

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 17 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591379

研究課題名(和文)造血器腫瘍における癌幹細胞特異的エネルギー代謝に関する基礎的研究

研究課題名(英文)The metabolome analysis of leukemic stem cell

研究代表者

大西 一功(Ohnisi, Kazunori)

浜松医科大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：80252170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：白血病前駆・幹細胞におけるメタボローム解析結果から白血病幹細胞特異的な代謝経路におけるヘキソキナーゼ(HK)、ホスホフルクトキナーゼ1,2(PFK1,2)、及びピルビン酸キナーゼ(PK)の活性化が明らかとなり、これらの特異的な阻害剤(HK阻害剤としてヘキソキナーゼII阻害剤(3-BP)、PFK1,2阻害剤としてPFKFB3阻害剤(3P0)、PK阻害剤としてAlkannin)が白血病幹細胞特異的な細胞増殖抑制効果を示すことが示唆されました。

研究成果の概要(英文)：We investigated the metabolome analysis in leukemic stem/progenitor cells. We found that hexokinase (HK), Phosphofructokinase 1 and 2 (PFK1 and 2) and Pyruvate Kinase (PK) were activated in leukemic stem/progenitor cells. We identified the inhibitors (3-BP, 3P0 and Alkannin) of these kinases as target molecules in leukemic stem/progenitor cells. We showed that these inhibitors inhibited the proliferation of leukemic stem/progenitor cells. We will perform the development of cancer stem cell-specific drugs for leukemia therapy.

研究分野：医歯薬学

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：白血病 メタボローム解析 代謝制御

## 1. 研究開始当初の背景

メタボロミクス研究において目覚ましい進歩を遂げてきているメタボローム解析技術の中で、キャピラリー電気泳動質量分析装置(CE-MS: capillary electrophoresis mass spectrometry)はエネルギー代謝に関連する一連の物質を一斉に同定・定量が可能であり、癌細胞内外の代謝変化の解析に最適である。癌のメタボローム研究において、マウスやラットの様々な組織切片や体液、ヒトの臨床検体、さらに培養細胞における細胞及び培養液などを用い、解糖系やペントースリン酸回路、クエン酸回路、尿素回路、アミノ酸及びポリアミン代謝、プリン体及びピリミジン代謝経路等エネルギー代謝に関与する物質群の一斉定量によるメタボローム解析も可能であり、メタボロームデータの比較解析により、比較検討したいサンプルから得られたメタボロームデータを網羅的に解析し、有意差のある物質のみを二次元マップに表示することが可能になった。これらの基盤技術の確立により、癌研究において、エネルギー代謝の側面から正常細胞と腫瘍細胞における相違を導き出すことが可能となり、治療薬開発へも応用が可能である。

白血病は、正常造血における造血幹細胞と同様にごく少数の白血病幹細胞が、自己複製と限定された分化を行うことにより構成されている。白血病化は、自己複製能を有する造血幹細胞に遺伝子変異が生ずる場合と、分化した造血前駆細胞が遺伝子変異により自己複製能を再獲得して白血病幹細胞システムを構築する場合がある。しかしながらいずれの場合も、白血病幹細胞の自己複製機構には不明な点が多い。白血病幹細胞は正常造血幹細胞と同様に骨髓微小環境を構成し、造血幹細胞ニッチと推定される骨髓両端の骨皮質と接する場所に存在し、大多数は細胞周期静止期にある。このことにより、抗癌剤治療によって増殖している大多数の白血病細胞

を死滅させても、正常造血幹細胞と同様に増殖速度が遅い細胞周期静止期にある白血病幹細胞は抗癌剤への感受性が低く、死滅せずに残存し、再発へと結びつくと考えられる。従って、白血病治療成績向上には、白血病幹細胞を標的としたより有効な治療薬、治療法の開発が求められている。近年、正常造血幹細胞と白血病幹細胞の間で、表面抗原や転写因子、シグナル伝達の差が明らかとなりつつあり、それに基づいて白血病幹細胞を直接標的とした治療法の開発も進みつつある。また、その自己複製能の違いを解明することにより、新たな標的治療薬の開発に寄与する可能性が推測される。

## 2. 研究の目的

我々は、CE-MS システムを用い、正常造血幹細胞と白血病幹細胞におけるエネルギー代謝を網羅的に解析し、両幹細胞が自己複製に必要なエネルギーをどのように捻出しているのか、両者の間でのエネルギー代謝で相違があるのかどうかを解析することを目的とした。このことは、正常造血幹細胞と白血病幹細胞の間で、表面抗原や転写因子、シグナル伝達の差に基づく治療法の開発のほかに、エネルギー代謝制御の面から新しい治療法、治療薬の開発に役立つと考えられる。

## 3. 研究の方法

### (1) CE-MSによるメタボローム解析

説明と同意を得た急性骨髄性白血病患者及び健常人の骨髓から単核球を分離し、フローサイトメトリにてALDH<sup>hi</sup>/CD34<sup>+</sup>陽性分画を更に分離することにより、白血病幹/前駆細胞と正常造血幹細胞/前駆細胞をそれぞれ採取し、CE-MSを用いて解糖系やペントースリン酸回路、クエン酸回路、尿素回路、アミノ酸及びポリアミン代謝、プリン体及びピリミジン代謝経路等エネルギー代謝に関与する物質群を網羅的にメタボローム解析した。

### (2) 各代謝経路における阻害剤による白血

## 病細胞の増殖抑制効果

HK阻害剤としてヘキソキナーゼII阻害剤(3-BP)、PFK1、2阻害剤としてPFKFB3阻害剤(3P0)、PK阻害剤としてAlkanninを使用しました。急性骨髄性白血病細胞株としてU937細胞とYRK2細胞を使用し、阻害剤を加えることによる細胞増殖抑制効果を細胞数カウントとMTTアッセイにて評価しました。また、白血病患者と健常人由来のALDH<sup>hi</sup>/CD34<sup>+</sup>陽性細胞を用い、阻害剤添加によるコロニー形成抑制効果をコロニーアッセイを用いて評価しました。

### (3) 阻害剤投与によるin vivo白血病細胞増殖抑制効果

白血病患者由来ALDH<sup>hi</sup>/CD34<sup>+</sup>細胞を、免疫不全マウス(NOD/SCID ノド<sup>+</sup>マウス)の背部へ移植することにより、白血病細胞腫瘍塊を形成させ、腫瘍形成部に各阻害剤を腫瘍内に注入することによる腫瘍体積の変化を評価しました。

## 4. 研究成果

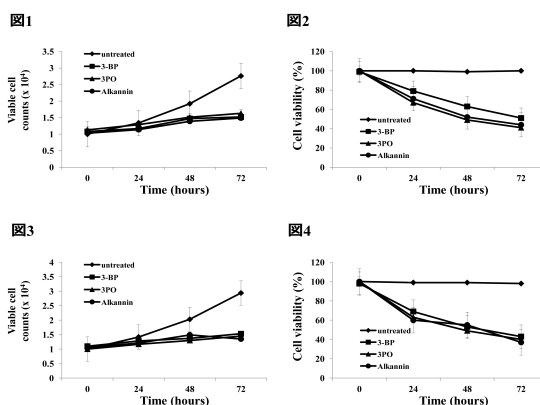
### (1) CE-MSによるメタボローム解析

白血病幹/前駆細胞として白血病患者由来のALDH<sup>hi</sup>/CD34<sup>+</sup>細胞をFACSを用いて分離し、CE-MSをもちいてエネルギー代謝に関する物質群の一斉定量によるメタボローム解析を行った。その中で、嫌氣的解糖系に関するヘキソキナーゼ(HK)、ホスホフルクトキナーゼ1、2(PFK1、2)、及びピルビン酸キナーゼ(PK)が白血病患者由来ALDH<sup>hi</sup>/CD34<sup>+</sup>細胞において正常造血幹/前駆細胞と比較して有意に活性化していることが示されました。

### (2) 各代謝経路における阻害剤による白血病細胞の増殖抑制効果

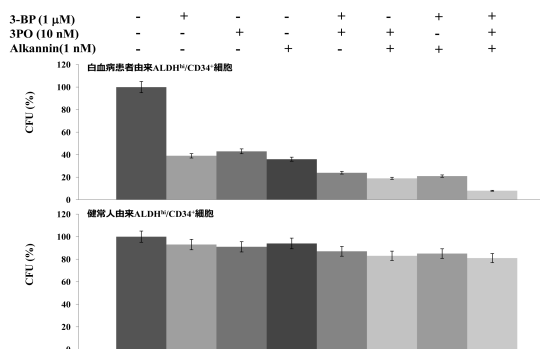
まず、HK阻害剤としてヘキソキナーゼII阻害剤(3-BP)、PFK1、2阻害剤としてPFKFB3阻害剤(3P0)、PK阻害剤としてAlkanninを各濃度で白血病細胞株U937細胞とYRK2細胞を処

理することにより、U937細胞(図1, 2)とYRK2細胞(図3, 4)はともに細胞数とMTTアッセイにおいて有意に白血病細胞数の増加を抑制しました。従って、3-BP(25 μM)、3P0(10 μM)及びAlkannin(10 μM)には白血病細胞の増殖抑制効果があることが示されました。



次に、3-BP、3P0及びAlkanninにより白血病患者由来ALDH<sup>hi</sup>/CD34<sup>+</sup>細胞の増殖が抑制されるかどうかをコロニーアッセイにて評価しました。

図5



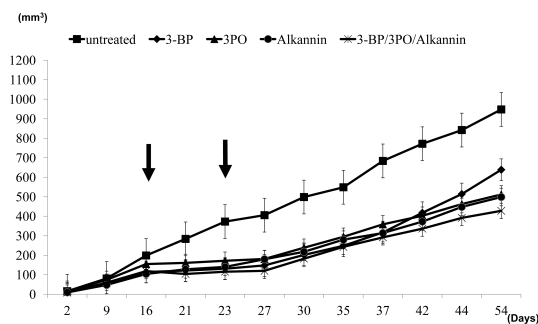
3-BP(25 μM)単独、3P0(10 μM)単独、Alkannin(10 μM)単独、3-BP(25 μM)/3P0(10 μM)併用、3-BP(25 μM)/Alkannin(10 μM)併用、3P0(10 μM)/Alkannin(10 μM)併用、及び3-BP(25 μM)/3P0(10 μM)/Alkannin(10 μM)併用群に分けて、各種の濃度で白血病由来ALDH<sup>hi</sup>/CD34<sup>+</sup>細胞のコロニー形成抑制能を評価したところ、どの薬剤の併用群でもコロニー形成が抑制され、3剤併用群が最も強力にコロニー形成を抑制しました(図5上)。一方、健常人由来ALDH<sup>hi</sup>/CD34<sup>+</sup>細胞のコロニー

形成はどの組み合わせにおいても優位な抑制効果は認められませんでした(図5下)。これらの結果から、HK、PFK1、2、PKの抑制が白血病癌幹細胞を根絶することが可能であることが示唆されました。

### (3) 阻害剤投与による in vivo 白血病細胞増殖抑制効果

フローサイトメトリー解析 ALDH<sup>hi</sup>/CD34<sup>+</sup>細胞を分離し、免疫不全マウス(NOD/SCID ノドマウス)へ移植。3週間後に生着を確認し、腫瘍形成部位に3-BP(25 μM)単独、3PO(10 μM)単独、Alkannin(10 μM)単独、及び3-BP(25 μM)/3PO(10 μM)/Alkannin(10 μM)併用群に分けて注射する(週1回を計2回)、その後の腫瘍体積の変化を3週間経過観察したところ、薬剤単独でも併用群でも有意な腫瘍形成抑制効果が認められた。中でも3-BP/3PO/Alkannin 併用群において最も腫瘍形成抑制効果が強く認められた(図6)。また、それぞれの薬剤投与群において有意な体重減少などの変化は認められませんでした。

図6



Individual tumor volumes were calculated as volume = [(width)<sup>2</sup> × length]/2 \* P<0.05

本研究結果から得られた白血病幹細胞における代謝経路ヘキソキナーゼ(HK)、ホスホフルクトキナーゼ1,2(PFK1,2)及びピルビン酸キナーゼ(PK)の活性化に基づき、これらの特異的な阻害剤(HK阻害剤としてヘキソキナーゼII阻害剤(3-BP)、PFK1,2阻害剤としてPFKFB3阻害剤(3PO)、PK阻害剤としてAlkannin)による白血病幹細胞特異的増殖制御を可能にする治療法を確立することを目指した基礎的研究を行いました。(1)白血

病由来 ALDH<sup>hi</sup>/CD34<sup>+</sup>細胞と健常人由来 ALDH<sup>hi</sup>/CD34<sup>+</sup>細胞の細胞障害評価:3-BP、3PO、Alkannin のより白血病由来 ALDH<sup>hi</sup>/CD34<sup>+</sup>細胞にのみ細胞増殖抑制効果が認められました。(2)白血病幹細胞の分離と白血病幹細胞移植実験:フローサイトメトリー解析により ALDH<sup>hi</sup>/CD34<sup>+</sup>細胞を示す表面性質をもつ白血病幹細胞を免疫不全マウス(NOD/SCID ノドマウス)の背部皮下へ移植することにより、白血病担癌マウスを作成し、3-BP、3PO、Alkannin の腫瘍部位への皮下投与により、腫瘍増殖抑制効果が認められました。(3)正常造血幹細胞への3-BP、3PO、Alkannin の細胞障害活性は白血病由来幹/前駆細胞に比べて軽度であった。

以上の結果より、3-BP、3PO、Alkannin 等の代謝酵素阻害剤は白血病幹細胞を特異的に根絶する可能性があると推測できました。(4)新規化合物の探索:今後、エネルギー代謝経路における標的酵素蛋白質を同定することにより、その蛋白質を特異的に阻害する物質、つまり、白血病幹細胞の代謝システムのキーとなる酵素を選択的に阻害する化合物を合成することで副作用がなく、治療効果の高い抗がん剤の実現を目指したいと考えています。

### 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16件)

Nakamura S, Yagyu T, Takemura T, Tan L, Nagata Y, Yokota D, Hirano I, Shibata K, Fujie M, Fujisawa S, Ohnishi K. Bcr-Abl-mediated Raf kinase inhibitor protein suppression promotes chronic myeloid leukemia progenitor cells proliferation. 1(3):54-66, 2011. 査読有 DOI: 10.4236/scd.2011.13006.  
Kimoto O, Sawada J, Shimoyama K, Suzuki D, Nakamura S, Hayashi H, Ogawa N.

Activation of the interferon pathway in peripheral blood of patients with Sjogren's syndrome. *J Rheumatol.* 38(2):310-316, 2011. 査読有

doi: 10.3899/jrheum.100486.

Nakamura S, Takemura T, Tan L, Nagata Y, Yokota D, Hirano I, Shigeno K, Shibata K, Fujie M, Fujisawa S, Ohnishi K. Small GTPase RAB45-mediated p38 activation in apoptosis of chronic myeloid leukemia progenitor cells. *Carcinogenesis.* 32(12):1758-1772, 2011. 査読有

doi: 10.1093/carcin/bgr205.

Nakamura S, Nagata Y, Tan L, Takemura T, Shibata K, Fujie M, Fujisawa S, Tanaka Y, Toda M, Makita R, Tsunekawa K, Yamada M, Yamaoka M, Yamashita J, Ohnishi K, Yamashita M. Transcriptional repression of Cdc25B by IER5 inhibits the proliferation of leukemic progenitor cells through NF-YB and p300 in acute myeloid leukemia. *PLoS One.* 2011;6(11):e28011, 2011. 査読有

doi: 10.1371/journal.pone.0028011.

Miwa M, Sakao Y, Ishigaki S, Ono M, Fujikura T, Yasuda H, Suzuki H, Kato A, Nagata Y, Shigeno K, Nakamura S, Ohnishi K, Fujigaki Y. Recovery of kidney function by rituximab-based therapy in a patient with Waldenström's macroglobulinemia-related nephropathy presenting cast nephropathy and interstitial lymphocytic infiltration. *Intern Med.* 51(13):1725-1730, 2012. 査読有

doi.org/10.2169/internalmedicine.51.7207.

Ogawa M, Nakamura S, Saito Y, Kosugi M, Magata Y. What can be seen by 18F-FDG PET in atherosclerosis imaging? The effect of foam cell formation on 18F-FDG uptake to macrophages in vitro. *J Nucl Med.* 53(1):55-58, 2012. 査読有

doi: 10.2967/jnumed.111.092866.

Natsume H, Shinmura K, Tao H, Igarashi H, Suzuki M, Nagura K, Goto M, Yamada H, Maeda M, Konno H, Nakamura S, Sugimura H. The CRKL gene encoding an adaptor protein is amplified, overexpressed, and a possible therapeutic target in gastric cancer. *J Transl Med.* 10:97, 2012. 査読有

doi: 10.1186/1479-5876-10-97.

Nakamura S, Yokota D, Tan L, Nagata Y, Takemura T, Hirano I, Shigeno K, Shibata K, Fujisawa S, Ohnishi K. Down-regulation of Thanatos-associated protein 11 by BCR-ABL promotes CML cell proliferation through c-Myc expression. *Int J Cancer.* 130(5):1046-1059, 2012. 査読有

doi: 10.1002/ijc.26065.

Nakamura S, Tan L, Nagata Y, Takemura T, Asahina A, Yokota D, Yagyu T, Shibata K, Fujisawa S, Ohnishi K. JmjC-domain containing histone demethylase 1B-mediated p15(Ink4b) suppression promotes the proliferation of leukemic progenitor cells through modulation of cell cycle progression in acute myeloid leukemia. *Mol Carcinog.* 52(1):57-69, 2013. 査読有

doi: 10.1002/mc.20878.

Fujita H, Asou N, Iwanaga M, Hyo R, Nomura S, Kiyoi H, Okada M, Inaguma Y, Matsuda M, Yamauchi T, Ohtake S, Izumi T, Nakaseko C, Ishigatsubo Y, Shinagawa K, Takeshita A, Miyazaki Y, Ohnishi K, Miyawaki S, Naoe T; Japan Adult Leukemia Study Group. Role of hematopoietic stem cell transplantation for relapsed acute promyelocytic leukemia: a retrospective analysis of JALSG-APL97. *Cancer Sci.* 104(10):1339-1345, 2013. 査読有

doi: 10.1111/cas.12230.

Naito T, Tashiro M, Ishida T, Ohnishi K, Kawakami J. Cancer cachexia raises the plasma concentration of oxymorphone through the reduction of CYP3A but not CYP2D6 in oxycodone-treated patients. J Clin Pharmacol. 53(8):812-818, 2013. 査読有  
doi: 10.1002/jcph.112.

Ohnishi K. The price of drugs for chronic myeloid leukemia (CML) is a reflection of the unsustainable prices of cancer drugs: from the perspective of a large group of CML experts. Experts in Chronic Myeloid Leukemia. Blood. 121(22):4439-4442, 2013. 査読有  
doi: 10.1182/blood-2013-03-490003.

[学会発表](計7件)

Satoki Nakamura, Tomonari Takemura, Daisuke Yokota, Isao Hirano, Takaaki Ono, Kazuyuki Shigeno, Kiyoshi Shibata, Shinya Fujisawa, Kazunori Ohnishi. The FOXM1 transcriptional factor promotes the proliferation of leukemia cells through modulation of cell cycle progression in acute myeloid leukemia. 第70回日本癌学会学術総会 2011年10月3日~10月5日、名古屋

中村 悟己、竹村 兼成、横田 大輔、平野 功、小野 孝明、重野 一幸、藤澤 紳哉、大西 一功。 Induction of IER5 inhibits leukemia cell proliferation through modulation of cell cycle progression. 第73回日本血液学会学術集会 2011年10月14日~16日、名古屋

竹村 兼成、中村 悟己、横田 大輔、平野 功、小野 孝明、重野 一幸、藤澤 紳哉、大西 一功。 Roles of RAB45-mediated p38 activation in apoptosis of CML progenitor cells. 第73回日本血液学会学術集会 2011年10月14

日~16日、名古屋

Lin Tan, Satoki Nakamura, Aya Asahina, Tomonari Takemura, Yasuyuki Nagata, Daisuke Yokota, Takaaki Ono, Kazuyuki Shigeno, Shinya Fujisawa, Kazunori Ohnishi. Inhibition of JHDM1B expression suppresses the proliferation of leukemia cells through the cell cycle arrest. 第73回日本血液学会学術集会 2011年10月14日~16日、名古屋

Satoki Nakamura, Kazuya Shinmura, Haruhiko Sugimura. Molecular targets of the novel synthesized phospho sugar derivatives, TMPP, and the mechanism of its antileukemic activity. 第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19日~21日、札幌

Satoki Nakamura, Haruhiko Sugimura. Molecular targets of the novel synthesized phospho sugar derivatives, TMPP, and the mechanism of its antileukemic activity. 第15回国際個別化医療学会、2012年11月10日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大西 一功 (OHNISHI Kazunori)  
浜松医科大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号：80252170

(2) 研究分担者

藤江 三千男 (FUJIE Michio)  
浜松医科大学・実験実習機器センター・技術専門職員  
研究者番号：90397373

(3) 研究分担者

柴田 清 (SHIBATA Kiyoshi)  
浜松医科大学・実験実習機器センター・技術専門職員  
研究者番号：80397372

(3) 研究分担者

中村 悟己 (NAKAMURA Satoki)  
浜松医科大学・医学部・特任研究員  
研究者番号：20377740