

白血病幹細胞の薬剤抵抗性と G0 期の深さと抗腫瘍免疫抵抗性とのクロストークの解明

田中洋介

東京大学 医科学研究所 細胞療法分野

【研究の背景】

白血病幹細胞(Leukemic stem cell: LSC)は正常造血幹細胞と同様に細胞周期が停止しており(G0 期)、細胞周期がまわっている細胞を標的とする従来の抗がん剤に感受性が低く、また薬剤排出能が高いため、完全寛解後の再発の原因となっている。このため、白血病の根治には G0 期の LSC の同定とそれを標的とした新しい治療法の開発が必要である。これまでに、慢性骨髄性白血病において、白血病再構築能を示す細胞は白血病幹細胞分画の G0 期の細胞のみであり、イマチニブにより G0 期の白血病幹細胞はさらに深い G0 期に移行し、これと関連して PD-L1 の発現が上昇することを確認している。このことは、薬剤抵抗性、G0 期の深さ、抗腫瘍免疫抵抗性のクロストークの存在を示唆している。

【目 的】

本研究では薬剤抵抗性、G0 期の深さ、抗腫瘍免疫抵抗性クロストークのメカニズムを明らかにし、白血病幹細胞の維持機構を理解することで白血病幹細胞の根絶を目指す。

【方 法】

- G0 マーカー(G0M)マウス¹を用いた白血病モデルの作製
5-FU 投与後 4 日目の G0M マウス骨髄細胞にレトロウイルスにより *BCR-ABL1*、*MLL-AF9* と *JAK2V617F* をそれぞれ導入し、致死量放射線照射したレシピエントマウス(C57/BL6J または Rag2KO)に移植することによりそれぞれの白血病モデルを作製した。
- 100 細胞 RNASeq 解析²
無治療群と治療群との骨髄から G0 期と cycling 期との LSC をセルソーティングにより 100 個採取し、100 細胞 RNASeq 解析を行なった。
- 治療モデル
CML モデルにおいては、移植後 10 日目から 2 週間投薬後に骨髄から LSC を採取し、各種解析を行なった。

【結 果】

CML については、G0M+CD27+c-Kit+Sca-1+Lineage negative の分画に G0 期の LSC を同定した。AML については G0M+c-Kit+Gr-1+ と G0M-c-Kit+Gr-1+ との分画に白血病再構築能の差を認めなかったため、造血幹細胞分画について検証中である。なお、MPN モデルについては、レトロウイルスモデルでは白血病の発症に至らなかったため、レンチウイルスを使ったモデルを検証中である。したがって、以下には CML モデルにおける研究結果を示す。CML モデルにおいて、無治療群とイマチニブ治療群とから G0 期の LSC 分画と cycling 期の LSC 分画をセルソーティングにより採取し、G0 期の LSC の治療抵抗性の責任遺伝子群や責任シグナル経路を特定するために RNASeq 解析(n=3 each)を行なった。主成分(PCA)解析と変動遺伝子のパスウェイ解析の結果から、イマチニブ治療群の G0 期の LSC において、炎症シグナルが亢進していること

が明らかになった(図1)。炎症シグナルの亢進を阻害する目的で、IL-1R/TLR-IRAK1/4-NF-kB 経路の阻害剤である IRAK1/4 阻害剤とイマチニブとの併用治療を行なったところ、G0 期の LSC を効果的に駆逐できることがわかった(図2)。次に、IL-1R/TLR-IRAK1/4-NF-kB 経路は PD-L1 の発現を惹起することから³、IRAK1/4 阻害剤が LSC の PD-L1 の発現を抑制するかを検証した。IRAK1/4 阻害剤とイマチニブとの併用は PD-L1 の発現も減少させた。さらに、抗 PD-L1 抗体とイマチニブとの併用療法は IRAK1/4 阻害剤とイマチニブとの併用と同等かそれ以上の LSC 駆逐効果が認められた(図2)。このことから、IL-1R/TLR-IRAK1/4-NF-kB 経路の活性化が PD-L1 の発現を上昇させることで、LSC を T 細胞免疫から保護していることが示唆された。この可能性を検証するために、T 細胞免疫を欠損している Rag2 欠損マウスをレシピエントに用いて同様の実験を行なったところ、LSC 駆逐効果は認められなかった。以上のことから、CML において、LSC はイマチニブ耐性を獲得する際に IL-1R/TLR-IRAK1/4-NF-kB 経路を活性化させることで生存シグナルを維持すると同時に IL-1R/TLR-IRAK1/4-NF-kB 経路による PD-L1 の発現上昇の惹起によって T 細胞免疫をも回避していることが明らかになった。

【考 察】

今回の研究結果は、イマチニブ存在下において LSC は炎症シグナル経路を活性化させることで BCR-ABL1 非依存的に生存できるのみならず、PD-L1 の発現上昇を同じ経路により惹起し、抗免疫抵抗性をも獲得するという巧みな生存戦略をとっていることが明らかになった。しかしながら、イマチニブ存在下においてどのように炎症シグナルの活性化が起こるかはわかっておらず、今後の課題である。炎症シグナルの活性化はイマチニブによって殺された CML 細胞から放出される DAPMS がそのトリガーとなっている可能性が高いと考えており、今後は炎症シグナルの活性化メカニズムの解明に迫りたい。

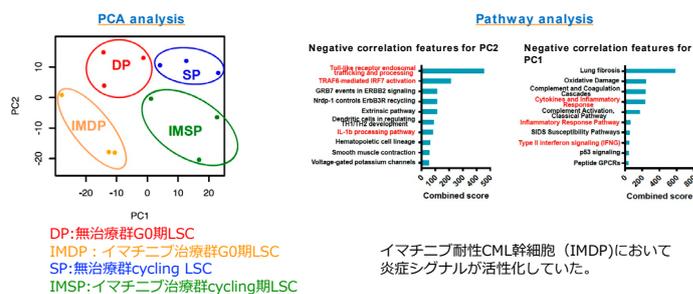
【臨床的意義・臨床への貢献度】

今回の研究結果は、CML 治療の標準治療であるイマチニブなどのチロシンキナーゼ阻害剤と IRAK1/4 阻害剤並びに現在注目を浴びている抗 PD-L1抗体との併用療法がヒト CML LSC の駆逐にも効果がある可能性を示唆するものであり臨床への貢献度が高いと考える。

【参考・引用文献】

1. Fukushima, T. *et al.* Discrimination of Dormant and Hematopoietic Stem Cells by G0 Marker Reveals Dormancy Regulation by Cytoplasmic Calcium. *Cell Reports* **29**, Active 4144-4158.e7 (2019).
2. Hayashi, T. *et al.* Single-cell full-length total RNA sequencing uncovers dynamics of recursive splicing and enhancer RNAs. *Nat Commun* **9**, 619 (2018).
3. Antonangeli, F. *et al.* Regulation of PD-L1 Expression by NF-kB in Cancer. *Front. Immunol.* **11**, 584626 (2020).

図1 Inflammatory signaling are active in imatinib-resistant CML stem cells



イマチニブ耐性CML幹細胞 (IMDP)において炎症シグナルが活性化していた。

図2 : CML LSCの維持には炎症性シグナルが重要であり、イマチニブとIRAK1/4阻害剤、イマチニブと抗PD-L1抗体の併用はCML LSCsの駆逐に有効である。

