



Title	Autonomous TGF β signaling induces phenotypic variation in human acute myeloid leukemia
Author(s)	新開, 泰宏
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/85283
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	新開泰宏
論文題名 Title	Autonomous TGF β signaling induces phenotypic variation in human acute myeloid leukemia (自律的TGF β シグナルがヒト急性骨髄性白血病の多様性を誘導する)
論文内容の要旨 〔目 的(Purpose)〕 急性骨髄性白血病(Acute myeloid leukemia;AML)は、幼若な骨髄系細胞の分化障害・自律性増殖により生じると考えられている造血器腫瘍で、しばしば再発を繰り返す難治性の疾患である。AMLの再発は、化学療法抵抗性の白血病幹細胞(Leukemia stem cell;LSC)が残存することが原因の一つとして挙げられており、LSCを根絶することがAMLの治療に重要と考えられている。これまで多くの研究において、AMLのLSCに特異的に発現する抗原が報告されてきたが、その一方でAMLにおけるLSCは不均一で、複数の分画に存在することも報告されている。そのため、AMLの治療の進展のためには、LSC特異的に発現する抗原を見いだすことと同時に、白血病細胞、特にLSCに内在する表現型の不均一性のメカニズムを解明していくことも必要であると考えられる。我々は血管内皮関連抗原として同定されたESAM (Endothelial cell-Selective Adhesion Molecule)が、ヒトおよびマウスの造血幹細胞マーカーとなることを見いだした。ヒト臍帯血細胞において、ESAM高発現細胞のみが長期造血構築能を有することから、我々はAMLのLSCにおいてもESAM発現に基づいた階層性があると仮定し、その検証を研究の第一の目的とした。また、もしAMLのLSCにおいてはESAM発現に関連した階層性が明らかとならず、可変性があるならば、この可変性に関与するメカニズムを解明し、それらを制御することが白血病細胞に与える影響を解明することを第二の目的とした。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 ヒトAML患者骨髄の臨床検体**例を用いて白血病細胞のESAMの発現を解析すると、検体毎にESAMの発現は多様で、また同一症例の白血病細胞集団内でもESAM発現は不均一であることが明らかとなった。単一検体内のESAM陽性細胞と陰性細胞の間に階層性があるかを確認するために、ESAM陽性および陰性細胞を分離し、それぞれをthrombopoietin、Flt3-ligand, stem cell factorの存在下で培地培養した。その結果、増殖に伴いESAM陽性細胞からESAM陰性細胞が生じた一方で、ESAM陰性細胞からもESAM陽性細胞が生じた。このことから、AMLにおいてはESAM発現に可変性が存在することが示唆された。ESAM発現の不均一性は、ヒトAMLの細胞株においても認められた。細胞株の一つであるKG1a細胞からESAM陰性分画を分離・培養すると、経時的にESAM発現が上昇し、親株と同様の不均一なESAM発現を呈する集団を再構成した。さらにKG1aから単細胞を分離・培養しても、分離時のESAMの発現量に関わらず、親株と同様の不均一なESAM発現を再構成した。これらの結果から、AML細胞の可変性は、個々の細胞に内在する性質に起因していると考えられた。 Real-time RT-PCRの結果、ESAM発現の可変性は遺伝子の転写レベルで生じていた。また、KG1a細胞を用いたRNAシーケンシングの結果、ESAM発現量に関連して多数の遺伝子の発現変化が認められた。さらにこの遺伝子変化をもとにIngenuity Pathway Analysisを用いてup-streaming解析を行うと、TGF β シグナルがESAM高発現分画で活性化しており、TGF β シグナルがESAM発現の可変性に関与している可能性が推察された。実際にKG1aのESAM陰性分画細胞を培養する際、TGF β 1の添加はESAM発現の上昇を促進した。また、無血清培地において、KG1aの培養後にTGF β 1濃度をELISA法にて測定すると、培養した細胞数に応じて上清中のTGF β 1濃度が上昇した。これらの結果からAML細胞は、自分分泌したTGF β からのシグナルによって、ESAMの発現レベルを変動させていることが示唆された。 最後に、このTGF β シグナルを阻害することが、AML細胞にどのような影響を与えるかを検討した。TGF β 受容体であるTGF β R1の選択的阻害薬であるSB525334の添加により、KG1aのESAM陰性細胞の継続培養に伴うESAM発現上昇は阻害された。それだけではなく、阻害剤の添加はKG1a細胞の増殖抑制と細胞死を誘導し、ダウノルビシンによる抗腫瘍効果を増強した。ヒト患者検体のAML細胞においても、培養系においてSB525334の添加はESAMの発現上昇を阻害した。一部のAML患者検体においては単剤で白血病細胞の増殖抑制・細胞死誘導効果をもたらし、単剤では効果が得られなかった患者検体についても、ダウノルビシンによる抗腫瘍効果を増強することが確認された。 〔総 括(Conclusion)〕 ヒトAML細胞において、ESAM発現に基づく階層性は明らかではなく、多様性と可変性がある。AML細胞の可変性の根底には自律的なTGF β シグナルの活性化があり、TGF β シグナル経路の阻害はヒトAMLの治療標的となりうる。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 新開 泰宏			
論文審査担当者		(職)	氏 名
	主 査	大阪大学教授	得 仁 通 毅
	副 査	大阪大学教授	山 崎 結 子
	副 査	大阪大学教授	長 澤 正 司
論文審査の結果の要旨 急性骨髄性白血病(AML)の治療の進展のためには、白血病幹細胞(LSC)特異的に発現する抗原を見いだすことと同時に、白血病細胞、特にLSCに内在する表現型の不均一性のメカニズムを解明していくことも必要であると考えられる。ESAMは申請者らが同定し、継続的に研究を行ってきた新規造血幹細胞抗原だが、本研究においては臨床検体あるいは細胞株を用い、ヒトAMLにおける白血病細胞のESAM発現変化に基づいた不均一性とその制御メカニズムを解析した。まず、ヒトAMLにおいて、ESAM発現に基づく階層性は明らかではなく、多様性と可変性があることを見いだした。また、AMLの可変性の根底には自律的なTGFβシグナルの活性化があり、TGFβシグナル経路の阻害はAMLの増殖抑制と細胞死を誘導することを明らかにした。これらは、白血病細胞の新たな治療標的になりうるメカニズムを解明した研究であり、今後の医学研究の発展に寄与すると考えられるため、博士(医学)の学位授与に値する。			