

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24240119

研究課題名(和文) がんの幹細胞特性を支える栄養シグナル制御機構の解明

研究課題名(英文) Role of nutrient signals in stem cell regulation in tumors

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) 36,000,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、栄養シグナルによるがん幹細胞制御機構の解明を目的に、栄養センサーシグナルで重要な役割を果たすmTOR複合体1に着目して研究を行った。そのため、Raptorの遺伝子欠損マウスを作製し、造血及び白血病発症におけるmTOR複合体1の機能解析を行った。その結果、急性骨髄性白血病においては、本シグナルは白血病細胞全体の増幅では必要であるが、幹細胞集団の自己複製には必須ではないことが判明した。一方で、Tリンパ球性白血病では、その生存に必須であり、重要な治療標的となることが判明した。今後、がんの動態制御における栄養シグナルの機能解析を詳細に行うことにより、がんの本態解明に寄与できると考えられた。

研究成果の概要(英文)：mTOR is an evolutionarily conserved kinase that plays a critical role in sensing and responding to nutrients. In this study, we investigated roles of mTOR complex 1 (mTORC1) in hematopoiesis and leukemogenesis. In an acute myeloid leukemia model, deficiency of Raptor, an essential component of mTORC1, significantly suppressed leukemia progression by causing apoptosis of differentiated cells, but did not affect self-renewal of leukemia stem cells. In contrast, we found that mTORC1 plays a critical role in the development of both early T-cell progenitors and leukemia. Thus, understanding the cell-context-dependent role of mTORC1 illustrates the potential importance of mTOR signals as therapeutic targets.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：白血病 mTOR

1. 研究開始当初の背景

幹細胞は、分化細胞を供給する能力と、自分自身を産生する自己複製能の二つの能力を兼ね備えており、そのバランスを保ちながら、恒常性を維持している。最近、がんの発生過程や悪性進展過程において、幹細胞特性(ステムネス)が獲得されることが知られており、がんの病態制御と幹細胞特性の密接な関連が注目されている。その関連を知るために、生体内で生じるがんの幹細胞特性制御を、可能な限り生理的な状態で解析し、その病理的意義を理解することが重要であると考えられる。

がん細胞が活発に増殖するためには、エネルギー源としての十分な栄養素の存在とその感知シグナルの活性化、それに引き続く様々な代謝調節が必要とされる。その中心的役割を果たしているのが、栄養センサーシグナル mTOR である。多くのがんで mTOR の活性化が観察され、本シグナルは、活発に増殖しているがんにおける治療の標的としても重要である。栄養環境の変化は幹細胞制御にも重要な因子であり、がんと幹細胞を結びつける鍵因子として興味深い。

2. 研究の目的

本研究では、栄養シグナルによる幹細胞特性制御という観点から、がんの成り立ち、悪性進展メカニズムを理解することを目的とする。特に、栄養シグナルとしての mTOR 複合体 1 が、いかに細胞分化に影響を及ぼすのか、正常およびがん組織において解析することを目標とした。

3. 研究の方法

マウス Raptor 遺伝子を含む BAC クローンを入手し、ターゲティングベクターを構築した。ターゲティングベクターでは、Raptor 遺伝子のエクソン 2 を挟む形で loxP サイトを挿入し、その下流に FRT サイトで挟んだネオマイシン耐性遺伝子を挿入した。ES 細胞にターゲティングベクターを導入し、相同組み換えクローンを選択し、キメラマウスを作製した。ジャームライントランスミッションを確認後、CAG-Flp マウスと交配させ、ネオマイシン耐性遺伝子を除去し、その後 C57BL6 と交配を続け、遺伝背景を均一にし、実験に使用した。本マウスを Rosa26-CreERT2 マウスと交配し、タモキシフェン投与による誘導的 Raptor ノックアウト系を確立した。

急性骨髄性白血病モデル作製のために、遺伝子改変マウスより骨髄細胞を採取し、レトロウイルスにて MLL-AF9 遺伝子を導入し、放射線照射をレシピエントマウスの尾静脈より注入し移植を行った。ウイルスベクターには GFP 発現力セットが組み込まれているため、生体内での白血病細胞は GFP を指標に評価した。

T リンパ性白血病モデルの作製には、Cre 活性により活性化型 Kras に変換する

K-rasG12D ノックインマウスを Raptor flox/Rosa26-CreERT2 と交配し、その骨髄細胞を放射線照射レシピエントマウスの尾静脈より注入し移植を行ったのち、タモキシフェンを投与し、血液解析を行った。また、活性化型 Notch をレトロウイルスによって導入した骨髄細胞を移植することで作製した T リンパ性白血病モデルでも解析を行った。

4. 研究成果

(1) mTOR 複合体 1 の造血における役割

成体 Raptor 欠損マウス(Raptor^{f/f} CreER) にタモキシフェンを投与すると、体重減少を伴い、投与約 20 日後までには死亡した。投与後 10 日目に解析を行うと、骨髄細胞、脾臓、胸腺などの造血組織の重量が有意に低下していた。骨髄細胞の細胞表面抗原解析により、骨髄細胞系分化細胞である好中球の分化異常、B 細胞未分化な集団(B220^{low}/IgM⁺ cells: early B cell precursors, pro/pre-B cells)の減少が認められた。一方、リンパ球系前駆細胞(common lymphoid progenitors: CLP)、好中球マクロファージ前駆細胞(granulocyte-macrophage progenitors: GMP)は増加傾向を示した。一方で未分化細胞では大きな影響を受けていなかった。以上の結果より、mTOR 複合体 1 は、B 細胞や骨髄球系分化細胞での生存に必須であることが判明した。

T リンパ球の発生分化における mTOR 複合体 1 の機能解析のために、Raptor flox/Rosa26-CreERT2 マウスにタモキシフェン投与し、2 週間後に胸腺中の T 細胞の解析を行った。その結果、Raptor 欠損によって、胸腺の縮小および CD4/8 double positive (DP) 細胞の減少が認められた。CD4/8 double negative (DN)細胞では、CD44+CD25⁻(DN1)細胞比率の増加および CD44+CD25⁺(DN2)細胞集団の減少を認めた。一方、T 細胞特異的である Lck-Cre と交配させたマウスでは、ほぼ胸腺分化の異常は認められなかった。Lck-Cre マウスでの遺伝子欠損を確認したところ、DN3 で約 30%、DP でほぼ 100%の欠損が認められた。一方、Rosa26-CreERT2 マウスでは、DN1 以降すべての分画でほぼ 100%の欠失であった。このことから、Raptor 欠損による異常は、主に DN1-DN2 で起こっていると考えられた。

(2) mTOR 複合体 1 の白血病における役割

急性骨髄性白血病モデルにおいては、Raptor 欠損により、未分化抗原 c-Kit 陽性の割合が増加し、一方で分化抗原 Gr-1 陽性細胞の割合の低下が見られた。また形態的には、Raptor 欠損により、分化傾向(分葉型の核)を示す細胞の割合が低下していた。以上の結果より、比較的分化した白血病は、Raptor に依存して増殖・生存していることが認められた。一方、白血病発症能力を有する分画(白血病幹細胞,c-Kit 陽性 Gr-1 陰性;K+G-)を移植し、白血病発症能力を評価したところ、レ

シピエントマウスの骨髄には、100 日以上経ても、白血球細胞が生存していることが判明した。長期的に生存していた Raptor 欠損白血球細胞に Raptor 遺伝子を導入し、再び移植したところ、Raptor 遺伝子を導入した群において、白血球細胞の増殖とそれに伴うマウスの死亡が確認された。このことから、Raptor 欠損でも、白血球幹細胞としての機能は保持されることが判明した。

T リンパ球性白血病モデルとして、K-ras 活性化を誘導し、Raptor 欠損状態での影響を観察した結果、Raptor 欠損は、Kras 活性化によって誘導される T 細胞性白血球細胞の発生と引き続く個体死を有意に抑制することが観察された。そこで、活性化型 Notch による T リンパ球性白血病を発症させ、その後 Raptor を欠失させたところ、ほぼ完全に白血球細胞は消失した。このように、T リンパ球性白血病では、その生存に必須であり、重要な治療標的となることが判明した。

以上の結果をまとめると、mTOR 複合体の役割は、白血病の種類や細胞分画によって大きく異なること、また、その違いは、正常造血における mTOR の役割と深く関わることが示された。今後、がんの動態制御における栄養シグナルの機能解析を詳細に行うことにより、さらにがんの本態解明に寄与できると考えられた。

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)(すべて査読あり)

1. Tanaka S, Nakada M, Yamada D, Nakano I, Todo T, Ino Y, Hoshii T, Tadokoro Y, Ohta K, Ali MA, Hayashi Y, Hamada J, Hirao A. Strong therapeutic potential of α -secretase inhibitor MRK003 for CD44-high and CD133-low glioblastoma initiating cells. *J Neurooncol.* 121:239-50, 2015. doi: 10.1007/s11060-014-1630-z
2. Ali MA, Naka K, Yoshida A, Fuse K, Kasada A, Hoshii T, Tadokoro Y, Ueno M, Ohta K, Kobayashi M, Takahashi C, Hirao A. Association of a murine leukaemia stem cell gene signature based on nucleostemin promoter activity with prognosis of acute myeloid leukaemia in patients. *Biochem Biophys Res Commun.* 450:837-43, 2014. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.06.066.
3. Hoshii T, Matsuda S, Hirao A. Pleiotropic roles of mTOR complexes in haemato-lymphopoiesis and leukemogenesis. *J Biochem.* 156:73-83. 2014.(review) doi: 10.1093/jb/mvu037
4. Hoshii T, Kasada A, Hatakeyama T, Ohtani M, Tadokoro Y, Naka K, Ikenoue T, Ikawa T, Kawamoto H, Fehling HJ, Araki K, Yamamura K, Matsuda S, Hirao A. Loss of mTORC1 induces developmental blockage in early T-lymphopoiesis and eradicates T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111:3805-10, 2014. doi: 10.1073/pnas.1320265111.
5. Yamada D, Hoshii T, Tanaka S, Hegazy AM, Kobayashi M, Tadokoro Y, Ohta K, Ueno M, Ali MAE, Hirao A. Loss of Tsc1 accelerates malignant gliomagenesis when combined with oncogenic signals. *J Biochem.* 155:227-33, 2014. doi: 10.1093/jb/mvt112.
6. Imai Y, Takahashi A, Hanyu A, Hori S, Sato S, Naka K, Hirao A, Ohtani N, Hara E. Crosstalk between the Rb pathway and AKT signaling forms a quiescence-senescence switch. *Cell Rep.* 7:194-207, 2014. doi: 10.1016/j.celrep.2014.03.006.
7. Takeishi S, Matsumoto A, Onoyama I, Naka K, Hirao A, Nakayama KI. Ablation of Fbxw7 eliminates leukemia-initiating cells by preventing quiescence. *Cancer Cell* 23:347-61, 2013. doi: 10.1016/j.ccr.2013.01.026.
8. Takubo K, Nagamatsu G, Kobayashi CI, Nakamura-Ishizu A, Kobayashi H, Ikeda E, Goda N, Rahimi Y, Johnson RS, Soga T, Hirao A, Suematsu M, Suda T. Regulation of glycolysis by pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell.* 12:49-61, 2013. doi: 10.1016/j.stem.2012.10.011.
9. Baba T, Naka K, Morishita S, Komatsu N, Hirao A, Mukaida N. MIP-1 /CCL3-mediated maintenance of leukemia-initiating cells in the initiation process of chronic myeloid leukemia. *J Exp Med.* 2210:2661-73, 2013. doi: 10.1084/jem.20130112.
10. Uema N, Ooshio T, Harada K, Naito M, Naka K, Hoshii T, Tadokoro Y, Ohta K, Ali, A.E. M, Katano M, Soga T, Nakanuma Y, Okuda A, Hirao A. Abundant nucleostemin expression supports the undifferentiated properties of germ cell tumors. Soga T, Nakanuma Y, Okuda A, Hirao A. *Am J Pathol.* 183:592-603, 2013. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.04.018.
11. Hirao A, Hoshii T. Mechanistic/mammalian target protein of rapamycin signaling in hematopoietic stem cells and leukemia.

- Cancer Sci. 104:977-82, 2013. doi: 10.1111/cas.12189., 2013 (review)
12. Ichimura Y, Waguri S, Sou YS, 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*. 51:618-31, 2013. doi: 10.1016/j.molcel.2013.08.003.
 13. 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*. 122:2114-29, 2012. doi: 10.1172/JCI62279
 14. 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*. 21:3044-54, 2012 doi: 10.1089/scd.2011.0725
 15. 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*. 188:4736-40, 2012 doi: 10.4049/jimmunol.1200069
 16. 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*. 1:360-373, 2012 doi: 10.1016/j.celrep.2012.02.007

[学会発表](計 10 件)

1. Hirao A: Role of c-Kit signal modulation in the control of self-renewal and aging of hematopoietic stem cells. 2015 US-Japan meeting on malignant hematopoiesis and stem cells. March. 16-17, 2015 (Hawaii, USA)
2. Hirao A: The signaling pathways for the determination of hematopoietic stem cell fate. 第 76 回日本血液学会 学術集会, 平成 26 年 10 月 31 日 11 月 2 日(大阪)
3. Hirao A: The nutrient sensing signaling in the cancer stem cells.

第 73 回日本癌学会学術総会, 平成 26 年 9 月 25-27 日, 横浜

4. Hirao A: The nutrient sensing signaling pathways in the hematopoietic and leukemia stem cells. SNUCRI CANCER SYMPOSIUM, April 16-19, 2014(Korea)
5. Hirao A: The nutrient sensing signaling pathways in the hematopoietic stem cells and leukemia. The 23th Hot Spring Harbor International Symposium, Nov.5, 2013, Kyushu University(Fukuoka)
6. 平尾 敦: 栄養センサーシグナルと幹細胞制御 第 86 回日本生化学会大会, 平成 25 年 9 月 11 - 13 日, パシフィコ横浜(横浜)
7. Hirao A: The nutrient sensing signaling pathways in the hematopoietic stem cells and leukemia. 2013 SUCRI-KUCRI Joint Symposium, July 10, 2013, Seoul National University (Korea)
8. 平尾 敦: The nutrient sensing signaling pathways in cancer 第 35 回日本分子生物学会年会 平成 24 年 12 月 11-14 日、福岡国際会議場(福岡)
9. Hirao A: The nutrient sensing signaling pathways in the hematopoietic stem cells and leukemia. New Frontiers of Metabolism Research in Biomedical Sciences Sep. 27-28th, 2012, 東京大学(東京)
10. 平尾 敦: 栄養センサーシグナルとがん幹細胞、第 71 回日本癌学会学術総会 平成 24 年 9 月 19-21 日、ロイトン札幌(札幌)

[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 - ム ペ - ジ :
<http://cri-mol-gen.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)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

(2)(3)研究分担者・連携研究者

なし