



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16411
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95942
Type	doctoral thesis
File Information	SAWAI_Saori.pdf



学 位 論 文

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)

2025 年 3 月

北 海 道 大 学

澤井 彩織

学 位 論 文

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)

2025 年 3 月

北 海 道 大 学

澤井 彩織

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	8 頁
方法	12 頁
結果	22 頁
考察	56 頁
結論	60 頁
謝辞	61 頁
利益相反	62 頁
引用文献	63 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Saori Sawai, Yoshitaka Oda, Yusuke Saito, Takeru Kuwabara, Lei Wang, Zen-ichi Tanei, Shinsuke Hirabayashi, Masumi Tsuda, Jian Ping Gong, Atsushi Manabe, Shinya Tanaka
Analysis of synthetic polymer hydrogel-based generation of leukemia stem cells.
Biochemical and Biophysical Research Communications. 744 (2025) 151149

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Saori Sawai, Yoshitaka Oda, Yusuke Saito, Lei Wang, Zen-ichi Tanei, Shinsuke Hirabayashi, Masumi Tsuda, Shinya Tanaka, Atsushi Manabe:
Analysis for stem cell induction of leukemia using hydrogel.
The JSH International Symposium 2024 in Hakodate, July 13-14, 2024, Hakodate, Japan
2. Saori Sawai, Yoshitaka Oda, Yusuke Saito, Lei Wang, Zen-ichi Tanei, Shinsuke Hirabayashi, Masumi Tsuda, Shinya Tanaka, Atsushi Manabe:
Analysis for stem cell induction of leukemia using hydrogel.
第 66 回 日本小児血液・がん学会学術集会、2024. 12. 13-15、京都

要旨

【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 *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の報告がある。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。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

AKR1B1	aldo-keto reductase family 1 member B
AML	acute myeloid leukemia
ALL	acute lymphocytic leukemia
ARHGDIB	Rho GDP dissociation inhibitor beta
AUL	acute undifferentiated leukemia
BAIAP2L1	BAR/IMD domain containing adaptor protein 2 like 1
BTBD3	BTB domain containing 3
CAAP1	caspase activity and apoptosis inhibitor 1
CALN1	calneuron 1
CCDC144NL-AS1	CCDC144NL antisense RNA 1
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CML	chronic myeloid leukemia
COL25A1	collagen type XXV alpha 1 chain
CPVL	carboxypeptidase vitellogenic like
CSCs	cancer stem cells
CTA	cancer-testis antigen
DN	double-network
ECAR	extracellular acidification rate
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	fetal bovine serum
FCCP	trifluoromethoxy carbonylcyanide phenylhydrazone
FLT3L	FMS-like tyrosine kinase 3 ligand
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GOLM1	golgi membrane protein 1
HBA	hemoglobin A
HE	hematoxylin eosin
HEL	human erythroid leukemia
HEPES	4- (2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid
HIST1H2AL	histone H2A type 1
HOTAIRM1	HOX antisense intergenic RNA myeloid 1
HOXA10	homeobox A10

IKZF3	IKAROS family zinc finger
RANBP17	RAN binding protein 17
RPS27	ribosomal protein S27
LB	Luria Broth
LINC	long intergenic non-protein coding RNA
LSC	leukemic stem cell
MAGEA1	melanoma-associated antigen 1
MAML3	mastermind like transcriptional coactivator 3
MCTP2	multiple C2 And transmembrane domain containing 2
MIR924HG	MIR924 host gene
mRNA	messenger ribonucleic acid
NDUFB6	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit B6
OCR	oxygen consumption rate
PAMPS	poly- (2-acrylamido-2-methylpropanesulfonic acid)
PBS	phosphate-buffered saline
PCDME	poly N-(carboxymethyl)-N, N'-dimethyl-2-(methacryloyloxy) ethanaminium, inner salt
PCR	polymerase chain reaction
PDMAAm	poly- (N,N'- dimethyl acrylamide)
PLGRKT	plasminogen receptor with a C-terminal lysine
PLP2	proteolipid protein 2
PNaSS	poly (sodium p-styrene sulfonate)
POPDC3	popeye domain cAMP effector 3
PS	polystyrene
PTPN7	protein tyrosine phosphatase non-receptor type 7
RPMI	roswell park memorial institute
SELENOP	selenoprotein P
SCF	stem cell factor
shRNA	short hairpin RNA
SMARCA5	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5
SNCA	α -synuclein
SOCS2	suppressor of cytokine signaling 2
TARGET	therapeutically applicable research to generate effective treatments
TCGA	the cancer genome atlas

TCL1a	T-cell leukemia/lymphoma protein 1A
TPTE	transmembrane phosphatase with tensin homology
TSPYL5	testis-specific Y-encoded-like 5
ZNF	zinc finger protein

緒言

悪性新生物

悪性新生物は日本の死因第一位であり、2022 年の悪性新生物による死亡数は 385,797 人であった。臓器別では、肺癌が年間死亡数 76,663 人で最も多く、大腸癌、胃癌、膵癌と続く。白血病は第 11 位で、日本における 2022 年の年間死亡数は 9,759 人、10 万人あたりの死亡数は 7.8 人であった(がんの統計 2024, 2024)。

小児白血病の疫学と現状

白血病とは血球を作る細胞である造血幹前駆細胞が骨髄の中でがん化し、増殖する疾患である。適切な治療がなされない場合は、感染症や出血により短期間で致死となる。白血病は急性白血病と慢性白血病に分類され、小児白血病においては急性白血病が大部分を占める。急性白血病は、主に白血球の一種であるリンパ球ががん化し増殖する急性リンパ性白血病 (acute lymphocytic leukemia, ALL) と骨髄球系前駆細胞ががん化し増殖する急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia, AML) に分類され、ALL が約 70%、AML が約 25% を占める(がん情報サービス, 2023)。治療の基本は多剤併用化学療法であるが、症例に応じて造血幹細胞移植や chimeric antigen receptor-T 細胞療法等を検討する。

本邦の小児例においては、ALL は日本で約 500 人が新たに診断され、男女比は 1.34 : 1 と男児にやや多い。発症年齢は 1-4 歳に大きなピークがある。免疫学的分類では、B 前駆細胞性 ALL が 85.6%、T 細胞性 ALL が 10.9%、成熟 B 細胞性 ALL が 2.4%、不明が 1% であった(Horibe et al., 2013)。近年、小児 ALL の長期生存率は 80% を超えるまでに向上している(Inaba et al., 2013)。一方 AML は、日本で約 180 人が新たに診断され、男女比は 1.1: 1 である(Horibe et al., 2013)。小児 AML は 49-62% の無病生存率を達成しているが(Rubnitz et al., 2010)、約 10% の症例で寛解導入が不能であり(Tsukimoto et al., 2009)、また寛解症例の約 30-40% が再発する(Kaspers et al., 2013)。Kaspers らの報告によると、この再発及び再寛解導入不能の小児 AML (再発難治小児 AML) の 4 年生存率は 38% であり(Kaspers et al., 2013)、新規治療薬の開発が急務である。

がん幹細胞

がんは無制限、無秩序に増殖しているように見えるが、同一の腫瘍内でも性質の異なる複数の細胞集団からなり、不均一な集団であることが知られている。その不均一性 (heterogeneity) を説明する考え方としてがん幹細胞 (cancer stem cells,

CSCs) 仮説があり、AML で初めて報告された(Dominique B & John E. Dick, 1997)。がん幹細胞は腫瘍組織中に存在し、正常の幹細胞と同じように多分化能、自己複製能を有する細胞集団と定義される。これらの細胞は、化学療法や放射線療法に抵抗性を示すことで、再発や転移の原因になるとされる (図 1)。

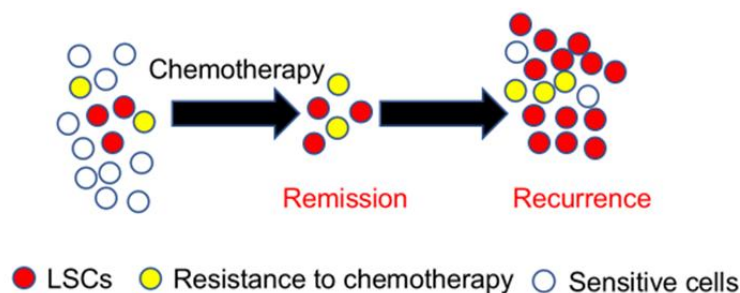


図 1 がん幹細胞の概略図

がん組織内に存在するがん幹細胞は、放射線療法や化学療法に対して DNA 修復や薬剤排泄能の亢進などの耐性機構により、治療抵抗性を獲得して生存する。自己複製能、多分化能を持つことで腫瘍形成を行い、転移・再発の原因となる。がん幹細胞に対する有効な治療法の開発が腫瘍の根絶には必要である。

白血病幹細胞

化学療法に抵抗性で、自己複製能を有する極少数の白血病幹細胞 (leukemia stem cells, LSCs) が存在することが想定されてきた。この LSCs が、あたかも正常の造血幹細胞システムを模倣するかのように白血病集団の頂点に座し、自己複製しながら多数の白血病細胞を供給するシステムの存在も併せて想定されてきた。この LSCs は、わずかでも残存すると再発をきたす(Farge et al., 2017; Stelmach & Trumpp, 2023)。

白血病の治療抵抗性の機序として、LSCs が抗がん剤存在下でも代謝モードを変化させ、生存に有利な環境を構築することが明らかとなっている。具体的には、AML の化学療法抵抗性には、酸化的リン酸化の活性が相関すること、LSCs は分化した芽球や正常造血幹細胞と比較しミトコンドリア由来の ATP 産生が亢進していること等が報告されている(Farge et al., 2017; Lagadinou et al., 2013; Mesbahi et al., 2022)。したがって、LSCs の化学療法抵抗性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。

現在までに LSCs を標的とした様々な治療が開発されてはいるが、LSCs は極めて希少な分画のため、LSCs を標的とした薬剤感受性スクリーニングは困難であり、治療開発を妨げる要因となっている(Barreto et al., 2022)。

LSCs の性質を明らかにするには、LSCs の効率的な誘導が不可欠である。LSCs の同定方法は報告により異なるが、多分化能や自己複製能の指標としては多能

性細胞の指標である *Nanog*、*Oct3/4*、*Sox2* などが用いられる。また、*GPR56*、*AKR1C3*、*CD34*、*EMP1*、*CPXM1*、*CDK6*、*KIAA0125*、*DPYSL3*、*ARHGAP22*、*NYNRIN*、*ZBTB46*、*DNMT3B*、*SMIM24*、*MMRN1*、*NGFRAP1*、*SOCS2*、*LAPTM4B* などが、LSCs のマーカーとして報告されている(Ng et al., 2016)。

がん幹細胞の従来の濃縮方法

がん幹細胞の収集方法としては、①表面抗原を用いたソーティング、②サイドポピュレーション法に代表される CSCs の性質を用いたソーティング、③培養基材による濃縮などの手法が試みられている。しかし、フローサイトメトリーによるソーティングでは細胞へのダメージが大きく、*in vivo* 動物実験などに用いにくいことが問題となる。培養基材を用いた濃縮では、時間がかかることが問題となっている。またどちらの方法でも全体の細胞数に占める CSCs の割合は少ないため、解析に必要な CSCs を確保するのに大量の基材が必要となり、研究の進展が妨げられてきた。

ハイドロゲルによるがん幹細胞の誘導法

北海道大学大学院医学研究院腫瘍病理学教室の先行研究にて、ある種のハイドロゲル〔PAMPS-PDMA double network gel (DN gel)〕上で細胞を培養することで、細胞がスフィア形成をとり、効率的に CSCs を誘導できることをみいだした(Suzuka et al., 2021)。DN ゲルは 24 時間以内に non-CSCs から CSCs を迅速且つ効率的に誘導することが可能で、従来の選別方法と異なり、多数の CSCs を得ることができ、CSCs の性状解析や CSCs への選択性の高い薬剤を同定する際の一助になると考えられている。

ハイドロゲル上での細胞培養が検討された背景としては、北海道大学スポーツ医学分野より DN ゲルがウサギの膝関節の軟骨の再生を誘導すると報告されたことから(Yasuda et al., 2009)、生体適合性の高いハイドロゲルに幹細胞を誘導する特性があると考えたことによる。DN ゲルは、第一のネットワークとして poly-(2-acrylamido-2-methylpropane sulfonic acid) (PAMPS)、第二のネットワークとして poly-(N,N'-dimethylacrylamide) (PDMAAm) を組み合わせて作られたハイドロゲルである。第一のネットワークは硬くて脆いのに対し、第二のネットワークは伸縮性があり柔軟な性質を持ち、立体構造と機械的特性が対照的な 2 種類のポリマーネットワークから構成されている。第一のネットワークは密に架橋された高分子電解質からなり、第二のネットワークは疎に架橋された中性ポリマーによって構成される。水分含有量は 85-90%で上述のように生体適合性も高い(Jian Ping Gong, 2014)。

研究が進む中で、DN ゲル以外にも CSCs の性質を誘導するゲルが同定され

るようになり、その中から PCDME ゲルと PNaSS ゲルが候補として挙げられた。PCDME ゲルは poly (N- (carboxymethyl) -N,N-dimethyl-2-(methacryloyloxy)) で、PAMPS と組み合わせて、PAMPS-PCDME double network gel も作成されており、PAMPS に近い伸縮性があり柔らかい性質を持つ(Yin et al., 2013)。PNaSS ゲルは poly (sodium p-styrene sulfonate) で、杯様体を培養した場合は polystyrene (PS) dish 上と同様の分化方向を示したという報告がある(J. F. Liu et al., 2011)。また PNaSS ゲルはヒト冠動脈内皮細胞の培養にも適していると報告されている(J. F. Liu et al., 2011)。がん細胞を培養した場合も形態学的には PS dish と類似の形態をとるが、がん幹細胞性が誘導された。そのため、形態によらないがん幹細胞性誘導を観察できるという利点もある。また実臨床では陽イオン交換樹脂として使用されており、生体適合性も高いと評価されている。

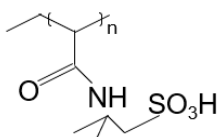
本研究では、ハイドロゲル上で浮遊細胞である白血病細胞を培養することで効率的に LSCs を誘導し、LSCs の誘導の鍵となる治療標的分子の同定を目指した。

方法

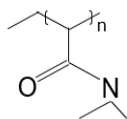
1. ハイドロゲルの合成

PAMPS ゲルは、モノマーの 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid (AMPS; Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. Tokyo, Japan) 1mol/L を、架橋剤である N,N'-methylenebisacrylamide (MBAA; Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. Tokyo, Japan) 4 mol % および UV 開始剤である 0.1 mol % 2-oxoglutaric acid (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) と混合し、2 枚のガラス板から成るセルに注入した。これに波長 365 nm の紫外線を 6 時間照射し重合させ、厚さ約 2-3 mm のシート状の PAMPS ゲルを合成した。合成後、未反応物を除去するため 4- (2-HydroxyEthyl) -1-Piperazine Ethane Sulfonic acid (HEPES) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 緩衝液に浸漬し 1 週間毎日交換して平衡状態に達したものを細胞培養に用いた (Gong et al., 2003; Yasuda et al., 2005)。

DN ゲルは、以前に報告された 2-step sequential polymerization method を用いて合成した。2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid (AMPS) (Toagosei Co. Ltd., Japan)、N,N'-dimethylacrylamide (DMAAm) (KOHJIN Co. Ltd., Tokyo, Japan)、N,N'-methylenebisacrylamide (MBAA) (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan)、2-oxoglutaric acid (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan) を購入した (図 2)。DMAAm 以外の薬剤は追加の精製を行わずに使用した。架橋剤として MBAA を使い、重合開始剤として 2-oxoglutaric acid を用いたラジカル重合によりハイドロゲルを作製した。モノマーおよび架橋剤、開始剤を含む水溶液をシリコーンゴムで仕切られた一対のガラス板からなるセルに注入した。このセルに UV ランプ (波長 365 nm) を約 8 時間照射した。第 1 のネットワークである PAMPS ハイドロゲルを MBAA および 2-2-oxoglutaric acid を含む 2M の DMAAm 溶液に平衡に達するまで浸漬した。続いて UV 光を約 8 時間照射して重合させることで PDMAAm による第 2 のネットワークを作製した。重合後、未反応物を除去するため HEPES 緩衝液に浸漬し、1 週間毎日交換して平衡状態に達したものを細胞培養に用いた (Gong, 2014)。



PAMPS gel: poly(2-acrylamide-2-methylpropanesulfonic acid)



PDMAAm gel: poly(N,N'-dimethylacrylamide)

図2 DNゲルを構成するPAMPSとPDMAAmの化学式

PCDMEゲルは1MのN-(carboxymethyl)-N,N'-dimethyl-2-(methacryloyloxy) ethanaminium, inner salt (Osaka Organic Chemical Co., Ltd., Japan) を主成分のモノマーとして(図3)、クロスリンカーである0.3 mol%のN,N'-methylenebisacrylamide (MBAA) (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan) とエタノールにより溶解した0.1 mol%の2-oxoglutaric acid (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan) を用いた。架橋剤としてMBAAを用い、重合開始剤として2-oxoglutaric acidを用いたラジカル重合によりハイドロゲルを作製した。モノマーおよび架橋剤、開始剤を含む水溶液をシリコーンゴムで仕切られた一対のガラス板からなるセルに注入した。このセルにUVランプ(波長365 nm)を約8時間照射した。重合後、未反応物を除去するためHEPES緩衝液に浸漬し、1週間毎日交換して平衡状態に達したものを細胞培養に用いた(Yin et al., 2013)。

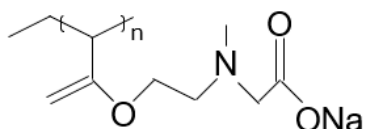


図3 PCDME gel: poly N-(carboxymethyl)-N,N'-dimethyl-2-(methacryloyloxy) ethanaminium, inner salt の化学式

PNaSSゲルは、1Mのsodium p-styrene sulfonate (Osaka Organic Chemical Co., Ltd., Japan) を主成分のモノマーとして(図4)、クロスリンカーである1 mol%のN,N'-methylenebisacrylamide (MBAA) (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan) とエタノールにより溶解した0.1 mol%の2-oxoglutaric acid (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan) を用いた。架橋剤としてMBAAを用い、重合開始剤として2-oxoglutaric acidを用いたラジカル重合によりハイドロゲルを作製した。モノマーおよび架橋剤、開始剤を含む水溶液をシリコーンゴムで仕切られた一対のガラス板からなるセルに注入した。このセルにニトロゲンガスを30分さらして、UVランプ(波長365 nm)を約6時間照

射した。重合後、未反応物を除去するため HEPES 緩衝液に浸漬し、1 週間毎日交換して平衡状態に達したものを細胞培養に用いた(J. J. Yang et al., 2010)。

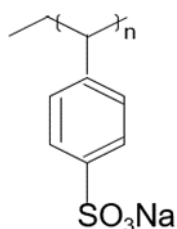


図 4 PNaSS gel: poly(sodium p-styrene sulfonate) gel の化学式

2.白血病細胞と培養方法

細胞株 4 種 (K562, KG-1, UCSD/AML1, MOLM13) (表 1)と、急性未分化型白血病(acute undifferentiated leukemia, AUL)の生後 1 か月女児の末梢血の検体を用いた。K562, KG-1, UCSD/AML1, MOLM13 の培養には RPMI-1640 培養液 (Shimadzu Diagnostics corporation, Japan)を用いた。患者検体の培養には StemSpan™ Serum-Free Expansion Medium (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada)を使用した。各細胞の培養液には 10 %ウシ胎仔血清 (fetal bovine serum, FBS) (Gibco, Brazil)、100 U/ml ペニシリンを添加した。UCSD/AML1 の培養液には、10 %FBS、100 U/ml ペニシリン、granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)を添加した。患者検体の培養液には stem cell factor (SCF)、FMS-like tyrosine kinase 3 ligand (FLT3L)、GM-CSF を添加した。それぞれの細胞を 5 %二酸化炭素 (CO_2) 存在下、37 °C のインキュベータ内で培養した。培養開始時の細胞数は、各細胞株では 1.0×10^5 個/ml、患者検体では 5.0×10^5 個/ml とした。

PAMPS ゲル、DN ゲル、PCDME ゲル、PNaSS ゲルは、培養 dish の大きさに合わせて型抜きを実施後、オートクレーブ滅菌を行った。それぞれのゲルを PS dish の底に沈めて、培養細胞に適合した培地で一晚浸漬後、ゲル上に 1.0×10^5 cells/ml の濃度となるように細胞を播種し、培養した。コントロールとして、通常培養条件である PS dish で培養した細胞を用いた。臨床検体を用いた実験は、「北海道大学病院 小児科：診療目的で採取された血液・組織などの研究用保管とその利用」に従って実施した (実施許可番号：指 022-0291)。

表 1: 本研究で使用した白血病細胞株

Name of cell line	Genetic background	Classification
K562	der(6)t(6;6),der(17)t(9;17),der(21)t(1;21), der(5)t(5;6), der(18)t(1;18)	CML in blast crisis
KG-1	45(42-47)<2n>X/XY, -4, +8, +8, -12, -17, -20, +2mar, der(5;17)(q10;q10)del(5)(q?11q?13), dup(7)(q12q33), del(7)(q22q35), i(8q)x2, der(8)t(6;8)(p11;q22), der(8)t(8;12)(p11;q13), der(11)t(1;11)(q13-21;p11-p13), der(16)t(?12;16)(?p13;q13/21)	human myelogenous leukemia
UCSD/AML1	45, XX, - 7, t(3;3)(q21;q26)	AML
MOLM13	KMT2A-MLLT3, FLT3-ITD+	AML

3.RNA 抽出および遺伝子発現解析

RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて細胞から total RNA を抽出後、NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) にて濃度を測定した。抽出した total RNA を用いて、SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) を用いて逆転写反応により complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) を作製した。遺伝子発現解析には Power SYBR® Green Master Mix の調整法に従い、real-time polymerase chain reaction (PCR) 法を StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) を用いて、テクニカルトリプリケートで実施した。cDNA の quality 評価として、*glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase* (GAPDH) を内因性コントロールに使用した。cDNA を含む各 RT 反応液 1 µl に、SYBR Green Premix, Ex Taq II (Takara, shiga, Japan) 10 µl、10 µM forward プライマー 0.18 µl, 10 µM reverse プライマー 0.18 µl、滅菌蒸留水 8.64 µl を添加し、各反応液を 95 °C にて 3 分間反応させた後、95 °C にて 30 秒間、58 °C にて 30 秒間、72 °C にて 30 秒間の条件で 40 サイクル反応させ、最後に 72 °C にて 5 分間反応させた。使用したプライマーの配列は以下の表 2 に示す通りである。

表 2: 実験に使用した real-time PCR プライマー

<i>GAPDH</i>	Forward	5`-agccacatcgctcagacac- 3`
	Reverse	5`-gcccataacgaccaaacc- 3`
<i>CD34</i>	Forward	5`-cccatgctggaggtagatctc- 3`
	Reverse	5`-ccaggagccgaatgtgtaaag- 3`
<i>Oct3/4</i>	Forward	5`-cgaccatctgccgcttgag- 3`
	Reverse	5`-ccccctgtccccattccta- 3`
<i>Nanog</i>	Forward	5`-tgcaatgtcttctgtgagat- 3`
	Reverse	5`-gttcaggatgttgagagttc- 3`
<i>CD71</i>	Forward	5`-atcggttggtgccactgaatgg- 3`
	Reverse	5`-acaacagtgggctggcagaaac- 3`
<i>CD117</i>	Forward	5`-caccgaaggaggcacttacaca- 3`
	Reverse	5`-tgccattcacgagcctgtcga- 3`
<i>CD38</i>	Forward	5`-tcttcccagactggagaaagg- 3`
	Reverse	5`-tggaccacatcacaggcagctt- 3`
<i>Sox2</i>	Forward	5`-agtctcaagcgacgaaaaa- 3`
	Reverse	5`-ggaagtgggatgaacaa- 3`
<i>DNMT3B</i>	Forward	5`- aagcgacaggctatgtctgg - 3`
	Reverse	5`- cagtgccaccagttgtctg- 3`
<i>CD44</i>	Forward	5`-ccagaaggaacagtggtttggc- 3`
	Reverse	5`-actgtcctctgggcttggtgtt- 3`
<i>SOCS2</i>	Forward	5`- cagatgtgcaaggataagcgg - 3`
	Reverse	5`- gcggtttggtcagataaagggtg - 3`
<i>MAGEA1</i>	Forward	5`-gcacctctgtatcctggagtc- 3`
	Reverse	5`-gacactctccagcatttctgcc- 3`
<i>MIR924HG</i>	Forward	5`- acagataaagggtcaagactggaaa - 3`
	Reverse	5`- tcctgtcctaacaccagtctt - 3`
<i>ZNF-433-AS1</i>	Forward	5`- ccggaatatctggaagctga - 3`
	Reverse	5`- gtctcaatggcaccagatt - 3`
<i>RANBP17</i>	Forward	5`-tgttgatcgggctggcaagaga- 3`
	Reverse	5`-tgttggctctccataaccacct- 3`
<i>HOTAIRM1</i>	Forward	5`- aggggggtgaaatgtgggtg - 3`
	Reverse	5`- ctgaaagtggagaaaataaagtgcc - 3`
<i>LINC01205</i>	Forward	5`- ccaccattcaagtccacatcc - 3`

<i>MCTP2</i>	Reverse	5`- ccacactgttcttgaggcttag - 3`
	Forward	5`- ccttagcagacctcagcgaaag - 3`
<i>COL25A1</i>	Reverse	5`- ctcttcctgagaaatctgccg - 3`
	Forward	5`-ctggagcagtaggacagaatgg- 3`
<i>TSPYL5</i>	Reverse	5`-cttttcgcctgtgtcaccccttg- 3`
	Forward	5`-gcatggatacgctggagaacgt- 3`
<i>SELENOP</i>	Reverse	5`-tttggatgaggtggttcctgcg- 3`
	Forward	5`-catcttggtttgccttttccttc- 3`
<i>HIST1H1B</i>	Reverse	5`-acagtagccaaagatacacgtttac- 3`
	Forward	5`-ccgaaaaaggcaaccaagagtc- 3`
<i>CCDC144NL-AS1</i>	Reverse	5`-gtttcacacgccagcttctac- 3`
	Forward	5`-agctggagatcacttagtgtaagg- 3`
<i>IKZF3</i>	Reverse	5`-aagctaggcttgctttattcct- 3`
	Forward	5`-gccaaagaagagatgcgctcac- 3`
<i>CALN1</i>	Reverse	5`-ggcgttattgatggcttggtcc- 3`
	Forward	5`-actggtgtcttcagaaggtcgc- 3`
<i>BTBD3</i>	Reverse	5`-gttaggtggtctcggaaggcat- 3`
	Forward	5`-cctgctgctttctcgctatgc- 3`
<i>AKR1B1</i>	Reverse	5`-aacacaggctctggcaaggtag- 3`
	Forward	5`-ccaactcaaccatctccaggtag- 3`
<i>HIST1H2AL</i>	Reverse	5`-gtcaccacgatgccttggact- 3`
	Forward	5`-gcgacaacaagaagaccgcat- 3`
<i>HOXA10</i>	Reverse	5`-gagcgaagggtactttgcccag- 3`
	Forward	5`-cttccgagagcagcaaagcctc- 3`
<i>PLP2</i>	Reverse	5`-tccagtgtctggcttcgtgt- 3`
	Forward	5`-catagcggcaatcctctacgt- 3`
<i>BAIAP2L1</i>	Reverse	5`-cgtcatagccaaagaggcacgt- 3`
	Forward	5`-tggtctatggagaacacgacg- 3`
<i>CPVL</i>	Reverse	5`-gctgatgcttctactgggtgtg- 3`
	Forward	5`-gtgaagtggctggttacatccg- 3`
<i>HBA2</i>	Reverse	5`-gtcaaaagctctcagaggctgg- 3`
	Forward	5`-gacctgcacgcgcacaagctt- 3`
<i>NDUFB6</i>	Reverse	5`-gctcacagaagccaggaacttg- 3`
	Forward	5`-ttcactcatgtactgtacctgtc- 3`
	Reverse	5`-tctggacttctttcaactatgcc- 3`

<i>MALT1</i>	Forward	5`-tggaagccctattcctcactacc- 3`
	Reverse	5`-catgacaccagtaggttccttgg- 3`
<i>MAML3</i>	Forward	5`-cacagcggaatccataccaggt- 3`
	Reverse	5`-atgcctgcgttctgtgccatca- 3`
<i>RPS27</i>	Forward	5`-aagaacgcctggtgcagagcc- 3`
	Reverse	5`-tgtaggctggcagaggacagt- 3`
<i>PTPN7</i>	Forward	5`-ggaccgatacaagaccatcttgc- 3`
	Reverse	5`-ggaggcaatgtagaccttctcc- 3`
<i>CECR2</i>	Forward	5`-ccttgatggctcctctggagt- 3`
	Reverse	5`-cggaggctgttaattccaactgg- 3`
<i>ARHGDIB</i>	Forward	5`-cggtcagcacacctacaggact- 3`
	Reverse	5`-ttgggagcctcctaactggag- 3`
<i>PLGRKT</i>	Forward	5`-gattgcgtggtctcggaattc- 3`
	Reverse	5`-aacaatcgggaccaggaaggct- 3`
<i>POPDC3</i>	Forward	5`-tcactgagaccacagaggaag- 3`
	Reverse	5`-ggagatgtagcgatctgagca- 3`
<i>GOLM1</i>	Forward	5`-atcaccacaggtgagaggctca- 3`
	Reverse	5`-acttctctccaggttggtctg- 3`
<i>SNCA</i>	Forward	5`-accaacagggtgtggcagaag- 3`
	Reverse	5`-cttgctcttggtcttctcagcc- 3`
<i>ZNF718</i>	Forward	5`-tggtcaccagtctggagcaaag- 3`
	Reverse	5`-cttctatgccctgcactgtcca- 3`
<i>HBA1</i>	Forward	5`-gacctgcacgcgacaagctt- 3`
	Reverse	5`-gctcacagaagccaggaacttg- 3`
<i>CAAP1</i>	Forward	5`-agtaccgactctccagctct- 3`
	Reverse	5`-caaggtcactgtgctctgcca- 3`

4.XFp analyzer による代謝解析

PNaSS ゲル上で7日間培養した白血病細胞株と AUL の患者検体を用いた。コントロールには、通常培養条件である PS dish で培養した細胞を用いた。それぞれの細胞 1×10^5 個/well を XF Assay Medium (10 mM glucose, 1 mM pyruvate, and 2 mM glutamine を添加)に懸濁し、Cell-Tak 15 μ l、0.1M Sodium Bicarbonate Buffer 430 μ l、5N NaOH 1.4 μ l でコーティングした Cell Culture Miniplate に注入した。1600 rpm で2分間遠心し、37 °Cで1時間培養した後に XFp analyzer の XF Cell Mito Stress Test で解析を行った。XF Cell Mito Stress Test では、ミトコンドリアでの

基礎呼吸能を XF Base Medium (1 mM sodium pyruvate, 10 mM glucose, 2 mM glutamine) で測定し、Oligomycin を注入し ATP 産生に関連した呼吸能を、trifluoromethoxy carbonylcyanide phenylhydrazone (FCCP) を注入し最大呼吸活性を、そして Rotenone と Antimycin A を注入して非ミトコンドリア呼吸能を測定した。

5. SCID マウスへの異所性移植実験

生後 6 週齢の雌の SCID マウス NOD/ShiJic-scid Jcl (Clea Japan, Inc., Tokyo, Japan) を用いた。K562 細胞を 1.0×10^5 cells/ml の密度となるように PNaSS ゲル上と PS dish 上に播種した。64 日後、それぞれの細胞をマウスの脳に 27 G の針と使い捨て注射器を用いて注射した。播種した細胞数は 1.0×10^5 cells で各 4 匹、合計 8 匹に注射した。PNaSS ゲル上で培養したマウスの 4 匹中 3 匹に平衡障害が出現し、細胞播種から 15 日の時点でマウスを安楽死させた。

脳を摘出し、4 %緩衝ホルマリンを用いて固定した。組織切片は hematoxylin eosin (HE) 染色及び Ki-67、CD34、glycophorin-A を用いた免疫組織化学により組織標本を作製した。動物実験は、「北海道大学動物実験に関する規定」に従って実施した（動物実験計画書承認番号：22-0089）。

6. SCID マウスへの同所性移植実験

生後 6 週齢の雌の SCID マウス NOD/ShiJic-scid Jcl (Clea Japan, Inc., Tokyo, Japan) を用いた。K562 細胞を 1.0×10^5 cells/ml の密度となるように PNaSS ゲル上と PS dish 上に播種した。35 日後、それぞれの細胞をマウスの尾静脈より 27G の針と使い捨て注射器を用いて注射した。播種した細胞数は 5.0×10^4 cells を各 4 匹、 5.0×10^5 cells を各 4 匹、合計 16 匹に注射した。細胞播種後 28 日、49 日、90 日に採血し、塗抹標本とフローサイトメトリーにより異形細胞の有無を評価した。なおフローサイトメトリーでは FITC を CD71、APC を CD45 とした。細胞播種から 74 日の時点で 1 匹死亡し、細胞播種から 91 日の時点でマウスを安楽死させた。肺、腎臓、脾臓、心臓を摘出し、4 %緩衝ホルマリンを用いて固定した。組織切片は HE 染色により評価した。動物実験は、「北海道大学動物実験に関する規定」に従って実施した（動物実験計画書承認番号：22-0089）。

7. シングルセル法による遺伝子解析

PNaSS ゲル上で 42 日間培養した白血病細胞株と、コントロールとして通常培養条件である PS dish で培養した細胞に対して、Chromium (10x Genomics, Pleasanton, CA, USA) を用いてシングルセル RNA シーケンシングを行った。取得したデータは R package の Seurat (v5.1.0) を用いて解析した。まず

CreateSeuratObject 関数によりそれぞれの遺伝子発現マトリックスから Seurat object を生成した。NormalizeData 関数を用いて発現量を正規化した後に merge 関数により 2 つのデータを結合した。FindVariableFeatures 関数を用いて発現変動の大きい遺伝子を抽出し、これをもとに ScaleData 関数により発現量を標準化した。その後 RunPCA 関数を用いて次元削減を行って、IntegrateLayers 関数により 2 つのデータを統合した。ElbowPlot 関数の結果をもとに、FindNeighbors 関数の dims パラメータを 1:30 として k 近傍法を行った。FindCluster 関数の resolution パラメータを 1.0 としてクラスタリングを行い、dims パラメータを 1:30 として RunUMAP 関数を実行し、全ての細胞を 2 次元上にプロットした。本解析において cluster 10 に割り振られた集団は PNaSS ゲル上で培養した細胞の含有割合が PS dish で培養した細胞に比して高く、ハイドロゲルを用いたことにより誘導された集団と考えられた。したがって、この cluster とその他の cluster との間での発現変動遺伝子を抽出し、白血病幹細胞のマーカーとなる候補遺伝子を取得した。

抽出した候補遺伝子のうち、real-time PCR primer を設計できた遺伝子について PNaSS ゲル上で 7 日間培養した白血病細胞株 K562 と PS dish で培養した K562 の遺伝子発現量を、real-time PCR 法で評価した。

8.shRNA による遺伝子ノックダウン実験

シングルセル法による遺伝子解析によって抽出した遺伝子のうち、real-time PCR 法で有意差をもって RNA 発現量の亢進を認めた遺伝子で、白血病への関連が報告されている *AKR1B1* と、様々ながんへの関連が報告されている *TSPYL5* を選択した。shRNA は MISSION™ shRNA Clone (Sigma-Aldrich Japan, Tokyo) のレンチウイルスシステムを使用した。なお、使用した shRNA Clone は表 3 の通りである。Lenti-X 293T 細胞株に shRNA プラスミド、第二世代レンチウイルスパッケージングプラスミド psPAX2 とエンベローププラスミド pMD2.G をコトランスフェクションし、48 時間および 72 時間後に培養上清を回収し、0.45 μ m フィルターでろ過してウイルス粒子を回収した。ウイルス液に Lenti-X Concentrator を 3:1 の割合で添加し 3500 rpm で 45 分間遠心し、ウイルス上清を濃縮した。ウイルス濃縮液 100 μ l と Polybrene (8 μ g/ml) を RPMI 1640 培養液 1 ml に添加し、白血病細胞株 K562 に遺伝子を導入した。shRNA プラスミドはピューロマイシン耐性遺伝子を有しており、レンチウイルス感染から 48 時間後にピューロマイシン(1 μ g/ml) を添加し、ウイルス感染細胞のセクションを行った。生存細胞を回収し、real-time PCR 法で幹細胞関連遺伝子の発現量の評価を行った。

表 3: 実験に使用した shRNA clone

<i>AKR1B1</i> #1	TRCN0000046410	tgtgcccatgtgtaccagaat
<i>AKR1B1</i> #2	TRCN0000288741	tgctgagaactttaaggtctt
<i>TSPYL5</i> #1	TRCN0000139099	ccagctagcatcctttctgaa
<i>TSPYL5</i> #2	TRCN0000322581	gcccaatcccttgacagttcta

9. 統計学的解析

2 群間の比較の実施には Student's t-test を行った。P < 0.05 を統計学的に有意差ありと判定した。シングルセル法による候補遺伝子の抽出には Wilcoxon rank test、Logistic regression、ROC analysis を行った。

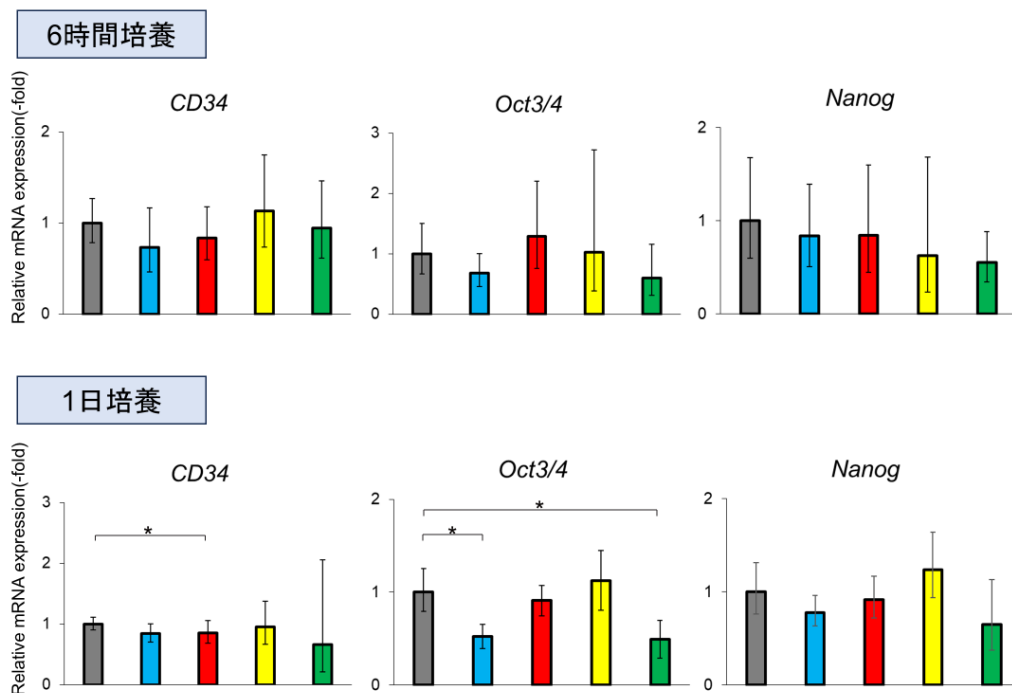
結果

1. ハイドロゲル上で培養した白血病細胞の遺伝子発現変化

ハイドロゲル上で培養した白血病細胞においてがん幹細胞性が誘導されるのかを確認するために、real-time PCR 法を用いて遺伝子発現解析を行った。

a) 白血病細胞株 K562 の検討

ハイドロゲルによるがん幹細胞性を誘導する方法の開発に向け、ハイドロゲルでの適切な培養条件を検討した。まず適切な培養時間を評価するため、PS dish 上での通常培養、および PAMPS ゲル上、DN ゲル上、PCDME ゲル上、PNaSS ゲル上で 6 時間、1 日、7 日間、14 日間培養した白血病細胞株 K562 における、幹細胞関連遺伝子である *CD34*、*Oct3/4*、*Nanog* の発現量を real-time PCR 法により検討した。6 時間培養する条件、1 日培養する条件では、いずれのゲルでも幹細胞関連遺伝子の発現量の有意な上昇を認めなかった。一方、7 日間培養する条件では、PCDME ゲルで培養した白血病細胞株 K562 において *CD34* と *Oct3/4* の有意な発現量の上昇を認め、PNaSS ゲル上で培養した白血病細胞株 K562 において *CD34*、*Oct3/4*、*Nanog* の有意な発現量の上昇を認めた。14 日間培養する条件では、DN ゲル上で培養した白血病細胞株 K562 において *CD34* と *Nanog* の有意な発現量の上昇を認めた(図 5)。



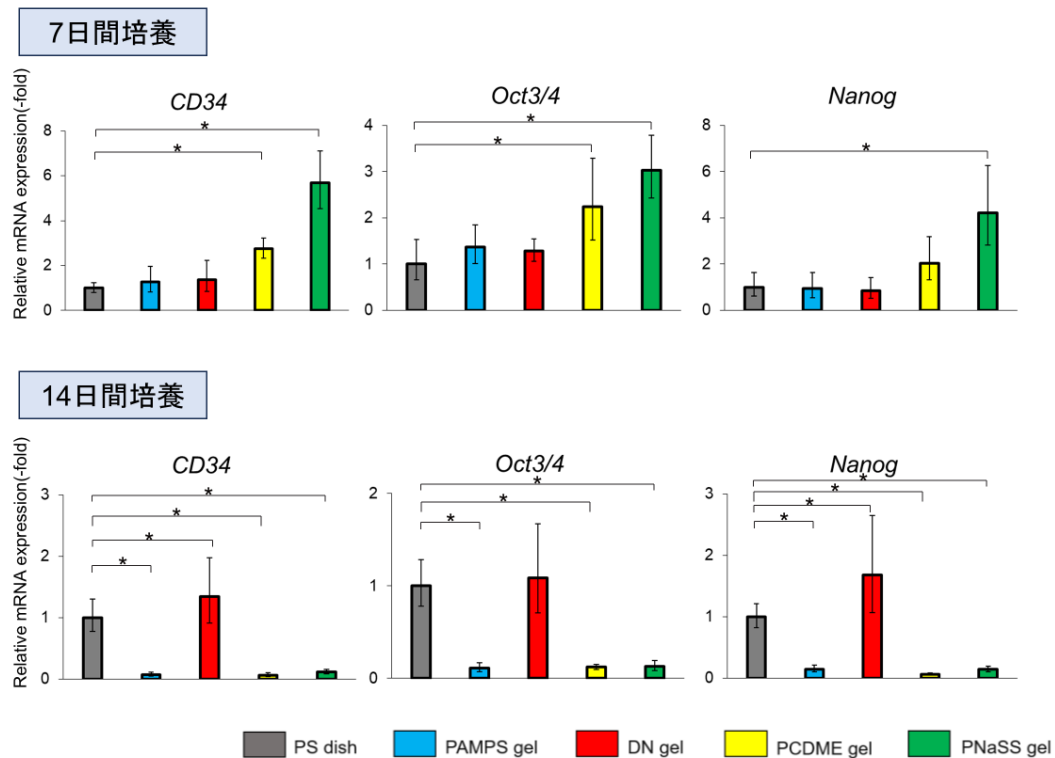


図5 Real-time PCR 法を用いた培養日数による幹細胞関連遺伝子の発現変動の評価。PS dish 上での通常培養、および PAMPS ゲル上、DN ゲル上、PCDME ゲル上、PNaSS ゲル上で 6 時間、1 日、7 日間、14 日間培養した白血病細胞株 K562 の幹細胞関連遺伝子 (*CD34*、*Nanog*、*Oct3/4*) の発現量の変化。PS dish と各ハイドロゲルとの 2 群間の比較は PS dish をコントロールとして Student's t-test を用いて行い、 $P < 0.05$ を*として示す。

次に、培地交換の頻度を検討した。PS dish 上での通常培養、および PAMPS ゲル上、DN ゲル上、PCDME ゲル上、PNaSS ゲル上で培養した白血病細胞株 K562 を、培地交換を全く行わずに 7 日間培養する条件、3 日目に 1 度のみ培地を交換し 7 日間培養する条件、2、4、6 日目に培地を交換し 7 日間培養する条件で、*CD34*、*Nanog*、*Oct3/4* の発現量を real-time PCR 法により検討した。培地交換をしない条件では、PNaSS ゲル上で培養した白血病細胞株 K562 において、*CD34* と *Nanog* の有意な発現量の上昇を認めた。3 日目に培地交換をする条件では、PCDME ゲルで培養した白血病細胞株 K562 において *CD34* と *Oct3/4* の有意な発現量の上昇を認め、PNaSS ゲル上で培養した白血病細胞株 K562 において *CD34*、*Oct3/4*、*Nanog* の有意な発現量の上昇を認めた。2、4、6 日目に培地を交換する条件では、いずれのゲルでも幹細胞関連遺伝子の発現量の有意な上昇を認めなかった(図 6)。

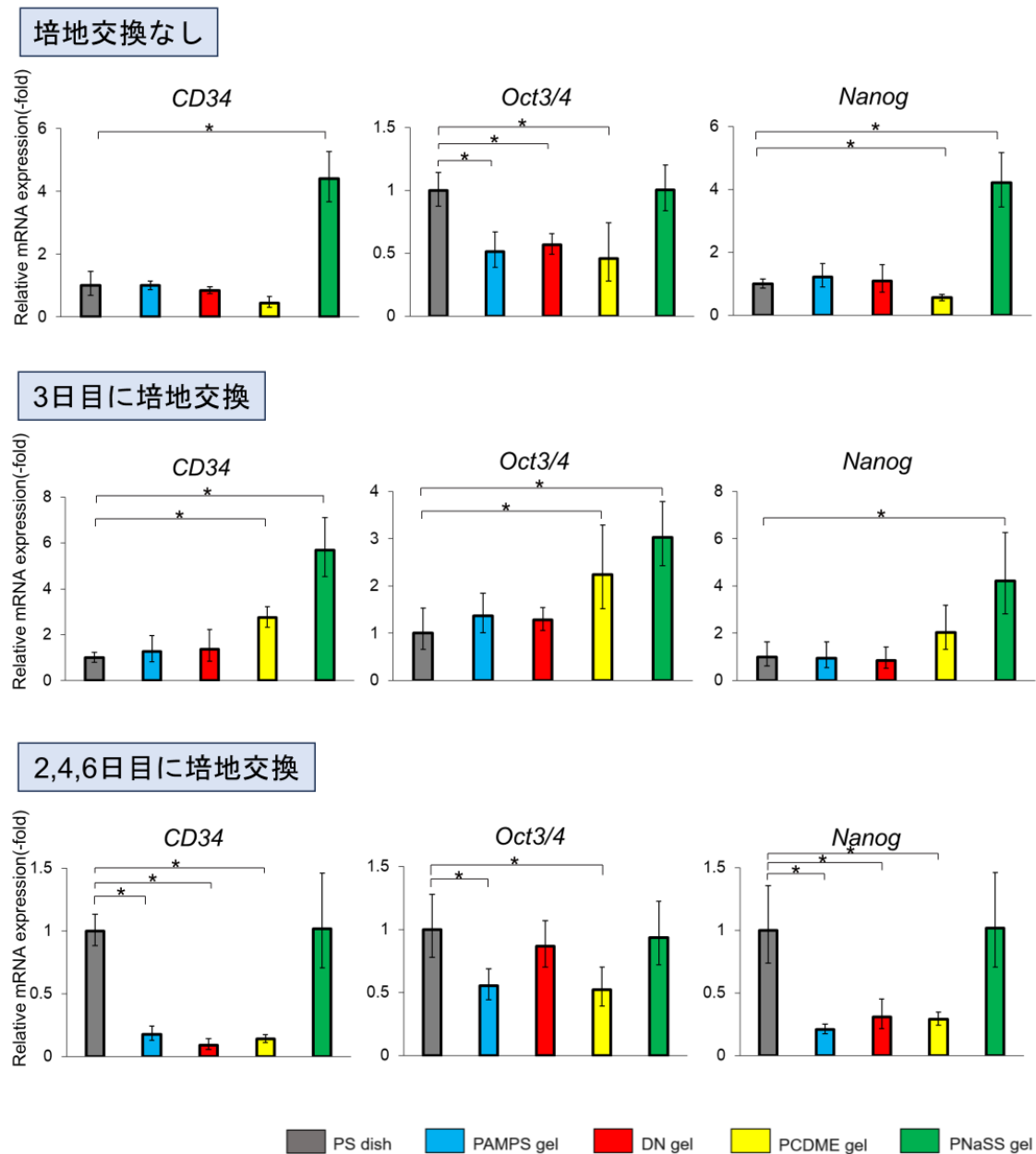
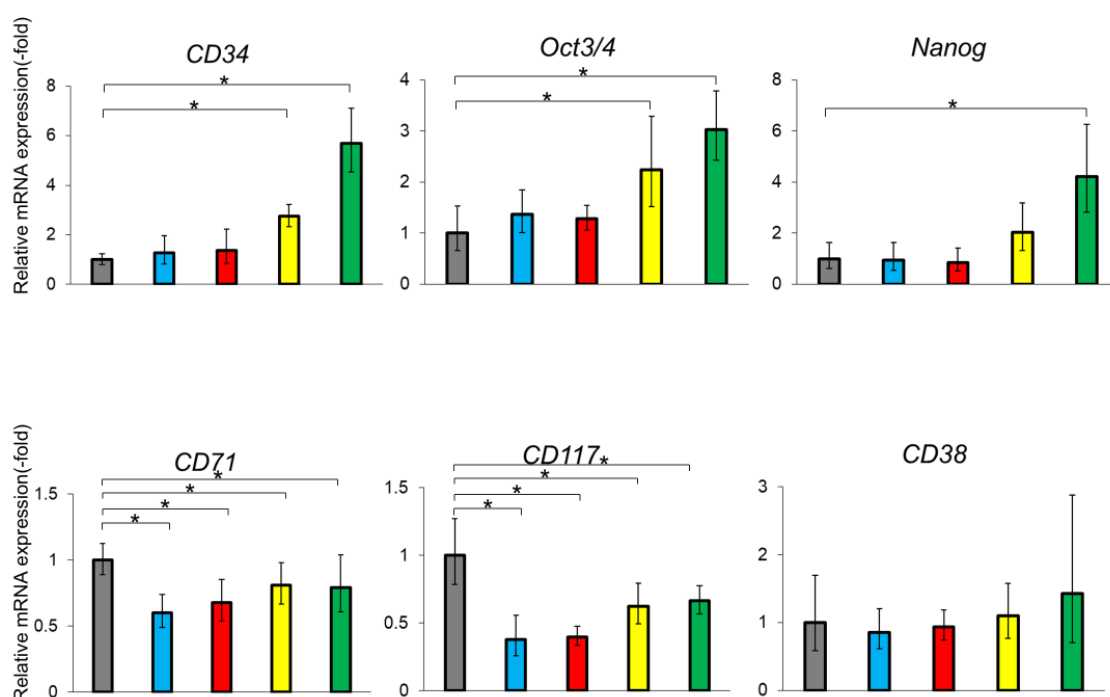


図6 Real-time PCR法を用いた培地交換の頻度による幹細胞関連遺伝子の発現変動の評価。PS dish 上での通常培養、および PAMPS ゲル上、DN ゲル上、PCDME ゲル上、PNaSS ゲル上で、培地交換を全く行わない条件、3 日目に 1 度のみ培地を交換する条件、2、4、6 日目に培地を交換する条件で 7 日間培養した白血病細胞株 K562 の幹細胞関連遺伝子 (*CD34*、*Oct3/4*、*Nanog*) の発現量の変化。PS dish と各ハイドロゲルとの 2 群間の比較は PS dish をコントロールとして Student's t-test を用いて行い、P < 0.05 を*として示す。

続いて、3日目に培地を交換し7日間培養する条件で、有用な幹細胞関連遺伝子について検討した。PS dish 上での通常培養、および PAMPS ゲル上、DN ゲル上、PCDME ゲル上、PNaSS ゲル上で培養した白血病細胞株 K562 における、幹細胞関連遺伝子の発現量を *real-time PCR* 法により検討した。PCDME ゲルと PNaSS ゲル上で培養した白血病細胞株 K562 において、*CD34*、*Oct3/4* の有意な発現量の上昇を認めた。PNaSS ゲル上で培養した白血病細胞株 K562 において、*Nanog* の有意な発現量の上昇を認めた。DN ゲル、PCDME ゲル、PNaSS ゲル上で培養した白血病細胞株 K562 において、*Sox2* の有意な発現量の上昇を認めた。一方、分化マーカーである *CD71* は、全てのゲル上で培養した白血病細胞株 K562 において発現量が低下した(図 7)。



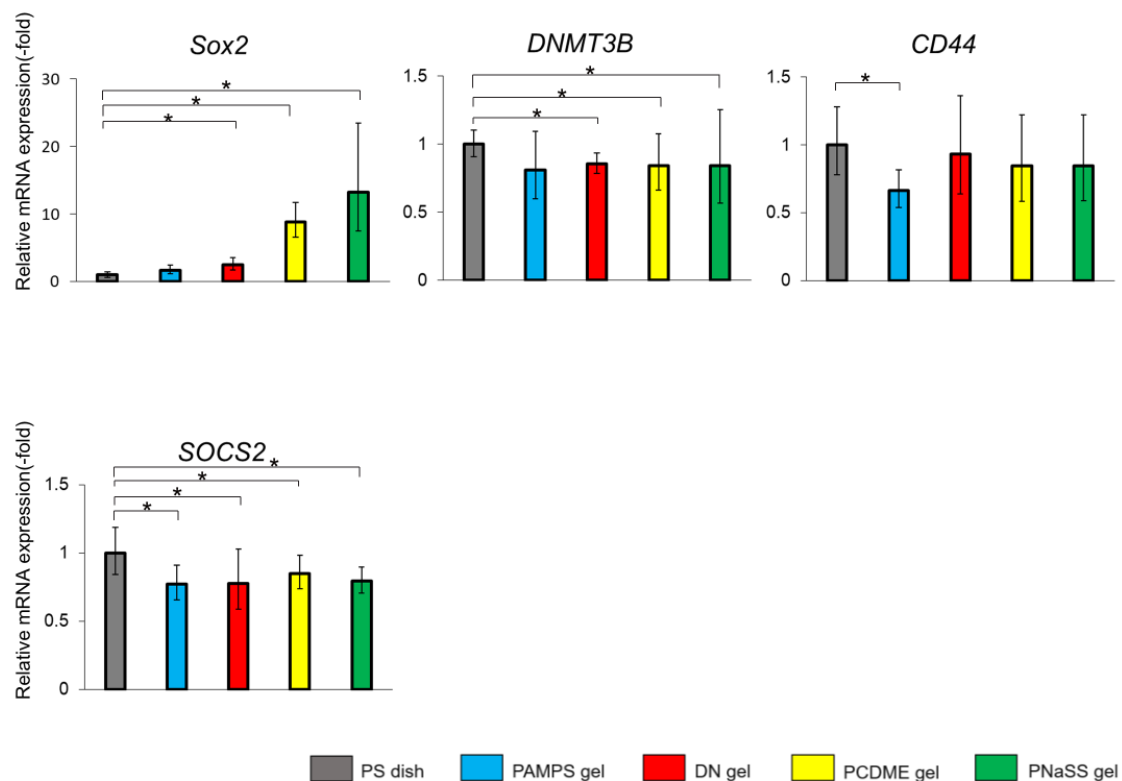


図7 Real-time PCR 法を用いた、有用な幹細胞関連遺伝子の評価。

PS dish 上での通常培養、および PAMPS ゲル上、DN ゲル上、PCDME ゲル上、PNaSS ゲル上で、3 日目に培地交換し 7 日間培養する条件での白血病細胞株 K562 の有用な幹細胞関連遺伝子の検討。PS dish と各ハイドロゲルとの 2 群間の比較は PS dish をコントロールとして Student's t-test を用いて行い、 $P < 0.05$ を*として示す。

加えて、ハイドロゲル上で培養した白血病細胞株 K562 における、幹細胞性の可逆性について検討した。PNaSS ゲルで 7 日間培養し、その後 PS dish に戻して 3 日間培養した細胞について real-time PCR 法にて幹細胞関連遺伝子の発現量を評価したところ、*CD34* と *Nanog* の発現量は低下した。次に、PNaSS ゲルで 20 日間培養し、その後 PS dish に戻して 7 日間培養したところ、幹細胞関連遺伝子の発現が保たれていた。さらに、PNaSS ゲルで 43 日間培養し、その後 PS dish に戻して 21 日間培養したところ、幹細胞関連遺伝子の発現が保たれていた。PNaSS ゲルで 7 日間培養すると幹細胞性は高まるが可逆性であり、長期培養すると不可逆性が高まると考えられた(図 8)。

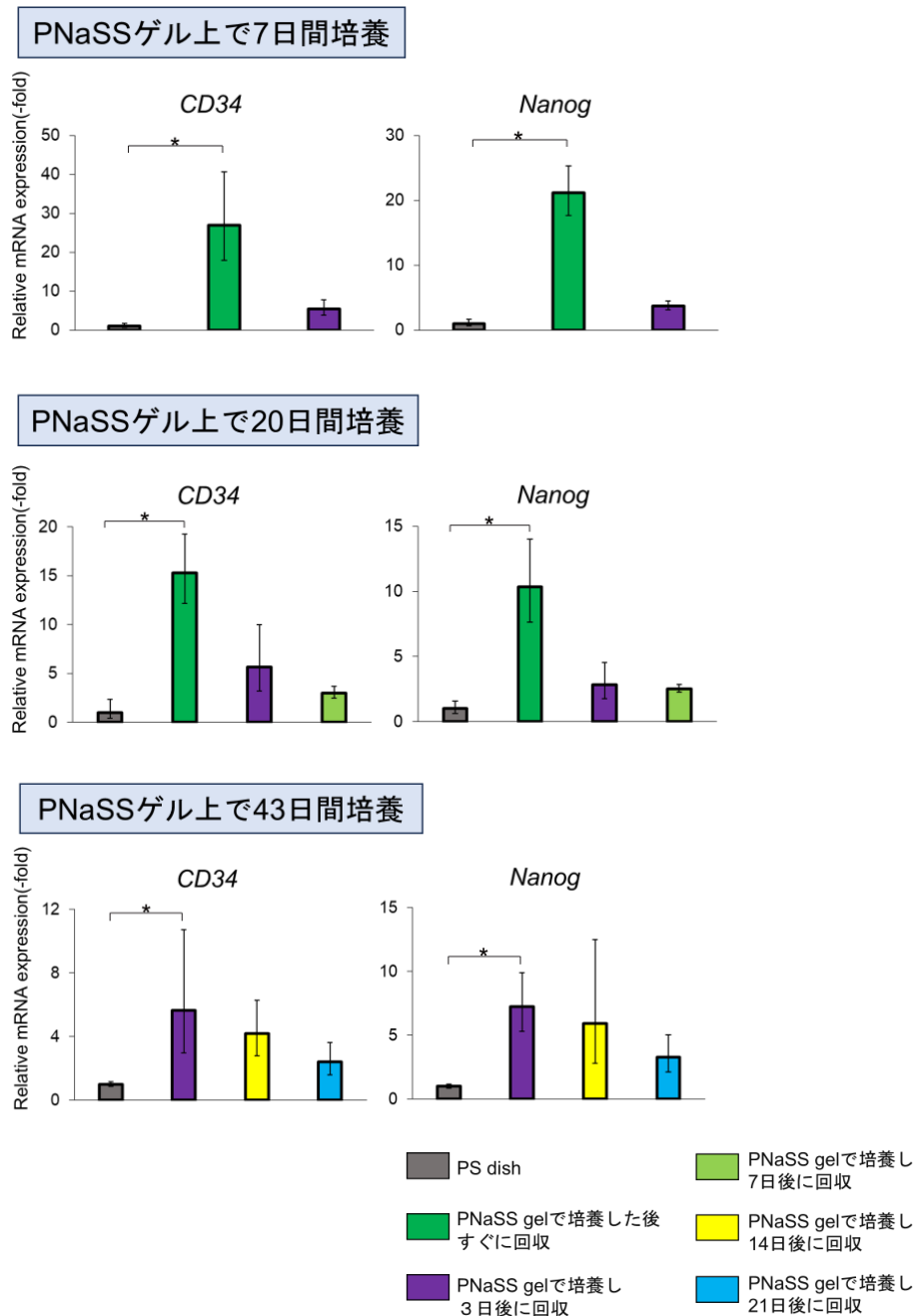


図8 Real-time PCR 法による長期培養時の幹細胞関連遺伝子の発現変動の評価。
PS dish 上での通常培養、および PNaSS ゲル上で培養した後に PS dish へ戻して培養した白血病細胞株 K562 の幹細胞マーカー遺伝子 (CD34 と Nanog) の発現量の変化。2 群間の比較は PS dish をコントロールとして Student's t-test を用いて行い、 $P < 0.05$ を*として示す。

b) 白血病細胞株 KG-1 の検討

PNaSS ゲル上で 3 日目に 1 度のみ培地を交換し 7 日間培養した白血病細胞株 KG-1 の幹細胞関連遺伝子の発現量を、real-time PCR 法により検討した。幹細胞関連遺伝子の明らかな発現量の上昇を認めなかった(図 9)。

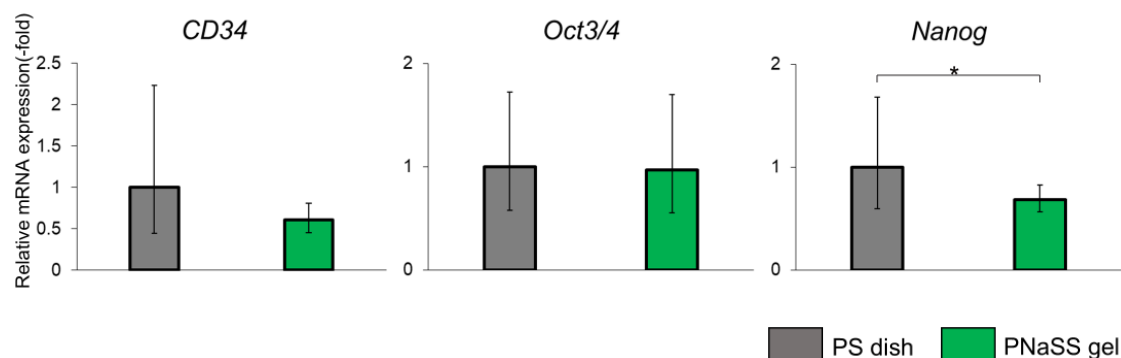


図 9 Real-time PCR 法を用いた白血病細胞株 KG-1 での幹細胞関連遺伝子の発現変動の評価。PS dish 上での通常培養、および PNaSS ゲル上で 3 日目に 1 度のみ培地を交換し 7 日間培養した白血病細胞株 KG-1 の幹細胞関連遺伝子 (CD34、Oct3/4、Nanog) の発現量の変化。2 群間の比較は PS dish をコントロールとして Student's t-test を用いて行い、 $P < 0.05$ を*として示す。

c) 白血病細胞株 UCSD/AML1 の検討

PNaSS ゲル上で 3 日目に 1 度のみ培地を交換し 7 日間培養した白血病細胞株 UCSD/AML1 の幹細胞関連遺伝子の発現量を、real-time PCR 法により検討した。PNaSS ゲル上で培養した UCSD/AML1 において Oct3/4、Nanog の発現量が上昇した。一方、CD34 は有意な変化を認めなかった(図 10)。

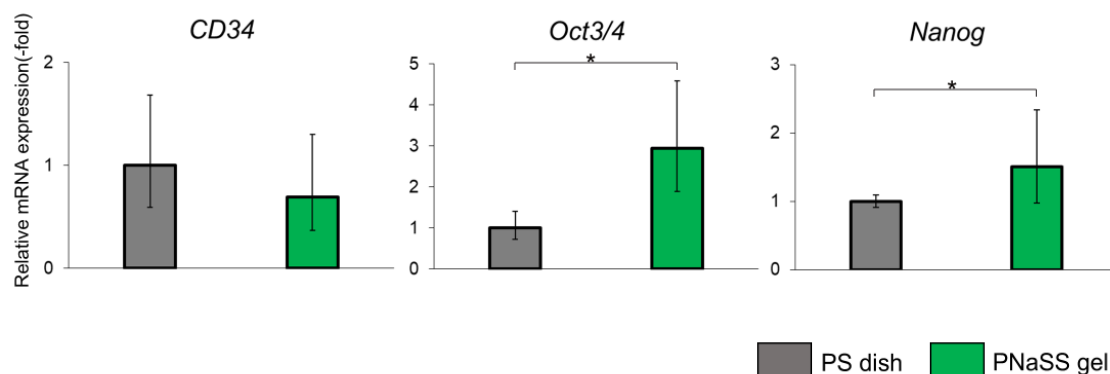


図 10 Real-time PCR 法を用いた白血病細胞株 UCSD/AML1 での幹細胞関連遺伝子の発現変動の評価。PS dish 上での通常培養、および PNaSS ゲル上で 3 日目に 1 度のみ培地を交換し 7 日間培養した白血病細胞株 UCSD/AML1 の幹細胞関連遺伝子 (*CD34*、*Oct3/4*、*Nanog*) の発現量の変化。2 群間の比較は PS dish をコントロールとして Student's t-test を用いて行い、 $P < 0.05$ を*として示す。

d) 白血病細胞株 MOLM13 の検討

PNaSS ゲル上で 3 日目に 1 度のみ培地を交換し 7 日間培養した白血病細胞株 MOLM13 の幹細胞関連遺伝子の発現量を、real-time PCR 法により検討した。PNaSS ゲル上で培養した MOLM13 の *Oct3/4*、*Nanog* の有意な発現量の上昇を認めた。*CD34* では、有意差はなかったものの発現量の上昇を認めた(図 11)。

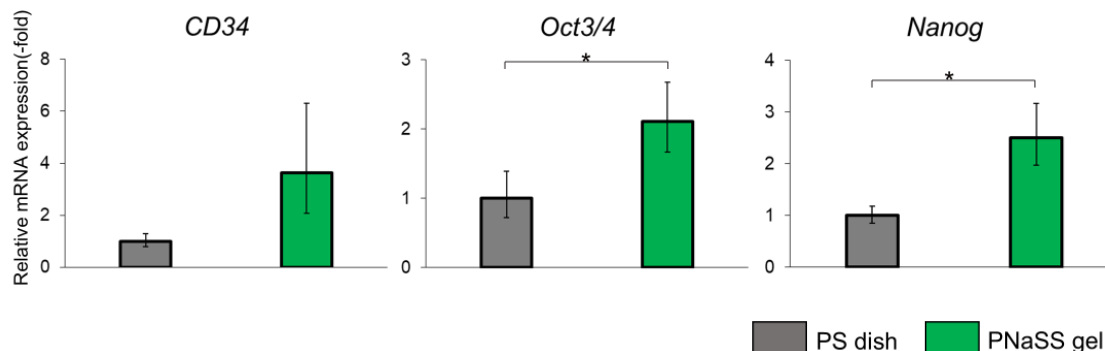


図 11 Real-time PCR 法を用いた白血病細胞株 MOLM13 での幹細胞関連遺伝子の発現変動の評価。PS dish 上での通常培養、および PNaSS ゲル上で 3 日目に 1 度のみ培地を交換し 7 日間培養した白血病細胞株 MOLM13 の幹細胞関連遺伝子 (*CD34*、*Oct3/4*、*Nanog*) の発現量の変化。2 群間の比較は PS dish をコントロールとして Student's t-test を用いて行い、 $P < 0.05$ を*として示す。

e) 患者検体での検討

AUL(CD34 陰性、CD38 陽性、CD13 陽性、CD33 陽性)と診断された生後 1 か月女児の末梢血の検体を PNaSS ゲル上で 7 日間培養し、幹細胞関連遺伝子の発現量を real-time PCR 法により検討した。*CD34*、*Oct3/4*、*Nanog* の発現量が有意に上昇した(図 12)。

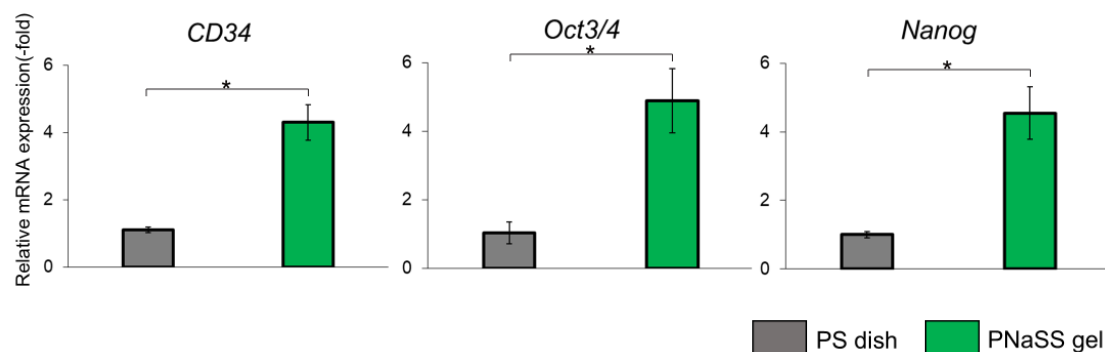


図 12 Real-time PCR 法を用いた患者検体での幹細胞関連遺伝子の発現変動の評価。PS dish 上での通常培養、および PNaSS ゲル上で 7 日間培養した AUL 患者の末梢血の検体の幹細胞関連遺伝子 (*CD34*、*Oct3/4*、*Nanog*) の発現量の変化。2 群間の比較は PS dish をコントロールとして Student's t-test を用いて行い、 $P < 0.05$ を*として示す。

2. 代謝解析(XF Cell Mito Stress Test)

ハイドロゲル上での培養により白血病細胞に代謝性の変化が生じる可能性を考え、PNaSS ゲル上で 3 日目に 1 度のみ培地を交換し 7 日間細胞を培養する条件で、XFp analyzer の XF Cell Mito Stress Test により細胞のエネルギー代謝解析を行った。

a) 白血病細胞株 K562 の検討

白血病細胞株 K562 を PNaSS ゲルで培養すると、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た。解糖系との比率を算出し、酸素消費速度 (oxygen consumption rate, OCR) へのシフトを認めた(図 13)。

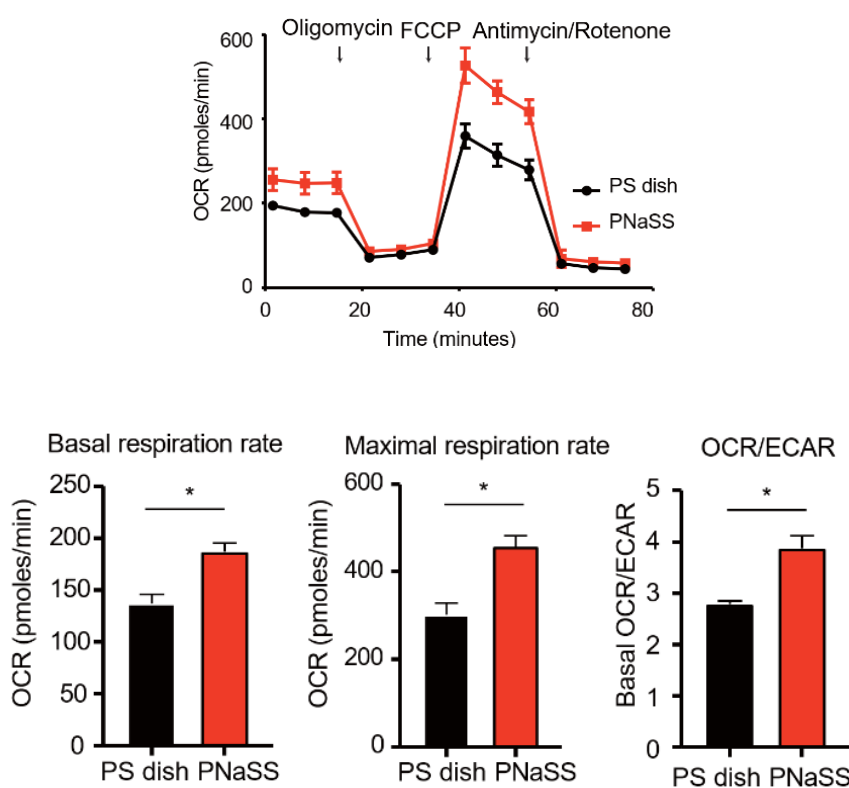


図 13 白血病細胞株 K562 の XF Cell Mito Stress Test によるエネルギー代謝解析。

PNaSS ゲルで 3 日目に培地交換し 7 日間培養した白血病細胞株 K562 の XF Cell Mito Stress Test。ミトコンドリアでの基礎呼吸能、最大呼吸活性の上昇を認めた。2 群間の比較は PS dish をコントロールとして Student's t-test を用いて行い、 $P < 0.05$ を*として示す。

b) 白血病細胞株 KG-1 の検討

白血病細胞株 KG-1 を PNaSS ゲルで培養したが、ミトコンドリアでの基礎呼吸能、最大呼吸活性の上昇を認めなかった(図 14)。

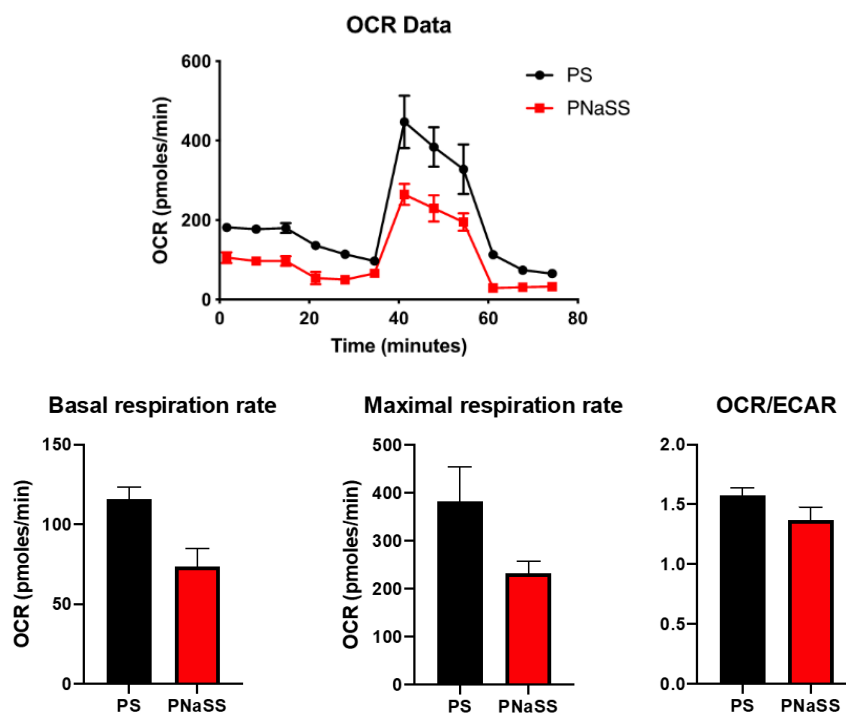


図 14 白血病細胞株 KG-1 の XF Cell Mito Stress Test によるエネルギー代謝解析。

PNaSS ゲルで 3 日目に培地交換し 7 日間培養した白血病細胞株 KG-1 の XF Cell Mito Stress Test。ミトコンドリアでの基礎呼吸能、最大呼吸活性の上昇を認めなかった。2 群間の比較は PS dish をコントロールとして Student's t-test を用いて行い、 $P < 0.05$ を*として示す。

c) 白血病細胞株 UCSD/AML1 の検討

白血病細胞株 UCSD/AML1 を PNaSS ゲルで培養したところ、ミトコンドリアでの基礎呼吸能の上昇を認めたが、最大呼吸活性の上昇を認めなかった。解糖系との比率を算出したところ OCR へのシフトを認めた(図 15)。

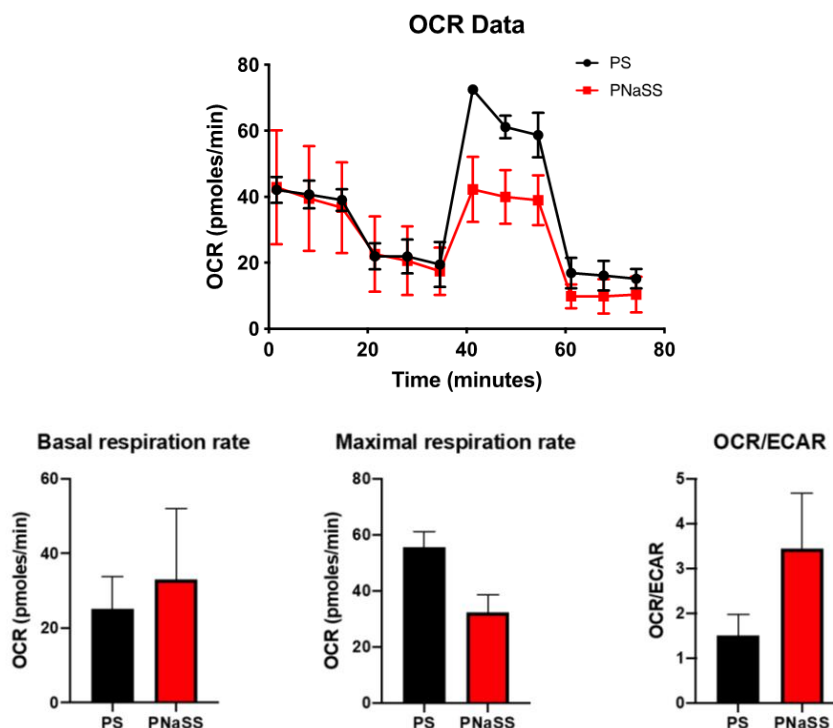


図 15 白血病細胞株 UCSD/AML1 の XF Cell Mito Stress Test によるエネルギー代謝解析。

PNaSS ゲルで 3 日目に培地交換し 7 日間培養した白血病細胞株 UCSD/AML1 の XF Cell Mito Stress Test。ミトコンドリアでの基礎呼吸能の上昇を認めたが、最大呼吸活性の上昇を認めなかった。2 群間の比較は PS dish をコントロールとして Student's t-test を用いて行い、 $P < 0.05$ を*として示す。

d) 白血病細胞株 MOLM13 の検討

白血病細胞株 MOLM13 を PNaSS ゲルで培養すると、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た。解糖系との比率を算出し、OCR へのシフトを認めたが、OCR/ECAR は有意差を認めなかった(図 16)。

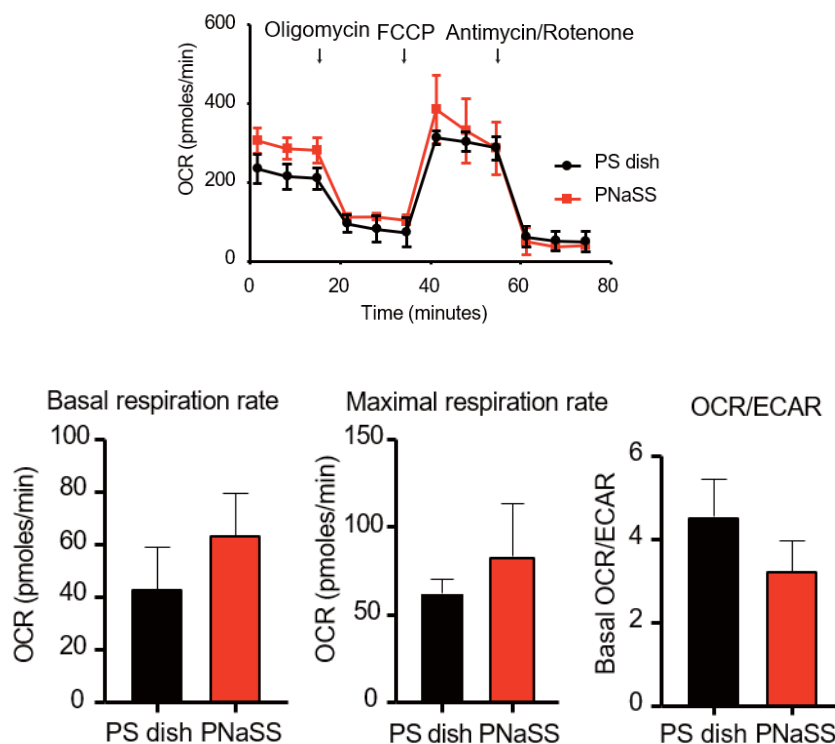


図 16 白血病細胞株 MOLM13 の XF Cell Mito Stress Test によるエネルギー代謝解析。

PNaSS ゲルで 3 日目に培地交換し 7 日間培養した白血病細胞株 MOLM13 の XF Cell Mito Stress Test。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た。2 群間の比較は PS dish をコントロールとして Student's t-test を用いて行い、 $P < 0.05$ を*として示す。

e) 患者検体の検討

AUL(CD34 陰性、CD38 陽性、CD13 陽性、CD33 陽性)と診断された生後 1 か月女児の末梢血を、PNaSS ゲルで 3 日目に培地交換し 7 日間培養する条件で、XF Cell Mito Stress Test を行った。PNaSS ゲルで培養すると、ミトコンドリアでの基礎呼吸能、最大呼吸活性の上昇を認めた。解糖系との比率を算出し、OCR へのシフトを認めた(図 17)。

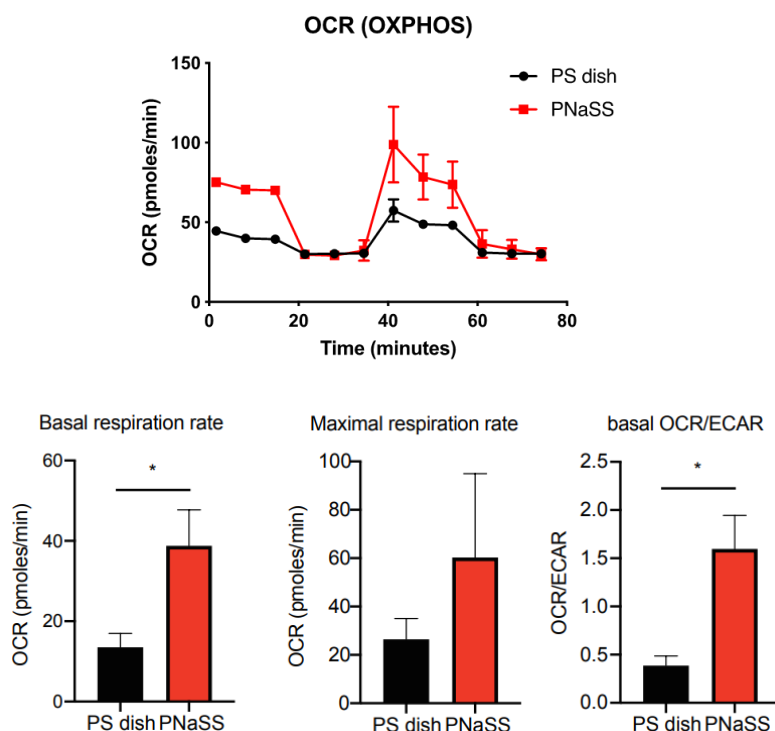


図 17 AUL 患者検体の XF Cell Mito Stress Test によるエネルギー代謝解析。
PNaSS ゲルで 3 日目に培地交換し 7 日間培養した AUL 患者検体の XF Cell Mito Stress Test。ミトコンドリアでの基礎呼吸能と最大呼吸活性の上昇を認めた。2 群間の比較は PS dish をコントロールとして Student's t-test を用いて行い、 $P < 0.05$ を*として示す。

3.マウスモデルを用いたハイドロゲルによる腫瘍形成能の検討

a) NOD-SCID マウスへの異所性移植実験

ハイドロゲル上で培養した白血病細胞の CSCs としての性質を評価するために、PS dish で培養した 1×10^5 個の白血病細胞株 K562 と、PNaSS ゲル上で 64 日間培養した 1×10^5 個の白血病細胞株 K562 を、それぞれ 4 匹の NOD-SCID マウスの脳に投与した。なお PNaSS ゲル上で 64 日間培養した白血病細胞株 K562 の幹細胞関連遺伝子及び分化マーカー遺伝子の発現量を real-time PCR によって評価したところ、幹細胞関連遺伝子である *CD34* と *Nanog* の発現量が上昇し、分化マーカー遺伝子である *CD71* の発現量が低下していた(図 18)。

PNaSS ゲル上で培養した細胞を投与したマウスの 4 匹中 3 匹に平衡障害が出現したため、全てのマウスを 15 日後に安楽死させた。

病理標本を作製して腫瘍細胞の広がりや性状を検討した。PS dish で培養した細胞を投与したマウスの 4 匹中 3 匹に腫瘍の形成を認め、PNaSS ゲル上で培養した細胞を投与したマウスでは全例に腫瘍の形成を認めた(表 4)。HE および Ki-67 の免疫染色では、PNaSS ゲル上で培養した細胞を投与したマウスにおいて脳室腔を埋め尽くすように腫瘍の増殖がみられた。強拡大における PS dish で培養した細胞と PNaSS ゲル上で培養した細胞の形態に大きな差は見いだせず、Ki-67 標識率に大きな差を認めなかった。いずれでも幹細胞マーカーである *CD34* の陽性像は得られなかったが、PNaSS ゲル上で培養した細胞では分化マーカーである glycophorin A の陽性像が得られなかったのに対し、PS dish で培養した細胞では陽性像が得られた(図 19)。

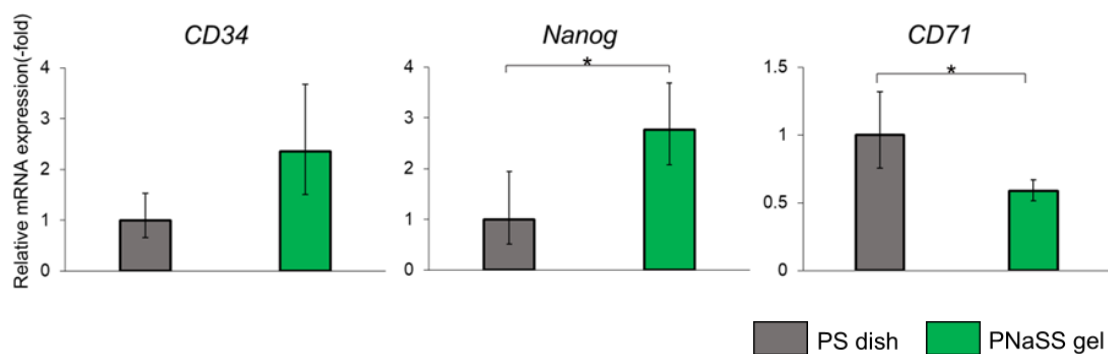


図 18 NOD-SCID マウスへ投与時の細胞における real-time PCR による幹細胞関連遺伝子の発現変動の評価。PS dish 上での通常培養、および PNaSS ゲル上で 64 日間培養した白血病細胞株 K562 の幹細胞関連遺伝子 (*CD34*、*Nanog*) および分化マーカー遺伝子(*CD71*)の発現量の変化。それぞれの比較はPS dish をコントロールとして Student's t-test を用いて行い、 $P < 0.05$ を*として示す。

表 4 NOD-SCID マウスの脳への腫瘍細胞投与モデルにおける、PNaSS ゲル上で培養した細胞の腫瘍形成能の評価。PNaSS ゲル上で培養した細胞を投与したマウスの 4 匹中 3 匹に平衡障害が出現した。

Cultivation conditions	Cell number	Disorder of balance	Tumorigenicity
PS dish	1.0×10^5	0/4	3/4
PNaSS gel	1.0×10^5	3/4	4/4

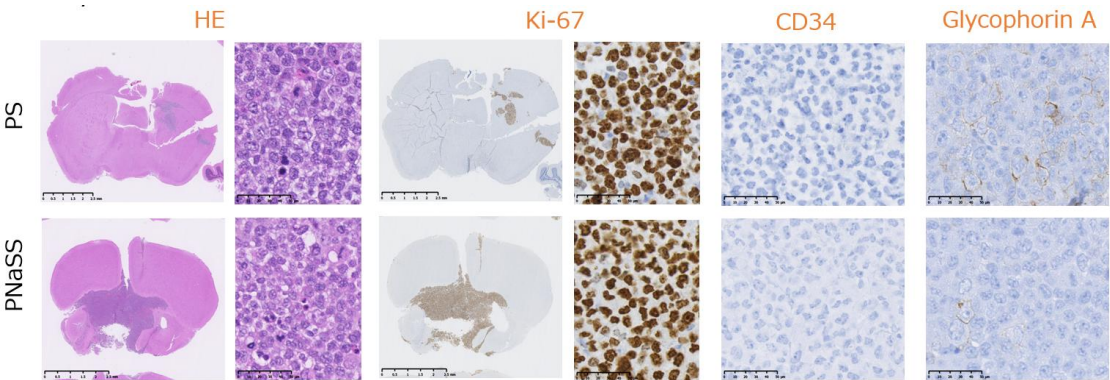


図 19 NOD-SCID マウスの脳への腫瘍細胞投与モデルにおける、PNaSS ゲル上で培養した細胞の腫瘍形成能の検討。上段：PS dish。下段：PNaSS ゲル。HE 染色、Ki-67 標識率、CD34、Glycophorin A について評価した。

b) NOD-SCID マウスへの同所性移植実験

ハイドロゲル上で培養した白血病細胞の CSCs としての性質を評価するために、PS dish で培養した白血病細胞株 K562 と、PNaSS ゲル上で 35 日間培養した白血病細胞株 K562 を、それぞれ 8 匹の NOD-SCID マウスの尾静脈より投与した。なお、PNaSS ゲル上で 25 日間培養した時点での白血病細胞株 K562 の幹細胞関連遺伝子及び分化マーカー遺伝子の発現量を real-time PCR によって評価したところ、幹細胞関連遺伝子である *CD34*、*Oct3/4*、*Nanog* の発現量が上昇し、分化マーカー遺伝子である *CD71* の発現量が低下していた (図 20)。投与した細胞数は、それぞれ 4 匹に 5.0×10^4 cells、4 匹に 5.0×10^5 cells とした (表 5)。しかし、PNaSS ゲル上で 35 日間培養した時点での K562 細胞の幹細胞関連遺伝子及び分化マーカー遺伝子の発現を real-time PCR によって評価したところ、*CD34*、*Oct3/4*、*Nanog* の発現量は低下し、分化マーカーである *CD71* の発現量は上昇していた (図 21)。

細胞投与後 28 日、49 日、90 日に採血し、塗抹標本とフローサイトメトリーにより異型細胞の有無を評価したが、全てのマウスで異型細胞を認めなかった (図 22)。

細胞投与から 74 日の時点で、PNaSS ゲル上で培養した細胞を 5.0×10^4 cells 投与した群のうち 1 匹が死亡した。細胞播種から 91 日の時点で全てのマウスを安楽死させた。肺、腎臓、脾臓、心臓を摘出し、4%緩衝ホルマリンを用いて固定した。組織切片は HE 染色により評価した。いずれのマウスにも、白血病細胞の臓器浸潤を認めなかった (図 23)。

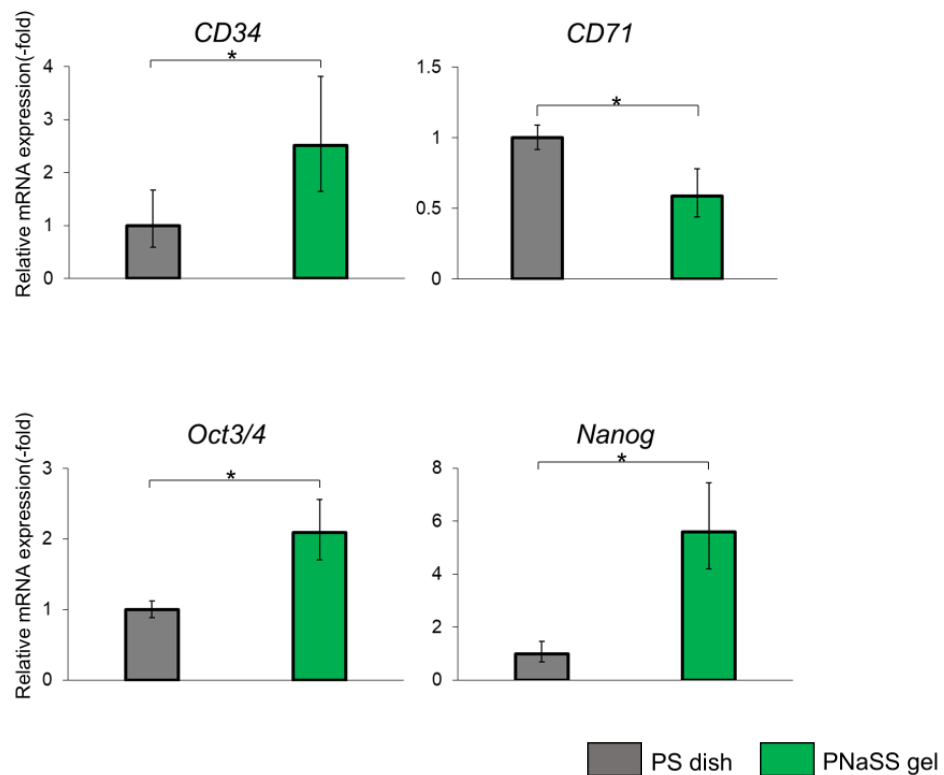


図 20 NOD-SCID マウスへ投与細胞における、投与予定段階での real-time PCR による幹細胞関連遺伝子の発現変動の評価。

PS dish 上での通常培養、および PNaSS ゲル上で 25 日間培養した時点での白血病細胞株 K562 の幹細胞マーカー遺伝子 (CD34、Oct3/4、Nanog) および分化マーカー (CD71) の発現量の変化。それぞれの比較は PS dish をコントロールとして Student's t-test を用いて行い、P < 0.05 を*として示す。

表 5 : NOD-SCID マウスへの腫瘍細胞の尾静脈注射モデルにおける白血病発症の評価

Cultivation conditions	Cell number	death	Tumorigenicity
PS dish	5.0×10^4	0/4	0/4
	5.0×10^5	0/4	0/4
PNaSS gel	5.0×10^4	1/4	0/4
	5.0×10^5	0/4	0/4

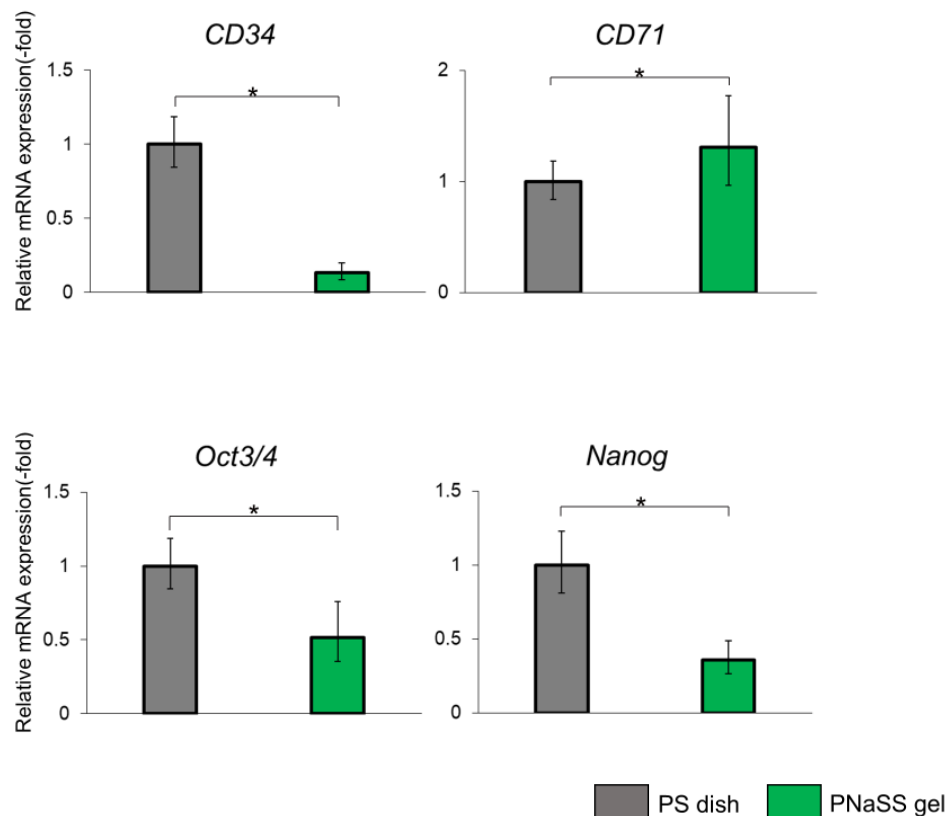
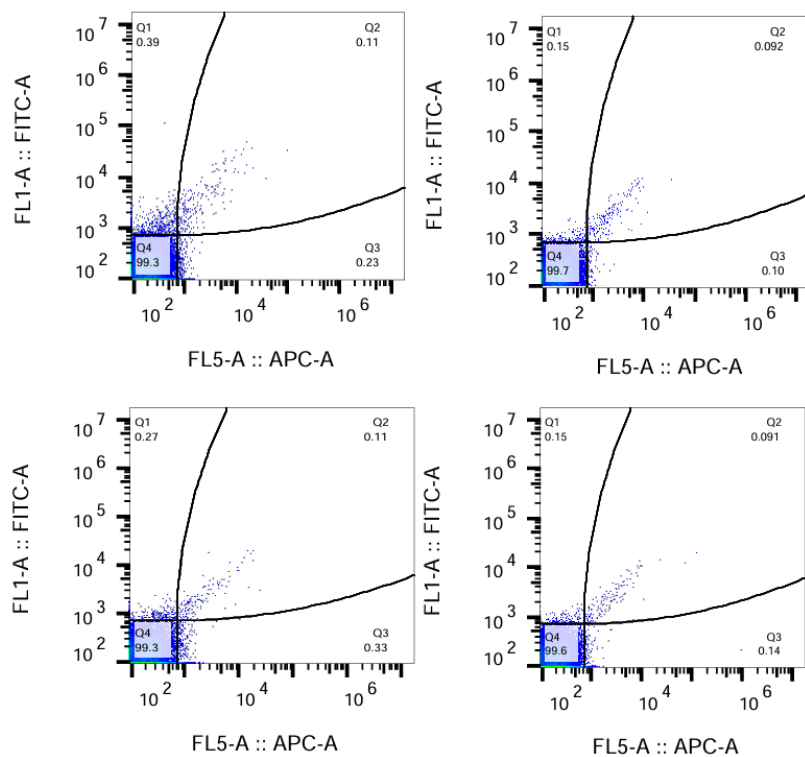
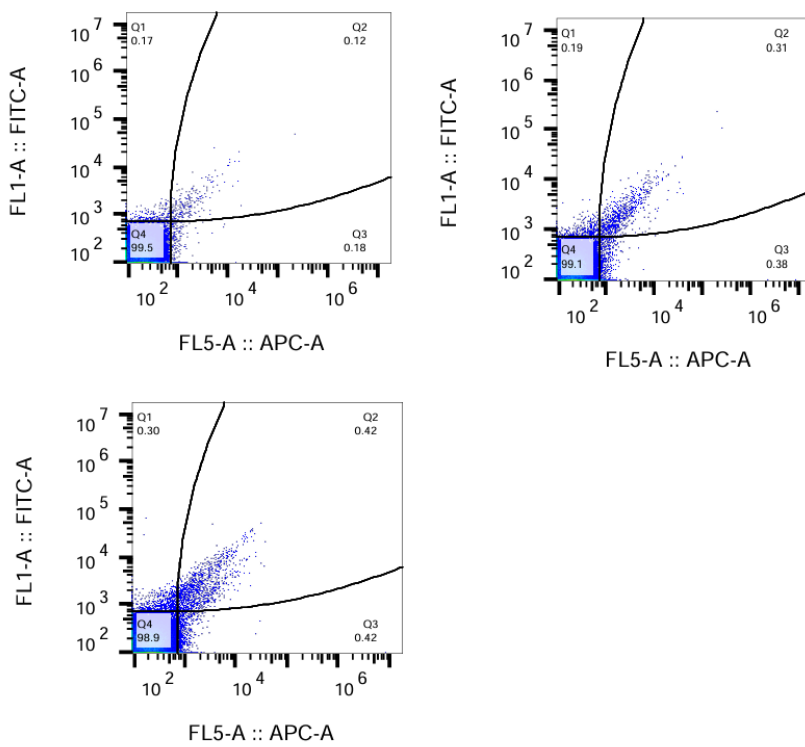


図 21 NOD-SCID マウスへ投与細胞における、投与時の real-time PCR による幹細胞関連遺伝子の発現変動の評価。PS dish 上での通常培養、および PNaSS ゲル上で 35 日間培養した時点での白血病細胞株 K562 の幹細胞関連遺伝子 (CD34、Oct3/4、Nanog) および分化マーカー遺伝子 (CD71) の発現量の変化。それぞれの比較は PS dish をコントロールとして Student's t-test を用いて行い、P < 0.05 を*として示す。

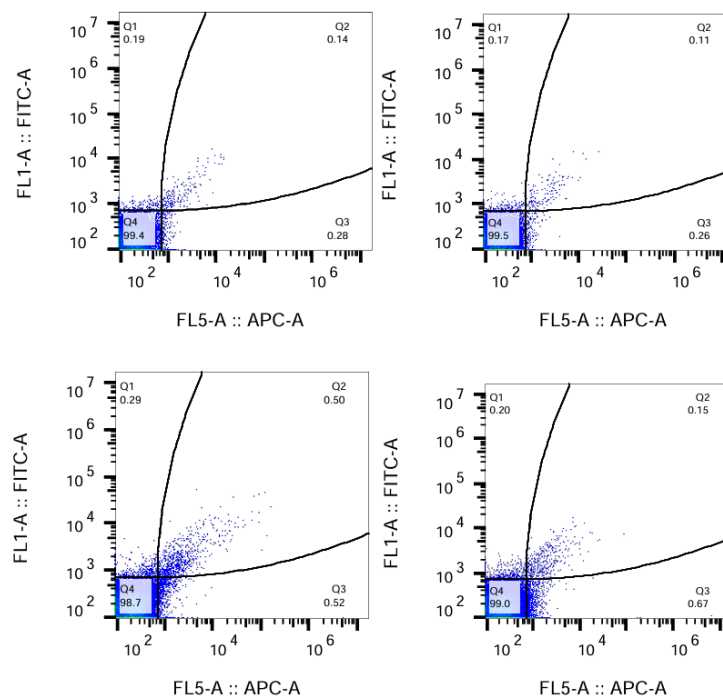
投与細胞 : PS dish / 5.0×10^4 cells



投与細胞 : PNaSS ゲル / 5.0×10^4 cells



投与細胞 : PS dish / 5.0×10^5 cells



投与細胞 : PNaSS ゲル / 5.0×10^5 cells

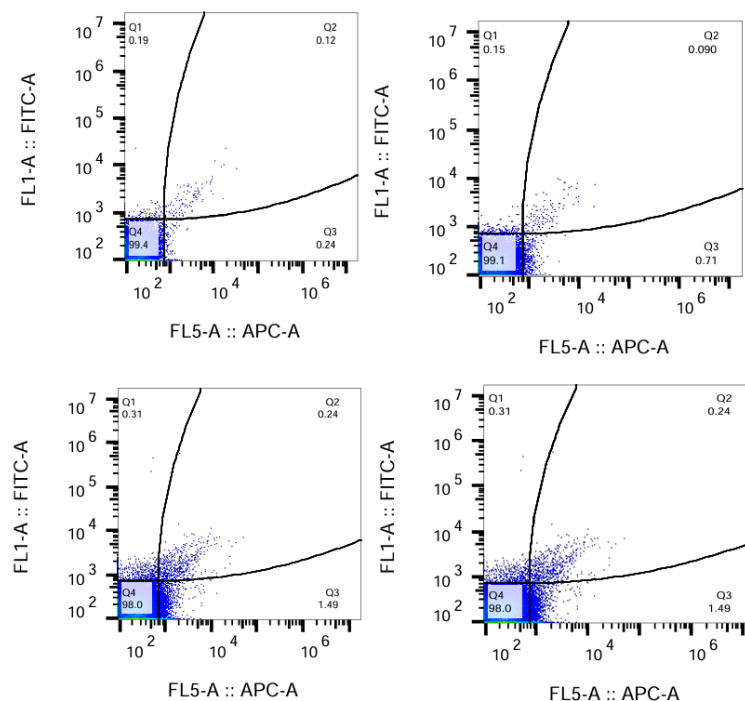
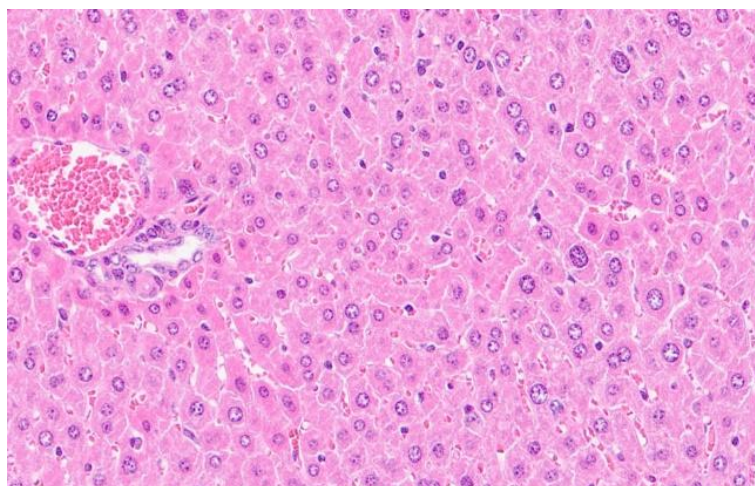


図 22 細胞投与から 90 日の時点での、尾静脈からの採血により得た血液のフローサイトメトリーによる異型細胞の有無の評価。FITC : CD71、APC : CD45。明らかな異型細胞の分画を認めなかった。

PS dish で培養した細胞を投与したマウスの肝臓



PS dish で培養した細胞を投与したマウスの脾臓

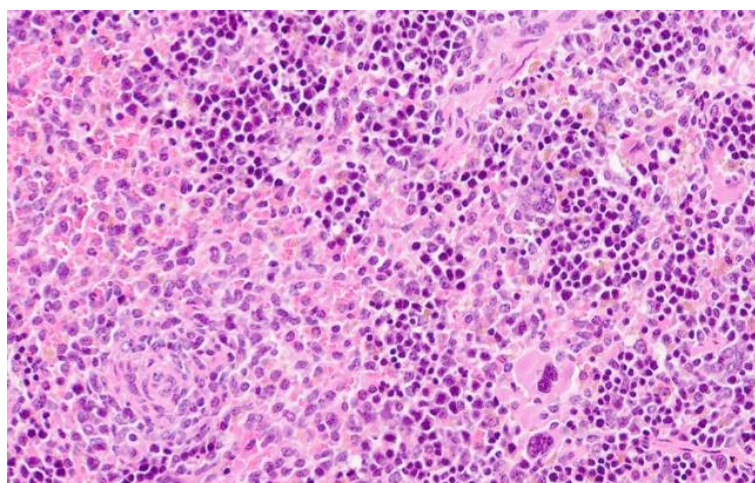


図 23 細胞投与から 91 日の時点での病理学的評価。PS dish で培養した細胞を投与したマウスの肝臓、脾臓の組織切片。いずれのマウスにも、白血病細胞の臓器浸潤を認めなかった。

4. シングルセル法による遺伝子解析

マイクロゲル上での培養で遺伝子発現量の変化を生じた細胞が **heterogeneity** に存在する可能性を考え、シングルセル RNA シーケンシングによる解析を行った。シングルセル RNA シーケンシングにより、PNaSS ゲル上で培養した細胞は **cluster 10** に多く分類された。一方、PS dish で培養した細胞は **cluster 10** に分類される細胞は極少数であった (図 24)。

cluster 10 に分類された細胞とそれ以外の細胞で遺伝子発現量に関して統計学的解析を行い、**cluster 10** に分類された白血病細胞に特異的な遺伝子を抽出した。抽出した遺伝子の **violin plots** を図 25 に示す(図 25)。

抽出した候補遺伝子について、PNaSS ゲル上で 7 日間培養した白血病細胞株 K562 と、コントロールとして通常培養条件である PS dish で培養した白血病細胞株 K562 の遺伝子発現量を **real time-PCR** 法で評価したところ、*aldo-keto reductase family 1 member B (AKR1B1)*、*CECR2*、*TSPY like 5 (TSPYL5)*、*HOX antisense intergenic RNA myeloid 1 (HOTAIRM1)*、*MIR924 host gene (MIR924HG)*、*ZNF433 and ZNF878 antisense RNA 1 (ZNF433-AS1)*、*ZNF718*、*hemoglobin A 1 (HBA1)*、*HBA2* において、PNaSS ゲル上で培養した白血病細胞で遺伝子発現量の有意な上昇を認めた(図 26)。なお *TPTE*、*AF279873.3*、*Linc01524* については、検索上 **real-time PCR primer** を認めなかったため、**real-time PCR** による評価ができなかった。

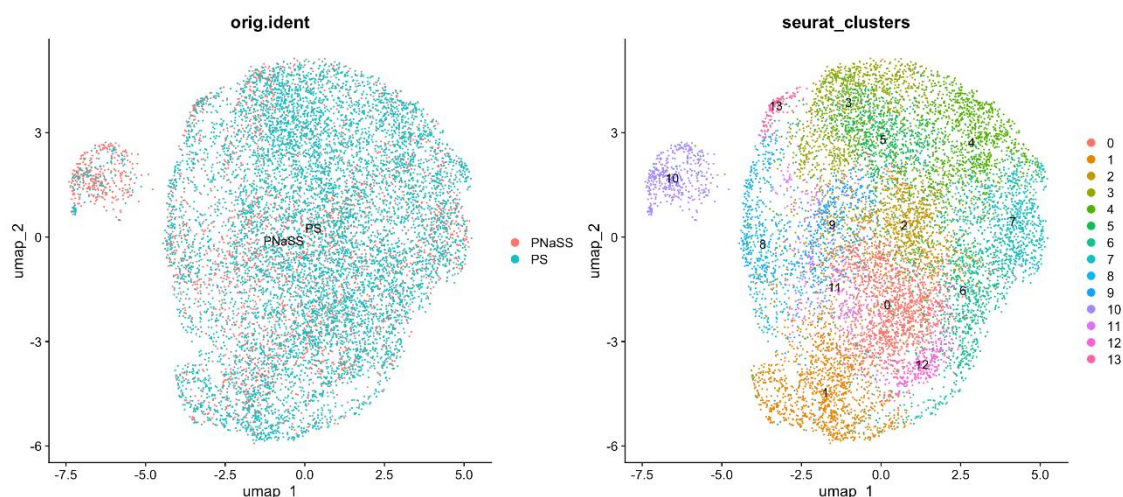
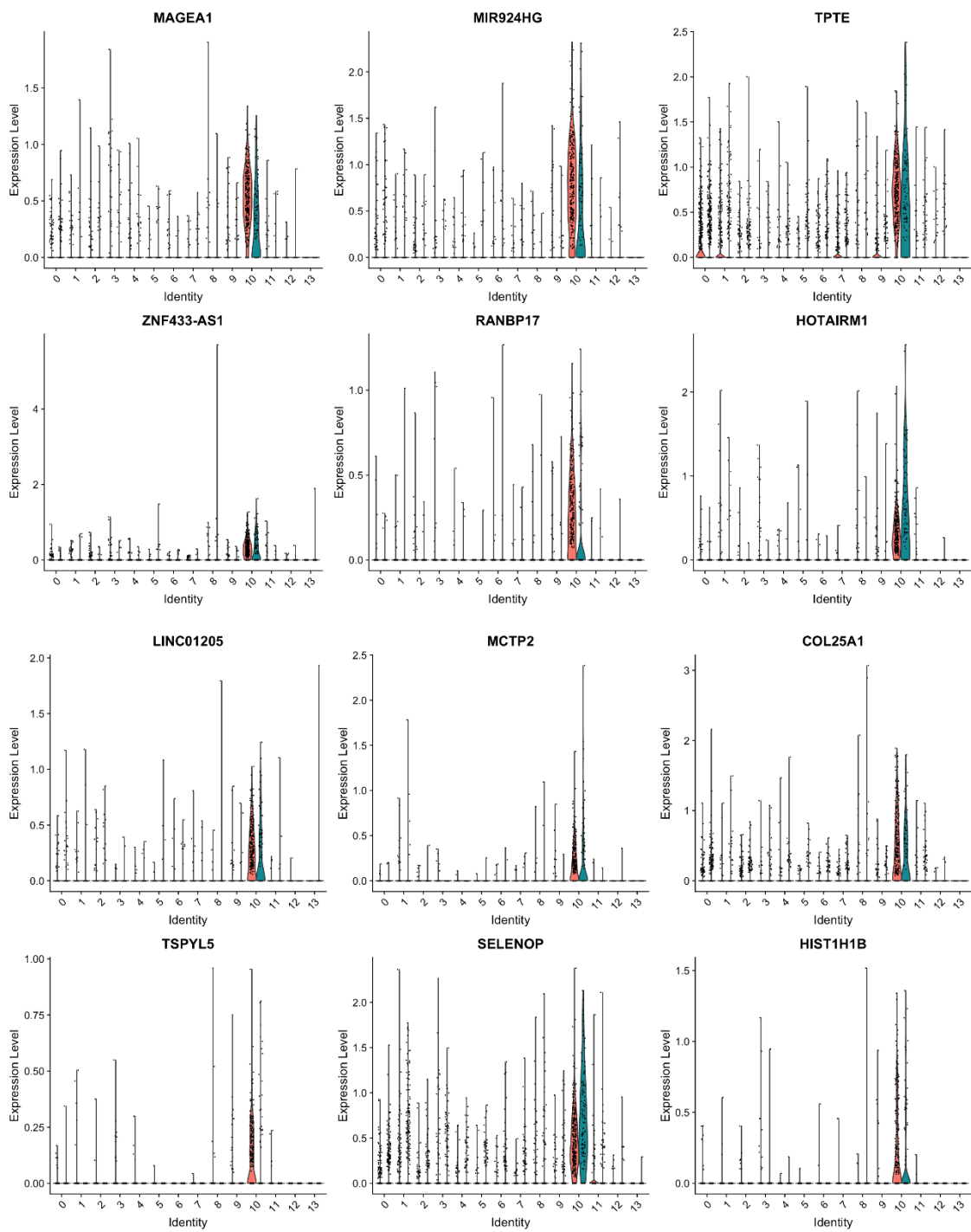
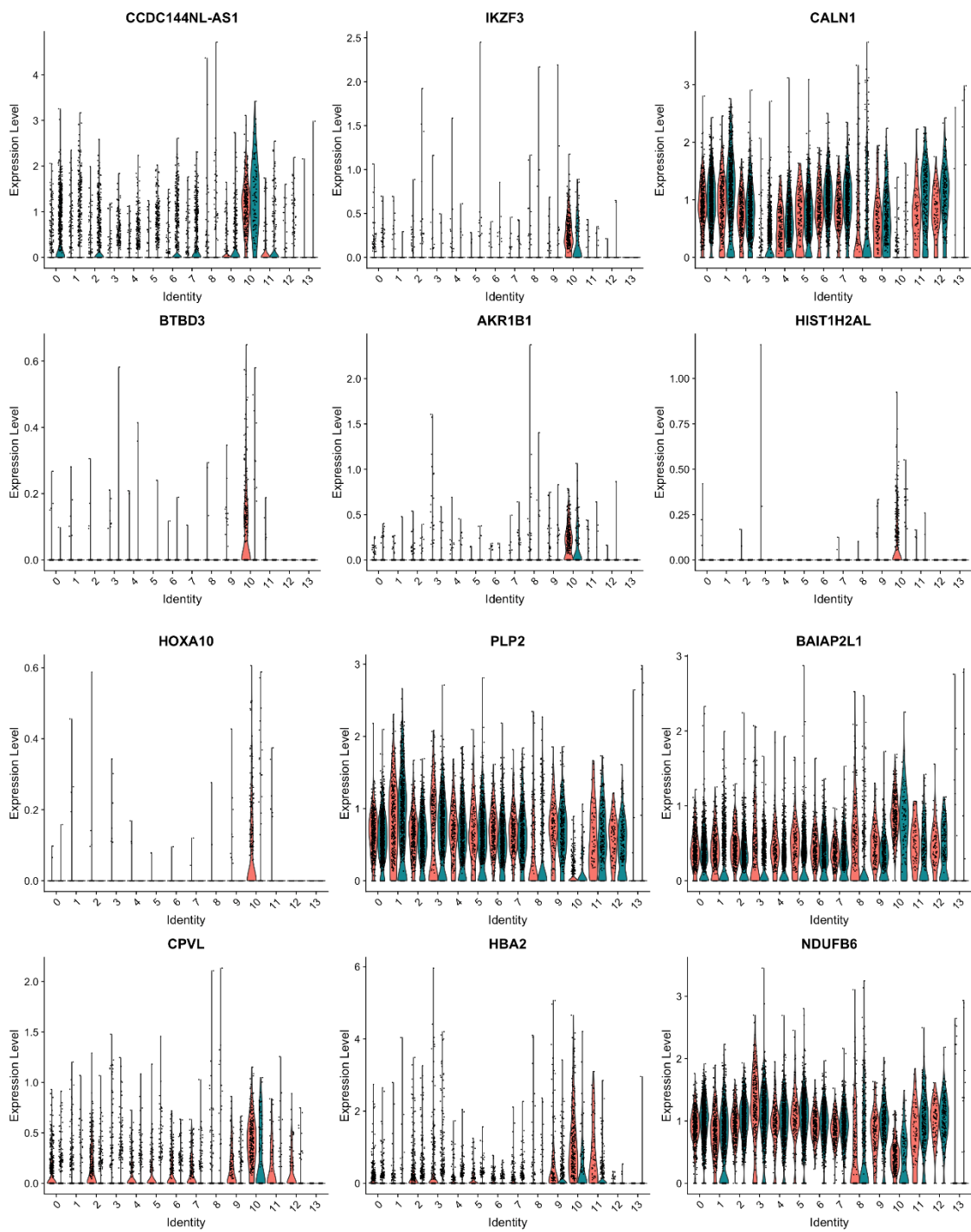
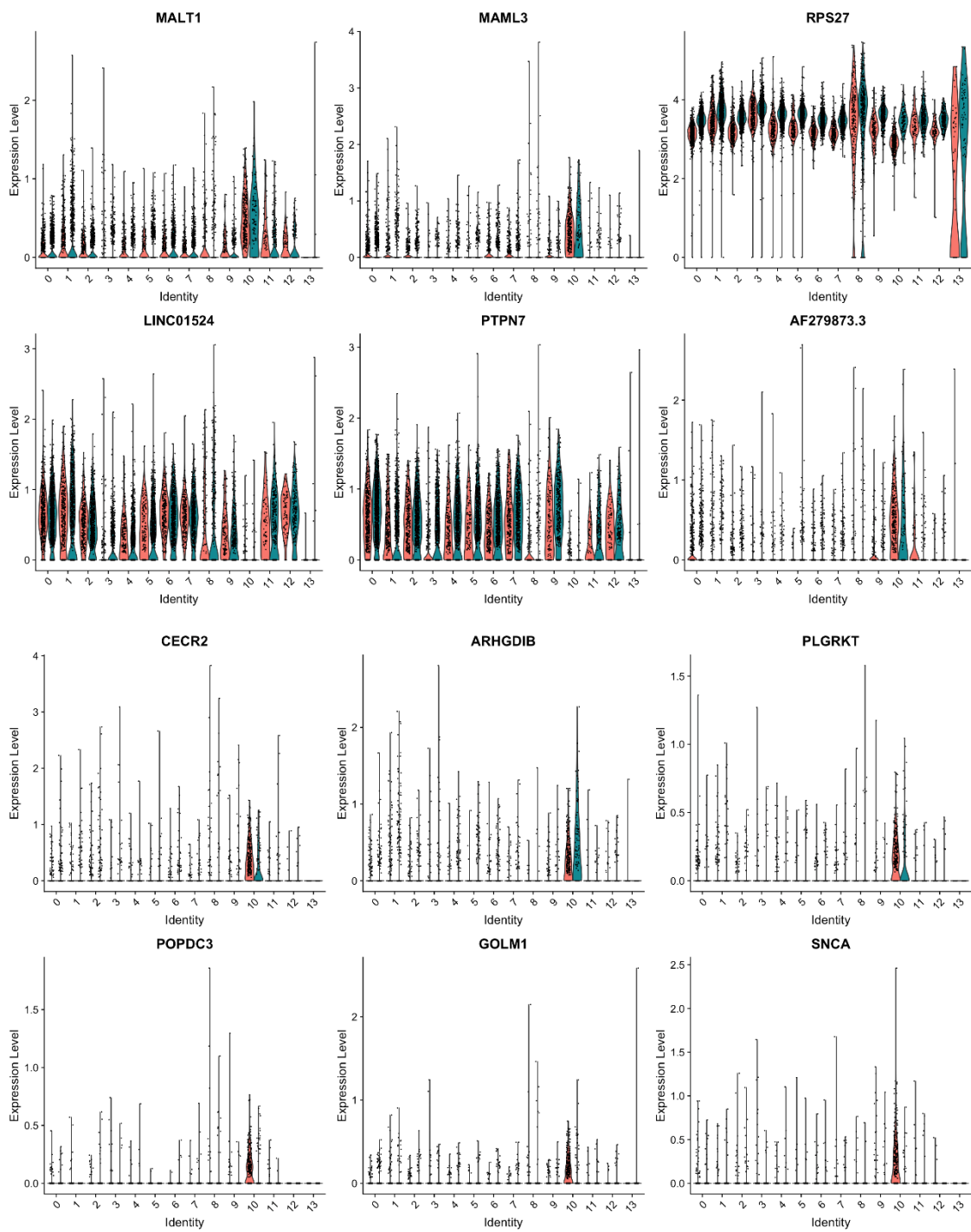


図 24 PNaSS ゲル上で培養した白血病細胞株 K562 と、コントロールとして通常培養条件である PS dish で培養した白血病細胞株 K562 のシングルセル RNA シーケンシング。UMAP で PNaSS ゲル上で培養した細胞は、**cluster 10** に多く分類された。







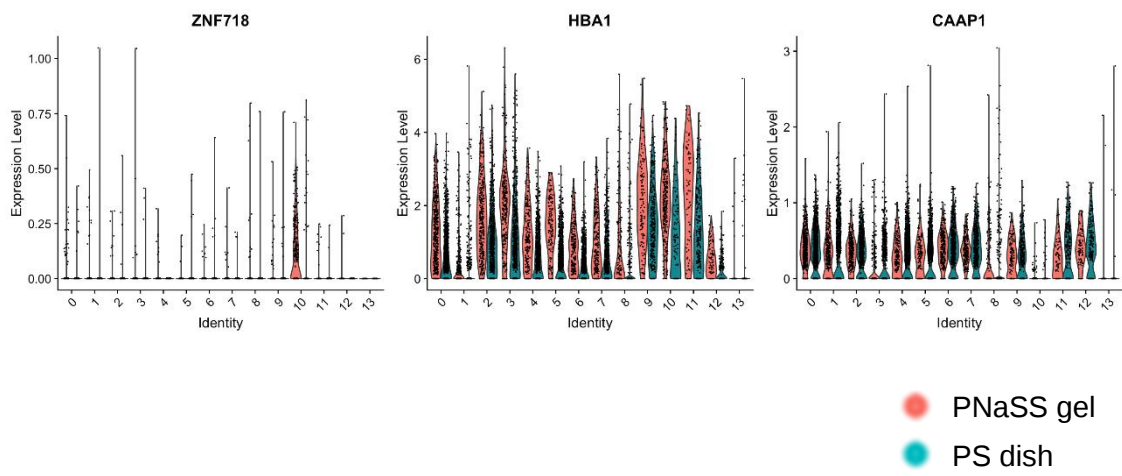
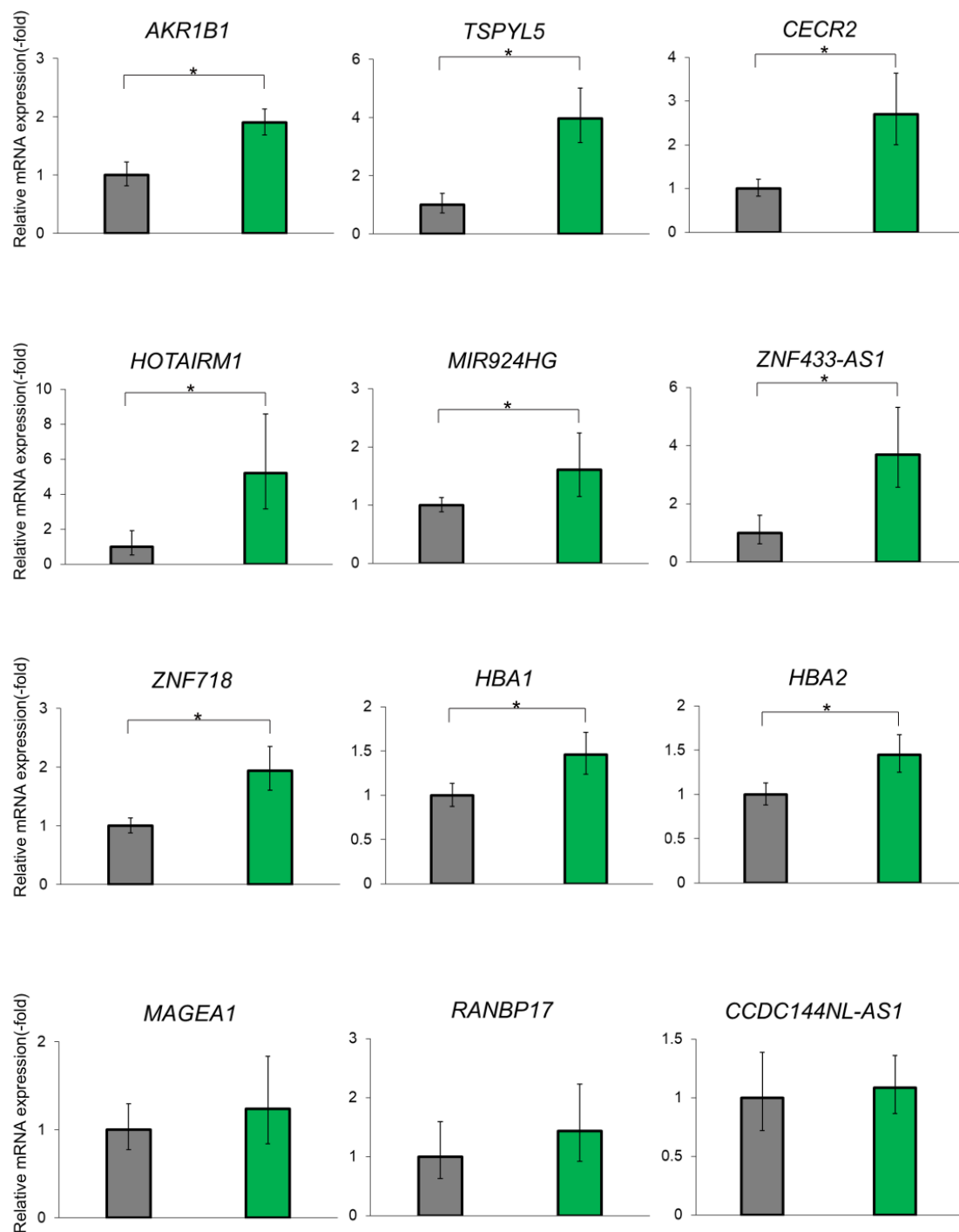
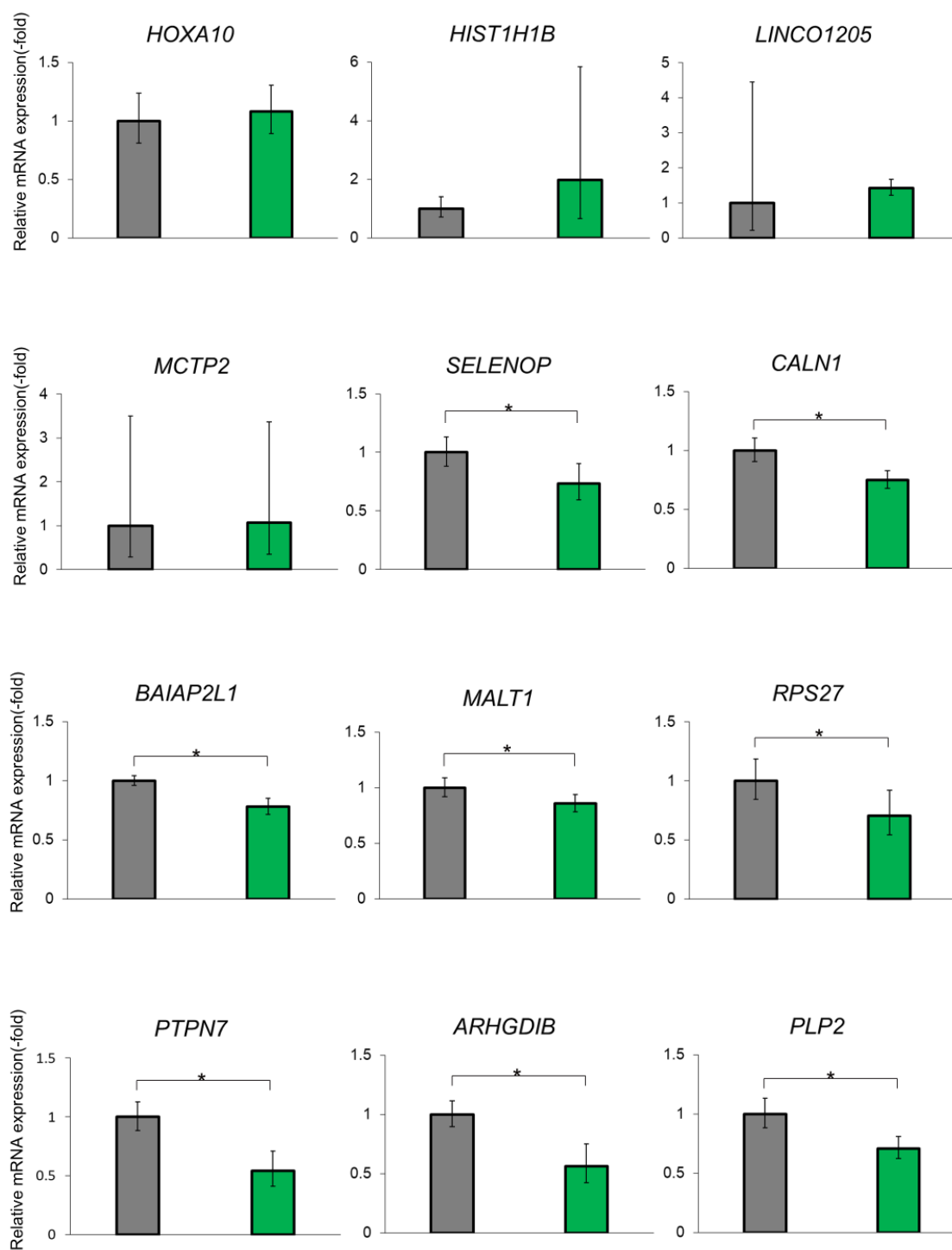


図 25 PNaSS ゲル上で培養した白血病細胞株 K562 に特異的な遺伝子の violin plots。





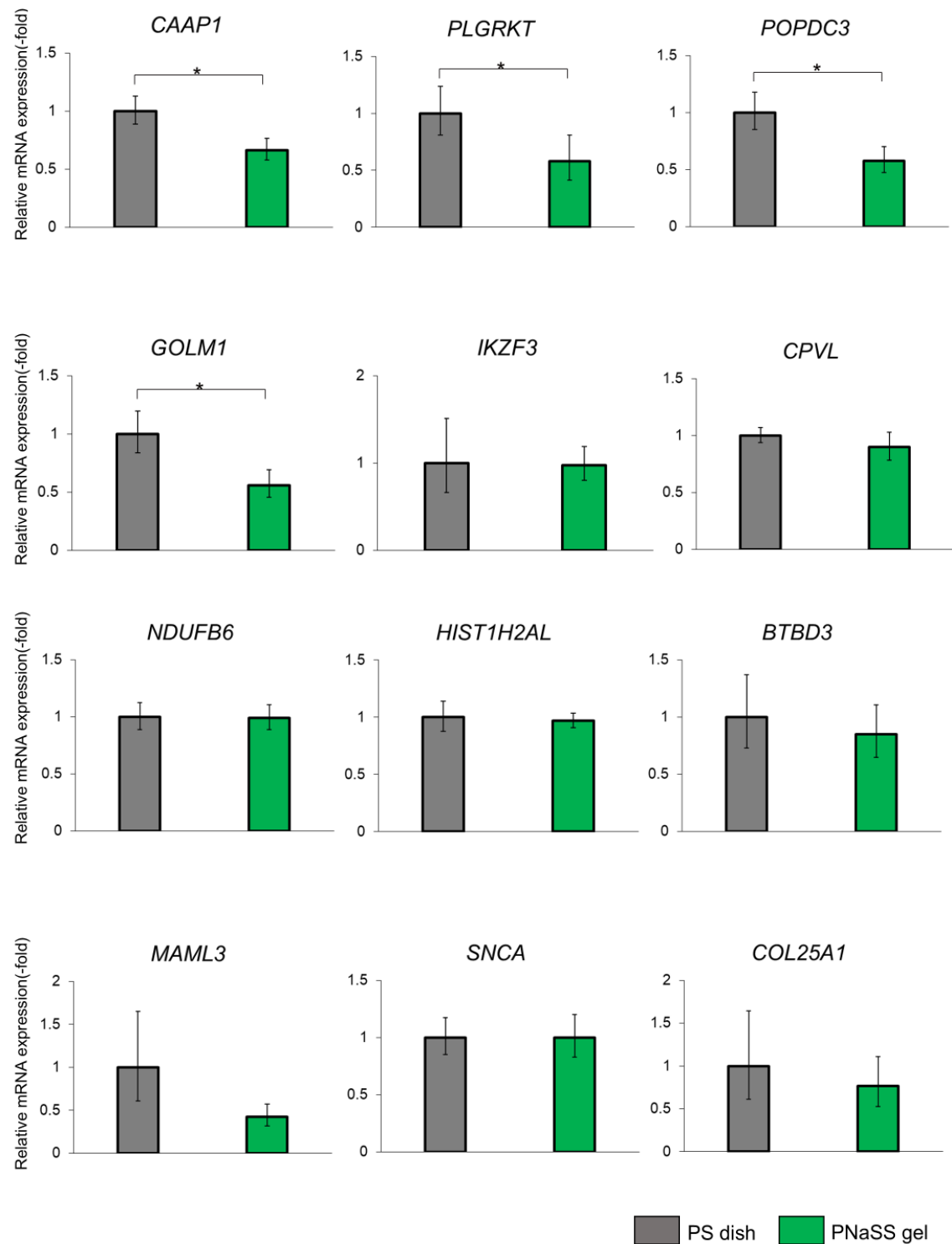


図 26 PNaSS ゲル上で培養した白血病細胞株 K562 に高発現している遺伝子の real-time PCR による幹細胞関連遺伝子の発現変動の評価。それぞれの比較は PS dish をコントロールとして Student's t-test を用いて行い、 $P < 0.05$ を*として示す。

5.shRNA による遺伝子ノックダウン実験

シングルセル RNA シーケンシングによる遺伝子解析によって抽出した遺伝子のノックダウンによる幹細胞性の変化を確認するために、まず *AKR1B1* と *TSPYL5* を選択し、各遺伝子の shRNA を白血病細胞株 K562 に導入し、real-time PCR 法で解析を行った。コントロールとして scramble shRNA を導入した白血病細胞株 K562 を用いた。*AKR1B1*、*TSPYL5* ともに 2 つの shRNA を使用したところ、全ての shRNA において遺伝子発現量の有意な低下を認めた(図 27)。

また shRNA 導入細胞における幹細胞関連遺伝子について real-time PCR 法で解析を行ったところ、*CD34*、*Oct3/4*、*Nanog* の遺伝子発現量の有意な低下を認めた (図 28)。

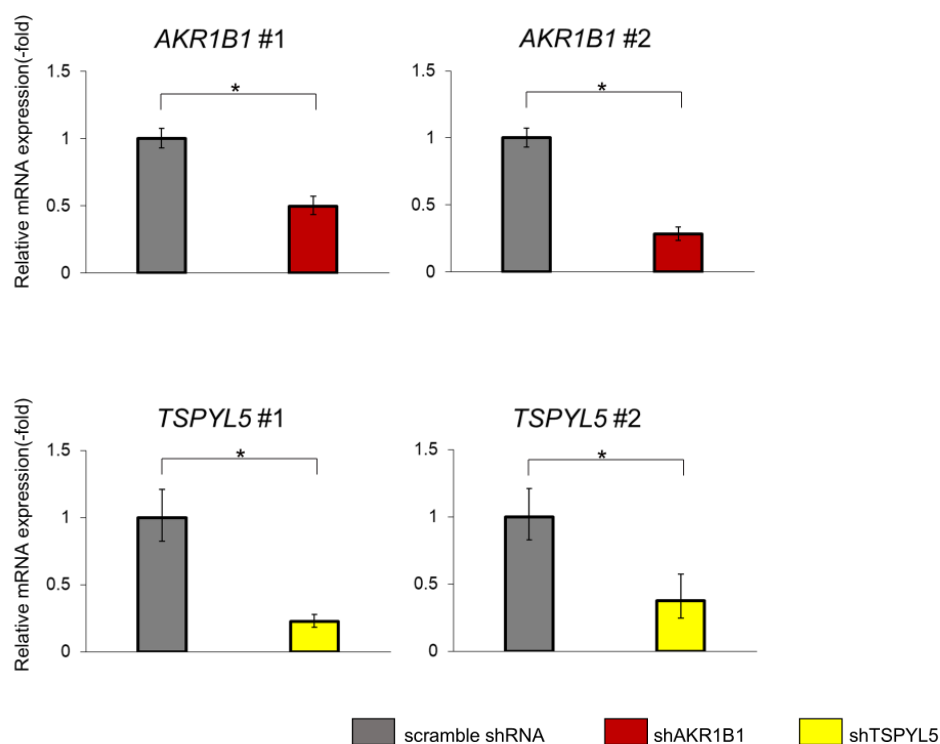
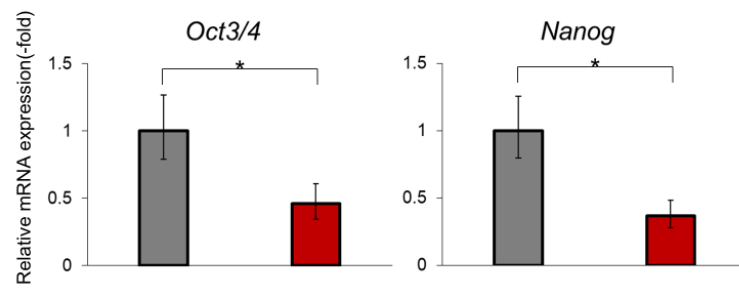
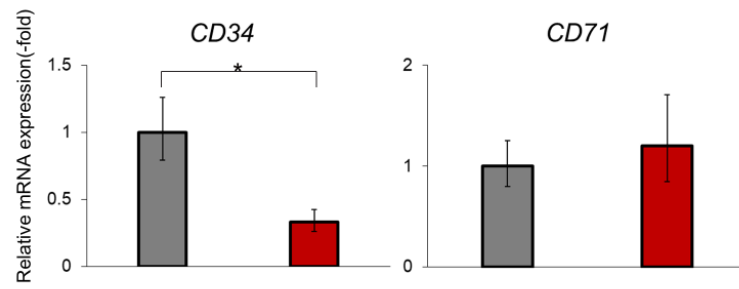
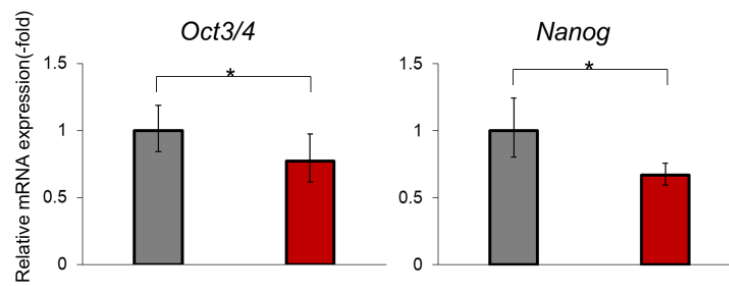
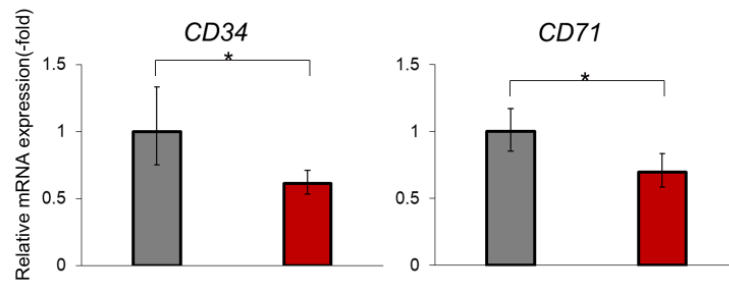


図 27 *AKR1B1* および *TSPYL5* の shRNA を導入した白血病細胞株 K562 の real-time PCR によるノックダウンの評価。それぞれの比較は scramble shRNA を導入した白血病細胞株 K562 をコントロールとして Student's t-test を用いて行い、 $P < 0.05$ を *として示す。

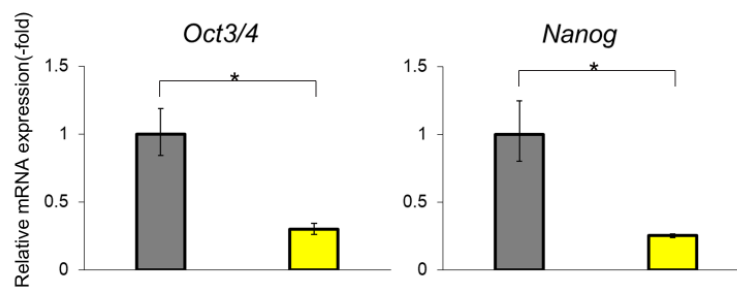
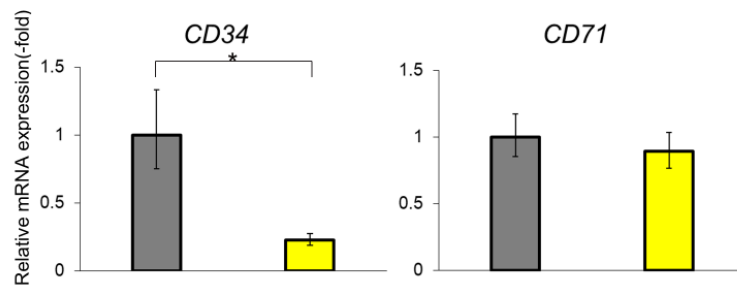
shAKR1B1 #1



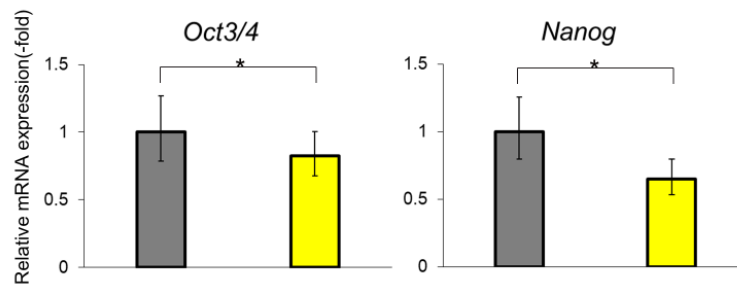
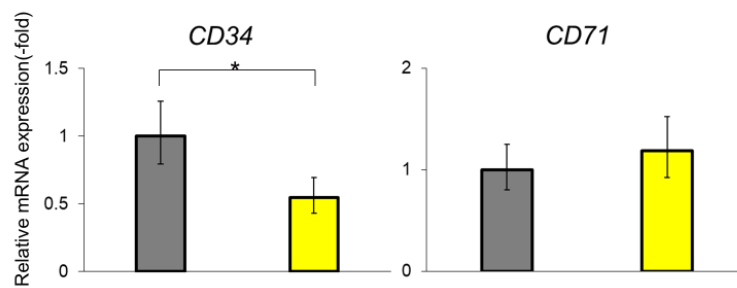
shAKR1B1 #2



shTSPYL5 #1



shTSPYL5 #2



scramble shRNA shAKR1B1 shTSPYL5

図 28 shRNA を導入した白血病細胞株 K562 の real-time PCR による幹細胞関連遺伝子の発現変動の評価。shAKR1B1 および shTSPYL5 を導入した白血病細胞株 K562 の幹細胞関連遺伝子 (CD34、Oct3/4、Nanog) および分化マーカー遺伝子 (CD71) の発現量の変化。2 群間の比較は scramble shRNA を導入した白血病細胞株 K562 をコントロールとして Student's t-test を用いて行い、 $P < 0.05$ を*として示す。

考察

本研究の目的は、ハイドロゲル上で白血病細胞を培養することで効率的に LSCs を誘導し、LSCs の誘導の鍵となる治療標的分子を同定することである。そのために、近年報告された HARP 現象によりハイドロゲルを使用して迅速に CSCs を誘導する方法(Suzuka et al., 2021)を用いた。北海道大学大学院医学研究院腫瘍病理学教室にて、現在までにハイドロゲルを用いた CSCs の誘導に関する検討は、主に接着細胞である固形腫瘍で行われてきたが、本研究では浮遊細胞である白血病細胞においても LSCs を誘導できる可能性を示した。本研究により、ハイドロゲル上で HARP 現象を誘導するために、細胞とハイドロゲルとの強固な接着は必ずしも必要でないことが示された。細胞由来のタンパク質やサイトカインがハイドロゲルの表面に吸着することにより、細胞がハイドロゲルに接着していなくても、持続的に細胞に刺激を与えることができる可能性がある(Semba et al., 2021)。

本研究により、白血病細胞株 K562、UCSD/AML1、MOLM13 および白血病患者の末梢血の検体から、PNaSS ゲルを用いて遺伝子レベルで幹細胞性を誘導できることを証明した。代謝解析については、XFp analyzer による代謝解析を行った。XFp analyzer は、細胞の酸素消費を OCR、細胞外に排出される水素イオン濃度の変化を細胞外酸性化速度(extracellular acidification rate, ECAR)として、細胞レベルのエネルギー代謝状態を評価する機器であり、幹細胞性の上昇がみられると OCR にシフトする。Oligomycin、FCCP、Rotenone と Antimycin A を順次投与することで、基礎呼吸能、ATP 産生、最大呼吸活性を測定する。PNaSS ゲル上で培養した白血病細胞株 K562、UCSD/AML1 および白血病患者の末梢血の検体において有意差をもって OCR へのシフトを確認し、幹細胞性を獲得したことを示した。なお細胞株 MOLM13 において OCR へのシフトがみられたものの OCR/ECAR が PS dish での培養と PNaSS ゲルで培養した細胞で有意差がなかった理由として、ECAR も全体的に上昇したことが考えられる。

一方で PAMPS ゲル、DN ゲル、PCDME ゲル上で培養した白血病細胞株 K562 では遺伝子レベルでの RNA 発現量の亢進に乏しかったことから、幹細胞性の誘導のされ方にはハイドロゲルによって差異があると推定される。加えて、白血病細胞株 KG-1 は遺伝子レベルおよびエネルギー代謝レベルにおいて、UCSD/AML1 ではエネルギー代謝レベルにおいて幹細胞性の誘導に乏しく、細胞株によっても幹細胞性の誘導のされ方には差異があった。ハイドロゲルや細胞株によって幹細胞性の誘導のされ方に差異が生じる理由については、今後の検討課題である。

動物実験では、異所性移植実験で PNaSS ゲル上で培養した白血病細胞株

K562 は、がん幹細胞性を獲得した可能性が示唆された。一方、同所性移植実験では PNaSS ゲル上で培養した白血病細胞株 K562 およびコントロールである PS dish で培養した白血病細胞株 K562 の両者ともに、白血病の発症を認めなかった。その理由として、PNaSS ゲル上で培養した白血病細胞株 K562 が、培養開始から 25 日の時点ではがん幹細胞性を獲得していたが、投与時である培養開始から 35 日の時点では、がん幹細胞性が低下してしまったことが考えられた。結果 1 の a) に示したように、ハイドロゲル上で長期培養すると、次第に幹細胞性が低下することがわかっている。がん幹細胞性を保ったまま長期培養する方法については、今後の検討課題である。加えて、PS dish で培養した白血病細胞株 K562 を投与したマウスでも白血病を発症しなかったため、投与した細胞数が少ない可能性がある。既報では、白血病細胞株 K562 1.0×10^6 個をマウスの尾静脈から投与することで白血病を発症すると報告されているが (Guimarães et al., 2006)、ハイドロゲル上で長期間かつ多数の細胞を培養するのは難しいため、本検討では 5.0×10^4 個、 5.0×10^5 個の投与とした。ハイドロゲル上で長期間、多数の細胞を効率よく培養できる方法についても、今後の検討課題である。なお、細胞の投与から 74 日の時点で 1 匹死亡したが、他のマウスが細胞の投与から 91 日の時点で白血病を発症していなかったことを鑑みると、白血病による死亡ではない可能性が高いと考える。しかし、明らかな死亡原因については不明であった。

シングルセル解析では、PNaSS ゲル上で培養した白血病細胞に特異的な遺伝子を抽出した。抽出した候補遺伝子の real-time PCR での評価では、*HOTAIRM1*、*AKR1B1*、*TSPYL5*、*MIR924HG*、*ZNF433-AS1*、*ZNF718*、*HBA1*、*CECR2*、*HBA2* において、有意差をもって RNA 発現量の亢進を認めた。また抽出した候補遺伝子のうち、AML の発症や進行に関与する因子として *HOTAIRM1* (Díaz-Beyá et al., 2015; Hu et al., 2019; Jing et al., 2021; Liang et al., 2021)、*IKAROS family zinc finger (IKZF3)* (X. Yang et al., 2024) が、予後不良因子として *AKR1B1* (Laffin & Petrash, 2012)、*protein tyrosine phosphatase non-receptor type 7 (PTPN7)* (Y. Liu et al., 2023)、*homeobox A10 (HOXA10)* (Guo et al., 2020) が、新規治療標的になり得る因子として *proteolipid protein 2 (PLP2)* (Fahui Xie et al., 2023) が、化学療法抵抗性因子として *CENPE* (Shi et al., 2021)、さらに LSC マーカーとして *HSPE1* (Petersen et al., 2022) がそれぞれ報告されている。

shRNA による遺伝子ノックダウン実験へ進む遺伝子として、real-time PCR において有意差をもって RNA 発現量の亢進を認め、かつ白血病への関与の報告がある *AKR1B1* をまず選択した。また、白血病への関与についての報告は見られないが、real-time PCR において有意差をもって RNA 発現量の亢進を認めた候補遺伝子のうち、がんへの関与が報告され (Episkopou et al., 2019; Epping et al.,

2011; E. J. Kim et al., 2010; Lakshmanan et al., 2017; M. Liu et al., 2013)、かつ shRNA が存在する *TSPYL5* を選択した。

shRNA による遺伝子ノックダウン実験では *AKR1B1* と *TSPYL5* について検討を行い、両遺伝子ともに白血病細胞でノックダウンすることができた。また、ノックダウンした細胞の幹細胞関連遺伝子について real-time PCR 法で解析を行ったところ、*CD34*、*Oct3/4*、*Nanog* で遺伝子発現量の有意な低下を認め、*AKR1B1* と *TSPYL5* をノックダウンすることで白血病細胞の幹細胞性を低下させたと考えられた。

白血病には、異常なクロマチンアクセシビリティが存在することがわかっている(Assi et al., 2019; Corces et al., 2016)。この異常なクロマチンアクセシビリティの原因となる主要なクロマチンは SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5 (SMARCA5) により調整されるが、この SMARCA5 による調整不全が白血病の発症と LSCs の自己複製に重要であることが明らかとなっている(Yu et al., 2024)。また、LSCs はミトコンドリアの OXPHOS にエネルギーの供給を依存している可能性が高く、フルクトースがグルコースと比較して白血病細胞の成長に重要なエネルギー源であることが判明している(Chen et al., 2016; Jeong et al., 2021; Kuntz et al., 2017; Lagadinou et al., 2013; Zhu et al., 2022)。Yu らは、SMARCA5 が *AKR1B1* を介してフルクトース代謝を再プログラムすることを明らかとした(Yu et al., 2024)。*AKR1B1* は、グルコースからソルビトールの生成を触媒するアルドケト還元酵素である(Yu et al., 2024)。Yu らによる公開されたデータやウエスタンブロットでの解析によると、AML 患者と AML 細胞株において、正常対照と比較し mRNA とタンパク質レベルで *AKR1B1* が高発現していた。また、The Cancer Genome Atlas (TCGA)、Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatments (TARGET)および Vizome datasets において、*AKR1B1* が高発現している患者は低発現患者と比較し生存率が低く、芽球の割合が高かった(Yu et al., 2024)。さらに、*AKR1B1* の阻害剤であるエパルレスタットを使用した *in vivo* の検討において、エパルレスタットが白血病の治療において有効であることが明らかとなった(Yu et al., 2024)。加えて、Chen らによる最近の報告により、*AKR1B1* のノックダウンが、急性白血病細胞の増殖、コロニー形成能力および細胞周期を阻害し、アポトーシスを促進することや、*in vivo* の検討では急性白血病の進行を遅らせたことも併せて示された(Chen et al., 2024)。

以上より、本研究においてシングルセル解析で候補遺伝子とした *AKR1B1* は、既報でも白血病細胞において代謝に関連し、予後不良因子として報告されていることが判明した。このことから、シングルセル解析を用いて抽出した遺伝子が、白血病の予後不良因子である可能性を見出した。そして、*AKR1B1* を

抑制すると幹細胞関連遺伝子の抑制につながることから、*AKR1B1* が LSCs の生存・維持に関与する可能性が示された。

TSPYL5 は、肺がんや乳がん等の固形腫瘍において強力な発がんドライバーである (Episkopou et al., 2019; Epping et al., 2011; E. J. Kim et al., 2010; Lakshmanan et al., 2017; M. Liu et al., 2013)。特に非小細胞肺癌において、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 (I. G. Kim et al., 2021)。AKT は、増殖、抗アポトーシス、タンパク質合成、代謝において重要な役割を担うことが知られているが、最近ではがん幹細胞性における制御的意義を持つことも示唆されている (Malak et al., 2015; Thorsten Schaefer & Claudia Lengerke, 2015; Watanabe et al., 2006)。また、今回我々が有用な幹細胞関連遺伝子として報告したうちの一つである *Nanog* は、*PI3K*/*AKT* 経路によって AKT 活性化タンパクである *T-cell leukemia/lymphoma protein 1A* (*TCL1a*) の転写を促進し、AKT 活性化の正のフィードバックループを形成するとされる (J. S. Kim et al., 2010; Noh et al., 2012)。

以上より、*TSPYL5* は CSCs に関する重要な遺伝子であり、白血病においても治療標的となりうる可能性がある。さらに、*TSPYL5* は精巣を除くほとんどの成人ヒト組織で低発現のため (I. G. Kim et al., 2021)、治療標的とした場合には多臓器への影響を抑えることができる可能性がある。

なお本研究の限界として、*real-time PCR* はテクニカルなトリプリケートのみを行い、バイオロジカルなトリプリケートは行っていないことが挙げられる。

本研究において、ハイドロゲル上で培養した白血病細胞株が LSCs の性質を獲得することを、幹細胞関連遺伝子の発現量の上昇及び OCR へのシフトを確認することで示した。また動物実験において、部分的にはあるがハイドロゲル上で培養した白血病細胞株が、腫瘍形成能の亢進に関与する可能性が示された。シングルセル解析によりがん幹細胞性の誘導に関わる候補遺伝子を同定した。今後、同定した候補遺伝子の治療標的としての妥当性について、さらに検討を進める。

結論

1. 本研究から得られた新知見

- 1) 白血病細胞をハイドロゲル上で培養することにより、幹細胞性が誘導された。
- 2) ハイドロゲル上で培養した細胞の遺伝子変動により同定された候補遺伝子が、白血病細胞において治療標的となる可能性を示した。

2. 新知見の意義

ハイドロゲル上で培養することで、効率よく **LSCs** を誘導できること示した。本誘導方法により、**LSCs** を用いた研究への応用の可能性が広がると考えられる。

シングルセル解析は、新しい候補遺伝子を選定するために有用な解析方法である。

3. 本研究で得られた新知見に基づく今後の研究の展開

本研究において **AKR1B1** と **TSPYL5** を抑制することで、白血病細胞の幹細胞性を抑制することができた。今後、**AKR1B1** と **TSPYL5** を抑制した白血病細胞を用いたエネルギー代謝解析や、動物実験における腫瘍形成能の評価を行う。また、シングルセル解析で得られた他の候補遺伝子についても、遺伝子を抑制した白血病細胞における遺伝子発現量の評価、エネルギー代謝解析、動物実験における腫瘍形成能の評価を行う。

4. 今後の課題

ハイドロゲルや白血病細胞株によって幹細胞性の誘導に差異が生じる理由の解明、ハイドロゲル上で幹細胞性を保ったまま効率よく長期培養する方法の確立、長期培養すると幹細胞性が不可逆となる理由の解明、今回誘導した **LSCs** と生体内の **LSCs** の性質の評価方法の確立、抽出した候補遺伝子をノックダウンした白血病細胞を用いたエネルギー代謝解析や動物実験による腫瘍形成能の評価などが、今後の検討課題である。

謝辞

本研究の機会を与えてくださいました北海道大学大学院医学研究院生殖・発達医学分野小児科学教室 真部淳教授、北海道大学大学院医学研究院腫瘍病理学教室 田中伸哉教授、津田真寿美准教授に感謝の意を表します。また、適切な助言と直接の御指導を賜りました北海道大学大学院医学研究院腫瘍病理学教室 小田義崇先生、北海道大学病院がん遺伝子診療部 齋藤祐介先生、培養基材に関する指導や情報提供を頂きました北海道大学大学院先端生命科学研究院 龔劍萍教授に深く感謝いたします。

最後に、本論文を作成するに当たってご指導・ご協力を頂いたすべての皆様に、重ねて御礼申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Assi SA, Imperato MR, Coleman DJL, Pickin A, Potluri S, Ptasinska A, Chin PS, Blair H, Cauchy P, James SR, et al (2019) Subtype-specific regulatory network rewiring in acute myeloid leukemia. *Nat Genet* 51, 151-162.

Barreto IV, Pessoa FMCP, Machado CB, Pantoja LC, Ribeiro RM, Lopes GS, Moraes MEA, de Moraes Filho MO, de Souza LEB, Burbano RMR, et al (2022) Leukemic Stem Cell: A Mini-Review on Clinical Perspectives. *Front Oncol* 12, 931050.

Chen J, Xu L, Li W, Sun M, Chen Y, Qiu T, Wu Y, Lv W, Liu F and Fan H (2024) AKR1B1 is Required for Maintaining Acute Leukemia Cell Survival by Epigenetic Silencing of Tumor Suppressor Genes. *Biochem Genet*. doi: 10.1007/s10528-024-10984-2. (PREPRINT)

Chen WL, Wang YY, Zhao A, Xia L, Xie G, Su M, Zhao L, Liu J, Qu C, Wei R, et al (2016) Enhanced Fructose Utilization Mediated by SLC2A5 Is a Unique Metabolic Feature of Acute Myeloid Leukemia with Therapeutic Potential. *Cancer Cell* 30, 779-791.

Corces MR, Buenrostro JD, Wu B, Greenside PG, Chan SM, Koenig JL, Snyder MP, Pritchard JK, Kundaje A, Greenleaf WJ, et al (2016) Lineage-specific and single cell chromatin accessibility charts human hematopoiesis and leukemia evolution. *Nat Genet* 48, 1193-1203.

Díaz-Beyá M, Brunet S, Nomdedéu J, Pratcorona M, Cordeiro A, Gallardo D, Escoda L, Tormo M, Heras I, Ribera JM, et al (2015) The lincRNA HOTAIRM1, located in the HOXA genomic region, is expressed in acute myeloid leukemia, impacts prognosis in patients in the intermediate-risk cytogenetic category, and is associated with a distinctive microRNA signature. *Oncotarget* 6, 31613-31627.

Dominique B and John ED (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3, 730-737.

Episkopou H, Diman A, Claude E, Viceconte N and Decottignies A (2019) TSPYL5 Depletion Induces Specific Death of ALT Cells through USP7-Dependent Proteasomal Degradation of POT1. *Mol Cell* 75, 469-482.

Epping MT, Meijer LA, Krijgsman O, Bos JL, Pandolfi PP and Bernards R (2011) TSPYL5 suppresses p53 levels and function by physical interaction with USP7. *Nat Cell Biol* 13, 102-108.

Farge T, Saland E, de Toni F, Aroua N, Hosseini M, Perry R, Bosc C, Sugita M, Stuani L, Fraisse M, et al (2017) Chemotherapy Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism. *Cancer Discov* 7, 716-735.

Gong JP, Katsuyama Y, Kurokawa T and Osada Y (2003) Double-network Hydrogels with Extremely High Mechanical Strength. *Adv Mater* 15, 1155-1158.

Gong JP (2014) Materials both Tough and Soft. *Science* 344, 161-162.

Guimarães F, Guven H, Donati D, Christensson B, Ljunggren HG, Bejarano MT and Dilber MS (2006) Evaluation of *ex vivo* expanded human NK cells on antileukemia activity in SCID-beige mice. *Leukemia* 20, 833-839.

Guo C, Ju QQ, Zhang CX, Gong M, Li ZL and Gao YY (2020) Overexpression of HOXA10 is associated with unfavorable prognosis of acute myeloid leukemia. *BMC Cancer* 20, 586.

Horibe K, Saito AM, Takimoto T, Tsuchida M, Manabe A, Shima M, Ohara A and Mizutani S (2013) Incidence and survival rates of hematological malignancies in Japanese children and adolescents (2006-2010): based on registry data from the Japanese Society of Pediatric Hematology. *Int J Hematol* 98, 74-88.

Hu N, Chen L, Li Q and Zhao H (2019) LncRNA HOTAIRM1 is involved in the progression of acute myeloid leukemia through targeting miR-148b. *RSC Adv* 9, 10352-10359.

Inaba H, Greaves M and Mullighan CG (2013) Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 381, 1943-1955.

Jeong S, Savino AM, Chirayil R, Barin E, Cheng Y, Park SM, Schurer A, Mullarky E, Cantley LC, Kharas MG, et al (2021) High Fructose Drives the Serine Synthesis Pathway in Acute Myeloid Leukemic Cells. *Cell Metab* 33, 145-159.

Jing Y, Jiang X, Lei L, Peng M, Ren J, Xiao Q, Tao Y, Tao Y, Huang J, Wang L, et al (2021) Mutant NPM1-regulated lncRNA HOTAIRM1 promotes leukemia cell autophagy and proliferation by targeting EGR1 and ULK3. *J Exp Clin Cancer Res* 40, 312.

Kaspers GJ, Zimmermann M, Reinhardt D, Gibson BE, Tamminga RY, Aleinikova O, Armendariz H, Dworzak M, Ha SY, Hasle H, et al (2013) Improved Outcome in Pediatric Relapsed Acute Myeloid Leukemia: Results of a Randomized Trial on Liposomal Daunorubicin by the International BFM Study Group. *J Clin Oncol* 31, 599-607.

Kim EJ, Lee SY, Kim TR, Choi SI, Cho EW, Kim KC and Kim IG (2010) TSPYL5 is involved in cell growth and the resistance to radiation in A549 cells via the regulation of p21^{WAF1/Cip1} and PTEN/AKT pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 392, 448-453.

Kim IG, Lee JH, Kim SY, Heo CK, Kim RK and Cho EW (2021) Targeting therapy-resistant lung cancer stem cells via disruption of the AKT/TSPYL5/PTEN positive-feedback loop. *Commun Biol* 4, 778.

Kim JS, Kim BS, Kim J, Park CS and Chung IY (2010) The phosphoinositide-3-kinase/Akt pathway mediates the transient increase in Nanog expression during differentiation of F9 cells. *Arch Pharm Res* 33, 1117-1125.

Kuntz EM, Baquero P, Michie AM, Dunn K, Tardito S, Holyoake TL, Helgason GV and Gottlieb E (2017) Targeting mitochondrial oxidative phosphorylation eradicates therapy-resistant chronic myeloid leukemia stem cells. *Nat Med* 23, 1234-1240.

Laffin B and Petrash JM (2012) Expression of the aldo-ketoreductases AKR1B1 and AKR1B10 in human cancers. *Front Pharmacol* 3, 104.

Lagadinou ED, Sach A, Callahan K, Rossi RM, Neering SJ, Minhajuddin M, Ashton JM, Pei S, Grose V, O'Dwyer KM, et al (2013) BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells. *Cell Stem Cell* 12, 329-341.

Lakshmanan I, Salfity S, Seshacharyulu P, Rachagani S, Thomas A, Das S, Majhi PD, Nimmakayala RK, Vengoji R, Lele SM, et al (2017) MUC16 regulates TSPYL5 for lung cancer cell growth and chemoresistance by suppressing p53. *Clin Cancer Res* 23, 3906-3917.

Liang L, Gu W, Li M, Gao R, Zhang X, Guo C and Mi S (2021) The long noncoding RNA HOTAIRM1 controlled by AML1 enhances glucocorticoid resistance by activating RHOA/ROCK1 pathway through suppressing ARHGAP18. *Cell Death Dis* 12, 702.

Liu JF, Chen YM, Yang JJ, Kurokawa T, Kakugo A, Yamamoto K and Gong JP (2011) Dynamic behavior and spontaneous differentiation of mouse embryoid bodies on hydrogel substrates of different surface charge and chemical structures. *Tissue Eng Part A* 17, 2343-2357.

Liu M, Ingle JN, Fridley BL, Buzdar AU, Robson ME, Kubo M, Wang L, Batzler A, Jenkins GD, Pietrzak TL, et al (2013) TSPYL5 SNPs: Association with Plasma Estradiol Concentrations and Aromatase Expression. *Mol Endocrinol* 27, 657-670.

Liu Y, Zhang J, Du Z, Huang J, Cheng Y, Yi W, Li T, Yang J and Chen C (2022) Comprehensive analysis of PTPN family expression and prognosis in acute myeloid leukemia. *Front Genet* 13, 1087938.

Malak PN, Dannenmann B, Hirth A, Rothfuss OC and Schulze-Osthoff K (2015) Novel AKT phosphorylation sites identified in the pluripotency factors OCT4, SOX2 and KLF4. *Cell Cycle* 14, 3748-3754.

Mesbahi Y, Trahair TN, Lock RB and Connerty P (2022) Exploring the Metabolic Landscape of AML: From Haematopoietic Stem Cells to Myeloblasts and Leukaemic Stem Cells. *Front Oncol* 12, 807266.

Ng SW, Mitchell A, Kennedy JA, Chen WC, McLeod J, Ibrahimova N, Arruda A, Popescu A, Gupta V, Schimmer AD, et al (2016) A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. *Nature* 540, 433-437.

Noh KH, Kim BW, Song KH, Cho H, Lee YH, Kim JH, Chung JY, Kim JH, Hewitt SM, Seong SY, et al (2012) Nanog signaling in cancer promotes stem-like phenotype and immune evasion. *J Clin Invest* 122, 4077-4093.

Petersen MA, Rosenberg CA, Bill M, Enemark MB, Rahbek O, Roug AS, Hasle H, Honoré B and Ludvigsen M (2022) Proteomic Profiling Identifies Specific Leukemic Stem Cell-Associated Protein Expression Patterns in Pediatric AML Patients. *Cancers* 14,14153567.

Rubnitz JE, Inaba H, Dahl G, Ribeiro RC, Bowman WP, Taub J, Pounds S, Razzouk BI, Lacayo NJ, Cao X, et al (2010) Minimal Residual Disease-Directed Therapy for Childhood Acute Myeloid Leukemia: Results of the AML02 Multicenter Trial. *Lancet Oncol* 11, 543-552.

Semba S, Kitamura N, Tsuda M, Goto K, Kurono S, Ohmiya Y, Kurokawa T, Gong JP, Yasuda K and Tanaka S (2021) Synthetic poly(2-acrylamido-2-methylpropanesulfonic acid) gel induces chondrogenic differentiation of ATDC5 cells via a novel protein reservoir function. *J Biomed Mater Res A* 109, 354-364.

Schaefer T and Lengerke C (2015) AKT-driven phospho-patterns of pluripotency. *Cell Cycle* 14, 3784-3785.

Shi M, Niu J, Niu X, Guo H, Bai Y, Shi J, Li W, Sun K, Chen Y and Shao F (2021) Lin28A/CENPE Promoting the Proliferation and Chemoresistance of Acute Myeloid Leukemia. *Front Oncol* 11, 763232.

Stelmach P and Trumpp A (2023) Leukemic stem cells and therapy resistance in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 108, 353-366.

Suzuka J, Tsuda M, Wang L, Kohsaka S, Kishida K, Semba S, Sugino H, Aburatani S, Frauenlob M, Kurokawa T, et al (2021) Rapid reprogramming of tumour cells into cancer stem cells on double-network hydrogels. *Nat Biomed Eng* 5, 914-925.

Tsukimoto I, Tawa A, Horibe K, Tabuchi K, Kigasawa H, Tsuchida M, Yabe H, Nakayama H, Kudo K, Kobayashi R, et al (2009) Risk-stratified Therapy and the Intensive Use of Cytarabine Improves the Outcome in Childhood Acute Myeloid Leukemia: The AML99 Trial From the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *J Clin Oncol* 27, 4007-4013.

Watanabe S, Umehara H, Murayama K, Okabe M, Kimura T and Nakano T (2006) Activation of Akt signaling is sufficient to maintain pluripotency in mouse and primate embryonic stem cells. *Oncogene* 25, 2697-2707.

Xie F, Qu J, Lin D, Feng K, Tan M, Liao H, Zeng L, Xiong Q, Huang J and Chen W (2023) Reduced Proteolipid Protein 2 promotes endoplasmic reticulum stress-related apoptosis and increases drug sensitivity in acute myeloid leukemia. *Mol Biol Rep* 51, 10.

Yang JJ, Chen YM, Kurokawa T, Gong JP, Onodera S and Yasuda K (2010) Gene expression, glycocalyx assay, and surface properties of human endothelial cells cultured on hydrogel matrix with sulfonic moiety: Effect of elasticity of hydrogel. *J Biomed Mater Res A* 95, 531-542.

Yang X, Yang L, Luo A, Liu S, Zhang X, Liu X, Liu X, Luo A, Cai M, Yan Y, et al (2024) IKZF3 polymorphisms contribute to the increased risk of acute lymphoblastic leukemia in children. *Cancer* 130, 973-984.

Yasuda K, Kitamura N, Gong JP, Arakaki K, Kwon HJ, Onodera S, Chen YM, Kurokawa T, Kanaya F, Ohmiya Y, et al (2009) A Novel Double-Network Hydrogel Induces Spontaneous Articular Cartilage Regeneration *in vivo* in a Large Osteochondral Defect. *Macromol Biosci* 9, 307-316.

Yasuda K, Gong JP, Katsuyama Y, Nakayama A, Tanabe Y, Kondo E, Ueno M and Osada Y (2005) Biomechanical properties of high-toughness double network hydrogels. *Biomaterials* 26, 4468-4475.

Yin H, Akasaki T, Sun TL, Nakajima T, Kurokawa T, Nonoyama T, Taira T, Saruwatari Y and Gong JP (2013) Double network hydrogels from polyelectrolytes: high mechanical strength and excellent anti-biofouling properties. *J Mater Chem B* 1, 3685-3693.

Yu PC, Hou D, Chang B, Liu N, Xu CH, Chen X, Hu CL, Liu T, Wang X, Zhang Q, et al (2024) SMARCA5 reprograms AKR1B1-mediated fructose metabolism to control leukemogenesis. *Dev Cell* 59, 1954-1971.

Zhu B, Zhong W, Cao X, Pan G, Xu M, Zheng J, Chen H, Feng X, Luo C, Lu C, et al (2022) Loss of miR-31-5p drives hematopoietic stem cell malignant transformation and restoration eliminates leukemia stem cells in mice. *Sci Transl Med* 14, 2548.

国立研究開発法人国立がん研究センター (2023) 白血病<小児>.In がん情報サービス <https://ganjoho.jp/public/cancer/leukemia/index.html> (2024 年 10 月 4 日参照)