

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790376

研究課題名（和文） 白血病幹細胞のCD44による代謝制御メカニズムの解析

研究課題名（英文） Analysis of CD44 role in metabolism of leukemic stem cell

研究代表者

杉原 英志 (EIJI SUGIHARA)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：50464996

研究成果の概要（和文）：白血病幹細胞は腫瘍全体の維持や再発に寄与することが分かってきているが、その分子機構の多くは不明である。本研究にて CD44 欠損マウス由来の骨髄細胞から B-ALL（B 細胞急性リンパ性白血病）及び CML（慢性骨髄性白血病）モデルを作製し解析したところ、CD44 が両モデルにおいて白血病幹細胞の維持に重要な役割を果たしていることを明らかにした。また CD44 を欠損した白血病幹細胞は野生型由来の白血病幹細胞と比較して酸化ストレス（ROS）が優位に高いこと、ROS に感受性が高いことが分かった。このことから CD44 が白血病幹細胞における ROS の代謝や生存に重要な役割を担っていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Leukemic stem cells (LSCs) have been reported to be implicated in the maintenance of overall tumor and tumor recurrence. However the mechanisms of these events are largely unknown. In this study, we established B-ALL and CML mice models derived from bone marrow cells of wild-type or *CD44* gene knock-out mice. We found that CD44 has an important role in the maintenance of both models of LSCs. Furthermore, *CD44*-null LSCs showed higher level of reactive oxygen species (ROS) and higher sensitivity to ROS than wild-type derived LSCs. Therefore, CD44 might play crucial roles in the metabolism of ROS and cell survival in LSCs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：白血病幹細胞, CD44, 酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

造血器腫瘍におけるがん幹細胞である白血病幹細胞は 1997 年に初めてヒト急性骨髄性白血病（AML）において同定され、その後他の造血器腫瘍においても相次いで白血病幹細胞が同定されてきた。白血病幹細胞は白血病細胞全体の頂点に立ち、自己複製を行いつつ、子孫白血病細胞を産生することで腫瘍造

成能を持つと考えられている。また白血病幹細胞は既存の抗がん剤に耐性を持つことで慢性骨髄性白血病（CML）や AML で再発の原因になっていることが指摘されていた。近年、マウスを用いた造血器腫瘍モデルによって白血病幹細胞の性状解析が進み、自己複製や静止期の制御における分子機構が明らかになってきた。また抗がん剤への耐性機構と

しては ABCG2 などの薬剤トランスポーターや細胞周期の休眠状態が知られているが、細胞内における代謝制御機構はほとんど不明であった。

CD44 は胃がんや乳がんを始め多くのがん幹細胞のマーカーであり、一般的に膜タンパク質として主にヒアルロン酸に結合することでがん細胞の浸潤や転移に関わることが報告されていた。また申請者の研究室では上皮性がん細胞特異的な CD44 のバリエーション分子がシスチントランスポーターである xCT と会合することで還元型グルタチオン合成を促し、上皮性がん細胞に酸化ストレス（活性酸素種：ROS）に耐性をもたらすことを報告している (Ishimoto T et al, Cancer Cell, 2011)。造血器腫瘍において CD44 は CML や AML の骨髄ニッチへのホーミングに重要な役割を果たすことが明らかにされていた (Jin L et al, Nat Med, 2006; Krause DS et al, Nat Med, 2006) が、代謝制御機構にどのように関与するのか全く不明であった。

## 2. 研究の目的

骨髄移植法を改良した *ex vivo* の手法を用いて *CD44* を欠損したマウス白血病モデルを構築し、白血病幹細胞を単離・解析することで *CD44* が白血病幹細胞の維持機構に関与するのか明らかにする。またヒト細胞株の解析も加え、増殖や ROS 代謝の制御機構に *CD44* が関与するのかどうか明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 白血病 *ex vivo* モデルの構築

野生型及び *CD44* 遺伝子ノックアウトマウス骨髄細胞より造血幹細胞・前駆細胞を単離し、白血病誘導因子として *Myc* や *BCR-ABL* 遺伝子をレトロウイルスベクターにて導入した。その後、致死量あるいは半致死量放射線を照射したマウスへ尾静脈より移植を行った。移植されたマウスは定期的に採血を行い、末梢血の細胞における GFP 陽性の細胞（レトロウイルスベクターは目的遺伝子と GFP を発現する）の増減を解析することで白血病発症を確認した。白血病の発症が認められたマウスの骨髄及び脾臓より GFP 陽性細胞を回収し、一次移植同様に放射線を照射したマウスへ移植を行った。

### (2) マウス B-ALL 初代培養細胞及びヒト B-ALL 細胞株の解析

WT 及び *CD44* KO 由来の B-ALL 細胞を解析するため、B-ALL を発症したマウスより白血病細胞を単離し、初代培養を行った。そ

の後 ROS の量を測定するため、CellROX deep red 及び MitoSOX を用いて検討を行った。

ヒト B-ALL 細胞株 (BALL-1, NALM-6) にて *CD44* の発現を抑制するため、レンチウイルスベクターにて *CD44* に対する shRNA を導入した。その後、通常酸素下及び低酸素下で増殖率を測定した。また過酸化水素を加えた後に細胞死測定を行った。

### (3) B-ALL 薬剤耐性細胞の解析

B-ALL を発症したマウスへ白血病標準治療薬の一つである Ara-C (Cytarabine) を投与し、末梢血及び骨髄細胞数を経時的に測定した。また Flow cytometry にて薬剤耐性細胞を解析した。さらに Microarray 及び RT-PCR 解析にて遺伝子発現の検討を行った。

## 4. 研究成果

(1) B 細胞性急性リンパ性白血病 (B-ALL) における *CD44* の役割を明らかにするため、*CD44* 遺伝子ノックアウト (*CD44* KO) 及び野生型 (WT) マウスから骨髄未熟細胞を採取し、*N-Myc* 遺伝子を発現させた後、移植を行った。その結果、WT 及び *CD44* KO 由来どちらの骨髄細胞からも B-ALL が発症し、発症率・生存期間ともに有意な差は生じなかった。次に WT 及び *CD44* KO 由来の B-ALL を 2 次移植したところ、*CD44* KO 由来の腫瘍において有意に生存期間が延長することを見出した (図 1A)。この結果から B-ALL 白血病幹細胞の維持に *CD44* が重要な役割を果たしていることが示唆された。次に CML における *CD44* の役割を明らかにするため、WT 及び *CD44* KO マウス由来の造血幹細胞に *BCR-ABL* 遺伝子を導入し移植を行った。その結果、WT 由来ではほぼ全てのマウスが CML を発症した一方、*CD44* KO 由来ではほとんど発症しないことが分かった (図 1B)。*CD44* は CML の骨髄ニッチへのホーミングに関与することが報告されているが、ホーミング時の血中酸化ストレスを回避する機構も *CD44* が担っている可能性も考えられた。

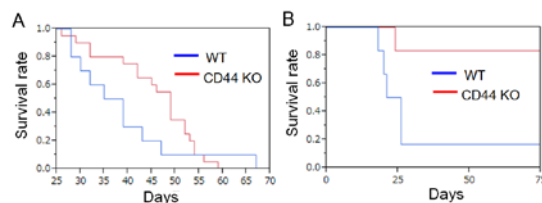


図1. Survival curves of mouse leukemia models  
A, 2nd transplantation of B-ALL model.  
B, 1st transplantation of CML model.

(2) 白血病幹細胞における ROS 代謝制御への CD44 の役割を調べるため、WT 由来及び CD44 KO 由来の B-ALL 細胞を骨髄より採取し培養した。マウス B-ALL モデルにおいては造血幹細胞マーカーではなく B 細胞マーカー陽性集団に白血病幹細胞がかなり多く存在することを報告している (Sugihara E. et al, *Oncogene* 2012) ため、これらの初代培養細胞のマーカー解析を行ったところ、全て B 細胞マーカー陽性であり、初代培養細胞はほぼ白血病幹細胞で占められていることがわかった。そこで WT 及び CD44 KO 由来の細胞における細胞内 ROS 量を測定したところ CD44 KO 由来の方が優位に ROS レベルが高いことが分かった (図 2A)。さらにミトコンドリアにおける ROS 量を測定したところ、こちらも同様に CD44 KO 由来の方が優位に ROS レベルが高いことが分かった (図 2B)。このことから CD44 は B-ALL 白血病幹細胞の ROS 代謝制御に重要な役割を果たしていることが示唆された。

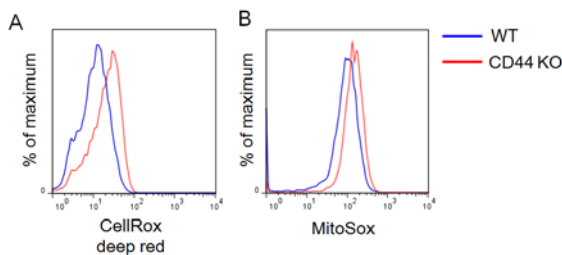


図2. ROS levels in WT or CD44 KO-derived B-ALL cells

(3) ヒト B-ALL 細胞株にて shRNA による CD44 の発現抑制の検討を行ったところ、通常酸素濃度下では増殖に影響はなかったが、低酸素濃度下では優位に増殖が低下することが分かった (図 3)。さらに活性酸素として過酸化水素を培養液に加えたところ、CD44 を発現抑制した細胞において優位に細胞死が生じることがわかった。これらの結果からヒト B-ALL 細胞においても CD44 は ROS や低酸素下における代謝制御に重要な役割を果たしていることが示唆された。

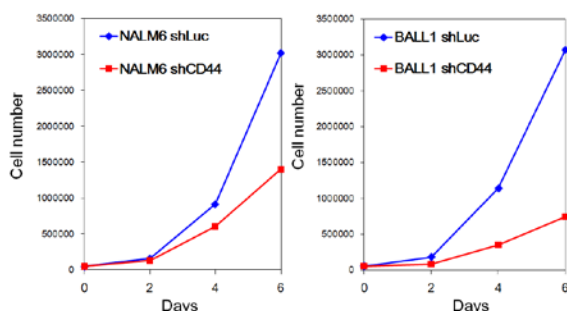


図3. Cell growth in shCD44 or shLuc (control) B-ALL cells

(4) マウス B-ALL の薬剤抵抗性細胞を同定し、白血病幹細胞であるのか検証するため、B-ALL 発症マウスに Ara-C を投与した結果、骨髄に残存する細胞を同定した。この同定した残存細胞の 2 次移植を行ったところ、非常に少数の細胞からでも腫瘍再構築能を持っていることがわかり、この細胞が白血病幹細胞様の細胞であることを明らかにした (論文準備中)。この細胞で特異的に発現している遺伝子をマイクロアレイや RT-PCR 法にて調べたところ、PKM2 など糖代謝に関わる遺伝子が高発現していることが分かった。つまり白血病幹細胞は糖代謝優位であり、酸化ストレスで生じる酸化ストレス量を減弱させていることが示唆された。

以上の結果より CD44 が白血病幹細胞の生存・維持に重要であることが示された。特に ROS を制御する分子機構に CD44 の関与が強く示唆され、白血病幹細胞を攻撃する分子治療薬において非常に有用な標的分子であることが分かった。今後 CD44 が分子レベルでどのように ROS の代謝制御に関与するのか研究を進めていきたいと考えている。

## 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]

英文論文 (計 14 件) 全件査読有

- Atsumi Y, Inase A, Osawa T, Sugihara E, Sakasai R, Fujimori H, Teraoka H, Saya H, Kanno M, Tashiro F, Nakagama H, Masutani M, Yoshioka KI. Arf/p53 module, which induces apoptosis, downregulates histone H2AX to allow normal cells to survive in the presence of anti-cancer drugs. *J Biol Chem.* 2013 (in press)
- Ishikawa T, Shimizu T, Ueki A, Yamaguchi S, Onishi N, Sugihara E, Kuninaka S, Miyamoto T, Morioka H, Nakayama R, Kobayashi E, Toyama Y, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Yamaguchi R, Miyano S and Saya H: Twist2 functions as a tumor suppressor in murine osteosarcoma cells. *Cancer Sci* 2013. doi: 10.1111/cas.12163. (in press)
- Osawa T, Atsumi Y, Sugihara E, Saya H, Kanno M, Tashiro F, Masutani M, Yoshioka KI: Arf and p53 act as guardians of a quiescent cellular state by protecting against immortalization

- of cells with stable genomes. *Biochem Biophys Res Commun* 2013 Mar 1;432(1):34-39. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.01.091.
4. Osuka S, Sampetean O, Shimizu T, Saga I, Onishi N, Sugihara E, Okubo J, Fujita S, Takano S, Matsumura A, Saya H: IGF1 Receptor Signaling Regulates Adaptive Radioprotection in Glioma Stem Cells. *Stem Cells* 2013 Apr;31(4):627-640. doi: 10.1002/stem.1328.
  5. Yoshikawa M, Tsuchihashi K, Ishimoto T, Yae T, Motohara T, Sugihara E, Onishi N, Masuko T, Yoshizawa K, Kawashiri S, Mukai M, Asoda S, Kawana H, Nakagawa T, Saya H, Nagano O: xCT inhibition depletes CD44v-expressing tumor cells that are resistant to EGFR-targeted therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2013 Mar 15;73(6):1855-1866. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3609-T.
  6. Sugihara E, Saya H: Complexity of cancer stem cell (Review article). *Int J Cancer* 2013, 132(6):1249-1259, 2013, doi: 10.1002/ijc.27961
  7. Ueki A, Shimizu T, Masuda K, Yamaguchi SI, Ishikawa T, Sugihara E, Onishi N, Kuninaka S, Miyoshi K, Muto A, Toyama Y, Banno K, Aoki D, Saya H: Up-regulation of imp3 confers in vivo tumorigenicity on murine osteosarcoma cells. *Plos One* 7(11):e50621, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0050621.
  8. Sugihara E, Shimizu T, Kojima K, Onishi N, Kai K, Ishizawa J, Nagata K, Hashimoto N, Honda H, Kanno M, Miwa M, Okada S, Andreeff M and Saya H: Ink4a and Arf are crucial factors in the determination of the cell of origin and the therapeutic sensitivity of Myc-induced mouse lymphoid tumor. *Oncogene* 2012, Jun 7;31(23):2849-2861. doi: 10.1038/onc.2011.462.
  9. Arima Y, Hayashi N, Hayashi H, Sasaki M, Kai K, Sugihara E, Abe E, Yoshida A, Mikami S, Nakamura S and Saya H: Loss of p16 expression is associated with the stem cell characteristics of surface markers and therapeutic resistance in estrogen receptor-negative breast cancer. *Int J Cancer* 2012 Jun 1;130(11):2568-79. doi: 10.1002/ijc.26271.
  10. Tamada M, Nagano O, Tateyama S, Ohmura M, Yae T, Ishimoto T, Sugihara E, Onishi N, Yamamoto T, Yanagawa H, Suematsu M and Saya H: Modulation of glucose metabolism by CD44 contributes to antioxidant status and drug resistance in cancer cells. *Cancer Res* 2012 Mar 15;72(6):1438-1448. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3024.
  11. Shimizu T, Ishikawa T, Iwai S, Ueki A, Sugihara E, Onishi N, Kuninaka S, Miyamoto T, Toyama Y, Ijiri H, Mori H, Matsuzaki Y, Yaguchi T, Nishio H, Kawakami Y, Ikeda Y and Saya H: Fibroblast growth factor-2 (Fgf2) is an important factor that maintains cellular immaturity and contributes to aggressiveness of osteosarcoma. *Mol Cancer Res* 2012 Mar;10(3):454-468. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0347.
  12. Sampetean O, Saga I, Nakanishi M, Sugihara E, Fukaya R, Onishi N, Osuka A, Akahata M, Kai K, Sugimoto H, Hirao A, and Saya H: Invasion precedes tumor mass formation in a malignant brain tumor model of genetically modified neural stem cells. *Neoplasia* 2011 Sep;13(9):784-791.
  13. Kobayashi Y, Shimizu T, Naoe H, Ueki A, Ishizawa J, Chiyoda T, Onishi N, Sugihara E, Nagano O, Banno K, Kuninaka S, Aoki D, Saya H. Establishment of a Choriocarcinoma Model from Immortalized Normal Extravillous Trophoblast Cells Transduced with HRASV12. *Am J Pathol.* 2011 Sep;179(3):1471-82. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.05.019.
  14. Ishizawa J, Kuninaka S, Sugihara E, Naoe H, Kobayashi Y, Chiyoda T, Ueki A, Araki K, Yamamura KI, Matsuzaki Y, Nakajima H, Ikeda Y, Okamoto S, Saya H. The cell cycle regulator Cdh1 controls the pool sizes of

hematopoietic stem cells and mature lineage progenitors by protecting from genotoxic stress. *Cancer Sci*, 2011 May;102(5):967-74. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01884.x.

邦文総説 (計 1 件) 査読無

杉原英志, 佐谷秀行: 癌幹細胞研究の現状と将来. 血液内科, 64: 120-126, 2012.

[学会発表]

国際学会 (計 2 件)

- (1) Sugihara E, Saya H.: Tumor cells derived from different cells of origin show distinct therapeutic sensitivities in Myc-induced lymphoid tumor model. Annual meeting of American Society for Cell Biology (ASCB), 12/15/2012 -12/19/2012, San Francisco, USA.
- (2) Sugihara E, Kojima K, Ishizawa J, Micheal A, Saya H.: Arf and Ink4a are critical factors determining the cell of origin and therapeutic of Myc-induced mouse lymphoid tumor. The 53rd annual meeting of American Society of Hematology (ASH), 12/9/2011-12/14/2011, San Diego, USA.

国内学会 (計 2 件)

- (1) Sugihara E, Hashimoto N, Saya H.: Identification and characterization of cancer stem like chemotherapeutic resistant cells in mouse pre-B ALL model. 第 71 回日本癌学会総会、2012 年 09 月 19 日～2012 年 09 月 21 日、札幌
- (2) Sugihara E、Shimizu T, Ishizawa J, Saya H: Ink4a and Arf determine the cell of origin and therapeutic sensitivity of Myc-induced lymphoid tumor, 第 73 回日本血液学会学術集会、2011 年 10 月 14 日～2011 年 10 月～16 日、名古屋

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.genereg.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉原 英志 (EIJI SUGIHARA)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号 : 50464996