

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料  
〔平成31年度（2019年度）研究進捗評価用〕

平成28年度採択分  
平成31年 3月 10日現在

全てのヒト骨髄性腫瘍が依存する、新規がん幹細胞維持機構の  
解明

Elucidation of novel molecular machineries for  
maintaining the cancer stemness in human myeloid  
malignancies

課題番号：16H06391

赤司 浩一（AKASHI, KOICHI）

九州大学・医学研究院・教授



研究の概要（4行以内）

ヒト骨髄系腫瘍におけるがん幹細胞である白血病幹細胞は、腫瘍の本体ともいえる少数の幹細胞性を有する白血病細胞である。本研究課題においては、先行研究における白血病幹細胞特異的分子であるTIM-3研究を一つの軸として、種々のオミクス解析を組み合わせることで、ヒト骨髄系白血病幹細胞の新規幹細胞性維持機構について、その解明を試みる。

研究分野：血液学

キーワード：がん幹細胞、白血病幹細胞

1. 研究開始当初の背景

造血器腫瘍分野においては、いわゆる「がん幹細胞」の存在が広く認められている。がん幹細胞はがんを構成する細胞の階層の頂点に位置し、自己複製を行う一方で腫瘍細胞への分化能力を有する幹細胞性を保持したがん細胞である。がん幹細胞は一般的に治療抵抗性であり、治療後に長期残存し、再発において重要な役割を担う。このように環境や外的ストレスに適応し潜むがん幹細胞の可塑性・柔軟性が新たに注目されている。端的に“静（耐える）”と“動（増える）”と表現できるがん幹細胞特有の振る舞いは、転写・シグナル・細胞回転などを制御する代謝・エピゲノムなどの細胞内因子や、がん幹細胞の微小環境からのシグナルなどの細胞外因子などにより規定されると予想され、がん幹細胞制御のためにはこれらのメカニズムを明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

骨髄系腫瘍におけるがん幹細胞である白血病幹細胞の腫瘍特異的分子群の解析を通して、全てのヒト骨髄系悪性腫瘍共通の、がん幹細胞成立・維持機構の解明とその制御基盤を確立することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

先行研究で我々の同定したヒト白血病幹細胞特異的表面抗原分子TIM-3をはじめとしたいくつかの表面抗原を用いた白血病幹細胞の純化を行い、複数のオミクス解析を通して、ヒト白血病幹細胞の動的シグナルと静的シ

グナルの解析を行い、悪性幹細胞成立、維持機構の解明に取り組んだ。

4. これまでの成果

(A)新規 canonical Wnt pathway 活性化機構としてのTIM-3シグナルの解明

平成28-30年度の研究遂行過程で、骨髄系白血病幹細胞に必須のTIM-3分子の下流シグナルの探索を進めた。リガンドであるgalectin-9のTIM-3への結合により、ヒト白血病幹細胞においては、Src family kinaseの一つであるHCKがTIM-3の細胞質内ドメインに結合し、活性化することを見出した。我々は、先行研究においてTIM-3シグナルが $\beta$ -catenin蓄積を生じることを見出しており、HCKと $\beta$ -cateninを制御するcanonical Wnt pathwayとの関連性を評価したところ、TIM-3シグナルの下流で活性化したHCKが、canonical Wnt pathwayにおける初期段階の反応であるp-120 cateninの活性化をWnt ligand非依存的に誘導し、以後のLRP6のリン酸化を含むcanonical Wnt pathwayの活性化を生じることを見出した。すなわち、TIM-3シグナルはヒト白血病幹細胞特異的な新規canonical Wnt pathway活性化経路であることが明らかになった。

B)新たなAML治療標的分子DCPSの同定

平成28-30年度の研究遂行過程で、CRISPRによる機能的スクリーニングを用いたアプローチによって、AMLに対する新規治療標的分子探索を行った。その結果、AML細胞が生存するために必須の遺伝子として130の遺伝

子を同定し、そのなかから、既に阻害薬が入手可能であった DCPS (mRNA decapping enzyme scavenger) に着目した。DCPS 阻害薬 (RG3039) を用いて、その抗白血病効果を検証したところ、RG3039 は濃度依存性に AML 細胞増殖を抑制した。さらに、PDX モデルを用いた実験結果から、in vivo における抗白血病効果も確認された。抗白血病効果の背景にある分子機構を探るため行った IP-Mass spectrometry・RNA-seq から、DCPS は mRNA export、pre-mRNA スプライシングといった、pre-mRNA 代謝経路と関与していることが示され、DCPS 阻害は AML 細胞に mRNA 異常スプライシングを引き起こすことが明らかとなった。さらに、RG3039 処理後 AML 細胞においては、I 型インターフェロン応答に類似したトランスクリプトーム変化がみられ、細胞内に惹起されるインターフェロン様変化が、DCPS 阻害剤の抗白血病効果の一端を担っている可能性が示唆された。

#### (C) 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同定

平成 28-30 年度の研究遂行過程で、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、特定のアミノ酸の細胞内含有量が、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。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、食餌中の特定のアミノ酸制限を行うことで 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。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していたことから、特定のアミノ酸代謝機構が悪性造血幹細胞の幹細胞性制御に重要な役割を担うと考えられた。今後その分子機構について詳細に検討を行い、アミノ酸代謝により白血病幹細胞性維持機構の解明に取り組む。

#### 5. 今後の計画

TIM-3 分子による白血病幹細胞の自己複製能制御機構は、上述のように骨髄系白血病幹細胞における下流分子の探索までほぼ完了しており、今後は同定した白血病幹細胞特異的な下流分子群の中から、治療標的分子の導

出を行い、TIM-3 シグナルを標的とした治療モデルの確立に取り組む。さらに同一の TIM-3 シグナルであっても骨髄系白血病幹細胞と exhausted T 細胞では、使用される TIM-3 シグナルの下流分子群が全く異なることを見出しており、腫瘍特異的な TIM-3 シグナルと exhausted T 細胞における TIM-3 シグナルの差を明確にする。また、オミクス解析についてはメタボロームデータベースの構築を中心に、骨髄系白血病幹細胞に共通する代謝特性の解明に取り組む。上述の BCAA 代謝経路以外にも複数の白血病幹細胞特異的な代謝メカニズムを現時点で同定できていることから、そのデータを発展させて、本研究計画の目的である骨髄系がん幹細胞が依存する新規の幹細胞性維持機構の解明に代謝研究の観点からも取り組む。

#### 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. T. Yamauchi *et al.*, Genome-wide CRISPR-Cas9 Screen Identifies Leukemia-Specific Dependence on a Pre-mRNA Metabolic Pathway Regulated by DCPS. *Cancer Cell* **33**, 386-400 e385 (2018).
2. M. Nakano *et al.*, Dedifferentiation process driven by TGF-beta signaling enhances stem cell properties in human colorectal cancer. *Oncogene*, (2018).
3. T. Sugio *et al.*, Microenvironmental immune cell signatures dictate clinical outcomes for PTCL-NOS. *Blood Adv* **2**, 2242-2252 (2018).
4. K. Miyawaki *et al.*, Identification of unipotent megakaryocyte progenitors in human hematopoiesis. *Blood* **129**, 3332-3343 (2017).
5. J. Yuda *et al.*, Persistent detection of alternatively spliced BCR-ABL variant results in a failure to achieve deep molecular response. *Cancer Sci* **108**, 2204-2212 (2017).
6. M. Minami *et al.*, Comparative analysis of pulmonary hypertension in patients treated with imatinib, nilotinib and dasatinib. *Br J Haematol*, (2017).
7. A. Yurino *et al.*, Enhanced Reconstitution of Human Erythropoiesis and Thrombopoiesis in an Immunodeficient Mouse Model with Kit (Wv) Mutations. *Stem Cell Reports* **7**, 425-438 (2016).

#### 7. ホームページ等

<http://www.1nai.med.kyushu-u.ac.jp>