

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19544

研究課題名（和文）PML-RARA融合遺伝子サブタイプが規定する白血病幹細胞性獲得機構の解明

研究課題名（英文）PML-RARA of the short but long isoform initiate from TIM-3+ leukemic stem cells with hierarchical leukemic organization

研究代表者

宮本 敏浩（Miyamoto, Toshihiro）

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：70343324

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：白血病幹細胞(LSC)機能分子TIM-3を指標として細分画したAPL幹細胞をマウスに移植し、APL再構築可能なことを明らかにした。疾患特異的PML::RARA融合遺伝子は転座切断部位によりshortとlong-typeに別れるが、幹細胞内ではshort-type CD34+CD38-TIM-3+分画のみPML::RARAを発現し、継代してAPL再構築するLSCであった。両タイプは異なる遺伝子発現シグネチャーを呈し、short-type PML::RARAタンパクはAPL細胞質内に局在し、long-typeは核内移行を認め、同一融合遺伝子でも切断部位の相違により白血化機構が異なることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

APLは異種移植系で安定して白血病を再構築可能な白血病幹細胞分画は報告されておらず、本研究が初めてAPL幹細胞の存在を明らかにした。また同一のPML::RARA融合遺伝子であってもゲノム切断部位で違うshort-typeとlong-typeで、初めて異なる白血化機構を解明した独自性の高い研究である。従来、APLはPML::RARA融合遺伝子獲得のみの単純な発症様式と考えられていたが、多様性に富む白血病である可能性を示した。今後は2つのタイプの白血化機構の相違を明らかにし、各病型に特化した標的治療が開発できれば、新規APL標的治療としてプレイクスルーとなる。

研究成果の概要（英文）：LSC of AML can be enriched in CD34+CD38- fraction and reconstitute human AML in vivo. However, in APL, which constitutes 10% of all AML and is driven by PML::RARA fusion genes, the presence of LSC has long been unidentified because of difficulty in reconstitution of APL. We show that LSC of short-type isoform APL, defined by different breakpoints of PML, concentrate in CD34+CD38- fraction and express TIM-3. Short-type APL exhibited distinct gene expression signatures, including LSC-related genes, compared to the other types. CD34+CD38-TIM-3+ short-type APL efficiently reconstituted APL in xenograft with high penetration, whereas CD34- differentiated APL cells did not. CD34+CD38-TIM-3+ short-type APL reconstituted APL after serial transplantation. Identification of LSC in a subset of APL and establishment of an efficient patient-derived xenograft model may contribute to further understanding APL leukemogenesis and devise individual treatments for eradication of APL LSC.

研究分野：血液内科学

キーワード：APL 白血病幹細胞 PML::RARA

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒト急性骨髄性白血病(AML)の白血病幹細胞(LSC)は正常造血幹細胞と同一の表面形質 $CD34^+CD38^-$ 分画内に濃縮して存在することが、免疫不全マウスへの移植系で証明され、AMLの起源となるLSCを直接標的とした生物学的特性の解明および治療開発が進められてきた。しかしながら、AMLの中で唯一、急性前骨髄球性白血病(APL)だけは異種移植系で白血病が再現できず、自己複製能を持つLSCが存在しないと考えられてきた。

(2) APL疾患特異的である $t(15;17)$ 染色体転座により形成される $PML::RARA$ 融合遺伝子は、両遺伝子の転座切断部位により short-type、long-type, variant-type に大別されるが、白血病発症機構など生物学的意義が明らかでなく、同一レジメンでの分化誘導療法を施行している。

2. 研究の目的

(1) 我々が同定したLSC機能分子TIM-3によりAPLの $CD34^+CD38^-$ 細胞を細かく亜分画し、異種移植系にてAPLを再構築可能か否か、APL-LSCの存在を検討する。

(2) 転座切断部位による $PML::RARA$ タイプ別でAPL生物学的特性や白血化機構の違いを明らかにし、各病型に特化した標的治療の開発を目指す。

3. 研究の方法

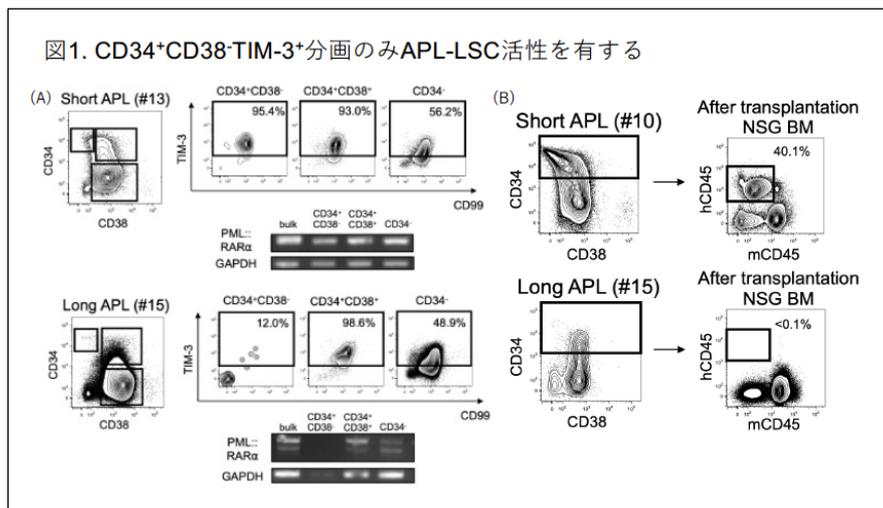
(1) APL患者 $CD34^+CD38^-$ 分画をTIM-3陽性陰性に分けて純化し、PCRにて $PML::RARA$ の発現、マウス連続異種移植によるAPL再構築能、Microarrayによる網羅的遺伝子発現について検討し、APL幹細胞活性を検証する。

(2) short-typeはexon6の核内移行配列を欠失するため、 $PML::RARA$ 融合タンパクの細胞内局在が他のtypeとは異なる可能性がある。各病型でArrayScanを用いて $PML::RARA$ 融合タンパクの細胞内の所在を検討し、APL発症機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) APL患者26例中14例に、 $CD34^+CD38^-$ 分画内にTIM-3+幹細胞が存在した。short-typeの14例全例で $CD34^+CD38^-$ 幹細胞はTIM-3陽性で、かつ $PML::RARA$ 融合遺伝子を発現し、異種移植実験が可能であった6例中4例においてAPLをマウス内に再構築した(図1)。一方、long-typeでは12例全例

で $CD34^+CD38^-$ 幹細胞はTIM-3陰性で、かつ $PML::RARA$ 融合遺伝子は発現しておらず、異種移植



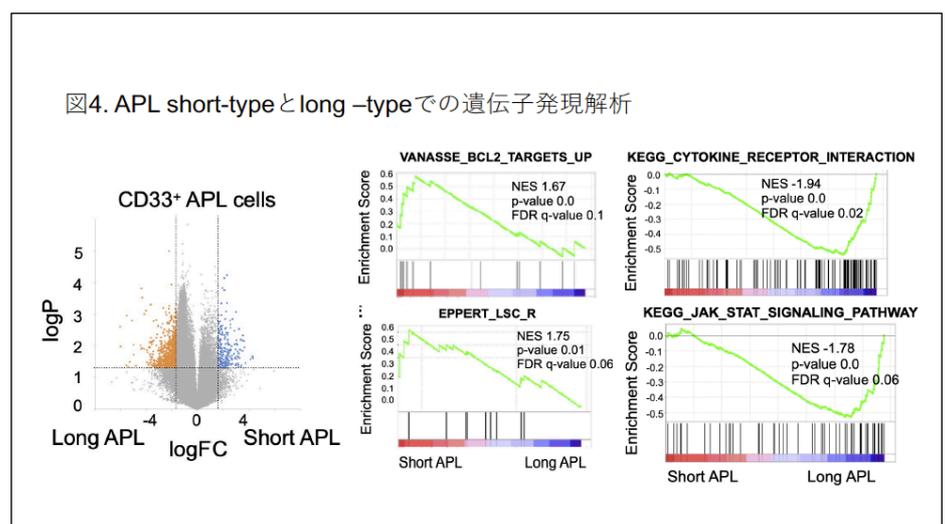
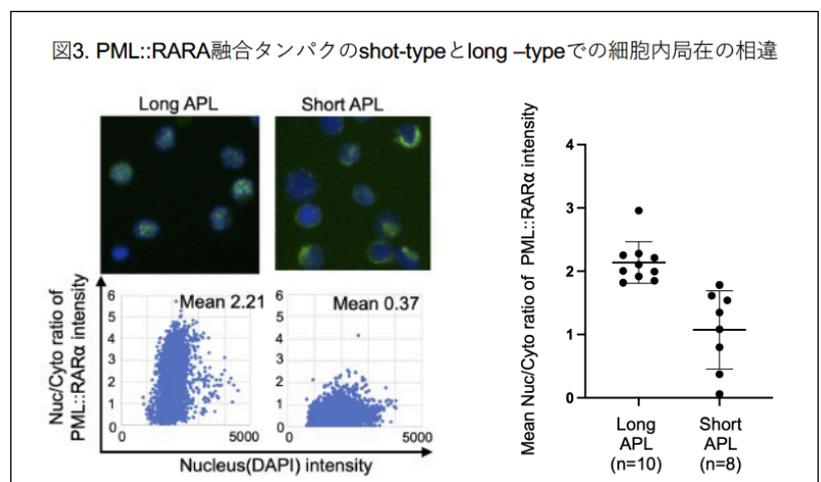
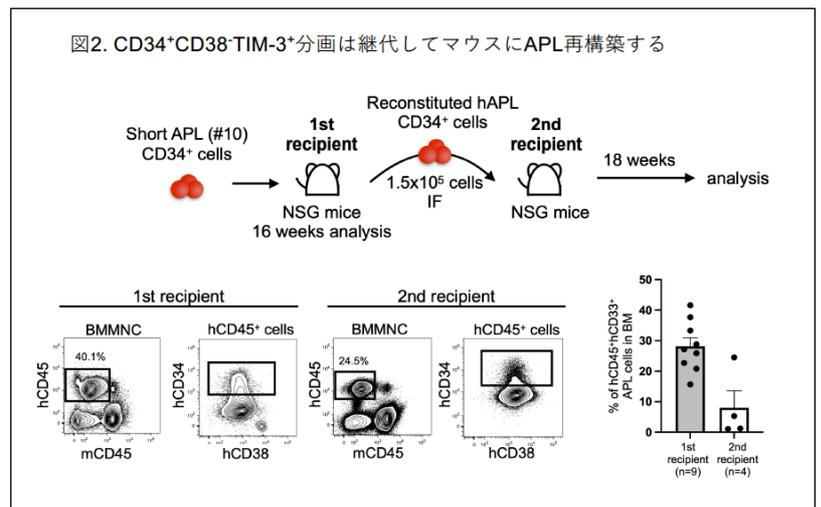
系においても、マウスで APL を再構築しないか、または生着しても PML::RARA 陰性のヒト造血細胞を構築した。

(2) short-type の CD34⁺CD38⁻TIM-3⁺ 幹細胞は、連続移植実験でも二次マウスに PML::RARA 陽性ヒト APL を再構築可能であった(図 2)。Short-type には、自己複製能を有する白血病幹細胞 (APL-initiating stem cell) が存在し、long-type とは APL 発症機構が異なることが明らかになった。

(3) PML::RARA 融合タンパクの細胞内局在の検討では、long-type 10 例で PML::RARA 融合タンパクが核内のみに局在し、short-type 8 例においては核内移行せず細胞質内に留まることを見出した(図 3)。PML::RARA 融合タンパクが核内において転写リプレッサーとして細胞分化を抑制する従来の APL 発症機構は short-type には該当せず、同一の融合遺伝子であってもゲノム切断部位の相違により PML::RARA の異なる白血化機構を明らかにした。

(4) short-type と long-type では異なる遺伝子発現シグネチャーを呈した(図 4 左)。short-type では未分化な幹細胞活性に関連する遺伝子群(LSC, BCL-2 ファミリー)を高発現し(図 4 中央)、long-type ではサイトカイン受容体関連や JAK-STAT シグナル関連遺伝子群の高発現を認めた(図 4 右)。

(5) 抗 PML 抗体を用いた ChIP シーケンスにより、long-type と short-type で PML::RARA が結合する分子について検討したが、うまく機能する PML 抗体が得られず、現時点では long-type



と short-type の各々で PML::RARA が結合する分子の違いが明らかにできていない。細胞質内に留まって存在する short-type PML::RARA が、intact allele 由来の PML の機能を dominant negative に抑制する可能性など、さらに検討を重ねて、2つの病型独自の白血化機構を詳細に解明する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kikushige Yoshikane, Miyamoto Toshihiro, Kochi Yu, Semba Yuichiro, Ohishi Maki, Irifune Hidetoshi, Hatakeyama Kiwamu, Kunisaki Yuya, Sugio Takeshi, Sakoda Teppei, Miyawaki Kohta, Kato Koji, Soga Tomoyoshi, Akashi Koichi	4. 巻 7
2. 論文標題 Human acute leukemia uses branched-chain amino acid catabolism to maintain stemness through regulating PRC2 function	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 3592 ~ 3603
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2021004618.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamada Shinya, Asakura Hidesaku, Kubo Masayuki, Sakai Kazuya, Miyamoto Toshihiro, Matsumoto Masanori	4. 巻 7
2. 論文標題 Distinguishing immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura from septic disseminated intravascular coagulation using plasma levels of haptoglobin and factor XIII activity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis	6. 最初と最後の頁 100076 ~ 100076
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-021-03239-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ito Yoshikiyo, Ozawa Hidetoshi, Eto Tetsuya, Miyamoto Toshihiro, Kamimura Tomohiko, Ogawa Ryosuke, Uchida Naoyuki, Wake Atsusi, Fujisaki Tomoaki, Ohno Yuju, Takase Ken, Okumura Hirokazu, Takamatsu Yasushi, Kawano Noriaki, Akashi Koichi, Nagafuji Koji	4. 巻 111
2. 論文標題 IKZF1-plus alterations are not associated with outcomes in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia patients enrolled in the FBMTG ALL MRD2008 trial	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 European Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 103 ~ 112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10428194.2021.2002321.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sakoda Teppei, Kikushige Yoshikane, Miyamoto Toshihiro, Irifune Hidetoshi, Harada Takuya, Hatakeyama Kiwamu, Kunisaki Yuya, Kato Koji, Akashi Koichi	4. 巻 7
2. 論文標題 TIM-3 signaling hijacks the canonical Wnt/ -catenin pathway to maintain cancer stemness in acute myeloid leukemia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 2053 ~ 2065
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacc.2022.01.098	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Harada Takuya, Kikushige Yoshikane, Miyamoto Toshihiro, Uno Kazuko, Niino Hiroaki, Kawakami Atsushi, Koga Tomohiro, Akashi Koichi, Yoshizaki Kazuyuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Peripheral helper-T-cell-derived CXCL13 is a crucial pathogenic factor in idiopathic multicentric Castleman disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6959 ~ 6959
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15458.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Irifune Hidetoshi, Kochi Yu, Miyamoto Toshihiro, Sakoda Teppei, Kato Koji, Kunisaki Yuya, Akashi Koichi, Kikushige Yoshikane	4. 巻 114
2. 論文標題 GPAM mediated lysophosphatidic acid synthesis regulates mitochondrial dynamics in acute myeloid leukemia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3247 ~ 3258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15835	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikezoe Takayuki, Ando Kiyoshi, Onozawa Masahiro, Yamane Takahisa, Hosono Naoko, Morita Yasuyoshi, Kiguchi Toru, Iwasaki Hiromi, Miyamoto Toshihiro, Matsubara Keisuke, Sugimoto Saori, Miyazaki Yasushi, Kizaki Masahiro, Akashi Koichi	4. 巻 113
2. 論文標題 Phase I study of alvocidib plus cytarabine/mitoxantrone or cytarabine/daunorubicin for acute myeloid leukemia in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4258 ~ 4266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15458	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyawaki K, Kato K, Sugio T, Sasaki K, Miyoshi H, Semba Y, Kikushige Y, Mori Y, Kunisaki Y, Iwasaki H, Miyamoto T, Kuo FC, Aster JC, Ohshima K, Maeda T, Akashi K.	4. 巻 6
2. 論文標題 A germinal center-associated microenvironmental signature reflects malignant phenotype and outcome of DLBCL.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood Adv	6. 最初と最後の頁 2388-2402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2021004618.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi S, Kanda Y, Konuma T, Inamoto Y, Matsumoto K, Uchida N, Ikegame K, Miyamoto T, Doki N, Nakamae H, Katayama Y, Takahashi S, Shiratori S, Saito S, Kawakita T, Kanda J, Fukuda T, Atsuta Y, Kimura F.	4. 巻 57
2. 論文標題 Outcomes of third allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in relapsed/refractory acute leukemia after a second transplantation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bone Marrow Transplant	6. 最初と最後の頁 43-50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41409-021-01485-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saito N, Yamauchi T, Kawano N, Ono R, Yoshida S, Miyamoto T, Kamimura T, Shultz LD, Saito Y, Takenaka K, Shimoda K, Harada M, Akashi K, Ishikawa F.	4. 巻 115
2. 論文標題 Circulating CD34+ cells of primary myelofibrosis patients contribute to myeloid-dominant hematopoiesis and bone marrow fibrosis in immunodeficient mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Hematol	6. 最初と最後の頁 198-207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-021-03239-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyamoto T, Sanford D, Tomuleasa C, Hsiao HH, Olivera LJE, Enjeti AK, Gimenez Conca A, Castillo TBD, Girshova L, Martelli MP, Guvenc B, Delgado A, Duan Y, Garbayo Guijarro B, Llamas C, Lee JH.	4. 巻 63
2. 論文標題 Real-world treatment patterns and clinical outcomes in patients with AML unfit for first-line intensive chemotherapy.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Leuk Lymphoma	6. 最初と最後の頁 928-938
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10428194.2021.2002321.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Morita Y, Nannya Y, Ichikawa M, Hanamoto H, Shibayama H, Maeda Y, Hata T, Miyamoto T, Kawabata H, Takeuchi K, Tanaka H, Kishimoto J, Miyano S, Matsumura I, Ogawa S, Akashi K, Kanakura Y, Mitani K.	4. 巻 116
2. 論文標題 ASXL1 mutations with serum EPO levels predict poor response to darbepoetin alfa in lower-risk MDS: W-JHS MDS01 trial.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Hematol	6. 最初と最後の頁 659-668
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-022-03414-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikezoe T, Ando K, Onozawa M, Yamane T, Hosono N, Morita Y, Kiguchi T, Iwasaki H, Miyamoto T, Matsubara K, Sugimoto S, Miyazaki Y, Kizaki M, Akashi K.	4. 巻 113
2. 論文標題 Phase I study of alvocidib plus cytarabine/mitoxantrone or cytarabine/daunorubicin for acute myeloid leukemia in Japan.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 4258-4266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15458.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakano N, Utsunomiya A, Matsuo K, Yoshida N, Seto M, Ohshima K, Fujiwara H, Fuji S, Takatsuka Y, Ito A, Miyamoto T, Suehiro Y, Nakamae H, Sawayama Y, Yuasa M, Miyazaki Y, Ota S, Imada K, Fukuda T, Ichinohe T, Atsuta Y, Kato K.	4. 巻 5
2. 論文標題 Chromosomal defects and survival in patients with adult T-cell leukemia/lymphoma after allogeneic HSCT.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood Adv	6. 最初と最後の頁 475-486
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2020003639	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 宮本敏浩
2. 発表標題 急性骨髄性白血病の新規治療
3. 学会等名 第22回日本薬学会Pharmacology-Hematologyシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮本敏浩
2. 発表標題 クローン性造血に潜む内科併存疾患
3. 学会等名 第86回日本内科学会北陸支部生涯教育講演会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Zaimoku Y, Imi T, Hatada T, Mura H, Yoshino H, Tran DCC, Nannya Y, Ogawa S, Hosomichi K, Doki N, Katayama Y, Koike T, Matsuoka K, Nishida T, Takahashi Y, Kataoka K, Nakazawa H, Ueda Y, Fukuda T, Ichinohe T, Ishimaru F, Onizuka M, Atsuta Y, Miyamoto T
2. 発表標題 Prevalence and Outcome of Vexas Syndrome in Unrelated Hematopoietic Stem Cell Transplantation Suppressed expression of ASCT1 contributes to the maintenance of leukemia stemness via the enhancement of antioxidant capacity.
3. 学会等名 65th ASH meeting (2023/12/09 San Diego) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tran DCC , Zaimoku Y, Hosomichi K, mizumaki H, Hosokawa K, Yamazaki H, Miyamoto T , Nakao S.
2. 発表標題 Single-Cell Dissection Reveals a Distinct Origin of Small Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Clones in Immune Aplastic Anemia and Healthy Individuals.
3. 学会等名 65th ASH meeting (2023/12/09 San Diego) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮本敏浩
2. 発表標題 新規分子標的薬時代における真菌症マネージメント
3. 学会等名 第46回日本造血・免疫細胞療法学会/シンポジウム5 (国際学会)
4. 発表年 2024年

〔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	菊繁 吉謙 (Kikushige Yoshikane) (40619706)	九州大学・大学病院・講師 (17102)	

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