Kiguchi T, Imai K, Uike N, Kimura F, Kitamura K, Nakaseko C, Onizuka M, Takeshita A, Ishida F, Suzushima H, Kato Y, Miwa H, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Naoe T. "Comprehensive analysis of genetic alterations and their prognostic impacts in adult acute myeloid leukemia patients." *Leukemia*, 28:1586-1595, 2014

3) Wong YF, Micklem CN, Taguchi M, Itonaga H, Sawayama Y, Imanishi D, Nishikawa S, Miyazaki Y, Jakt LM. "Longitudinal Analysis of DNA Methylation in CD34+ Hematopoietic Progenitors in Myelodysplastic Syndrome." *Stem Cells Transl Med*, 3: 1188-1198, 2014

4) Shinagawa K, Yanada M, Sakura T, Ueda Y, Sawa M, Miyatake J, Dobashi N, Kojima M, Hatta Y, Emi N, Tamaki S, Gomyo H, Yamazaki E, Fujimaki K, Asou N, Matsuo K, Ohtake S, Miyazaki Y, Ohnishi K, Kobayashi Y, Naoe T. "Tamibarotene As Maintenance Therapy for Acute Promyelocytic Leukemia: Results From a Randomized Controlled Trial." *J Clin Oncol*, 32:3729-3735, 2014

5) Hata T, Imanishi D, Miyazaki Y. "Lessons from the Atomic Bomb About Secondary MDS." *Curr Hematol Malig Rep*, 9:407-411, 2014

6) Taguchi M, Imaizumi Y, Sasaki D,

Higuchi T, Tsuruda K, Hasegawa H, Taguchi J, Sawayama Y, Imanishi D, Hata T, Yanagihara K, Yoshie O, Miyazaki Y. "Molecular analysis of loss of CCR4 expression during mogamulizumab monotherapy in an adult T cell leukemia/lymphoma patient." *Ann Hematol*, 2014 Oct 23.

7) Iriyama N, Asou N, Miyazaki Y, Yamaguchi S, Sato S, Sakura T, Maeda T, Handa H, Takahashi M, Ohtake S, Hatta Y, Sakamaki H, Honda S, Taki T, Taniwaki M, Miyawaki S, Ohnishi K, Kobayashi Y, Naoe T. "Normal karyotype acute myeloid leukemia with the CD7+ CD15+ CD34+ HLA-DR + immunophenotype is a clinically distinct entity with a favorable outcome." *Ann Hematol*, 93:957-963, 2014

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

「ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬 romidepsin に対する耐性機序の解析」に
関する研究

担当責任者 永井 正（自治医科大学・医学部・准教授）

研究要旨：DNA メチル化阻害薬 Azacitidine(AZA)耐性白血病細胞を親株として、AZA とヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害薬 romidepsin の両方に耐性を示す細胞株 TAR/RR を樹立した。次いで、TAR/RR を用いて、急性骨髄性白血病(AML)細胞における romidepsin 耐性機序の解析を行った。その結果、TAR/RR では membrane transporters の過剰発現が認められないにも関わらず、romidepsin によるヒストンアセチル化の誘導が低下し、アポトーシスの誘導も抑制されていた。このことから、HDAC の変異等により romidepsin に対する感受性が低下している可能性が指摘される。

A. 研究目的

DNA メチル化阻害薬 azacitidine (AZA)は骨髄異形成症候群(MDS)および急性骨髄性白血病(AML)に対する有力な治療薬である。しかしながら、長期の奏効が得られない症例が多く、耐性の克服が重要な課題である。前研究においてヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害薬 romidepsin の AZA 耐性 AML 細胞に対する有効性が示唆されたが、実際に romidepsin を臨床応用した場合、AZA と romidepsin 両方に耐性を示すクローンの増大が危惧される。そこで、本研究では、AZA と romidepsin 両方に耐性を示す細胞株を樹立し、特に romidepsin の耐性機序を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

THP-1/AR および HL60/AR は、ヒト AML 由来細胞株 THP-1 および HL60 より樹立した AZA 耐性株である。本研究では、AZA/romidepsin 耐性株を樹立するため、THP-1/AR を AZA および romidepsin 存在下で長期間培養した。その過程で、添加する romidepsin を低濃度から段階的に増加させ、最終的にメチルセルロース半寒天培地を用いて AZA/romidepsin 耐性クローンを

単離した。樹立した AZA/romidepsin 耐性株を用いて、romidepsin によるアポトーシス誘導機序の欠落等について検討した。

C. 研究結果

THP-1/AR より AZA/romidepsin 耐性株 TAR/RR を樹立した。TAR/RR における romidepsin の IC50 値は THP-1/AR の 9.77 倍であり、TAR/RR が高度の romidepsin 耐性を有することが示された。THP-1/AR では 5nM の romidepsin によりヒストン H3 のアセチル化が誘導されたが、TAR/RR では同濃度の romidepsin では全く誘導されず、10nM でわずかな誘導が観察されるに過ぎなかった。さらに、TAR/RR では romidepsin によるアポトーシス誘導が抑制されており、実際 romidepsin 添加後も cleaved-caspase 蛋白量の増加が認められなかった。一方、P 糖蛋白発現量を flowcytometry 解析により検討したところ、THP-1/AR と TAR/RR とで明らかな差を認めなかった。さらに equilibrative nucleoside transporters の発現量についても差がなかった。一方、THP-1/AR では romidepsin 添加後にリン酸化 ERK1/2 発現量の低下を認めたが、TAR/RR では変化を認め

なかった。このことから、TAR/RR では romidepsin による増殖シグナル抑制効果が欠落している可能性がある。

D. 考察

高リスク MDS および多剤併用化学療法の実行が困難な AML 症例に対しては、AZA が有力な治療選択となっている。HDAC 阻害薬は AZA と同様に遺伝子発現調節に作用する。従って、HDAC 阻害薬は細胞内 AZA 活性化機構が障害されている AZA 耐性細胞に対しても効果が期待される。実際、前研究において romidepsin が AZA 耐性細胞に対してアポトーシスを誘導することが示された。一方、一般的に低分子治療薬は容易に耐性が獲得される傾向が強く、romidepsin についても耐性の出現が予想される。特に、AZA と romidepsin の併用療法を行った場合には、AZA/romidepsin 耐性細胞の出現が予想される。本研究では、AZA/romidepsin 耐性細胞の樹立を行い、romidepsin 耐性機序の検討を行った。多くの薬剤耐性細胞で、細胞内薬剤濃度低下の起因となる membrane transporter の高発現がみられる。しかしながら、AZA/romidepsin 耐性株 TAR/RR では、P 糖蛋白および equilibrative nucleoside transporters のいずれの高発現も認められなかった。従って、romidepsin の細胞内濃度低下が耐性の主たる原因である可能性は低いと推察される。一方、romidepsin によるヒストンアセチル化の誘導が TAR/RR 細胞では減弱していることから、romidepsin の主な作用標的分子である HDAC1、HDAC2 の変異の可能性もあり、現在、遺伝子変異の有無について検討中である。

E. 結論

1. AZA/romidepsin 耐性白血病細胞株 TAR/RR を樹立した。
2. TAR/RR では、romidepsin によるヒストンアセチル化の誘導が減弱しており、アポトーシスの誘導も抑制されていた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sripayap P, Nagai T, Uesawa M, Kobayashi H, Tsukahara T, Ohmine K, Muroi K, Ozawa K.

“Mechanisms of resistance to azacitidine in human leukemia cell lines” *Exp Hematol* **42**: 294-306, 2014

- 2) Hatano K, Nagai T, Matsuyama T, Sakaguchi Y, Fujiwara S, Oh I, Muroi K, Ozawa K. “Leukemia cells directly phagocytose blood cells in AML-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis: a case report and review of the literature” *Acta Haematologica* **133**: 98-100, 2014
- 3) Tataru R, Sato M, Fujiwara S, Oh I, Muro K, Ozawa K, Nagai T. “Cytokine adsorption therapy for Hodgkin lymphoma-associated haemophagocytic lymphohistiocytosis” *Internal Med* **53**: 2365-2368, 2014
- 4) Fujiwara S, Muroi K, Tataru R, Ohmine K, Matsuyama T, Mori M, Nagai T, Ozawa K. “Intrathecal Administration of High-Titer Cytomegalovirus Immunoglobulin for Cytomegalovirus Meningitis” *Case Reports in Hematol* Article ID 272458, 2014.
- 5) Okabe H, Suzuki T, Uehara E, Ueda M, Nagai T, Ozawa K. “The bone marrow hematopoietic microenvironment is impaired in iron-overloaded mice” *Eur J Haematol* **93**: 118-128, 2014
- 6) Fujiwara S, Muroi K, Tataru R, Matsuyama T, Ohmine K, Suzuki T, Mori M, Nagai T, Tanaka A, Ozawa K. “Clinical features of de novo CD25-positive follicular lymphoma” *Leuk Lymphoma* **55**: 307-313, 2014
- 7) Muroi K, Fujiwara S, Tataru R, Sato K, Oh I, Ohmine K, Suzuki T, Nagai T, Ozawa K, Kanda Y. “Two granulocytic regions in bone marrow with eosinophilia evaluated by flow cytometry” *J Clin Exp Hematop* **54**: 243-245, 2014

- 8) Suzuki T, Oh I, Ohmine K, Meguro A, Mori M, Fujiwara S, Yamamoto C, Nagai T, Ozawa K. “Distribution of serum erythropoietin levels in Japanese patients with myelodysplastic syndromes” *Int J Hematol* **101**: 32-36, 2015

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

「白血球に発現するG蛋白質共役型受容体」に関する研究

担当責任者： 中村元直 岡山理科大学理学部臨床生命科学科 教授

研究要旨：白血球は、異物や微生物が体内に侵入した際の防御において重要な役割を果たす。血液幹細胞からの増殖・分化段階を含め、白血球系細胞には様々なG蛋白質共役型受容体（G-protein coupled receptor；GPCR）が発現し、白血球の成熟や機能に深く関与すると考えられている。これまで我々は、白血球系細胞に高発現するGPCRとして、脂質メディエーターを認識するもの（血小板活性化因子受容体、ロイコトリエンB₄受容体など）やプロトン感受性GPCR（T-cell death-associated gene 8; TDAG8、G2 accumulation; G2Aなど）を発見してきた。しかし、白血球成熟過程や機能におけるこれら受容体の個々の役割は未だ不明な点が多い。本研究課題では、この中でヒト前骨髄球性白血病細胞株HL-60細胞に高発現するG2Aに着目し、細胞表面に局在（表在）する受容体のみを特異的に蛍光標識する新規技法を用いてこの受容体の細胞外pHに依存した細胞内挙動の解析を行った。この受容体は、生理的pH（pH7.4）下では速やかに細胞内に取込まれて初期エンドソーム内で貯留状態にあるが、低pH（pH6.4）に曝されるとこの取込み速度が極度に低下し、恒常的な形質膜へのリサイクリングが優位となる結果、細胞表面のG2A量が増加した。細胞膜上に局在後は酸性環境下ゆえのG2A構造変化が起これ、これによって活性化状態に移行して細胞内にシグナルが伝達されるものと推察した。

A 研究目的

プロトン感受性GPCRは細胞外pHの低下（酸性化）に伴い活性化する受容体であり、Gi型G蛋白質と共役してイノシトール3リン酸産生を促すG2Aとovarian cancer G protein-coupled receptor 1 (OGR1)、そして、Gs型G蛋白質の活性化で細胞内cAMP量を高めるTDAG8とGPR4の4種類が存在する。これら受容体は白血球系細胞に発現し、また、ヒト癌細胞株にも強く発現が認められることから、これらが細胞の癌化に関与する可能性が議論されている。例えば、マウス肺癌細胞株であるLLC細胞をマウスに尾静脈注射し、肺に生着した癌の進行を検討した結果、TDAG8を過剰発現させたLLC細胞において、コントロールLLC細胞に比べて著しい癌の進行が認められた（PNAS 107:17309）。こうした背景から、我々はG2Aに関してもその諸性質と白血球における発現の意義解明から、白血病発症、進展への関与を調べることにした。

B 研究方法

我々は最近、Sortase-A（黄色ブドウ球菌由来のトランスペプチダーゼ）とAF-488蛍光標識ペプチド（LPETGG配列）を用い、生細胞に発現させた目的受容体の表在分子のみを特異的に蛍光標識する手法を構築した（*Methods Enzymol* 521:203）。この手法を活用し、HEK293T細胞に発現させたヒトG2Aの表在分子のみを蛍光標識した。その後、細胞外環境を生理的pH（pH 7.4）、或は、低pH（pH 6.4）に変化させながら表在ヒトG2Aの挙動を共焦点蛍光顕微鏡で観察した。形質膜に局在するヒトG2A、初期エンドソームに貯留するヒトG2Aそれぞれの蛍光強度を測定し、pH変化時の両者の局在比率を経時的に導き出した。なお、この研究は、東京大学大学院工学研究科 長棟輝行教授と共同で進めたものである。

C 研究結果

G2Aはヒト前骨髄球性白血病細胞株HL-60に高発現しており（*Genes to cells* 14:1441）、細胞生理的pH下では細胞内シグナ

リングは全く起こさないが、低 pH 環境下に曝すと Gi 型 G 蛋白質を介してイノシトール 3 リン酸の産生を惹起する。こうした pH 変化に依存した活性化に照らし合わせて蛍光標識した表在ヒト G2A の挙動解析をタイムラプス共焦点蛍光顕微鏡で行った結果、生理的 pH 下では表在ヒト G2A は標識後に速やかな初期エンドソームへの移行が観察されたが、標識直後に低 pH に曝すとこの移行は極度に低下した。また、生理的 pH 環境下で初期エンドソームに蓄積したヒト G2A は、細胞外環境を低 pH に変化させることで減少し、同時に形質膜局在量が増加した。pH 変化に伴う細胞膜／初期エンドソーム間のヒト G2A 移動量をそれぞれの蛍光強度を経時的に測定することで評価した結果、細胞表面受容体の細胞内への取込み速度は生理的 pH 下の方が酸性環境下よりも約 10 倍速かった。以上の結果より、ヒト G2A は小胞体合成後、形質膜上発現→初期エンドソーム移行→リサイクルによる形質膜再発現の順路で挙動するが、生理的 pH では酸性下よりも細胞内取込み速度が顕著に速いことから結果的に細胞表面局在量が低減していることが推察された。

D&E. 考察及び結論

G2A は酸性環境下でのみ活性化され、G 蛋白質を介して細胞内にシグナル伝達すると考えられているが、実は、この受容体は生理的環境下では細胞表面に局在するものは少なく、主に初期エンドソーム内に貯留していることが示唆された。酸性環境下でこの受容体が活性化される場合は、“細胞膜上の分子数増加”と“低 pH 下における受容体の構造変化”の 2 つのイベントを経てシグナル伝達が起きることが明らかとなった。言い換えると、細胞内局在と構造変化という 2 重の制御によって G2A は厳密に活性がコントロールされていることになる。では、この制御が破綻した場合、細胞はいかなる影響を受けるのか？細胞の癌化に結びつくのか？こうした課題に引き続き取り組んでいきたい。

他の癌に目を向けた場合、悪性腫瘍の内部が酸性であることはよく知られている。癌細胞の増殖は時に血管から離れた栄養・酸素不足の部位でも進行する。低酸素状態での増殖は解糖系活発化による乳酸の蓄積で細胞内は酸性となるが、細胞は細胞死回避のためにプロトンや乳酸などを細胞外に汲み出し、これによって周辺環境の pH

が酸性に傾く。このように腫瘍形成により引き起こされた酸性状態でプロトン受容体シグナル経路が活性化され、これが腫瘍の進展に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられる。今後、G2A を含めたプロトン GPCR の白血球を含めた細胞の癌化との関係を調べると同時に、制癌的な観点から制御の方法を検討する計画である。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sumida H, Yanagida K, Kita Y, Abe J, Matsushima K, Nakamura M, Ishii S, Sato S, & Shimizu T. "Interplay between CXCR2 and BLT1 Facilitates Neutrophil Infiltration and Resultant Keratinocyte Activation in a Murine Model of Imiquimod-Induced Psoriasis" *J. Immunol.*, **192**(9): 4361, 2014
- 2) Lan W, Yamaguchi S, Yamamoto T, Yamahira S, Tan M, Murakami N, Zhang J, Nakamura M, & Nagamune T. "Visualization of the pH-dependent dynamic distribution of G2A in living cells" *The FASEB J.*, **28**: 3965, 2014

H 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

「白血病関連変異遺伝子の機能的意義の解明」に関する研究

担当責任者： 都築 忍 愛知県がんセンター研究所 室長

研究要旨：研究代表者の間野らにより、Bリンパ性白血病において高頻度に認められる遺伝子変異が3種類見出された。本分担研究では、その遺伝子変異が白血病の成立・維持に果たす役割についてマウスモデルにより検討した。その結果、3種の変異遺伝子には、Bリンパ球の分化を阻害するとともに自己複製能を亢進させ、したがってマウス体内で未分化Bリンパ球を持続的に増殖させる作用があることが判明した。このBリンパ球は白血病性幹細胞と共通する特性を備えていることから、今回見出された変異遺伝子が白血病の成立・維持に中心的役割を果たすことが明らかとなった。

A 研究目的

白血病は様々な遺伝子異常によって生じるヘテロな疾患群だが、PML-RARA や BCR-ABL のようにその疾患単位を特徴づける遺伝子変異が存在するのも事実である。研究代表者の間野らによる大規模ゲノミクス解析により、Bリンパ性白血病において高頻度に特定の遺伝子変異が起きていることが見出された。本分担研究では、この新たに見出された遺伝子変異の機能的意義の解析を通して、その遺伝子変異が白血病の成立・維持に果たす役割を解明し、さらに当該遺伝子変異が疾患単位を規定しうるものであるのかを明らかにすることを目的とする。

B 研究方法

われわれはこれまでに、小児リンパ性白血病で最も高頻度に認められる TEL-AML1 融合遺伝子や、成人白血病で予後の関係が深い ERG 遺伝子について、その機能的意義につきマウスモデルを用いて解明してきた (Tsuzuki S, et al., Stem Cells, 2013; Tsuzuki S, et al., Blood, 2011)。その結果、TEL-AML1 にはBリンパ球に自己複製能を付与することにより白血病前駆細胞を生成する能力があること、ERG には自己複製付与能はないもののTリンパ球の細胞増殖促進作用があることを明らかにした。

本分担研究では、これらと同様の手法により、マウス胎児由来未分化プロBリンパ球に、今回新たに見出された変異遺伝子をレトロウイルスベクターにより遺伝子発現させ、放射線照射マウスに移植し、移植後の細胞動態を追跡

することで、当該変異遺伝子が細胞の分化や自己複製に与える効果を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は、愛知県がんセンター組換えDNA委員会および動物委員会の承認を得て行われた。

C 研究結果

今回の検討対象の変異遺伝子は、バリエーションが存在するものの大別して3種類ある（特許申請予定のため、遺伝子名を明らかにすることはできない）。

コントロールのマウス未分化プロBリンパ球は、移植後マウス体内で急速に免疫グロブリン陽性細胞に分化し、1か月程度で体内から検出できなくなった。

これに対して、変異遺伝子Aをマウス未分化プロBリンパ球に発現させてマウスに移植すると、細胞は免疫グロブリン陽性細胞に分化せず、最も未分化なプロBの段階で分化が停止し、マウス体内に長期間（1か月以上）存在し続けた。さらに、変異遺伝子Aを発現させたこのBリンパ球をマウス体外へ取り出し、別のマウスに移植（2次移植）した後も分化が停止したまま体内で増殖し続け、さらに3次移植も可能であった。

変異遺伝子Bをマウス未分化プロBリンパ球に発現させてマウスに移植すると、細胞はプロBよりやや分化したプレBの段階で分化が停止し、マウス体内で増殖し続けた。同細胞も別のマウスへの移植（2次移植）が可能であった。

変異遺伝子Cの機能解析は現在進行中であるが、Bリンパ球の分化抑制作用は不完全であり、一部に免疫グロブリン陽性細胞が出現するもののコントロールと比べると分化抑制がみられるという予備的結果を得ている。

以上より、変異遺伝子AとBには、Bリンパ球の分化を止め、同時にマウス体内でBリンパ球を増殖させる機能があることが判明した。変異遺伝子Cにも類似の機能があると考えられるが、その作用は変異遺伝子AやBに比べて弱い可能性がある。

変異遺伝子A、Bは各々プロB、プレBといった異なる分化段階で細胞の分化を止めること、変異遺伝子Cには分化抑制作用が弱いことから、各々の変異遺伝子は白血病の異なる表現型と相関を示す可能性があり、したがって疾患単位を規定しうる点は今後さらに詳細に検討すべき課題と考える。

このように分化抑制作用のある変異遺伝子A、B、Cであるが、同遺伝子を発現させたBリンパ球を移植したマウスは3か月以上生存しており、単独では白血病には至らない可能性、したがって他の遺伝子異常と協調して白血病が発症する可能性が示唆された。

一方で、変異遺伝子A、Bを発現させたBリンパ球はマウスに連続移植が可能であり、このことは白血病性幹細胞と共通する特性であることから、変異遺伝子A、Bの作用を抑制することで白血病性幹細胞を標的とした新しい治療法の開発につながる可能性が示唆された。

D&E. 考察及び結論

研究代表者の間野らによる大規模ゲノミクス解析によりBリンパ性白血病において高頻度に見いだされた3種類の遺伝子変異は、各々分化段階の異なる白血病と相関しうることから、疾患単位を規定する可能性がある。さらに、これらの遺伝子変異は白血病性幹細胞としての性質を細胞に付与する可能性があり、治療標的として適することが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yoshida N, Karube K, Utsunomiya A, Tsukasaki K, Imaizumi Y, Taira N, Uike N, Umino A, Arita K, Suguro M, Tsuzuki S, Kinoshita T, Ohshima K, Seto M.

“Molecular Characterization of Chronic-type Adult T-cell Leukemia/Lymphoma”. *Cancer Res.*, 74: 6129-6138, 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

様式第19

学会等発表実績

委託業務題目「次世代シーケンサーによる造血器悪性腫瘍大規模リシーケンス」

機関名 東京大学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
発がんの本体解明がもたらす治療革新	間野博行	第4回北摂呼吸器・免疫アレルギー研究会	2014年5月	国内
肺がんの遺伝子研究 -ALKの発見と臨床応用-	間野博行	第17回日本医学会公開フォーラム	2014年6月	国内
同種造血肝細胞移植後ドナー由来白血病の発症機構	間野博行	第18回日本がん分子標的治療学会学術集会	2014年6月	国内
がん遺伝子とメディカルゲノミクス	間野博行	第2回がん代謝研究会	2014年7月	国内
がんにおける essential growth driver と heterogeneity	間野博行	第73回日本癌学会学術総会	2014年9月	国内
ゲノム解析が指し示す発がんの複雑性・多様性	間野博行	第87回日本生化学会	2014年10月	国内
最近の発がんメカニズムの知見について（仮）	間野博行	第61回日本矯正医学会総会	2014年10月	国内
がんのゲノム研究からわかったこと	間野博行	日本内科学会 第42回内科学の展望	2014年11月	国内
がん領域における日本アカデミアからのイノベーション創出が拓く医学・医療革命	間野博行	新世代のがん分子標的療法戦略シンポジウム	2014年12月	国内
Targeting Essential Growth Drivers in Human Cancer	間野博行	Joint International Symposium on "TGF- β Family and Cancer: Signal Network in Tumor Microenvironment"	2015年1月	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所（学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
Recurrent CDC25C mutations drive malignant transformation in FPD/AML	Yoshimi A, Toya T, Kawazu M, Ueno T, Tsukamoto A, Iizuka H, Nakagawa M, Nannya Y, Arai S, Harada H, Usuki K, Hayashi Y, Ito E, Kirito K, Nakajima H, Ichikawa M, Mano H and Kurokawa M	Nat Commun	2014, Aug.	国外