

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 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22659180

研究課題名（和文） 4 倍体胚補完法による白血病原因遺伝子の on, off 可能なマウスの作製と解析

研究課題名（英文） Analysis of leukemogenic transgenic mice generated by tetraploid embryonic complementation method using Tet-off system.

研究代表者

松村 到 (MATSUMURA ITARU)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：00294083

研究成果の概要（和文）：

4 倍体胚補完法を用いて慢性骨髄性白血病 (CML) の原因遺伝子である BCR-ABL を Tet-off システムにて on, off 可能なマウスを作成した。本マウスにおいて、Tet-off すると約 1 ヶ月後に CML 様の病態が再現し、Tet-on することでこの病態は消失した。メチル化領域の網羅的解析の結果、Tet-off 2 ヶ月後の造血幹細胞分画では正常造血幹細胞分画と比較してメチル化のプロファイルが異なることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we generated BCR-ABL transgenic mice using the tetraploid embryonic complementation method, in which we can turn on or off the BCR-ABL gene using the Tet-off system. In these mice, CML-like disease was induced about 1 month after the Tet-off, which was disappeared by Tet-on. The change of the methylation profile was observed two months after Tet-off, indicating that BCR-ABL secondary causes the abnormality in the methylation profile.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	0	1,800,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	330,000	3,230,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：白血病、4 倍体胚補完法、白血病幹細胞、ES 細胞、分化

1. 研究開始当初の背景

近年、白血病の原因となる遺伝子異常が多数同定され、また、すべての白血病細胞の源となる白血病幹細胞の存在が明確となった。しかし、これらの白血病原因遺伝子がどのよう

な過程で白血病を引き起こすのかは明らかではなく、白血病幹細胞の分子生物学的特性の詳細も明らかではない。さらに、白血病においてはエピゲノムの異常が伴っているこ

とも明らかにされてきたが、遺伝子異常との関連についても明らかではない。

2. 研究の目的

4 倍体胚補完法 (tetraploid embryonic complementation) というトランスジェニックマウスを容易に作成できる方法を用いてマウス個体内で Tet-off システムにより白血病原因遺伝子の発現を on、off し、以下の解析を行う。

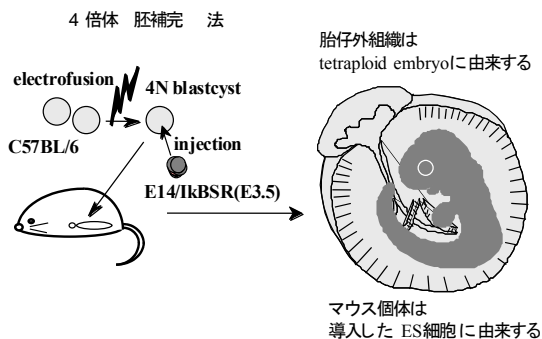
1) 正常造血幹細胞が白血病幹細胞に変化した際の細胞周期、エネルギー代謝、遺伝子発現、骨髄内の局在の変化などを検討する。

2) 白血病原因遺伝子の長期発現や mutagen 処理による 2 次的遺伝子異常やエピジェネティックな変化を明らかにする。

3) 二次的な遺伝子異常単独での白血病原性やエピジェネティックな変化の可逆性を解析する。

3. 研究の方法

4 倍体胚補完法を用いて慢性骨髄性白血病 (CML) の原因遺伝子である BCR-ABL を Tet-off システムにて on、off (Tetracycline 服用時には BCR-ABL off、Tetracycline 非服用時には BCR-ABL on) 可能なマウスを作成し、その病態変化を解析した。

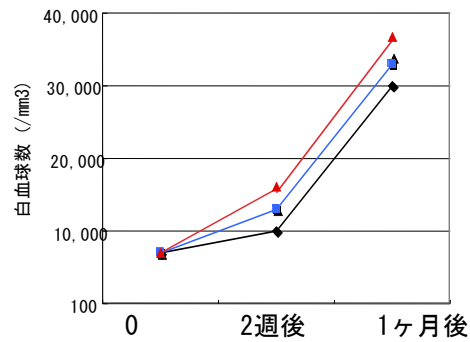


4. 研究成果

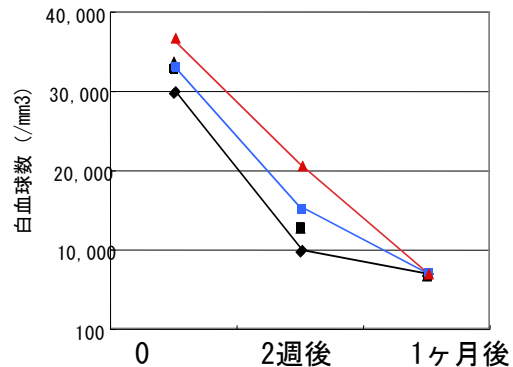
1. Tet-off による CML 様の病態の発症

本マウスにおいて、Tet-off すると約 1 ヶ月後に骨髄および末梢血において顆粒球系細胞を主体とする CML 様の病態が再現された。また、Tet-off によって発症した CML 様の病態は、Tet-on によって BCR-ABL を off にすることで消失した。また、Tet-off によって発症した CML 様の病態は、BCR-ABL 阻害薬 Imatinib の投与によってほぼ正常化し、本マウスが CML モデルとなることが明らかとなった。

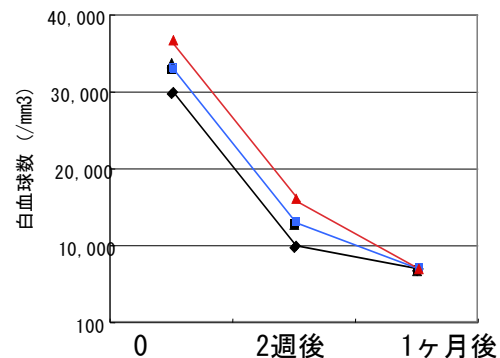
作成した3つのストレインにおける Tet-off後のマウスの末梢白血球数の変化



Tet-onによって BCR-ABL を offした際の Tet-offにより発症した白血球増加の変化



Tet-offにより発症した CML様の白血球増加に対するイマチニブの効果



2. BCR-ABL と他の遺伝子異常との関係

Tet-off する前、Tet-off によって CML を発症した時期、再度 Tet-on にて造血が正常化した時期、それぞれの造血幹細胞分画を用いて、骨髄系腫瘍全般で明らかにされている Tet2、IDH1/2、EZH2、ASXL1 の遺伝子変異の有無を検討したが、すくなくとも coding region には遺伝子変異は認められなかった。

2. BCR-ABL とエピゲノムの異常との関係。これらの細胞を用いたメチル化領域の網羅的解析の結果、Tet-off 2 ヶ月後の造血幹細胞分画では正常造血幹細胞分画と比較してメチル化のプロファイルが異なることが明らか

かとなった。再度、Tet-on によって正常造血に戻した2ヶ月時点ではメチル化プロファイルの異常は持続したが、6ヶ月時点ではほぼ正常と変わらぬメチル化プロファイルとなった。また、メチル化プロファイルが正常化するまでの間、血液細胞に軽度の異形成は認められたが、明らかな数的異常は認められなかった。

以上の結果により、

4倍体胚補完法を用いた白血病モデルマウスの有用性が確認された。特に、遺伝子変異とエピゲノムの異常との関係を明らかにする上で、極めて有用と考えられた。

また、今回作成したCMLのモデルマウスはCML治療に向けたCML幹細胞の生体内動態、分子生物学的特性の解析に有用と考えられた。

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 20件)

- ① Wada N, Zaki MA, Matsumura I, et al. (他9名、7番目) Diffuse large B cell lymphoma with an interfollicular pattern of proliferation shows a favourable prognosis: a study of the Osaka Lymphoma Study Group. *Histopathology*. 査読有、2012 Feb 9, online publication
doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.04161.x.
- ② Suzuki M, Tanaka H, Matsumura I, et al. (他10名、11番目) The Clathrin assembly Protein PICALM is Required for Erythroid Maturation and Transferrin Internalization in Mice. *PLoS ONE* 査読有、online publication. 2012.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3283694/?tool=pubmed>
- ③ Matsui K, Ezoe S, Matsumura I, et al. (他9名、8番目) NAD-dependent histone deacetylase, SIRT1, plays essential roles in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有、418: 811-817、2012.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X12001568>
- ④ Ohyashiki K, Katagiri SI, Matsumura I, (他4名、6番目) Increased natural killer cells and decreased CD3(+) CD8(+) CD62L(+) T cells in CML patients who sustained complete molecular remission after discontinuation of imatinib. *Br J Haematol*. 査読有、157: 254-256、2012.
doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08939.x.
- ⑤ Morita Y, Shimada T, Tatsumi Y, Ashida T, Matsumura I, et al. (他8名、10番目) Cytokine profiles in relapsed multiple myeloma patients undergoing febrile reactions to lenalidomide. *Int J Hematol*. 査読有、94: 583-584、2011.
<http://www.springerlink.com/content/g2645ujtqx281180/?MUD=MP>
- ⑥ Maeda Y, Sasakawa A, Matsumura I, et al. (他6名、9番目) Senescence induction therapy for the treatment of adult T-cell leukemia. *Leuk Lymphoma*. 査読有、52:150-152, 2011.
<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10428194.2010.527406>
- ⑦ Satoh Y, Matsumura I, Tanaka H et al. (他6名、2番目) C-terminal mutation of RUNX1 attenuates the DNA-damage repair response in hematopoietic stem cells. *Leukemia* 査読有、26: 303-311、2012.
doi: 10.1038/leu.2012.202.
- ⑧ Maeda Y, Yamaguchi T, Matsumura I, et al. (他3名、6番目) Effects of tamibarotene for the treatment of adult T cell leukemia. *Ann Hematol* 査読有、91:629-631, 2012.
<http://www.springerlink.com/content/h3406uu84w5265r4/>
- ⑨ Saito Y, Tanaka H, Matsumura I, Kanakura Y, et al. (他2名、5番目) PICOT is a molecule which binds to anamorsin. *Biochem Biophys Res Commun* 査読有、408:329-333, 2011.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X11006073>
- ⑩ Chihara T, Wada N, Matsumura I, et al. (他10名、9番目) Frequency of intravascular large B-cell lymphoma in Japan: Study of the Osaka Lymphoma Study Group. *J Hematol Oncol*. 査読有、11: 14、2011.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>

articles/PMC3095575/?tool=pubmed

- ⑪ Shibayama M, Ezoe S, Matsumura I, et al. (他8名、11番目) Predictability of the response to tyrosine kinase inhibitors via in vitro analysis of Bcr-Abl phosphorylation. *Leukemia Research*. 査読有、35:1025-1211、2011. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145212611000221>
- ⑫ Fujita J, Mizuki M, Tanaka H, Matsumura I, et al. (他6名、9番目) Myeloid neoplasm-related gene abnormalities differentially affect dendritic cell differentiation from murine hematopoietic stem/progenitor cells. *Immunol Lett*. 査読有、136:61-73, 2011. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165247811000022>

(他 8件)

[学会発表] (計 29 件)

- ① 松村 到 他
真性多血症から移行した急性赤白血病に対して非血縁者間骨髄移植が有効であった1例
第34回日本造血細胞移植学会総会
2012. 2. 24 (大阪国際会議場)
- ② 松村 到
各がん腫におけるバイオマーカー研究
第49回日本癌治療学会総会 2011. 10. 27
(名古屋国際会議場)
- ③ Matsumura I, et al.
SATB1 Induces Early Lymphocyte Differentiation From Primitive Hematopoietic Progenitors
第73回日本血液学会学術集会
2011. 10. 14 (名古屋国際会議場)
- ④ Matsumura I, et al.
Aanalysis of iron overload in patients with transfusion - dependent hematological diseases
第73回日本血液学会学術集会
2011. 10. 14 (名古屋国際会議場)
- ⑤ 松村 到
慢性骨髄性白血病と第二世代 ABL チロシンキナーゼ阻害剤
第72回日本血液学会学術集会

2010. 9. 24 (名古屋国際会議場)

- ⑥ 松村 到 他 AML 幹細胞の特性 解析
第69回日本癌学会学術集 2010. 9. 22
(大阪国際会議場)

(他 23 件)

[図書] (計 8 件)

- ① 松村 到、医学書院、今日の治療指針、2012、1955 (582-584)
- ② 松村 到、中外医学社、今日の診療のために ガイドライン外来診療、2011、602 (439-441)
- ③ 山口晃史、松村 到、中外医学社、Annual Review 血液、2011、229 (116-122)
- ④ 松村 到、医薬ジャーナル社、WH 血液腫瘍分類 ~WHO 分類 2008 をうまく活用するため~、2010、587 (38-45)
- ⑤ 松村 到、中外医学社、Annual Review 血液、2010、229 (107-113)

(他 3 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松村 到 (MATSUMURA ITARU)
近畿大学・医学部・教授
研究者番号：00294083

(2) 研究分担者

金倉 譲 (KANAKURA YUZURU)
大阪大学大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20177489
(申請時 分担者として参画)

水木 満佐央 (MIZUKI MASAO)
大阪大学・附属病院・准教授
研究者番号：80283761
(申請時 分担者として参画)

織谷 健司 (ORITANI KENJI)
大阪大学大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：70324762
(申請時 分担者として参画)

柴山 浩彦 (SHIBAYAMA HIROHIKO)
大阪大学大学院医学系研究科・講師
研究者番号：60346202
(申請時 分担者として参画)

芦田 隆司 (ASHIDA TAKASHI)
近畿大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：30211006
(H22 から分担者として参画)

辰巳 陽一 (TATSUMI YOICHI)
近畿大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：60236552

(H22 から分担者として参画)

嶋田 高広 (SHIMADA TAKAHIRO)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：90319674

(H22 から分担者として参画)

田中 宏和 (TANAKA HIROKAZU)

研究者番号：40360846

(H23 から分担者として参画)

(3) 連携研究者

なし