

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 24 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790906

研究課題名（和文）mTOR複合体1による正常造血幹細胞・白血病幹細胞制御機構の解明

研究課題名（英文）Research for regulatory mechanisms of normal hematopoietic stem cell and leukemia stem cell pool via mTOR Complex 1

研究代表者

星居 孝之（HOSHII TAKAYUKI）

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：20464042

研究成果の概要（和文）：

mTORC1 の異常な活性化は白血病化を促進するが、白血病幹細胞の維持における役割は明らかではない。本研究では白血病マウスモデルにおいて mTORC1 活性を特異的に欠損させることにより、分化した白血病細胞は細胞死の誘導により速やかに消失するが、未分化型白血病細胞は長期的に生存可能であることを見出した。mTORC1 の再活性化により、白血病が再発したことから、mTORC1 抑制下でも、白血病幹細胞は自己複製を行うことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Although dysregulation of mTOR complex 1 (mTORC1) promotes leukemogenesis, how mTORC1 affects established leukemia is unclear. We investigated the role of mTORC1 in mouse model of acute myeloid leukemia. Raptor deficiency significantly suppressed leukemia progression by causing apoptosis of differentiated, but not undifferentiated, leukemia cells. Strikingly, a subset of AML cells with undifferentiated phenotypes survived long-term in the absence of mTORC1 activity. Thus, AML cells lacking mTORC1 activity can self-renew as AML stem cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：幹細胞生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：幹細胞, シグナル伝達, mTOR 複合体

## 1. 研究開始当初の背景

mTOR はマクロライド系抗生物質ラパマイシンに対する標的分子であり、2つの異なる複合体（mTORC1 と mTORC2）を形成して機能するリン酸化酵素である。Raptor を含む複合体は mTORC1 と呼ばれ、PI3K/AKT シグナルや、アミノ酸シグナル伝達に関わる低分子量 G タ

ンパク質 Rag からのシグナルにより活性化し、成長因子や栄養環境からのシグナル伝達において重要である。造血幹細胞は骨髄内の微小環境下で維持され、細胞周期上では大半が休止状態にあり、mTORC1 は抑制状態にある。mTORC1 の上流抑制因子である PTEN や TSC1 の欠損マウスでは、mTORC1 の恒常的な活性化が

生じ、休止状態が解除されて、未分化性が失われることから、mTORC1 の活性化は幹細胞維持を障害することが報告されていた。一方で、幹細胞維持における生理的な mTORC1 活性の重要性については検討されていなかった。また mTORC1 は抗がん剤の標的としても注目されているが、造血幹細胞と類似した特徴を有する白血病幹細胞に対する mTORC1 抑制の効果は明らかではなかった。以上の背景から、生体内において遺伝学的に mTORC1 を欠損させることにより、幹細胞維持における生理的な mTORC1 の機能の解明を目指すという着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究は、生体内の生理的環境下において遺伝学的手法により mTORC1 を抑制し、造血幹細胞集団と白血病幹細胞集団の維持に対する、mTORC1 の役割を明らかにすることを目的としている。

## 3. 研究の方法

造血幹細胞や白血病幹細胞で mTORC1 活性のみを特異的に欠損させるため、mTORC1 に必須のコンポーネントである Raptor のコンディショナルノックアウト(Raptor<sup>flox</sup>)マウスを樹立した。この Raptor<sup>flox</sup> マウスをタモキシフェン投与下でのみ Cre を活性化出来る Rosa26-CreERT2 マウスと交配し、タモキシフェン投与により Raptor が欠損するマウス(Raptor<sup>flox/flox</sup>CreER)を樹立した。

正常造血細胞に対する影響の評価においては、8 週齢のマウスにタモキシフェンを腹腔内投与し、Raptor を欠損させた。

また、白血病幹細胞における役割を明らかにするために、Raptor<sup>flox</sup> マウスから造血幹・前駆細胞を採取し、MLL-AF9 融合遺伝子を導入した後にレシピエントマウスに移植し、急性骨髄性白血病 (AML) を発症させることにより、Raptor<sup>flox/flox</sup>CreER AML 細胞を得た。白血病発症マウスの骨髄細胞を採取し、新たに用意したレシピエントマウスに 2 次移植を行った後、タモキシフェンを投与することで、生体内の白血病幹細胞において Raptor を欠損させた(図 1)。

## 4. 研究成果

まず正常造血幹細胞における mTORC1 の重要性を明らかにするため、タモキシフェンを投与した Raptor<sup>flox/flox</sup>CreER マウスの骨髄細胞を解析した。Raptor を全身性に欠損したマウスは著しい体重減少を伴い、早期に死に至る重篤な表現型を示したことから、タモキシフェン投与後 10 日目に解析を行った。10 日目の段階において、表面抗原上では造血幹細胞集団 (CD34-Lin-c-Kit+Sca-1+) に大きな変化は認められなかった。同時期において、

顆粒球細胞や B 前駆細胞は顕著な減少が認められたが、骨髄球前駆細胞は増加傾向にあるなど、分化の進行した細胞種の生存において影響が顕著であることが明らかとなった。幹細胞を含む c-Kit+Sca-1+Lin-集団を採取し、コロニー形成能を評価したところ、著しいコロニー形成能の低下が観察された。一方で *in vivo* での造血幹前駆細胞集団の増殖や細胞死の状態に関しては、有意な差は認められなかったことから、幹細胞だけでなく、高い増殖能を示す骨髄球前駆細胞集団においても生理的な条件下での維持に高い mTORC1 活性は必須ではないことが示唆された。

また、骨髄球前駆細胞では、mTORC1 下流リン酸化標的分子の 1 つであるリボソーム蛋白質 S6 のリン酸化状態が維持されていることを見出した。直接的な mTORC1 の基質である S6Kinase のリン酸化は低下していたことから、mTORC1-S6Kinase とは異なる経路による S6 のリン酸化制御が細胞の生存・増殖に寄与していると考えられる。

MLL-AF9 融合遺伝子導入により発症させた AML モデルを用いた結果から、Raptor 欠損は AML マウスの生存期間を有意に延長することを見出した。MLL-AF9 遺伝子を導入した細胞は GFP で標識されるため、GFP を指標に白血病細胞を検出した結果では、末梢血中に白血病細胞はほとんど検出されず、遺伝学的な mTORC1 の抑制が白血病発症を抑制することが確認された。一方で骨髄中では末梢血中に比べて明らかに高い頻度で GFP 陽性の白血病細胞を検出し、残存する細胞集団が高い c-Kit の発現や低い分化マーカー Gr-1 の発現を示すことが明らかとなった(図 1)。形態的にも分葉核球の減少が認められるなど、未分化細胞が残存していると考えられた。全体的に Raptor 欠損 AML 細胞では Anxnin-V 陽性率が増加していたが、Gr-1 を発現する細胞ではより顕著であり、分化細胞集団の細胞死が mTORC1 抑制時の白血病発症抑制効果に関与することが強く示唆された。

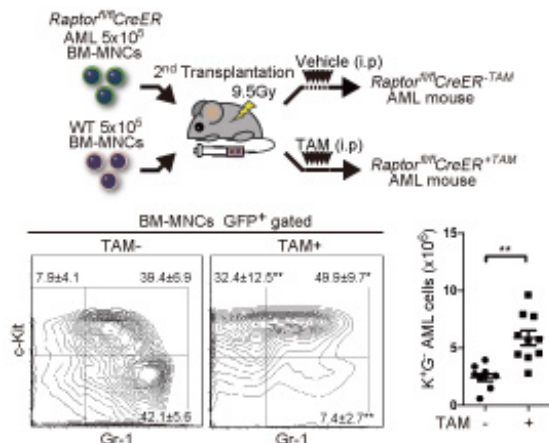


図 1

mTORC1 の下流リン酸化標的分子について解析すると、既知の下流分子 (S6Kinase, S6, 4E-BP1) のリン酸化は減少が認められた。一般的に mTORC1 の抑制は上流分子 AKT の脱抑制を引き起こすことが知られているが、AML 細胞でこのような傾向は認められなかった。mTORC1 は細胞成長を促進する機構として広く認知されていることから、Flow cytometry の FSC を指標に細胞サイズの解析を行ったが、細胞サイズの縮小化は観察されなかった。また細胞から得られる総蛋白量でも顕著な変化は認められず、蛋白合成の抑制が AML 細胞で生じていることを示す結果は得られなかった。脱リン酸化された 4E-BP1 は、eIF4E を足場として、mRNA の 5' Cap 構造に結合し、翻訳を阻害することが知られている。5' Cap 構造を模倣した m7GTP-sepharose beads を用いて Raptor 欠損 AML 細胞中の 4E-BP1 の結合能を評価した結果、Raptor 欠損下で脱リン酸化された 4E-BP1 は強固に eIF4E に結合していることが確認できた。一方で足場となる eIF4E も増加傾向にあり、eIF4E の増加を介して蛋白翻訳が維持されている可能性が示唆された。

In vivo で生存する Raptor 欠損 AML 細胞の幹細胞機能を、限界希釈移植法により評価した結果、生存していた白血病細胞からの再発能力は有意に減少していた。また Raptor 欠損 AML 細胞はコロニー形成能を有して居らず、in vitro の培養環境下ではアポトーシス誘導、細胞増殖能の低下が認められたことから、増殖や分化を促進するストレスに弱いことが示唆された。また、Raptor 欠損 AML 細胞を移植後に白血病を発症しなかったレシピエントマウスの骨髓細胞を解析した結果、一部で GFP 陽性の白血病細胞が検出された。この細胞の表面抗原は c-Kit 陽性 Gr-1 陰性であり、未分化様の状態で維持されていることが示唆された。この細胞では Raptor 蛋白は消失しており、アポトーシスも増加傾向にあったが、細胞周期は障害されておらず、自己複製を行い維持されていることが確認された。

次に長期間 in vivo において維持されていた Raptor 欠損細胞に Raptor 遺伝子を再導入し、生存細胞の白血病発症能力について評価を行った。レトロウイルスにより Human Raptor 遺伝子を再導入し、レシピエントマウスに移植した結果、レシピエントマウスは速やかに重篤な白血病を発症した。骨髓細胞を解析すると、表面抗原の特徴やコロニー形成能力から、Heterogenous な AML 細胞集団が再構築されており、Raptor 欠損 AML 細胞は長期間生体内において再発能力を有する未分化様状態で維持されていることが明らかとなった。

以上の結果から生理的な mTORC1 活性は、造血細胞において分化型細胞の生存に必須

である一方で、短期的には造血幹前駆細胞の増殖・生存を障害しないことが明らかとなった。また急性骨髄性白血病モデルから、白血病細胞においても mTORC1 活性に依存せずに生存可能な集団の存在を同定するに至った。この細胞集団は表面抗原の特徴や再発能力を有する点から、未分化な集団であると結論付けられ、mTORC1 の抑制が未分化細胞の維持に関わる可能性が示唆された。

今後は Raptor 欠損 AML 細胞を用いることにより、mTORC1 抑制により誘導される幹細胞維持機構もしくは、mTORC1 抑制と共役して働く幹細胞制御機構を明らかにできるのではないかと期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Hoshii T., Tadokoro Y., Naka K., (他 7 名), mTORC1 is essential for leukemia-propagation but not stem cell self-renewal, J Clin Invest. (2012), in press, 査読有 DOI: 10.1172/JCI62279.
- ② Ohtani H., Hoshii T., Fujii H., (他 3 名), mTORC1 in Intestinal CD11c+CD11b+ Dendritic Cells Regulates Intestinal Homeostasis by Promoting IL-10 Production., J Immunol., 188(2012), 4736-40, 査読有 DOI: 10.4049/jimmunol.1200069
- ③ Hoshii T., (他 11 名, 9 番目), PI3K-Akt-mTORC1-S6K1/2 axis controls Th17 differentiation by regulating Gfi-1 expression and nuclear translocation of RORgamma Cell Reports. 1(2012), 360-373, 査読有 DOI: 10.1016/j.celrep.2012.02.007
- ④ Hoshii T., (他 16 名, 7 番目), NKX2.2 suppresses self-renewal of glioma-initiating cells. Cancer Res, 71(2012), 1135-45, 査読有 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2304
- ⑤ Naka K, Hoshii T, Hirao A., Novel therapeutic approach to eradicate tyrosine kinase inhibitor resistant chronic myeloid leukemia stem cells, Cancer Sci, 101(2010), 1577-81, 査読有 DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01584.x

〔学会発表〕(計9件)

- ① 星居孝之：急性骨髄性白血病細胞の増殖と幹細胞維持における mTORC1 の機能解析、第16回造血器腫瘍研究会、平成24年1月28-29日、国立がん研究センター（東京都）
- ② 星居孝之：急性骨髄性白血病細胞の増殖と幹細胞維持における mTOR 複合体1 (mTORC1) の機能解析、新学術領域「細胞運命制御」若手の会、平成23年9月23-25日、軽井沢プリンスホテル（長野県）
- ③ 星居孝之：Roles of mTORC1 signaling in normal hematopoiesis and leukemogenesis、日米血液腫瘍セミナー、平成23年2月25-27日、湘南国際村センター（神奈川県）
- ④ 星居孝之：TSC-mTOR signaling controls the hematopoietic stem cell pool、日本分子生物学会第10回春季シンポジウム、平成22年6月7日、ホテル松島大観荘（宮城県）
- ⑤ 星居孝之：Strict regulation of mTOR signaling is essential for hematopoietic stem cell maintenance in vivo、第8回幹細胞シンポジウム、平成22年5月15日、淡路夢舞台（兵庫県）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

星居 孝之 (HOSHII TAKAYUKI)  
金沢大学・がん進展制御研究所・助教  
研究者番号：20464042

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし