

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08406

研究課題名(和文) TKI治療抵抗性の慢性骨髄性白血病細胞に対する新規治療戦略の開発

研究課題名(英文) Development of novel treatment strategy for TKI resistant chronic myeloid leukemia cell.

研究代表者

高久 智生 (Takaku, Tomoiku)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：20408256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、慢性骨髄性白血病患者において、治療後も残存し再発の原因となる白血病幹細胞を同定、抽出し遺伝学的な解析を行うことで新たな治療法を開発することである。まずは細胞表面の標識を目印にして1細胞ごとに分取を試みたが、細胞株では成功するも患者細胞での分取が困難であった。そこで、白血病細胞ではミトコンドリアの断片化が生じているという結果をもとに、細胞の構造変化を検出可能なゴーストサイトメトリーを採用した。患者の骨髄細胞をゴーストサイトメトリーで測定し、遺伝子解析を行った結果、健常者の骨髄にはみられない細胞分画が検出され、この細胞分画の分取に成功した。今後はシングルセル解析を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現状においては、細胞の表面抗原を基にした白血病幹細胞の同定は、細胞数がごく少数である事や特徴的な表面抗原情報が不十分であること、さらには採取後もその検証方法も限られている。このような状況において、白血病細胞においてはミトコンドリアが断片化しているという発見をもとに、ゴーストサイトメトリーを採用した本研究は独創的かつ高い先進性を有すると考える。さらに、ゴーストサイトメトリーによる測定で得られた情報をもとに解析を行うことで、健常者の骨髄にはみられない細胞分画の同定に成功し、将来的なシングルセル解析への道筋を開いた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to identify, extract, and cytogenetically analyze leukemia stem cells from chronic myeloid leukemia to find novel therapeutic targets. Initially, we planned to sorting cell, based on surface antigens CD34 positive, CD38 negative and succeeded in cell lines, but had faced on technical difficulty because of vulnerability of patient cells. Acquisition of knowledge about mitochondrial fragmentation occurs in BCR-ABL1-positive cells, we employed ghost cytometry, which can detect structural changes in intracellular microorganisms. We have succeeded in fractionation of unknown cell fraction, which is not observed in healthy individual bone marrow by the UMAP analysis. We plan to perform single cell analysis in the future.

研究分野：慢性骨髄性白血病

キーワード：慢性骨髄性白血病 白血病幹細胞 ミトコンドリア ゴーストサイトメトリー シングルセルアナリシス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

Imatinib に代表される Tyrosine kinase inhibitor (TKI) が 2000 年に登場して以降、慢性骨髄性白血病 (Chronic myeloid Leukemia : CML) 患者の予後は 10 年生存率 80% 以上と劇的に改善した。さらに 2005 年以降は、より高い抗腫瘍効果をもつ第 2/第 3 世代 TKI が CML 治療に広く用いられるようになり、imatinib 治療に抵抗性を示した患者を含む、より多くの患者で病勢の進行が抑制されるのみならず、深い分子学的寛解 (Deep molecular response : DMR) が得られている。

一方で、第 2 世代 TKI 登場以降も 5 年後の DMR 達成率は CML 患者全体で 50% 程度にとどまる。さらに DMR を達成し数年間の維持が可能であった患者において、TKI 治療の中止を試みる臨床試験が国内外で複数実施されたが、最終的に 60% 以上の患者が CML を再発し、多くは 6 ヶ月以内に TKI 治療が再開されている (Etienne G, et al. *J Clin Oncol* 2017)。

また、TKI は催奇形性を有するため妊娠希望のある、または妊娠中の女性 CML 患者における治療戦略を困難とし、その他胸水・肺高血圧症、時間依存的、用量依的に増加する脳梗塞・心筋梗塞などの致命的な動静脈血栓症を含む様々な合併症問題、さらには高額な薬剤費による患者の経済的負担など、TKI 内服の長期化に伴う様々な問題が生じている。

現在、TKI 治療抵抗性の機序として BCR-ABL キナーゼドメイン (KD) の点突然変異が広く知られているが、慢性期 CML 患者においてこれら変異が発見されることは非常に希である。このほかにも、イマチニブにおいては薬剤の吸収不良や細胞内への薬剤取り込み阻害、BIM 遺伝子の欠失多型等が薬剤耐性の原因として報告されているものの、第 2 世代 TKI における耐性機序は前述の点突然変異以外は明らかとなっていない。

この様な状況において、これまで様々な手法を用いて治療抵抗性のメカニズムを解明する試みが行われてきた。しかしながら、TKI 治療後も残存する CML 細胞を抽出して、詳細に解析した研究はいまだ行われていない。その理由として以下の点が挙げられる。

- (1) TKI 治療前の CML 細胞は、そのほとんどが TKI 治療に反応する腫瘍細胞であり、治療後多くの患者で国際標準化法により定量した *BCR-ABL* mRNA 量が 0.01% 前後であることから、残存する TKI 抵抗性の CML 細胞数は 1 万細胞に 1 細胞程度であると推察される。
- (2) TKI 治療後も残存する CML 細胞に特徴的な表面抗原や分子がまだ同定されていないため、骨髓を採取しても膨大な骨髓細胞から腫瘍細胞のみを抽出することが困難である。

また、TKI 治療中止後も分子学的寛解維持が可能な患者は、CML 患者全体の 10% 程度と推定されることから、現状では TKI 治療は病勢のコントロールが可能であるものの、治癒は困難であると認識されている。申請者は、現在 80 名以上の CML 患者診療に従事しているが、大多数の患者は TKI 治療が中止ができないため、内服に伴う様々な困難に日々直面しており、その現状を日々の診療で目の当たりにしている。このような状況において、

『BCR-ABL シグナルに依存する CML 細胞が、なぜ TKI 治療後も大多数の患者で少量残存し、治癒が不可能とされているのか?』 という問いを重ねてきた。

2. 研究の目的

このような状況において、本研究の目的はこの学術的問いへの解を求め、TKI 治療後も残存しているごく少量の CML 細胞における特異的な RNA 発現プロファイルを明らかにすることで、治療抵抗性の CML 細胞を標的とした治療戦略の構築に必要な知見を得ることである。具体的に

は、1細胞ごとにcDNAを調製した上で、*BCR-ABL*陽性のcDNAをスクリーニングすることで、膨大な非CML細胞から、TKI抵抗性のCML細胞由来のcDNAの取得を計画した。CML細胞の1細胞解析はこれまでに行われてきたが（Giustacchini A, et al. *Nat Med* 2017; Warfvinge R, et al. *Blood* 2017）、いずれもTKI治療前に、*BCR-ABL*陽性と陰性の細胞集団を解析したものであり、TKI治療後に残存するTKI抵抗性のCML細胞の転写プロファイルを1細胞レベルで解析した報告はない。さらに、類似の研究手法による解析はこれまでに報告がないことなどから、本研究の独自性は極めて高いと言える。本研究により、CML細胞の真のTKI抵抗性の解明に繋がる知見が得られることから、その科学的創造性は極めて高いと言える。またCML細胞の根絶を可能にする治療薬開発に直結する知見が得られることから、医学面や産業面の創造性も非常に高いと言える。

さらに、本邦においては毎年1,000人程度が新たにCMLと診断されるが、TKI登場以降はCMLによって患者の予後が規定されなくなったため、CML患者総数は増加する一方であることから、TKI治療の長期化に伴うこれらの問題は今後さらに顕在化し、深刻化すると考えられる。このため、TKIとは異なる分子を標的とした新規薬剤による残存CML細胞の根絶は、社会的、経済的な問題を含むこれらを全て解決するのみならず、日々の副作用に苦しむ多くのCML患者への福音となる。

3. 研究の方法

本研究では、TKI治療抵抗性CML細胞の転写プロファイリングに基づき、TKI抵抗性獲得の分子基盤を解明するとともに、治療標的としての可能性を示す

(1) TKI治療抵抗性CML細胞の転写プロファイルの解明

TKI治療が奏功した患者の骨髄からCD34陽性造血幹細胞を含む細胞集団をセルソーターで96ウェルプレートに1細胞ごとに分取した上で、RT-RamDA法を用いてcDNA合成を行う。各ウェルのcDNAの一部をプールしたcDNAを鋳型に、定量PCRを行い、*BCR-ABL*陽性のcDNAを含むプールをスクリーニングする。同定したプールを構成するウェルを様にスクリーニングし、*BCR::ABL*陽性の1細胞由来のcDNAを取得する。得られたcDNAを、次世代シーケンサーによりRNA-seq解析し、コントロールの同一プレート由来の*BCR-ABL*陰性の解析結果と比較して、*BCR-ABL*陽性でTKI抵抗性の造血幹細胞に特異的な転写プロファイルを明らかにする。

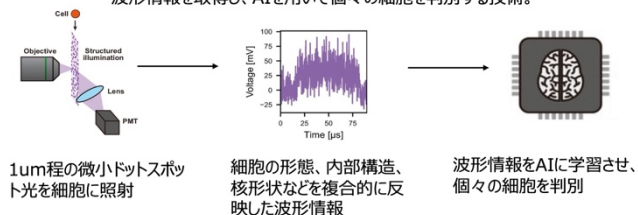
(2) 治療抵抗性獲得の分子基盤の解明

TKI抵抗性の造血幹細胞に特異的な転写プロファイルから推測された、抵抗性獲得に関与すると考えられる遺伝子をレトロウイルスベクターに組み込み、*BCR::ABL*陽性のK562細胞株などに導入し、細胞株を樹立する。これらの細胞株にTKIを作用させて、TKI抵抗性が獲得されていることを明らかにすることで、TKI抵抗性を獲得する分子基盤を明らかにする手法を採用した。

しかし、RT-RamDA法を用いて細胞の分取を試み、細胞株を用いた実験では100細胞までの分取に成功するも、実際のCML患者細胞で試みたところ、分取した細胞のViabilityが低下しており、その後のシングルセル解析が困難であった。申請者グループにおける研究で、急性巨核芽球性白血病細胞株であるUT-7EPO細胞と、UT-7EPO細胞に*BCR::ABL*を遺伝子導入した細胞を電子顕微鏡用いて撮影し、画像を比較した結果、細胞内のミトコンドリアが*BCR::ABL*陽性細胞では、遺伝子導入前の細胞と比較し断片化しているという知見が得られた。さらには、TKI治療前のCML患者と健常者の末梢白血球の比較においても同様のミトコンドリアの断片化がみられたことから、表面抗原ではなく細胞内の微小構造変化を、ノンラベルで検出可能なゴーストサイトメトリー（Ghost Cytometry: GC）によりTKI治療抵抗性の細胞を同定するという方法を選択した。

ゴーストサイトメトリー(Ghost Cytometry; GC)

多数の微小ドットスポット光(Structured illumination)を細胞に照射することにより、精密な細胞情報を含む波形情報を取得し、AIを用いて個々の細胞を判別する技術。



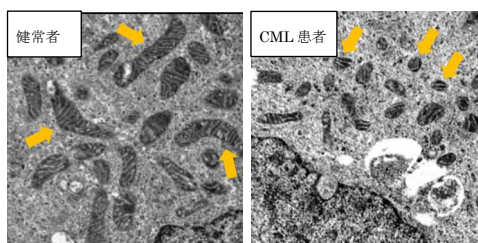
GC技術はレーザー光を特殊な格子により1 μm程度の微小ドットスポットに分光し、細胞の形態や内部構造、核の形状を反映した波形情報を収集する。そして、特殊な構造照明と機械学習

(artificial intelligence: AI) を組み合わせることで、細胞内の微細な構造変化を捉え、表面抗原を用いた鑑別では検出できなかった様々な細胞を高速で判別可能な技術であり、得られた波形情報を人工知能(Artificial Intelligence: AI)の学習機能を用いて細胞内の微小構造変化を検証可能である①。

この手法をもちいて、患者骨髄細胞より CD34 陽性/CD38 陰性細胞を分取し、10X 法によりシングルセル化。その後 cDNA を合成し、BCR::ABL 陽性細胞を確認後に陽性ウエルの細胞の cDNA でシングルセル解析を計画した。

4. 研究成果

本研究においては、当初の RT-RamDA 法による BCR::ABL 陽性細胞の検出は、細胞株を用いた検証では 100 細胞程度までの濃縮が可能であったが、実際の CML 患者細胞を用いた場合に細胞の viability の低下のため濃縮が困難であった。その理由としては、一度保存し解凍した CML 患者骨髄細胞の脆弱性にあると考えられた。しかし、その後の研究の進捗において UT-7/EPO 細胞と



UT-7/EPO 細胞に BCR::ABL を遺伝子導入した細胞の電子顕微鏡画像を比較した結果、BCR::ABL 陽性細胞においてはミトコンドリアが顕著に断片化している事が明らかとなった。また、実際の TKI 治療前の CML 患者と健常者の白血球との比較においても同様の結果が得ら

図 1

れ(図 1)、さらにはこの細胞内微小構造物であるミトコンドリア断片化情報による、GC は CML 患者細胞および健常者の細胞を鑑別していると考えられた。

また、ミトコンドリアの断片化は、BCR::ABL 下流の MAPK パスウェイを通してミトコンドリア切断酵素として一般的な dynamin-related protein (DRP)1 の serine 616 (s616) のリン酸化を通して生じている事が明らかとなる一方で、ミトコンドリア融合に関与する Mfn1/2 や OPA1 などは発現に変化が認められなかった(図 2)。ここで、MAPK pathway における MEK を薬

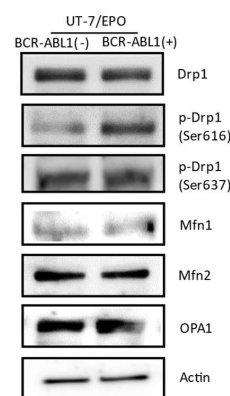


図 2

剤により阻害すると DRP のリン酸化も抑制され、さらにはミトコンドリアも断片化も抑制する事を明らかにした。

同じ UT-7/EPO 細胞において、BCR::ABL を遺伝子導入することによりミトコンドリアの断片化が生じており、これらの細胞内微小構造変化を基に GC は BCR::ABL 陽性細胞を鑑別し、さらにはソーティングも可能である事から、TKI 治療抵抗性であると考えられている白血病幹細胞(Leukemic stem cell : LSC) においても同様の変化が生じ、GC を用いる事で抽出が可能である

との仮説をもとに、CML 患者骨髄細胞において LSC が含まれると考えられる CD34 陽性/CD38 陰

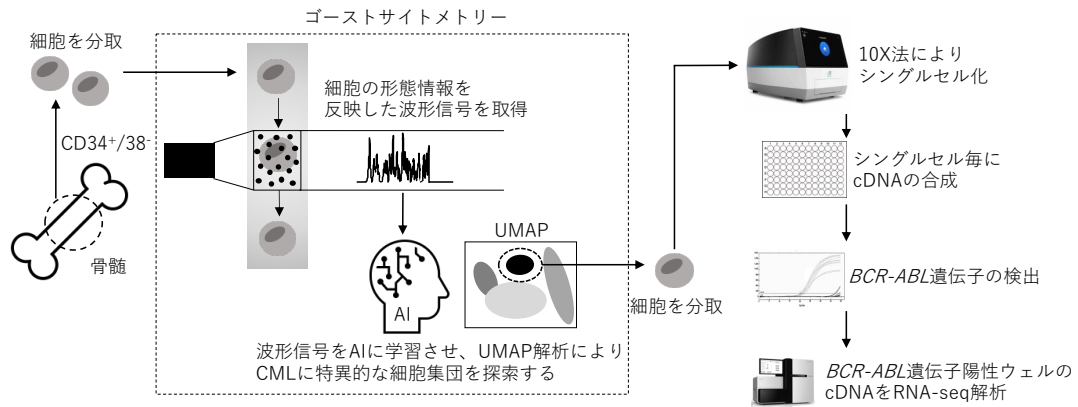


図 3

性細胞をソーティングし、GCにより解析・ソーティングを行い、10X法により濃縮した上でシングルセル解析を行う方針とした。(図3)最初のCML患者骨髄検体で上記の解析を行うも、再度細胞のviabilityの低下を認めた事から、検体採取時の保存方法を含めた条件検討を行い、2例目のCML患者骨髄検体からcDNAを合成し、シングルセル解析の結果を待っている状況である。今後は、3検体までシングルセル解析を行い、結果により解析症例数の追加を含めた検討を行う予定である。

引用文献

- ① Ugawa M, Kawamura Y, Toda K, et al. In silico-labeled ghost cytometry. *Elife*. 2021;10.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Suzuki Kohjin, Watanabe Naoki, Torii Satoru, Arakawa Satoko, Ochi Kiyosumi, Tsuchiya Shun, Yamada Kazuhiro, Kawamura Yoko, Ota Sadao, Komatsu Norio, Shimizu Shigeomi, Ando Miki, Takaku Tomoiku	4. 巻 -
2. 論文標題 Artificial Intelligence Enables the Label-Free Identification of Chronic Myeloid Leukemia Cells with Mitochondrial Morphological Alterations	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	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） 10.1101/2023.07.26.550632	査読の有無 無
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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高久智生
2. 発表標題 CML細胞における細胞内小器官の機能および形態分析
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木行人
2. 発表標題 AIを搭載したゴーストサイトメトリーによる末梢血CML細胞の鑑別
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木行人
2. 発表標題 ゴーストサイトメトリーを用いた非標識白血病細胞の判別性能の検証と、その形態・機能解析
3. 学会等名 第32回日本サイトメトリー学会
4. 発表年 2022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	荒木 真理人 (Araki Marito) (80613843)	順天堂大学・大学院医学研究科・客員教授 (32620)	

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