

[課程一 2]

審査の結果の要旨

氏名 志村（貫名） 有香

本研究では白血病幹細胞 (leukemia stem cell: LSC) に特異的な表面抗原の探索を、単一細胞毎の遺伝子発現解析により試みたものである。具体的には、急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia: AML) 症例検体を用いて、単一細胞毎の遺伝子発現解析を行い、多様な集団であるAML細胞を、各細胞のleukemia-initiating cell (LIC) らしさを独自に導入した「single-cell LICスコア」として点数付けし、よりLICらしい細胞で高発現する表面抗原候補遺伝子を探索するという方法によりLSCに特異的な表面抗原の探索を行っており、下記の結果を得ている。

1. Single-cell LICスコア算出のためのLICで高発現することが知られている遺伝子群 (LIC遺伝子セット) は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) 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) を用いて検討した結果、症例毎のLIC遺伝子セット15遺伝子の発現量より算出したLICスコアが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を示された。
2. AML症例2検体のCD34+分画96細胞ずつを単一細胞毎に遺伝子発現解析を行った。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 (GSE30375より50遺伝子抽出) 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た。上述のGSE12417を用いて、20遺伝子毎に各遺伝子の高発現群と低発現群で生存期間を比較したところ、唯一ALCAM遺伝子のみが高発現群と低発現群とを比較して有意に高発現群で生存率が低く、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示唆された。
3. 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。以上のことから一部の症例において、LICはCD34+ ALCAM高発現分画に濃縮される可能性が示された。
4. 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。

5. 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ところ、in vitroの実験においてshRNAと同様の結果を得た。
6. 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。
7. 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。

以上、本論文では、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が示唆された。

本研究結果は、単一細胞毎の single-cell LIC スコアを指標とした遺伝子発現解析で、LSC 特異的な表面抗原の候補遺伝子の探索を試みた独自性の高い研究であり、他の悪性腫瘍においてもがん幹細胞の特性を明らかにするために同様の手法を応用可能と考えられ意義深い研究である。そして、抽出された ALCAM 遺伝子の解析は白血病メカニズムの解明に寄与する可能性があり、学位の授与に値するものと考えられる。