

平成 31 年 4 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05131

研究課題名(和文) 幹細胞ニッチのmTORシグナルによる造血機能制御：白血病治療展開への基礎研究

研究課題名(英文) mTORC1 in osteoblastic niche regulates progression of acute myeloid leukemia.

研究代表者

檜井 栄一 (Hinoi, Eiichi)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：70360865

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、幹細胞ニッチの通常造血および急性骨髄性白血病(AML)進展における役割解明を目的とした。骨芽細胞特異的mTORC1活性化マウスを用いて定常状態における造血解析を行った。その結果、造血幹細胞やミエロイド細胞の増加、B細胞の減少が観察された。さらにmTORC1活性化マウスにAML細胞を移植しAMLを発症させ、病態評価を行った。その結果、mTORC1活性化マウスでは、野生型マウスと比較し、有意にAMLの進行が早くなることが明らかとなった。以上の結果より、骨芽細胞性ニッチのmTORC1は通常造血の制御だけでなく、AML進展メカニズムにも関与することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性骨髄性白血病は、骨髄系造血細胞の異常増殖により引き起こされる造血器腫瘍であり、その治療には、抗がん剤を用いた寛解導入療法や造血幹細胞移植療法などが行われている。本研究では、造血幹細胞(白血病幹細胞)側のmTORC1活性ではなく、「ニッチ細胞側のmTORC1活性」による造血幹細胞(白血病幹細胞)の機能調節機構を解明した。これらの一連の研究結果は、造血幹細胞(白血病幹細胞)の機能異常に伴い誘発される各種血液疾患の発症・進展に対する効果的な制御法開発を指向する研究基盤になることが期待されることから、本研究成果の学術的意義および社会的意義は高い。

研究成果の概要(英文)：Hematopoietic stem cells (HSCs) and leukemic stem cells (LSCs) have self-renewal ability to maintain normal hematopoiesis and leukemia propagation, respectively. Recently, it has been reported that bone forming osteoblasts provide a microenvironment for LSCs and are implicated in pathogenesis and progression of leukemia as an osteoblastic niche in bone marrow. We here show a critical role of mTORC1 in regulating normal hematopoiesis and leukemia progression through its expression in osteoblasts in mice. Using a mouse models of acute myeloid leukemia (AML), we revealed that AML cells enhance the mTORC1 activity in osteoblasts in vivo and in vitro. Subsequent analyses determined that inactivation of Tsc1, a negative regulator of mTORC1, in osteoblasts results in a marked acceleration of AML. These findings highlight a critical role of mTORC1 in normal hematopoiesis and leukemia propagation, at least in part, through its expression in osteoblastic niche.

研究分野：薬理学

キーワード：白血病

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

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は全ての血液細胞の源である。造血幹細胞は骨髄に存在し、個体において一生に渡って血液細胞を産生し続ける。造血幹細胞は造血システム全体の恒常性を維持するために、最適なスピードで増殖・分化と同時に自己複製を行わなければならない。近年造血幹細胞の制御機構に、造血幹細胞ニッチと総称される骨髄微小環境が重要な機能を担っていることが明らかになってきた。また、白血病幹細胞においても、同様の機構が存在することが報告されている。白血病幹細胞は、薬剤抵抗性や化学療法後の高い再発率の原因となることも明らかになっており、ニッチを標的とした新規治療戦略の開発が望まれている。しかしながら、白血病幹細胞と骨髄微小環境との間でどのような相互作用が働いているかについて、十分に検討されていないのが現状である。骨髄微小環境を構成する細胞の1つである骨芽細胞は、造血幹細胞の増殖・分化・自己複製等の機能を制御する働きを持つ。また、白血病の発症や進展にも大きく寄与することが知られている。

2. 研究の目的

Mechanistic target of rapamycin (mTOR)は、増殖、代謝や翻訳などの様々な細胞機能を制御するセリン/スレオニンキナーゼであり、哺乳類ではRaptorを含むmTORC1とRictorを含むmTORC2の2種類の独立したシグナル複合体を形成する。Tuberous sclerosis 1 (TSC1)/TSC2は、mTORC1抑制因子である。骨形成系細胞に発現するmTORC1は、骨格形成や骨代謝に重要な働きを担うことが明らかとされており、一方血液細胞においては、急性骨髄性白血病(AML)の発症や進展に関与することも報告されている。しかしながら、骨髄微小環境におけるmTORC1がAMLの進展メカニズムに関与しているかについては明確になっていない。そこで本研究では、新規AML進展メカニズムの解明を目的として、AML発症時の骨芽細胞内mTORC1の活性評価を行うとともに、AML進展に対する骨芽細胞内mTORC1の機能的役割を検討した。

3. 研究の方法

(1)野生型(WT)マウスから、セルソーターを用いて造血幹前駆細胞の集合であるLineage⁻Sca-1⁺c-kit⁺(LSK)細胞を採取した。このLSK細胞にレトロウイルスを用いてAMLの原因遺伝子である*MLL-AF9*を導入し、マウスに移植することでAMLモデルマウスを作製した。骨髄内の骨芽細胞をCD45⁻Lin⁻CD31⁺Sca-1⁺CD51⁺細胞と定義し、フローサイトメーターを用い、4E-BP1のリン酸化を指標にしてAMLモデルマウスの骨芽細胞内mTORC1の活性評価を行った。

(2)新生児マウス頭蓋冠から調製した骨芽細胞とAML細胞の共培養実験等の*in vitro*におけるmTORC1の活性評価にはWestern blotting法を用いた。

(3)*Col1a1-Cre*マウスを用いて「骨芽細胞特異的にmTORC1を活性化させたマウス(*Col1a1-Cre;Tsc1^{fl/fl}*マウス)」を作製し、フローサイトメーターを用いて通常造血時の骨髄における造血機能解析を行った。さらに、*Col1a1-Cre;Tsc1^{fl/fl}*マウスを用いてAMLモデルを作製し、フローサイトメーターを用いて骨髄や末梢血中におけるAML細胞の検出を行った。

4. 研究成果

(1)AMLモデルマウスにおける骨芽細胞内mTORC1活性を評価した。正常細胞のみを移植したマウスと比較し、AMLモデルマウスにおいて骨芽細胞の4E-BP1のリン酸化上昇が観察された。また、骨芽細胞とAML細胞を共培養した場合、骨芽細胞のP70S6Kのリン酸化上昇が認められた。さらにAML細胞の培養上清を用いて骨芽細胞を培養した場合においても、骨芽細胞のP70S6Kのリン酸化上昇が認められた。したがって、モデルマウスを用いた*in vivo*解析および細胞を用いた*in vitro*解析の結果から、AML細胞は骨芽細胞のmTORC1活性を上昇させる能力を有しており、AML細胞由来の液性因子が直接的にその活性上昇に関与している可能性が示された。

(2)「AMLの発症・進展」と「骨芽細胞内mTORC1シグナルの活性化」との相関性を明らかにする目的で、*Col1a1-Cre;Tsc1^{fl/fl}*マウスを用いて定常状態における造血解析を行った。すると、LSK細胞やミエロイド細胞の増加、B細胞の減少が観察された。この表現型がmTORC1に依存しているかどうかを検討するために、*Col1a1-Cre;Tsc1^{fl/fl}*マウスに*Raptor^{fl/+}*を導入したところ、大部分の表現型がレスキューされた。以上の結果より、骨芽細胞内mTORC1の活性化が異常造血を引き起こす要因の1つである可能性が示された。

(3)AMLは未成熟なミエロイド細胞の異常増殖を特徴とするため、*Col1a1-Cre;Tsc1^{fl/fl}*マウスにおいて、確認された異常造血は、AMLの進行を促進させる可能性が考えられた。そこで、次に骨芽細胞内mTORC1のAML発症進展における役割を検討するため、*Col1a1-Cre;Tsc1^{fl/fl}*マウスにAML細胞を移植しAMLを発症させ、病態評価を行った。すると、*Col1a1-Cre;Tsc1^{fl/fl}*マウスでは、WTマウスと比較し、有意にAMLの進行が早くなることが明らかとなった。さらに、骨髄や末梢血中の解析を行ったところ、*Col1a1-Cre;Tsc1^{fl/fl}*マウスでは、AML幹細胞の増殖が促進していることが観察された。

以上の結果より、骨芽細胞内mTORC1は通常造血の制御だけではなく、AML進展メカニズムに

も関与することが示された。本研究成果は、造血幹細胞（白血病幹細胞）の機能異常に伴い誘発される各種血液疾患の発症・進展に対する効果的な制御法開発を指向する研究基盤になることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 27 件)

Iezaki T., Horie T., Fukasawa K., Kitabatake M., Nakamura Y., Park G., Onishi Y., Ozaki K., Kanayama T., Hiraiwa M., Kitaguchi Y., Kaneda K., Manabe T., Ishigaki Y., Ohno M. and Hinoi E.: Translational Control of Sox9 RNA by mTORC1 Contributes to Skeletogenesis. *Stem Cell Reports* 11:228-241. 2018. 査読あり

doi: 10.1016/j.stemcr.2018.05.020.

Iezaki T., Fukasawa K., Horie T., Park G., Robinson S., Nakaya M., Fujita H., Onishi Y., Ozaki K., Kanayama T., Hiraiwa M., Kitaguchi Y., Kaneda K., Yoneda Y., Takarada T., Guo X.E., Kurose H. and Hinoi E.: The MAPK Erk5 is necessary for proper skeletogenesis involving a Smurf-Smad-Sox9 molecular axis. *Development* 145:dev164004. 2018. 査読あり

doi: 10.1242/dev.164004.

Takarada T., Xu C., Ochi H., Nakazato R., Yamada D., Nakamura S., Kodama A., Shimba S., Mieda M., Fukasawa K., Ozaki K., Iezaki T., Fujikawa K., Yoneda Y., Numano R., Hida A., Tei H., Takeda S. and Hinoi E.: Bone resorption is regulated by circadian clock in osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* 32:872-881. 2017. 査読あり

doi: 10.1002/jbmr.3053.

Fukasawa K., Park G., Iezaki T., Horie T., Kanayama T., Ozaki K., Onishi Y., Takahata Y., Yoneda Y., Takarada T., Kitajima S., Vacher J. and Hinoi E.: ATF3 controls proliferation of osteoclast precursor and bone remodeling. *Sci. Rep.* 6:30918. 2016. 査読あり

doi: 10.1038/srep30918.

Iezaki T., Fukasawa K., Park G., Horie T., Kanayama T., Ozaki K., Onishi Y., Takahata Y., Nakamura Y., Takarada T., Yoneda Y., Nakamura T., Vacher J. and Hinoi E.: The transcriptional modulator *Ifrd1* regulates osteoclast differentiation through enhancing NF- κ B/NFATc1 pathway. *Mol. Cell. Biol.* 36:2451-2463. 2016. 査読あり

doi: 10.1128/MCB.01075-15.

Iezaki T., Ozaki K., Fukasawa K., Inoue M., Kitajima S., Muneta T., Takeda S., Fujita H., Onishi Y., Horie T., Yoneda Y., Takarada T. and Hinoi E.: ATF3 deficiency in chondrocytes alleviates osteoarthritis development. *J. Pathol.* 239:426-437. 2016. 査読あり

doi: 10.1002/path.4739.

Takarada T., Nakazato R., Tsuchikane A., Fujikawa K., Iezaki T., Yoneda Y. and Hinoi E.: Genetic analysis of *Runx2* function during intramembranous ossification. *Development* 143:211-218. 2016. 査読あり

doi: 10.1242/dev.128793.

Iezaki T., Onishi Y., Ozaki K., Fukasawa K., Takahata Y., Nakamura Y., Fujikawa K., Takarada T., Yoneda Y., Yamashita Y., Shioi G. and Hinoi E.: The transcriptional modulator interferon-related developmental regulator 1 in osteoblasts suppresses bone formation and promotes bone resorption. *J. Bone Miner. Res.* 31:573-584. 2016. 査読あり

doi: 10.1002/jbmr.2720.

〔学会発表〕(計 10 件)

檜井栄一：骨組織を基軸とした臓器間ネットワーク。第159回日本獣医学会学術集会。2016年。

檜井栄一：BMPシグナルと骨代謝。第18回応用薬理シンポジウム。2016年。

檜井栄一：骨組織を基軸とした生体恒常性維持機構。Advans研究会2016。2016年。

檜井栄一：骨組織を中心とした臓器連関および疾患発症連関。日本薬学会第137年会。2017年。

檜井栄一：エネルギー代謝からみた骨代謝制御。第19回日本骨粗鬆症学会。2017年。

檜井栄一：柑橘系と運動器の健康。日本薬学会第138年会。2018年。

檜井栄一：骨軟骨代謝調節と時計遺伝子について。第25回日本時間生物学会学術大会。2018年。

檜井栄一：骨を造る細胞の新たな役割 ~免疫・代謝・記憶~。第40回日本臨床栄養学会総会・第39回日本臨床栄養協会総会・第16回大連合大会。2018年。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~yakuri/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

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：家崎高志

ローマ字氏名：Iezaki Takashi

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。