

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19568

研究課題名(和文) 疾患由来iPS細胞を用いたCML幹細胞におけるイマチニブ耐性機構の解明

研究課題名(英文) The elucidation of the mechanism of imatinib-resistance in CML stem cells using disease specific iPSCs

研究代表者

宮内 将 (Masashi, Miyauchi)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：40772801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：慢性骨髄性白血病(CML)はチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)の登場により長期予後が大きく改善したが、TKIのみによるCMLの根治は達成できておらず、TKIに対する反応性が良好な患者群に対してもTKI中断後の再発を予測することはできない。

本研究では疾患由来iPS細胞を用いてTKI耐性CML幹細胞モデルを構築し、TKI耐性に関わる細胞表面蛋白質ADAM metalloproteinase domain 8(ADAM8)を同定した。CML患者検体でADAM8陽性細胞はTKI耐性を示し、TKIに対する反応性良好なCML患者について、ADAM8陽性分画に残存CML細胞が濃縮されることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Properties of cancer stem cells (CSC) involved in drug-resistance and relapse have significant effect on clinical outcome. Although tyrosine kinase inhibitors (TKIs) have dramatically improved survival of patients with chronic myelogenous leukemia (CML), TKIs have not fully cure CML due to TKI-resistant CML stem cells. Moreover, the relapse after discontinuation of TKIs has not been predicted in CML patients with best TKI-response. In our study, a model of CML stem cells derived from CML-iPSCs identified ADAM8 as an antigen of TKI-resistant CML cells. The inhibition of expression or metalloproteinase activity of ADAM8 restored TKI-sensitivity in primary samples. In addition, residual CML cells in patients with optimal TKI-response were concentrated in ADAM8+ population. Our study demonstrates that ADAM8 is a novel marker of residual CML cells even in patients with optimal TKI-response and would be a predictor of relapse and a therapeutic target of TKI-resistant CML cells.

研究分野：血液内科学

キーワード：疾患由来iPS細胞 慢性骨髄性白血病 がん幹細胞

1. 研究開始当初の背景

再発の原因の一つと考えられる治療抵抗性がん幹細胞はがん患者の予後に大きな影響を持つ。慢性骨髄性白血病 (chronic myeloid leukemia: CML) はチロシンキナーゼ阻害剤 (tyrosine kinase inhibitor: TKI) の登場により長期予後が大きく改善したが、TKI のみによる CML の根治は達成できておらず、TKI に対する反応性が良好な患者群に対しても TKI 中断後の再発を予測することはできない。その原因の一つとして TKI 耐性 CML 幹細胞の存在が示唆されるが、CML 幹細胞の有効な疾患モデルは限定的で解析が困難である。

2. 研究の目的

上述の問題を克服するため、本研究では複数の CML 患者骨髄検体から induced pluripotent stem cells: iPSCs を樹立した。CML-iPSCs より分化誘導された血液細胞を用いて TKI 耐性を示す CML 幹細胞モデル分画を解析することで、CML 幹細胞の TKI 耐性メカニズムの解明および特異的治療の開発を目的とし研究を行った。

3. 研究の方法

1. 疾患由来 iPSCs の樹立

導入細胞のゲノムに外来遺伝子の挿入が起らない pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSK、pCXLE-hUL、pCXWB-EBNA1、episomal vector を用いて遺伝子導入を行った[2]。

2. CML-iPSCs の確認

患者検体より樹立した iPSCs を用いて、BCR-ABL に対する半定量 Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) および染色体解析を行った。

3. iPSCs の血液分化誘導

iPSCs の血液分化誘導は、VEGF を添加した

血液分化用培地を用いて C3H10T1/2 と iPSCs の共培養にて行った。

4. CML-iPSCs 由来 pre-HPCs のイマチニブ感受性評価

CML-iPSCs 由来血液細胞のうち、未分化な CD34 陽性・CD43 陽性・CD45 陰性 pre-HPCs と分化した細胞分画である CD34 陰性 CD45 陽性 differentiated cells (DCs) のイマチニブ (第一世代 TKI) 感受性評価を細胞増殖能評価、および apoptosis 解析を用いて行った。

5. CML-iPSC 由来 pre-HPCs の網羅的遺伝子発現解析

CML-iPSCs 由来 pre-HPCs および DCs に 6 時間イマチニブ 2.5mM を曝露したサンプルから RNA を抽出し、クラスター解析および GSEA 解析を含めた網羅的遺伝子発現解析を行った。

6. CML 患者検体を用いた ADAM8 阻害実験

ADAM8 を阻害するためマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤 GM6001 および ADAM8 に対するショートヘアピン RNA をレンチウイルスベクターを用いて導入し、TKI に曝露した際の生存を評価した。

7. 残存 CML 細胞を測定する limiting dilution assay

900 細胞、300 細胞、100 細胞、33 細胞、11 細胞に対して BCR-ABL に対する RT-PCR の陽性率を計算し、それぞれの陽性率から残存する CML 細胞の測定を行った。

4. 研究成果

1. 慢性骨髄性白血病患者検体由来 iPSCs の樹立

複数の慢性骨髄性白血病慢性期患者の骨髄液から CD34 陽性細胞を濃縮し、OCT3/4, KLF4, SOX2, L-MYC, EBNA1, LIN28, の導入と p53 の knock down を併用することで iPSCs 様コロニーを得た。iPSCs 様コロニーは幹細胞遺伝子の発現を認め、奇形種形成能を持つこ

とが示された。また外来遺伝子の挿入が無いことも確認され、CML 患者検体から iPSCs を樹立することに成功した。(図 1)

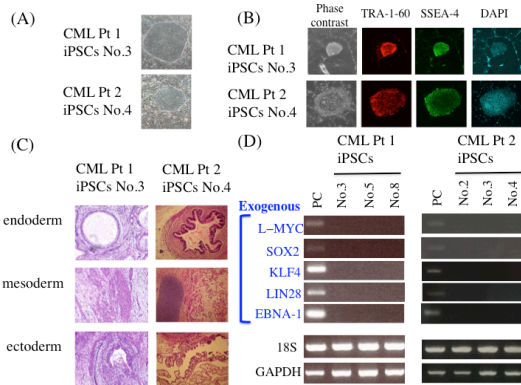


図 1. CML 患者検体由来 iPSCs の樹立

A. CML 患者検体由来 iPSCs 様コロニー B. 免疫染色による幹細胞表面マーカーの確認 C. 免疫不全マウスへの移植によるテラトーム形成能評価 D. RT-PCR による外来遺伝子発現の消失確認。

2. 疾患由来CML-iPSCsの確認

CML 患者検体由来の iPSCs おいて、*BCR-ABL* 融合遺伝子の遺伝子発現および染色体解析を行った。CML 患者検体由来 iPSCs には *BCR-ABL* を発現し、また患者検体と同様に $t(9;22)(q34;q11.2)$ の染色体異常のみを有する CML-iPSCs が存在することが示され、以後の解析に利用した。(表 1)

	clone No.	stem cell gene expression	integration check	teratoma formation	G-banded chromosome analysis	BCR-ABL gene expression
Healthy donor	12	○	○	○	46 XY	Normal-iPSCs Pt 1.1
	14	○	○	○	46 XY	Normal-iPSCs Pt 1.2
	17	○	○	○	46 XY	
CML patient 1	1	○	○	○		
	2	○	○	○		
	3	○	○	○	46 XY (t(9;22))	CML-iPSCs Pt 1.1
	4	○	○	○		
	5	○	○	○	46 XY (t(9;22))	CML-iPSCs Pt 1.2
	6	○	○	○		
	7	○	○	○		
	8	○	○	○	46 XY (t(9;22))	
CML patient 2	9 to 14	○	○	○		
	1	○	○	○	46 XY	
CML patient 2	2	○	○	○		
	3	○	○	○	46 XY	Normal-iPSCs Pt 2
	4	○	○	○	46 XY (t(9;22))	CML-iPSCs Pt 2
	5	○	○	○		
	6	○	○	○		
	7	○	○	○		
	8	○	○	○	46 XY (t(9;22))	

表1. 樹立および解析に利用した iPSCs クローンの一覧表

3. CML-iPSCs 由来 pre-HPCs はイマチニ

ブ耐性の細胞を含む

CML-iPSCs 由来血液細胞のうち CD34 陽性・CD43 陽性・CD45 陰性 pre-HPCs の未分化性、イマチニブ感受性を評価した。Pre-HPCs は血球コロニー形成能評価にて多系統への分化能を有する未分化な細胞であることが示され、細胞増殖能評価および apoptosis 解析の結果イマチニブに対して耐性示すことが明らかとなった。(図 2)

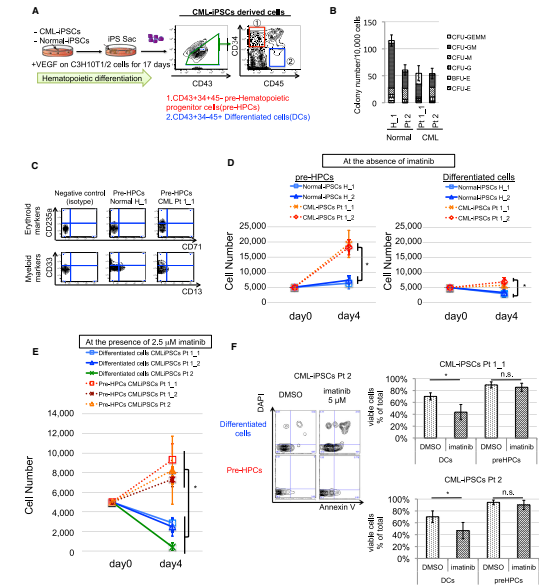


図 2. CML-iPSCs 由来 pre-HPCs はイマチニブ耐性を示す

4. CML-iPSCs 由来 pre-HPCs を用いたイマチニブ耐性遺伝子の検索

CML-iPSCs 由来 pre-HPCs を CML 幹細胞モデルとして利用し CML 幹細胞におけるイマチニブ耐性の原因遺伝子を同定するため、CML-iPSCs 由来 pre-HPCs にイマチニブを曝露したサンプルを用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。GSEA 解析の結果、CML-iPSCs 由来 pre-HPCs では、造血幹細胞の増殖および維持に重要であることが知られている HOXA9 の target 遺伝子群や造血幹細胞の維持および TKI 耐性に関わることが知られている TGF- β に関連した pathway が enrich されていることを明らかにした。さらに TKI 耐性に関連する遺伝子 ADAM8 を同定した。

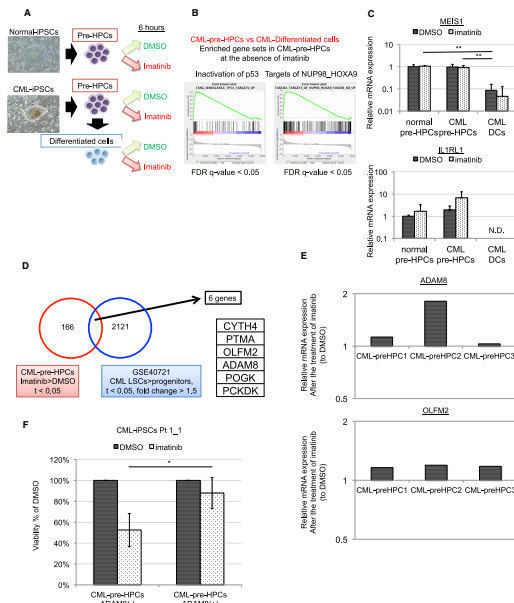


図 3. ADAM8 は TKI 耐性に関連する遺伝子候補である

5. 初発 CML 患者検体にて ADAM8 陽性細胞は TKI 耐性を示す

ADAM8 が患者検体において TKI 耐性に関与するか評価するため、初発 CML-CP 患者の骨髓検体を用いて ADAM8 陽性細胞と陰性細胞の TKI 感受性を評価したところ、ADAM8 陽性細胞は TKI 耐性を示すことを明らかとした。

6. ADAM8 は機能的に TKI 耐性に関与する

ADAM8 が TKI 耐性に機能的に関与するかを評価するため、初発 CML-CP 患者の骨髓検体を用いて ADAM8 の遺伝子発現を阻害するノックダウンおよび ADAM8 の機能を阻害するマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤を加えて TKI に対する感受性を評価した。その結果 ADAM8 の阻害によって TKI 感受性が回復することが明らかとなった。

7. ADAM8 は残存 CML 細胞をマークする

ADAM8 が TKI に optimal response を示した患者においても TKI 耐性に寄与するかを評価するため、これらの患者の骨髓検体を用いて ADAM8 陽性分画と陰性分画における残存 CML 細胞を limiting dilution assay を用いて評

価した。その結果、ADAM8 陽性分画に残存 CML 細胞が濃縮されることを明らかとした。

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 1 件)

1. Miyauchi M, Koya J, Arai S, Yamazaki S, Honda A, Kataoka K, Yoshimi A, Taoka K, Kumano K, and Kurokawa M. ADAM8 is an antigen of TKI-resistant CML cells identified by patient-derived induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*, 10(3): 1115-1130, 2018.

[学会発表] (計 6 件)

1. *International Society of Stem Cell Research (ISSCR) 2016 annual meeting, San Francisco, CA, USA. June 22-25, 2016*
Masashi Miyauchi, Shunya Arai, Akira Honda, Sho Yamazaki, Kensuke Kataoka, Akihide Yoshimi, Kazuki Taoka, Keiki Kumano and Mineo Kurokawa. Pre-hematopoietic progenitor cells (CD34+CD43+CD45-) from CML-iPSCs as powerful platform for analysis of TKI-resistant CML stem cells. (ポスター)
2. *Fifth JCA-AACR Special Joint Conference, Urayasu, Japan. July 13-15, 2016.* Masashi Miyauchi, Shunya Arai, Akira Honda, Sho Yamazaki, Keisuke Kataoka, Akihide Yoshimi, Kazuki Taoka, Keiki Kumano, and Mineo Kurokawa. Modeling Tyrosine Kinase Inhibitor-resistant Chronic Myelogenous Leukemia by

- Patient-derived Induced Pluripotent Stem Cells. (ポスター)
3. 第78回日本血液学会学術集会(横浜 2016.10.13-15) Masashi Miyauchi, Shunya Arai, Akira Honda, Sho Yamazaki, Keisuke Kataoka, Akihide Yoshimi, Kazuki Taoka, Keiki Kumano, and Mineo Kurokawa. Pre-HPCs derived from CML-iPSCs represent a platform for analysis of TKI-resistant CML stem cells. (口演)
4. 58th ASH Annual Meeting and Exposition San Diego, CA, USA. December 3-6, 2016. Masashi Miyauchi, Shunya Arai, Akira Honda, Sho Yamazaki, Keisuke Kataoka, Akihide Yoshimi, Kazuki Taoka, Keiki Kumano, and Mineo Kurokawa. Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells Revealed ADAM8/CD156 as a Novel Marker of TKI-Resistant Chronic Myeloid Leukemia Cells. (ポスター)
5. 第21回日本がん分子標的治療学会学術集会(福岡 2017.6.14-6.16) 宮内 将, 黒川 峰夫 疾患由来人工多能性幹細胞を用いたチロシンキナーゼ耐性慢性骨髄性白血病細胞の表面抗原ADAM8 (CD156)の同定 (口演)
6. Keystone Symposium, Olympic Valley, CA, USA. March 25-29, 2018. Masashi Miyauchi, Junji Koya, Shunya Arai, Sho Yamazaki, Akira Honda, Keisuke Kataoka, Akihide Yoshimi, Kazuki Taoka, Keiki Kumano, and Mineo Kurokawa. Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells Identify ADAM8 as an Antigen of TKI-resistant Chronic Myeloid Leukemia Cells. (口演)

[図書] (計 2件)

1. 宮内将・黒川峰夫、疾患由来 iPS 細胞を用いた MPN の病態解析、最新医学、72 巻、2017 年
2. 宮内将、骨髄増殖性腫瘍由来 iPS 細胞の樹立と病態解析、血液内科、73 巻、p355-359、2016 年

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：慢性骨髄性白血病の検査方法及び検査用キット、並びにチロシンキナーゼ阻害剤に対して耐性を有する慢性骨髄性白血病細胞の単離方法

発明者：宮内 将、黒川 峰夫

権利者：国立大学法人東京大学

番号：2017-026287

出願年月日：2017 年 2 月 15 日

国内外の別：国内/米国

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

特記なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮内 将 (MIYAUCHI MASASHI)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：40772801

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし