

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24659457

研究課題名（和文）単一細胞の網羅的な遺伝学的・生物学的解析による難治性白血病の病態解明

研究課題名（英文）Pathophysiological elucidation of refractory leukemias with the genetic analyses at the single-cell level

研究代表者

黒川 峰夫（KUROKAWA MINEO）

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：80312320

研究成果の概要（和文）：

本研究では、t(3;21)染色体転座を有する慢性骨髄性白血病患者細胞を用いて、単細胞レベルでの遺伝子発現解析システムを用いてさまざまな細胞分画におけるキメラ遺伝子の発現を解析した。その結果、白血病細胞の中でも幼若で治療抵抗性の原因にもなるとされる CD34 陽性 CD38 陰性 CD90 陽性の分画で、単細胞レベルで BCR-ABL キメラ遺伝子の発現が他の分画に比べて低い傾向にあることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we assessed the variations of BCR-ABL expression at the single-cell level, with the use of patient samples from a t(3;21) positive chronic myeloid leukemia patient and a single-cell gene expression analyzer. We assessed several cell populations of patient samples, isolated via surface antigen profiles. In the result, we found that the expression level of BCR-ABL in CD34+/ CD38-/CD90+ leukemic cells was likely to be lower than those in other fractions at the single-cell level.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：白血病幹細胞、BCR-ABL、clonal evolution

1. 研究開始当初の背景

白血病の治療において、高い再発率が治療成績の向上を妨げている。再発の一因として初期治療に抵抗性の白血病幹細胞が維持・増殖することが示唆されている。これまでも白血病の難治化に関する研究は多数行われてきたが、それらの多くは性質が不均一な細胞集団をまとめて解析したものであった。単一細胞レベルで白血病幹細胞における遺伝子発現を調べることにより、これまでの解析では解らなかつた白血病幹細胞の遺伝子発現プロファイルが明らかになる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、白血病幹細胞を単一細胞レベルで解析することにより、従来の手法では検出できなかった白血病幹細胞に特異的な分子生物学的異常の解明を、特に遺伝子発現に注目して行うことを目指した。白血病細胞の生存や増殖に重要なキメラ遺伝子の発現量が、白血病幹細胞といわれる、再発に大きく関わる分画で他の分画と比べてどのような挙動を示しているのか、明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、t(3;21)染色体転座を有する慢性骨髄性白血病の初発患者の骨髓液を用いて解析を行った。骨髓液中の有核細胞を血球分離溶液を用いて分離し、表面抗原 CD34, CD38, CD90 を、蛍光抗体 CD34-PE, CD38-FITC または CD33-FITC, CD90-APC で染色し、FACS AriaII (ベクトン・ディッキンソン社)を用いて、CD34+/CD38-/CD90+, CD34+/CD38-/CD90-, CD34+/CD38+, CD34-/CD33+, CD34-/CD33-の各分画に分けた上で、single-cell sort を行った。

ソートされた単一細胞から CellsDirect One-Step qRT-PCR キット (インビトロジェン社)を用いて RNA の逆転写を行い、BCR-ABL, AML1-MDS1-Evi1 (t(3;21)に伴って生じるキメラ遺伝子), β -actin の定量 PCR を施行した。定量 PCR には BioMark HD (Fluidigm 社)も使用した。また、各分画における BCR-ABL 陽性細胞の割合を、FISH 法で定量した。

4. 研究成果

FISH の結果、CD34+分画でも 90~95%の細胞が BCR-ABL 陽性であり、慢性骨髄性白血病細胞の割合の高い検体であった。しかし、CD34+/CD38-/CD90+ の分画に限定すると BCR-ABL 陽性細胞の割合は約 80%で、残存している正常造血幹/前駆細胞が一定の割合で混入していると考えられた。

一方、単一細胞発現解析の結果、BCR-ABL を発現していると考えられた細胞の割合は、CD34+/CD38+分画では 85%であったのに対し、CD34+/CD38- 分画では 70%、CD34+/CD38-/CD90+分画では 30%と、より未分化な表面抗原発現パターンの細胞ほど発現量が低い傾向にあることがわかった。FISH の結果と併せると、CD34+/CD38+分画ではほぼすべての白血病細胞が BCR-ABL を測定感度以上のレベルで発現していたのに対して、そのような細胞が CD34+/CD38-分画では約 7 割、CD34+/CD38-/CD90+分画に限定すれば約 4 割であると考えられた。

各細胞ごとの発現量を比較すると、同じ分画に属する白血病細胞であっても 10 倍以上の BCR-ABL 発現量の差があることが示唆されたが、各分画ごとに発現量の分布は正規性を保っていると考えられた。従って、最も未分化な分画の慢性骨髄性白血病細胞では、BCR-ABL キメラ遺伝子の発現が全体的に下がる傾向のあることが示唆された。

一方、BCR-ABL より後から加わった染色体異常によると思われる AML1-MDS1-Evi1 キメラ遺伝子については、CD33-/CD34-分画の細胞ではまったく発現していないことがわかった。このことから、AML1-MDS1-Evi1 が加わることによって白血病細胞に何らかの分化阻害が加わり、CD33-/CD34-のリンパ球や赤

血球などの分画には分化できなくなることが示唆された。また、最も幼若と考えられる CD34+/CD38-/CD90+分画でも AML1-MDS1-Evi1 を発現している白血病細胞は見られなかった。このことから、慢性骨髄性白血病が最も未熟な造血細胞分画で発生することと、それに白血病の進展に関わるような遺伝子異常が加わる場合には少し血球が分化した段階で異常が加わっていることが示唆された。

白血病の最も幼若な分画では白血病遺伝子の発現量が少ない可能性があることが本研究から示唆された。慢性骨髄性白血病が、BCR-ABL を標的とするチロシンキナーゼ阻害剤だけで治療できないことなども、このような幼若白血病細胞の BCR-ABL 非依存性が普遍的な事象であれば説明可能である。逆に、白血病遺伝子に依存せずに白血病細胞を維持・生存させる因子が極めて重要とも考えられる。本研究によって、白血病幹細胞といわれる分画の分子生物学的特性の一端が示され、白血病細胞を維持する微小環境などの重要性が明らかになったと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

- ① 黒川峰夫(他 15 名, 16 番目). The shortest isoform of C/EBP β , Liver inhibitory protein (LIP), collaborates with Evi1 to induce AML in a mouse BMT model. *Blood*. 121:4142-4155, 2013. 査読有
doi: 10.1182/blood-2011-07-368654
- ② 黒川峰夫(他 19 名, 5 番目). The role of HLA-matched unrelated transplantation in adult patients with Ph chromosome-negative ALL in first remission. A decision analysis. *Bone Marrow Transplantation*. in press. 査読有
doi: 10.1038/bmt.2013.4
- ③ 黒川峰夫(他 16 名, 4 番目). Impact of a donor source on adult Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia: a retrospective analysis from the Adult Acute Lymphoblastic Leukemia Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Annals of Oncology*. 24:1594-1602, 2013. 査読有
doi: 10.1093/annonc/mds655

- ④ 黒川峰夫(他 39 名, 4 番目). Clinical evaluation of WT1 mRNA expression levels in peripheral blood and bone marrow in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia & Lymphoma*. in press. 査読有
doi: 10.3109/10428194.2012.745074
- ⑤ 山崎翔、中村文彦、南谷泰仁、中川正弘、市川幹、黒川峰夫(他 5 名, 6 番目). Early-onset therapy-related myelodysplastic syndrome originating from prolonged myelosuppression after fludarabine-based therapy. *Internal Medicine*. 51:3427-3430, 2012. 査読有
doi: 10.2169/internalmedicine.51.8310
- ⑥ 黒川峰夫(他 7 名, 8 番目). Erythroleukemia showing early erythroid and cytogenetic responses to azacitidine therapy. *Annals of Hematology*. 92:707-709, 2013. 査読有
doi: 10.1007/s00277-012-1603-2
- ⑦ 黒川峰夫(他 13 名, 14 番目). Generation of induced pluripotent stem cells from primary chronic myelogenous leukemia patient samples. *Blood*. 119:6234-6242, 2012. 査読有
doi: 10.1182/blood-2011-07-367441
- ⑧ 古屋淳史、南谷泰仁、黒川峰夫. Evaluation of procalcitonin with liquid-phase binding assay in hematological malignancy. *Clinica Chimica Acta*. 413:1633-1636, 2012. 査読有
doi: 10.1016/j.cca.2012.05.003
- ⑨ 黒川峰夫(他 13 名, 10 番目). Prdm3 and Prdm16 are H3K9me1 methyltransferases required for mammalian heterochromatin integrity. *Cell*. 150:948-960, 2012. 査読有
doi: 10.1016/j.cell.2012.06.048
- ⑩ 籠谷勇紀、南谷泰仁、黒川峰夫. Thalidomide maintenance therapy for patients with multiple myeloma: meta-analysis. *Leukemia Research*. 36:1016-1021, 2012. 査読有
doi: 10.1016/j.leukres.2012.04.001
- ⑪ 黒川峰夫(他 11 名, 9 番目). Intensive chemotherapy for elderly patients with acute myelogenous leukemia: a propensity score analysis by the Japan Hematology and Oncology Clinical Study Group (J-HOCS). *Annals of Hematology*. 91:1533-1539, 2012. 査読有
doi: 10.1007/s00277-012-1487-1
- ⑫ 黒川峰夫(他 12 名, 13 番目). Multiple phosphorylation sites are important for RUNX1 activity in early hematopoiesis and T-cell differentiation. *European Journal of Immunology*. 42:1044-1050, 2012. 査読有
doi: 10.1002/eji.201040746
- ⑬ 黒川峰夫(他 8 名, 9 番目). Primary MALT lymphoma of the urinary bladder in the background of interstitial cystitis. *Annals of Hematology*. 91:1505-1506, 2012. 査読有
doi: 10.1007/s00277-012-1419-0
- ⑭ 森田剣、中村文彦、南谷泰仁、上久保靖彦、市川幹、黒川峰夫. Lymphoma with specific affinity to endocrine organs. *Annals of Hematology*. 91:1149-1150, 2012. 査読有
doi: 10.1007/s00277-011-1372-3
- ⑮ 田岡和城、山本豪、蕪城俊克、高橋強志、新家眞、黒川峰夫. Treatment of primary intraocular lymphoma with rituximab, high dose methotrexate, procarbazine, and vincristine chemotherapy, reduced whole-brain radiotherapy, and local ocular therapy. *British Journal of Haematology*. 157:252-254, 2012. 査読有
doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08938.x
- ⑯ 片岡圭亮、黒川峰夫. Ecotropic viral integration site 1, stem cell self-renewal and leukemogenesis. *Cancer Science*. 103:1371-1377, 2012. 査読有
doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02303.x

[学会発表] (計 8 件)
(国際学会)

- ① 黒川峰夫(他 7 名, 8 番目). Generation of induced pluripotent stem cells from primary hematological malignancies. *International Society for Stem Cell*

Research (ISSCR) 10th annual meeting.
June 13-16, 2012, Yokoyama (Poster)

- ② 黒川峰夫(他6名,7番目). Regulation of Chronic myeloid leukemia stem cells by leukemia oncogene Evi1. 17th congress of EHA. June 14-17, 2012, Amsterdam (Poster)
- ③ 黒川峰夫(他6名,7番目). NF- κ B/TNF- α Positive Feedback Loop with Active Proteasome Machinery Supports Myeloid Leukemia Initiating Cell Capacity. 54th ASH Annual Meeting. December 8-11, 2012, Atlanta (Oral)
- ④ 黒川峰夫(他6名,7番目). Inhibition of EZH2 Depletes MLL Fusion Leukemia Stem Cells Through Restoration of p16 Expression. 54th ASH Annual Meeting. December 8-11, 2012, Atlanta (Poster)
- ⑤ 西川慧、荒井俊也、大河内直子、黒川峰夫. CD41 and Mpl Positive Fraction Shows an Efficient Leukemia-Initiating Capacity in Evi1-Induced Leukemia. 54th ASH Annual Meeting. December 8-11, 2012, Atlanta (Poster)
- ⑥ 南谷泰仁、篠原明仁、市川幹、黒川峰夫. The Serial Profile of Vitamins and Mineral Microelements During the Acute Phase of Hematopoietic Stem Cell Transplantation. 54th ASH Annual Meeting. December 8-11, 2012, Atlanta (Poster)

(国内学会)

- ⑦ 黒川峰夫. 血液疾患とiPS細胞. 第74回日本血液学会学術集会, 2012年10月20日, 京都(口演)
- ⑧ 黒川峰夫. iPS細胞を用いた造血器腫瘍研究. 第12回日本再生医療学会総会, 2013年3月21日, 横浜(口演)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.u-tokyo-hemat.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒川 峰夫 (KUROKAWA MINEO)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号: 80312320