

博士論文

白血病幹細胞に特異的な表面抗原の探索

志村（貫名） 有香

白血病幹細胞に特異的な表面抗原の探索

東京大学大学院 医学系研究科 内科学専攻 博士過程

血液・腫瘍病態学

指導教員 黒川 峰夫教授

志村 (貫名) 有香

目次

【要旨】	2
【序文】	3
【実験方法】	8
【結果】	29
【考察】	59
【結論】	68
【謝辞】	69
【参考文献】	70

【要旨】

急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia: AML) は自己複製能を有する白血病幹細胞を頂点とする階層構造を有しており、この白血病幹細胞が従来の化学療法に抵抗性を示し、再発の主な要因となっているが、白血病幹細胞を規定する特異的マーカーはほとんど報告されていない。不均一な集団である AML 細胞の遺伝子発現解析を単一細胞レベルで行うことで、集団解析では平均化されて抽出されなかった白血病幹細胞に特異的な表面抗原遺伝子を同定できる可能性があると考え、本実験を行った。

候補遺伝子として抽出した ALCAM 遺伝子が、実際に一部の症例でヒト AML 細胞を濃縮する細胞表面マーカーになること、その阻害により白血病発症能が阻害され、治療標的になる可能性があることが示唆された。

【序文】

AML の治療成績は、主に支持療法の進歩により過去 30 年間で飛躍的に改善を認め、約 80% の患者が初回治療により完全寛解を得ることができるようになった¹。一方で長期予後に関しては、AML は寛解後地固め療法を行わないと再発が必至のため寛解後療法を行うが、多剤併用化学療法のみで AML の治癒を得られる症例は少ないのが現状である²。再発率を下げるために多剤併用化学療法のレジメンの改善など様々な取り組みがなされてきており³、その中の重要な治療選択肢として、同種造血幹細胞移植がある⁴⁻¹¹。しかし移植の前処置（大量化学療法や全身放射線照射）や Graft Versus Host Disease (GVHD) などの治療関連毒性による死亡率も高く、全例には適用できない。

そこで予後予測因子により治療選択を層別化し、高リスク患者に対してのみ治療強度を上げるような取り組みが行われている^{12,13}。予後予測因子は主として、年齢・全身状態等の患者背景と染色体異常・遺伝子変異等の病因的な因子があげられる。染色体異常は最大の予後規定因子であり、t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13.1q22) または t(16;16)(p13.1;q22), t(15;17)(q22;q12) が予後良好群、abnormal 3q, -5 または del(5q), -7 または del(7q), t(6;9)(p23;q34), 複雑核型が予後不良群、それ以外の染色体異常や、AML の 40-50% を占める染色体正常核型が予後中間群とされ治療方法の層別化がなされてきた^{12,13}。近年、染色体正常核型の AML 症例においても、FLT3, NPM1, CEBPA 遺伝子などの遺伝子変異の有無により化学療法に対する反

応性・長期予後が異なることが知られ、遺伝子変異も治療法選択において重要な情報となってきた¹⁴。

具体的な治療選択としては、予後良好群では第一寛解期における寛解導入療法・およびその後の化学療法による地固め療法のみで長期生存率が約 60%程度得られ、同種造血幹細胞移植治療の優位性は示されていない^{4,5}。その一方で、予後不良群および、予後中間群に関しては化学療法のみで治癒が得られる可能性は低く、可能であれば第一寛解期に同種造血幹細胞移植を積極的に検討する。だが、同種造血幹細胞移植の場合、ドナーとの HLA 適合性等により、GVHD のリスクも異なっており、同胞 HLA 一致ドナーがいる場合には骨髓移植の良い適応と考えられるが^{4,6-8}、一致同胞ドナーがいない場合には、移植ソースをどのような基準で選定するか、またどのような条件の移植ソースが得られた場合に移植を実施するかについてはコンセンサスが得られていないのが現状である⁹⁻¹¹。また再発後・化学療法難治性の症例に関しては、化学療法単独治療による治癒の可能性が極めて低いので、できる限り同種造血幹細胞移植を検討する¹⁵。

上述のような予後予測因子による治療層別化、同種造血幹細胞移植治療の発達により治療成績は徐々に改善しているが、AML に対する抗腫瘍薬物療法のキードラッグは数十年来アントラサイクリン系およびシタラビンを中心であり画期的な進歩が見られているとは言い難く、同種造血幹細胞移植治療が可能なドナー適合者がいない場合や、全身状態により移植治療が困難な高齢者患者、移植後の再発症例な

どもあり、長期生存率は現在も AML 全体の 20-30%にとどまっている²。

そこで、新たなキードラッグとなり得る抗腫瘍薬物療法の開発のためには従来の化学療法に対する抵抗性の原因の解明が必要であるが、その原因として後述するように白血病幹細胞 (leukemia stem cell: LSC) の存在が重要であると報告され¹⁶、LSC を標的とした治療の早期開発が期待されている。

AML をはじめとする悪性疾患が不均一な集団であることは古くから知られ、その不均一性を説明するためのモデルとして、腫瘍にも正常組織と同様に幹細胞を頂点とする分化の階層性があるという仮説が提唱されていたが、免疫不全マウスへのヒト AML 細胞の移植実験でマウスに AML を引き起こす細胞 (leukemia-initiating cell: LIC) は、正常造血幹細胞 (hematopoietic stem cell: HSC) と同一の表現型である CD34⁺ CD38⁻を示すごく一部の分画に限られることが示されて、初めて LSC の存在が証明された¹⁷。LIC の多くは G0 期にあり、通常の化学療法には抵抗性を示す^{16,18}。LIC と LSC の異同については議論があるものの、免疫不全マウスに対する異種移植実験により AML を引き起こす活性を有することにより定義される LIC は、現在のところ LSC の存在を *in vivo* で検証できる唯一の方法である。AML のヒエラルキーの頂点に存在すると考えられるこれらの細胞が再発の原因として重要であることは広く受け入れられており、AML の根治のためにはこれらの細胞の根絶が必要であると考えられている^{19,20}。

LIC は当初 CD34⁺ CD38⁻分画に限局して存在していると報告され¹⁷、それを前

提として多くの研究が行われたが、近年になり CD34⁺ CD38⁺分画、CD34⁻分画にも存在するなど、症例により多様性に富むことが明らかとなり、既存の表面抗原の発現パターンだけでは定義できないことがわかってきた²¹。従って従来の CD34、CD38 だけを用いた単離法では、LSC の性質を正確に捉えられていない可能性が高く、LSC の性質を明らかにし、LSC を標的とした治療法を探索していくためには、新規の LSC 特異的細胞表面マーカーが必要である。

一方腫瘍特異的治療の開発において、腫瘍細胞で特異的に発現する表面抗原をターゲットとした抗体療法は、標的細胞の選択的治療および毒性軽減が期待され、非常に有用な手段の一つである²²。実際に B 細胞性リンパ腫では抗 CD20 モノクローナル抗体である Rituximab の開発により治療成績の大幅な改善を認め、現在では CD20 陽性リンパ腫治療のキードラッグとなり、その他にも有望な抗体医薬が多くの腫瘍で開発されている²³。一方で AML に対して今まで実用化されたモノクローナル抗体には抗 CD33 モノクローナル抗体を用いた抗体薬物複合体の Gemtuzumab ozogamicin などがあるが、現在のところ十分な治療成績の改善効果は得られず、強い副作用も問題となっている²⁴。治療関連毒性が強い原因、十分な治療効果が得られない原因としては、CD33 を初めとする AML 細胞で発現する抗原の多くが、正常造血細胞にも発現していること、また多くの AML 細胞で発現していたとしても LSC では十分に発現していないことなどが可能性として考えられている。これらのことから、AML の根治を目指す特異的治療の開発に当たっては、

LSC で発現量が高く、正常造血細胞で発現の低い細胞表面抗原を標的とすることが望ましい。

そこで本研究では LSC に特異的な新規表面抗原の同定・それに基づく LSC 特異的治療標的の探索を目的とした。これまでに T-cell immunoglobulin muchin-3 (TIM3) や IL-3R α (CD123), CD99 等が LIC で発現する表面抗原として報告されているが、これらは必ずしも LIC に特異的なマーカーではなく、またこれまで LSC を標的とした新規治療薬の開発につながっている表面抗原はない²⁵⁻²⁷。私は新規表面抗原の探索方法として、単一細胞毎の遺伝子発現は集団全体での解析よりも多様性があるという報告に着目し^{28,29}、不均一な集団である AML 細胞の遺伝子発現解析を単一細胞レベルで行うことにより、集団を対象とした解析では平均化されて抽出されなかった LSC 特異的 surface 抗原遺伝子が同定できる可能性があると考えた。

本研究では、単一遺伝子レベルでの遺伝子発現解析を行うことにより、LSC に特異的な表面抗原遺伝子を抽出すること、また抽出された候補遺伝子の白血病発症における役割を明らかにして、LSC 特異的な治療標的としての可能性を探求することを目的とした。

【実験方法】

実験スキーム

LSC に特異的な表面抗原を探索する手段として、AML 症例検体を用いて単一細胞レベルでの遺伝子発現解析を行うことにより、LSC に特異的な表面抗原遺伝子を抽出した。具体的には、LIC で高発現を示すことが知られている遺伝子群（LIC 遺伝子セット）の発現量の総和を single-cell LIC スコアとして単一細胞毎に点数付けを行い、各細胞の single-cell LIC スコアと細胞表面抗原遺伝子の発現との相関関係を調べることにより、single-cell LIC スコアと正の相関を示す表面抗原遺伝子を LSC 特異的な表面抗原候補遺伝子として抽出した (Figure 1)。

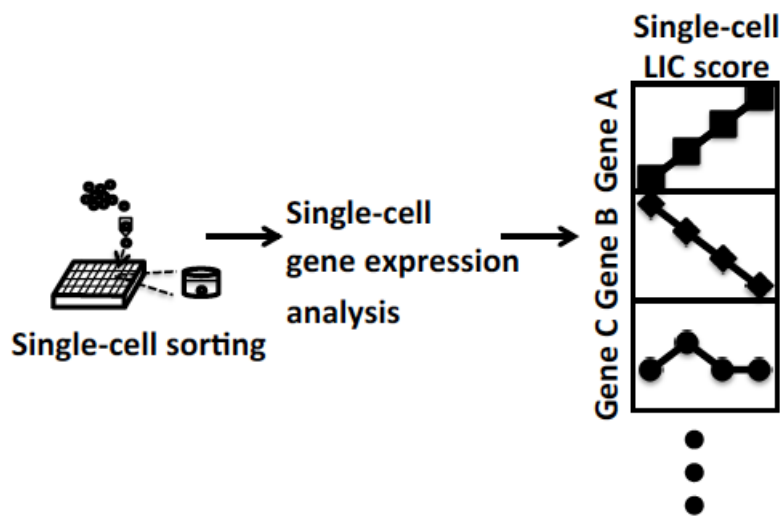


Figure 1: 実験スキーム

AML 症例検体を単一細胞毎に分離し、単一細胞毎の遺伝子発現を解析し single-cell LIC スコアと表面抗原候補遺伝子との相関関係を調べ、single-cell LIC スコアと正の相関を示す候補遺伝子を抽出した。

ヒト AML 検体

WHO 基準に従い、AML と診断された症例の診断時、および再発時の骨髄もしくは末梢血検体を使用した。検体の採取、臨床情報の調査および実験を含むこの研究に関わるすべての過程は、東京大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科と無菌治療部において行われた。本研究は「造血器疾患における遺伝子異常の網羅的解析」（承認番号 G2314-(1)）に含まれており、東京大学医学部倫理委員会の承認を得た。また実験に関わる全ての症例において、事前に研究内容を説明し同意を取得した。

表 1. 使用した AML 症例検体

患者番号	年齢	性別	病型	染色体異常
AML 1	48	M	AML M4	46,XY,t(11;19)(q23;p13.1)[16/20]/46,XY,i(7)(q10), t(11;19)(q23;p13.1)[4/20]
AML 2	37	F	AML M2	46XX[20]
AML 3	66	M	AML M1	46,XY,t(8;21)(q22;q22)[4]/46,XY[8] C-kit 遺伝子変異陽性
AML 4	68	F	AML M5a	46,XX,t(6;11)(q27;q23)[20]
AML 5	42	M	AML M2	46,X,-Y,add(4)(q21),del(5)(p13),-9,add(10)(p11.2) add(11)(q13),add(17)(q21),add(18)(q21.1),+2mar
AML 7	72	M	AML M2	46XY[20]
AML 8	68	F	AML M4	46XY[20]
AML 10	59	F	AML M1	46XX[20]
AML 17	64	M	AML M1	46,XY,t(1;11)(q21;p15)

フローサイトメトリー (FCM)

FACS Aria II、FACS Aria III、FACS LSR II (いずれも Becton, Dickinson and Company, Japan: BD, 東京) のいずれかを用いて解析およびソーティングを行った。使用した抗体は以下の表 2. 3 に示す。

表 2. 使用した FACS 用抗体 (anti-Human 抗体)

エピトープ	抱合色素	クローン	使用濃度	供給元
CD34	APC	581	1:33	BECKMAN COULTER
	FITC	581	1:33	BD Pharmingen
CD38	FITC	T16	1:33	BECKMAN COULTER
CD166 (ALCAM)	PE	3A6	1:33	BioLegend
CD45	APC	J.33	1:33	BECKMAN COULTER
CD33	PE/Cy7	P67.6	1:33	BD Biosciences
CD11b	Biotin	ICRF44	1:33	BioLegend
CD14	Biotin	HCD14	1:33	BioLegend

表 3. 使用した FACS 用抗体 (anti-Mouse 抗体)

エピトープ	抱合色素	クローン	使用濃度	供給元
B220	Biotin	RA3-6B2	1:200	BioLegend
CD3ε	Biotin	145-2C11	1:200	BioLegend
CD4	Biotin	GK1.5	1:200	BioLegend
CD8	Biotin	53-6.7	1:200	BioLegend
CD45.1	APC	A20	1:200	BioLegend
CD127	Biotin	A7R34	1:200	eBioscience
ALCAM	PE	ebioALC48	1:200	eBioscience
c-kit	FITC	2B8	1:200	BD
Ly6G	Biotin	RB6-8C5	1:200	BioLegend
CD11b	Biotin	M1/70	1:200	eBioscience
Streptoavidin	APC-Cy7		1:200	BioLegend
Ter-119	Biotin	Ter-119	1:200	BioLegend

Lineage 抗原に対する抗体としては、CD3ε, CD4, CD8a, B220, Ly6G, CD11b, Ter-119, IL-7Rαに対する biotin 化抗体の混合物を使用して氷上で 15 分の染色を行った。AML 症例検体を各分画でソーティングする場合には 7-AAD で死細胞除去を行った。

アポトーシスの解析は、細胞表面抗原の染色後、Annexin-APC (BD)(1:200)、

DAPI を用いて室温の Annexin V Binding Buffer (BD) 中で 15 分染色し、60 分以内に測定を行った。

単一細胞毎の遺伝子発現解析

FACS Aria II (BD) を用いて 96 well へ 1 well につき 1 細胞となるようにシングルセルソーティングを行い、顕微鏡下で 1 well に 1 細胞が回収されていることを確認した。各 well には Cells Direct™ One-Step qRT-PCR kit (Invitrogen) および nested PCR の外側プライマー溶液 (表 4) を用いてあらかじめ調整した溶液を入れておき、セルソーティング後の検体を逆転写・特定のターゲットの増幅反応を行った (Figure 1)。

作成された、シングルセル由来の cDNA を用いて、内側プライマー (表 5) で定量 PCR を行い、各遺伝子の発現量の解析を行った。定量 PCR は BioMark™ HD (Fluidigm, 東京) を使用した。

表 4. 外側プライマー

<i>ADA</i>	cgagacttcgggggtaag	gccagggtcaatggctacc
<i>ADAM28</i>	gccagtagaaggcaatgagc	tttggatttgagtccttaggtgt
<i>ALCAM (CD166)</i>	gcatgattgcttcaacagcta	attgtgcatgacacgggtag
<i>FAM189B</i>	catcacgacctccagtgaca	aggcaggcttcagagcag

<i>C1R</i>	ttctgaaggetgcttctatgatt	cccttgggacataaattcctt
<i>DCAF17</i>	tggtgtgccaggaaagtactaa	tggetcagatgcaacaactg
<i>C5ORF28</i>	gctggtgtgcacctgtagttt	aggttcaageccattgtctgc
<i>C5ORF42</i>	tgagatggtcccaactacctg	gccatggactggacgact
<i>CAMLG</i>	gatcatgggctttcacagg	cgctgagggagttcagtttate
<i>CD151</i>	cctgctgcgctgtactt	ttctcctgagctccgtgtt
<i>CD164</i>	cctccccttctacaactcca	ccaggacaattcctccaatg
<i>CLDND1</i>	tatccggtgaatttggatgg	actctttccggttggtgtga
<i>DLG4</i>	ggcgcacaagttcattgag	cgagacatcgaggatgcag
<i>F11R</i>	tcaaggtcaagctcatcgtg	gaaccatcttgttctgagcatgt
<i>FAM168B</i>	gagcgaatcctaccttccaa	ggcagctctggtaggggttc
<i>FZD6</i>	ttccctaactctgatgggtcatt	tgcaggttggtacaaatgctt
<i>FZD7</i>	aggtaaacttcaaagtgattctgga	tcatgcaaaagaatccgagtt
<i>GLIPR1</i>	atgcaactacggaccaggag	tcggttaacacagagattgtcc
<i>GLP1R</i>	cagcgtccctgactgag	agctgacattcacgaacgag
<i>GNRHR</i>	tgcagtcagttggattgattct	ttttcaaacacactggtgagca
<i>GPR56</i>	gctcttctgtccaaggt	tggtgtgggtttgtagtgga
<i>IL3RA (CD123)</i>	aattcttgagcgcctggag	tgcagatcacgaagacacaga

<i>INTS5</i>	cagtcacgaaatcagcagga	agcattccccacattcagtg
<i>ITGA6</i>	agcctcttcggcttctcg	ctcccgttctgttggtct
<i>LIMS1</i>	tttcaactgcgccaactg	tggggacccccattttat
<i>SLC16A5</i>	ggccagctccttctctcac	accgtgatgcttgactgga
<i>LRP12</i>	tgggatgtactgtgaagctttattctc	cctgagcaatcaattgtccata
<i>LY75</i>	catgcagctggtgagcat	ccaaccaaagttgagttcatca
<i>NOTCH3</i>	agggccgtactggtagcc	ccattgtagccaggaagacac
<i>NPR2</i>	agaagctggtggaggaacg	tccccgttttaactgctctg
<i>PCDHGA11</i>	ggtctctctcattgaggact	gagtggctcgtttttctcac
<i>PKD2</i>	cacaagttgctagcctcaagaa	tgctgggaattcaaccaataa
<i>PLA2G6</i>	gagctggccaagactgttttt	gtactggatgccgaccatct
<i>PTK7</i>	tctagcctgcagccatc	gcaggctcttcacaagtacca
<i>RAB11A</i>	gctgcttttcagacaattttaacag	ctgcacctttggcttgtttt
<i>RAB11FIP2</i>	caagcaatgaagacctcagga	ggatgtgggtgtctttctc
<i>RAB4A /// SPHAR</i>	gccagaacattgtgatcatcc	agcgcactgtttccaaaa
<i>SCARF1</i>	gaggcctgtgagccagatac	aggtggggcaggtagagc
<i>KIAA1305</i>	tttctgaagaagccaaacagg	agtcagcgtcatcactcagc
<i>SLC20A2</i>	ggctaataatgatgacagcacca	gggtcatggacagtgtcttt

<i>SLC39A6</i>	catgaatcgggtgttttca	atggtggtgacttgcattgag
<i>SLC7A6</i>	catcatcgccatcacctt	ggcacagttcacaatgtcag
<i>SPINT2</i>	aacagctaccgctctgagga	gaggatcaacaccatcacga
<i>TAOK3</i>	atgaaatgatggcctctcaag	tctggtaggcgttgagca
<i>TM2D1</i>	aactgtacaaactacacagctcatgtt	ccaacttcgttcccagtaaaa
<i>TNFSF4</i>	ttgctggtggcctctgtaat	ttgaattcgaggataccgatg
<i>TSPAN3</i>	accaaccctgatgctgcta	ttggtttctttgaaccaatctg
<i>VANGL1</i>	cgagtaaagaagcggaaagc	ctccctagggtccatcacct
<i>VPS37B</i>	acggagatggtgcagaagat	tggggctggtacaaaaggt
<i>ZDHHC4</i>	ccatgttatggacaaggtctt	caggacaaacaacaggtagcc
<i>CD99</i>	aaaaagaagctatgcttcaaagaaa	atttctctaaaagagtacgctgaaca
<i>TIM3</i>	ggagcctccctgatataaatctaa	tgtccgatgtagatgctta
<i>GAPDH</i>	acaccatggggaaggtgaag	gtgaccaggcgccaata
<i>ACTINB</i>	ccaaccgagagaagatgac	tagcacagcctggatagcaa
<i>NIPAL2</i>	tggcagttcctgatctatgtga	caccatagcttcattccttttc
<i>SLC9A7</i>	cattgtgttcttactgtctgga	tgttcattctggtcctcttcg
<i>TRAF3IP2</i>	gtgcctagacccttagca	ccatagctgtgtccatcgaa
<i>ATP1B1</i>	cggtggcagttggtttaag	agcatcacttggatggttcc

<i>ABCG1</i>	tcaggacctttctattcg	ttccttcaggagggttctgt
<i>LRRC61</i>	gggttgaagattgtgaagcaa	ggcttaccaggccagt
<i>PAQR6</i>	atgccttcccagagcaca	cactgcacagatgtggaataact
<i>METTL21B</i>	tttactcgctttgtttaatggattc	aatgggttcgagaatttgtcc
<i>ARPP19</i>	agcactatgtctgcggaagtc	ggactagtcactttatcttccattcc
<i>PNPLA4</i>	gttctgctaacagcaccagaaa	gaagtcataaccgggcgttac
<i>PTCD2</i>	acgagttggatctcgaggaa	gagaagaaacctcgtaaattgctg
<i>CRKRS</i>	gccaagtatataaagccaaggaca	tctcaccttcttcagagccact
<i>ARL3</i>	aagatttgaagagacgggtcag	gatgagcactggcacacaaac
<i>RBPMS</i>	agccgagaaggagaacacc	aaggccactgacaaataggg
<i>MAP3K7</i>	aactccatcccaatggctta	ttgggcaagggtgctagag

表 5. 内側プライマー

<i>ADA</i>	gagacttcgggggtcaaggc	tcaatggctaccacgggtctg
<i>ADAM28</i>	caatgagccccagcctc	agtccttaggtgtagacactgga
<i>ALCAM (CD166)</i>	gctcaacagctatcacagttca	catgacacgggtaggcatc
<i>FAM189B</i>	cacgacctccagtgacactg	gagcagagccctgtatctgc
<i>C1R</i>	agaaaagcctggggagggttc	aattccttctttcccggggg

<i>DCAF17</i>	ggtgtgccaggaaagtactaaatt	ctgacacagegcccataattg
<i>C5ORF28</i>	gtgtgcacctgtagttcagc	ggttcaagccattgtctgcc
<i>C5ORF42</i>	tcaggtgctgcaaagtctca	ctggacgactctcactgctg
<i>CAMLG</i>	ctttcacaggcccgggag	gctgagggagttcagttatcac
<i>CD151</i>	ctgcgcctgtacttcatct	gctgctggtagtaggcgtag
<i>CD164</i>	acactgtgactccaacctcac	cctccaatgaaactggctgc
<i>CLDND1</i>	ttggatggtccttctgctg	tgtgagcagcccagatgaag
<i>DLG4</i>	cgcacaagttcattgaggcc	gacatcgaggatgcagtgt
<i>F11R</i>	aaggtcaagctcatcgtgct	tggcagaggaggggatgta
<i>FAM168B</i>	agcgaatcctaccttccaaaca	gtgggggaacaggacaactt
<i>FZD6</i>	tcctaatactgatgggtcattatgac	tggtacaaatgctttgcagag
<i>FZD7</i>	tctggagttctttgaaatgtgctg	tgcaaaagaatccgagttctattaca
<i>GLIPR1</i>	aactacggaccaggaggaa	tgtcattattggggcaggca
<i>GLP1R</i>	cctcctgccacagacttgtt	tgacattcacgaacgagcct
<i>GNRHR</i>	gcagtcagttggattgattctaatt	acacactgttgagcactcga
<i>GPR56</i>	ctcttctggtccaaggtgc	tgtgggttttagtggaggc
<i>IL3RA (CD123)</i>	ttcttgagcgcctggagc	atcacgaagacacagaccagg
<i>INTS5</i>	tcacgaaatcagcaggaagtga	ctgcagcagtgaaccagga

<i>ITGA6</i>	ctcttcggcttctcgtctgg	tctgttggtctctgcagtg
<i>LIMS1</i>	ttcaactgcgccaactgc	ggcatgggaggcagtatagc
<i>SLC16A5</i>	ccttctctcacaacctcagcc	ctggaagctgaagcacatgc
<i>LRP12</i>	gggatgtacttgtaagctttattctct	gtccatacagggaggagct
<i>LY75</i>	gagcatcacggaccttacc	accaaagttgagttcatcatcttgac
<i>NOTCH3</i>	ccgtactggtagccactgtg	gccaggaagacactcacaca
<i>NPR2</i>	aagctggtggaggaacgc	cccgttttaactgctctgcc
<i>PCDHGA11</i>	ctcgcagaagagtcacctga	tttctcacagctctcctggc
<i>PKD2</i>	aaaatgtctggctggaccga	acctgaccacacagaacagg
<i>PLA2G6</i>	gccaagactgtttttggggc	tctggatccgtgcaacagtc
<i>PTK7</i>	cgctggggaagagtgagttt	caagtaccagggtctctgcc
<i>RAB11A</i>	accgcattgtttctcagaagc	tggettgttttcagtggttgg
<i>RAB11FIP2</i>	tgaagacctcaggaaaatcccg	gatgtgggtgtctttctctct
<i>RAB4A /// SPHAR</i>	agaacattgtgatcatcctttgtgg	gtttccaaaaacatcagctcattttct
<i>SCARF1</i>	ggcctgtgagccagatactg	tagagccacagtcttcccca
<i>KIAA1305</i>	cctgaaggtgtggaagacc	gtcagcgtcatcactcagct
<i>SLC20A2</i>	atgatgacagcaccatcccg	tcatggacagtgtcttccg
<i>SLC39A6</i>	tcttgagtttcttctgtggca	tggtgggtgacttgcatagaga

<i>SLC7A6</i>	atgccatcacctttgccaa	caggtatgggggatcacage
<i>SPINT2</i>	acagctaccgctctgagga	caacaccatcacgaacagcc
<i>TAOK3</i>	atgatggcctctcaagcgtt	cagctccatttctctgctgga
<i>TM2D1</i>	actacacagctcatgtttcctgt	tgtttcattgccactggaatcc
<i>TNFSF4</i>	tggtggcctctgtaattcagg	aagagcagagaagtgcaggc
<i>TSPAN3</i>	aacctgatgctgctagcc	accaatctgtatccccagctga
<i>VANGL1</i>	gaaagcaaggctggtggttg	tcctagggtccatcacctc
<i>VPS37B</i>	tggtgcagaagatggaggag	aaggtttccttctgccaggc
<i>ZDHHC4</i>	tggacacggtctttcttattcagt	accaggaggaagctcagaa
<i>CD99</i>	atgcagaacaaggggaggtg	ctctaaaagagtacgctgaacage
<i>TIM3</i>	aacacaaatatccacattggccaa	ttgctccagagtcccgtaag
<i>GAPDH</i>	caccatggggaaggtgaagg	tgaccaggcgccaatac
<i>ACTINB</i>	cgcgagaagatgaccagat	cacagcctggatagcaacgt
<i>NIPAL2</i>	ggcagttcctgatctatgtgatttt	accatatgcttcattccttttcttt
<i>SLC9A7</i>	gatcattggaggaggcacga	ctcgacgccaactctgatgt
<i>TRAF3IP2</i>	tgcttagacccttagcaac	atagctgtgtccatcgaataagtga
<i>ATP1B1</i>	ggtggcagttggtttaagatccttc	ggtccaatgaagatgccage
<i>ABCG1</i>	cagggacctttcctattcgggttc	cctttcaggagggtcttgatecc

<i>LRRC61</i>	ttgtgaagcaatagcctaaggga	gctctaccaggccagtgc
<i>PAQR6</i>	tgcettcccagagcacaga	ctgcacagatgtggaataactgg
<i>METTL21B</i>	tcgctttgtttaatggattccacc	tgggttcgagaatttgcca
<i>ARPP19</i>	actatgtctgcggaagtccc	cactttatcttcatttccttctgct
<i>PNPLA4</i>	accaatttacctacaagtttgccg	tcataaccgggcgttactgc
<i>PTCD2</i>	agttggatctcgaggaatctgc	agaaacctcgtaaatgctggtct
<i>CRKRS</i>	ccaagtatataaagccaaggacaaaga	accttcttcagagccactagc
<i>ARL3</i>	agacgggtcaggaactagct	atgagcactggcacacaact
<i>RBPMS</i>	ccgagaaggagaacacctg	aggccactgacaaatagggtc
<i>MAP3K7</i>	ccatccaatggcttatcttacac	cacggtgctagaggtgtag

コロニー形成能アッセイ

AML 症例検体を上述の FACS Aria II/ Aria III で各分画に分離してリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline: PBS) に懸濁し、実験ごとに一定数の細胞を、メチルセルロース半固形培地 (Methocult H4434 Classic, Stemcell Technologies, Vancouver, Canada) に播種して duplicate で培養し、14-18 日後にコロニー数を計測した。

マウス白血病モデルについては上述の FACS Aria II/ Aria III で各分画に分離した検体を PBS に懸濁し、実験ごとに一定数の細胞を Methocult M3434 (Stemcell

technologies) に播種して duplicate で培養し、7 日後にコロニー数を計測した。

マウス

NSG マウス (NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ)、および ALCAM ノックアウト (KO) マウス (B6.129(FVB)-*Alcam*^{tm1Jawe}/J) を The Jackson laboratory (Bar Harbor, ME) から購入し自家繁殖を行い使用した。また、C57BL/6J マウスは三協ラボサービスから購入し、使用した。ALCAM KO マウスの genotyping は下記のプライマーを用いて行った³⁰。ALCAM KO と ALCAM ワイルドタイプ (WT) マウスを比較する実験には littermate を使用した。

fw (WT, KO 共通): ctaagcgagaccacaagcg

rv (WT specific): gatcaagaggcagaaaaccag

rv (KO specific): gtcgtccttgaagaagatgg

いずれも 8 週齢から 12 週齢のマウスを実験に使用した。すべての動物実験は、東京大学医学部倫理委員会の承認を得て、東京大学動物実験実施規則を遵守して行った。

マウス骨髄細胞・脾細胞採取

生細胞数の計測を行う実験においては、頸椎脱臼にてマウスを安楽死させた後、両側大腿骨を単離して筋・結合織を除去し、両端を切断してシリンジと針を用いて

骨髓腔を 2%ウシ胎児血清 (FCS) 添加 PBS で洗浄し、70 μ m メッシュ (BD) を通して骨髓細胞を回収した。

マウス骨髓細胞を回収する場合には Histopaque 1083 (Sigma-Aldrich Japan, 東京) のマニュアルに従って単核細胞分離を行った後、血球計算盤による標準トリパンプルー色素除去法により生細胞数を計測して、解析・培養・移植に使用した。脾臓は乳鉢を用いてすりつぶした後、70 μ m メッシュを通して細胞を回収した。

ただし NSG マウスの骨髓細胞を解析する場合には、上記用法で骨髓細胞を回収後、塩化アンモニウム溶血剤を用いて赤血球溶血除去を行い、その後の実験に使用した。

細胞株

AML 細胞株として、THP-1 (RCB1189) を使用した。10%FCS・1%ペニシリン・ストレプトマイシン添加 (Wako Pure Chemical Industries, 大阪) をした RPMI1640 を用いて 5% CO₂, 37°C の環境下で培養を行った。2 \times 10⁵ cells/ml から 3 \times 10⁶ cells/ml の範囲になるような目安で継代を行った。

Short hairpin RNA (shRNA)

ヒト ALCAM に対する shRNA プラスミドは、siDirect version2 (<http://sidirect2.rnai.jp/>) を用いて設計し、オリゴヌクレオチド (Thermo Fisher

Scientific (東京)にてカスタムオーダー)を、メーカーのマニュアルに従って RNAi-Ready pSIREN-RetroQ-ZsGreen1 Vector (Takara Bio, 大津) および RNAi-Ready pSIREN-RetroQ Vector (Takara Bio) に挿入して作成した。

Target sequences from 5' to 3'

shALCAM: gccattcaatggacaattactgg

コントロールとしては、Luciferase に対する shRNA を挿入したベクターを使用した。

ベクター

AML マウスモデルの作成を行うために、pMSCV-MLL-ENL-internal ribosome entry site-EGFP (*IRES-EGFP*); pGCDNsam-MLL-ENL-*IRES*-Kusabira-Orange を使用した。

マウス *Alcam* 遺伝子の cDNA は MLL-ENL 白血病マウスモデルの脾臓を単核球分離した細胞から上述の方法で抽出した cDNA よりプライマー

fw: gacggatccaccatggcatctaaggtgtccccttcttg (5'→3')

rv: gacgctcgagttaggcttctgttttggattgttttcttc (5'→3')

を用いてクローニングした。シークエンスで NM_009655.2 を参考に配列を確認後、pGCDNsam-IRES-EGFP retroviral vector (東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター中内啓光教授より供与) の BamHI-XhoI 部位に挿入し作成した。

ヒト *ALCAM* 遺伝子の cDNA は Shanghai Tenth People's Hospital of Tongji University の Fenyong Sun M.D, PhD より譲渡された pcDNA3.1-CD166-HA vector をテンプレートとして、

fw: gacggatccaccatggaatccaagggggccagt (5'→3')

rv: gacgctcgagtttagcttcagttttgtgattgttttcttctaact (5'→3')

で PCR を実施してクローニングし、シーケンスで NM_001627.3 を参考に配列を確認後、pGCDNsam-IRES-EGFP retroviral vector の BamHI-XhoI 部位に挿入し作成した。

Soluble *ALCAM*-3×FLAG の cDNA は pGCDNsam-human *ALCAM*-IRES-EGFP vector から、下記のプライマーを使用して KOD Plus Mutagenesis Kit (TOYOBO,大阪) をマニュアルにそって用いて作成した³¹。

fw: accacgacatcgactacaaggacgacgacgacaagtagggatccctcgaggttaacgaatt (5'→3')

rv: cctttagtcaccgtcggtcctttagtccttactgaacaccttgactattgtagtgct (5'→3')

その後 pENTR4-H1tetOx1 (RIKEN BRC, 茨城), CSIV-TRE-RfA-EF-KT (RIKEN BRC)を用いて tet-inducible soluble *ALCAM* vector を作成した。

異種移植実験

凍結保存した AML 症例検体を異種移植の前日に 37°C で融解し、stem cell factor (SCF ; Wako), Flt3-ligand (Flt3L ; R&D systems, Minneapolis, MN), IL-3 (Kyowa Hakko Kirin, 東京), Megakaryocyte growth and development factor (MGDF; Wako) を 100 ng/ml ずつと 10% FCS を加えた RPMI 1640 培地で前培養を行い、day 0 に上記の手順に従い各分画にソートして、移植用の細胞を調製した。細胞は前処置を行っていない NSG マウスの尾静脈に、静脈内注射により移植した。12-16 週間後に骨髓細胞を回収し、赤血球溶血除去後の骨髓細胞の中で、human CD45 (hCD45) 陽性細胞が 1%以上の場合を生着と判断した。限界希釈法の解析はすべて ELDA (Extreme Limiting Dilution Analysis) statistical software (<http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda/index.html>) で行った³²。

また AML 細胞株を NSG マウスに移植する場合は、day 0, day 1 にシクロフォスファミド (Sigma-Aldrich Japan) 100 mg/kg/day を腹腔内投与した³³。

レトロウイルス作成

レトロウイルスの産生には、マウス細胞に対する感染を行う場合には、Platinum-E packaging cells (Plat-E)、ヒト細胞に対する感染を行う場合には、Platinum-A packaging cells (Plat-A) (ともに東京大学医科学研究所先端医療研究センター北村俊雄教授より供与)、を使用して、既報と同様の方法により行った³⁴。

簡潔に述べると、150 mM NaCl (500 μ l/ 10 cm dish) にウイルスベクター10 μ g および polyethylenimine (PEI, Sigma-Aldrich Japan) 80 μ l を混合し 15 分常温でインキュベート後に、混合した溶液を添加して 1×10^6 個の Plat-E 細胞/Plat-A 細胞にトランスフェクションを行い、48 時間後の培養上清をウイルス液として回収し、RetroNectin (Takara Bio) コートプレート上で $1000 \times g$ 、 $32^\circ C$ 、2 時間の遠心を行った後、ウイルス液を除去して、ウイルスコートしたプレートを作製した。ここにマウス骨髄単核細胞もしくは、AML 細胞株を加えて 2 日間培養しウイルスを感染させた。

正常マウス骨髄細胞に対するウイルス感染を行う場合、前日にマウスの骨髄細胞を上述の方法で回収し、c-kit MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Glandbach, Germany) で $4^\circ C$ にて 15 分染色した後、AutoMACS (Miltenyi Biotec) を使用して陽性分画を回収した。20% FCS・1%ペニシリン・ストレプトマイシン添加, 20 ng/ml の SCF, Flt3L, Thrombopoietin (TPO ; Kyowa Hakko Kirin), IL-6 (Kyowa Hakko Kirin) を加えた培地にて、c-kit⁺濃縮分画を 24 時間培養後、ウイルスコートしたプレート上で 48 時間のウイルス感染を行った。

レンチウイルスの作成

レンチウイルスの作成には、HEK293T 細胞を使用して、既報と同様の方法により行った³³。150 mM NaCl (500 μ l/ 10 cm dish) にレンチウイルスベクター6 μ g

と psPAX2 3.0 µg、pMD2.G 1.5 µg、PEI 60 µl を加えて 15 分常温でインキュベート後に、混合した溶液を添加して 1×10^6 個の HEK293T 細胞にトランスフェクションを行い、48 時間後、72 時間の培養上清をウイルス液として回収した。その polybrene (hexadimethrine bromide) (Sigma-Aldrich Japan) を終濃度 5 µg/ml となるように加えて 4°C で 1 時間培養後、4°C、7700×g、16 時間遠心し、1000 倍に濃縮した。

細胞株に対するウイルス感染を行う場合には、polybrene 5 µg/ml、10% FCS、1% ペニシリン・ストレプトマイシン添加をした RPMI 1640 にて、multiplicity of infection (MOI) = 0.5 となるように濃縮ウイルスを添加し、48 時間後に回収した。

AML 症例検体に対するウイルス感染を行う場合には、NSG 異種移植実験を行ったマウスの骨髄細胞を上述の方法で回収し、hCD45 陽性 hCD34 陽性細胞を FACS Aria II により濃縮分離し、20 ng/ml の IL-3、G-CSF、TPO を加えた 10% FCS、1% ペニシリン・ストレプトマイシン添加をした RPMI 1640 で 37°C、4 時間前培養した。その後、polybrene 4 µg/ml および MOI = 10 となる濃度の濃縮ウイルスを加えて 48 時間後に回収をした³⁵。

定量 PCR (qRT-PCR)

細胞を回収後、NucleoSpin RNA XS (Takara Bio) をマニュアルに従って用いて RNA を抽出した。その後、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO) をメ

メーカーのマニュアルに従って用い、cDNA への逆転写を行った。qRT-PCR は、THUNDERBIRD SYBR qPCR MIX (TOYOBO) を使用し、LightCycler480 (Roche, Basel Switzerland) を用いて製造者推奨のプロトコールに従って行った。

Cp 値から計算された発現量を、内部標準遺伝子である *GAPDH* の発現量で除した値を比較した。すべての解析は triplicate で行った。

統計解析

In vitro の実験では、3 回独立した実験を行い同様の傾向が得られたものを結果として採用した。全ての実験において、統計学的有意差は unpaired t-test を用いて評価した。生存曲線は、統計解析ソフトウェア R を用いて log-rank test により比較した。FACS データの解析は、全て FlowJo (Star Tree, Ashland, OR) を使用した。

【結果】

(1) LIC スコアの算出法と AML の予後との相関関係

LIC スコア算出のための LIC 遺伝子セットは Eppert らが発表した既存の遺伝子発現解析のマイクロアレイデータ (GSE30375) の解析結果から抽出した²¹。具体的には AML 細胞を免疫不全マウスに移植をしてマウス骨髄で生着を認めた細胞群を LIC 群、生着を認めなかった細胞群を non-LIC 群として、non-LIC 群との比較から LIC で高発現する 48 プローブ、42 遺伝子 (Complete LSC-R Probe List FDR ≤ 0.05) を、LIC で高発現する遺伝子として抽出した。そして、CD34⁺ CD38⁻ 分画の AML 細胞において、CD34⁺ CD38⁻ 分画の臍帯血細胞と比較して発現が多い 134 遺伝子を HSC よりも LIC で発現が高発現する遺伝子として抽出した。そして、共通する 15 遺伝子 (NIPAL2, SLC9A7, TRAF3IP2, ATP1B1, ABCG1, LRRC61, PAQR6, METTL21B, ARPP19, PNPLA4, PTC2, CRKRS, ARL3, RBPMS, MAP3K7) を LIC 遺伝子セットとした (Figure 2)。

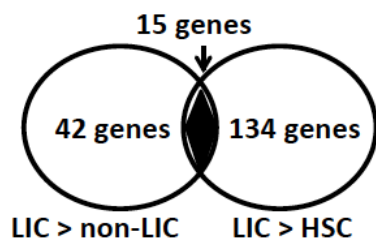


Figure 2: LIC 遺伝子セットの抽出方法

GSE30375 のデータを用いて免疫不全マウスに AML 細胞を移植して生着した細胞群 (LIC 群) と生着しなかった群 (non-LIC 群) を比較して、LIC 群の方が発現が高く、かつ HSC と比較して LIC 群で発現が高い 15 遺伝子を抽出した。

抽出した LIC 遺伝子セットが AML の生物学的な性質と関連しているかどうか、Metzeler らが正常核型の AML の遺伝子発現プロファイルと疾患予後を解析したマイクロアレイデータデータ (GSE12417) を用いて検討した³⁶。データは NCBI (National Center for Biotechnology Information) GEO (Gene Expression Omnibus) DataSets (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>) より CEL ファイルでダウンロードした。マイクロアレイデータの正規化は統計解析ソフトウェア R を用いて Bioconductor (<https://www.bioconductor.org/>) の提供する affy library に含まれる justRMA 関数で行った。解析した 163 名の患者 (平均年齢 55.6 歳) は正常核型の AML と診断され、the German AMLCG 1999 trial に登録された患者であり、一般的な寛解導入療法と地固め療法で治療された。また 60 歳以下で適応があった場合には寛解導入後に同種血縁者間造血幹細胞移植を行われた患者も含まれていた³⁶。正規化したマイクロアレイのデータを用いて、症例毎に LIC 遺伝子セット 15 遺伝子の各発現量の Z スコアを足し合わせるにより各症例の LIC スコアを算出した (Figure 3)。163 名の症例を LIC スコア高値群 (n = 82)、低値群 (n = 81) に分けて生存曲線を描いたところ、LIC スコア高値群の症例が有意に予後不良となり、LIC スコアが AML の予後と相関することが示された (Figure 3)。

Z score in gene A (Z_A) = $(E_A - M_A)/SD_A$
LIC score = the sum of Z score

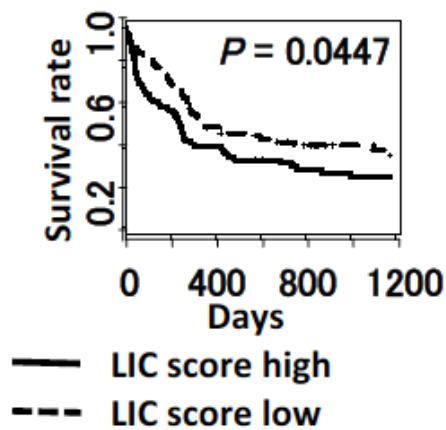


Figure 3: LIC スコアと正常核型 AML との予後の相関関係

Z_A : ある患者における遺伝子 A の Z スコア

E_A : ある患者における遺伝子 A の発現量

M_A : 患者 163 名の遺伝子 A の発現量の平均

SD_A : 患者 163 名の遺伝子 A の発現量の標準偏差

GSE12417 の遺伝子発現データを用いて、LIC 遺伝子セット 15 遺伝子の Z スコアを算出した。各遺伝子の Z スコア (Z_A) は、平均が 0、分散が 1 となるように発現量を標準偏差で正規化したデータで、それらを足し合わせることにより、各症例毎の LIC スコアを算出した。LIC スコア高値群 ($n = 82$)、低値群 ($n = 81$) で Kaplan-Meier 生存曲線を描いた。

(2) AML 症例検体は多様な遺伝子発現パターンを認める

GSE30375 の遺伝子発現データで LIC 群に高い発現を示す遺伝子 (Complete LSC-R Probe List FDR \leq 0.25, 1411 プローブ、1071 遺伝子) の中から、NCBI Gene (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene) や GeneCards (www.genecards.org) を用いて、細胞表面に発現する可能性があることが知られている 96 遺伝子を抽出し、その中から AML 患者細胞で発現がみられた 50 遺伝子を LIC 特異的な細胞表面抗原の候補として抽出した。そこで、本解析では LIC 遺伝子セット 15 遺伝子に加えて、LIC 特異的な表面抗原候補の 50 遺伝子、LIC に高発現を示す傾向があると報告されている TIM3, CD99、内部コントロールとして GAPDH, ACTINB を加えた合計 69 遺伝子の発現量を BioMark™を用いて解析した。内部コントロール遺伝子の GAPDH, ACTINB の発現がともに陽性だった well を有効とし、Singular™ Analysis Toolsets (Fluidigm) を用いて解析をおこなった。

AML 症例は AML 1 (FAB M4) と AML 3 (FAB M1) を使用し、それぞれ CD34⁺ CD38⁻細胞 (n = 66)、CD34⁺ CD38⁺細胞 (n = 30) ずつ解析した。CD38 の発現の有無に関わらず、細胞ごとに発現パターンの多様性を認めた (Figure 4)。

Figure 4-i AML 1

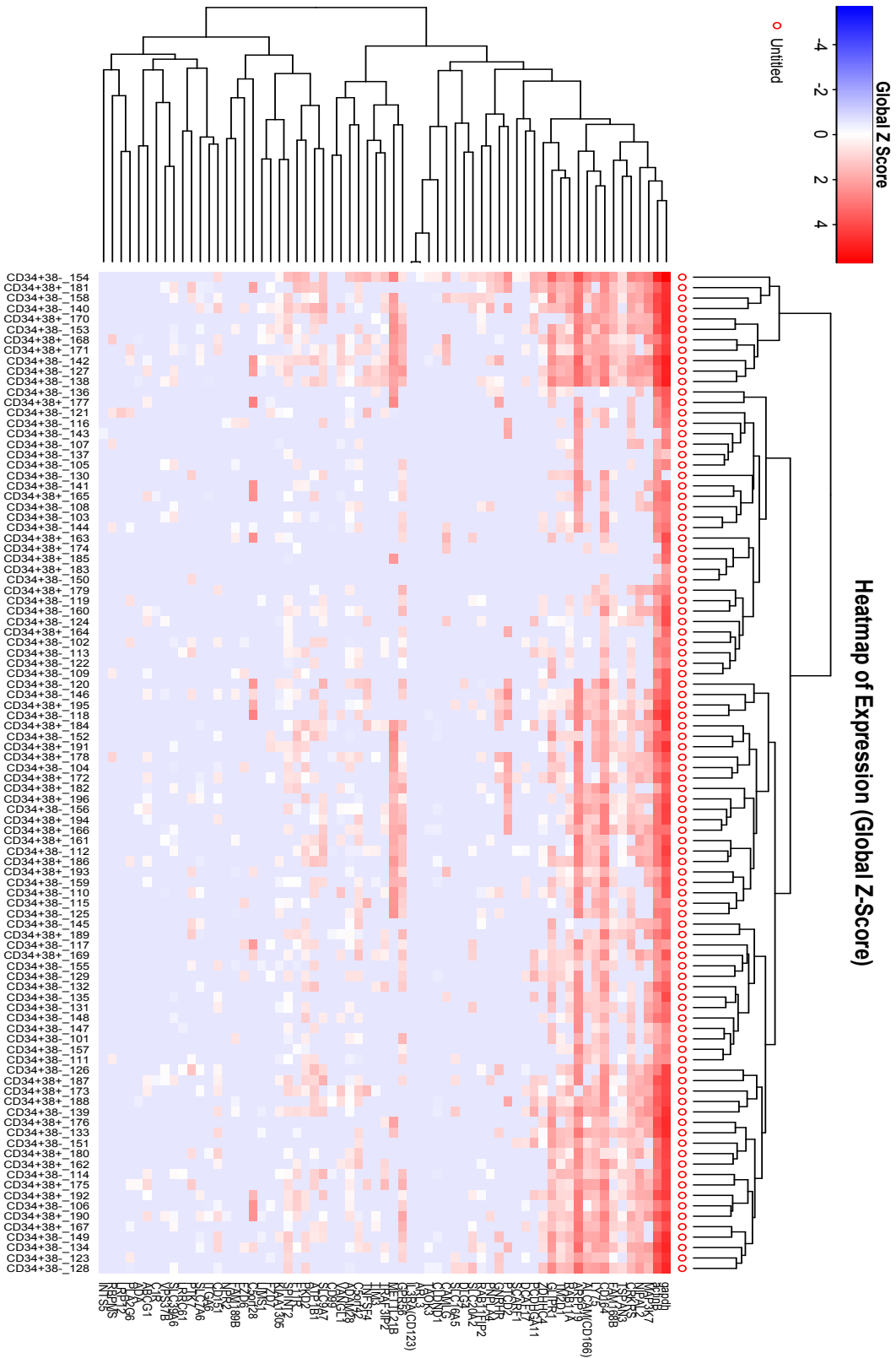


Figure 4-ii AML 3

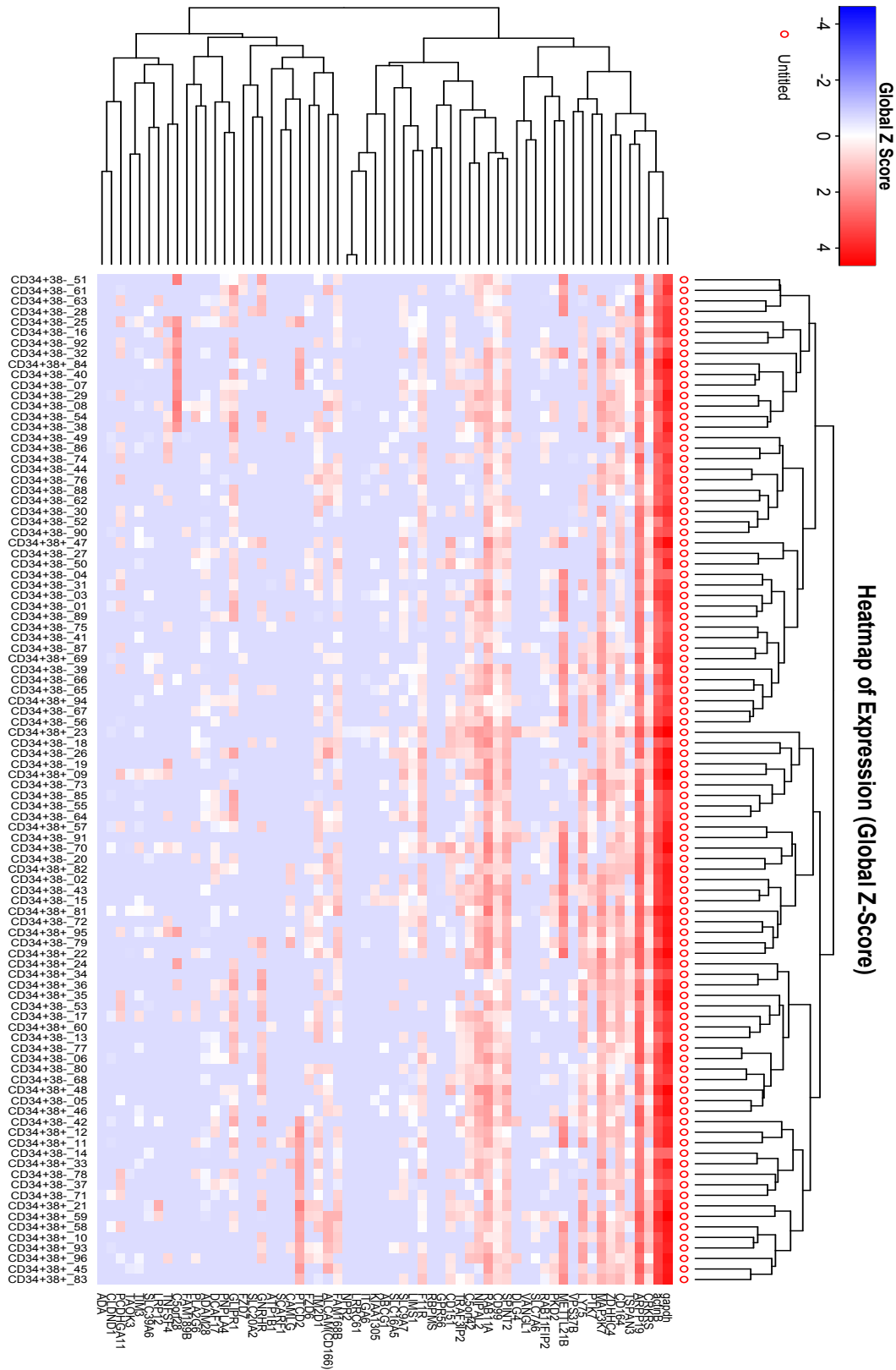


Figure 4: AML 症例 2 検体における単一細胞毎の遺伝子発現解析のヒートマップ

ヒト AML 細胞 (i) AML 1 と (ii) AML 3 を BioMark™ で、単一細胞毎の遺伝子発現解析を行った。細胞毎に遺伝子発現様式はばらつきを認めた。

(3) single-cell LIC スコアによる点数付けにより LSC に特異的な表面抗原候補として ALCAM 遺伝子を抽出した

多様な遺伝子発現パターンを認めた AML 細胞について、LIC 遺伝子セット 15 遺伝子の各発現量を症例毎に検討をしたところ、細胞毎にばらつきを認めた (Figure 5-i)。そこで単一細胞における各細胞の LIC スコア (single-cell LIC スコア) を算出し、LICらしさを single-cell LIC スコアで細胞毎に順位付けを行った。点数付けの方法は、症例毎に、LIC 遺伝子セットの各遺伝子について、その症例の平均発現量以上に発現している場合は 2 点、平均発現量以下の発現の場合は 1 点、発現を認めない場合は 0 点、と点数付けし、15 遺伝子の点数の総和を single-cell LIC スコアとした (Figure 5-ii)

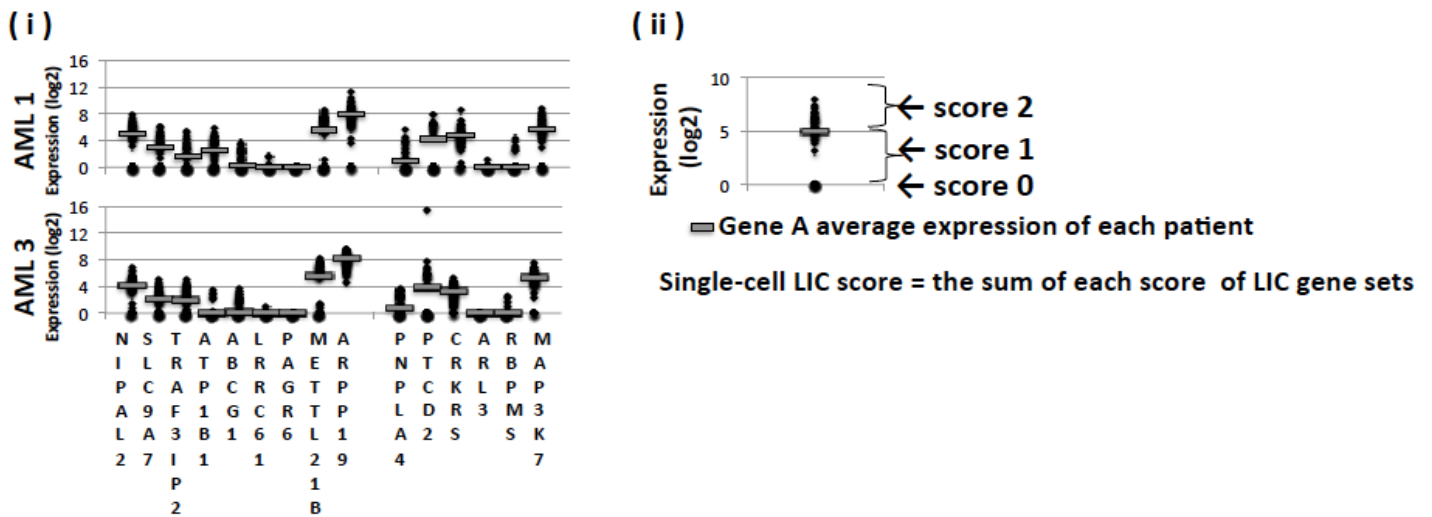


Figure 5: 単一細胞毎の遺伝子発現解析における single-cell LIC スコア算出方法

(i) 各症例毎の LIC 遺伝子セット 15 遺伝子の発現様式

(ii) Single-cell LIC スコアの算出方法は、LIC 遺伝子セットの各発現量を発現なし、平均以下の発現量、平均以上の発現量で 0, 1, 2 点と点数付けを行い、総和を single-cell LIC スコアとした。

各表面抗原候補遺伝子の発現量に応じて細胞を 3 分画に分けて、分画毎の平均 single-cell LIC スコアを算出した (Figure 6)。

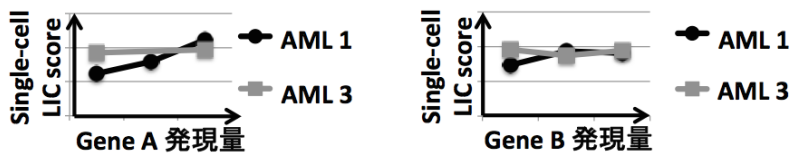


Figure 6: single-cell LIC スコアと白血病幹細胞に特異的な表面抗原候補遺伝子の相関関係

各候補遺伝子の発現量に応じて 3 分画にわけて、3 分画の平均 single-cell LIC スコアを算出し相関関係をみて、AML 1, AML 3 とともに正の相関関係を示した遺伝子を抽出した。

上記のように表面抗原候補遺伝子の発現量との相関関係を算出したところ、19 遺伝子の発現が 2 症例のいずれにおいても single-cell LIC スコアと正の相関を示し、その中には LIC で高発現すると報告されている CD99 や TIM3 が含まれており、我々の探索方法の妥当性が示唆された (Figure 7)。

ALCAM	CAMLG	CD151	CD164	CLDND1	F11R	FZD7	GPR56
ITGA6	ATP1B1	SLC16A5	PTCD2	PLA2G6	RAB11A	TAOK3	SLC7A6
CD99	VANGL1	TSPAN3	TIM3				

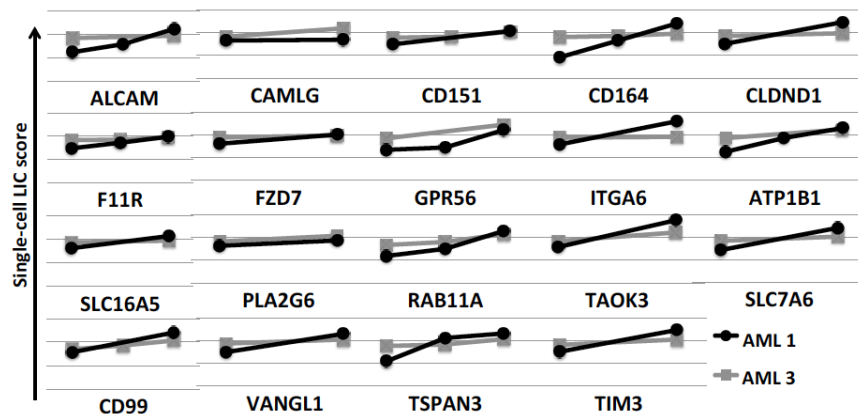


Figure 7: single-cell LIC スコアと正の相関関係を示した候補遺伝子

19 遺伝子が single-cell LIC スコアと正の相関関係を示した。その中には LIC を濃縮する遺伝子として報告のある CD99 や TIM3 が含まれていた。

そこで再び、遺伝子発現プロファイルと患者予後の関連を示した上述のマイクロアレイデータ (GSE12417) を用いて、抽出された 19 遺伝子毎に、高発現群 (n = 41) と低発現群 (n = 41) で生存期間を比較した。TIM3 は使用データに含まれておらず解析できなかったが、残る 18 遺伝子の中で唯一、Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM, CD166) 遺伝子のみが高発現群が低発現群と比較して有意に生存率が低かったことから、単一遺伝子レベルで AML の生物学的な性質に影響を与える可能性があると考え、同遺伝子に着目することとした (Figure 8)。

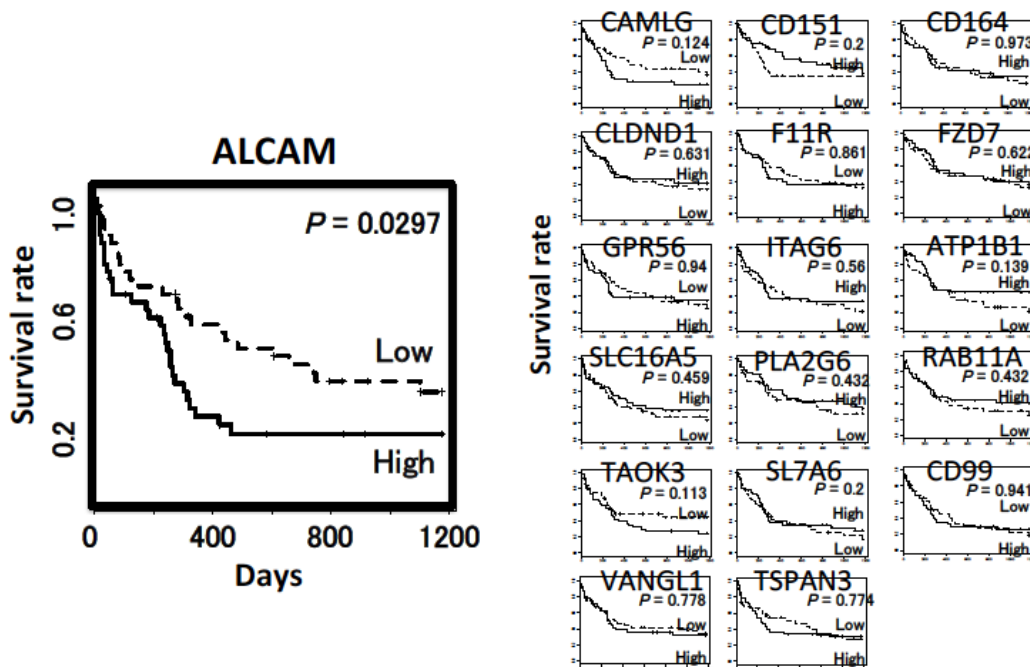


Figure 8: ALCAM 遺伝子の発現と正常核型の AML の予後と相関関係

GSE12417 の遺伝子発現データを用いて解析を行った。全症例の中から各候補遺伝子の発現量により高発現群 (上位 1/4) と低発現群 (下位 1/4) を抽出し、高発現群と低発現群で Kaplan-Meier 生存曲線を描いた。唯一 log-rank test で有意差を認めたのが ALCAM 遺伝子であった ($p < 0.05$)。

(4) CD34⁺ ALCAM 高発現分画は CD34⁺ ALCAM 低発現分画と比較してコロニー形成能が高い

AML 症例検体における ALCAM の発現をフローサイトメトリーで解析したところ、AML の病型によらず全ての検体の CD34⁺分画において、正常骨髄単核球 CD34⁺分画と比較して高い発現を認めた (Figure 9)。

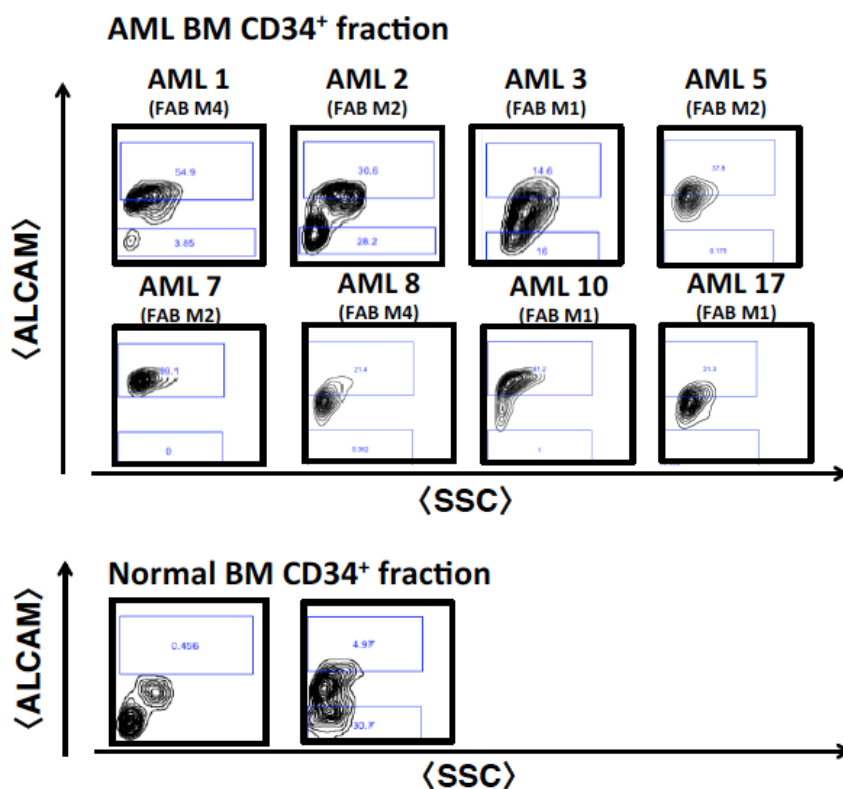


Figure 9: AML 症例検体は正常骨髄単核球と比較して CD34⁺分画における ALCAM 抗原の発現量が多い

AML 症例検体と正常骨髄単核球の CD34⁺分画における ALCAM 遺伝子の発現をフローサイトメトリーで解析したところ、多様な AML 病型において ALCAM の発現を認め、正常骨髄単核球における発現よりも高かった。

また CD34⁺ AML 細胞を ALCAM 高発現細胞と ALCAM 低発現細胞に分けて、未分化性の指標であるコロニー形成能を評価したところ、症例 AML 1、症例 AML

3 において CD34⁺ ALCAM 高発現細胞で顕著なコロニー形成能を示した (Figure 10-i)。一方で、従来のマーカーである CD34⁺ CD38⁺細胞と CD34⁺ CD38⁻分画の比較では、症例によりコロニー形成能が高い分画が異なっていた。また、その他の症例においても、CD34⁺ ALCAM 高発現細胞と、CD34⁺ ALCAM 低発現細胞について比較を行ったが、白血病細胞を *in vitro* で培養してコロニーを形成する症例は少なく、検討が行えた AML 4 においては前述した 2 症例と同様に CD34⁺ ALCAM 高発現細胞で顕著なコロニー形成能を示した (Figure 10-ii)。

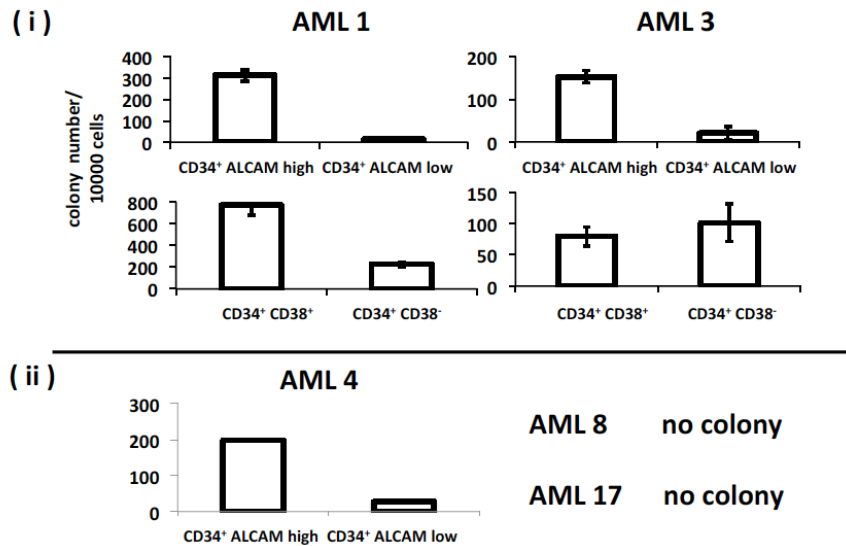


Figure 10: CD34⁺ ALCAM 高発現分画ではコロニー形成能が高い

(i) ヒト AML 症例検体 (AML 1, AML 3) を CD34⁺ ALCAM 高発現分画と CD34⁺ ALCAM 低発現分画に分離し、半固形培地で培養し 14-18 日後にコロニー数を算出したところ、CD34⁺ ALCAM 高発現分画におけるコロニー形成能が高かった。同じサンプルを既存の CD34⁺ CD38⁺分画と、CD34⁺ CD38⁻分画でも分離して培養を行ったところ、症例によりコロニー形成能が高い分画はばらつきを認めた。

(ii) ヒト AML 症例検体 (AML 4, AML 8, AML 17) についても CD34⁺ ALCAM 高発現分画と CD34⁺ ALCAM 低発現分画に分離して培養を行ったところ、AML 4 のみコロニー形成を認め、CD34⁺ ALCAM 高発現分画におけるコロニー形成能が高かった。

(5) ALCAM 発現量の違いにより明確な LIC 頻度の差は認められないが、1 症例においては CD34+陽性 ALCAM 高発現細胞に LIC が濃縮される

ヒト化マウス白血病モデルは免疫不全マウスに AML 症例検体を移植することによりヒト AML を発症させるモデルであり、ヒト AML 細胞の *in vivo* での AML 発症の有無を *in vivo* で解析できる唯一の方法である。AML 症例検体の CD34+ AML 細胞を ALCAM 遺伝子の高発現分画と、低発現分画に分けて、免疫不全マウスである NSG マウスに限界希釈法を用いて移植実験を行い、前述の ELDA で解析して LIC の存在頻度を両分画で比較した (Figure 11)。限界希釈法を用いた比較が可能であった 3 症例 (AML 4, AML 8, AML 5) のうち 2 例 (AML 8, AML 5) では ALCAM の発現により LIC の頻度は明確な差は認めなかったが、1 症例 (AML 4) においては有意差をもって CD34+ ALCAM 高発現分画で LIC の頻度が高かった。

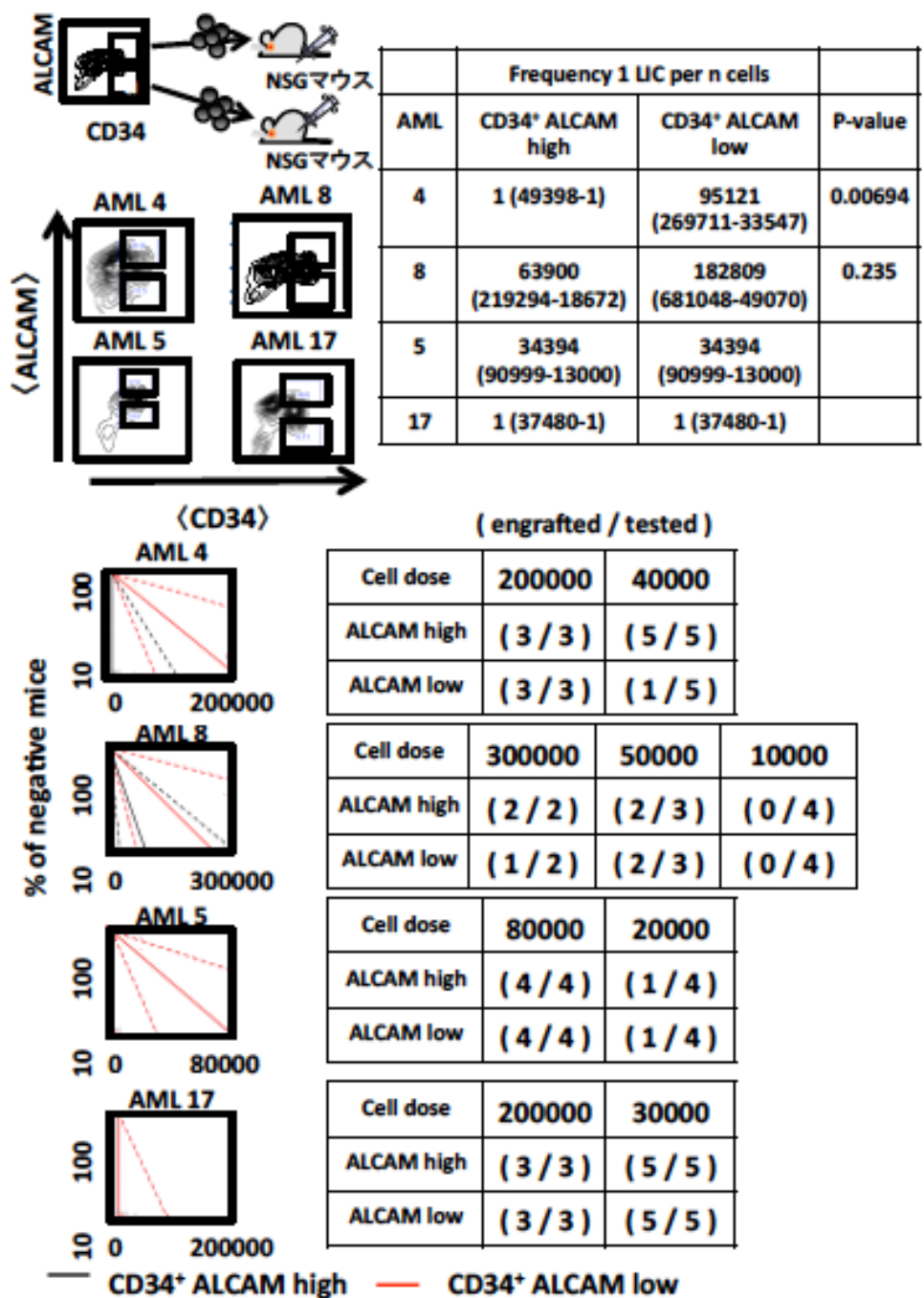


Figure 11: LIC の頻度は ALCAM 発現量の違いにより明確な差を認めない

4 つの AML 症例検体について CD34⁺ ALCAM 高発現分画と CD34⁺ ALCAM 低発現分画に分離をして、免疫不全マウスに移植をして、CD34⁺ ALCAM 高発現分画と CD34⁺ ALCAM 低発現分画の LIC の頻度を観察した。

また免疫不全マウスに生着したヒト AML 細胞は、ALCAM 高発現分画からは ALCAM 高発現細胞のみが生着し、ALCAM 低発現分画からは ALCAM 高発現細胞のみが生着したマウスと ALCAM 高発現細胞と ALCAM 低発現細胞が生着したマウスがあった (Figure 12)。

また解析できたのは 1 症例のみではあるが、生着した AML 細胞において、ALCAM 高発現分画と低発現分画で既存の分化関連表面抗原の発現に違いは認められず、ALCAM の発現量の差は単に分化段階の差を反映したものではない可能性が示唆された (Figure 13)。

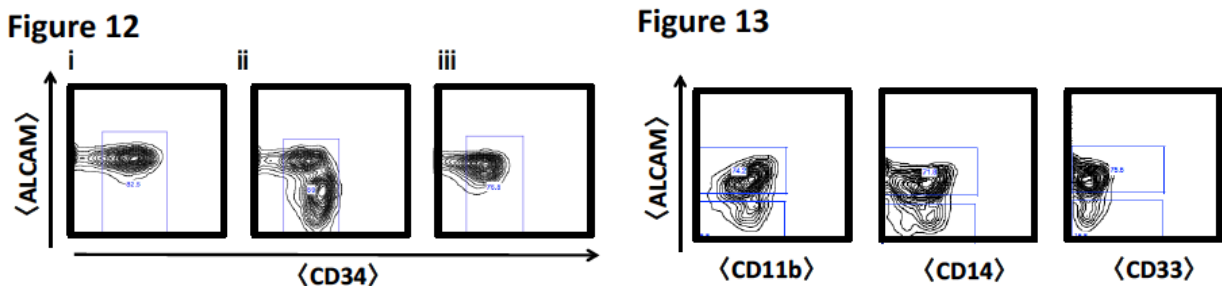


Figure 12: ALCAM 高発現分画、低発現分画ともに移植後は ALCAM 高発現の細胞が濃縮される

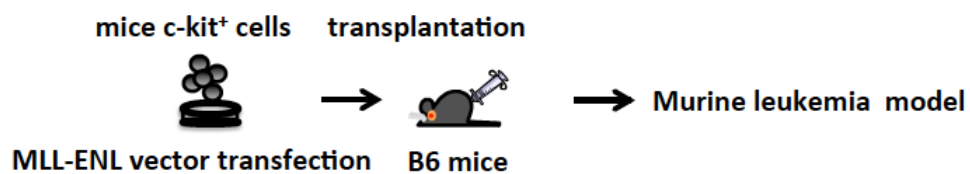
AML 症例検体 (AML 8) を CD34^+ ALCAM 高発現分画を移植した免疫不全マウス (i)、 CD34^+ ALCAM 低発現分画 (ii, iii) を移植した免疫不全マウス、それぞれに生着した白血病細胞の CD34^+ 分画における ALCAM の発現を確認した。他の症例においても同様の傾向を示した (記載なし)

Figure 13: ALCAM の発現は既存の分化関連表面抗原とは連動をしない

AML 症例検体 (AML 8) を移植して免疫不全マウスに生着した細胞を解析した。ALCAM 高発現分画と低発現分画で、既存の分化関連表面抗原の発現に違いは認められなかった。

(6) マウス AML モデルにおいて AML 細胞は ALCAM を発現していない

ヒト AML 検体症例で ALCAM の発現の違いにより LIC の頻度が唯一異なった AML 4 の検体は MLL 遺伝子の再構成を伴う染色体異常をもつ AML であった。そこで MLL 遺伝子再構成を伴うマウス AML モデルのひとつであり代表的な難治性 AML のモデルの一つである MLL-ENL 陽性マウス AML モデルで ALCAM 遺伝子の役割について検討を行った。MLL-ENL 融合遺伝子をレトロウイルスによりマウス正常骨髄 c-kit⁺細胞に導入し、非致死量照射マウスに移植して MLL-ENL 陽性 AML を発症させた。マウス AML モデルで ALCAM 遺伝子の発現を調べたところ、マウス AML において LSC を濃縮することが知られている lineage⁻ (Lin⁻) c-kit⁺ 画における ALCAM 遺伝子を発現している細胞の割合は 4.84% とごくわずかであり、ヒト AML 症例検体とは明らかにその発現パターンが異なっていた (Figure 14)。



MLL-ENL induced AML

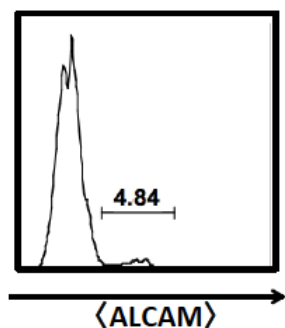


Figure 14: マウス AML モデル 骨髄 Lin⁻ c-kit⁺分画における ALCAM の発現は低い

(i) マウス正常骨髄 c-kit⁺細胞に MLL-ENL 融合遺伝子をレトロウイルスにより導入して発症させた MLL-ENL 陽性 AML 細胞における ALCAM の発現量は、Lin⁻ c-kit⁺分画において低かった。3 回以上検討をし、代表的な図を掲載した。

(7) マウス AML モデルにおいて ALCAM 発現レベルにより LIC 頻度に差はない

MLL-ENL 融合遺伝子をレトロウイルスにより導入して発症させた MLL-ENL 陽性 AML 細胞の、未分化な分画である Lin⁻ c-kit⁺分画を ALCAM 高発現細胞と低発現細胞に分けて、非致死量の放射線を照射した C57BL/6 マウスに移植したところ、Lin⁻ c-kit⁺ ALCAM 高発現分画と Lin⁻ c-kit⁺ ALCAM 低発現分画では LIC の頻度に差を認めなかった (ALCAM high vs ALCAM low: 138 (282-67.7) vs 148 (300-72.7)) (Figure 15)。

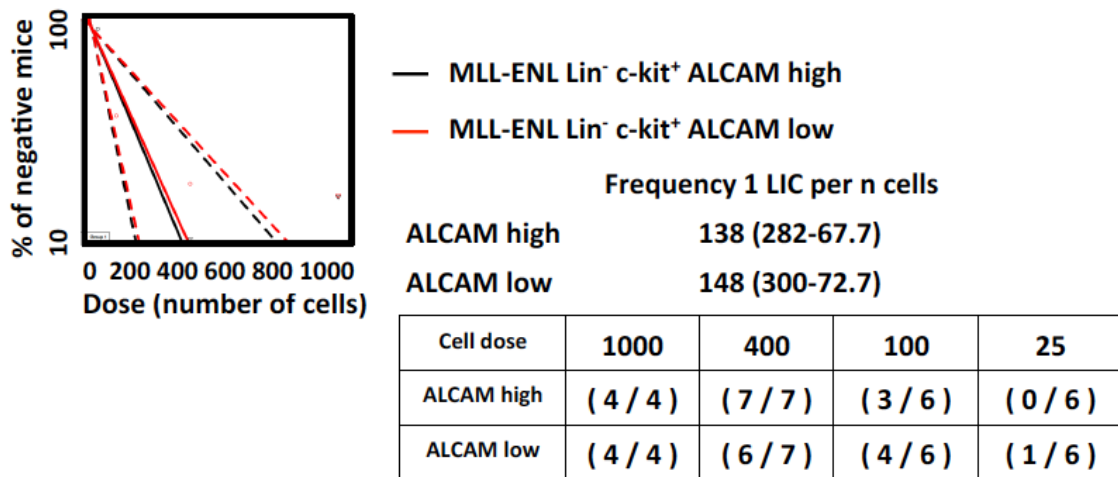


Figure 15: MLL-ENL AML モデルマウスでは ALCAM の発現により LIC の頻度に差を認めない

MLL-ENL マウス白血病細胞 Lin⁻ c-kit⁺分画を ALCAM 高発現群と低発現群にわけて、限界希釈法を用いた移植実験を行い、LIC の頻度に差を認めなかった。

(8) マウス AML モデルとヒト AML 細胞における ALCAM 遺伝子の役割は異なる

次に ALCAM KO マウスを用いてマウス AML モデルを作成した³⁷。ALCAM KO マウスと ALCAM WT マウスの造血細胞に MLL-ENL 融合遺伝子をレトロウイルスで導入してレシピエントマウスに移植することにより、AML 発症能の違いを確認した。また骨髄環境における ALCAM の発現も造血系に影響を与えるという報告があるため、レシピエントにも ALCAM KO マウス、ALCAM WT マウスを用いて移植を行った^{38,39}。その結果、ドナー、レシピエントの ALCAM の有無により AML 発症能・生存期間に差を認めなかった (Figure 16)。

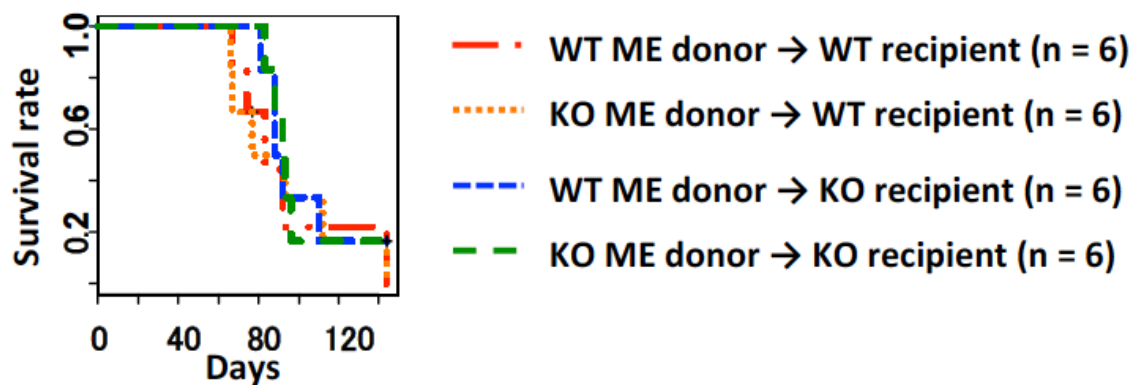


Figure 16: MLL-ENL AML モデルマウスの生存期間は ALCAM の影響を受けない

MLL-ENL 融合遺伝子 (ME) をレトロウイルスで ALCAM WT および KO の骨髄 c-kit⁺ 分画に導入し、移植実験を行った。レシピエントに ALCAM WT と ALCAM KO を用いて 4 系統で比較したところ、発症能に有意差を認めなかった。

また二次移植でも同様の結果であった (Figure 17)。

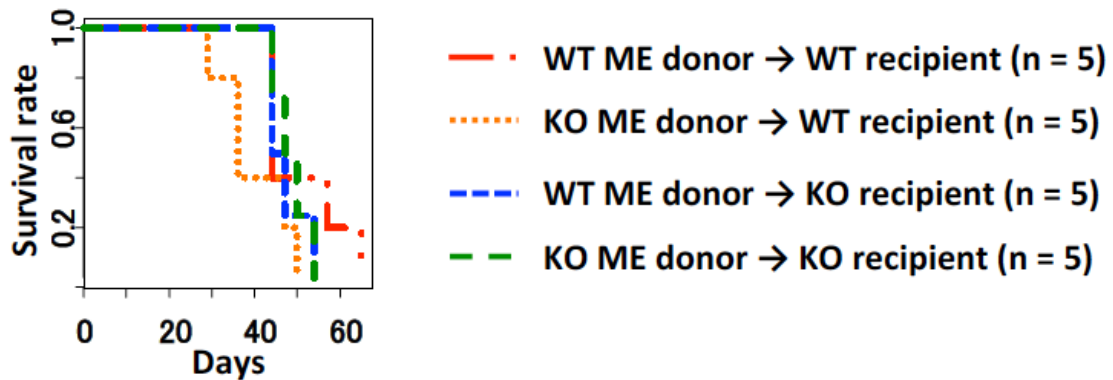


Figure 17: 二次移植においても生存期間に影響は認められない

以上のことからマウス AML モデルは ALCAM 遺伝子の発現している割合がヒト AML 症例検体と比較して低く (Figure 9, Figure 14)、ALCAM 発現と LIC の頻度にも関連が見られないなど、ヒトとマウスの AML において ALCAM の果たす役割は異なることが示唆された。

(9) AML 細胞株において ALCAM 遺伝子をノックダウンすると、in vitro で増殖能が低下する

次にヒト AML 細胞株を用いて、ALCAM の機能について in vitro で解析を行った。ALCAM 遺伝子が発現していると報告されている MLL 遺伝子再構成を伴う染色体異常を有する AML 細胞株、THP-1 細胞株を使用して shRNA による ALCAM のノックダウンを行った⁴⁰。ALCAM の発現量をフローサイトメトリーで確認し発現量が低下していることを確認した (Figure 18)。次に in vitro で ALCAM ノックダウン細胞とコントロール細胞の増殖能を比較したところ、ALCAM ノックダウン細胞では増殖速度が低下した (Figure 19)。

Figure 18

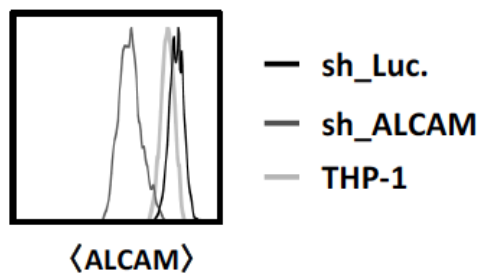


Figure 19

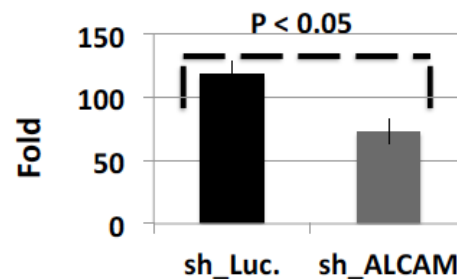


Figure 18: ALCAM の発現量はノックダウン細胞で低下している

shRNA vector をレトロウイルスを用いて THP-1 に導入し ALCAM 遺伝子をノックダウンを行い、発現量をフローサイトメトリーで解析した。

Figure 19: ALCAM ノックダウン細胞はコントロール細胞に比べて増殖能が低下する傾向にある

ALCAM ノックダウン細胞とコントロール細胞を 2×10^5 cells/ml ずつ培養し、2 日毎に細胞数を計上して継代し、day 6 における増殖倍率を比較したところ、ALCAM ノックダウン細胞で増殖能が低下した。

(10) THP-1 細胞株において ALCAM 遺伝子をノックダウンするとシタラビン (Ara-C) 処理時のアポトーシスの割合が増加する

ALCAM ノックダウン THP-1 細胞とコントロール細胞を、AML 治療におけるキードラッグであるシタラビン (東京化成工業株式会社、東京, Ara-C) 0 μM 、1 μM 、4 μM 、10 μM で処理して細胞数の変化を比較したところ、ALCAM をノックダウンした細胞では Ara-C に対する感受性が亢進していた (Figure 20)。ALCAM ノックダウン細胞では Ara-C 処理後の早期アポトーシス細胞の割合が有意に高く、ALCAM はアポトーシスの抑制を介して AML 細胞の治療抵抗性に寄与している可能性が示唆された (Figure 21)。

Figure 20

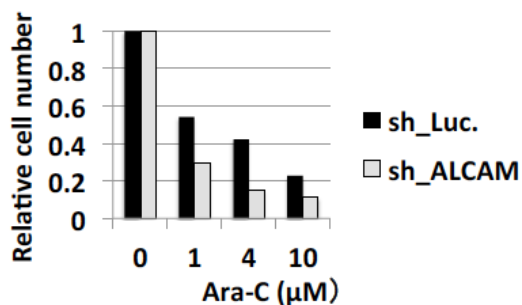


Figure 21

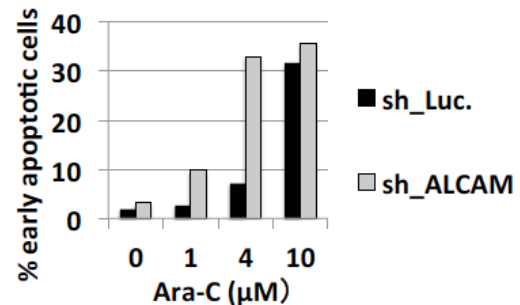


Figure 20: Ara-C を投与すると ALCAM ノックダウン群はコントロール群に比べて細胞数の減少率が高い

Ara-C を 0, 1, 4, 10 μM ずつ、ALCAM ノックダウン群、コントロール群 (2×10^5 cells/ml) に投与し、48 時間後に細胞数のカウントを行った。

Figure 21: Ara-C を投与すると ALCAM ノックダウン群では早期アポトーシス細胞の割合が増加する

Ara-C を 0, 1, 4, 10 μM ずつ、ALCAM ノックダウン群、コントロール群 (2×10^5 cells/ml) に投与し、48 時間後に AnnexinV-APC と DAPI を用いて常温で 15 分染色しフローサイトメトリーにて解析を行った。

(11) ALCAM をノックダウンすると、THP-1 細胞の異種移植実験で AML の進行が遅延する傾向にある

次に ALCAM ノックダウン THP-1 細胞株とコントロール THP-1 細胞株をそれぞれ免疫不全マウスに異種移植して AML を発症させ、生存期間を観察したところ、有意差はないが ALCAM ノックダウン群で生存期間が延長する傾向が認められた (Figure 22)。

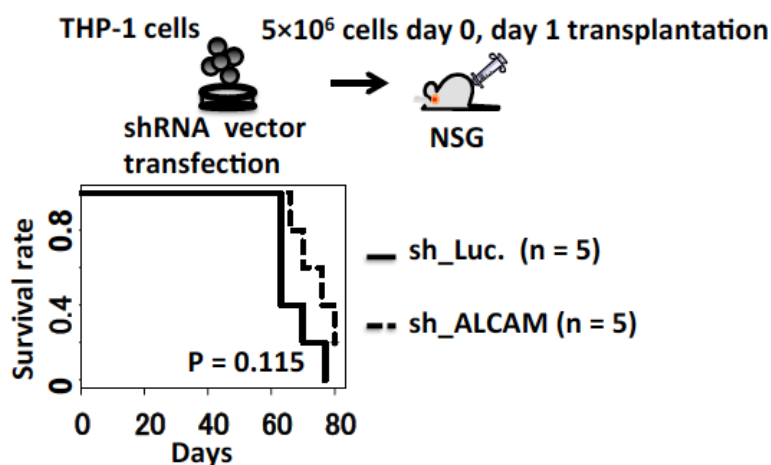


Figure 22: ALCAM ノックダウン群はコントロール群と比較して、THP-1 異種移植実験において白血病の進行が遅延する傾向にある

ALCAM ノックダウン THP-1 と、コントロール THP-1 を前処置としてシクロフォスファミド 100 mg/kg/day 腹腔内投与 (day 0, day 1) した上で、それぞれ免疫不全マウスに 5×10^6 cells (day 0, day 1) 移植した。ノックダウン細胞を移植したマウスでは白血病の進行が遅延する傾向にあった。

ALCAM ノックダウン群において生着した細胞は移植前の細胞と比較して、ALCAM を高発現する、ノックダウン効果の弱い細胞が濃縮されていた (Figure 23)。以上のことから、ALCAM は単にマーカーになるだけでなく、*in vivo* においても AML の生着あるいは進行に寄与していると考えられた。

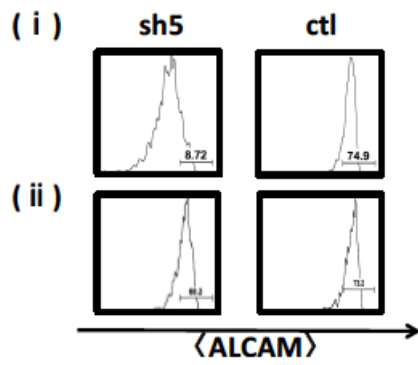


Figure 23: 生着した細胞は ALCAM ノックダウン THP-1、コントロール THP-1 ともに ALCAM を高発現している

(i) 移植前 (ii) 移植後の ALCAM の発現をフローサイトメトリーで解析を行ったところ移植後の THP-1 はコントロール細胞、ノックダウン細胞ともに ALCAM 高発現細胞が濃縮されていた。

(12) soluble ALCAM により ALCAM を阻害すると、THP-1 細胞の増殖能が低下し、Ara-C 処理後のアポトーシスの割合が増加する

shRNA を用いた ALCAM の機能阻害では、上述のようにノックダウン効率の悪い細胞が選択的に増加してしまい、ALCAM の有無による差をマスクしてしまう可能性があることから、soluble ALCAM の細胞質外分泌による ALCAM-ALCAM 結合の阻害という方法を用いた ALCAM シグナルの阻害を試みた^{31,41}。さらに Figure 22, 23 の方法では、ALCAM が AML 細胞の移植後のホーミングと生着のみを抑制している可能性を否定できないので、テトラサイクリン遺伝子発現誘導システム (tet-on system) で soluble ALCAM 遺伝子を誘導できるレンチウイルスベクターを THP-1 に導入した細胞株を作成した。Soluble ALCAM 誘導群 (doxycycline 1 µg/ml) と非誘導群に分けて in vitro で培養し、細胞数を計測したところ、soluble ALCAM 誘導群では増殖能が低下した (Figure 24)。

Ara-C を 0 µM、1 µM、4 µM、10 µM の濃度で添加して、soluble ALCAM 誘導群と非誘導群を比較して細胞数の変化を比較した (Figure 25)。早期アポトーシス細胞の割合も soluble ALCAM 誘導群は非誘導群と比較して増加しており、ALCAM の機能阻害により、Ara-C 投与時にアポトーシスが增強されると考えられた (Figure 26)。

Figure 24

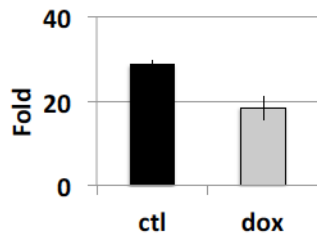


Figure 25

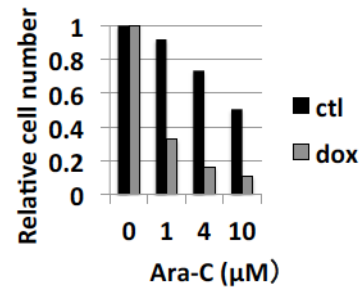


Figure 26

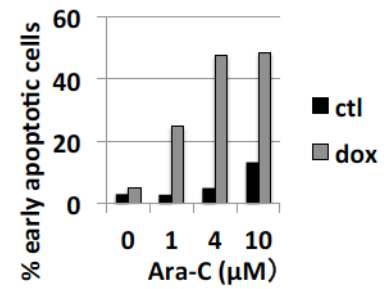


Figure 24: tet-inducible soluble ALCAM vector を導入した THP-1 において soluble ALCAM 誘導群は非誘導群と比較して増殖能が低下する

In vitro で培地に soluble ALCAM 誘導群 (doxycycline 1 μg/ml) と非誘導群で 2×10^5 cells/ml ずつ培養し day 6 での増殖倍率を比較したところ、soluble ALCAM 誘導群では増殖の抑制を認めた。

Figure 25: Ara-C を投与すると soluble ALCAM 誘導群は非誘導群に比べて細胞数の減少率が高い

tet-inducible soluble ALCAM vector を導入した THP-1 (2×10^5 cells/ml) に Ara-C を 0, 1, 4, 10 μM ずつ、soluble ALCAM 誘導群、非誘導群にわけて培養し、48 時間後に細胞数のカウントを行った。

Figure 26: Ara-C を投与すると soluble ALCAM 誘導群では早期アポトーシス細胞の割合が増加する

tet-inducible soluble ALCAM vector を導入した THP-1 (2×10^5 cells/ml) に Ara-C を 0, 1, 4, 10 μM ずつ、soluble ALCAM 誘導群、非誘導群にわけて培養し、48 時間後に AnnexinV-APC と DAPI を用いて常温で 15 分染色しフローサイトメトリーにて解析を行った。

(13) soluble ALCAM により ALCAM の機能を阻害すると、THP-1 細胞の異種移植で AML の進行が遅延する

次に tet-on system の soluble ALCAM 遺伝子を導入した THP-1 細胞を免疫不全マウスに異種移植し、細胞生着後の移植 2 週間後より soluble ALCAM 誘導群（飲料水中に doxycycline 2 mg/ml + 5% スクロースを入れて投与）と、非誘導群にわけて生存期間を比較したところ、soluble ALCAM 誘導群での生存期間が延長した (Figure 27)。移植 2 週間後から doxycycline を投与したので、この系では ALCAM の機能阻害によるホーミング・生着への影響は考えにくいことから、in vivo において soluble ALCAM で ALCAM の機能を阻害することで、AML の進行が抑制されることが明らかになった。

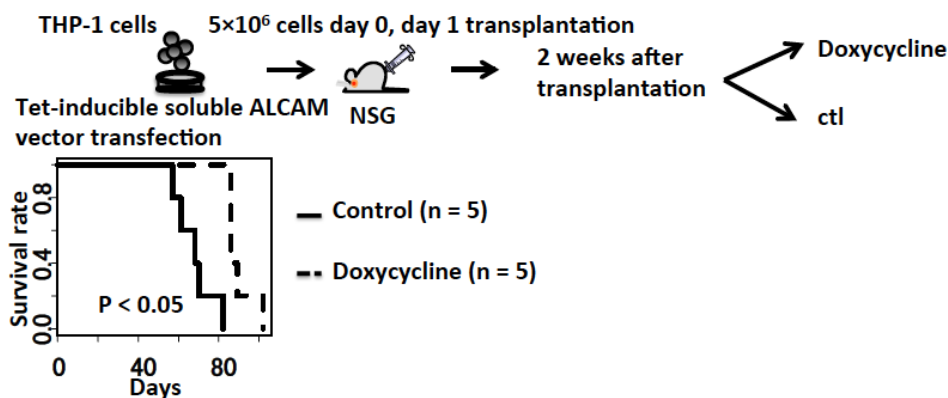


Figure 27: soluble ALCAM 誘導群は非誘導群と比較して、移植実験において生存期間の延長を認める

tet-inducible soluble ALCAM vector を導入した THP-1 を前処置としてシクロフォスファミド 100 mg/kg/day 腹腔内投与 (day 0, day 1) を行った上で、それぞれ免疫不全マウスに 5x10⁶ cells (day 0, day 1) 移植した。移植 2 週間後から soluble ALCAM 誘導群（飲料中に doxycycline 2 mg/ml + 5% スクロースを入れて投与）と非誘導群にわけて生存を比較したところ、soluble ALCAM 誘導群に生存期間の延長を認めた。

(14)ヒト AML 症例検体で ALCAM の機能を阻害すると、移植実験で骨髄への生着割合が有意に低下する

ALCAM 遺伝子の高発現が確認されているヒト患者由来 AML 細胞の CD34⁺分画をソートして tet-on system で soluble ALCAM を発現させるレンチウイルスベクターを導入し、免疫不全マウスに移植を行った。12 週後に骨髄細胞を回収し、レンチウイルスが導入された細胞 (Kusabira Orange 陽性細胞) をソートして、免疫不全マウスに移植し、生着後の移植 2 週間後から soluble ALCAM 誘導群 (飲料中に doxycycline 2 mg/ml + 5%スクロースを入れて投与) と非誘導群に分けて、移植後 12 週で骨髄の hCD45 陽性 AML 細胞の生着割合を解析した。患者由来 AML 細胞においても THP-1 細胞株と同様に、soluble ALCAM で ALCAM の機能を阻害すると、AML 細胞の増殖が抑制された (Figure 28)。

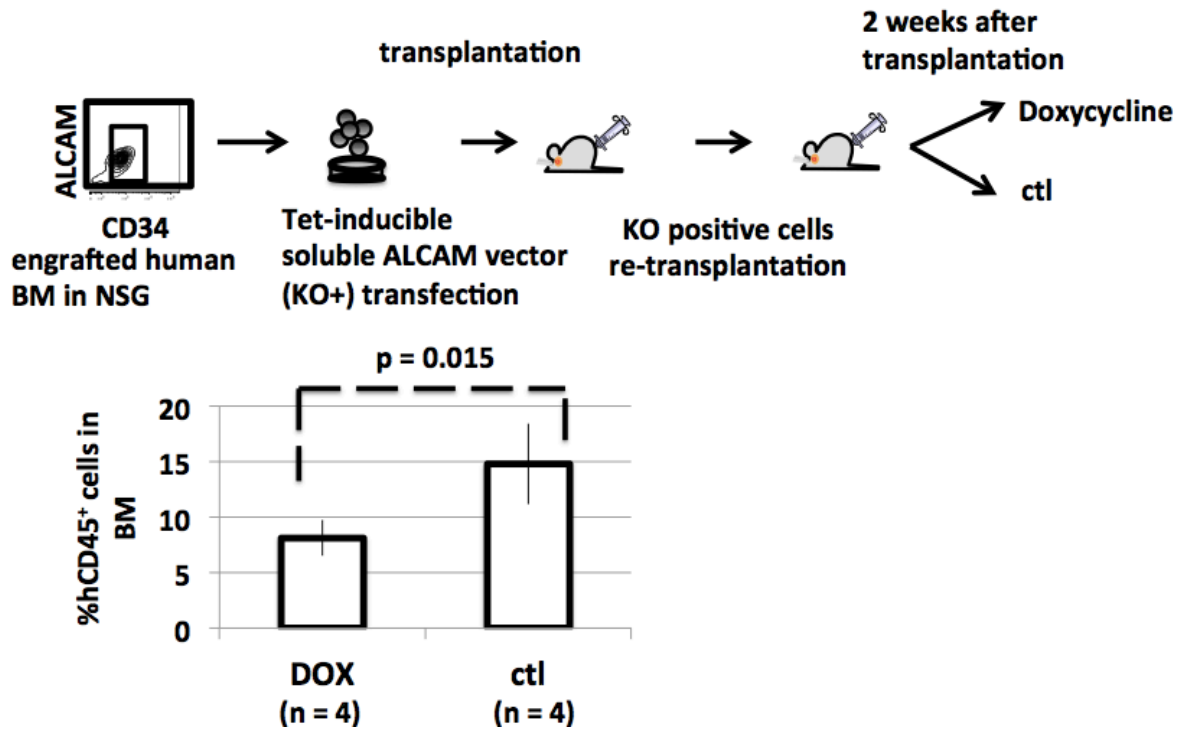


Figure 28: ヒト患者由来 AML 細胞においても doxycycline 投与群は生存期間の延長を認める

tet-inducible soluble ALCAM vector (selective marker: Kusabira-Orange) をレンチウイルスを用いてヒト AML 患者検体 (AML 8) に導入し、免疫不全マウスに移植後した。生着した細胞の中で Kusabira Orange 陽性の細胞を前処置なしで 1×10^4 cells ずつ再移植した。移植 2 週間後から soluble ALCAM 誘導群 (飲料水中に 2 mg/ml + 5%スクロースを入れて投与) と非誘導群にわけて移植後 12 週の骨髄生着細胞における hCD45 陽性細胞の割合をフローサイトメトリーで解析した。

【考察】

本研究で私は LSC に特異的な新規表面抗原の同定を目的とし、単一細胞毎の遺伝子発現解析により LSC に特異的な表面抗原の候補遺伝子として ALCAM 遺伝子を抽出した。そして抽出した候補遺伝子である ALCAM はヒト AML の一部の症例において LIC を濃縮するマーカーである可能性があること、また ALCAM の機能阻害により AML 細胞の白血病発症能が阻害される可能性があることについて示し、ALCAM が AML の治療標的になりうることを示した。

新規 LSC 特異的 surface 抗原の探索を目的とした先行研究はあるが、AML 細胞は遺伝子変異の異なる数種類のクローンが混在していることに加えて、鋭敏な LSC のマーカーが存在しないことなどが、解析の障壁となっている。本研究では単一細胞毎に LIC に特異的な遺伝子発現パターンを single-cell LIC スコアとして点数付けするという方法を採用した。この方法により、個々の細胞の LIC らしさを正確に捉えることができるようになり、雑多な AML の細胞集団を対象としたこれまでの研究では検出できなかった、LSC 特異的 surface 抗原を検出できるのではないかと考えた。また治療標的の検索という点においても、LIC 遺伝子セットの中にあらかじめ HSC と発現量が大きく異なる遺伝子という条件を加えて single-cell LIC スコアを算出することにより、LSC に特異性の高い遺伝子を検出することが可能となり、また多くの細胞で発現量を定量して十分に発現の高い遺伝子を選択することにより、その分子が治療標的として有望であるかどうかを、あらかじめスクリーニングすること

が可能となるメリットがあるのではないかと考えた。

単一細胞毎の発現量を single-cell LIC スコアで順位付けをして、LIC らしい細胞で発現量の高い表面抗原候補遺伝子を抽出するにあたり、LIC 遺伝子セットの抽出が必要であった。既存の報告で、ヒト AML 細胞を用いて LSC に特異的な遺伝子発現パターンを捉えようとする遺伝子発現解析の報告はいくつかあるが^{21,42,43}、LSC の多い分画と低い分画をどのように割り当ててるのかは報告によって異なっており、正常骨髄と同様の階層構造を持ち未分化な分画に LSC が多いということを前提に、未分化な表現型を有する分画 (CD34⁺ CD38⁻分画) を分化した表現型を有する分画 (CD34⁺ CD38⁺分画) と比較する報告が多かった^{42,43}。しかし前述した通り、白血病細胞では LSC は未分化な表現型を有する分画に限らず存在することが知られており、実際に LSC を多く含むかどうかを唯一 in vivo で検証することができるのは、免疫不全マウスにヒト白血病細胞を移植し生着するかどうかを判定する異種移植実験の系に限られているため、実際に移植をして生着した群を LIC 群、生着しなかった群を non-LIC 群として測定していた GSE30375 が公開されているデータベースの中で最も LIC の特徴を捉えている可能性が高いと考え、GSE30375 を用いて LIC 遺伝子セットを抽出することとした²¹。

抽出できた 15 遺伝子を用いて算出した LIC スコアが AML の予後と相関した (Figure 3)。既存のマイクロアレイのデータで AML 細胞全体の遺伝子発現プロファイルが LSC に特徴的な発現パターンだと予後が悪いことが知られており²⁹、本

研究の結果は化学療法抵抗性を示す LSC 割合が多い AML 症例が予後不良であることをよく反映していると考えられた。

単一細胞での発現量解析を CD34⁺CD38⁻分画 (n = 66)、CD34⁺CD38⁺分画 (n = 30)、2 症例で解析を行ったところ、細胞毎に発現パターンのばらつきを認め、CD38 の有無に依存しない多様な発現パターンを認めた (Figure 4)。AML は数クローンから構成される不均一な集団であることが報告されており⁴⁴⁻⁴⁶、クローンによる発現パターンの違いや分化段階による発現パターンの違いなどが混在していると考えられた。

今回の単一細胞レベルの遺伝子発現解析で LSC に特異的な表面抗原を抽出したが、それぞれの症例毎の細胞数は 96 細胞ずつと十分量の細胞数を用いて解析が行われており、多様な細胞集団の中から白血病幹細胞に特異的な表面抗原候補遺伝子を抽出できたことから、2 症例においては single-cell LIC スコアを用いた順位付けによる表面抗原の探索は機能しており、内的妥当性は高いと考えられる。しかし 2 症例のみの解析であるため LIC スコアの有用性、LIC スコアと ALCAM 遺伝子の関連については、さらに多数例での検証が必要と考えられる。

私がこの方法で抽出した ALCAM については、単一細胞レベルでの遺伝子発現解析を行った症例だけではなく、多くのヒト AML 症例検体において、未分化な分画である CD34⁺細胞において高い発現を認めた (Figure 9)。ヒト正常骨髄単核球における未分化な細胞分画である CD34⁺分画では、個体差があるものの、AML 細胞

と比較すると概して発現が低かったので、特異性の条件を満たしているものと考えた。AML 症例における ALCAM 発現が生存期間と関連していて ALCAM が AML の生物学的な性質に何らかの役割を果たしている可能性があること (Figure 8)、ALCAM KO マウスでも造血系も含めて大きな表現型の異常はなく、長期生存可能であると報告されていることから³⁷、ALCAM は治療効果・副作用の両面において、治療標的としても有望であると考えて、解析を進めることにした。

ALCAM は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する I 型膜貫通タンパクであり、ALCAM とのホモ結合、および CD6 とのヘテロ結合が知られている接着因子である⁴⁷。近年いくつかの固形腫瘍において、ALCAM の発現レベルと予後との相関関係が報告されている⁴⁸⁻⁵⁰。また血液領域においては、造血幹細胞ニッチにおいて ALCAM が発現していることが知られている³⁸。近年、マウスの HSC において ALCAM は長期造血再構築能を有する造血幹細胞を標識していると複数のグループから報告されたが^{30,39}、ALCAM の有無による造血幹細胞機能の差は致死量の放射線を照射したマウスに移植する系でのみ検出され、造血ストレスを加えない定常状態での造血に対する ALCAM の寄与は大きくないと考えられること³⁷、また我々の解析で ALCAM はマウス AML 細胞ではほとんど発現していなかったことなどを考えると、正常造血細胞における ALCAM の発現・機能はマウス骨髄移植という特殊な状況でのみ重要である可能性や、ALCAM の発現・機能に関してはヒトとマウスの種間差が大きい可能性があると考えている。

ヒト AML 症例細胞において ALCAM 遺伝子が LSC を濃縮するか調べるために、*in vitro* における未分化性の評価系であり LSC 活性のサロゲートマーカーとなるコロニー形成能アッセイを行った。CD34⁺ CD38⁺分画と CD34⁺ CD38⁻分画の比較においては、Dick らの報告と同様に、症例によってコロニー形成能が高い分画が異なった²¹。一方で CD34⁺ ALCAM 高発現分画と CD34⁺ ALCAM 低発現分画を比較した実験においては CD34⁺ ALCAM 高発現分画においてコロニー形成能が高かった。異種移植実験で生着しても、*in vitro* の系であるコロニー形成能ではコロニー形成の見られない症例が多く、現段階では 3 症例のみでの検討となり、更なる症例数の検討が必要ではあるが、ALCAM が LSC を濃縮する可能性が示唆された。

限界希釈法を用いた移植実験では、有効な結果と考えられた 3 症例 (AML 4, AML 8, AML 5) のうち CD34⁺ ALCAM 高発現分画において 1 症例については有意差をもって LIC の頻度が高かったが、症例によって差が大きく、全症例では ALCAM 発現量により LIC の頻度に明確な差は認めなかった (Figure 11)。先行研究では CD34 の発現の有無に関わらず、AML 患者検体を単に目的遺伝子の高発現群、低発現群に分けて LIC 頻度の解析を行っている場合が多いが²⁷、CD34 との交絡の影響を否定できない問題点があると考えられたため、本研究は CD34 と独立した LIC のマーカーであることを示す目的で、CD34⁺分画における ALCAM 高発現と低発現分画に分離して移植実験を行った。予想した通り、症例によっては CD34 と ALCAM の発現が相関し、CD34⁺分画のほとんどが ALCAM 高発現を示す症例

(AML 5, AML 8) があり、その中で相対的に ALCAM を高発現、低発現する分画に分離して移植したことで、結果として ALCAM 低発現分画にも多くの LIC が含まれることになり、LIC の頻度の差が少ないと判定される方向に働いたと考えられた。このような CD34 の発現と ALCAM の発現の相関が強い症例においては LIC のマーカーとして CD34 に ALCAM を上乗せする意義は相対的に低いと考えられた。ALCAM の LIC マーカーとしての意義を確立するためには、先行研究と同様、CD34 発現に関わらず ALCAM 発現の有無のみにより LIC の頻度を比較し、ALCAM の LIC マーカーとしての意義を検討する必要があると考えられた²⁷。

一方、マウス白血病モデルの解析においては、ALCAM 遺伝子が LSC を標識することを示唆する所見は得られなかった。ヒト AML 症例検体においては未分化な CD34⁺分画の多くの細胞が ALCAM を発現していたが、マウス AML モデルにおいては同じく未分化な分画である Lin⁻c-kit⁺分画において、ほとんど ALCAM の発現を認めなかった (Figure 14)。また MLL-ENL 融合遺伝子導入により作成した、ALCAM KO マウスと WT マウス由来の AML 細胞を比較しても、AML 発症能に差は認められなかった (Figure 16, 17)。マウス AML モデルは他にも種類があるため更なる検討は必要ではあるが、ヒト AML 検体症例で ALCAM 高発現分画に LIC が有意差をもって濃縮された AML 4 の検体は MLL 遺伝子の再構成を伴う染色体異常をもつ AML であり、MLL 遺伝子再構成を伴うマウス AML モデルのひとつである MLL-ENL 陽性マウス AML モデルの系であるため、AML サブタイプによる

違いというよりは、ヒトとマウスで異なる結果となったと考えられた。この原因としては、上述のようなヒトとマウスにおける ALCAM 遺伝子の発現・機能的役割の違いの他、ヒト AML が多くの場合遺伝子異常の蓄積が原因で起こるのに対して、今回用いたマウス AML モデルは強力ながん遺伝子のレトロウィルスを用いた過剰発現によって短時間で発症するため、ALCAM のような他の因子に依存する必要がない可能性などが考えられる。そこで、ヒト造血系・AML における ALCAM の機能を明らかにするためには、ヒト細胞を用いた研究が必要であると考えられた。

具体的には MLL 遺伝子再構成を伴う AML 細胞株である THP-1 において、shRNA を用いた ALCAM のノックダウン、および soluble ALCAM の発現による ALCAM-ALCAM 結合の阻害という 2 つの系を用いて、ALCAM の機能阻害による影響を解析した。ALCAM を阻害した THP-1 細胞は、in vitro で増殖能が低下した (Figure 19, 24)。また AML に対する代表的な治療薬である Ara-C に対する感受性も ALCAM 発現に依存しており、ALCAM を阻害すると Ara-C に対する感受性が高まり、アポトーシスが誘導された (Figure 20, 21, 25, 26)。また in vivo においても ALCAM を阻害することにより、異種移植 AML マウスの生存期間が shRNA を用いた系では有意差は示さなかったが延長傾向を示し、soluble ALCAM の発現を用いた系では延長を認めたことから、ALCAM が AML の進展に関与していることが示唆された (Figure 22, 27)。またヒト患者検体由来 AML 細胞に対しても、tet-inducible soluble ALCAM vector を導入し、異種移植実験を行ったが、soluble

ALCAM を発現することにより有意に hCD45 陽性 AML 細胞の生着割合が低下した (Figure 28)。以上のことから AML 細胞株のみならず、ヒト AML 症例検体においても、ALCAM の機能を阻害することにより AML を抑制する効果が得られる可能性が示唆された。ALCAM の機能を阻害する私の実験系の問題点として、shRNA の実験系については off target 効果の可能性もあるため、別配列の shRNA で同様の効果が得られるかどうかをさらに検討する必要がある。また soluble ALCAM の細胞質外分泌による ALCAM-ALCAM 結合阻害については、予備的実験により soluble ALCAM が細胞質外に分泌されていることは確認しているものの、細胞質内の soluble ALCAM が我々の意図しない機序により、AML 細胞の生存・増殖に何らかの影響を与えている可能性を現段階で完全に否定することはできない。このような限界はあるものの、複数の方法による ALCAM シグナルの阻害でほぼ同様の結果が見られていることは、ALCAM の阻害が AML の治療標的になりうることを示唆している。

ALCAM 遺伝子発現を制御する上流シグナルについては、NF- κ B 経路、noncanonical Wnt 経路、STAT3 経路、CD9 による ALCAM 発現の増強等の報告がある^{39,51-53}。一方 ALCAM の細胞内シグナルとしては、乳癌において ALCAM ノックダウンでアポトーシスが誘導されやすくなるという報告、膵臓癌において ALCAM ノックダウンにて化学療法抵抗性が惹起されるという報告、肝細胞癌において PI3K/AKT pathway を活性化し YAP が下流エフェクターであるという報告な

ど、癌腫によって様々な経路が知られているが、AML 細胞においてはまだ ALCAM の上下流シグナルの詳細な検討はされていない⁵⁴⁻⁵⁶。定量化が難しいため今回は報告していないが、*in vitro* で THP-1 細胞株を培養する際に、shRNA を用いた ALCAM ノックダウン細胞および、soluble ALCAM 発現細胞では、通常の THP-1 細胞で見られる AML 細胞同士の凝集が肉眼的にも明らかに減少していた。AML 細胞と骨髄環境との相互作用・接着については CXCL12-CXCR4 chemokine axis や CD44, VCAM-1 などが重要であり、骨髄環境との接着が AML 細胞の性質にも影響を与えることが知られている⁵⁷⁻⁵⁹。ALCAM は *in vivo* のみならず、AML 細胞以外の細胞が存在していない *in vitro* の培養系でも増殖や抗癌剤感受性に対して影響を与えていることから、明確な形で報告はされていないものの、AML 細胞同士の凝集が AML の性質に影響を与える可能性も考えられる。今後 ALCAM を標的とした LSC 特異的治療の基盤を築いていくために、ALCAM と他の LIC マーカーとの関連、ALCAM が AML 細胞同士あるいは骨髄ニッチとの相互作用・接着にどのような影響を与え LSC の性質にどのように関与しているか、また正常造血と AML における ALCAM の作用の違いなどを、今後の研究で明らかにしていくことが期待される。

【結論】

本研究では単一細胞ごとの single-cell LIC スコアを指標とした遺伝子発現解析で、LSC 特異的な表面抗原プロファイルを抽出し、白血病幹細胞に特異的な表面抗原の候補遺伝子として ALCAM 遺伝子を抽出した。今後 AML に限らず、他の造血器悪性腫瘍、固形癌においても同様の手法によりがん幹細胞の特性を明らかにできる可能性があり、将来的には悪性腫瘍研究全般に広く応用可能なものとする。

また、ALCAM 遺伝子は一部の症例において LIC を濃縮する細胞表面マーカーとして働く可能性があるだけでなく、ALCAM が白血病において機能的にも重要な役割を果たしている可能性が示唆された。今後更なる分子メカニズムの解明が必要である。

【謝辞】

本研究を進めるにあたり、丁寧なご指導をいただきました東京大学大学院医学系研究科 血液腫瘍病態学講座 黒川峰夫教授に深く感謝いたします。また実験全般に関してご指導・ご協力をいただきました、東京大学医学部附属病院 輸血部助教 正本庸介先生、同病院 血液・腫瘍内科講師 荒井俊也先生、トロント大学 籠谷勇紀先生に感謝いたします。また、PLAT-E packaging cell および PLAT-A packaging cell を供与していただいた東京大学医科学研究所細胞療法分野教授 北村俊雄先生、pGCDNsam-IRES-EGFP retroviral vector を供与していただいた東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター中内啓光教授、pcDNA3.1-CD166-HA vector を供与していただいた、Shanghai Tenth People's Hospital of Tongji University Fenyong Sun M.D, PhD に感謝いたします。

【参考文献】

1. Grimwade, D., *et al.* The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* **92**, 2322-33 1998.
2. Pulte, D., Gondos, A. & Brenner, H. Expected long-term survival of patients diagnosed with acute myeloblastic leukemia during 2006-2010. *Ann Oncol* **21**, 335-41 2010.
3. Mayer, R.J. *et al.* Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. Cancer and Leukemia Group B. *N Engl J Med* **331**, 896-903 1994.
4. Koreth, J. *et al.* Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. *JAMA* **301**, 2349-61 2009.
5. Burnett, A.K. *et al.* Curability of patients with acute myeloid leukemia who did not undergo transplantation in first remission. *J Clin Oncol* **31**, 1293-301 2013.
6. Yanada, M., Matsuo, K., Emi, N. & Naoe, T. Efficacy of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation depends on cytogenetic risk for

- acute myeloid leukemia in first disease remission: a metaanalysis. *Cancer* **103**, 1652-8 2005.
7. Cornelissen, J.J. *et al.* Results of a HOVON/SAKK donor versus no-donor analysis of myeloablative HLA-identical sibling stem cell transplantation in first remission acute myeloid leukemia in young and middle-aged adults: benefits for whom? *Blood* **109**, 3658-66 2007.
 8. Sakamaki H, Miyawaki S., Ohtake S., *et al.* Postremission Treatment with Chemotherapy or Allogeneic Stem Cell Transplantation (Allo-SCT) in Adults with Acute Myeloid Leukemia (AML)–JALSG AML-97 Trial-. *Blood* **104**, Abstract 2298, 2004.
 9. Atsuta, Y. *et al.* Disease-specific analyses of unrelated cord blood transplantation compared with unrelated bone marrow transplantation in adult patients with acute leukemia. *Blood* **113**, 1631-8 2009.
 10. Rocha, V. *et al.* Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N Engl J Med* **351**, 2276-85 2004.
 11. Gupta, V. *et al.* Comparable survival after HLA-well-matched unrelated or matched sibling donor transplantation for acute myeloid leukemia in first remission with unfavorable cytogenetics at diagnosis. *Blood* **116**, 1839-48

- 2010.
12. National Comprehensive Cancer Network: NCCN clinical practice guidelines in oncology (2015): Acute Myeloid Leukemia, Version 2. 2015
 13. 一般社団法人 日本血液学会: 造血器腫瘍診療ガイドライン WEB 版 (第 1.2 版). <http://www.jshem.or.jp/gui-hemali/table.html>
 14. Marcucci, G., Haferlach, T. & Dohner, H. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol* **29**, 475-86 2011.
 15. Duval, M. *et al.* Hematopoietic stem-cell transplantation for acute leukemia in relapse or primary induction failure. *J Clin Oncol* **28**, 3730-8 2010.
 16. Ishikawa, F., *et al.* Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nat Biotechnol* **25**, 1315-21 2007.
 17. Lapidot, T., *et al.* A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **367**, 645-8 1994.
 18. Saito, Y., *et al.* Induction of cell cycle entry eliminates human leukemia stem cells in a mouse model of AML. *Nat Biotechnol* **28**, 275-80 2010.
 19. Clevers, H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* **17**, 313-9 2011.

20. Visvader, J.E. & Lindeman, G.J. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell stem cell* **10**, 717-28 2012.
21. Eppert, K., *et al.* Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nat Med* **17**, 1086-93 2011.
22. Adams, G.P. & Weiner, L.M. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* **23**, 1147-57 2005.
23. Coiffier, B., *et al.* CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* **346**, 235-42 2002.
24. Giles, F., Estey, E. & O'Brien, S. Gemtuzumab ozogamicin in the treatment of acute myeloid leukemia. *Cancer* **98**, 2095-104 2003.
25. Jan, M., *et al.* Clonal evolution of preleukemic hematopoietic stem cells precedes human acute myeloid leukemia. *Sci Transl Med* **4**, 149ra118 2012.
26. Jin, L., *et al.* Monoclonal antibody-mediated targeting of CD123, IL-3 receptor alpha chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells. *Cell stem cell* **5**, 31-42 2009.
27. Kikushige, Y., *et al.* TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells. *Cell stem cell* **7**, 708-17 2010.
28. Janes, K.A., Wang, C.C., Holmberg, K.J., Cabral, K. & Brugge, J.S.

- Identifying single-cell molecular programs by stochastic profiling. *Nat Methods* **7**, 311-7 2010.
29. Warren, L., Bryder, D., Weissman, I.L. & Quake, S.R. Transcription factor profiling in individual hematopoietic progenitors by digital RT-PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17807-12 2006.
30. Jeannet, R., Cai, Q., Liu, H., Vu, H. & Kuo, Y.H. Alcam regulates long-term hematopoietic stem cell engraftment and self-renewal. *Stem cells* **31**, 560-71 2013.
31. Ikeda, K. & Quertermous, T. Molecular isolation and characterization of a soluble isoform of activated leukocyte cell adhesion molecule that modulates endothelial cell function. *J Biol Chem* **279**, 55315-23 2004.
32. Hu, Y. & Smyth, G.K. ELDA: extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *J Immunol Methods* **347**, 70-8 2009.
33. Morita, K., *et al.* BAALC potentiates oncogenic ERK pathway through interactions with MEKK1 and KLF4. *Leukemia* **29**, 2248-56, 2015.
34. Reed, S.E., Staley, E.M., Mayginnes, J.P., Pintel, D.J. & Tullis, G.E. Transfection of mammalian cells using linear polyethylenimine is a simple and effective means of producing recombinant adeno-associated virus

- vectors. *J Virol Methods* **138**, 85-98 2006.
35. Schepers, H., *et al.* Reintroduction of C/EBPalpha in leukemic CD34+ stem/progenitor cells impairs self-renewal and partially restores myelopoiesis. *Blood* **110**, 1317-25 2007.
36. Metzeler, K.H. *et al.* An 86-probe-set gene-expression signature predicts survival in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood* **112**, 4193-201 2008.
37. Weiner, J.A., *et al.* Axon fasciculation defects and retinal dysplasias in mice lacking the immunoglobulin superfamily adhesion molecule BEN/ALCAM/SC1. *Mol Cell Neurosci* **27**, 59-69 2004.
38. Nakamura, Y., *et al.* Isolation and characterization of endosteal niche cell populations that regulate hematopoietic stem cells. *Blood* **116**, 1422-32 2010.
39. Chitteti, B.R., *et al.* CD166 regulates human and murine hematopoietic stem cells and the hematopoietic niche. *Blood* **124**, 519-29 2014.
40. Strassberger, V., *et al.* A comprehensive surface proteome analysis of myeloid leukemia cell lines for therapeutic antibody development. *J Proteomics* **99**, 138-51 2014.
41. van Kilsdonk, J.W., *et al.* Attenuation of melanoma invasion by a secreted

- variant of activated leukocyte cell adhesion molecule. *Cancer research* **68**, 3671-9 2008.
42. Gentles, A.J., Plevritis, S.K., Majeti, R. & Alizadeh, A.A. Association of a leukemic stem cell gene expression signature with clinical outcomes in acute myeloid leukemia. *JAMA* **304**, 2706-15 2010.
43. Gal, H. *et al.* Gene expression profiles of AML derived stem cells; similarity to hematopoietic stem cells. *Leukemia* **20**, 2147-54 2006.
44. Ding, L. *et al.* Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature* **481**, 506-10 2012.
45. Mardis, E.R. *et al.* Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med* **361**, 1058-66 2009.
46. Welch, J.S. *et al.* The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell* **150**, 264-78 2012.
47. Bowen, M.A., *et al.* Characterization of mouse ALCAM (CD166): the CD6-binding domain is conserved in different homologs and mediates cross-species binding. *Eur J Immunol* **27**, 1469-78 1997.
48. Kristiansen, G., *et al.* Expression profiling of microdissected matched prostate cancer samples reveals CD166/MEMD and CD24 as new prognostic markers for patient survival. *J Pathol* **205**, 359-76 2005.

49. Davies, S.R., *et al.* Expression of the cell to cell adhesion molecule, ALCAM, in breast cancer patients and the potential link with skeletal metastasis. *Oncol Rep* **19**, 555-61 2008.
50. van Kempen, L.C., *et al.* Activated leukocyte cell adhesion molecule/CD166, a marker of tumor progression in primary malignant melanoma of the skin. *Am J Pathol* **156**, 769-74 2000.
51. Gessert, S., *et al.* DM-GRASP/ALCAM/CD166 is required for cardiac morphogenesis and maintenance of cardiac identity in first heart field derived cells. *Dev Biol* **321**, 150-61 2008.
52. Wang, J., *et al.* NF-kappaB P50/P65 hetero-dimer mediates differential regulation of CD166/ALCAM expression via interaction with microRNA-9 after serum deprivation, providing evidence for a novel negative auto-regulatory loop. *Nucleic Acids Res* **39**, 6440-55 2011.
53. Gilsanz, A., *et al.* ALCAM/CD166 adhesive function is regulated by the tetraspanin CD9. *Cell Mol Life Sci* **70**, 475-93 2013.
54. Jezierska, A., Matysiak, W. & Motyl, T. ALCAM/CD166 protects breast cancer cells against apoptosis and autophagy. *Med Sci Monit* **12**, BR263-73 2006.
55. Hong, X., *et al.* ALCAM is associated with chemoresistance and tumor cell

- adhesion in pancreatic cancer. *J Surg Oncol* **101**, 564-9 2010.
56. Ma, L., *et al.* Cluster of differentiation 166 (CD166) regulated by phosphatidylinositide 3-Kinase (PI3K)/AKT signaling to exert its anti-apoptotic role via yes-associated protein (YAP) in liver cancer. *J Biol Chem* **289**, 6921-33 2014.
57. Nervi, B., *et al.* Chemosensitization of acute myeloid leukemia (AML) following mobilization by the CXCR4 antagonist AMD3100. *Blood* **113**, 6206-14 2009.
58. Jin, L., Hope, K.J., Zhai, Q., Smadja-Joffe, F. & Dick, J.E. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat Med* **12**, 1167-74 2006.
59. Becker, P.S., *et al.* Very late antigen-4 function of myeloblasts correlates with improved overall survival for patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **113**, 866-74 2009.