

令和 5 年 5 月 27 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03582

研究課題名（和文）モデル細胞株を活用した骨髄異形成症候群の白血病化を阻止する戦略

研究課題名（英文）Strategy aiming at the inhibition of leukemic evolution of the myelodysplastic syndromes by the use of MDS-derived cell lines

研究代表者

通山 薫（Tohyama, Kaoru）

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：80227561

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では骨髄異形成症候群（MDS）から急性骨髄性白血病（AML）に病型進展する分子機構の解明を目指して、申請者が樹立したMDS様細胞株からAML様に至る一連の6細胞株を用いてシングルセルRNAシーケンス解析を行い、どのような遺伝子発現プロファイルをもつクローンが病型進展していくのかという分子機構の探索に取り組んだ。

MDS様からAML様に変貌する過程で、CD34陽性分画の明らかな増加、S100A8等の顆粒球特有の機能分子の喪失に加えて、特異的な遺伝子群の変化を見出した。この中から鍵となる少数の候補遺伝子の絞り出しが可能と期待され、さらに解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MDSは血球減少に加えてAMLに移行しやすい難治性造血障害で、とくにMDS由来のAMLはきわめて予後不良のため、画期的治療法が待望されている。本研究では申請者が樹立したMDSからAMLへの移行を表現した細胞株を用いて、悪性転換の鍵となる遺伝子変化を突き止めることに繋がることを期待される。解析すべきデータが膨大なため、さらに検討を進める必要があるが、新規治療の開拓に向けてあらたな分子標的を発見できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）： To explore the molecular mechanism of disease progression from myelodysplastic syndromes (MDS) to acute myeloid leukemia (AML), we performed single-cell RNA sequencing analysis using a series of six cell lines established from a patient with MDS. We attempted to explore the molecular mechanisms by which clones with different gene expression profiles develop the malignant process.

In the process of transformation from MDS-like to AML-like, we found a clear increase in CD34-positive cell fraction, loss of functional molecules specific to granulocytes such as S100A8, as well as changes in specific gene clusters. We expect to be able to identify a small number of candidate genes that may play key roles in this process, and further analysis is underway.

研究分野：造血器腫瘍を中心とする検査血液学

キーワード：骨髄異形成症候群 白血病化 遺伝子変異 シングルセル解析

1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndromes ; MDS) は主に中高齢者に発症する難治性の造血障害である。MDS では貧血・血球減少のために骨髄不全に陥る一方、骨髄中の幼若細胞が遺伝子変異を獲得して、しばしば急性骨髄性白血病 (AML) へ移行する。MDS の血球減少については対症療法の余地があるが、一方 MDS の時期を経由して AML に移行した場合はきわめて難治性である。また高齢者では造血幹細胞移植の適応となり難いため、治療法の新機軸が強く望まれる。つまり AML 発症してからの治療よりも、AML への病型移行を阻止できることが本来的には望ましい。そこで、MDS から AML への病型移行に関わる分子機構の解明と、MDS から AML への移行を阻止する戦略の開拓が重要課題であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、MDS 由来細胞株とそこから派生した一連の MDS 細胞株を用いて、MDS から AML へ移行する病型進展の分子機構の一端を解明し、病型進展を阻止するという新たな治療戦略の基盤への道を開くことである。研究代表者が樹立した MDS92 とそこから派生した一連の MDS 細胞株は、MDS から AML への移行をインビトロで再現し得る、独創的な培養細胞モデルである。そこで細胞株だからこそ可能な実験系を用いて MDS の病型進展をゲノムレベルで網羅的に解析することによって、この疾患の分子病態の解明と新たな治療法の開拓に寄与することができると考え、この計画を立案した。

3. 研究の方法

(1) 実験材料として、MDS細胞株 MDS92とその継代培養中に派生した変異亜株計6細胞株を対象とした。各細胞株の名称と相互の位置関係を図1に示す。すなわちMDS期を反映するMDS92からMDS92-P1、MDS92-P2を経てAML期を反映するMDS-Lとなり、IL-3存在下ではMDS-L-2007、IL-3非存在下でMDS-LGFがそれぞれ得られた。

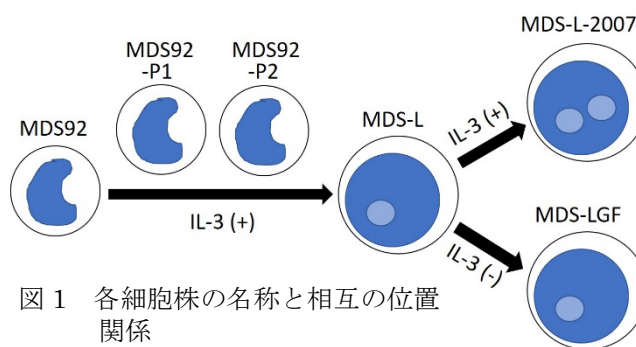


図1 各細胞株の名称と相互の位置関係

(2) シングルセルRNAシーケンス解析について述べる。Chromium Single Cell Solution System (10X Genomics) を用いて、単一の細胞ごとに特異的なバーコードとそれぞれ採取された各mRNAに特有なバーコードを標識してcDNA合成をおこない、そのあとIllumina NovaSeq 6000を用いて単一細胞ごとに網羅的な塩基配列情報を得た。Cell Ranger(ver.6.1.2)の解析パイプラインによる前処理として、シーケンスリードをヒトリファレンスゲノム配列 (hg38) へアラインメントし、バーコードのフィルタリング、各バーコードのUMI(Unique Molecular Identifier)カウントを行い、遺伝子・バーコードのマトリックスを作成した。このデータを元にシングルセルにおける主成分分析をおこない、遺伝子発現パターンによるクラスタリングをおこなった。またクラスタリング解析時の解像度を0.1から1.0の間で設定し、得られたデータをUMAP(Uniform Manifold Approximation and Projection)によって次元圧縮をおこない、Loupe Browserによって一部可視化した。さらにLoupe Browser機能を用いて、特定の遺伝子発現を示す細胞間同士で他の遺伝子発現の有意差の有無を調べた。

以上の解析を通して、悪性化に繋がると考えられる増殖優位性を示すグループの遺伝子発現パターンを抽出した。さらに、造血幹細胞マーカー、細胞増殖、アポトーシス、細胞分化に関わると考えられるいくつかの分子の発現様態について、6細胞間で比較検討した。

4. 研究成果

(1) MDS92 シリーズ 6 細胞株における遺伝子発現パターンのクラスタリング

MDS92、MDS92-P1、MDS92-P2、MDS-L、MDS-L-2007、MDS-LGF からそれぞれ 6171 個、7214 個、5081 個、2337 個、7769 個、8060 個の細胞についてシングルセルデータを得た。上記 6 細胞株の総データを用いて遺伝子発現パターンのクラスタリング解析を行い、その時の解像度を 0.1 から 1.0 の間で設定して、得られたデータを UMAP によって次元圧縮して可視化したところ、解像度 0.3 のときのクラスタリングは全細胞集団を cluster 0 から cluster 7 までの 7 つに区分するものであるが、このときが 6 つの細胞株間の遺伝子発現プロファイルを最も特徴的に区分できることがわかった (図 2)。

(2) 細胞株間で変動があったクラスターの特徴

図2から、細胞株間で変動があったクラスターとしてcluster 0、4、5、7に着目した。cluster 0は細胞の病型移行に伴い発現上昇した遺伝子群で、*CD52*、*GAS5*、*CSRP2*、リボソーム構成分子などが含まれていた。cluster 4、5は細胞の病型移行に伴い発現低下した遺伝子群で、cluster 4には *LGALS3*、*FUCA1*、*CXCL8*、*IFI30* などが、cluster 5には *S100A8*、*CA2*、*SRGN*、*MNDA*、*LYZ* などが含まれていた。さらにcluster 7はMDS92にほぼ特異的に発現していた遺伝子群で、*S100A6*、*MRC1*、ミトコンドリアの酸化還元関連分子が多数含まれていた。cluster 4、5、7には顆粒球分化に伴い発現上昇する遺伝子が多く含まれることが明瞭であり、これらの遺伝子発現の喪失が病型移行と関連することが示唆された。

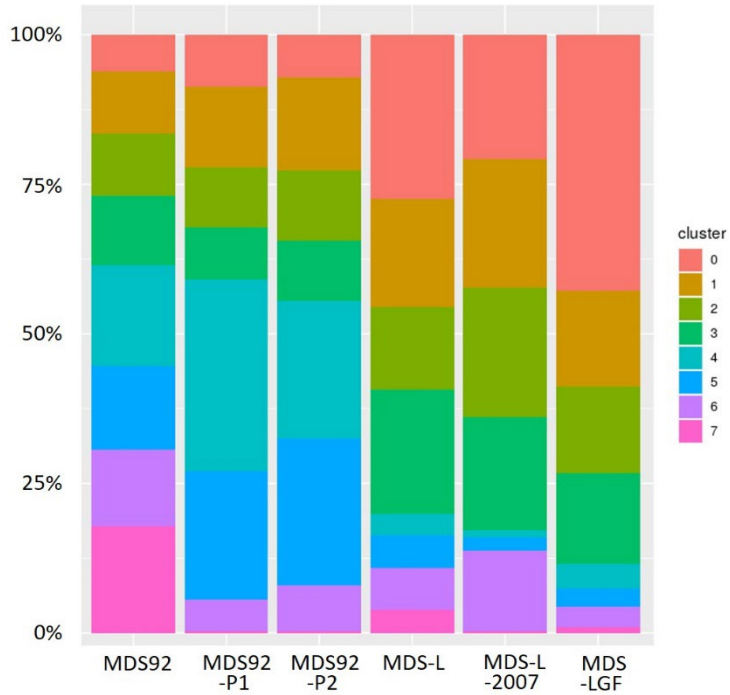


図2 6細胞株の遺伝子発現パターンのクラスタリング

(3) 各細胞株における CD34 陽性細胞分画の比率と、それぞれの CD34 陽性細胞の遺伝子発現プロファイル

MDS92、MDS92-P1、MDS92-P2、MDS-L、MDS-L-2007、MDS-LGF の CD34 陽性細胞分画の比率はそれぞれ、5.1%、0.3%、0.3%、1.0%、92.6%、90.2%、85.9%であり、MDS 期を反映する前半3株とAML 期を反映する後半3株とで、明らかに差異があった。

次に、以下の遺伝子 (*MYC*、*BCL2*、サイクリンファミリーとして *CCNA1*、*CCNA2*、*CCNB1*、*CCNB2*、*CCNB3*、*CCND1*、*CCND2*、*CCND3*、*CCNE1*、*CCNE2*、それから *WT1*) の発現を各細胞株全体と CD34 陽性細胞分画について比較した。図3に示すように、細胞株全体ではMDS期よりもAML期の細胞株で概ね高発現となった。

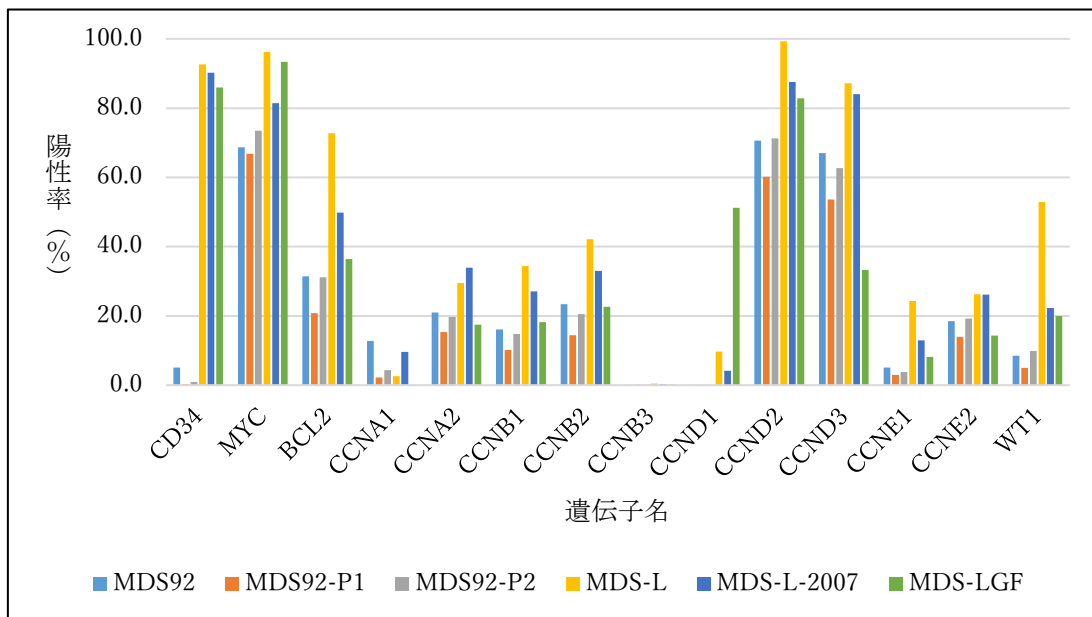


図3 各細胞株における主な遺伝子発現 (細胞集団全体における陽性細胞比率)

左端に CD34 陽性比率を占めす。

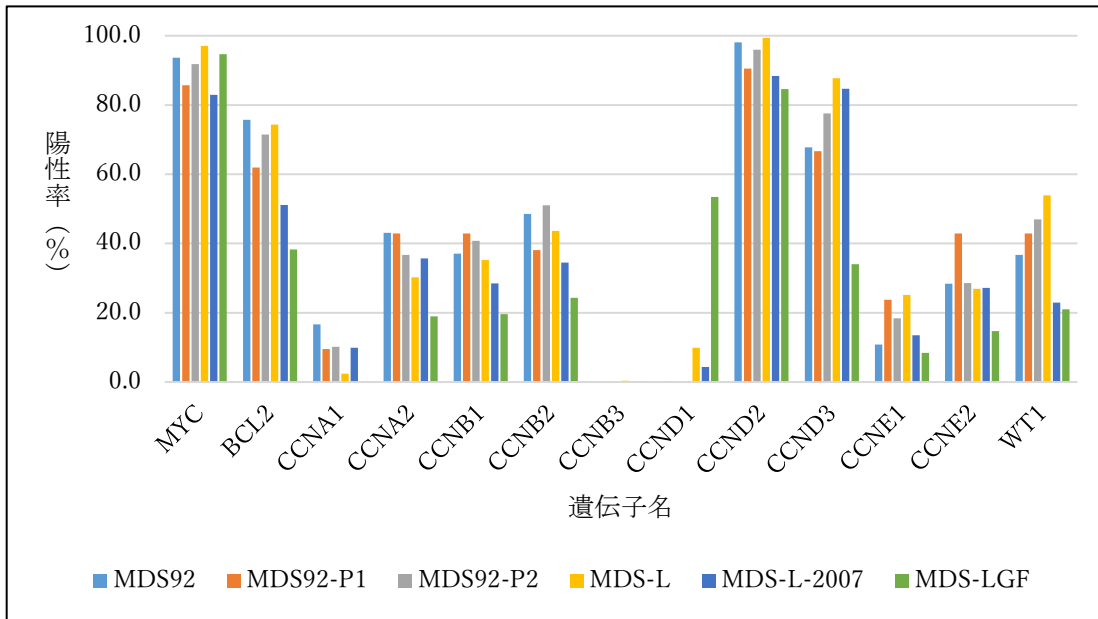


図4 各細胞株における主な遺伝子発現 (CD34 陽性分画における陽性細胞比率)

一方図4に示すように、CD34 陽性細胞分画に限定すると、各細胞株間での差異は必ずしも明瞭でなく、一部のサイクリン分子に見られるように、むしろ MDS 期の細胞株のほうが高発現傾向のものもあった。一連の細胞株間で見出されたことは、MDS 期と AML 期の最大の相違点は CD34 陽性比率自体であって、CD34 陽性細胞分画同士では細胞株間で明確な差異はないということ、それから *BCL2* と *WT1* については、CD34 陽性細胞分画よりも細胞集団全体での発現値が MDS 期と AML 期の判別に有用であると考えられた。

(4) 転写因子群の関与について

骨髓球系分化に関与するとされる *RUNX1*、*GATA* 転写因子群について探究したところ、現時点で有為な変動を示す遺伝子は得られていない。

(5) 本研究成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

MDS の発症ならびに AML への病型進展の解明とその防止は臨床上大きな課題であり、近年は国内外で臨床検体を集積して網羅的遺伝子解析が活発に行われている。本研究は MDS 期から AML 期への移行をインビトロで再現するという、世界的にも他に例のないモデル細胞株を活用していることから、再現実験が可能であること、抗腫瘍薬等種々の薬剤への反応性やその際の遺伝子変動など応用研究が拡大可能であることから、独創的かつインパクトある研究を推進できるポテンシャルがある。

今回の一連の研究で得られた素のデータは膨大であるため、関心ある遺伝子個別の発現解析に加えて遺伝子群としての発現変動の解析はまだまだ探究の余地が多く残されている。たとえば疑似時間軸解析によって AML 期への移行の鍵となる遺伝子 (群) を同定する試みは現在進行中である。また、本研究のようなビッグデータを扱うあらたな解析ツールの開発が日進月歩であるので、本研究の目的である MDS の病型進展の分子機構の一端を解明し、病型進展を阻止するという新たな治療戦略の基盤への道を開くことを目指して検討を一層深めることが重要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Shafiee Sahba, Gelebart Pascal, Popa Mihaela, Hellesoy Monica, Hovland Randi, Brendsdal Forthun RakeI, Lee Jungwoo, Tohyama Kaoru, Molven Anders, Parekkadan Biju, Tore Gjertsen Bjorn, Olsnes Kittang Astrid, McCormack Emmet	4. 巻 193
2. 論文標題 Preclinical characterisation and development of a novel myelodysplastic syndrome derived cell line	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 415 ~ 419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.17372	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 Kurozumi Nami, Tsujioka Takayuki, Ouchida Mamoru, Sakakibara Kanae, Nakahara Takako, Suemori Shin ichiro, Takeuchi Masaki, Kitanaka Akira, Shibakura Misako, Tohyama Kaoru	4. 巻 112
2. 論文標題 VLX1570 induces apoptosis through the generation of ROS and induction of ER stress on leukemia cell lines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3302 ~ 3313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14982	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2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 通山 薫
2. 発表標題 異常造血？ CHIPと骨髄異形成症候群
3. 学会等名 日本検査血液学会第21回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 通山 薫
2. 発表標題 血球形態学への誘い
3. 学会等名 日本血液学会東北地方会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

川崎医科大学検査診断学（病態解析学）ホームページ
<https://m.kawasaki-m.ac.jp/labhematology/>

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	通山 由美 (Tohyama Yumi) (70362770)	姫路獨協大学・薬学部・教授 (34521)	
研究分担者	片岡 浩巳 (Kataoka Hiromi) (80398049)	川崎医療福祉大学・医療技術学部・教授 (35309)	

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