

平成 21 年 4 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590552  
 研究課題名（和文） mRNA イメージングによる白血病治療後の微小残存病変生細胞の同定法と網羅的な特性解析  
 研究課題名（英文） Identification of minimal residual cells after the treatment of leukemia cells by the imaging of mRNA  
 研究代表者 竹下明裕（TAKESHITA AKIHIRO）  
 浜松医科大学・医学部・准教授  
 研究者番号 00242769

研究成果の概要：特定の白血病細胞の分画の検出と分離を施行するため、細胞内の mRNA の染色を試みた。QUAL/FRET (quenched autoligating /fluorescence resonance energy transfer)法を改良し、蛍光 probe の導入技術や反応時間の調整など多方面の改良を施行した。適切な donor probe と acceptor probe を設定し、energy transfer にて得られた特異的蛍光を検出しようとした。標的分子(mRNA)を WT1 とし、白血病細胞の同定と分離を生細胞の状態で行う可能性を模索した。作成された probe の細胞膜の透過性を一時的に高めるため streptolysin O (SLO)を使用した。SLO の至適濃度の決定に関しては細胞や試薬の状態などによる再現性の低下を防止するため、probe 導入前に SLO の処理濃度の最適化実験を行い、flow cytometry にて検討した。培養細胞では細胞内蛍光の増加を認め、WT1 が特異的に検出できると考えられた。しかし、WT1 の発現が本来非常に弱いとされている正常のリンパ球における蛍光が probe 量の増加とともに増加し、non-specific な蛍光をより低下させる必要性がでてきた。Non-specific な蛍光の原因を検討するため、分子量を変えた probe を設計して細胞内に導入した。また probe が核内へ移行することも考えられたため、probe に接着させる蛍光物質の量を変化させ検討している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：白血病、微小残存病変、mRNA、flow cytometry

## 1. 研究開始当初の背景

多くの白血病は造血幹細胞(HSC)に近い非常に未分化な細胞に遺伝子異常が発現し、

その異常によって引き起こされた分化異常と増殖を呈する疾患である。したがって癌化学療法後に観察される微小残存白血病細胞

胞内には原因遺伝子の異常は保持される。化学療法の有効性や個別化治療の面からも微少残存病変 (minimal residual disease; MRD) を正確に評価しようとする試みがされてきた。

MRD はこれまで flow cytometry (FC) 法、fluorescence in situ hybridization (FISH) 法、定量的 polymerase chain reaction (PCR) 法にて検出されてが、長所とともに欠点があった。FC 法では CD45, CD34 等のモノクローナル抗体に多パラメータ搭載セルソーター、カラム、磁気ビーズ法を併用し識別する方法や色素 (Hoechst33342 等) 難染色性を用いた方法が用いられ、比較的簡易で安価である。しかし正常造血前駆細胞と白血病細胞をその表現型や色素排泄能のみから判別することは容易でなく、正常未分化細胞の混入がデータの解釈に様々な影響を与えてきた。FISH 法では原因核酸を染色し原因核酸を保有する白血病細胞が判別される。しかし、本法では細胞が固定されるため、その後に施行される残存白血病細胞が獲得あるいは増幅した耐性など、残存した原因の解析法は限定される。固定後に表現型を解析可能な抗体も限定される。

定量的 PCR 法では残存細胞量を核酸のコピー数に現わす。最近標準化の努力により、施設間差も縮小してきた。しかし、本法は細胞自体を破壊するため、形態学的、機能的そして表現型の同時解析は難しい。予め目的細胞を分離しておく手段もあるが、手間とコストがかかり、生細胞率や機能上の変化が引き起こされる、表面抗原に規定された亜集団を分離しているにすぎず、また厳密に純化した白血病細胞の分離は不可能であった。PCR 法や FISH 法を用いた微少残存病変の研究が Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) を中心に行われ、治療の個別化や層別化の指標として重要視され始めたが、化学療法後の白血病細胞が減少 ( $10^6$ - $10^9$ /body) 時では細胞数や核酸量の定量が主眼で、重要な MRD 細胞の特性 (質的評価) を解析することは困難であった。

白血病細胞の薬剤耐性の獲得に関しては化学療法施行前と治療抵抗期や再発時の増殖した白血病細胞を比較検討して研究がされてきた。耐性メカニズムとして ABC transporters、apoptosis 抑制、間葉系細胞とのクロストーク等が提唱されている。私達も前者を中心に研究をしてきた (Takeshita et al, *JJCR* 86: 607-615, 1995; *Br J Haematol* 93: 18-21, 1996; 108: 90-92, 2000; *Leukemia* 14: 1436-1443, 2000; 16: 813-9, 2002; 19:

1306-11, 2005)。しかし化学療法に耐性を呈する白血病細胞は MRD の中にこそ存在しているものであり、この部分を解析の主眼と位置づけるべきである。薬剤耐性の本丸とされる白血病幹細胞も白血病腫瘍量の多くなった時点でその特性を解析するのは障害が多かった。

## 2. 研究の目的

mRNA は rRNA よりも少量で可変部が多く分子構造が不明の部分もあり検出は困難であった。標的に対する蛍光 probe の設計が難しく、生細胞の細胞膜を通過し、細胞内酵素の影響を免れることも難しい。1990 年後半から molecular beacon (MB) probe を使用し標的 RNA を検出する試みがなされた (Sokol et al Proc Natl Acad Sci USA 95, 11538-43, 1998)。しかし非特異的信号が多く細胞内で不安定である。quenched autoligating (QUAL) probe を導入し fluorescence resonance energy transfer (FRET) にて検出する QUAL/FRET 法は標的核酸を保有する細胞を同定する有用な方法として海外では一部の造血管腫瘍の研究に導入され始めた。

QUAL/FRET 法を安定した手法として発展させ、donor シグナルの減衰と特異的 FRET シグナルの検出を得、QUAL/FRET 法と flow cytometry を用い目標遺伝子を保有する生細胞を同定し純化しようとした。本法の導入により化学療法後の MRD が生細胞のまま分離されうる。分離された MRD の白血病細胞の表現型を検討すれば、効率的かつ正確に MRD の責任細胞が明らかとなりうる。白血病遺伝子保有細胞を標的とするは MRD の量的評価に加え、質的評価が可能となり表現型や形態に加え薬剤感受性、耐性獲得そして間葉細胞との関係などの研究が飛躍的に発展する、と考えた。染色される核酸の対象として白血病に極めて特異性が高く原因でもある BCR/ABL, PML/RAR $\alpha$ , AML-1/ETO 等を標的とすれば、得られる白血病細胞の純度は理論上 100% となりうる。

## 3. 研究の方法

QUAL-FRET 法を利用した probe の設定を行う。WT1 mRNA に対する作製された donor probe と acceptor probe の特異性を確認する。培養細胞に donor および acceptor probe と incubate し、キメラ RNA 陽性細胞で energy transfer による FRET 蛍光が上昇することをスペクトロメーター等により解析する。

QUAL-FRET 法を利用した白血病細胞分

離方法の確認として特異的蛍光 probe の白血球細胞への導入と gating と sorting による分離効率の調整、そして生細胞率の向上をはかる。これまでの preliminary な実験では、接着性のある細胞や増殖が顕著な培養細胞では probe の導入効率が低下する傾向があるため、neuramidase や low Ph condition 等を用いて技術的な向上をはかる。monocytic leukemia や NK cell leukemia のような接着性を有する白血球細胞株を使用する。

同様に QUAL-FRET 法を利用し、培養細胞において WT1 の保有細胞を非保有細胞から識別する。遺伝子陽性細胞として分離された細胞が実際に遺伝子を保有しているかは FISH 法により検討する。また同じ検体の mRNA 量を RT-PCR 法にて測定し、両者に正の相関関係があることを検討する。また WT1 の極めて低発現量である末梢血リンパ球をサンプリングし、この FRET シグナルを検討する。

WT1 発現細胞では flow cytometry 以外に蛍光顕微鏡下に検討し、mRNA の存在する細胞質（胞体）内に限局して蛍光が認められること、核内には蛍光が発生しないことを確認する。

#### 4. 研究成果

SLO による細胞膜の穿孔に関して浮遊培養細胞として K562、HL60 等 10 種類の細胞、接着細胞として COS7、NOMO1 等を使用した。いずれの細胞でも FITC ラベル dextran の取り込みが確認された。さらに膜穿孔後再封入した細胞を継代培養し、その生存と細胞分裂を確認することができた。

WT1 を標的とした染色では白血球細胞内に FRET シグナルを検出することができた。しかし、細胞内の蛍光の局在部位を検討したところ、核内からの蛍光を検出し、理論上の核が染色されない結果に相反した。細胞内に導入した probe を胞体内に局在させるため細胞膜を通過し、核膜は通過しない probe の修飾が必要であると考えられた。これに対して、avidin-biotin 結合やモノクローナル抗体を結合させ、分子量の増加を試みた。この実験の結果、核内への probe の取り込みは減少し、胞体が特異的に蛍光を発していることが確認された。

RT-PCR との相関関係を検討したところ、RT-PCR において強発現を認める細胞において FRET シグナルの発現は低レベルであった。一方、末梢血リンパ球を Ficoll にて分離し、そ

の WT1 発現量を検討した。WT1 は RT-PCR では極めて低発現であったが、FRET シグナルが検出された。

WT1 の発現量は 1 細胞あたり 1000-3000 コピーと想定され、現行の方法では FRET を検出するには不十分で非特異的なシグナルを検出することが困難であることも考えられた。さらに mRNA 発現量の多い RAS や FOS をいった標的から検討を加える必要があると思われた。また、quenched autoligating FRET probe を使用し増幅させることに関しても検討が必要であると考えられた。

#### 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 8 件)

- ① Takeshita A, Asai T, Murakami M, Fujihara H, Ishizuka T, Nakai S, Yamada C, Suzumura T, Uchiyama Y, Maekawa M, Shigeno K, Washiyama N, Yamashita K, Unno N, Shinjo K. Effective blood utilization via system for massive blood transfusion, including cardiovascular operation in local areas. *Jpn J Transfusion and Cell Therapy* 55: 64-67, 2009.
- ② Kobayashi Y, Naito K, Takeshita A, Morishima Y, Ogura M, Besso H, Hotta T, Mitani K, Takeuchi H, Miyawaki S, Naoe T, Ohno R. Phase I/II study of humanized anti-CD33 antibody conjugated with calicheamicin, gemtuzumab ozogamicin, in relapsed or refractory acute myeloid leukemia: Final results of Japanese multi-center cooperative study. *Int J Hematol, in press.*
- ③ Takeshita A, Yamakage N, Shinjo K, Ono T, Hirano I, Nakamura S, Shigeno K, Tobita T, Maekawa M, Kiyoi H, Naoe T, Ohnishi K, Sugimoto Y, Ohno R. CMC544 (inotuzumab ocogamicin), an anti-CD22 immuno-conjugate of calicheamicin, alters the levels of target molecules of malignant B-cells. *Leukemia, in press*
- ④ Takeshita A, Shinjo K, Yamakage N, Ono T, Hirano I, Matsui H, Nakamura S, Shigeno K, Tobita T, Maekawa M, Kiyoi H, Naoe T, Ohnishi K, Sugimoto Y, Ohno R. CMC-544 (inotuzumab ozogamicin) shows less effect on multidrug resistant cells: analyses in cell lines and cells from patients with

B-cell chronic lymphocytic leukemia and lymphoma. Br J Haematol, *in press*.

- ⑤Fujisawa S, Ohno R, Shigeno K, Sahara N, Nakamura S, Naito K, Kobayashi M, Shinjo K, Takeshita A, Suzuki Y, Hashimoto H, Kinoshita K, Shimoya M, Kaise T, Ohnishi K. Pharmacokinetics of arsenic species in Japanese patients with relapsed or refractory acute promyelocytic leukemia treated with arsenic trioxide. Cancer Chemother Pharmacol. 54: 485-493, 2007.
- ⑥Asou N, Kishimoto Y, Kiyoi H, Okada M, Kawai Y, Tsuzuki M, Horikawa K, Matsuda M, Shinagawa K, Ohtake S, Nishimura M, Takahashi M, Yagasaki F, Takeshita A, Kimura Y, Iwanaga M, Naoe T, Ohno R. A randomized study with or without intensified maintenance chemotherapy in patients with acute promyelocytic leukemia who have become negative for *PML-RAR $\alpha$*  transcript after consolidation therapy: The Japan Adult Leukemia Study Group(JALSG)APL97 study. Blood 110: 59-66, 2007.
- ⑦Miyawaki S, Kawai Y, Takeshita A, Komatsu N, Usui N, Arai Y, Ishida F, Morii T, Kano Y, Ogura M, Doki N, Ohno R. Phase I Trial of FLAGM with High Doses of Cytosine Arabinoside for Relapsed, Refractory Acute Myeloid Leukemia: Study of the Japan Adult Leukemia Study Group(JALSG). Int J Hematol 86: 343-347, 2007

[学会発表] (計 4 件)

- ① Fujihara H, Takeshita K, Nakai S, Yamada C, Suzumura T, Uchiyama S, Takeshita A. The usefulness of the expected elevation value of serum albumin before replacement therapy. Annual Meeting of AABB Montreal, Canada.
- ②Wakita A, Ohtake S, Takada S, Yagasaki F, Komatsu H, Miyazaki Y, Kubo K, Kimura Y, Takeshita A, Adachi Y, Kiyoi H, Yamaguchi T, Yoshida M, Ohnishi K, Miyawaki S, Naoe T, Ueda R, Ohno R. A Randomized Trial Comparing Individualized Vs. Non-Individualized Treatment for Elderly Acute Myeloid Leukemia: JALSG GML200 Study. Annual Meeting of American Society of Hematology, Sanfrancisco, USA.
- ③Yamakage N, Takeshita A, Shinjo K, Ono T, Hirano I, Okinaka K, Nakamura S, Shigeno K, Maekawa M, Ohnishi K, Ohno R. Cell cycle features and quantitative alteration of target molecules of malignant B cells treated with CMC544 alone or in combination with

rituximab. Annual Meeting of American Society of Hematology, Sanfrancisco, USA. Atranta, USA, Dec, 2007.

- ④Takeshita A, Shinjo K, Yamakage N, Ono T, Hirano I, Okinaka K, Matsui H, Nakamura S, Shigeno K, Maekawa M, Ohnishi K, Sugimoto Y, Ohno R. Reduced effect of CMC544 on P-glycoprotein positive malignant B cells and its restoration by multidrug resistance modifiers. Annual Meeting of American Society of Hematology, Sanfrancisco, USA. Atranta, USA, Dec, 2007.

[図書] (計 1 件)

Motoji T, Motomura S, Wang Y, Tsuji K, Takanashi M, Shiozaki H, Miyawaki S, Asou N, Takeshita A, Saburi Y, Ohno R, Mizoguchi H. Clinical Significance of P-Glycoprotein in Acute Leukemia and a Strategy to Overcome Drug Resistance. Frontiers in Cancer Res 123-151.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

特記事項なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹下 明裕 (TAKESHITA AKIHIRO)  
浜松医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 00242769

### (2) 研究分担者

竹下 香 (TAKESHITA KAORI)  
浜松医科大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号: 30397393

前川 真人 (MAEKAWA MASATO)  
浜松医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 20190291

### (3) 連携研究者