

「エピゲノム研究に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出」
平成 24 年度採択研究代表者

H25 年度
実績報告

中 畑 龍 俊

京都大学 iPS 細胞研究所
特定拠点教授

ダウン症に合併する TAM をモデルとしたがんの発症と退縮に関わるエピジェネティクスの解析

§ 1. 研究実施体制

(1) 「中畑」グループ

- ① 研究代表者: 中畑 龍俊 (京都大学 iPS 細胞研究所、特定拠点教授)
- ② 研究項目
 - ・ヒト iPS 細胞を用いた TAM/AMKL の再現と解析

(2) 「伊藤」グループ

- ① 研究代表者: 伊藤悦朗 (弘前大学大学院医学研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・臨床検体を用いた TAM/AMKL の解析

(3) 「平家」グループ

- ① 主たる共同研究者: 平家 俊男 (京都大学・大学院医学研究科発達小児科学、教授)
- ② 研究項目: NOG マウスを用いた TAM/AMKL のエピゲノム解析
 - ・TAM/AMKL 細胞の NOG マウス移植系の確立と検証
 - ・患者および生着した細胞のエピゲノム解析
 - ・他グループで得られた知見の NOG マウス移植系での検証
 - ・エピゲノム異常を標的とした治療の開発

(4) 「清水」グループ

- ① 主たる共同研究者: 清水 律子 (東北大学大学院医学系研究科、教授)
- ② 研究項目

・マウスモデルを用いた TAM/AMKL 病態形成メカニズムの解析

(5)「渡辺」グループ

- ① 主たる共同研究者: 渡辺 亮 (京都大学 iPS 細胞研究所、特定拠点助教)
- ② 研究項目
 - ・発がん過程で変化するエピジェネティクスの統合的解析

§ 2. 研究実施の概要

ダウン症は、21番染色体が通常2本に対して3本存在することにより、多彩な症状を呈する疾患である。本研究提案では、自然退縮する白血病様反応である、ダウン症に合併する一過性骨髄異常増殖症(transient abnormal myelopoiesis:TAM)をモデルとして、1)発がんとその退縮に関わるエピジェネティックな変化を明らかにする、2)真の白血病である急性巨核芽球性白血病(DS-AMKL)に至るヒットとそれに伴うエピジェネティックな変化を明らかにする、および3)ダウン症における胎児期のゲノム不安定性をもたらすメカニズムを明らかにする、ことを目標とする。これにより、がん化のメカニズムを理解するとともに、がんの退縮を制御する新しい治療法開発の基盤を形成することを目指す。

中畑 G では、ダウン症由来 iPS 細胞を用いて、血球分化異常の解析を行う。本年度はダウン症患者由来 iPS 細胞の樹立を中心に行った。21番染色体を3本(トリソミー)持つ細胞と2本(ダイソミー)持つ細胞を同一患者より得るため、トリソミーとダイソミー双方を含むダウン症患者由来細胞株2例から iPS 細胞を樹立した。また、人工的に GATA1 遺伝子の変異を導入するための準備を行った。

伊藤 G では、臨床検体を用いた解析から、ダウン症に特異的な TAM 発症の仕組みと白血病進展の分子機構を解明することを目指す。次世代シーケンサーを用いて、15例の TAM 症例と14例の DS-AMKL 症例について、ゲノムのうちタンパク質をコードする領域(エクソン)の全塩基配列を徹底的に解読することにより(全エクソンシーケンス)、その遺伝子変異の網羅的解析を行った。本年度の研究より、以下の2点が明らかになった。① TAM では GATA1 変異以外に繰り返し(高頻度に)認められる遺伝子変異は検出されず、TAM はダウン症候群の特徴である21トリソミーと GATA1 遺伝子の変異によって起こっている疾患であることが示唆された。② DS-AMKL は、TAM にコヒーシン/CTCF および EZH2 の変異が生じて発症し、TK/RAS 変異はその後の腫瘍の進展に関与していると示唆される。

平家 G では TAM 細胞を長期にわたり増殖させることのできる新規の実験系を確立することで、TAM 細胞の白血病化の過程を再現することを試みた。高度免疫不全マウスである NOG マウスを用いた異種移植により、患者検体由来 TAM 細胞を長期にわたり維持・増殖させることに成功した。今後、本実験系を用いて、前白血病状態である TAM が白血病である DS-AMKL へ移行する過程での、さらに詳細な遺伝的変化およびエピジェネティックな変化を追跡する。また患者由来 iPS 細胞を用いることで、新たな疾患モデルの作製を試みる。

清水 G は、変異型 GATA1 のみを発現する遺伝子改変マウスを用いて、GATA1 の機能異常により引き起こされる標的遺伝子の制御不均衡やエピゲノム変化の解析を進めている。

渡辺 G では、各グループの解析によって得られた試料のエピゲノム状態について、一括して解析を行っている。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

論文詳細情報(国内)

1 斎藤潤、中畑龍俊:疾患特異的 iPS 細胞. 再生医療 12(1):19-29,2013.

論文詳細情報(国際)

1 Saida S, Watanabe KI, Sato-Otsubo A, Terui K, Yoshida K, Okuno Y, Toki T, Wang R, Shiraishi Y, Miyano S, Kato I, Morishima T, Fujino H, Umeda K, Hiramatsu H, Adachi S, Ito E, Ogawa S, Ito M, Nakahata T, Heike T.: Clonal selection in xenografted TAM recapitulates the evolutionary process of myeloid leukemia in Down syndrome. *Blood*, 121(21):4377-87. 2013 (DOI: 10.1182/blood-2012-12-474387)

2 Yanagimachi MD, Niwa A, Tanaka T, Ozaki F, Nishimoto S, Murata Y, Yasumi T, Ito J, Tomida S, Oshima K, Asaka I, Goto H, Heike T, Nakahata T, Saito MK: Robust and highly-efficient differentiation of functional monocytic cells from human pluripotent stem cells under serum- and feeder cell- free conditions. *PLoS ONE*. ; 8(4): e59243. 2013 (DOI:10.1371/journal.pone.0059243)

3 Tomizawa D., Tawa A., Watanabe T., Saito A.M., Kudo K., Taga T., Iwamoto S., Shimada A., Terui K., Moritake H., Kinoshita A., Takahashi H., Nakayama H., Kiyokawa N., Isoyama K., Mizutani S., Hara J., Horibe K., Nakahata T., Souichi Adachi S.: Appropriate dose modification 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. Hematol.*:98(5):578-88. 2013 (DOI: 10.1007/s12185-013-1429-2.)

4 Yoshida K, Toki T, Okuno Y, Kanezaki R, Shiraishi Y, Sanada M, Park M, Terui K, Kon A, Nagata Y, Sato-Otsubo A, Sato Y, Wang R, Shiba N, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Muramatsu H, Hasegawa D, Nakamura K, Kanegane H, Tsukamoto K, Adachi S, Kawakami K, Kato K, Nishimura R, Izraeli S, Hayashi Y, Miyano S, Kojima S, Ito E and Ogawa S. Landscape of gene mutations in Down syndrome-related myeloid disorders. *Nature Genetics*, vol. 45, No.11, pp. 1293-1299,2013 (DOI: 10.1038/ng.2759)

5 Toki T, Kanezaki R, Kobayashi E, Kaneko H, Suzuki M, Wang R, Terui K, Kanegane H, Maeda M, Endo M, Mizuochi T, Adachi S, Hayashi Y, Yamamoto M, Shimizu R, Etsuro Ito E. Naturally occurring oncogenic GATA1 mutants with internal deletions in transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome. *Blood*, vol. 121, No.16, pp. 3181-3184, 2013 (DOI: 10.1182/blood-2012-01-405746)

6 Mukai H, Suzuki M, Nagano M, Ohmori S, Otsuki A, Tsuchida K, Moriguchi T, Shimizu R, Ohneda O and Yamamoto M, "Establishment of erythroleukemic GAK14

cells and characterization of GATA1 N-terminal domain”, *Gene Cells*, vol. 18, No. 1, pp.886-898, 2013 (DOI: 10.1111/gtc.12084)

7 Morishima T, Watanabe KI, Niwa A, Hirai H, Saida S, Tanaka T, Kato I, Umeda K, Hiramatsu H, Saito MK, Matsubara K, Adachi S, Kobayashi M, Nakahata T, Heike T.: Genetic correction of HAX1 in induced pluripotent stem cells from a patient with severe congenital neutropenia improves defective granulopoiesis. *Haematologica.* ; 99(1):19-27. 2014 (DOI: 10.3324/haematol.2013.083873)

8 Tomizawa D., Akio Tawa A., MD/PhD, Watanabe T., Saito A.M., Kudo K., Taga T., Iwamoto S., Shimada A., Terui K., Moritake H., Kinoshita A., Takahashi H., Nakayama H., Koh K., Kigasawa H., Kosaka Y., Miyachi H., Horibe K., Nakahata T., Adachi S.: Excess reduction of anthracyclines results in inferior event-free survival in core binding factor acute myeloid leukemia in children; a report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG). *Leukemia*, in press (DOI:10.1038/leu.2013.153)

9 Kodera Y, Yamamoto K, Harada M, Morishima Y, Dohy H, Asano S, Ikeda Y, Nakahata T, Imamura M, Kawa K, Kato S, Tanimoto M, Kanda Y, Tanosaki R, Shiobara S, Kim SW, Nagafuji K, Hino M, Miyamura K, Suzuki R, Hamajima N, Fukushima M, Tamakoshi A; for the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation, Halter J, Schmitz N, Niederwieser D, Gratwohl A.: PBSC collection from family donors in Japan: a prospective survey. *Bone Marrow Transplant.* , in press

10 Honda Y, Tsuchida M., Zaike Y, Masunaga A, Yoshimi A., Kojima S., Ito M., Kikuchi A., Nakahata T., Manabe A.: Clinical characteristics of 15 children with juvenile myelomonocytic leukemia who developed blast crisis: MDS Committee of Japanese Society of Pediatric Hematology/Oncology (JSPHO). *Brit. J. Haematol.* In press.