

T細胞性急性リンパ性白血病（T-ALL）における cBAF複合体を中心とした細胞増殖の分子メカニズム解明と新規治療法開発

京都大学 医生物学研究所
生命システム研究部門 助教
青木一成 先生

使用機種

セルソーター MA900

使用用途

- ・ cBAF阻害剤による抗腫瘍効果の確認（遺伝子解析用サンプル調製）
- ・ 96/384ウェルプレートへの、白血病細胞シングルセルソーティング



青木先生は、T細胞性急性リンパ性白血病（T-ALL）に対する、新規治療法の手がかりを見つけるべく、ご研究をされている新鋭の研究者です。T-ALLでは、治療成績が比較的良好かつ長期生存率が得られている一方で、治療が奏功しない患者さんに対しては、新たな治療法の開発が求められているという背景があります。そこで先生はT-ALLの分子病態を、遺伝子発現制御の観点から解析されています。

—2024年2月15日に、国際学術誌「Blood」に掲載された、“*Canonical BAF complex regulates the oncogenic program in human T-cell acute lymphoblastic leukemia*”, Kazunari Aoki et, al, でもご記載のある、先生のご研究について教えてください。

T-ALL細胞の増殖メカニズムの一部を解明しました。クロマチンリモデリング因子 cBAF複合体ががん原性転写因子 RUNX1結合領域のクロマチンアクセシビリティを特異的に制御し、それによりCXCL12応答性や白血病細胞の増殖を促していたことが分かりました（Fig. 1）。また、①cBAF複合体阻害剤の使用で、RUNX1のゲノムからの乖離とCXCL12応答性の低下、増殖抑制が可能であること、②白血病マウスにおいても増殖抑制効果が得られることが証明できました。

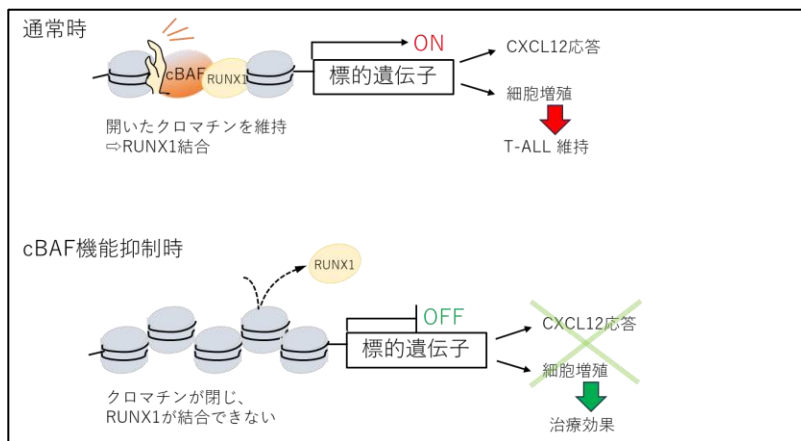


Fig.1 T-ALLにおけるcBAF複合体の機能

元々、CXCR4の発現制御を行うシグナルについては部分的にはわかっていたのですが、網羅的には解明されていませんでした。そのため、この研究結果の面白さというのは、「cBAFがRUNX1とペアになって機能していることが分かった」ということにあると思っています。（詳細説明は後述になりますが）cBAFはRUNX1とペアになってRUNX1の機能を助ける形で、CXCR4やCDK6の発現を介して、外部からの刺激を受け、細胞増殖を助けている。というのを見つけたわけですね。

骨髄の微小環境内では、CXCL12 ケモカインタンパク質が分泌しているのですが、その受容体が白血病細胞側が出しているCXCR4 に相当します (Fig. 2)。CXCL12をこのCXCR4で受け取ると、白血病細胞は増えることができたり、生存することができるので、増殖と生存と、両方に必要なんですね。私の研究ではこういった因子や受容体が出てくるわけですが、今回の論文で使用している特徴的な実験手法としては、私の所属している研究室の遊佐 宏先生が、イギリスのサンガー研究所にいらした時代に確立した「CRISPRスクリーニング法」を用いました。遺伝子は全部で2万ほどありますが、その手法を活用すると「注目表現型においてそれぞれの遺伝子がどのような機能を果たしているか」を網羅的に調べることができるんです。例えば、今回だったら、どの遺伝子を壊すとCXCL12への応答性がなくなってしまうとかか。

Fig. 3 がそのCXCL12への遊走性を調べたCRISPRスクリーニングの概要図です。CXCL12はメッシュの下方だけに存在していて、2万パターンの遺伝子を壊した細胞をメッシュの上に置いておきます。メッシュ部分には8 μ m程度の微小な穴が開いているんです。そうすると細胞は通常はすり抜けれられないのですが、下にCXCL12を入れておくと、T-ALL細胞であれば、メッシュより下に遊走するわけですね。そこで、既知のCXCR4以外にCXCR4の上流あるいは下流で機能している新しい遺伝子がいくつかヒットしてきたというわけです。

(Canonical BAF complex regulates the oncogenic program in human T-cell acute lymphoblastic leukemia, Kazunari Aoki et, al, Fig1 B 参照)。

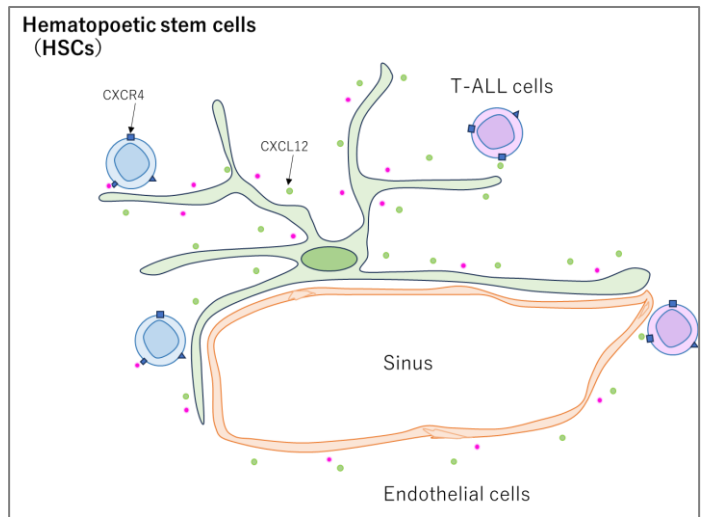


Fig. 2 骨髄微小環境

方法論としては、まず、 1×10^7 オーダーのCas9発現細胞に、様々な遺伝子をノックアウトできるgRNAを十分低い効率で形質導入します。そうすると、1細胞には1つのウイルスしか感染しないようになり、これで1遺伝子ずつ壊すことができます。そして最終的には、マイグレーションした細胞を回収して、次世代シーケンサーで、gRNAの配列を解析して定量化するというわけです。

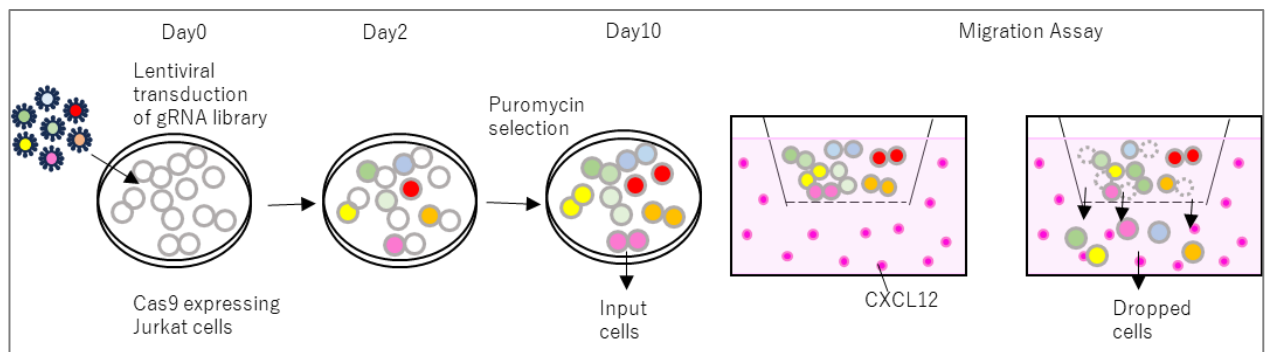


Fig.3 CXCL12に対する白血病細胞の遊走に必須な遺伝子を同定するスクリーニングストラテジー

そこから、さらに解析を続けていくと、cBAF複合体がCXCR4の発現を制御している、つまり、上流だったことが分かったんですね。そのような経緯で、①cBAFは、CXCR4の発現を上げて、ニッチ細胞から分泌されるCXCL12への反応性を高めること、さらに②CDK6も発現させて白血病細胞の増殖を促すことが分かりました。その2つの要素で、がん細胞の増殖をドライブをしているようなので、cBAFを阻害すれば、白血病細胞自体の増殖能も低下し、CXCL12との反応性も当然落ち、二重のメカニズムで抗腫瘍効果を発揮するのではないか、と思ったわけですね。この現象を論文では最後、マウスモデルでも検証していますね。

ー現時点で、cBAFががん増殖に関与しているといわれている疾患は、T-ALLのみでしょうか？

いくつかのがんで、cBAFは重要な働きをしていると分かっている、T-ALLだと共同ではたらくのがRUNX1になるわけですが、前立腺がんだったらアンドロゲンレセプター、AMLだったらIRF8のように、それぞれがん増殖のキーになるような転写因子の、ゲノムへの結合を、cBAFが助けてるらしいということが、様々ながん種でここ2-3年言われるようになりました。

T-ALLに関しては、我々が世界で初めて証明できましたが、ここ数年で同時に、他のがんにおいても注目されてきているという感じですね。

ーそう聞くと、cBAFをターゲットにすることは、いろいろながん治療にとって汎用性がありそうですね。そうすると先生としてはどのように、今回の研究成果を新規薬剤や治療法開発に、結びつけたいと思われませんか？

2つあって、1つには、「T-ALLに対して、cBAFの有効性を予知するバイオマーカーを見つけない」ということですね。cBAFの阻害剤は確かにT-ALLに効くと信じていますが、本当に全員の患者さんに効くかどうかの保証はないので、バイオマーカーをもとに、こういう人には効く、こういう人には効かないという、患者さんの層別化、グループ分けができるようなマーカーが分かるということです。そうすると効きそうな人にだけに阻害剤を使うことができ、効かなさそうな人には使わずに済むので、予め薬剤効果を予測できるようにしたいというのが1つです。

もう1つは、「どの薬剤を組み合わせたらいいか」というのが、まだよく分かっていない点なので、見つけたいですね。もし、cBAF阻害剤と2-3種類組み合わせるべき、治療薬が見つけられれば、その組み合わせによって、より強く、相乗的に抗腫瘍効果を発揮できるようなるかもしれないですね。そのような組み合わせを、今後考えていきたいと思っていますね。

T-ALLではもちろん試みたいですが、cBAFが効くと言われている、ほかの癌にも広げていきたいと思っています。

ーバイオマーカーというキーワードを出していただいて、まさしく、フローサイトメーターの関わってくるところかと思いました。今回のご研究では、弊社のMA900はお使いいただけましたでしょうか。実験上の使用用途についてお伺いしたいです。

はい、私の実験ではソーティングを欠かせないので、MA900は頻繁に使用しています。

発現パターンの確認はもうアナライザーで行っているの、ソーターでは主に、「実験の材料になる、目的とする細胞だけを分取してくる」という目的でソニーのセルソーターを使っています。今回の論文では、計4か所使用していて、

まずは、先述のCXCL12への遊走性を確かめたCRISPRスクリーニングの実験 (Fig.3) で、ウイルスを感染させる対象の Cas9発現 Jurkat細胞は、もともとシングルセルソーティングで純化して作製しているので、ここが1つめですね。

2つめは、cBAFの阻害をすることでCXCR4の発現が減少し、CXCL12への白血球の遊走が弱くなる事を示した実験(論文内 Fig3参照)で、実験上 CXCR 4が過剰発現しているJurkat細胞が必要なのですが、そこでmCherry発現 (CXCR4+) Jurkat細胞を作って、mCherry陽性細胞をソーティングするのに使用しました。その後、その細胞は培養してマイグレーションの実験に使いましたね。

3つめは、cBAF阻害で、CDK6のエンハンサーにRUNX1が結合することを阻害して、実際に細胞増殖を抑えられる (抗腫瘍効果が出る) という結論を示した実験 (論文内 Fig6) ですね。ここでも、実験上 CDK6が過剰発現しているJurkat細胞が必要なのですが、そこでmCherry発現 (CDK6+) Jurkat細胞を作って、mCherry陽性細胞をソーティングするのに使用しました。

最後は、cBAF複合体が、in vivoでのヒトT-ALLの増殖に必要なであることを示す実験 (論文内 Fig7) で、こちらでもCXCR4やCDK6の発現量を確認するためにヒト白血病細胞 (hCD45 発現、APCで標識した細胞) を回収した、という用途ですね。

—MA900について、気に入っていただけているポイントはありますか。

やはり使ってみると、すごく楽なことですね。それとノズルがチップと一体化していて、毎回交換するのでほぼ間違いなく詰まることはないですね。それもあって、設定のときのキャリブレーションはもう99%パスという体感です。大学院生でも使いやすいように、（ソフトウェアで）ガイドが出て、どんどん説明していってくれるので、ソフトウェア側もユーザーフレンドリーなところがいいと思いますね。

それから、私の実験系ではシングルセルソートでMA900を使用しているのですが、プレートソートが良いです。ソニーのとても優れてるところは位置合わせがばっちりなところですね。96wellだったら位置調整はしなくていいと、（動画チュートリアルやマニュアルには）書いてあるんですが、私は一応いつも合わせるようにしているのですが、その時十字キーで少し調整するだけで、96ウェルでも384wellでも本当にドンピシャな位置に落ちてくれるので、そこが非常に好きですね。

—ここからは、青木先生のバックグラウンドや、今のご研究に至るまでの経緯などお伺いしたいと思います。先生はもともと、臨床医でいらっしゃったとお伺いしたのですが、そこから研究者としてのキャリアの方に舵を切った、というところには、何かモチベーションやきっかけになることがあったのでしょうか。

最初は血液内科で、普通に医者をやってたんですよ、五年半ほど。主治医としてたくさん治療させてもらいましたが、決まった抗癌剤で治療しても、治らない症例も見てきたので、もっと根本的に、新しい治療法を作り上げる方をやりたい、という気持ちがありました。

学生時代は、大阪大学にて、長澤丘司教授のもとで研究していたのですが、先生はニッシュェの細胞の方、つまりCXCL12を分泌する側の研究をされてたんですね。私も学生時代は論文をそこで書きましたが、もともと血球の方に興味があったので、より白血病細胞の研究に進みたいと思うようになりました。

また、現在所属している京都大学の風土も、医師を経験してから研究に戻ってくる人が多く、私も戻りたい、と思うところがありましたね。大学によっては、研究に戻る人がほとんどいない機関も多々あると思いますが、京都大学は研究志向の人が多く感じていて、臨床医を続けたい人はもちろん、研究者も大事にされて、両方バランスよく育成されている風土だと感じますね。

—最後に、これから先生が研究者として、大事にしていきたいビジョンがあれば、お聞かせください。

新しい治療標的を探したいとは大原則思っています。今までもcBAFに着目して研究を展開できたので、今後もcBAFを糸口に、新規治療につながるターゲットを見つけて、患者さんの要望改善をするような、そして社会実装に結びつくような基礎研究をしたいと思っています。今までもずっと、そこは揺らがず続けていますが。

—大変貴重なお話を、誠にありがとうございました。



参考文献

・ Kazunari Aoki, et. al, “Canonical BAF complex regulates the oncogenic program in human T-cell acute lymphoblastic leukemia”, blood 15 (2024) | VOLUME 143, NUMBER 7: 604-618

<https://doi.org/10.1182/blood.2023020857>

・ 青木 一成 著 “T-ALLの微小環境との相互作用と増殖のメカニズム“, 血液内科 (2024), 89(2):197-202

・ “T細胞性急性リンパ性白血病の増殖因子を発見—新規治療法開発への手がかりに—”
京都大学ホームページ (2023)

<https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2023-11-14-0>

セルソーターMA900

最大12色の蛍光同時検出と4方向ソーティングに対応

- ・ 96/384シングルセルソート(プレート対応モデル)
- ・ 目的に応じてオリフィスサイズを選択できるディスプレイブルソーティングチップ
- ・ 様々な要求に対応できる先進のソーティングシステム
- ・ どなたでもすぐ使える全自動セットアップ
- ・ 12色解析を支えるソフトウェア



発行元

ソニー株式会社

ライフサイエンス事業部

〒220-8750 神奈川県横浜市西区みなとみらい5-1-1

Tel: 0120-667-010

URL: <http://www.sony.co.jp/LS>

