

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08356

研究課題名(和文) コンピュータ急性骨髄性白血病モデルによる再発動態解析と標的治療開発の基盤創成

研究課題名(英文) Computing analysis of leukemic stem cell dynamics in acute myelocytic leukemia

研究代表者

犀川 太 (SAIKAWA, Yutaka)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：60283107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究(令和元年-3年度)は、コンピュータモデル解析による急性骨髄性白血病治療後の再発予知を目的とした。白血病幹細胞(LSC)システムに基づく急性骨髄性白血病モデルに抗がん剤治療を導入し、「治癒型白血病治療モデル(治癒モデル)」と「再発型白血病治療モデル(再発モデル)」を構築した。再発の予知にはLSCの動きを視覚化(移動軌跡の描画)する必要がある。そこでLSCに目印を付加(マーキング)することにより、LSCの時間的位置変化を追跡した。その結果、再発と治癒とでは白血病幹細胞の移動パターンに違いが推定された。今後、移動軌跡の数学的解析により変化点を検出し、再発の予知因子を抽出する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児リンパ性白血病の治療成績がめざましく向上していくなかで、小児骨髄性白血病は依然として再発率の高い予後不良群を形成している。これまで治療後に残存する白血病細胞(微小残存病変)を指標に治療開発が試みられてきた。一方、白血病細胞を供給する白血病幹細胞(LSC)の存在が明らかとなり、「真の治癒の判断」と「再発の予知」にはLSCの動態を把握することが必須となってきた。しかし、実際のLSCの動きをリアルタイムに捉えることは困難であり、ここに「モデル化」の意義があり、重要なアプローチ方法となりうる。本研究のLSCの細胞軌跡の解析が今後の白血病治療戦略の構築に基礎的な情報を提供することが期待される。

研究成果の概要(英文)：To investigate the mechanisms of leukemic relapse after treatment in acute myelocytic leukemia (AML), we have developed a three-dimensional (3D) cellular automaton simulation system, in which the cellular states of normal and leukemic stem cells (e.g. their position coordinates and differentiation stages on discrete time steps in a computer-generated 3D virtual space) were extracted for statistical and mathematical analyses. In addition, we have developed a 3D trajectory mapping (position tracking) system of normal and leukemic stem cells for visualization. The distinctive movement motifs of leukemic stem cells were visually suggested in the relapse models when compared with the complete cure models that have been established as AML treatment models in our previous studies. Extensive analyses of these trajectory behaviors of leukemic stem cells will contribute to discovering the predictable risk factors for relapse in AML.

研究分野：小児血液腫瘍

キーワード：コンピュータ解析 急性骨髄性白血病 白血病幹細胞 再発 細胞移動軌跡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 小児急性リンパ性白血病の治療成績がめざましく向上していくなかで、小児急性骨髄性白血病 (acute myelocytic leukemia, AML) は依然として再発率の高い予後不良群を形成している。これまで治療中・治療後に残存する白血病細胞 (leukemic cell, LC) を微小残存病変 (minimal residual disease, MRD) と捉えて、それを指標に治療開発が進められてきた。しかし、MRD の動態は複雑であり、個人差も大きい。臨床現場で実施される骨髄検査による MRD の経時的観測では個々の完全予測には結びつかない現状があった。

(2) 白血病の基礎研究から LC を供給する白血病幹細胞 (leukemic stem cell, LSC) の存在が明らかとなり、LC を対象とした従来の MRD モニタリングでは、LSC の細胞動態を把握することはできない。残存する少数の LSC の挙動が「治癒」と「再発」を決定づけるため、LSC の動態を把握する方法の開発が望まれた。

2. 研究の目的

(1) 再発の予知には LSC の動態をリアルタイムに把握することが必要である。残存する少数の LSC の挙動を臨床現場の限られた検査で明らかにすることは困難である。そこで研究者らが開発した「LSC が自己複製しながら LC を供給する LSC システム」をモデル化した「AML モデル」および「AML 治療モデル」(コンピュータシミュレーションモデル) を用いて、LSC の細胞動態を解析する。

(2) 正常骨髄幹細胞 (normal stem cell, NSC) 系および LSC 系の細胞動態、個々の LSC および LC の長期的変動、LSC の局在とその移動軌跡が予後 (治癒と再発) におよぼす影響を解析することで、再発の機序とその予知となりうる基礎的情報を得る。

3. 研究の方法

(1) AML 治療モデルを用いた解析

研究者らはすでにセル・オートマトン (Cellular Automaton, CA) を基本原理に用い、LSC システムを導入した「AML モデル (3次元コンピュータシミュレーションモデル)」を構築した。本モデルは「個々の細胞が解析空間内を移動しながら分裂と分化し、NSC は自身の微小周辺環境に応じて自己複製し、さらに成熟細胞に分化して造血を維持する。LSC は自己複製しつつ、LC を供給し、LC 自身も増殖を続ける」特徴を有する。このモデルに化学療法を導入し、AML 治療モデルを構築した。本モデルを用いて、治療直後に残存する NSC と LSC の数とそれぞれの幹細胞の移動と局在が「予後 (治癒および再発)」に及ぼす影響を解析する。

本研究で用いた CA モデルは、支配方程式を導くことが困難な複雑系である造血システムを「多数の要素の相互作用から自然発生的に生まれる秩序をもったシステム」として具象化する方法を提供する。人工知能 (AI) の開発が人間の認知の限界を克服する「知の再構築」であるのに対して、生物の複雑性と秩序の創発を解析する CA モデルは「メカニズムの再構築」であり、人工生命 (artificial life) の理解に寄与する。

(2) 細胞移動軌跡の解析

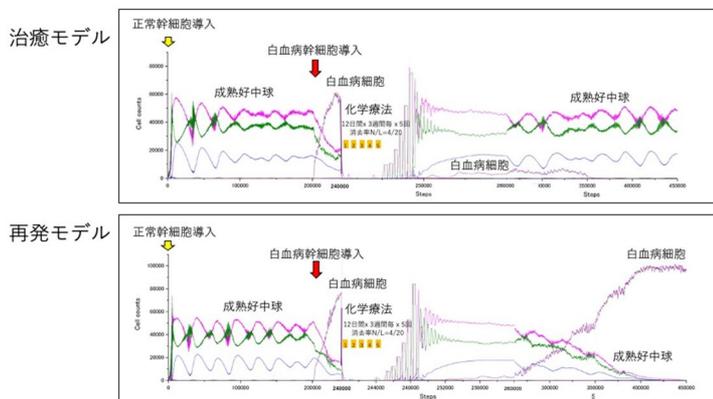
本モデルではすべての細胞に「解析空間内の継時的な位置情報と分化段階」が追跡・記録される。NSC と LSC をマーキングすることで、マーキングされた特定の細胞集団 (NSC, LSC およびその分化細胞) を抽出することが可能である。このモデルを用いて LSC の移動軌跡を分析し、NSC との相互関係および予後との関連性を解析する。

4. 研究成果

(1) 「治癒型」・「再発型」急性骨髄性白血病治療モデルの構築

日本小児白血病リンパ腫研究グループ (JPLSG) の臨床試験で用いられた急性骨髄性白血病治療プロトコル (AML-05) を基に治療をモデル化した。「3週間毎に1サイクル12日間の治療を5サイクル実施」する高治療強度のプロトコルを導入し、「治癒型」および「再発型」の急性骨髄性白血病治療モデルを構築した (図1)。

セル・オートマトンによる急性骨髄性白血病治療モデル (図1)



治療モデルでは治療終了後の寛解状態期間にも LSC と LC は MRD として一定期間存在した。この現象は臨床データに極めて一致していた。さらに、正常骨髓系造血が維持される過程で LSC の消失が確認された。

再発モデルでは少数の LSC と LC が一定期間存在したのち、急激に増加し再発の経過を辿った。両モデルの細胞動態からは「治療と再発を方向づける分岐点」の存在が示唆された。

(2) 治療直後に残存する NSC と LSC の数と予後の関係

治療直後に残存する LSC 数は治療効果を反映するとともに、再発の最も大きな要因である。高強度治療を導入後、「LSC の残存数および細胞状態 (局在と分化段階)」が同一の条件下でシミュレーションを繰り返すと、残存 LSC 数に依存して「高治癒型 (治療率 86%、n=29、治療直後の残存 LSC 1 個/解析空間)」「治療再発同等型 (治療率 50%、n=40、治療直後の残存 LSC 2 個/解析空間)」「高再発型 (再発率 65%、n=40、治療直後の LSC 3 個/解析空間)」に分かれることが明らかになった。興味深いことは、ごく少数の残存 LSC 数においても再発の可能性があり、「残存 LSC 数に依存しない再発の機序」の存在が示唆された。

(3) 細胞移動軌跡の可視化

「治療と再発を方向づける分岐点」の解析には NSC と LSC の細胞動態を継時的な軌跡図とし可視化する必要がある。治療直後の NSC と LSC をマーキング (0-29,999 time steps) し、抽出したマーキングデータを自動処理にて軌跡データを作成し、描画する自動化プログラムを共同開発した。

「治療再発同等型」の再発例における LSC (mk20001 と mk20002) の細胞軌跡を図 2 に示す。治療直後の NSC 75 個と LSC 2 個をマーキングし、軌跡を同一解析空間に描画した。2 つの LSC のうち一方 (mk20002) は途中で消失し、他方の LSC (mk20001) のみが増殖し、再発に至っている。それぞれの細胞が示す軌跡の性質の違いを数学的処理により評価する必要がある。

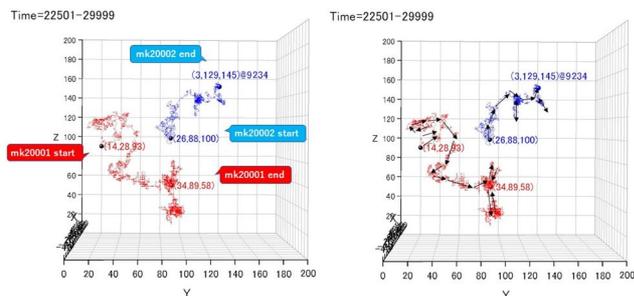
「高治癒型」の治療例の 4 つのシミュレーションの LSC 軌跡を重ね合わせたものを図 3 に示す。治療直後の残存 NSC 74 個と LSC 1 個をマーキングし、それぞれの軌跡を同一解析空間に描画した。LSC は「同一の局在座標と分化段階」からスタートしても、シミュレーション毎にそれぞれ軌跡の方向、形、LSC 消失までの時間は異なることが示された。セル・オートマトンモデルでは「細胞は移動可能なスペースの中から、ランダムに選択される」という局所則に従うため、LSC はシミュレーション毎に異なる軌跡を描き、全く同一の移動軌跡にはならない。これが複雑系を再現するセル・オートマトンモデルの優れた点である。

(4) 細胞移動時間 (不動時間) の統計的解析

細胞は、周囲環境により移動するスペースがない場合にはその場に留まり続ける。そのため細胞が動かない時間 (不動時間) を軌跡データから抽出し、統計学的解析を加えた (図 4)。再発例での NSC と LSC の不動時間を比較すると、有意に NSC > LSC あり、再発では LSC がより有意に移動していることが示された。

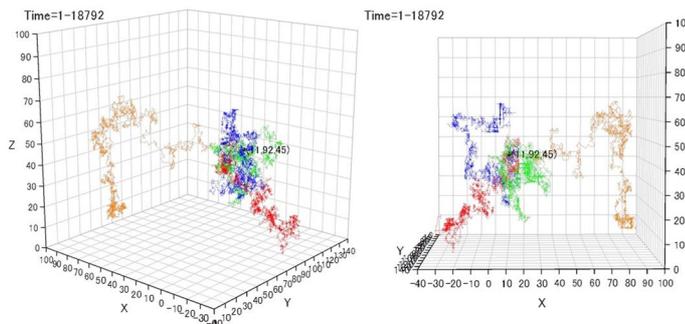
121221 v10.72 092920PC04 (治+再) 2019PC44 (再発) モデル (図 2)

mk20001 (0-29999) +mk20002 (0-9234) 連続軌跡図

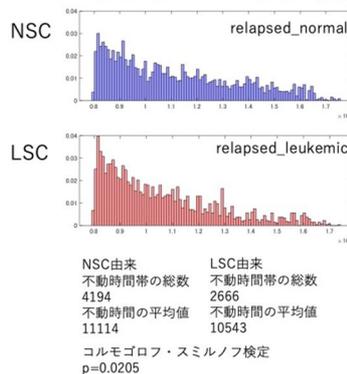


092920mPC高治モデル (治療) mk20001 ci15 (LSC) 軌跡 (図 3)

- 0920212020PC (red) t=1-18792
- 1209212019PC33 (blue) t=0-18156
- 1209212019PC44 (green) t=0-21562
- 1209212020PC (orange) t=0-12683



再発における NSC と LSC の不動時間の比較 (図 4)
(不動時間 > 8000 の細胞を抽出)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小松崎 俊彦 (KOMATSUZAKI Toshihiko) (80293372)	金沢大学・フロンティア工学系・教授 (13301)	
研究分担者	西山 宣昭 (NISHIYAMA Nobuaki) (10198525)	金沢大学・高等教育開発・支援系・教授 (13301)	
研究分担者	八田 稔久 (HATTA Toshihisa) (20238025)	金沢医科大学・医学部・教授 (33303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関