

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16261

研究課題名（和文）急性骨髄性白血病において非腫瘍細胞が果たす役割の解明

研究課題名（英文）The analysis of non-leukemic cells in acute myeloid leukemia.

研究代表者

坂本 竜弘（Tatsuhiko, Sakamoto）

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：60815398

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）：本研究により、急性骨髄性白血病患者の治療前、治療開始後早期、治療開始後後期、寛解期、再発時における末梢血単核球検体を分離し、採取・保存を行い、それら急性骨髄性白血病患者の各種臨床情報と検体を対応させるシステムを構築した。単一細胞レベルにおける遺伝子発現解析を実施した。予想に反して治療の効果に関わらず治療開始後早期における白血病細胞集団の細胞数の変化については治療反応性による有意差はなく、治療開始後ごく早期の白血病細胞減少は治療効果予測には繋がらない可能性があると考えられた。また、白血病細胞以外の細胞において、治療開始後早期に一部のリンパ球集団が増加しており、治療に伴う変化の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性骨髄性白血病は予後不良な疾患であり、治療効果の予測及び治療による有害事象の回避が重要である。本研究では通常用いられる骨髄を用いた場合に比較して、患者の侵襲を低減させ、頻回の検査を行うことが可能と考え、末梢血検体を用いて治療効果を予測することを目標とした。治療前及び治療開始早期に遺伝子発現・細胞集団の変化について解析を行い、治療早期にリンパ球の一部において増加する集団を同定した。この変化が治療反応性を予想するかどうかに関して、さらなる解析を行い、患者に侵襲が少ない方法で早期に治療効果を予測する検査方法を確立する基礎となる知見となると考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we collected and stored peripheral blood mononuclear cell samples from patients with acute myeloid leukemia before, early after, and late after the start of treatment, and established a system to correlate these samples with various clinical information on patients with acute myeloid leukemia. Next, gene expression analysis at the single cell level was performed. Contrary to expectations, there were no significant differences in changes in the cell counts of the leukemic cell population early after the start of treatment, regardless of the treatment effect. In addition, a portion of the lymphocyte population of non-leukemic cells increased early after treatment initiation, suggesting the possibility of treatment-related changes.

研究分野：血液内科学

キーワード：急性骨髄性白血病 非腫瘍細胞 治療反応性 血液内科学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

血液悪性腫瘍の1つである急性骨髄性白血病 (AML)は化学療法及び造血幹細胞移植の進歩によっても未だ予後不良で、半数程度の患者が長期生存できない。現在の強力化学療法は腫瘍細胞を標的として殺細胞的な効果を示すことにより、腫瘍細胞の根絶を目指すという戦略に基づいている。従って治癒を目指すための強力化学療法は非常に強力となり、臓器機能障害のある患者及び高齢の患者においては治癒を目指す化学療法は不可能である。高齢化社会である現在の世界ではこのような患者層に対する治療開発が急務であると考えられ、新たな治療戦略が必要となっている。

治療戦略の一つは非血液細胞で構成される骨髄微小環境を標的とするもので、もう一つは非腫瘍細胞である血液細胞を標的としたものである。

骨髄において非血液細胞が構成する骨髄微小環境は、造血幹細胞及び血液細胞の分化・成熟に重要な役割を果たしている(Morrison SJ. Nature. 2014)。研究開始時には白血病モデルマウスを用いた骨髄微小環境の解析により、白血病を発症したマウスの骨髄微小環境は正常と比べて構成細胞及び遺伝子発現が変化し、骨髄微小環境を白血病細胞が自らの生存・増殖に有利なものに変化させることが複数の研究から明らかとなっており、この改変された微小環境は白血病微小環境と呼ばれていた。

白血病微小環境の研究において白血病モデルマウスでは単一細胞レベルの研究が行われ全容が解明されつつあった (Baryawno N. Cell 2019.) もの、ヒトにおいて白血病微小環境の全容は解明されておらず、従って AML 患者検体を用いて白血病微小環境の全容及び AML の発症・進展のメカニズムを解明することは AML に対する治療開発を進展させるための重要な知見であると考えていた。

### 2. 研究の目的

本研究ではAML患者から採取した骨髄・末梢血検体を単一細胞におけるRNA-seqを用いて遺伝子発現を詳細に解析し、AMLにおいて非腫瘍細胞が病態の進行・治療反応性に果たす役割を解析し、治療標的細胞・分子を検証することで非腫瘍細胞を標的とした新規治療の開発の端緒となることを目指すことが目的であった。

### 3. 研究の方法

AMLにおける非腫瘍細胞の役割を解明するため、AML患者より同意を得て骨髄検体・末梢血検体を採取・保存し、臨床情報とともにデータベース化した。

AML患者より採取した検体を用いて、セルソーターを用いて7-AAD陰性、GPA陰性の赤血球以外の生細胞を分取し、chromiumシステム (10X genomics) により単一細胞RNA-seq ライブラリを作製した。その後次世代シーケンサを用い配列情報を得て解析を行った。解析には東京大学医科学研究所のスーパーコンピュータであるShirokaneを用いる。一次解析はCell Ranger, 二次解析はSeuratパイプラインを用いて行った。

## 4 . 研究成果

### 1 ) AML 患者検体収集のためのデータベース構築

AML 及びその他骨髄系悪性疾患の患者より同意を得て、様々な時系列（初発時、治療後早期、治療後晩期、寛解期、再発時）において経時的に骨髄検体・末梢血検体を採取・保存し、臨床情報とともにデータベース化を行うことで、本研究のみならず将来の研究においても利用可能となるデータベースを構築した。このデータベースに基づいて、その一部を抽出し得た知見を日本血液学会で発表しており（樽井、日本血液学会学術集会 2023 年）、今後も本データベースを更新・活用し、更なる研究に活用する予定である。

### 2 ) AML 患者における末梢血中腫瘍細胞・非腫瘍細胞の変化

研究計画当初においては、骨髄における白血病微小環境を解析することにより、白血病微小環境を標的とした治療開発の端緒となる知見を得ることが目的であった。

しかしながら、研究開始当初より COVID-19 パンデミックによる医療体制の変化、臨床研究体制の構築への影響から、実際の研究開始において遅延が生じた。また疾患の特性上強い免疫不全を呈することが不可避な AML 患者では、通常の感染症のみならず COVID-19 感染症を併発することも多く、そのような症例においては同意採取・検体の収集自体が困難であった。そのため、患者への侵襲が少なく、頻回採取が容易な末梢血を採取し、末梢血検体を用いて研究を開始することに変更した。

骨髄検体と比較して末梢血検体を用いた場合に、有利な点として治療前、治療開始後早期、治療中など、通常骨髄検査による治療効果判定を行わない時期であっても、通常診療において末梢血を用いた臨床検査が行われるため、その残余検体を用いて解析が可能な点にある。

その利点を最大限活用するためには、AML 患者に対する治療反応性を治療早期の検体を用いて予測することができれば、個別化治療のような患者に合わせた適切な治療選択が可能となり、結果として不要な治療による有害事象の低減、最適な治療方針選択による治療成績の向上のための基礎となる知見が得られると考えた。

上記の目的のため、AML 患者より治療前・治療後早期における末梢血検体を採取し、細胞を保存した。またそれらの患者について治療反応性を診療情報より抽出し、単一細胞レベルの遺伝子発現解析と合わせて治療奏効例 3 例、治療無効例 3 例において解析を行った。その結果、治療奏効例において治療前検体における白血病細胞の割合が少なかった（次ページ図）。先行研究においては治療開始後、腫瘍細胞の早期減少・消失が治療反応性と関連しているとの報告があった（Short NJ, et al. Am J Hematol. 2016.）が、本研究においては白血病細胞に分類される細胞集団の割合は治療開始前と治療開始後で明らかな減少は同定されず（次ページ図）、治療反応性との関連も同定されなかった。今後の研究において白血病細胞における詳細な遺伝子発現解析を行い、治療前後で治療反応性と関連する変化が同定されるかについて更なる解析を行う予定である。

非腫瘍細胞を解析したところ、NK 細胞に分類される細胞分画が治療開始後早期で増加していた（次ページ図）。しかし、本研究においては治療反応性によらず NK 細胞が増加しており、治療反応性の予測因子とは言えない結果であった。AML 治療開始後早期における普遍的な変化である所見の可能性も考えられるが、単一細胞レベルや集団内で遺伝子発現変化が起こっている可能性は十分あると考えられ、例数を増やした解析・更なる詳細な解析を行う必要があると考えており、現在更なる解析を計画中である。

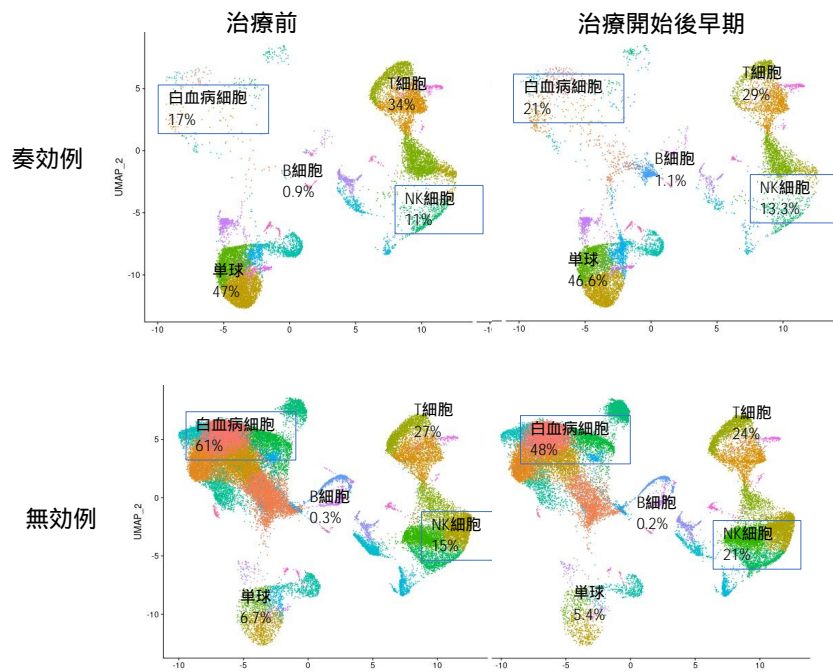


図. AML患者における治療前・治療開始後早期の単一細胞レベル遺伝子発現解析によって分類される細胞集団の変化と治療奏効性

また、本研究において、DNA 検体を用いたゲノム解析も合わせて行う予定となっており、今後合わせて統合的な解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kamura Yuya, Sakamoto Tatsuhiro, Yokoyama Yasuhisa, Nishikii Hidekazu, Sakata-Yanagimoto Mamiko, Chiba Shigeru, Obara Naoshi	4. 巻 116
2. 論文標題 Hemolysis induced by SARS-CoV-2 mRNA vaccination in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 55 ~ 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-022-03387-9	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 -

1. 著者名 Tsuboi Yuri, Iimura Yumoe, Matsumura Fumiaki, Nanmoku Toru, Suma Sakurako, Matsuoka Ryota, . . . . Sato Kimi, Maruyama Yumiko, Sakamoto Tatsuhiro, Yokoyama Yasuhisa, Kato Takayasu, Kurita Naoki, Nishikii Hidekazu, Obara Naoshi, Ieda Masaki, Chiba Shigeru, Sakata-Yanagimoto Mamiko	4. 巻 62
2. 論文標題 Cardiac Tamponade as a Recurrence of Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma with the Detection of a p.Gly17Val RHOA Mutation in the Pericardial Effusion	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 595 ~ 600
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.9248-22	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 -

1. 著者名 栗田 尚樹、坪井 宥璃、小原 直、錦井 秀和、坂田（柳元） 麻実子、千葉 滋、加藤 貴康、南木 融、丸山 ゆみ子、末原 泰人、服部 圭一朗、坂本 竜弘、横山 泰久、吉田 近思	4. 巻 63
2. 論文標題 NUP98::DDX10融合遺伝子を有した急性骨髄性白血病	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 1397 ~ 1401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.63.1397	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 -

1. 著者名 法岡 菜月、高橋 華、中馬越 清隆、石井 亜紀子、松岡 亮太、南木 融、玉岡 晃、千葉 滋、栗田 尚樹、加村 雄哉、坂本 竜弘、加藤 貴康、横山 泰久、錦井 秀和、小原 直、坂田（柳元） 麻実子	4. 巻 64
2. 論文標題 神経浸潤による末梢神経障害を合併した原発性マクログロブリン血症	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 18 ~ 22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.64.18	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 -

1. 著者名 清水 百萌、服部 圭一朗、丸山 ゆみ子、南谷 泰仁、小川 誠司、坂田(柳元) 麻実子、千葉 滋、小原直、錦井 秀和、飯塚 正、松岡 亮太、栗田 尚樹、坂本 竜弘、横山 泰久、加藤 貴康、末原 泰人	4. 巻 64
2. 論文標題 免疫抑制療法後に<i>ASXL1</i>変異クローンで造血が回復した重症再生不良性貧血	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 49 ~ 53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.64.49	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 -

1. 著者名 Kiyoki Yusuke, Kato Takayasu, Kito Sakura, Matsuzaka Takashi, Morioka Shin, Sasaki Junko, Makishima Kenichi, Sakamoto Tatsuhiro, Nishikii Hidekazu, Obara Naoshi, Sakata-Yanagimoto Mamiko, Sasaki Takehiko, Shimano Hitoshi, Chiba Shigeru	4. 巻 37
2. 論文標題 The fatty acid elongase Elovl6 is crucial for hematopoietic stem cell engraftment and leukemia propagation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 910 ~ 913
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-023-01842-y	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 -

1. 著者名 Abe Yoshiaki, Sakata-Yanagimoto Mamiko, Fujisawa Manabu, Miyoshi Hiroaki, Suehara Yasuhito, Hattori Keiichiro, Kusakabe Manabu, Sakamoto Tatsuhiro, Nishikii Hidekazu, Nguyen Tran B., Owada Yohei, Chiba Shigeru	4. 巻 24
2. 論文標題 A single-cell atlas of non-haematopoietic cells in human lymph nodes and lymphoma reveals a landscape of stromal remodelling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 565 ~ 578
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41556-022-00866-3	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 Suma Sakurako, Yokoyama Yasuhisa, Momose Haruka, Makishima Kenichi, Kiyoki Yusuke, Sakamoto Tatsuhiro, Kusakabe Manabu, Kato Takayasu, Kurita Naoki, Nishikii Hidekazu, Sakata-Yanagimoto Mamiko, Obara Naoshi, Hasegawa Yuichi, Chiba Shigeru	4. 巻 -
2. 論文標題 Salvage Cord Blood Transplantation Using a Short-term Reduced-intensity Conditioning Regimen for Graft Failure	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Internal Medicine	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) 10.2169/internalmedicine.7836-21	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 Nguyen Yen T. M., Fujisawa Manabu, Nguyen Tran B., Suehara Yasuhito, Sakamoto Tatsuhiro, Matsuoka Ryota, Abe Yoshiaki, Fukumoto Kota, Hattori Keiichiro, Noguchi Masayuki, Matsubara Daisuke, Chiba Shigeru, Sakata Yanagimoto Mamiko	4. 巻 112
2. 論文標題 Tet2 deficiency in immune cells exacerbates tumor progression by increasing angiogenesis in a lung cancer model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4931 ~ 4943
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15165	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 Kurita Naoki, Sakamoto Tatsuhiro, Kato Takayasu, Kusakabe Manabu, Yokoyama Yasuhisa, Nishikii Hidekazu, Sakata-Yanagimoto Mamiko, Obara Naoshi, Hasegawa Yuichi, Chiba Shigeru	4. 巻 100
2. 論文標題 Early administration of cyclosporine may reduce the incidence of cytokine release syndrome after HLA-haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation with post-transplant cyclophosphamide	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	6. 最初と最後の頁 1295 ~ 1301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00277-021-04439-6	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Yutaro Tarui, Tatsuhiro Sakamoto, Naoki Kurita, Yumiko Maruyama, Hidekazu Nishikii, Yuya Sasaki, Yasuhito Suehara, Keiichiro Hattori, Takayasu Kato, Yasuhisa Yokoyama, Mamiko SakataYanagimoto, Shigeru Chiba, Yasuhito Nannya, Naoshi Obara
2. 発表標題 TP53変異骨髄異形成症候群の転帰: 単一施設での経験
3. 学会等名 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2023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
---------	---------