

令和 6 年 4 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16310

研究課題名（和文）単一細胞での遺伝子・細胞内蛋白質同時計測による急性骨髄性白血病の病態解明

研究課題名（英文）Simultaneous single cell analysis of intracellular proteins and gene expressions in Acute myeloid leukemia

研究代表者

村上 紘一（Murakami, Koichi）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：60846088

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）：本研究では、ヒト末梢血・骨髄サンプルを用いて、遺伝子発現および細胞表面蛋白質発現に加えて、リン酸化蛋白質を含む細胞内蛋白質を単一細胞レベルで同時解析する新規シングルセル解析手法を開発した。この手法を初発急性骨髄性白血病患者のサンプルに適用し、健常人の正常骨髄サンプルと比較することで、正常骨髄細胞と比較して腫瘍の骨髄細胞やその周囲の免疫細胞において発現が上昇している細胞内蛋白質を同定した。今後は、急性骨髄性白血病マウスモデルを用いて、細胞内蛋白質の発現変化とそれに伴う細胞機能や腫瘍微小環境の変化のメカニズムを明らかにしていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した新規のシングルセル解析手法は、ヒト検体にも適用可能であり、今回解析対象とした急性骨髄性白血病以外の癌種や感染症、自己免疫疾患など多くの疾患研究に広く応用可能な手法である。また、本手法で見出された急性骨髄性白血病検体における単一細胞レベルでの細胞内蛋白質発現量の変化は、遺伝子発現および細胞表面蛋白質発現と同時に単一細胞レベルで解析したことで初めて明らかになったものであり、今後さらに研究を進めることで、この変化が及ぼす腫瘍進展への影響やその発生機序を明らかにすることで新たな治療標的候補を見出すことが期待出来る。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a novel method for simultaneous analysis of intracellular proteins including phosphorylated proteins at single-cell level in addition to gene expression and cell surface proteins using human peripheral blood and bone marrow samples. By applying this method to the samples from patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia (AML) and comparing them with normal bone marrow samples from healthy donors, we identified intracellular proteins that are upregulated in myeloid cells and surrounding immune cells in the tumor compared to normal bone marrow cells. In the future, we will clarify the mechanism of intracellular protein expression changes and the resulting changes in cellular functions and tumor microenvironment using AML mouse models.

研究分野：血液内科学

キーワード：急性骨髄性白血病 シングルセル解析 遺伝子発現解析 蛋白質発現解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病(AML)は予後不良な造血器腫瘍である。若年者では強力化学療法により60%程度は寛解に入るが、30~40%は再発してしまう。近年、新規治療薬の開発により治療成績が改善しているが、強力化学療法の適応とならない患者の寛解率は4割に満たない。

AMLは造血幹細胞に遺伝子変異が起こることで発症し、分化障害と幼な骨髄芽球の増殖が特徴である。白血病細胞は未分化な白血病幹細胞や骨髄系細胞への分化傾向を示す芽球から構成される。この腫瘍内不均一性は治療抵抗性に寄与しており(Kreso and Dick, *Cell Stem Cell* 2014; Pollyea and Jordan, *Blood* 2017) AML細胞の不均一性を評価することは、AMLの病態解明と、それに基づく新たな治療法開発のために重要な課題である。

近年、シングルセル解析により、AMLは複数の腫瘍クローンで構成され、それぞれ遺伝子変異パターンが異なることや、変異と関連して表面マーカーや遺伝子発現が異なることなど、遺伝子変異と遺伝子発現の関係を中心に腫瘍内不均一性が詳細に解明されつつある(Miles, *Nature* 2020; Morita, *Nat Commun* 2020)。

しかし、例えば治療抵抗性については、特定の遺伝子変異を有する薬剤耐性クローンが選択されて拡大するだけでなく、遺伝子変異の違いによらない代謝リプログラミングや遺伝子発現変化によっても生じることが明らかになっており、AMLの生存戦略を明らかにするには遺伝子変異と遺伝子発現の関係を評価するだけでは不十分である(Joshi, *Cancer Cell* 2021; Duy, *Cancer Discov* 2021)。従来、細胞の多様性は表面蛋白質発現に基づいてフローサイトメトリーで集団の分離が試みられてきたが、AMLの白血病細胞は遺伝子変異に伴って異常な表面マーカーのパターンを呈するため、表面マーカーのみから腫瘍細胞を正確に分類することは出来ない(Levine, *Cell* 2015; Morita, *Nat Commun* 2020)。Mass cytometry解析でAMLの表面マーカーが細胞内の状態を正確に反映せず、細胞内リン酸化蛋白質の発現量を元に推定されるシグナル伝達経路の活性化プロファイルがAML細胞の成熟度をより正確に反映するという報告もある(Levine, *Cell* 2015)。また、ヒト造血幹細胞では静止期と活性化状態の間に遺伝子発現パターンの大きな変化はないが、エピゲノム(オープンクロマチン領域)のダイナミックな変化が起こることが示されており、AMLにおいてもエピゲノムが遺伝子発現に先行して変化する可能性がある(Takayama, *Cell Stem Cell* 2021)。AML細胞の不均一性をより正確に評価するには、これまで解析されてきた遺伝子変異と遺伝子発現の関係に加えて、細胞内リン酸化蛋白質、表面マーカーやクロマチン状態など複数モダリティーのデータと遺伝子発現の関係を単一細胞レベルで評価する技術の開発が望まれる。

2. 研究の目的

申請者はこれまで、造血系の多様性に着目し、多様な血球細胞を生み出す造血幹細胞の維持機構や、造血幹細胞から多様な成熟細胞が生み出される細胞分化運命決定機構を研究してきた。今回は造血器腫瘍の腫瘍細胞の多様性に着目し、AMLの腫瘍内不均一性をより正確に評価するために、以下の項目を実施する。

(1) 末梢血及び骨髄検体を用いた単一細胞における遺伝子発現と細胞内リン酸化蛋白質の同時計測技術の開発

(2) ヒト造血幹細胞およびAML患者検体への新規解析技術の応用

(3) 新規技術のデータと他の複数モダリティーのデータの統合解析

本研究では、AML細胞の生存・増殖に重要な細胞内シグナル伝達経路の活性化状態の不均一性およびそれに伴う遺伝子発現変化などの関係を単一細胞レベルで評価することを目指す。

現在、単一細胞レベルで遺伝子発現と細胞内リン酸化蛋白質の関係性を評価する技術はなく、その点に最大の独自性がある。申請者のグループは、単一細胞レベルで遺伝子発現と表面マーカー(CITE-seq)など複数モダリティーのデータを統合する単一細胞マルチオミクス解析技術を確立し、悪性リンパ腫患者検体に適応することで、腫瘍細胞や免疫微小環境の特徴を明らかにしてきた(Koya, *Blood Cancer Discov* 2021)。これまでに確立したシングルセル解析技術をAML患者検体に応用し、そのデータと新規技術から得られるデータを統合することで、データの網羅性を高める。

本研究で開発する単一細胞解析技術は、がん研究のみでなく、感染症・自己免疫疾患など多様な分野に幅広く応用可能であり、また本研究から得られる成果は、新たなAML治療戦略開発の基盤となるデータを見出すことが期待される。

3. 研究の方法

(1) 末梢血及び骨髄検体を用いた単一細胞における遺伝子発現と細胞内リン酸化蛋白質の同時計測技術の開発

細胞の固定・膜透過処理方法を至適化することで、ヒト検体において細胞内リン酸化蛋白質が検出可能なシングルセルRNA-seq手法を確立する。さらに、AMLの病態に重要なシグナル伝達経路の活性を評価するために必要な抗体パネルを作成する。蛍光標識抗体による細胞内染色を行ってフローサイトメトリーで検出可能性を評価して抗体を選定し、これらの抗体に対してオリゴヌクレオチドタグ付加を行うことで抗体パネルを作成する。

検出系の妥当性の検討として、健常者末梢血及び骨髄検体に上記の手法を適用し、多様な細胞種で構成されるサンプルのデータ解析アルゴリズムを独自に検討し、末梢血中の成熟細胞と骨髄中の幼若細胞の細胞内リン酸化蛋白質のばらつきを評価する。サイトカイン刺激によってシグナル伝達経路の活性化を誘導し、このシングルセル解析手法で細胞内リン酸化蛋白質発現量の変化が検出できることを確認する。

(2) ヒト造血幹細胞および AML 患者検体への新規解析技術の応用

(1)で開発した新規技術を AML 患者検体に応用する。(1)で作成した抗体パネルを用いて複数のリン酸化蛋白質を解析し、それらの分布の違いを評価することで、サンプル内における細胞内シグナル伝達経路活性化状態の不均一性を検討する。また、健常者のヒト造血幹細胞を含む骨髄検体でも同様の解析を行い、造血幹細胞特異的なシグナル伝達パターンを明らかにする。

さらに、正常細胞と AML 細胞を比較することで、AML 細胞に特徴的なシグナル伝達パターンを示す分画を同定する。

(3) 新規技術のデータと他の複数モダリティのデータの統合解析

遺伝子発現および細胞表面蛋白質発現量のデータを用いることで、腫瘍検体中に含まれる免疫細胞や AML 幹細胞に特徴的な遺伝子発現プロファイルや細胞表面マーカー発現パターンを示す集団を同定する。さらに、(2)で取得した細胞内蛋白質発現量のデータと統合することで、正常骨髄と AML 検体の免疫細胞における細胞内蛋白質の発現量の違いを検討する。また、正常造血幹細胞と AML 幹細胞の細胞内蛋白質発現量を比較し、AML 幹細胞が特異的に依存する生存・増殖シグナル伝達経路を評価する。

以上の項目を遂行することで、AML における腫瘍細胞の不均一性をより詳細に評価することを目指す。

4. 研究成果

本研究では、まずヒト検体を用いて単一細胞レベルで同一細胞から遺伝子発現、細胞表面蛋白質発現および細胞内蛋白質発現データを同時計測するシングルセル解析手法を確立し、ヒト末梢血単核球を用いた検証によってその妥当性を確認した。

その後、確立した独自のシングルセル解析手法を用いて初発急性骨髄性白血病の患者検体を解析した。解析対象としては、急性骨髄性白血病の骨髄検体を 50 検体収集し、それらについて遺伝子変異解析を行い、AML における主要なドライバー遺伝子異常を有する検体を中心にシングルセル解析に用いる対象検体を選別した。最終的に、健常ドナーから取得された正常コントロール 2 検体と急性骨髄性白血病 6 検体の合計 8 検体を解析した。

ヒト末梢血単核球での検討結果と一致して、患者検体からも遺伝子発現および細胞表面蛋白質のデータを高精度に取得することに成功した。また、細胞内蛋白質についても、正常コントロール検体と比較して AML 検体でリン酸化蛋白質発現量には大きな変化が見られなかったが、抗体パネルに加えていたアポトーシス関連蛋白質の発現亢進を複数検体において検出することに成功した。遺伝子発現および細胞表面蛋白質のデータから細胞種ごとに分類し、各細胞種における細胞内蛋白質の発現を評価した結果、骨髄系細胞だけでなく、周囲の免疫細胞でも遺伝子発現量の変化によらず、細胞内蛋白質の発現が正常コントロール検体と腫瘍検体で亢進することが見出された。この細胞内蛋白質発現量の差は細胞内染色法を用いてフローサイトメトリーでも確認を行った。

今後、シングルセルデータの解析を進め、細胞内蛋白質発現量の違いに伴ってどういった細胞内機能の違いが生じているか、遺伝子発現データの検討を進めるのに加えて、本研究で見出された腫瘍検体における細胞内蛋白質発現亢進が腫瘍周囲の免疫細胞に対してどういった変化を起しているか、マウス急性骨髄性白血病モデルを用いて検討していく方針である。

本研究で開発した新規のシングルセル解析手法は、ヒト検体にも適用可能であり、今回解析対象とした急性骨髄性白血病以外の癌種や感染症、自己免疫疾患など多くの疾患研究に広く応用可能な手法である。また、本手法で見出された急性骨髄性白血病検体における単一細胞レベルの細胞内蛋白質発現量の変化は、遺伝子発現および細胞表面蛋白質発現と同時に単一細胞レベルで解析したことで初めて明らかになったものであり、今後さらに研究を進め、この変化が及ぼす腫瘍進展への影響やその発生機序を明らかにすることで、新たな治療標的候補を見出すことが期待出来る。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------