

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16356

研究課題名(和文) 白血病幹細胞の不均一性とゆらぎの解析と白血病治療への応用

研究課題名(英文) Analysis of heterogeneity and fluctuation of leukemic stem cells and its application to leukemia therapy

研究代表者

新開 泰宏(Shingai, Yasuhiro)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：70791614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：新規造血幹細胞抗原であるEndothelial cell-Selective Adhesion Molecule(ESAM)の発現変化に基づき、ヒトAMLにおける白血病細胞の不均一性と制御メカニズムを解析した。ヒトAMLにおいてESAM陰性細胞とESAM陽性細胞は相互に変動可能で、ESAM発現に伴うAML細胞の階層性は認めず、可塑性を認めていた。ESAM発現の可塑性はAML細胞自身の自分泌を含めたTGF β 1刺激によって促進された。TGF β 1シグナルの阻害はESAM発現の可塑性を阻害するだけでなく、AML細胞の増殖抑制と細胞死を誘導し、抗腫瘍薬の効果を増強した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性骨髄性白血病(AML)については、これまで多くの研究により、染色体・遺伝子異常による層別化や、新規治療薬が開発されてきた。しかし、未だに完治のためには造血幹細胞移植が必要であり、移植後の再発も多く、極めて難治性の疾患である。AMLにおいては、白血病幹細胞(LSC)が化学療法抵抗性や再発に関与すると報告されており、LSCを根絶することがAMLの治療に重要と考えられている。本研究において、ヒトAMLにはTGF β 1シグナが関与する不均一性と可塑性が存在し、その阻害は治療標的となり得ることが示唆された。これらの研究成果はAMLにおけるLSCの病態解明だけでなく、新規治療にも寄与すると期待される。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the heterogeneity and regulatory mechanisms of leukemic cells in human AML based on the altered expression of Endothelial cell-Selective Adhesion Molecule (ESAM), a novel hematopoietic stem cell antigen. In human AML, ESAM-negative and ESAM-positive cells were mutually variable and showed plasticity without hierarchy of AML cells associated with ESAM expression. Plasticity of ESAM expression was promoted by TGF β 1 stimulation, including autocrine secretion by AML cells themselves. Inhibition of TGF β 1 signaling not only inhibited ESAM expression plasticity, but also inhibited AML cell proliferation and induced cell death, thereby enhancing the effect of anti-tumor drugs.

研究分野：血液・腫瘍内科学

キーワード：白血病幹細胞 ESAM 不均一性

1. 研究開始当初の背景

急性白血病は、造血幹細胞あるいは造血前駆細胞に遺伝子異常が生じることによって発生する造血器腫瘍である。従来、白血病は腫瘍細胞のモノクローナルな増殖による疾患と考えられてきたが、免疫不全マウスへの異種移植実験において白血病細胞の一部が腫瘍を再構築することから、白血病幹細胞という概念が提唱されるようになった。白血病細胞の中に幹細胞としての性質を持つ細胞が存在し、細胞周期が静止期にあることで治療抵抗性や疾患の再発の原因となるという概念である。白血病が化学療法によって完全寛解を得られても、白血病幹細胞が残存することで再発を誘導することから、白血病幹細胞を根絶することが白血病の治癒に必要と考えられる。ヒト急性骨髄性白血病における腫瘍幹細胞抗原として CD44・CD47・CD96・CLL-1 などが報告されており、これらの抗原を標的とした治療法が研究されているが、これらの抗原の発現量は環境に応じて複雑に変動する。普遍的な白血病幹細胞特異的抗原は特定されておらず、白血病幹細胞に対して有効な治療法もいまだ確立されていない。白血病幹細胞が環境に応じてその性質を変化させるという事実は、白血病幹細胞の属性に寄与する分子機序の理解が、根治的な治療法の開発に必須であることを示唆していた。

これまで造血幹細胞は均一な細胞集団と考えられてきたが、最近の研究成果は、造血幹細胞集団が本質的に不均一で、細胞生物学的にゆらぎながら存在することを示していた。申請者の研究グループは、核クロマチン構造調節分子が造血幹細胞の自己複製と多分化能力に重要であるのみならず、造血幹細胞の遺伝子発現にゆらぎを付与することによって、集団の多様性を構築していることを明らかにした(Cell Reports 2018)。また、白血病幹細胞集団においても同様なゆらぎと多様性が存在し、化学療法に対する抵抗性を誘導している可能性を示している(Blood 2018)。そこで今回申請者は、白血病幹細胞の揺らぎと多様性の分子基盤を明らかにし、新たな治療戦略の構築を目標として本研究計画を策定した。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト白血病幹細胞における不均一性とゆらぎを解析し、その機能的意義と調節機序を明らかにすることを通じて、新規治療法の開発に繋げることを目的とした。本研究で白血病幹細胞の不均一性とゆらぎの指標として用いる ESAM は、申請者らが独自に同定した新規造血幹細胞マーカーである。ESAM は、種を超えて造血幹細胞に発現していることから、造血幹細胞の普遍的な機能に関与していると考え研究を継続してきた。最近の研究成果として、骨髄抑制時の造血幹細胞の活性化のみならず、胎生期の造血幹細胞の発生と分化にも、ESAM が重要な役割を担っていることを明らかにしていた。本研究では、これまでの正常造血幹細胞に関する独自の研究成果を白血病幹細胞へと展開することを目指した。ヒト白血病幹細胞における ESAM の機能的意義や、その発現を制御する分子機序の解析を通じて、白血病幹細胞の概念の再構築とその治療抵抗性の克服方法を創造することを試みた。

3. 研究の方法

(1)白血病幹細胞における細胞生物学的な不均一性の解明

申請者は予備研究で、ヒト白血病細胞株が ESAM 発現に関して不均一性を示し、単一細胞

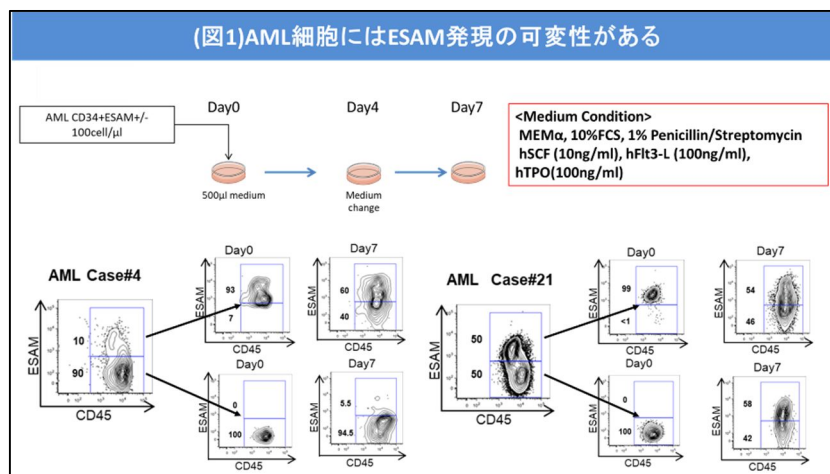
を分離・培養しても親株と同様の不均一性が再構成される結果を得た。本研究においては、この知見に基づいて研究を展開し、ヒト急性骨髄性白血病症例検体においても同様の結果が得られた。また、フローサイトメトリーや次世代シーケンズにより白血病幹細胞の表面抗原および内的なトランスクリプトームの変化をより詳細に解析し、白血病幹細胞のゆらぎの動態を明確にすることを目指した。

(2)ヒト白血病幹細胞の不均一性の基盤となる分子機序とそれを標的とした治療の開発

予備実験の結果は、白血病幹細胞における不均一性とゆらぎが環境側からの影響で生じる受動的なものだけではなく、白血病幹細胞自身に本質的に備わった自動的な機序の存在を示唆していた。RNA シークエンシングにより、ESAM 発現の不均一性維持に TGF- β 1 を始めとする複数のサイトカインシグナルが関与することを見出した。また白血病幹細胞の培養系に TGF- β 1 を添加することにより、不均一性の再構成が促進される結果を得ていた。これらの知見を発展させ、白血病幹細胞のサイトカインの自分泌・傍分泌が、白血病幹細胞集団の細胞遺伝学的ゆらぎを誘導する分子メカニズムを明確にしようとした。そしてそれらのシグナル伝達系を制御することで、白血病幹細胞の生存や薬剤抵抗性にどのような影響を与えるかを解析した。

4. 研究成果

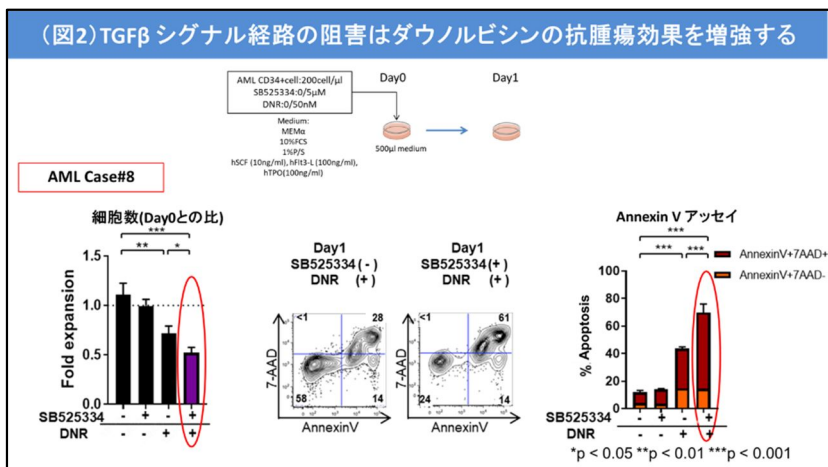
ヒト AML 患者骨髄の臨床検体 21 例を用いて白血病細胞の ESAM の発現を解析すると、検体毎に ESAM の発現は多様で、また同一症例の白血病細胞集団内でも ESAM 発現は不均一であることが明らかとなった。単一検体内の ESAM 陽性細胞と陰性細胞の間に階層性があるかを確認するために、ESAM 陽性および陰性細胞を分離し、それぞれを thrombopoietin, Flt3-ligand, stem cell factor の存在下で培地培養した。その結果、増殖に伴い ESAM 陽性細胞から ESAM 陰性細胞が生じた一方で、ESAM 陰性細胞からも ESAM 陽性細胞が生じた。このことから、AML においては ESAM 発現に可変性が存在することが示唆された。(図 1)ESAM 発現の不均一性は、ヒト AML の細胞株においても認められた。細胞株の一つである KG1a 細胞から ESAM 陰性分画を分離・培養すると、経時的に ESAM 発現が上昇し、親株と同様の不均一な ESAM 発現を呈する集団を再構成した。さらに KG1a から単細胞を分離・培養しても、分離時の ESAM の発現量に関わらず、親株と同様の不均一な ESAM 発現を再構成した。これらの結果から、AML 細胞の可変性は、個々の細胞に内在する性質に起因していると考えられた。



Real-time RT-PCR の結果、ESAM 発現の可変性は遺伝子の転写レベルで生じていた。また、KG1a 細胞を用いた RNA シークエンシングの結果、ESAM 発現量に関連して多数の遺伝子の発現変化が認められた。さらにこの遺伝子変化をもとに Ingenuity Pathway Analysis を用い

て up-streaming 解析を行うと、TGFβ シグナルが ESAM 高発現分画で活性化しており、TGFβ シグナルが ESAM 発現の可変性に関与している可能性が推察された。実際に KG1a の ESAM 陰性分画細胞を培養する際、TGFβ 1 の添加は ESAM 発現の上昇を促進した。また、無血清培地において、KG1a の培養後に TGFβ 1 濃度を ELISA 法にて測定すると、培養した細胞数に応じて上清中の TGFβ 1 濃度が上昇した。これらの結果から AML 細胞は、自分泌した TGFβ からのシグナルによって、ESAM の発現レベルを変動させていることが示唆された。

最後に、この TGFβ シグナルを阻害することが、AML 細胞にどのような影響を与えるかを検討した。TGFβ 受容体である TGFβ R1 の選択的阻害薬である SB525334 の添加により、KG1a の ESAM 陰性細胞の継続培養に伴う ESAM 発現上昇は阻害された。それだけではなく、阻害剤の添加は KG1a 細胞の増殖抑制と細胞死を誘導し、ダウノルビシンによる抗腫瘍効果を増強した。ヒト患者検体の AML 細胞においても、培養系において SB525334 の添加は ESAM の発現上昇を阻害した。一部の AML 患者検体においては単剤で白血病細胞の増殖抑制・細胞死誘導効果をもたらし、単剤では効果が得られなかった患者検体についても、ダウノルビシンによる抗腫瘍効果を増強することが確認された。(図 2)



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 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ozawa Takayuki, Fujii Kentaro, Sudo Takao, Doi Yukiko, Nakai Ritsuko, Shingai Yasuhiro, Ueda Tomoaki, Baba Yoshihiro, Hosen Naoki, Yokota Takafumi	4. 巻 208
2. 論文標題 Special AT-Rich Sequence-Binding Protein 1 Supports Survival and Maturation of Naive B Cells Stimulated by B Cell Receptors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1937 ~ 1946
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2101097	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yasuhiro Shingai, Takafumi Yokota, et al	4. 巻 -
2. 論文標題 Autonomous TGF signaling induces phenotypic variation in human acute myeloid leukemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem cells	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/stem.3348	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yasuhiro Shingai
2. 発表標題 Autonomous TGF signaling promotes phenotypic variations of human AML cells
3. 学会等名 日本血液学会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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