

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790967

研究課題名(和文)mTOR複合体1による白血病幹細胞自己複製維持メカニズムの解明

研究課題名(英文)Analysis for the role of mTORC1 in the self-renew of leukemia stem cell

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：mTORは、二つの複合体(mTORC1とmTORC2)を形成して機能するキナーゼである。これまでの成果から、mTORC1欠損下で分化AML細胞の産出と白血病発症は抑制されるが、AML幹細胞は自己複製し、生体内で維持されることを明らかにしていた。本研究では、mTORC1欠損AML細胞を用いて、自己複製を司る分子の同定を主題として研究を展開し、新規のmTORC1下流候補分子やAML幹細胞関連分子を同定した。また、mTORC2-FOXO経路の生体内AML幹細胞における役割を解明する研究基盤を構築した。今後の研究によって白血病幹細胞の新たな治療標的となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Mammalian target of rapamycin (mTOR) is identified as a target protein of immunosuppressive agent rapamycin, and this protein kinase is known to form two different complexes, named mTORC1 and mTORC2. In past years, we reported that mTORC1 inactivation, by Raptor deficiency, apparently suppressed the acute myeloid leukemia (AML) cell propagation and differentiation, but some AML cells with stem cell properties survived and proliferated in vivo. To identify the molecular mechanisms to maintain the stem cell like population after mTORC1 inactivation, we performed a quantitative phosphoproteomics study and cell surface proteomics study. We identified mTORC1 downstream candidate genes from phosphoproteomics study, and AML-stem cell associated cell surface molecules from cell surface proteomics study. The findings will provide the new therapeutic targets for drug-resistant 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

キーワード：mTOR 自己複製

1. 研究開始当初の背景

Mammalian target of rapamycin (mTOR)は、抗生物質・免疫抑制剤ラパマイシンの標的として同定されたキナーゼであり、二つの複合体を形成して機能する。mTOR 複合体 1 (mTORC1)は様々な細胞外シグナルにより活性化し、蛋白翻訳・リボソーム生合成などを介して細胞成長を司るほか、オートファジーやミトコンドリア生合成を調節している。近年の精力的な研究により、免疫や細胞増殖、代謝や個体老化など、多くの生命現象に関わることが知られるようになり、**生命科学分野の中で最も注目されているシグナル伝達分子の1つ**である。造血幹細胞や精原前駆細胞の維持は細胞周期上の休止状態(G0期)で行われ、mTORC1の抑制が必須であることが報告されていた(Yilmaz OH et al., 2006, Nature; Chen C et al., 2008, JEM; Hobbs RM et al., 2009, Cell)。さらに、精原前駆細胞ではmTORC1抑制により、幹細胞維持に必要なGDNF受容体の発現が増加することも報告されている(Hobbs RM, 2009, Cell)。他の幹細胞ではmTORC1抑制の能動的な役割は不明であり、mTORC1抑制の生理的意義については国内・国外共に検討されていない状況にあった。

mTORC1活性化は、リンパ腫・骨髄増殖疾患・白血病の原因となることが報告されており、mTORC1は有効な薬剤標的である(Wendel HG et al., 2004 Nature; Yilmaz OH et al., 2006, Nature)。一方で、第2相臨床試験から、**mTORC1阻害剤であるラパマイシン誘導体が再発性急性骨髄性白血病に対しては奏効しないことが報告されており、抵抗性メカニズムの解明が必要**である(Yee KW et al., 2006, Clin Cancer Res; Rizzieri DA et al., 2008, Clin Cancer Res)。慢性骨髄性白血病(CML)では、正常の造血幹細胞と類似した特徴を有する白血病幹細胞が存在し、mTORC1シグナルの抑制が認められている。急性骨髄性白血病(AML)においても高い再発能力を有する白血病幹細胞が存在するが、正常造血幹細胞やCML幹細胞とは異なり、活発に増殖している。このようなAML幹細胞において、mTORC1シグナル抑制時の変化を明らかにすることは、ラパマイシン抵抗性メカニズムの解明と、新たな治療標的の同定に必須である。

私たちは造血システムにおける生理的なmTORC1機能の解析を目的とし、mTORC1に必須のサブユニットであるRaptorのfloxマウスを作製した。さらに、MLL-AF9融合遺伝子導入により樹立した急性骨髄性白血病(AML)マウスモデルを用いた解析から、mTORC1欠損下で分化AML細胞の産出と白血病発症は抑制されるが、AML幹細胞は自己複製し、生体内で維持されることを明らかにした。以上の研究成果から、mTORC1欠損AML幹細胞の生存・自己複製のメカニズムを解析することによって、mTORC1抑制による幹細胞維持機構が解明できるのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、mTORC1欠損AML細胞を用いて、mTORC1抑制によって誘導され、自己複製を司る分子メカニズムを同定することを主題として研究を展開した。白血病細胞でmTORC1抑制時に拮抗して働く幹細胞維持機構を解明することによって、白血病幹細胞の自己複製制御分子を明らかにし、新たな薬剤標的を同定することを目標とした。

3. 研究の方法

申請者は(1)プロテオーム解析、(2)FOXOの機能解析、(3)mTORC2の機能解析、の主に3つの研究を柱として自己複製機構の同定を試みた。まずmTORC1がリン酸化酵素であることから、下流シグナルを同定するため、リン酸化プロテオーム解析を行い、mTORC1欠損AML細胞で変化するmTORC1依存的リン酸化分子の同定を行った。また、mTORC1欠損AML幹細胞の細胞状態の変化を捉えるため、細胞表面抗原の網羅的な解析を行った。網羅的探索から、自己複製を行う幹細胞様細胞集団の特徴を同定すると共に、自己複製に重要と考えられるシグナル経路の探索を行った。これに加え、仮説検証型の研究として、mTORC2-AKT-FOXOシグナルに着目した。FOXOファミリー分子は既にAML幹細胞の維持に重要であることが報告されている(Sykes SM, 2011 et al., Cell)。興味深いことに、mTORが形成するmTORC1とは別の複合体であるmTORC2は、AKTを介してFOXOを制御することが明らかとなっている(Guertin A et al., 2006, Dev Cell)。mTORC1欠損時にこのシグナルが活性化する可能性が強く示唆されることから、このシグナルの活性化状態の測定と、機能評価を行った。

4. 研究成果

(1) プロテオーム解析

まず、*in vitro* で培養した Raptor^{fllox};Rosa26-CreERT2 AML 細胞の全蛋白を安定同位体ラベルで標識し、一群には 4-OHT(4-ヒドロキシタモキシフェン)を投与して Raptor を欠損させ、カラムでリン酸化ペプチドを濃縮した後にプロテオーム解析を行い、野生型と Raptor 欠損型におけるリン酸化蛋白の差を網羅的に解析した。4419 のペプチドが同定され、2 倍以上の変動を示す分子が 515 同定された。その内 419 は Raptor 欠損後にリン酸化が減少した分子であった。4E-BP1 や AKT1S1 (PRAS40) など、既知の mTORC1 標的ペプチドも多数含まれ、信頼性の高いデータが得られていることが確認された。また、著しい減少を示す分子の一つとして、DNAJC2 が同定された (図 1A)。この分子は分子シャペロンの一つとして知られており、近年ではヒストンユビキチン化制御にも関与することが報告されている (Richly H et al., 2010, Nature)。mTORC1 下流標的候補として、解析をすすめ、DNAJC2 の shRNA を AML 細胞に導入した結果、アポトーシスが誘導され、*in vivo* では白血病細胞の増殖を抑制することが確認された (図 1B,C)。DNAJC2 のリン酸化部位変異蛋白では正常 DNAJC2 の細胞増殖支持機能が回復しないことも確認され、リン酸化部位が重要な機能を持つことが推測される。今後はこのリン酸化部位を認識する抗体などを作製することによってリン酸化による制御の意義を追求する必要があると考えている。

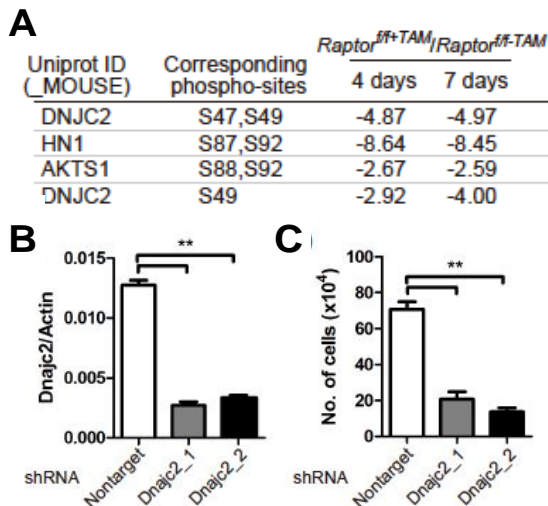


図 1. DNJC2 のリン酸化変動と機能阻害効果 (A) プロテオーム解析の結果, (B) shRNA による Dnajc2 発現低下, (C) Dnajc2 shRNA 導入 AML 細胞の細胞増殖能の減少 **P<0.01

また幹細胞様集団の特徴付けをするため、細胞表面プロテオーム解析を行った。BD 社の Mouse Cell Surface Marker Screening Panel を用い、176 の細胞表面抗原抗体に対する抗原の反応から、mTORC1 欠損時に *in vivo* で自己複製する細胞の特徴を同定した。その結果、

正常の造血幹細胞でも高い発現を示すことが知られている Sca-1 の発現が増加していることが明らかとなった (図 2)。MLL-AF9 を原因とするマウス AML 細胞では通常 Sca-1 の発現は低いことから、機能的な意義については不明であるが、mTORC1 が抑制されることによって、正常の造血幹細胞に近い性質が獲得されている可能性が示唆される。また興味深いことに、リン酸化プロテオームの結果とは異なり、多くの表面抗原蛋白の発現が上昇している傾向が認められた。他にも CD27, CD106, CD274 などの上昇が著しく、野生型の AML 細胞でも c-KIT の発現との相関が認められることから、AML の幹細胞様性質を維持するために機能している可能性が示唆される (図 2)。CD27 は CML 幹細胞で発現している分子として近年報告があり、AML 幹細胞でも重要な機能を示すことが報告されている beta-Catenin の制御を介して幹細胞機能を制御していることが報告されている (Wang Y et al., Science, 2010; Schürch C et al., JCI, 2012)。申請者らが樹立した mTORC1 欠損 AML 細胞でも beta-Catenin の変化が幹細胞様性質の獲得に関与していることが示唆されるため、beta-Catenin 及び、脱リン酸化型 beta-Catenin (活性型) の発現レベルを解析した結果、*in vivo* のサンプルでは両者の発現が著しく上昇していることを見出した。また MLL-AF9 により誘導される AML 細胞は *in vitro* において半永久的に培養することが可能であるが、移植による白血病再発能力を失うことから、培養条件下では幹細胞性を失っていると考えられている。培養後の細胞を解析すると、CD27 の発現や、beta-catenin の発現も消失したことから、mTORC1 欠損 AML 幹細胞における変化は CD27 の発現上昇を起因とする non-canonical な beta-catenin の上昇が関与していると示唆された。また、CD27 の発現上昇は mRNA レベルで観察されたことから、転写制御を介しているものであることが確認出来たが、その原因となる転写因子や

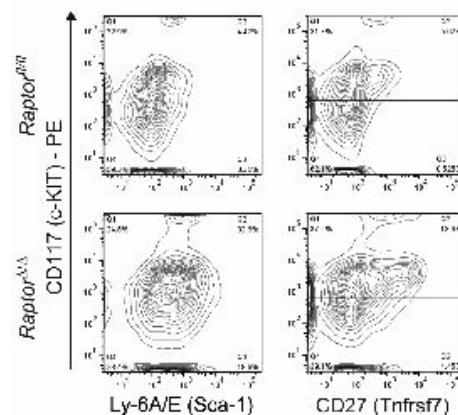


図 2. Sca-1, CD27 の発現変化 表面抗原蛋白解析の結果。野生型 AML 細胞 (上段) と mTORC1 欠損 AML 細胞 (下段) における Sca-1 (左列、水平方向) と CD27 (右列、水平方向) の発現。CD117 (c-KIT、垂直方向) との共染色後、Flow cytometer で解析した。

エピジェネティックな変化については不明なままである。mTORC1 はリン酸化や蛋白質発現制御が良く知られていることから、今後はこの転写制御を介する分子について同定を進める必要があると考えている。

(2)FOXO の機能解析

FOXO については、mTORC1 欠損 AML 細胞を in vivo より採取し、FOXO3a の細胞内局在について免疫染色により解析を行ったところ、FOXO3a の核局在を示す細胞が mTORC1 欠損後には増加していることを見出した。FOXO3a の shRNA を作製し、in vitro で Raptor 欠損と組み合わせて評価を行ったところ、相乗的に AML 細胞の増殖を抑制する効果が認められた。FOXO3a の shRNA を導入した細胞を移植した後に Raptor を欠損させて、in vivo でも相乗的な治療効果が認められるか検討を行ったものの、shRNA の効果が認められない細胞が優位に増加してしまい、FOXO3a を低下させたことによる正確な評価が困難であった。また FOXO は 3 つのファミリー蛋白 (FOXO1/FOXO3a/FOXO4) があり、造血細胞で重複した機能を持つことが報告されている (Tothova Z et al., 2007, Cell)。In vivo での mTORC1 欠損 AML 細胞において、長期的な FOXO の抑制を実現するため、FOXO1/3a/4 トリプル flox マウスを導入した (MD Anderson Cancer Center, Dr. Ronald A. DePinho より)。交配を進め解析が可能な状態に近づいたが、本研究期間内に解析を完了させることは出来なかった。しかしながら、上述のマウスを用いた今後の解析により、mTORC1 欠損時の FOXO 役割について詳細を明らかに出来ると期待している。

(3)mTORC2 の機能解析

mTORC2 の機能解析についても mTORC2 の必須のコンポーネントである Rictor の flox マウスを導入し(東京大学・池ノ上恒雄先生より)解析を行った。まず、MLL-AF9 を導入し、mTORC2 が欠損可能な AML 細胞を樹立した。興味深いことに Rictor を欠損した AML 細胞は培養条件下において、AKT の S473 リン酸化が消失しているにも関わらず、野生型とほぼ変わらない増殖能を示した。生体内で mTORC2 を欠損させた場合においても、mTORC1 で認められたような明らかな生存の延長は観察されなかった。このことから、mTORC1 と mTORC2 はまったく異なる役割を有することが示唆された。また申請者らは T 細胞発生において mTORC2 は mTORC1 よりも胸腺内での分化後期に働くことを報告しており (Hoshii T et al., 2014, PNAS)、AML 幹細胞でも mTORC2 の役割は限定的である可能性が示唆される。mTORC1 欠損時の mTORC2 の役割を明らかにするための、ダブル flox マウスを樹立したことから、今後はこのマウスの細胞を由来とする AML マウスモデルを樹立し、in vivo での幹細胞機能・細胞動態の変化について解析する必要がある

あると考えている。

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](計10件)

Yamada D, Hoshii T, Tanaka S, Hegazy AM, Kobayashi M, Tadokoro Y, Ohta K, Ueno M, Ali MA, Hirao A.

Loss of Tsc1 accelerates malignant gliomagenesis when combined with oncogenic signals.

J Biochem. 2014 Apr;155(4):227-33. 査読有. 10.1093/jb/mvt112.

Hoshii T, Kasada A, Hatakeyama T, Ohtani M, Tadokoro Y, Naka K, Ikenoue T, Ikawa T, Kawamoto H, Fehling HJ, Araki K, Yamamura KI, Matsuda S, Hirao A.

Loss of mTOR complex 1 induces developmental blockage in early T-lymphopoiesis and eradicates T-cell acute lymphoblastic leukemia cells.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Mar 11;111(10):3805-10. 査読有.

10.1073/pnas.1320265111.

Indo Y, Takeshita S, Ishii KA, Hoshii T, Aburatani H, Hirao A, Ikeda K.

Metabolic regulation of osteoclast differentiation and function.

J Bone Miner Res. 2013 Nov;28(11):2392-9.

査読有. 10.1002/jbmr.1976.

Ichimura Y, Waguri S, Sou Y, Kageyama S, Hasegawa J, Ishimura R, Saito T, Yang Y, Kouno T, Fukutomi T, Hoshii T, Hirao A, Takagi K, Mizushima T, Motohashi H, Lee MS, Yoshimori T, Tanaka K, Yamamoto M, Komatsu M.

Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy

Mol Cell. 2013. Sep 12;51(5):618-31. 査読有. 10.1016/j.molcel.2013.08.003.

Uema N, Ooshio T, Harada K, Naito M, Naka K, Hoshii T, Tadokoro Y, Ohta K, Ali MA, Katano M, Soga T, Nakanuma Y, Okuda A, Hirao A.

Abundant nucleostemin expression supports the undifferentiated properties of germ cell tumors.

Am J Pathol. 2013 Aug;183(2):592-603. 査読有. 10.1016/j.ajpath.2013.04.018.

Hirao A, Hoshii T.

Mechanistic / mammalian target protein of rapamycin signaling in hematopoietic stem

cells and leukemia.
Cancer Sci. 2013 Aug;104(8):977-82. 査読有. 10.1111/cas.12189. Epub 2013 Jun 9.

Shugo H*, Ooshio T*, Naito M, Naka K, Hoshii T, Tadokoro Y, Muraguchi T, Tamase A, Uema N, Yamashita T, Nakamoto Y, Suda T, Kaneko S, Hirao A.
Nucleostemin in injury-induced liver regeneration
Stem Cells Dev. 2012 Nov 1;21(16):3044-54. 査読有. 10.1089/scd.2011.0725.

Hoshii T, Tadokoro Y, Naka K, Ooshio T, Muraguchi T, Sugiyama N, Soga T, Araki K, Yamamura K, Hirao A.
mTORC1 is essential for leukemia-propagation but not stem cell self-renewal
J Clin Invest. 2012 Jun 1;122(6):2114-29. 査読有. 10.1172/JCI62279.

Ohtani M, Hoshii T, Fujii H, Koyasu S, Hirao A, Matsuda S.
mTORC1 in Intestinal CD11c+CD11b+ Dendritic Cells Regulates Intestinal Homeostasis by Promoting IL-10 Production.
J Immunol. 2012 May 15;188(10):4736-40. Epub 2012 Apr 13. 査読有.
10.4049/jimmunol.1200069.

Kurebayashi Y, Nagai S, Ikejiri A, Ohtani M, Ichiyama K, Baba Y, Yamada T, Egami S, Hoshii T, Hirao A, Matsuda S, Koyasu S.
PI3K-Akt-mTORC1-S6K1/2 axis controls Th17 differentiation by regulating Gfi-1 expression and nuclear translocation of ROR γ
Cell Reports. 2012 April 19;1(4): 360-373. 査読有. 10.1016/j.celrep.2012.02.007.

[学会発表](計11件)

Takayuki Hoshii, Atuo Kasada, Tomoki Hatakeyama, Masashi Ohtani, Yuko Tadokoro, Kazuhito Naka, Tsuneo Ikenoue, Tomokatsu Ikawa, Hiroshi Kawamoto, Asushi Iwama, Kimi Araki, Ken-ichi Yamamura, Satoshi Matsuda, Atsushi Hirao : mTORC1 inactivation prevents and eradicates acute lymphoblastic T-cell leukemia., 平成 25 年 12 月 7-11 日、2013 ASH annual meeting and exposition, New Orleans, LA (USA)

星居孝之、笠田篤郎、大谷真志、池上恒雄、伊川友活、河本宏、荒木喜美、山村研一、松田達志、平尾敦 : mTORC1 is essential for

T lineage-committed cell in normal lymphopoiesis and leukemogenesis、平成 25 年 10 月 11-13 日、第 75 回日本血液学会学術集会、さっぽろ芸文館・ロイトン札幌・札幌市教育分化会館(北海道)

星居孝之 : T 細胞発生と急性 T リンパ性白血病における mTORC1 の機能解析、平成 25 年 9 月 4-7 日、平成 25 年度がん若手研究者ワークショップ、蓼科グランドホテル滝の湯(長野県)

星居孝之 : 白血病クラス 変異による細胞分化異常における mTORC1 活性の機能解析、平成 25 年 5 月 21-23 日、新学術領域研究「細胞運命制御」、グランドエクシブ鳴門(徳島県)

星居孝之、笠田篤郎、平尾敦 : mTORC1 is essential for propagation of earliest T lineage-committed cell in normal lymphopoiesis and leukemogenesis. 平成 25 年 5 月 17-18 日、第 11 回幹細胞シンポジウム、東京大学伊藤国際学術センター(東京都)

星居孝之 : 活性型 K-Ras 変異による白血病発症における mTOR 複合体 1 の役割、平成 25 年 2 月 1-2 日、第 17 回造血器腫瘍研究会、シーガイア・コンベンションセンター(宮崎県)

Hoshii T, Hirao A : Analysis of survival signals in mTORC1-deficient acute myeloid leukemia stem cells. 平成 24 年 11 月 6-7 日、International symposium on genetic and epigenetic control of cell fate、グランドプリンスホテル京都(京都府)

星居孝之、田所優子、仲一仁、大塩貴子、村口輝之、杉山直幸、曾我朋義、荒木喜美、山村研一、平尾敦 : AML stem cells lacking mTORC1 self-renew but have defective leukemia-initiating capacity in mice. 平成 24 年 10 月 19-21 日、第 74 回日本血液学会学術集会、国立京都国際会館(京都府)

星居孝之、仲一仁、村口輝行、曾我朋義、荒木喜美、山村研一、平尾敦 : Acute myeloid leukemia stem cells lacking mTORC1 self-renew but have defective leukemia-initiating capacity in mice. 平成 24 年 9 月 19-21 日、第 71 回日本癌学会学術総会、ロイトン札幌・さっぽろ芸文館・札幌市教育分化会館(北海道)

星居孝之、田所優子、仲一仁、大塩貴子、村口輝之、杉山直幸、曾我朋義、荒木喜美、山村研一、平尾敦 : Acute myeloid leukemia stem cells lacking Raptor self-renew but

have defective leukemia initiating capacity in mice、平成 24 年 6 月 13-16 日、International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 10th Annual Meeting、パシフィコ横浜（神奈川県）

星居孝之：mTORC1 シグナルによる造血細胞の増殖・分化制御、平成 24 年 6 月 5-7 日、新学術領域研究「細胞運命制御」、グランドプリンスホテル広島（広島県）

〔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

金沢大学がん進展制御研究所遺伝子・染色体構築研究分野ホームページ

<http://www.kanazawa-u.ac.jp/~ganken/hirao-hp/index.html>

金沢大学がん進展制御研究所ホームページ

<http://www.kanazawa-u.ac.jp/%7Eganken/>

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