

論文の内容の要旨

論文題目 白血病幹細胞に特異的な表面抗原の探索

氏名 志村（貫名） 有香

【序文】

急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia: AML) において高い自己複製能を有する白血病幹細胞 (leukemia stem cell: LSC) を起源としたヒエラルキー構造が存在することが近年明らかとなってきた。LSC は従来の化学療法に抵抗性を示し、治療後再発の原因となっているため、同細胞の特性を解析することにより新規治療法の開発、治療成績の著しい改善につながる可能性がある。

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。LIC は上述のように当初は CD34⁺ CD38⁻分画に限局して存在していると報告されたが、近年になり CD34⁺ CD38⁺、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になり、既存の表面抗原パターンだけでは定義できないことがわかってきた。従って従来の CD34、CD38 を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 を標的とした治療法を探索していくためには新規の LSC 特異的表面マーカーが必要である。

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 mucin-3 (TIM3) や CD113 (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。

そこで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、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 LSC に特異的な表面抗原遺伝子が同定できる可能性があると考え、本実験を行った。

【主な材料と方法】

実験スキーム

AML 症例検体を用いて単一細胞レベルの遺伝子発現解析を行った。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で、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。

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。本研究は東京大学医学部倫理委員会の承認を得ており、また実験に関わる全ての症例において、事前に研究内容を十分に説明し同意を取得した。

単一遺伝子毎の遺伝子発現解析

シングルセルソーティングを行い、検体を逆転写・特定のターゲットの増幅反応を行った。作成された、シングルセル由来の cDNA を用いて定量 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、Singular™ Analysis Toolsets (Fluidigm) を用いて解析を行った。

マウス

NSG マウス (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) を購入し自家繁殖を行い使用した。

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、SCF, Flt3L, IL-3, MGDF を添加した培地で前培養を行った。Day 0 に調整した細胞を尾静脈に、静脈内注射により移植した。12-16 週間後に骨髄細胞を回収し解析を行った。

Short hairpin RNA (shRNA)

ヒト ALCAM に対する shRNA 配列を挿入した RNAi-Ready pSIREN-RetroQ-ZsGreen1 Vector をレトロウイルスにより AML 細胞株に導入した。

Tet-inducible soluble ALCAM

作成した tet-inducible soluble ALCAM vector をレンチウイルスにより AML 細胞株、ヒト AML 症例検体に導入した。

【結果】

LIC スコアの算出方法と 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) から独自に 15 遺伝子を抽出した。正常核型の AML 患者 (n = 163、平均年齢 55.6 歳) の遺伝子疾患プロファイルと疾患予後を解析した既報データ (GSE12417) を用いて、症各症例の LIC スコアを算出し、163 名の症例を LIC スコア高値群 (n = 82)、低値群 (n = 81) にわ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。

LSC に特異的な表面抗原候補として ALCAM 遺伝子を抽出

LSC 特異的な細胞表面抗原の候補として GSE30375 のデータを用いて 50 遺伝子を抽出し、上記の LIC 遺伝子セット 15 遺伝子、LIC に高発現する傾向があると報告されている CD99 や TIM3、内部コントロールとして GPADH、ACTINB を加えた合計 69 遺伝子の発現量を、AML 症例 2 検体の CD34⁺分画 96 細胞ずつ解析した。次に単一細胞毎に single-cell LIC スコアを算出し、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 20 遺伝子が正の相関を示し、その中には LIC で高発現との報告がある CD99 や TIM3 が含まれていた。上述のデータを用いて 20 遺伝子毎に各遺伝子の高発現と低発現群で生存期間を比較したところ、ALCAM 遺伝子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。

ALCAM の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⁺ ALCAM 高発現細胞に LIC が濃縮される

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、LIC の存在頻度を両分画で比較した。3 症例中 2 例では 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 症例においては有意差をもって ALCAM 高発現細胞に LIC が濃縮された。

AML 細胞株において ALCAM 遺伝子をノックダウンすると、in vitro で増殖能が低下し、cytarabine (Ara-C) 処理時のアポトーシスの割合が増加する

代表的な AML 細胞株である 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。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。また ALCAM をノックダウンした細胞では AML 治療におけるキードラッグである Ara-C に対する感受性が亢進していた。

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

sh RNA を用いた ALCAM の機能阻害では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。In vitro の実験において shRNA と同様の結果を得た。

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

テトラサイクリン遺伝子発現誘導システム (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の延長が認められた。

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

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。細胞生着後の移植 2 週間後から soluble ALCAM 誘導群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。

【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 は一部のヒト AML において LIC を濃縮するマーカーとして働く可能性があること、また 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あることを示した。