

令和元年6月4日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19599

研究課題名(和文) オンコニュートリエント”ジペプチド”によるがん幹細胞の発生・維持機構の解明

研究課題名(英文) Novel role of dipeptide species as an onco-nutrient to maintain cancer stem cells

研究代表者

仲一仁 (NAKA, KAZUHITO)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授

研究者番号：70372688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は、慢性骨髄性白血病(CML)のマウスモデルを用いて、二分子のアミノ酸からなるジペプチドの吸収がCMLのがん幹細胞(CML幹細胞)の維持に重要な役割を担うことを報告した。本研究ではジペプチドトランスポーターSlc15A2遺伝子のノックアウトマウスを用いて、生体内でのCML幹細胞の維持におけるジペプチド吸収の役割を解析した。RNAシーケンスによる遺伝子発現解析の結果、Slc15A2欠損によるジペプチド吸収の低下はCML幹細胞の分化を促進していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん幹細胞はがん細胞を産み出す能力と抗がん剤抵抗性を併せ持つ細胞であり、抗がん剤治療を逃れたがん幹細胞は再発を引き起す原因となる。研究代表者は、CML幹細胞はジペプチドを吸収して生存していることを報告したが、その生物学的意義は不明であった。本研究では、ジペプチド吸収できないSlc15A2遺伝子のノックアウトマウスを用いることで、ジペプチドの吸収は生体内でのCML幹細胞の未分化性の維持に重要な役割を担うことを解明した。本成果はSlc15A2阻害剤による分化誘導など、CML幹細胞を標的とする新しいCML根治療法を開発するための医薬基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Although the discovery of tyrosine kinase inhibitors (TKIs) has been improved prognosis of chronic myelogenous leukemia (CML) patients, CML stem cells are responsible for the relapse of CML disease following TKI therapy. We have previously reported that internalization of dipeptide species plays a crucial role for surviving CML stem cells in vivo. In this study, we examined a biological role of dipeptide species in the maintenance of CML stem cells by using Slc15A2-deficient CML mouse model, which cannot take up dipeptide species. Interestingly, RNA-sequencing study indicated that the defective dipeptide internalization induced differentiation of CML stem cells to granulocyte macrophage progenitor (GMP)-like CML cells. Therefore, our results suggested that inhibiting dipeptide uptake contributes to development of new differentiation therapy to eradicate CML stem cells in vivo.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：ジペプチド がん幹細胞 抗がん剤抵抗性 オンコニュートリエント メタボローム トランスポーター

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

(1) がん細胞中には、少数ながら非常に多くのがん細胞を生み出す能力を有するがん幹細胞が存在する。大多数を占めるがん細胞は高い増殖活性を有するのに対して、その供給源であるがん幹細胞は正常幹細胞と同様に増殖活性が低く、低エネルギー状態や低栄養・低代謝環境でも生存を維持できる特殊な能力を有すると考えられる。通常の抗がん剤はがん細胞の増殖活性を標的とするが、増殖活性の低いがん幹細胞は治療することができない。その結果、がん幹細胞は抗がん剤に対して抵抗性を示し、残存したがん幹細胞は再発を引き起こす原因となる。従って、がんの再発を克服するうえで、がん幹細胞の生存維持に関わる特殊な代謝経路を解明し、このメカニズムを標的とする治療法を開発することは重要な課題となっている。

(2) このような抗がん剤治療後の再発が問題となっている腫瘍の1つとして慢性骨髄性白血病 Chronic myelogenous leukemia (CML)が知られている。CMLは造血幹細胞を発症起源とする幹細胞疾患であり、原因遺伝子としてフィラデルフィア染色体転座 t(9;22)(q34;q22)によって産生される BCR-ABL1 が報告されている。CML患者の治療薬として、ABL1のチロシンキナーゼ活性をターゲットとするチロシンキナーゼ阻害薬 (Tyrosine kinase inhibitor; TKI) メシル酸イマチニブ、ニロチニブ、ダサチニブ、ボスチニブ、ポナチニブが開発され、慢性期 CML患者の生命予後は著しく改善された。しかし、TKI治療のみでCMLは根治せず、再発が起こることが臨床上の重大な課題となっている。

## 2. 研究の目的

(1) CML細胞中には、大多数のCML細胞と、CML細胞を生み出すもとなるCMLのがん幹細胞 (CML幹細胞)が存在する。大多数を占めるCML細胞はTKIによって治療できるが、CML幹細胞はTKI抵抗性を示し、治療後、根絶を免れたCML幹細胞は再び多くのCML細胞を供給して再発を引き起す。従って、CMLの再発を克服するためにはCML幹細胞を根絶する新しい治療法の開発が必要とされている。

(2) 研究代表者はCMLのマウスモデルを用いて、代謝制御転写因子FOXOがCML幹細胞の維持に重要な役割を担うことを発見した (Naka *et al.*, *Nature* 2010)、さらに、CML幹細胞内の栄養素や代謝産物のメタボローム解析を行った結果、CML幹細胞は生存維持に必要な栄養素としてジペプチドを吸収していることを発見した (Naka *et al.*, *Nat Commun* 2015)。ジペプチドはアミノ酸が2分子結合した栄養物質であり、ジペプチドトランスポーター (Slc15A)によって小腸から体内へと吸収される。Slc15AはSlc15A1, Slc15A2, Slc15A3、並びにSlc15A4の4つのサブファミリーからなり、このうちCML幹細胞ではSlc15A2が高発現している。しかし、どのようなメカニズムによってジペプチドがCML幹細胞の生存を維持しているのか、そのメカニズムは明らかでない。

(3) 本研究では、このジペプチドの吸収を行なうジペプチドトランスポーター Slc15A2 のノックアウトマウスを用いて、ジペプチドを取込むことのできない *Slc15A2* 欠損 CML 幹細胞のマウスモデルを樹立し、生体内での CML 幹細胞の維持におけるジペプチド吸収の意義を明らかにすることを目的とした研究を実施した。

## 3. 研究の方法

(1) *Slc15A2* 欠損マウス由来 CML モデル ジペプチドの吸収を担う *Slc15A2* 遺伝子のノックアウトマウスは、米国シガン大学 David E. Smith 博士より供与を受けた。この *Slc15A2* のノックアウトマウスより骨髓単核細胞を取得し、抗 CD4 (L3T4)、抗 CD8 (53-6.7)、抗 B220 (RA3-6B2)、抗 TER119 (Ly-76)、抗 Gr-1 (RB6-8C5)、抗 Mac1 (M1/70)、抗 Sca-1 (E13-161.7)、並びに抗 c-Kit

(2B8) 抗体を用いて染色を行なった。これらの骨髄単核細胞から、セルソーター (FACS Aria III BD 社製)を用いて、マウス造血幹細胞(cKit<sup>+</sup>Scal<sup>+</sup>Linage<sup>-</sup>細胞; KSL 細胞)を含む細胞集団を純化した。この KSL 細胞にレトロウイルスベクターを用いて *BCR-ABL1-GFP* 遺伝子を導入した (遺伝子導入細胞は蛍光タンパク質 GFP によって選択することができる)。1 日間、サイトカイン含有無血清培地 (S-Clone, エーディア社製) で培養後、別途取得したマウス (C57BL/6) の骨髄単核細胞 (マウス 1 匹当たり  $5 \times 10^5$  細胞) と共に、放射線を照射 (9.5Gy) したレシピエントマウス (C57BL/6) に尾静脈注射により移植して、CML マウスモデルを樹立した。

(2) 連続移植による CML 幹細胞の自己複製能の解析 移植 12 日後、上記の CML マウスモデルの骨髄、並びに脾臓より CML 幹細胞 (GFP<sup>+</sup>KSL 細胞) を純化し、上述と同様に放射線照射を行なったマウスに二次移植を行なった。さらに、移植 12 日後、二次移植を行なった CML マウスモデルの骨髄、並びに脾臓より CML 幹細胞 (GFP<sup>+</sup>KSL 細胞) を純化し、放射線照射を行なったマウスに三次移植を行なって、生体内での CML 幹細胞の自己複製能を解析した。

(3) テトラサイクリン制御型 CML モデル 生体内環境における野生型マウス、並びに *Slc15A2* ノックアウトマウス由来 CML 幹細胞の代謝産物を解析するため、テトラサイクリン誘導型 CML マウスモデルを樹立した。テトラサイクリン誘導型 CML マウスモデルは、幹細胞特異的にテトラサイクリン制御性転写活性化因子 (tTA) を発現する *Scl-tTA* トランスジェニックマウス (ジャクソン研究所: #6209)と、tTA によって *BCR-ABL1* 遺伝子の発現を制御出来る *tetO-BCR-ABL1* トランスジェニックマウス (ジャクソン研究所: #6202) の 2 系統のトランスジェニックマウスからなる CML マウスモデルである。この *Scl-tTA*・*tetO-BCR-ABL1* ダブルトランスジェニックマウスはテトラサイクリン誘導体であるドキシサイクリン (Dox) (20mg/l; Sigma 社製) の投与により *BCR-ABL1* の発現を抑制し、Dox 投与を中止することで *BCR-ABL1* を発現させて CML の発症を誘導することができる制御型 CML マウスモデルとして広く用いられている。

上記のジペプチドトランスポーター *Slc15A2* 遺伝子のノックアウトマウスと *Scl-tTA*、および *tetO-BCR-ABL1* トランスジェニックマウスの交配を行ない、*Slc15A2* 欠損 *Scl-tTA*・*tetO-BCR-ABL1* マウスを樹立した。次いで、野生型、並びに *Slc15A2* 遺伝子欠損 *Scl-tTA*・*tetO-BCR-ABL1* トランスジェニックマウスの Dox 投与を中止し、5 週間後、CML マウスモデルを得た。

(4) *Slc15A2* 欠損 CML 幹細胞の純化 上記の CML の発症誘導を行なった野生型、並びに *Slc15A2* 欠損 *Scl-tTA*・*tetO-BCR-ABL1* トランスジェニックマウスから骨髄単核球を取得し、抗 CD4 (L3T4), 抗 CD8 (53-6.7), 抗 B220 (RA3-6B2), 抗 TER119 (Ly-76), 抗 Gr-1 (RB6-8C5), 抗 Mac1 (M1/70), 抗 Sca-1 (E13-161.7), 並びに抗 c-Kit (2B8) 抗体を用いて染色を行なった。これらの染色を行った骨髄単核細胞から、セルソーターを用いて、マウス CML 幹細胞を含む KSL 細胞の純化を行った。

また、未分化な長期 CML 幹細胞を得るため、上記抗体に加え、抗 CD150/SLAM (TC15-12F12.2), 抗 CD48 (HM48-1), 抗 CD135/Fik2 (A2F10) 抗体を用いて染色を行った。これらの染色を行った細胞から、セルソーターを用いて、CD150<sup>+</sup>CD48<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup>KSL 細胞を単離した。

(5) メタボローム解析 野生型マウス、並びに *Slc15A2* 遺伝子のノックアウトマウス由来の CML 幹細胞における代謝産物の比較を行うため、メタボローム解析を行った。上記の Dox

投与中止 5 週後の CML 発症マウスから、野生型、並びに *Slc15A2* 欠損 CML 幹細胞 (KSL 細胞)を純化した。単離した CML 幹細胞は-80°Cで凍結保存した。

メタボローム解析はメタボロン社 (米国, ノースカロライナ州)に委託した。メタボローム解析は超高速液体クロマトグラフィ/質量分析装置 (Ultrahigh Performance Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy: UPLC/MS/MS) Waters Acquity UPLC (Waters 社製) と Q-Exactive high resolution/accurate mass spectrometer (Thermo Scientific 社製) を用いて実施した。

(6) RNA シークエンス解析 野生型マウス、並びに *Slc15A2* 遺伝子のノックアウトマウス由来の長期 CML 幹細胞 (CD150<sup>+</sup>CD48<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup>KSL 細胞)を用いて、RNA シークエンス法により遺伝子発現を解析した。RNA シークエンス解析は北海道システムサイエンス社に委託した。Isogen 溶液より回収した RNA の品質は RIN (RNA integrity number)が 8.5 以上であることを確認した。ライブラリーを SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA kit for Sequencing (Takara Clontech)を用いて構築した。RNA シークエンスは HiSeq2000 (Illumina 社製)を用いて実施した。

#### 4. 研究成果

(1) *Slc15A2* 欠損マウス由来の造血幹細胞に対して、CML の原因遺伝子である *BCR-ABL1* をレトロウイルスを用いて導入し、CML マウスモデルを樹立した。この *Slc15A2* 欠損 CML マウスの白血病の発症能力を解析したが、野生型 CML マウスと比較して発症遅延は認められなかった。また、CML 幹細胞 (GFP<sup>+</sup>KSL 細胞)の頻度の解析を行なった結果、野生型、及び *Slc15A2* 欠損 CML マウスの間で CML 幹細胞集団の頻度に有意差は見られなかった。

次に、野生型、及び *Slc15A2* 欠損 CML 幹細胞の連続移植を行ない、生体内での自己複製能の解析を行なった。CML 幹細胞の二次移植を行なったマウスにおいて白血病発症能に有意差は認められなかった。しかし、三次移植を行なった結果、野生型 CML 幹細胞と比較して、*Slc15A2* 欠損 CML 幹細胞では白血病発症能力が低下していることが明らかとなった。従って、*Slc15A2* によるジペプチドの吸収は CML 幹細胞の長期間の自己複製能の維持に関わる可能性が示唆された。

(2) CML幹細胞における長期自己複製能の低下の原因となる分子機構を解明するため、野生型、及び*Slc15A2*欠損CML幹細胞における栄養素や代謝産物のメタボローム解析を行なった。このメタボローム解析では、生体内環境に近い条件で代謝産物の解析を行なうため、*Slc15A2*欠損マウスと、テトラサイクリン制御型CMLモデルマウス (*Slc15A2*-*tTA*・*tetO-BCRABL1*マウス)との交配を行なって、*Slc15A2*欠損CMLマウスモデルを樹立した。この*Slc15A2*欠損CML幹細胞(KSL細胞)におけるメタボローム解析を行なった。しかし、野生型CML幹細胞と比較して、*Slc15A2*欠損CML幹細胞において、栄養素となるアミノ酸やペプチド、並びにエネルギーの産生に関わるグルコース、ピルビン酸、乳酸など、自己複製能の低下の原因となる代謝産物の減少は認められなかった。

(3) *Slc15A2*欠損CML幹細胞における遺伝子発現の解析を行なった。野生型、並びに*Slc15A2*欠損CMLマウスモデルより長期CML幹細胞(CD150<sup>+</sup>CD48<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup>KSL細胞)を純化し、RNAシークエンスによって網羅的遺伝子発現解析を行なった。その結果、*Slc15A2*欠損CML幹細胞ではCD33を高発現していることが判明した。CD33は造血幹細胞では発現していないが、顆粒球マクロファージ前駆細胞(Granulocyte-macrophage progenitor: GMP)で発現していることが知られている。従って、*Slc15A2*遺伝子欠損によるジペプチド吸収の低下はCML幹細胞からGMP様CML前駆細胞への分化を促進している可能性が示唆された。

(4) 以上より, Slc15A2によるジペプチドの吸収はCML幹細胞の未分化性の維持に重要な役割を担う可能性が示された. 本研究成果を基盤として, Slc15A2阻害剤によるCML幹細胞の分化誘導療法の開発を行なう計画である. また, 抗CD33抗体薬は骨髄性白血病の治療薬として用いられている. 今後, Slc15A2阻害剤の投与によるCD33の発現誘導後, 抗CD33抗体薬との併用を行うことで, 新しいCML根治療法の開発へと発展させる計画である.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Park J.-H., Woo Y.-M., Youm E., Hamad N., Won H.-H., Naka K., Park E.-J., Park J.-H., Kim H.J., Kim S.-H., Kim H., Ahn J.-S., Sohn S.-K., Moon J.-H., Jung C.-W., Park S., Lipton J., Kimura S., Jong-Won Kim J.-W., Kim D., (2018) HMGCLL1 is a predictive biomarker for deep molecular response to imatinib therapy in chronic myeloid leukemia. **Leukemia** in press doi: 10.1038/s41375-018-0321-8. PMID: 30555164 (査読有り)
2. 仲 一仁, 慢性骨髄性白血病幹細胞, **血液フロンティア**, 28(6): 869-877, 2018. (査読なし)
3. Naka K., and Hirao A., Regulation of hematopoiesis and hematological disease by TGF- $\beta$  family signaling molecules. **Regulation of the Bioavailability of TGF- $\beta$  and TGF- $\beta$ -Related Proteins**, Derynck, R, Miyazono K. eds., CSHL Press (ISBN 978-1-621820-36-9): 2017. doi:10.1101/cshprespect.a027987. (査読有り)
4. Morita K., Suzuki K., Maeda S., Matsuo A., Mitsuda Y., Tokushige C., Kashiwazaki G., Taniguchi J., Maeda R., Noura M., Hirata M., Kataoka T., Yano A., Yamada Y., Kiyose H., Tokumasu M., Matsuo H., Tanaka S., Okuno Y., Muto M., Naka K., Ito K., Kitamura T., Kaneda Y., Liu P.P., Bando T., Adachi S., Sugiyama H., Kamikubo Y. (2017) Genetic regulation of the RUNX transcription factor family has antitumor effects. **J Clin Invest.**, 127(7):2815-2828. doi: 10.1172/JCI91788. (査読有り)
5. 仲 一仁,代謝を標的とした白血病幹細胞制御, **臨床血液**, 58(10): 1818-1827, 2017. (査読有り)

[学会発表] (計 15件)

1. 八幡崇, Abd Aziz Ibrahim, 仲 一仁, 宮田敏男, 安藤潔, PAI-1活性の阻害によるCML幹細胞の治療高感受性化, 第80回日本血液学会学術集会, 平成30年10月12-14日大阪市
2. 折井直子, 溝口出, 長谷川英哲, 義本隆之, 仲一仁, マウスモデルを用いたCML発症におけるIL-27の抗腫瘍効果, 第77回日本癌学会学術総会, 平成30年9月27-29日, 大阪市
3. Kazuhito Naka, and Seong-Jin Kim, Novel therapeutic strategy targeting nutrient supply specific to CML stem cells, The 9<sup>th</sup> Japanese Society of Hematology International Symposium, 平成30年7月26日, 京都市
4. 仲 一仁, 幹細胞の栄養代謝システムを標的とするがん再発治療法の開発, 大阪府商工労働部平成29年度創薬シーズ事業化コンペティション, 平成30年2月13日, 大阪市 (招待講演)
5. Dennis Dong Hwan Kim, Jong Ho Park, Young Min Woo, Emilia Moonkyung Youm, Mark Minden, Shinya Kimura, Hyeoung-Joon Kim, Chulwon Jung, Kazuhito Naka, and Jong-Won Kim, Statin enhances eradication of CML leukemic stem cell synergistically in combination with tyrosine

- kinase inhibitors through C-MYC pathway inhibition: *in vitro* and *vivo* evidences, American Society of Hematology annual Meeting and Exposition, 平成29年12月 9-12日, ジョージア州・アトランタ市 (米国)
6. 仲 一仁, CML幹細胞の新しい治療戦略, BMS CML Symposium 2017, 平成29年11月16日, 広島市 (招待講演)
  7. 仲 一仁, 特別教育講演「代謝を標的とした白血病幹細胞制御」, 第79回日本血液学会学術集会, 平成29年10月20-22日, 東京 (招待講演)
  8. Kazuhito Naka, Novel therapeutic strategy targeting nutrition specific to CML stem cells, Metabolon Seminar, 平成29年10月10日, 東京 (招待講演)
  9. 仲 一仁, Duolink<sup>®</sup> PLA技術を用いたCML幹細胞のシグナル伝達研究と前臨床試験への応用, 第76回日本癌学会学術総会, 平成29年9月28日, 横浜市 (招待講演)
  10. 仲 一仁, Discovery of novel therapeutics targeting CML stem cells by Duolink<sup>®</sup> technology, 平成29年8月30日, Scientist Round Table, 東京 (招待講演)
  11. 仲 一仁, CML幹細胞の新しい治療戦略, 第40回八幡平血液セミナー, 平成29年8月19日, 岩手県盛岡市 (招待講演)
  12. 仲 一仁, 幹細胞における新しいシグナル伝達研究, 第40回日本神経科学大会, 平成29年7月20日, 幕張メッセ国際会議場, 東京 (招待講演)
  13. 仲 一仁, CML幹細胞の新しい治療戦略, Hematology Seminar in KAGOSHIMA, 平成29年6月9日, 鹿児島市 (招待講演)
  14. Kazuhito Naka, Yoshihiro Takihara, Ichinohe Tatsuo, Eisuke Hida, Yukio Kato, Wataru Yasui, Seong-Jin Kim, Novel therapeutic strategy targeting nutrient supply of CML stem cells, Global Academic Programs 2017 Conference, 平成29年5月 9日, テキサス州・ヒューストン市 (米国)
  15. Kazuhito Naka, and Wataru Yasui, Novel therapeutic strategy targeting nutrient supply of CML stem cells, Special Session Translational Molecular Pathology Division of Pathology Meeting Series, 平成29年5月11日, テキサス州・ヒューストン市 (米国) (招待講演)

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○ 出願状況 (計1件)

名称: 新規アミノピラゾール誘導体

発明者: 澤 匡明, 森山 英樹, 大本 弘志 仲 一仁

権利者: カルナバイオサイエンス株式会社, 広島大学

種類: 特許

番号: 特願 2018-243575

出願年月日: 平成 30 年 12 月 26 日

国内外の別: 国内

○ 取得状況 (計0件)

〔その他〕 ホームページ等 該当なし