

令和 3 年 5 月 20 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 31 年度

受付番号 201960551

氏名 雅人 大木

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：スタンフォード（国名：アメリカ合衆国）

2. 研究課題名（和文）前白血病幹細胞の代謝・エピゲノム特性解明と治療法の開発

3. 派遣期間：平成 31 年 4 月 1 日～令和 3 年 3 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名
受入機関名：スタンフォード大学
部局名：がん研究所5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意(A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6.研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

前白血病幹細胞の代謝・エピゲノム特性を理解するために、患者検体を用いて再発機構に関するマウスモデルを作成する事から着手した。急性骨髓性白血病は悪性疾患の中では稀有な疾患であり、4割程度の長期生存率ではあるものの、一方で化学療法のみで完治する患者さん存在する。生殖器由来の特殊な悪性疾患を除けば、手術療法や分子標的薬を使用せずに古典的な化学療法で完治できる悪性疾患は稀である。化学療法は細胞周期に依存した治療法であるため、まずは細胞周期に注目した再発機構の解析およびマウスモデルの作成にとりかかった。急性骨髓性白血病における細胞周期の解析は歴史が古く、1960 年代には既に細胞周期が常に回っている細胞集団 (DC, dividing cells) と滅多に細胞周期に入らない細胞集団 (RDC, rarely dividing cells) の二つの集団に分類される事が知られていた。この二つの機能的解析はその後数十年かけて行われるが、2003 年の報告では、急性骨髓性白血病患者の凍結骨髄を、再解凍後に 1 日培養して、その後にピロリン Y とヘキスト染色で G0/G1/S+G2+M の 3 つの細胞周期に分けてソーティングし、マウスに移植したところ、明らかに G0 細胞移植群で著明に生着率が良好だった。この事実と先の 1960 年代の DC/RDC を照らし合わせ、RDC=白血病幹細胞、DC=白血病芽球という考え方が浸透した。しかしこれは 2000 年代初頭の技術で解析されたものであり、現在の知見と照らし合わせると、不十分なもと言わざるを得ない内容であった。即ち、凍結再解凍後に 1 日培養した検体は患者体内での細胞周期を反映しているのか？また生着細胞はヒト血球細胞の汎マーカーである CD45 でのみ検討されているが、本当に生着細胞は急性骨髓

性白血病細胞由来なのか？まずはこの疑問点を検討した。1番目の疑問点を解決するために、凍結再解凍をせず、患者検体をそのまま細胞周期染色をしてソーティングを行い移植した。また生着後はCD45に加えてCD33/CD19を評価して、複数系統の血球が存在するか検討した。

【図1】

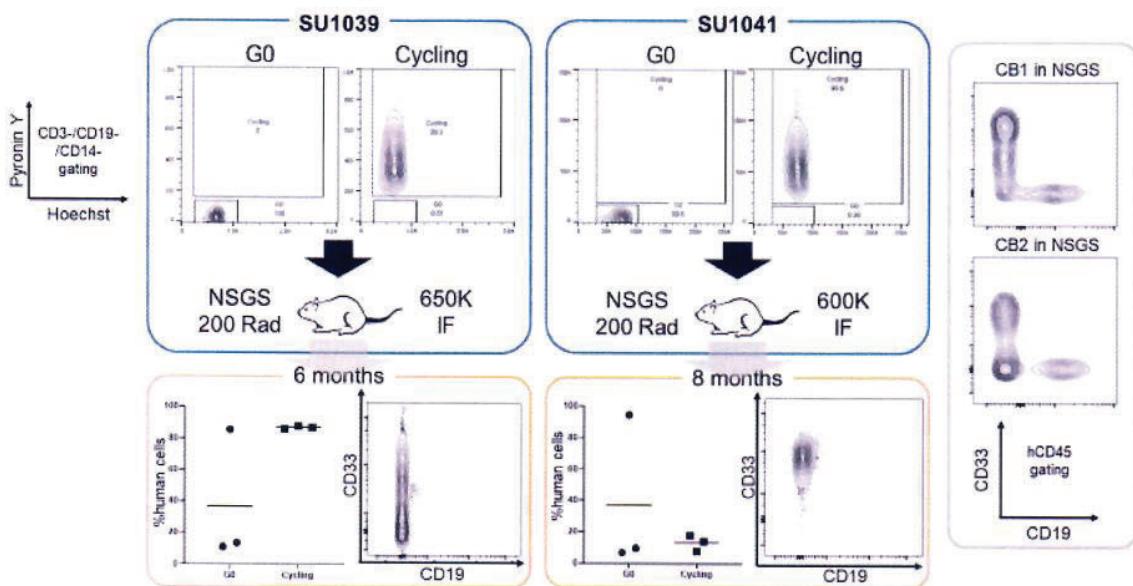
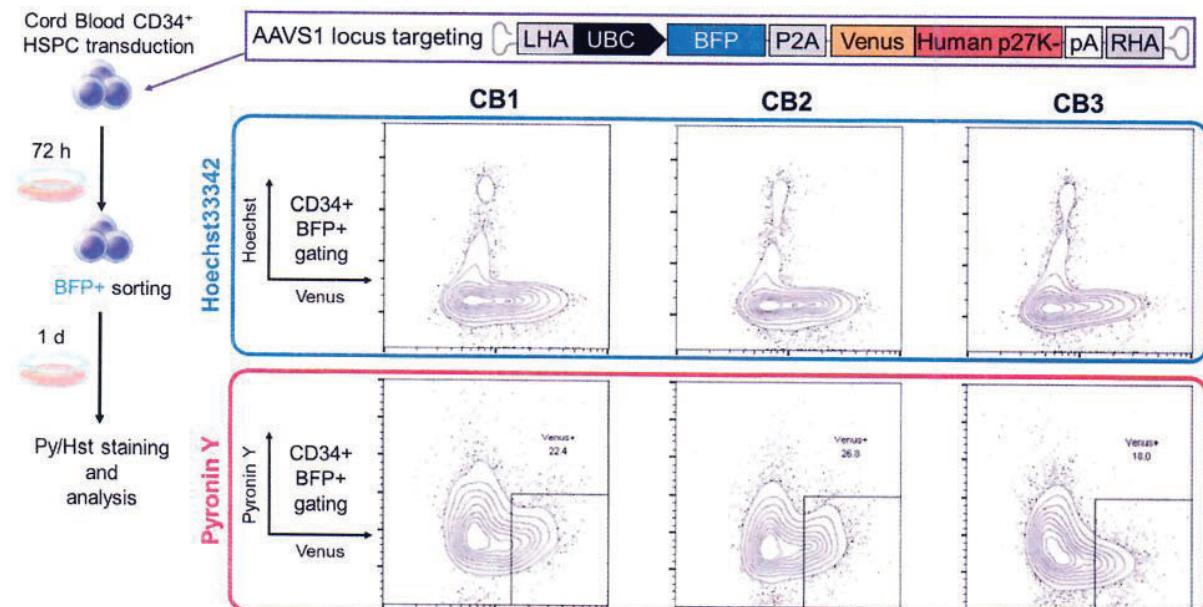


図1に示すように、患者末梢血由來の細胞を、G0 細胞と細胞周期に入っている分画に分けて移植すると、その生着率に有意差はなかった。またこの細胞集団は CD19 陽性の B 細胞系統を産生せず、少なくとも正常の造血幹細胞の生着ではなかった。この結果は、既報のような白血病幹細胞=静止期という説を否定するものであった。しかしピロリン Y・ヘキスト染色で1時間半ほど培養が必要であるため、その間での細胞周期の変化や、ピロリン Y は単純に RNA 量を測定しているという事実からは、その他の評価方法で再検討する必要があると考えられた。

そこでリアルタイム細胞周期レポーターの導入を考えた。FUCCI システム(Sakaue-Sawano A et al., Cell 2008)が広く使用されているが、このシステムでは G1 期と S 期の分離は良いものの、G0 期に関しては G1 と同様に分類されてしまう。白血病幹細胞領域で注目されているのは G0 期であり、ここを正確に評価するために FUCCI システムの代わりに Venus-p27K⁻(Oki T et al., Sci Rep 2014)のシステムを採用する事とした。当研究室では、CRISPER/Cas9 とアデノ関

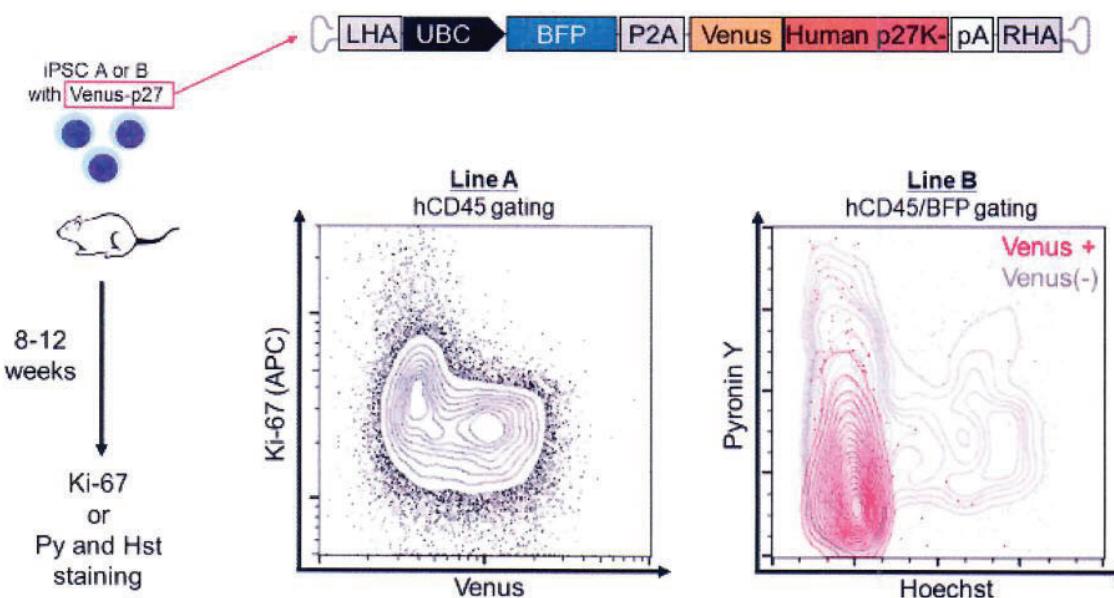
【図2】



連ウイルス (AAV) ベクターを用いた臍帯血由来造血幹前駆細胞の遺伝子編集を行っており、まずは当該ベクターがヒト造血幹前駆細胞でも同様の結果を示すか検討した。

ベクター挿入細胞を恒常的発現マーカーである BFP を用いて FACS でソーティングし、低サイドカイン培地で 1 日培養した後に、古典的細胞周期染色であるピロリン Y とヘキストで染色した。その結果、Venus 陽性細胞は完全にヘキスト陽性細胞と異なり、また Venus 陽性細胞はピロリン Y 低染色であった (図 2)。このことから、新規 G0 マーカーである Venus-p27K は古典的染色ともよく相関し、G0 細胞を生細胞のまま分離することができると考えられた。次に同様の方法で患者由来の急性骨髄性白血病細胞への Venus-p27K の挿入を試みた。しかし、AML 細胞では明らかに遺伝子編集が困難であり、低効率で編集細胞を得られるものの、種々の実験を行うのは不可能であった。またこれらの細胞は明らかに未編集のものに比してマウスへの生着能が低下しており、その点でも改良すべきであった。そのため当研究室で最初に報告した AML-iPS 細胞を用いて、遺伝子編集を iPS 細胞の状態で行い、その後に AML 細胞に分化させるという手法に変更した。図 3 に示すようにまず Venus-p27K を AML-iPSC に導入し、そこから血液細胞に分化させ免疫不全マウスに移植し、白血病を発症させた。これらの細胞内で Venus-p27K のレポーターは、ピロリン Y や Ki67 などの古典的マーカーとよく相関した。一次移植マウス内で AML 細胞を、Venus を用いて細胞周期を分けて二次移植を行い、細胞周期と白血病幹細胞の関係を検討した。

【図 3】



その結果、CD34 陽性細胞においては Venus 陽性陰性に問わず、二次移植マウスに生着したのに対し、CD34 陰性細胞においては、Venus⁺細胞はで明らかに生着能が低下していた (図 4)。患者由来の非凍結検体をピロリン Y・ヘキスト染色で分離した場合、AML-iPSC 由来の AML 細胞を G0 マーカーである Venus の陽性陰性で分離した場合のどちらでも、生着能を有した細胞は G0 そして細胞周期に入った細胞集団のどちらにも存在していることを示していた。1960 年代に見出された RDC/DC が 2000 年代に RDC=白血病幹細胞/DC=白血病芽球と考えられ、長らくこの白血病幹細胞理論が広く共通認識とされていたが、それに反証をするような結果であった。つまり我々の知見からは、正常の造血幹細胞とは異なり、白血病幹細胞は常に G0 と細胞周期を行き来しているような特性であると考えられた。しかし先に述べたように急性骨髓性白血病は、細胞周期を標的とした化学療法のみで完治し得る稀有な悪性疾患であり、細胞周期

に依存した動態を示しているのは臨床特性から間違いないと考える。次世代シークエンサーの導入により 2010 年代から遺伝子変異の解析が急速に進み、急性骨髓性白血病の中に複数のサブクローニングが存在している事が証明されている。理論的にはこのサブクローニング一つ一つに白血病幹細胞と白血病芽球が含まれていると考えられる。今後は上記のツールを使用しつつ、1960 年代に報告された RDC/DC、2000 年代に報告された細胞周期によって分類された白血病幹細胞と白血病芽球、そして 2010 年代からのクローニング多様性の 3 つの概念を総合的に組み合わせ、マウスモデルの作成とともに解析を進めていく予定である。

【図 4】

