

難治性白血病における治療抵抗性を辿る運命クローンの追跡と新規治療標的探索

仙波雄一郎

九州大学大学院医学研究院 プレシジョン医療学

【研究の背景】

固形腫瘍で高頻度に認める癌抑制遺伝子 *TP53* の変異は、AML において全体の約 8%、高齢者の約 20%にみられる、最も強力な予後不良因子である。既存の化学療法だけでなく、BCL2 阻害薬などのアポトーシス経路を標的とした新規治療薬に対しても治療抵抗性であるため、*TP53* 経路が機能的に欠如した AML に対する新規治療法の開発は喫緊の課題である。*TP53* 変異が各種治療に対し抵抗性を獲得する経路、および治療過程のクローン動態は十分解明されていない。

【目的】

本研究の目的は、*TP53* 変異 AML の治療抵抗性経路を明らかにし、治療下の細胞動態を明らかにすることである。CRISPR スクリーニングおよび細胞バーコーディング技術を駆使し、薬剤投与下の *TP53* 変異 AML 細胞株および患者由来細胞の細胞動態を評価し、治療に抵抗性の経過を辿るクローンの特徴を明らかにする。

【方法】

(1) *Trp53* 変異白血病における各治療薬剤に対する抵抗性機序の解明

Trp53 変異白血病細胞株に全ゲノム CRISPR スクリーニング用ライブラリを感染させ、複数薬剤投与下で細胞培養を行う。細胞培養の前後でゲノム DNA を抽出し、含まれる sgRNA 配列を次世代シーケンサーにて同定する。

(2) *Trp53* 変異白血病の治療抵抗性クローンの動態追跡

Trp53 変異 AML 細胞株に対して DNA バーコードを挿入し、クローン追跡を行う。バーコード発現レンチウイルスを作成し、*Trp53* 変異 AML 細胞株にバーコードライブラリを導入し、薬剤投与を行う。薬剤投与前後のバーコード配列を同定し、薬剤投与によるクローン構成の変化を解析する。また、化学療法や同種移植に治療抵抗性を示す *TP53* 変異 AML 患者検体について、治療前後の遺伝子発現とエピゲノム変化を、scRNA-seq を用いて解析する。

【結果】

Trp53 変異細胞株を樹立し、各種薬剤 (azacitidine, decitabine, venetoclax, S64315 [MCL inhibitor], selinexor, adavosertib [wee1 inhibitor]) 存在下で CRISPR スクリーニングを行った。その結果、各薬剤について、耐性遺伝子および合成致死に機能する遺伝子を同定した。XPO7/NPAT は *Trp53* 変異により高発現し、発現抑制することで *Trp53* 変異細胞特異的に細胞増殖を抑制することを明らかにした¹⁾。さらに、*Trp53* 野生型 AML 細胞のスクリーニング結果と比較することで、*Trp53* 変異に伴い獲得された耐性機構を新たに複数同定した。

また、ClonMapper 法を参考に、CRISPR-Cas9 システムの sgRNA 配列をバーコードとして利用したプラスミッドライブラリを作成した。ランダム挿入配列の配列パターン、クローニング方法を最適化し、 10^7 規模のバーコードライブラリを作成した。さらに、治療前後の AML 患者検体を用いて、scRNA-seq + GoT 解析を行った。再発後に新たにクラスターが出現し、新規出現変異がこれらの新規出現クラスターに濃縮されることが確認された。さらに、治療前の時点でこれらの遺伝子変異を有するマイ

ナー再発クローンが少数存在していることが明らかとなった。

【考 察】

CRISPR スクリーニングを用いて、*Trp53* 変異 AML における各薬剤に特徴的な感受性および耐性経路を新たに同定することが可能であった。また、治療前後患者検体の scRNA-seq 解析により、治療後再発クローンはこれらの耐性経路遺伝子を高発現しており、さらに治療前の時点で少数クローンとして既に存在していることが明らかになった。現在、条件検討を行ったバーコードライブラリを用い、各薬剤存在下のバーコード分布の変化と再発クローンの治療前の特徴を評価している。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究で明らかにした XPO7/NPAT 経路は *TP53* 変異白血病細胞で特に生存に必要な経路であり、今後の阻害薬の開発を通じて、極めて予後不良な疾患に対する新たな治療選択肢となる可能性がある。また、遺伝子変異のみならず、薬剤投与下のクローン動態変化について知見を蓄積することで、更なる個別化医療の最適化が進むことが期待される。

【参考・引用文献】

1. **Yuichiro Semba**, Takuji Yamauchi, Daniel E Bauer, Seishi Ogawa, Koichi Akashi, Takahiro Maeda. The XPO7-NPAT axis represents key vulnerabilities in TP53-mutated acute myeloid leukemia. *Blood*. 2025.