

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09935

研究課題名(和文) 白血病幹細胞特異的なDNA損傷修復機構の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Specific DNA damage repair mechanisms in leukemic stem cells

研究代表者

宮崎 拓也 (Miyazaki, Takuya)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：20711245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：急性骨髄性白血病の化学療法抵抗性や再発の機序として、白血病幹細胞の関与が示唆されている。初発時と再発時の白血病患者の骨髄もしくは末梢血検体を用いて、フローサイトメトリーによって白血病細胞の集団から白血病幹細胞の分画(CD34+/CD38-)の同定を試みた。白血病幹細胞はわずかな細胞集団(CD34+/CD38- 1.91%(0.83-3.24%))であったが、これらの細胞のRNA、DNA、タンパクの抽出を行った。さらに急性骨髄性白血病に関連する遺伝子変異のシーケンス解析を行った。今後は白血病幹細胞のDNA修復に影響する標的分子の同定を行い、白血病幹細胞に特徴的なDNA修復機構の解明を継続する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、白血病幹細胞に特徴的なDNA修復メカニズムに着目して急性骨髄性白血病の再発や治療抵抗性に及ぼす影響を検証したものである。研究期間内に、白血病幹細胞特異的にDNA修復に影響する標的分子を同定することができず、その特徴的な細胞特性に関する知見は得られなかった。今後の展望として、白血病幹細胞の病態をより確実に捉えるべく実臨床における検体を用いた解析を継続し、急性骨髄性白血病の再発や治療抵抗性のメカニズムを解明していく。

研究成果の概要(英文)：Leukemic stem cell is thought to be a critical factor for chemotherapy resistance or relapse in acute myeloid leukemia (AML). Using flow cytometry, we tried to identify leukemic stem cell population, CD34+/CD38- cells in bone marrow or peripheral blood samples from patients with newly diagnosed or relapsed AML. Leukemic stem cells were sorted based on the CD34+/CD38- expression, which were minor population (1.91% (0.83-3.24%)), and RNA and proteins were extracted for DNA repair analysis. AML-related mutations were also identified by targeted sequencing. The target molecule, which is critical for DNA repair in leukemic stem cells, will be determined in the future study.

研究分野：血液内科学

キーワード：白血病幹細胞 DNA修復 急性骨髄性白血病

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia、AML) の病態の多因子性や再発には、自己複製能と限定された分化能を有する白血病幹細胞 (leukemic stem cell、LSC) による白血病細胞の供給の強い関与が示されている。これまでに、LSC は白血病細胞の CD34 陽性 CD38 陰性細胞に存在することが示され、LSC に特異的に発現する表面抗原の候補が報告されてきた。さらに、LSC は骨内膜領域でその多くが G0 期にあるため、細胞周期に依存的な化学療法には抵抗性を示す。この LSC の化学療法抵抗性が、寛解後の AML における再発機序の重要な要因として考えられており、LSC を標的とした新規治療方法の開発が求められている。

細胞には複数の DNA 修復機構が備わっており、多様な DNA の損傷に対応している。これらの DNA 損傷に対する修復反応 (DNA damage response、DDR) は、造血幹細胞 (hematopoietic stem cell、HSC) にも備わっており、がん化や老化を回避する仕組みとして機能している。実際に、幹細胞ではアポトーシスに耐性であり、DNA 修復活性が上昇していることが報告されている。一方では、HSC は DNA 損傷に対して感受性が高く、逆に DNA 修復のエラー起こりやすいという報告が相次ぎ、HSC の DDR の制御メカニズムには不明な点が多い。正常 HSC と同様に LSC においても、DNA 損傷に対する感受性が亢進し、DDR の特徴的な機能を有することが想定されるが、LSC に特異的な DNA 修復機構のメカニズムは明らかではない。

### 2. 研究の目的

LSC を標的とした AML の治療戦略は、再発予防法や治療抵抗性 AML に有効な治療法を開発する上で極めて重要である。これまでに、LSC に特徴的な治療抵抗性や再発に影響する細胞特性は明らかにされていないが、正常 HSC と同様に LSC においても、DNA 損傷に対する感受性が亢進し、DDR の特徴的な機能を有することが想定される。これらの LSC の DDR 経路の細胞特性を明らかにすることで、LSC の DDR 経路を標的とした治療戦略を立てることが可能となる。

本研究では、LSC の DNA 損傷に対する修復反応性に注目し、LSC に特徴的な DNA 修復機構に関与する因子を同定し、AML の化学療法抵抗性および治療後再発のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究は、初発、再発、治療抵抗性となった AML の骨髄もしくは末梢血の臨床検体を用いて LSC の同定を行い、それらの LSC に特徴的な DNA 損傷に対する DNA 修復関連分子の解析研究である。さらには、同定された DNA 損傷修復分子の作用を阻害する薬剤を用いて、LSC を標的とした治療戦略を検証することも目標とした。

#### (1) LSC の同定・分離・抽出

当大学附属病院で新規に AML (M3 を除く) と診断し、化学療法による治療を行う症例を対象とする。AML の病期は、診断時、再発時、治療抵抗性時とする。本研究は、ヒト臨床検体を利用するにあたり当大学の倫理委員会の承認を得た。研究への同意が得られた AML 患者より臨床検体を採取した。

AML 患者の骨髄もしくは末梢血の単核球分離によって白血病細胞の分取を行い、その CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>細胞集団をフローサイトメトリーによるソーティングもしくは磁気細胞分離システム (MACS) による分離によって、LSC と非 LSC 分画 (non-LSC) 分画細胞を得る。分取した LSC と non-LSC 細胞のタンパク、Total RNA、Genomic DNA を抽出する。

#### (2) 対象とする DNA 損傷および DNA 損傷に対する DDR 関連分子

DNA 損傷センサー (PARP1、DNA-PKcs、ATM、XRCC1 等) DDR 関連分子 (PAR、 $\gamma$ H2AX、pCHK1、pATM 等) DNA 損傷に反応して活性化する転写制御因子 (p53 や TP53BP1 等)。

#### (3) LSC における DNA 損傷および DDR 関連分子の発現解析

LSC と non-LSC における DNA 損傷および DNA 損傷修復反応に関連するタンパクおよび遺伝子の発現レベルの変化を解析する。さらに、正常 HSC に関しても同様の DNA 損傷および DDR 関連分子発現レベルも解析し、HSC と AML における LSC の DNA 修復機構の相違も明らかにする。

#### (4) LSC の治療抵抗性の獲得機序の解析

同一 AML の診断時、再発時、治療抵抗性時の LSC における DNA 損傷および DNA 損傷修復反応に関連するタンパクおよび遺伝子の発現レベルの変化を解析する。治療抵抗性を獲得した AML の LSC で特異的な DNA 修復機構の変化を解析する。

#### (5) LSC の生存に与える影響の解析 (治療標的としての応用)

(4) および (5) によって同定された LSC に特徴的な DNA 損傷修復系因子を標的とし、その作用

を阻害する薬剤を用いて、LSC の生存に及ぼす影響を解析する。

#### 4 . 研究成果

フローサイトメトリー解析によって、ヒト AML の白血病細胞集団から LSC 分画 ( CD34 + /CD38-細胞 ) の同定を試みた。フローサイトメトリーの解析およびセルソーターには BD FACSAria を利用した。フローサイトメトリー解析時の抗体は APC/Cyanine7 anti-CD34 Antibody(Clone 581)と PE/Cyanine7 anti-CD38 Antibody(Clone HIT2)を使用し、7-AAD による死細胞除去を行った。

AML 診断時の LSC 分画と再発時の LSC 分画との比較では、診断時よりも再発時の骨髓中の白血病細胞において、CD34+/CD38-細胞の割合が増加していることを確認した ( newly diagnosed vs relapsed CD34 + /CD38-; 2.10%(0.0-5.2%) vs 9.03%(1.2-23.9%),  $p<0.04$  )。現時点までに少数例での解析であったため、LSC の頻度がその後の生存や予後に及ぼす影響は不明であった。分取した LSC 分画はわずかな細胞集団 ( CD34 + /CD38- (1.91%(0.83-3.24%) ) ) であったが、これらの細胞の分取後に RNA、DNA、タンパクの抽出を行った。さらに、ターゲットシーケンス解析によって同定された様々な AML に関連する遺伝子変異は、LSC の出現頻度や抗原発現強度との関連はみられなかった。

次のステップとして計画していた RNA、DNA、タンパクを用いた DNA 損傷および DNA 損傷に対する DDR 関連分子の発現解析は、現時点で解析までに至っていない。具体的には、上記研究の方法に示した PARP1、DNA-PKcs、ATM、XRCC1、PAR、 $\gamma$ H2AX、pCHK1、pATM、p53、TP53BP1 の遺伝子発現レベルを PCR 法によって、タンパク発現をウエスタンブロット法によって解析を行うことを予定している。さらに、同一の AML 患者の診断時、再発時、治療抵抗性時の LSC において、これらの DDR 関連分子のタンパク、遺伝子の発現レベルの変化を解析することも重要である。最終的には、AML 患者より分取した LSC の細胞培養において、標的分子の機能を阻害する薬剤や拮抗する薬剤に対する生存への影響を解析 ( フローサイトメトリー、ウエスタンブロット、DNA 断片解析等により細胞のアポトーシスや細胞周期を評価 ) し、化学療法抵抗性を克服できるか検証する。一方で、継続して AML の臨床検体を用いた LSC と non-LSC の細胞保存と、それぞれの細胞の mRNA、タンパクの抽出を行い解析検体の蓄積を行う。

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	中島 秀明  (Nakajima Hideaki)  (30217723)	横浜市立大学・医学研究科・教授    (22701)	