

令和元年5月16日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H02361

研究課題名(和文) 幹細胞性獲得・維持のためのがん微小環境

研究課題名(英文) A study of microenvironment for maintenance or acquisition of malignant property

研究代表者

平尾 敦 (HIRAO, Atsushi)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：90343350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、栄養環境変化に着目し、がんの幹細胞性の獲得・維持機構を理解することにより、がんの悪性進展の分子基盤を理解することを目的とした。その結果、mTORC1の活性亢進は、解糖系の亢進、ミトコンドリア機能の活性化を制御することにより、エネルギーの産生と需要のバランスを調和させることで膠芽腫の悪性進展に寄与すること、また、オートファジー阻害は、カルシウムイオンの動員と相乗的に抗がん作用を発揮することを見いだした。さらに、高脂肪食による腸内細菌叢の変化が引き金になる刺激に対して腫瘍化を抑制する新規の制御機構の解明に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、日常的な栄養環境がどのように、がんの発生や悪性化に寄与しているのかという疑問に対し、分子レベルでの制御機構の理解を進めた。その結果、新たな治療標的分子の発見やがんの発症の予防に寄与できる複数の研究成果を得ることができた。本研究を通して得られた成果は、将来、健康福祉の観点から社会に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to understand molecular mechanisms of malignant property in aspect of stem cell regulation by nutrient signals. As a result, firstly, we found that activation of mTOR complex 1 induces upregulation of glycolysis and mitochondrial activity and contributes to good balance between energy consumption and production for tumor progression. Secondly, we revealed that combining a Ca²⁺ mobilizer with the autophagy inhibitor remarkably suppress tumor growth in vitro and in vivo, proposing new therapeutics for GBM patients. Thirdly, we discovered an important tumor suppressive mechanism in hematopoietic stem cells against the ill effects caused by the dysbiosis (microbial imbalance) of gut microbiota induced by a high fat diet.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：がん 幹細胞 栄養

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

最近、がんの発生メカニズムの解明や新たな治療開発に向けて、幹細胞研究を基盤とした取り組みが盛んに行われている。がんの発生や悪性進展機構において、幹細胞特性(ステムネス)の制御が深く関わり、幹細胞特性の動作原理を深く追求する試みは、がんと幹細胞の両者をつなぐ重要な鍵を見つけることにつながり、発がんや転移・治療抵抗性など、がん悪性進展の本質の理解に寄与できると考えられる。

研究代表者は、これまで幹細胞動態制御の基本原理は何かという基盤的研究課題を継続して行ってきた。その結果、DNA 損傷反応、活性酸素制御に関する研究を経て、栄養シグナルに辿りついた。FOXO 転写因子は、多くの生物種において糖やアミノ酸など様々な栄養代謝変動に関与しストレス耐性分子として機能している。研究代表者は、造血幹細胞では FOXO 転写因子の活性化が、細胞周期停止状態を誘導し、幹細胞機能の維持に寄与していることを見いだした。また、FOXO 活性化は、白血球幹細胞でも観察され、治療抵抗性の原因となっていることが判明した。さらに、栄養シグナルの中心的役割を担う mTOR シグナルを遮断した場合、残存している白血球細胞では幹細胞形質が亢進していたことから、低栄養状態が、がんの未分化性獲得に重要な役割を果たしていると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、正常およびがん組織における幹細胞特性を研究対象として、微小環境としての栄養環境変化に焦点を当て、がん悪性進展の分子基盤の解明に取り組むこととした。特に、1) がん細胞の未分化性獲得・維持における栄養反応性シグナルの役割、2) 個体レベルでの栄養環境変化による幹細胞形質への影響に関する研究を進めた。本研究を推進することで、栄養シグナルを介した新規幹細胞制御因子の発見などを通じ、あらたな発がんメカニズムすることを目指した。本研究が、がんに関する基礎研究の発展や抗がん剤開発を通じた社会への還元に貢献できるよう研究を進めた。

3. 研究の方法

目的を達成するために、1. がん細胞の未分化性獲得・維持における栄養反応性シグナルの役割、および 2. 個体レベルでの栄養環境変化による幹細胞形質制御について研究を行った。栄養反応性シグナルとして、mTOR に着目し、mTOR 複合体 1 やオートファジーに関連する遺伝子の改変マウスや CRISPR/CAS9 を用いた遺伝子破壊法によって、白血球および脳腫瘍幹細胞の挙動を解析した。個体レベルでの栄養環境変化による幹細胞形質の解析については、高脂肪食による幹細胞集団の変化の解析を行った。以上の方法によって、局所および全身的栄養環境変化と幹細胞制御の関連について理解を進めた。

4. 研究成果

1) . がん細胞の未分化性獲得・維持における栄養反応性シグナルの役割

(1) mTOR 複合体 1(mTORC1)

悪性神経膠芽腫(グリオーマ)は、極めて悪性度の高い脳腫瘍である。グリオーマにおいて顕著に活性化し、患者の生命予後とも相関するシグナルが mTOR である。本研究では、mTORC1 によるエネルギー代謝とがんの悪性化に焦点を当て研究を進めた。マウスグリオーマモデルにおいて、mTORC1 活性を過剰に亢進させる系を用いて解析した結果、mTORC1 の異常活性化は、グリオーマ形成に寄与する glioma-initiating cell (GIC)を増加させることを観察した。さらに、mTORC1 活性型グリオーマ細胞では、ATP 産生亢進が顕著であることから、mTOR 依存的なエネルギー産生亢進が、GIC の増幅に寄与していると考えられた。この結果と一致して、ミトコンドリア傷害を誘導することが知られている化合物が、mTORC1 活性型グリオーマ細胞に対し強い増殖抑制効果を示すことが判明した。これらの中には、ヒトグリオーマ細胞に対しても、顕著な ATP レベルの低下、AMPK の活性化、オートファジーの亢進を誘導し、さらには生体内での増殖抑制効果を示すものも存在した。以上の結果より、mTORC1 の活性亢進は、解糖系の亢進、ミトコンドリア機能の活性化を制御することにより、エネルギーの産生と需要のバランスを調和させることで膠芽腫の悪性進展に寄与することが判明した。

(2)オートファジー

悪性神経膠芽腫においては、数多くの遺伝子の変異や様々なシグナル伝達経路の異常が生じていることが報告されているが、タンパク質やオルガネラの消化を通じて細胞の品質管理に寄与するオートファジーもそのひとつであり、グリオーマの悪性進展においても重要な役割を果たすことが知られている。しかし、その具体的な機能あるいは役割は複雑であり、一定の結論に至っていない。本研究では、悪性グリオーマにおけるオートファジーの役割を明らかにすることを目的とし、患者由来細胞を対象に、ゲノム編集技術による ATG5 遺伝子破壊を試みた。最初に、複数の患者由来細胞株に対し、CRISPR/CAS9 を用いて ATG5 遺伝子を破壊し、欠損クローンを得た。ATG5 欠損細胞では、オートファジー活性の消失が確認されたが、細胞の増殖、分化および細胞死に顕著な影響は認められなかった。さらに、免疫不全マウスへの脳内あるいは皮下移植によって、生体内での増殖を比較したが、ATG5 欠損細胞は、野生型細胞と顕著な差は認めなかった。オートファジーは、がんの化学療法の耐性獲得や感受性を規定する因子として

機能を発揮することが報告されている。そこで、悪性グリオーマに標準治療として使用されるテモゾロミドの感受性に対するオートファジーの役割を検討した結果、ATG5 欠損は、試験管内、生体内いずれの実験系においてもテモゾロミド感受性に影響を及ぼさないことが判明した。さらに、CAMKK 経路を通じて AMPK を活性化する化合物を添加した場合、オートファジーが欠損しているとミトコンドリア活性酸素が上昇し細胞死が誘導されることが判明した。また、これらの化合物とオートファジー阻害剤の組み合わせにより、顕著な抗腫瘍効果が発揮されることを見いだした。以上の結果より、オートファジー阻害は、カルシウムイオンの動員と相乗的に抗がん作用を発揮することが判明し、今後の新規脳腫瘍治療法の開発に寄与すると期待された。

2) 個体レベルでの栄養環境変化による幹細胞形質への影響

高脂肪食などの過栄養は、全身の様々な臓器に影響を与え、組織恒常性の破綻や発がんの誘因となる。高脂肪食は、骨髄微小環境の変化を促すこと、造血幹細胞の再生能を低下させることなどが報告されているが、どのような因子が幹細胞機能の制御に関与しているか詳細は明らかではない。今回、我々は、高脂肪食による栄養的ストレス下において、Spred1 が造血幹細胞の恒常性を保つ上で極めて重要な役割を果たすことを見いだした。Spred1 は、c-Kit 結合分子としてクローニングされ、Raf の負の制御因子として知られる。また、SPRED1 遺伝子の異常は、皮膚、神経、骨格異常を示す遺伝疾患 (Legius 症候群) で認められ、RAS/MAPK 経路の活性化を示す他の遺伝疾患とともに RAS-MAPK 経路症候群 (RASopathy) と呼ばれる。我々は、通常の状態では、Spred1 は RhoA/ROCK 経路・アクチン重合の調節を介して自己複製の抑制因子として機能していることを見出した。興味深いことに、Spred1 の欠損状態では、自己複製能の亢進を介して、感染や加齢などによる幹細胞障害を回避できる反面、高脂肪食による過栄養状態では、造血幹細胞の機能不全とともに骨髄増殖性疾患が惹起されることを観察した。このことから、本経路が、個体レベルの栄養環境変化に反応して、幹細胞の運命制御に寄与する重要な経路であると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計15件)

1. Imanishi T, Unno M, Kobayashi W, Yoneda N, Matsuda S, Ikeda K, Hoshii T, Hirao A, Miyake K, Barber GN, Arita M, Ishii KJ, Akira S, Saito T. Reciprocal regulation of STING and TCR signaling by mTORC1 for T-cell activation and function. *Life Sci Alliance*. 2019 Jan 25;2(1). pii: e201800282.
2. Vu HT, Kobayashi M, Hegazy AM, Tadokoro Y, Ueno M, Kasahara A, Takase Y, Nomura N, Peng H, Ito C, Ino Y, Todo T, Nakada M, Hirao A. Autophagy inhibition synergizes with calcium mobilization to achieve efficient therapy of malignant gliomas. *Cancer Sci*. 2018 Aug;109(8):2497-2508.
3. Li R, Gunarta IK, Suzuki R, Boldbaatar J, Nakazato R, Yuliana D, Davaakhuu G, Oyunsuren T, Takamatsu N, Kobayashi M, Hirao A, Yoshioka K. JLP-JNK signaling protects cancer cells from reactive oxygen species-induced cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Jun 27;501(3):724-730
4. Tadokoro Y, Hoshii T, Yamazaki S, Eto K, Ema H, Kobayashi M, Ueno M, Ohta K, Arai Y, Hara E, Harada K, Oshima M, Oshima H, Arai F, Yoshimura A, Nakauchi H, Hirao A. Spred1 Safeguards Hematopoietic Homeostasis against Diet-Induced Systemic Stress. *Cell Stem Cell*. 2018 May 3;22(5):713-725.e8.
5. Peng H, Kasada A, Ueno M, Hoshii T, Tadokoro Y, Nomura N, Ito C, Takase Y, Vu HT, Kobayashi M, Xiao B, Worley PF, Hirao A. Distinct roles of Rheb and Raptor in activating mTOR complex 1 for the self-renewal of hematopoietic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Jan 1;495(1):1129-1135
6. Dong Y, Furuta T, Sabit H, Kitabayashi T, Jiapaer S, Kobayashi M, Ino Y, Todo T, Teng L, Hirao A, Zhao SG, Nakada M. Identification of antipsychotic drug fluspirilene as a potential anti-glioma stem cell drug. *Oncotarget*. 2017 Dec 4;8(67):111728-111741
7. Ali MAE, Fuse K, Tadokoro Y, Hoshii T, Ueno M, Kobayashi M, Nomura N, Vu HT, Peng H, Hegazy AM, Masuko M, Sone H, Arai F, Tajima A, Hirao A. Functional dissection of hematopoietic stem cell populations with a stemness-monitoring system based on NS-GFP transgene expression. *Sci Rep*. 2017 Sep 12;7(1):11442.
8. Hegazy AM, Yamada D, Kobayashi M, Kohno S, Ueno M, Ali MA, Ohta K, Tadokoro Y, Ino Y, Todo T, Soga T, Takahashi C, Hirao A. Therapeutic Strategy for Targeting Aggressive Malignant Gliomas by Disrupting Their Energy Balance. *J Biol Chem*. 2016 Oct 7;291(41):21496-21509
9. Hirao A. Cooperative networks for stem cell homeostasis in normal and malignant hematopoiesis: from metabolism to epigenetics. *Int J Hematol*. 2016 Jun;103(6):605-6.
10. Baba T, Tanabe Y, Yoshikawa S, Yamanishi Y, Morishita S, Komatsu N, Karasuyama H, Hirao A, Mukaida N. MIP-1 /CCL3-expressing basophil-lineage cells drive the

- leukemic hematopoiesis of chronic myeloid leukemia in mice. *Blood*. 2016 May 26;127(21):2607-17.
11. Matsushita T, Le Huu D, Kobayashi T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Naka K, Hirao A, Muramatsu M, Takehara K, Fujimoto M. A novel splenic B1 regulatory cell subset suppresses allergic disease through phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway activation. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Oct;138(4):1170-1182.e9
 12. Naka K, Ishihara K, Jomen Y, Jin CH, Kim DH, Gu YK, Jeong ES, Li S, Krause DS, Kim DW, Bae E, Takihara Y, Hirao A, Oshima H, Oshima M, Ooshima A, Sheen YY, Kim SJ, Kim DK. Novel oral transforming growth factor- signaling inhibitor EW-7197 eradicates CML-initiating cells. *Cancer Sci*. 2016 Feb;107(2):140-8.
 13. Kawahara T, Kagaya N, Masuda Y, Doi T, Izumikawa M, Ohta K, Hirao A, Shin-ya K. Foxo3a Inhibitors of Microbial Origin, JBIR-141 and JBIR-142. *Org Lett*. 2015 Nov 6;17(21):5476-9.
 14. Nakagawa T, Araki T, Nakagawa M, Hirao A, Unno M, Nakayama K. S6 Kinase- and -TrCP2-Dependent Degradation of p19Arf Is Required for Cell Proliferation. *Mol Cell Biol*. 2015 Oct;35(20):3517-27.
 15. Fahkri H, Zhang B, Fajol A, Hernando N, Elvira B, Mannheim JG, Pichler BJ, Daniel C, Amann K, Hirao A, Haight J, Mak TW, Lang F, Föllner M. Checkpoint kinase Chk2 controls renal Cyp27b1 expression, calcitriol formation, and calcium-phosphate metabolism. *Pflugers Arch*. 2015 Sep;467(9):1871-80.

〔学会発表〕(計17件)

1. 平尾敦: 造血幹細胞自己複製の制御と腸内細菌叢北海道大学「感染・免疫・がん・炎症」シンポジウム 2019年3月27日
2. Hirao A: The nutrient signals in self-renewal of hematopoietic stem cells and tumorigenesis 2019 US-Japan Symposium on Normal/Malignant Hematopoiesis and Novel Therapies for Hematologic Malignancies 2019年2月19日 ハワイ, 米国
3. Hirao A: Metabolic Regulation of Stemness in Malignant Hematopoiesis Eleventh AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: Biology to Precision Medicine 2019年2月12日 ハワイ, 米国
4. Hirao A: Metabolic Control of Cancer Stemness. The 2nd NanoLSI Symposium in London Towards Establishment of New Research Field: Nanoprobe Life Science- Nov.19, 2018, London
5. Hirao A. Regulation of stem cell properties by metabolic signals in hematopoietic neoplasm. JSPS - National University of Singapore (NUS) 2nd Symposium. Jan 18th-20th, 2018, Kumamoto, Japan
6. Hirao A: Metabolic Regulation of Stemness in Malignant Hematopoiesis. International symposium on drug discovery (Joint symposium of Univ. of Tokyo and Novartis Institute) Oct.22, 2018, Tokyo
7. 平尾敦:造血幹細胞の運命決定機構—自己複製の異常と疾患— 第7回細胞再生医療学会, 2017
8. 平尾敦: 幹細胞 第10回研修医のための血液学セミナー2017年7月8日, 大津
9. Hirao A: Regulation of stem cell properties by nutrient signals in hematopoietic neoplasms. 2017 Cancer Biology Symposium. Jun 23, 2017, Taiwan
10. Hirao A: Hematopoietic stem cell homeostasis under diet-induced systemic stress. The joint symposium on tumor microenvironment and precision medicine. May 22, 2017, Seoul, Korea
11. 平尾敦: 造血幹細胞の運命決定機構—自己複製の異常と疾患—, 臨床分子医学会 2017年4月14日, 東京
12. 平尾敦: 栄養シグナルと幹細胞制御 第39回日本分子生物学会年会 平成28年12月3日, 横浜
13. Hirao A: Molecular mechanism regulating stem cell properties mediated by nutrient signals. 46th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund Nov.8, 2016, Tokyo
14. Hirao A: Molecular mechanism linking hematopoietic stem cell aging and leukemogenesis. Fifth JCA-AACR Special Joint Conference on the Latest Advances in Hematological Cancer Research July.13-15, 2016, Urayasu, Japan
15. Hirao A. Stem cell regulation by nutrient signals 第74回日本癌学会学術総会, 平成27年10月9日, 名古屋
16. Hirao A: Molecular mechanism linking between hematopoietic stem cell aging and leukemogenesis. International Society for Experimental Hematology (ISEH) 44th Annual Scientific Meeting Sep.17-19, 2015, Kyoto

17. Hirao A: Role of nutrient sensing signaling pathways in the maintenance of leukemia stem cells. SNUCRI CANCER SYMPOSIUM, Apr. 3, 2015, Korea

〔図書〕(計2件)

1. Naka K, Hirao A. Regulation of Hematopoiesis and Hematological Disease by TGF-Family Signaling Molecules. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2017 Sep 1;9(9). pii: a027987
2. Hirao A, Tadokoro Y, Ueno M: Molecular Pathogenesis and Treatment of Chronic Myelogenous leukemia (Editor: Masahiko Kizaki) Chapter 2: Molecular Mechanisms of CML Stem Cell Maintenance. p11-17, 10.1007/978-4-4431-55714-2, 2015, Springer

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称: 脳腫瘍治療組成物

発明者: 中田光俊, 平尾敦, 北林朋宏, サビエルジャンジャパル

権利者: 国立大学法人金沢大学

種類: 特許権

番号: 2017-149468

出願年: 平成 29 年 8 月 1 日

国内外の別: 国内

名称: 脳腫瘍治療組成物

発明者: 中田光俊, 平尾敦

権利者: 国立大学法人金沢大学

種類: 特許権

番号: 2015-095019

出願年: 平成 27 年 5 月 7 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

<http://ganken.cri.kanazawa-u.ac.jp/about/department/cscr07/>

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 田所優子

ローマ字氏名: Yuko Tadokoro

研究協力者氏名: 小林昌彦

ローマ字氏名: Masahiko Kobayashi

研究協力者氏名: 上野将也

ローマ字氏名: Masaya Ueno

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。