



Title	ハイドロゲルを用いた白血病幹細胞誘導に関する研究〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	澤井, 彩織
Description	配架番号 : 2903
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16411号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95403
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	SAWAI_Saori_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 澤 井 彩 織

学 位 論 文 題 名

ハイドロゲルを用いた白血病幹細胞誘導に関する研究
(Analysis of synthetic polymer hydrogel-based generation of leukemia stem cells)

【背景と目的】

白血病は、造血幹前駆細胞が骨髄の中でがん化する疾患である。そのうち *acute myeloid leukemia* (AML) は分化・成熟能が障害された幼若骨髄系細胞のクローナルな自律性増殖を特徴とする疾患である。小児 AML は 49-62%の無病生存率を達成しているが、一方で再発及び再寛解導入不能例が存在し、新規治療薬の開発が急務である。

再発難治例が存在する原因として、化学療法に抵抗性で、自己複製能を有する *leukemia stem cells* (LSCs)の存在が想定されてきた。この LSCs を誘導する鍵分子を同定すれば、LSCs を標的とした新規治療開発に繋がると考えられる。しかし LSCs の確立した誘導方法は現時点で存在せず、治療開発を妨げる要因となっている。

北海道大学化学反応創成研究拠点 (ICReDD) における先端生命科学ソフト&ウェットマター研究室と腫瘍病理学研究室の共同研究にて、ハイドロゲルを用いた *cancer stem cells* (CSCs)の誘導方法が開発された。そこで、白血病細胞をハイドロゲル上で培養することで、白血病細胞の幹細胞性を誘導できるのかを検討する。そして、白血病細胞の幹細胞性誘導の鍵となる分子を探索し、LSCs に対する治療標的分子の同定を目指す。

【材料・方法】

1) 細胞株と培養方法：白血病細胞株 K562 を poly-(2-acrylamido-2-methylpropanesulfonic acid) (PAMPS) ゲル、PAMPS/PDMAAm double-network (DN) ゲル、poly N-(carboxymethyl)-N,N'-dimethyl-2-(methacryloyloxy) ethanaminium, inner salt (PCDME)ゲル、poly (sodium p-styrene sulfonate) (PNaSS)ゲル上で培養し、形態観察および real-time PCR による遺伝子発現解析を行った。適切な培養条件を検討した上で、その他の白血病細胞株3種(KG-1,UCSD/AML1,MOLM13)と急性未分化型白血病(*acute undifferentiated leukemia*, AUL)の患者検体を PNaSS ゲル上で培養し、形態観察と遺伝子発現解析を行った。2) エネルギー代謝解析：PNaSS ゲル上で培養した白血病細胞株 4 種 (K562,KG-1,UCSD/AML1,MOLM13) と AUL 患者検体の主要なエネルギー代謝経路を計測した。3) ゼノグラフト実験：PNaSS ゲル上で培養した白血病細胞株 K562 を NOD/SCID マウスの脳に移植し、腫瘍形成能への影響を検討した。また、同様の条件の細胞を NOD/SCID マウスの尾静脈から投与し、白血病発症への影響を検討した。4) シングルセル解析：PNaSS ゲル上で培養した白血病細胞株 K562 が多く属する集団に特異度の高い発現分子を探索した。なお 1-4)いずれでもコントロールとして polystyrene dish 上で培養した細胞を用いた。5) 遺伝子ノックダウン実験：シングルセル解析によって抽出した遺伝子のうち *aldo-keto reductase family 1 member B*

(*AKR1B1*)と *TSPY like 5* (*TSPYL5*)を選択し、short hairpin RNA (shRNA)を白血病細胞株 K562 に導入し real-time PCR で遺伝子発現量を検討した。

【結果】

1) 幹細胞性誘導の検証：4 種のハイドロゲル上で培養した白血病細胞株 K562 において、特に PNaSS ゲル上で培養した細胞で *CD34*、*Nanog*、*Oct3/4* などの幹細胞関連遺伝子の発現亢進が認められた。培養条件は、3 日目で培地交換し 7 日間培養する条件で最も幹細胞関連遺伝子の発現亢進が認められた。白血病細胞株 K562 を長期培養すると不可逆性となった。白血病細胞株 UCSD/AML1、MOLM13 と AUL 患者検体においても、PNaSS ゲル上で 7 日間培養すると幹細胞関連遺伝子の発現量の亢進が認められた。2) エネルギー代謝解析：PNaSS ゲル上で培養した白血病細胞株 K562 と AUL 患者検体において、ミトコンドリアでの基礎呼吸能と最大呼吸活性の上昇を認め、oxygen consumption rate (OCR)へのシフトを認めた。3)ゼノグラフト実験：異所性移植実験では、PNaSS ゲル上で培養した白血病細胞株 K562 において腫瘍形成能の亢進が認められたが、同所性移植実験では白血病の発症は認められなかった。4) 候補遺伝子の抽出：シングルセル法により、PNaSS ゲル上で培養した白血病細胞株 K562 が多く属する集団に特異度の高い遺伝子を抽出した。5)ノックダウン実験：抽出した遺伝子のうち *AKR1B1* と *TSPYL5* を選択し、shRNA を白血病細胞株 K562 に導入した。ノックダウンした細胞で幹細胞関連遺伝子の発現低下が認められた。

【考察】

遺伝子発現解析、エネルギー代謝解析および異所性移植実験より、ハイドロゲル上で培養した白血病細胞が LSCs の性質を獲得したことが示された。シングルセル解析ではハイドロゲル上で培養した白血病細胞が多く属する集団に特異度の高い遺伝子を抽出した。抽出した遺伝子で遺伝子発現量の亢進を認めたもののうち、*AKR1B1* と *TSPYL5* を選択し、遺伝子ノックダウン実験を行った。両遺伝子をノックダウンした白血病細胞において幹細胞関連遺伝子の発現量の有意な低下が認められ、*AKR1B1* と *TSPYL5* の抑制が白血病細胞の幹細胞性低下に寄与したと考えられた。

AKR1B1 は、白血病細胞の成長に重要なエネルギー源であるフルクトース代謝に関与することが判明している。また、AML 患者と AML 細胞株では messenger ribonucleic acid とタンパク質レベルで *AKR1B1* が高発現しており、高発現の患者は生存率が低く、芽球の割合が高いことが報告されている。さらに *AKR1B1* の阻害剤が白血病の治療として有効である可能性も示唆されている。よって、本研究で抽出した遺伝子が白血病の予後不良因子である可能性を見出し、そして *AKR1B1* が LSCs の生存・維持に関与する可能性が示された。

TSPYL5 は、複数のがんにおける強力な発がんドライバー遺伝子である。特に非小細胞肺癌において、がん幹細胞性の制御的意義を持つ AKT を介した testis-specific Y-encoded-like 5 (*TSPYL5*) のリン酸化が PTEN の転写を抑制し、AKT/*TSPYL5*/PTEN と PTEN/PI3K/AKT シグナル伝達経路間の正のフィードバックループを介し、AKT を持続的に活性化すると報告がある。よって *TSPYL5* は CSCs に関する重要な遺伝子であり、白血病においても LSCs を対象とした治療標的となりうる可能性がある。

【結論】

本研究ではハイドロゲル上で培養した白血病細胞のがん幹細胞性の獲得を示し、がん幹細胞性の誘導に関わる遺伝子を同定した。