

令和 4 年 4 月 18 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03687

研究課題名(和文) ヒト急性白血病に共通する悪性幹細胞特異的な代謝経路の同定

研究課題名(英文) Identification of human acute leukemia specific metabolic pathways

研究代表者

菊繁 吉謙 (Kikushige, Yoshikane)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：40619706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト白血病幹細胞における幹細胞性維持に重要な代謝経路の同定に取り組んだ。ヒト白血病幹細胞が濃縮されるCD34+急性骨髄性白血病(AML)および急性リンパ芽球性白血病細胞(ALL)はCD34+正常ヒト造血幹前駆細胞と比較して、細胞内分岐鎖アミノ酸(BCAA)含有量が20倍以上上昇していることを見出した。ヒト患者由来AML/ALL細胞を移植したPDXモデルにおいて、食餌中BCAA制限を行なうと、in vivoにおいてヒトAML, ALLの増殖が抑制され、BCAA代謝は白血病幹細胞の自己複製をcell intrinsicなメカニズムで維持するのに必須であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の遂行により、ヒト急性白血病における幹細胞性維持にとって重要な代謝特性としてBCAA代謝経路を同定することができた。また、BCAA代謝が利用する幹細胞性維持機構として、下流のPRC2機能制御を同定することができた。これらの結果から、BCAA代謝経路を標的としたヒト急性白血病における治療戦略を構築する上で、基盤的な特性を明らかにすることができた。したがって本研究の果たした意義は基礎的研究分野のみならず、今後の応用も含めた発展性のある内容であり、社会的意義も高いものであると考える。

研究成果の概要(英文)：In the current study, we explored the critical metabolic mechanisms underlying the maintenance of stem cell properties in human acute leukemia. Through the analysis of metabolome data sets we have established, we found that human CD34+ acute leukemia cells exhibited significantly higher cellular content of branched chain amino acids (BCAAs) as compared to normal CD34+ hematopoietic stem progenitor cells. Inhibition of BCAA metabolism strongly impaired the maintenance of leukemic stem cell properties of human acute leukemia in the xenograft models. Furthermore, we explored the molecular machineries how BCAA metabolism regulate the stemness of human acute leukemia and demonstrated that BCAA metabolism is specifically required to maintain PRC2 components including EZH2 and EED. Thus, BCAA metabolism represents a specific regulator of stem cell properties via maintaining PRC2 function in human acute leukemia.

研究分野：血液内科学

キーワード：白血病幹細胞 がん代謝

### 1. 研究開始当初の背景

近年の急速なゲノム解析技術の進歩により、腫瘍内部には、複数のがん幹細胞が生み出す多様ながん細胞クローンが存在することが明らかとなってきた。しかしがん組織におけるゲノム上のクローン進化は証明されたが、がんの強靱さの原因である「可塑性」や「適応性」に関する情報は殆ど得られていない。患者個体内では、病気の進行や治療によるストレスによりこれらのがん細胞の多様性に変化が生じるが、これは新しく生じた「自己複製能」を持つがん幹細胞が、多様な治療抵抗性クローンを新たに生み出し続けることに起因する。したがって、がん根絶治療開発のためには、生体内でのがん幹細胞の幹細胞性維持メカニズムを解明し、がんの「可塑性」や「適応性」を打破する必要がある。申請者はこれまでにヒト白血病幹細胞研究を精力的に取り組んできた。そのような研究の背景から、申請者はヒト造血器腫瘍病態を考える上で、発症、進展および腫瘍維持の全てのフェーズにおいて幹細胞性維持機構が非常に重要であるという着想に至った。特にヒト急性白血病(AML, ALL)は、未分化性を維持しながら自己複製を行い、異種移植モデルにおいてヒト白血病を再構築可能な強力な幹細胞性を有していることが共通点である。近年のゲノム解析、あるいはトランスクリプトーム解析の進捗によっても AML と ALL に共通する幹細胞性維持機構の解明には至っておらず、全く新しいアプローチによるヒト急性白血病における幹細胞性維持機構の理解が必要と考えられる。そこで、本研究においては、emerging hallmark of cancer として注目されるがん代謝に焦点を当てて研究を行う。細胞の代謝は生命活動を直接的に反映するものであり、代謝産物を網羅的に定量するメタボローム解析は、遺伝子変異や遺伝子発現のサブタイプによらず、AML と ALL における共通の幹細胞性維持機構を解明する上での新しい解析アプローチとして有効と考えられる。そこで、本研究においては先行研究のデータをもとに、ヒト急性白血病特異的な代謝特性を明らかにすることでヒト造血器腫瘍における幹細胞性維持機構の解明を行う。

### 2. 研究の目的

近年の次世代シーケンサー技術の進歩によりオミクス解析技術の中でもゲノミクスは飛躍的な発展を遂げ、造血器腫瘍における遺伝子変異については、ほぼ解析が完了したと言っても過言ではない。その一方でメタボローム解析は解析に必要な細胞数が非常に多いために臨床検体、あるいは幹細胞分画にターゲットを絞った解析は困難であったが、我々は臨床検体でも十分なデータが得られるメタボローム解析系とデータベースを既に確立しており、従来のゲノミクスやトランスクリプトミクスという切り口とは全く異なる代謝解析の観点からヒト白血病病態解明に取り組むことを本研究の目的とする。

### 3. 研究の方法

先行研究より構築した未分化 CD34+ ヒト白血病細胞および正常 CD34+ 造血幹細胞の代謝産物データより、AML と ALL に共通して細胞内含有量の上昇している分岐鎖アミノ酸 (BCAA) の白血病幹細胞における機能をマルチオミクス解析により明らかにするとともに、免疫不全マウスへの異種移植系を用いて治療モデルの確立に取り組む。

### 4. 研究成果

#### ヒト急性白血病に共通する幹細胞性維持機構としての分岐鎖アミノ酸代謝経路の同定

本研究遂行過程で、マルチオミクス解析によるがん幹細胞の不均一性維持機構の解明に取り組んだ。オミクス解析の一つの柱であるメタボローム解析を純化した CD34+AML 細胞および同一の表面形質を有する CD34+急性リンパ芽球性白血病(ALL)細胞と CD34+正常造血幹前駆細胞(HSPC)を用いて行い、正常および悪性造血幹細胞の代謝産物データベースの構築を行った。その結果、分岐鎖アミノ酸(BCAA)の細胞内含有量が、AML と ALL で共通して正常 CD34+HSPCs よりも非常に高いことを見出した。この機構として CD34+AML/ALL 細胞がアミノ酸トランスポーターおよび代謝酵素を異所性に高発現し、このアミノ酸代謝経路を利用していることを確認した(図1)。

また、ヒト AML および ALL を異種移植により免疫不全マウス内で再構築した後に、食餌中 BCAA 制限を行うこ

図1 ヒト白血病幹細胞における幹細胞性維持機構としてのBCAA代謝経路の同定

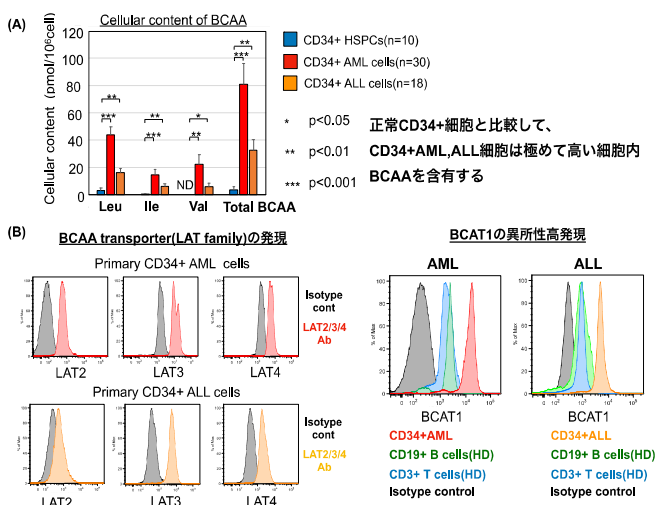
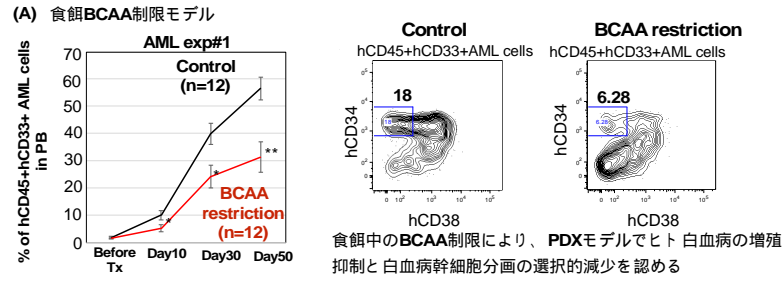


図2 AML/ALLに共通する幹細胞性維持機構としてのBCAA代謝経路



とで *in vivo* におけるヒト AML/ALL の増殖が抑制され、特に AML においては CD34+CD38- 白血病幹細胞分画が選択的に減少した (図 2)。さらに連続移植実験系における腫瘍再構築能力が著名に低下することを見出した。興味深いことに 2 次移植マウスにおいては BCAA 食餌制限を

全く行っていないにも関わらず、移植したヒト AML /ALL 細胞の幹細胞性が強力に減弱していることから、cell-intrinsic な機構により幹細胞性が損なわれている可能性が考えられた。

この cell-intrinsic な BCAA 代謝による白血病幹細胞性制御機構を解明するために、BCAA 代謝阻害前後での網羅的遺伝子発現変化を解析したところ、GSEA 解析により幹細胞 (ES, iPS 細胞) における PRC2 標的遺伝子の発現が亢進することを見出した。これらの遺伝子は、未分化性維持のために PRC2 が制御する H3K27me3 のヒストン修飾により適切に発現が抑制されるべき遺伝子群であった。そこで、我々は BCAA 代謝が PRC2 分子の機能を制御しているという仮説を立てた。ロイシンのアナログとして BCAA 代謝の薬理的阻害剤として利用される gabapentin を用いて、ヒト AML, ALL 細胞において BCAA 代謝を阻害して、その前後で H3K27me3 に対する抗体を用いた ChIP -Seq 解析を行ったところ、既知の幹細胞関連の PRC2 標的遺伝子近傍において BCAA 代謝阻害によりヒストンの H3K27me3 修飾レベルが低下することを確認した。すなわち、BCAA 代謝阻害により PRC2 の機能抑制が生じることで、本来幹細胞性維持のために抑制されるべき標的遺伝子群の発現が誘導されることを見出した。次に BCAA 代謝による PRC2 機能制御メカニズムの解明のためにヒト白血病細胞株を BCAA-free 培地で培養し、網羅的遺伝子発現解析をおこなったところ、PRC2 コンポーネントの中でも EZH2 と EED という 2 つのコアコンポーネントの mRNA 発現が低下していることを見出した。これらのデータから、BCAA 代謝活性が EZH2 と EED 遺伝子の転写維持に必要であることが考えられた。

そこで、白血病細胞株および患者由来 AML, ALL 細胞を *in vitro* で培地の BCAA 濃度を減らした条件で培養すると、EZH2, EED の転写が抑制され、タンパクレベルでも EZH2 および EED の低下が生じることを確認した。また、上述の BCAA 食餌制限をおこなったマウス内で再構築したヒト AML, ALL 細胞においても転写レベルで EZH2, EED の発現低下およびその結果としてのタンパクの低下が確認された。この現象は他の必須アミノ酸を制限した場合には認められないことから、BCAA 代謝に特異的な現象であると考えられた。すなわち、ヒト AML, ALL においては共通の白血病幹細胞性維持機構として活性化 BCAA 代謝が存在し、この BCAA 代謝は PRC2 のコアコンポーネントである EZH2, EED の発現を制御することで、エピジェネティックに幹細胞関連遺伝子発現を制御することを見出した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kikushige Yoshikane	4. 巻 60
2. 論文標題 Pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia and the development of novel therapeutic strategies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical and Experimental Hematopathology	6. 最初と最後の頁 146 ~ 158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3960/jslrt.20036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tochigi Taro, Miyamoto Toshihiro, Hatakeyama Kiwamu, Sakoda Teppei, Ishihara Daisuke, Irifune Hidetoshi, Shima Takahiro, Kato Koji, Maeda Takahiro, Ito Takumi, Handa Hiroshi, Akashi Koichi, Kikushige Yoshikane	4. 巻 135
2. 論文標題 Aromatase is a novel neosubstrate of cereblon responsible for immunomodulatory drug?induced thrombocytopenia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 2146 ~ 2158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2019003749	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jinnouchi Fumiaki, Yamauchi Takuji, Yurino Ayano, Nunomura Takuya, Nakano Michitaka, Iwamoto Chika, Obara Teppei, Miyawaki Kohta, Kikushige Yoshikane, Kato Koji, Maeda Takahiro, Miyamoto Toshihiro, Baba Eishi, Akashi Koichi, Takenaka Katsuto	4. 巻 135
2. 論文標題 A human SIRPA knock-in xenograft mouse model to study human hematopoietic and cancer stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1661 ~ 1672
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2019002194	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Higashioka K., Kikushige Y., Ayano M., Kimoto Y., Mitoma H., Kikukawa M., Akahoshi M., Arinobu Y., Horiuchi T., Akashi K., Niino H.	4. 巻 201
2. 論文標題 Generation of a novel CD30 + B cell subset producing GM-CSF and its possible link to the pathogenesis of systemic sclerosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical & Experimental Immunology	6. 最初と最後の頁 233 ~ 243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cei.13477	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuda Junichiro, Odawara Jun, Minami Mariko, Muta Tsuyoshi, Kohno Kentaro, Tanimoto Kazuki, Eto Tetsuya, Shima Takahiro, Kikushige Yoshikane, Kato Koji, Takenaka Katsuto, Iwasaki Hiromi, Minami Yosuke, Ohkawa Yasuyuki, Akashi Koichi, Miyamoto Toshihiro	4. 巻 111
2. 論文標題 Tyrosine kinase inhibitors induce alternative spliced BCR ABL Ins35bp variant via inhibition of RNA polymerase II on genomic BCR ABL	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2361 ~ 2373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14424	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tochigi Taro, Miyamoto Toshihiro, Hatakeyama Kiwamu, Sakoda Teppei, Ishihara Daisuke, Irifune Hidetoshi, Shima Takahiro, Kato Koji, Maeda Takahiro, Ito Takumi, Handa Hiroshi, Akashi Koichi, Kikushige Yoshikane	4. 巻 -
2. 論文標題 Aromatase is a novel neo-substrate of cereblon responsible for immunomodulatory drugs-induced thrombocytopenia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2019003749	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jinnouchi Fumiaki, Yamauchi Takuji, Yurino Ayano, Nunomura Takuya, Nakano Michitaka, Iwamoto Chika, Obara Teppei, Miyawaki Kohta, Kikushige Yoshikane, Kato Koji, Maeda Takahiro, Miyamoto Toshihiro, Baba Eishi, Akashi Koichi, Takenaka Katsuto	4. 巻 -
2. 論文標題 Establishment of a human SIRPA knock-in xenograft mouse model to study human hematopoietic and cancer stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2019002194	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kodama Tatsushi, Kochi Yu, Nakai Waka, Mizuno Hideaki, Baba Takeshi, Habu Kiyoshi, Sawada Noriaki, Tsunoda Hiroyuki, Shima Takahiro, Miyawaki Kohta, Kikushige Yoshikane, Mori Yasuo, Miyamoto Toshihiro, Maeda Takahiro, Akashi Koichi	4. 巻 18
2. 論文標題 Anti-GPRC5D/CD3 Bispecific T-Cell-Redirecting Antibody for the Treatment of Multiple Myeloma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Therapeutics	6. 最初と最後の頁 1555 ~ 1564
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1535-7163.MCT-18-1216	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yoshikane Kikushige, Koichi Akashi
2. 発表標題 Evaluation of residual TIM-3+ LSC is a promising approach to predict the clinical outcome of allo-SCT
3. 学会等名 25th Congress of European Hematology Association, EHA-JSH joint symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshikane Kikushige, Koichi Akashi
2. 発表標題 Stem Cells in Acute Myeloid Leukemia
3. 学会等名 11th Eurasian Hematology-Oncology Congress, EHOJ-JSH joint symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菊繁吉謙 赤司浩一
2. 発表標題 Identification of BCAAs metabolism pathway as a critical metabolic machinery for the maintenance of human acute leukemia-initiating cells
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菊繁吉謙 赤司浩一
2. 発表標題 ヒト急性白血病に共通する幹細胞性維持機構としてのアミノ酸代謝経路の解明
3. 学会等名 第93回日本生化学学会 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菊繁吉謙 赤司浩一
2. 発表標題 Identification of BCAAs metabolism pathway as a critical metabolic machinery for the maintenance of human acute leukemia-initiating cells
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会 コアシンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菊繁吉謙
2. 発表標題 ヒト急性白血球幹細胞における幹細胞性維持機構としての代謝特性の解明
3. 学会等名 第1回日本医学連合 若手リトリート(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊繁吉謙
2. 発表標題 Identification of BCAAs metabolism pathway as a critical metabolic machinery for the maintenance of human acute leukemia-initiating cells
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会 プレナリーセッション(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊繁吉謙
2. 発表標題 ヒト急性白血球幹細胞における幹細胞性維持機構としての代謝特性の解明
3. 学会等名 第42回分子生物学会 ワークショップ(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	赤司 浩一  (Akashi Koichi)  (80380385)	九州大学・医学研究院・教授   (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------