

令和 5 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08755

研究課題名(和文) CD35陽性白血病幹細胞の機能解析と治療標的候補分子の抽出

研究課題名(英文) Functional analysis of CD35-positive leukemic stem cells and identification of candidate molecules for targeted therapy

研究代表者

森 康雄 (Mori, Yasuo)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：90573345

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)：白血病幹細胞(LSC)分画の $28.8 \pm 11.3\%$ にCD35陽性亜分画の存在が確認され、これらは既知のLSCマーカーであるTim3+分画に濃縮された。フローサイトメトリーで純化したCD35+/-LSC分画を用いて施行した補体結合アッセイでは、CD35+分画で補体結合が少ない傾向が見られたものの、その他の解析では両者に有意差を認めなかった。遺伝子発現や蛋白発現を比較解析し、CD35陽性分画の機能的特徴や治療標的となる特定の分子・シグナル経路などの存在を明らかにする必要がある。また再発症例の検体を用いた解析を追加し、CD35発現が臨床経過に与える影響に関し検証していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が造血幹細胞マーカーとして見出したCD35の発現は、白血病幹細胞(LSC)分画にも見出された。既知のLSCマーカーであるTim-3との共発現パターンから機能的なLSCの分離・純化に有用であると考えられ、今後のLSC研究に利用可能な有意義な結果が得られたものと考えている。一方で、研究期間内には治療法開発に直結するデータの創出には至らず、CD35+Tim-3+LSCでより特異的に発現する分子や特徴的なシグナル経路の抽出など、実臨床への応用に向けた研究継続の必要性を認識している。

研究成果の概要(英文)：In our study, the presence of CD35-positive subfraction was identified in $28.8 \pm 11.3\%$ of the leukemic stem cell (LSC) population. This CD35+ LSCs were significantly enriched in the CD34+CD38-CD45RA-Tim3+ fraction. We performed functional assays by using FACS-purified CD35+/-LSC fraction. Although a trend towards less complement binding in the CD35+ LSCs was observed, no differences in survival or colony-forming capacity were evident between these CD35+/-LSCs in vitro cell culture with or without the complement supplementation. Further comparative analysis of gene and protein expression is required to clarify the functional characteristics of the CD35+ LSCs and the specific molecules and signaling pathways that could be therapeutic targets. In addition, we are planning to assess the impact of residual CD35+ LSCs on clinical outcomes by using samples that are acquired from the patients experienced leukemia relapse.

研究分野：血液学 造血細胞移植 幹細胞生物学

キーワード：CD35 白血病幹細胞 補体経路 治療標的

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自己複製能と多分化能を有する HSC は、生涯にわたり成熟血球を供給し、生体の恒常性維持に極めて重要な役割を担っている。本研究開始前に、我々はヒト HSC が濃縮される CD34⁺CD38⁻分画を詳細に解析し、一部の亜分画に補体制御分子のひとつである CD35 が発現している事を見出していた。in vitro での機能解析では、CD35 陽性 HSC は CD35 陰性 HSC と比較して分化能力に大きな差を認めないものの、造血ヒエラルキーのより上流に位置して、細胞周期関連の遺伝子発現が低下した静的状態を維持していること、異種移植実験を補体機能が残存する BRGS マウスで行うと、CD35⁺HSC のみがヒト造血再構築能を示すことを明らかにしていた。この事は、ストレス環境下での造血に際して、活性化した補体カスケードからエスケープ可能な CD35⁺HSC が重要な役割を担っていることを示唆するものであった。

AML などの造血器腫瘍においては、HSC のカウンターパートである白血病幹細胞(LSC)の存在が示されており、LSC は自己複製能と白血病芽球への分化能を発揮して AML 細胞集団を形成するのみならず、未分化性を維持して治療抵抗性を示し、再発に深く寄与しているとされる。

CD35⁺HSC が定常状態で高い未分化性を有するとともに、化学療法や放射線治療など補体活性化状態を引き起こすストレス環境への高度耐性を示すことから、この細胞集団を起源とする CD35⁺LSC が存在すれば、補体カスケードからの逃避機構という新たなメカニズムで生存が担保され、再発・治療抵抗性へ寄与することが想定され、治療標的として非常に魅力的な細胞分画であると思われた。

2. 研究の目的

短期的には以下の2点を検証することを目的とした。

1) LSC に CD35 発現亜分画は存在するか？

2) CD35⁺LSC と CD35⁻LSC に機能的差異はあるか？

ストレス耐性が高い(±幹細胞特性が高い)機能的分画として CD35⁺LSC の存在が示された場合には、同分画を標的とする治療候補分子を抽出し、難治性 AML の治療成績向上に寄与することを長期的な目標とした。

3. 研究の方法

1) LSC 分画における CD35 発現の確認

マルチカラーFCM を用いて、AML-LSC が濃縮される CD34⁺CD38⁻CD90⁻分画内に CD35 を発現する亜分画が存在するかを確認する。他の LSC マーカーである Tim-3 も同時染色して検証する。

2) CD35 陽性 LSC の機能解析 (CD35 陰性 LSC との比較解析)

a) Single-cell RNA sequencing (Fluidigm C1/Biomark system, BD Rhapsody)

FACS ソーティングした LSC を用いて、シングルセル遺伝子発現解析を行う。HSC/LSC 関連の遺伝子(細胞周期・stemness マーカーなど)を中心に評価を行い、CD35⁺LSC が静的状態・未分化性を維持し、CD35⁺HSC のカウンターパートとして矛盾しないかを検証する。

b) 補体結合能解析

LSC 分画を用いて細胞表面への C3b 結合能を評価。HSC で確認された CD35 陽性亜分画での低補体結合状態が再現できるかを検証する。

c) 細胞培養

in vitro での細胞培養を行い、補体添加・CD35 中和抗体添加などの条件が CD35⁺/LSC の生存や増殖に与える影響を解析する。抗癌剤添加や放射線照射などのストレス環境下での変化も合わせて解析する。

d) 異種移植

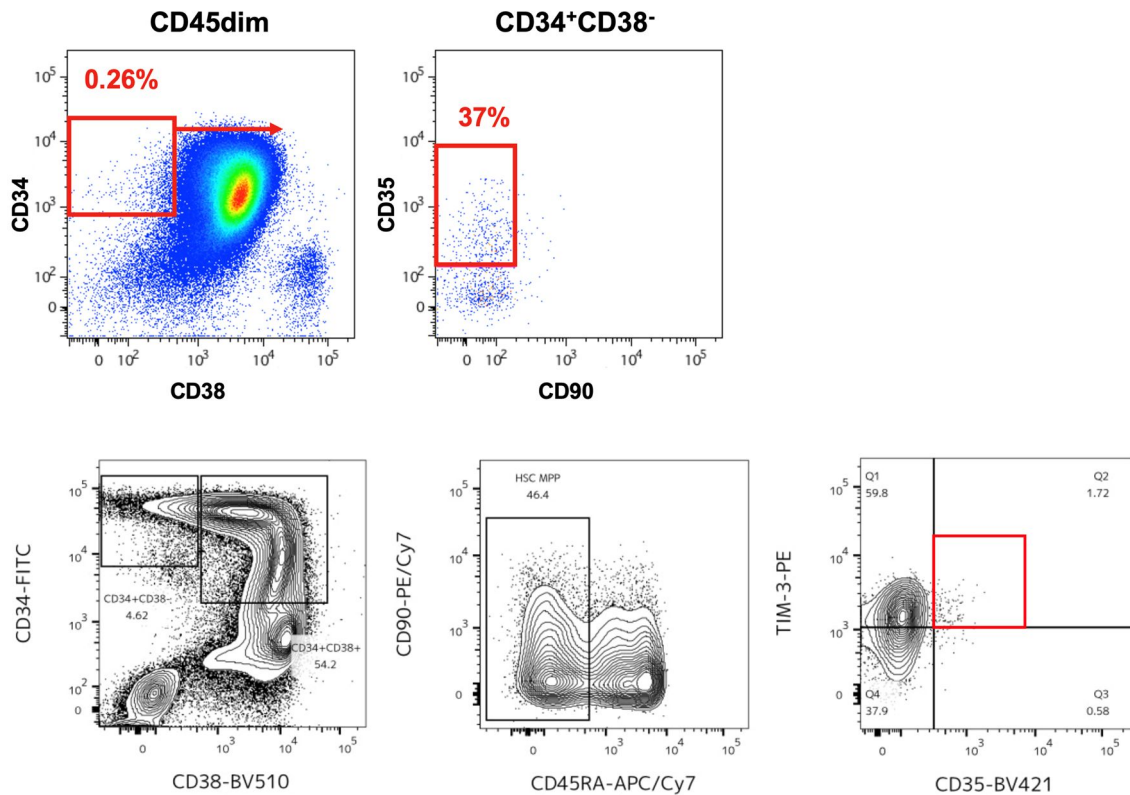
CD35⁺LSC と CD35⁻LSC を純化して異種移植(継代移植含む)を行い、その差異を検討する。

HSC での実験と同様に、レシピエントとして NSG マウス(補体系欠損)と BRGS マウス(補体系維持)を用いて造腫瘍効率を比較する

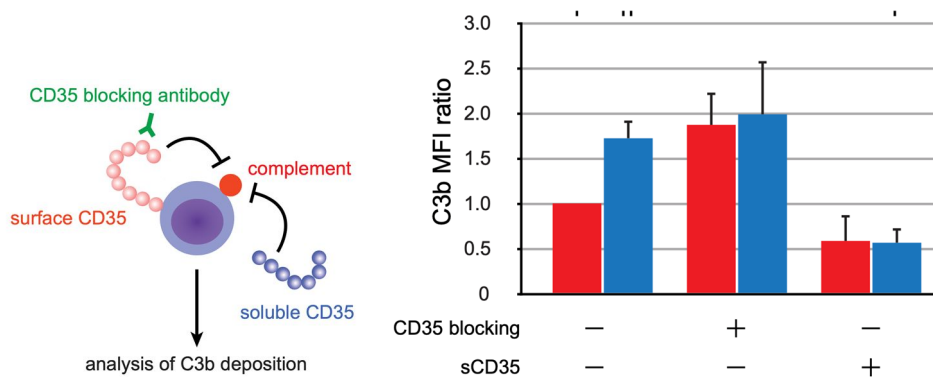
4. 研究成果

白血病幹細胞(LSC)分画の 28.8 ± 11.3% に CD35 陽性亜分画の存在が確認された。

さらに Tim-3 を加えた発現解析では、CD35 分画は既知の LSC マーカーである Tim-3 陽性分画で存在比率が高く、LSC 純化に有用な細胞表面抗原である可能性が示唆された。(次頁参照)



補体結合能解析では、CD35 陽性分画で細胞表面への補体結合が少ない傾向が確認された。
(赤:CD35 陽性分画, 青:CD35 陰性分画)



その他の機能解析に関しては2群間で差を認めなかった。遺伝子発現/蛋白発現解析に関しては実施に必要な細胞数を得られる検体が少なく、研究計画が予定通りに進捗しなかった。

上記の研究結果より、LSC 分画に一定数の CD35 陽性亜分画が存在し、既知の機能的 LSC マーカーである Tim-3 陽性分画に濃縮されることから CD35 も新規 LSC マーカーである可能性が高く、少なくともその分離・純化には利用可能な表面抗原であることが示唆された。

一方で、CD35 陽性 LSC の機能解析に関しては進捗が不十分であり、同分画を標的とした特異的治療開発を目指すためには、今後の継続研究により CD35 陽性分画で特異的に高発現している遺伝子群や依存する代謝経路などを同定すること、再発症例での解析を増やし治療経過に与えるインパクトを検証する必要があると考えられた。

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------