

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17416

研究課題名（和文）RNA結合因子によるがん幹細胞の運命決定制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of cancer stem cell by RNA binding protein

研究代表者

服部 鮎奈（Hattori, Ayuna）

京都大学・医生物学研究所・准教授

研究者番号：60820420

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：がん組織には、再発や転移の原因となる特殊な細胞集団であるがん幹細胞が存在することが近年明らかにされてきた。正常な組織幹細胞と同様に、がん幹細胞は自身の未分化性を保つと同時に、増殖能の強いがん細胞を産生する二つの側面を持つ。本研究は、このがん幹細胞の未分化性を維持する新たな活性制御機構について解明することを目指した。その結果、未分化性を維持するのに必須のRNA結合タンパク質が翻訳制御を受けることでがん幹細胞が分化すること、分化することでがん幹細胞が消失することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗がん剤治療における重要な課題は、がん幹細胞によって引き起こされる治療抵抗性と再発・転移である。がん幹細胞は、そのみで腫瘍を再構築する能力を持つ特殊な細胞集団で、未分化状態を維持した自己を保つと同時に、腫瘍の維持に寄与する。動物モデルを用いた研究では、がん幹細胞の除去によりがん組織が消失することが示された。しかし、いまだがん幹細胞を標的とした治療は存在しない。本研究では、がん幹細胞の未分化性を維持するタンパク質の活性制御機構の一端を明らかにした。今後、この制御分子を同定することで、これを基にした創薬に繋がる重要な成果だと考えている。

研究成果の概要（英文）：Cancer Stem Cells (CSCs) are a small subpopulation of cells within tumors with capabilities of self-renewal, differentiation, and tumor reconstitution. In this study, we aimed to elucidate a novel regulatory mechanism to maintain cancer stem cells via RNA binding protein. We found that the amount of the protein, which is essential for leukemia growth, is regulated by post translational modification. Ectopic expression of the modified protein led to cancer stem cell differentiation. These results suggest that this translational modification pathway may become a novel therapeutic target of leukemia treatments.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん幹細胞 細胞運命決定 白血病

## 1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞は、化学療法薬や放射線照射に高い抵抗性を示し、がん組織の長期的維持や部分寛解後の再発に寄与する細胞集団で、白血病や脳腫瘍など様々な腫瘍に存在する。動物モデルを用いた実験では、がん幹細胞を除くことでがんが治癒することが証明されている。従って、がん幹細胞システムの分子的理解は、腫瘍生物学的にもがん幹細胞を標的とする治療法開発という観点からも不可欠である。がん幹細胞制御に与る経路として、Notch, Wnt, Shh 等のシグナル経路や、RUNX1, HOX 等の転写制御因子が同定されてきた。なかでも RNA 結合因子は、遺伝子の転写段階ではなく、mRNA を標的とした転写後制御を介して白血病幹細胞の機能維持に機能する。私はこれまでに、RNA 結合因子 X (RBD-X) の標的としてアミノ酸代謝酵素 BCAT1 遺伝子を同定し、BCAT1 が白血病幹細胞の維持に必須であることを明らかにしてきた。一方で、RBD-X 自身の発現・活性・機能がどのように調節されているかは不明な点が残されている。最近、私は、RBD-X の活性がタンパク質の限定分解によって制御される可能性を示す知見を得た。そこで、本研究では、細胞運命決定因子 RBD-X の活性制御機構を解明することで、がん幹細胞システムに関わる仕組みを理解することを目指した。

## 2. 研究の目的

RBD-X 自身の活性・機能がどのように調節されているか検討する過程で私は、RBD-X タンパク質が細胞内で部分切断されることを発見した。この現象に着目し、「タンパク切断が Msi 2 を不活性化する制御機構として働き、切断型 RBD-X が増加した幹細胞では自己複製能を維持できずに分化に至る」との仮説を立てた。本研究では、白血病のマウスモデルと生化学的手法を用いてこの仮説を検証する。これまでの解析から以下のことが示唆された。

- 強制発現させた RBD-X は骨髄由来造血細胞株 32D 内で C 末端側が切断されるが、線維芽細胞など非造血細胞では切断されない
- RNA 結合部位に変異を導入した RBD-X RBD 変異体は切断を受けない
- マウス白血病細胞中の内在性 RBD-X は、未分化細胞では全長型のみが検出されたのに対し、分化したがん細胞ではほぼ全てが切断されている

RBD-X は、C 末端側で PolyA RNA 結合タンパク質 PABP と結合し、翻訳開始因子 eIF4E による翻訳反応を制御する。すなわち、RBD-X の C 末端領域は標的 RNA の翻訳制御に必須であり、この領域を欠損する切断型 RBD-X は標的 RNA の翻訳制御を行えないと考えられた。実際に、RBD-X 欠損白血病細胞のコロニー形成能の低下は、PABD 結合ドメインを欠失させた RBD-X の過剰発現ではレスキューされなかった。以上の研究結果は、自己複製する白血病幹細胞では RBD-X タンパク質が全長型で存在するのに対し、分化し自己複製能を失ったがん細胞では RBD-X が限定分解により不活性化していることを示唆している。そこで、本研究では RBD-X の限定分解が、RBD-X の機能を抑制し、白血病幹細胞の分化を誘導する可能性について検討する。この可能性を検討するため、以下の方法で本研究を進めた。

## 3. 研究の方法

項目 1：がん幹細胞の自己複製能・生存における、RBD-X 限定分解の意義

RBD-X タンパク質の切断により RNA 結合ドメインと翻訳制御活性に必要な PABP 結合領域が分離することから、切断型 RBD-X は機能的に不活性であることが予想される。この点を明らかにするため、切断部位以降を欠損した RBD-X $\Delta$ C 変異体、切断部位以降の RBD-X $\Delta$ N 変異体および、切断されない非切断型 RBD-X 変異体を作成し、コロニー形成法を用いて検証する。野生型 (WT) の白血病細胞は半固形培地中で造血細胞コロニーを形成するが、RBD-X 欠損 (KO) 細胞ではコロニー形成率が著しく低下することがわかっている。そこで、RBD-X 欠損細胞にレトロウイルスを用いて得られた各変異体を発現し、KO 細胞のコロニー形成異常が抑圧されるか検

討した。

#### 項目 2：細胞分化を決定する RBD-X 切断酵素の同定と機能解析

RBD-X の切断にはプロテアーゼの関与が考えられるので、本項目では生化学的手法を用いてこれを同定するため、プロテアーゼの分子的特徴を明らかにする。具体的には、マウス白血病細胞を用いて、プロテアーゼの細胞内局在や細胞の分化度による活性変化を明らかにする。また、精製のため、切断の至適塩濃度、pH、温度、反応液を検討することで、カラムクロマトグラフィーによるプロテアーゼの精製条件を検討する。加えて、プロテアーゼ以外の、RNA や阻害因子などの RBD-X タンパク質の切断を制御する因子の同定を行う。

#### 4 . 研究成果

当初研究計画では、がん幹細胞の自己複製能・生存における、RBD-X 限定分解の意義を解明することを第一の目的として研究を遂行してきた。これまでの研究期間で、切断された RBD-X の N 末断片および C 末断片の両方の質量分析により、RBD-X の切断部位が C 末端側に存在する PABD ドメインの直前であることを発見した。マウス白血病細胞およびヒト白血病培養細胞を用いた解析から、自己複製する白血病幹細胞では RBD-X タンパク質が全長型で存在するのに対し、自己複製能を失ったがん細胞では RBD-X が限定分解により不活性化することで分化が誘導されることを明らかにした。細胞分化を決定する RBD-X 切断因子の同定を進める中で、RBD-X 切断の特徴として複数の興味深い発見があった。第一に、RNA 結合部位に変異を導入した RBD-X 変異体は切断を受けないことと、切断活性を持つ細胞抽出液に RNase 処理を行うと切断活性を失うことから、切断は RBD-X が標的 mRNA に結合している状態で引き起こされることが示唆された。これは、total RNA の再添加によって回復したことから、確かに RNA が切断に寄与することが示唆された。また、切断活性を持つ白血病細胞を細胞質・核質・クロマチン画分に分けて活性を調べたところ、細胞質画分はほとんど RBD-X 切断活性を持たず、核質・クロマチン画分で高い活性が観察された。さらに細胞内 RBD-X の免疫染色を行うと RBD-X が細胞質だけでなく核にも局在することが明らかになった。また、非切断型 RBD-X を作成するため、切断部位周辺に変異を導入したが、完全に切断を抑制することができなかったことから、RBD-X の切断因子は、RBD-X の特定の配列を認識していない可能性があることや、RNA 依存的に切断を起こすことなど、既知のプロテアーゼとは異なった性質をもっていることがわかってきている。新たに採択された基盤 B 研究課題において、切断活性をもつ細胞抽出液の分画を進めており当初計画どおり来年度中にプロテアーゼを同定し、この機能解析を進めていく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakagawa Makoto, Yamaguchi Masayuki, Endo Makoto, Machida Yukino, Hattori Ayuna, Tanzawa Fumie, Tsutsumi Shinji, Kitabayashi Issay, Kawai Akira, Nakatani Fumihiko	4. 巻 34
2. 論文標題 Clinical usefulness of 2-hydroxyglutarate as a biomarker in IDH-mutant chondrosarcoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bone Oncology	6. 最初と最後の頁 100430 ~ 100430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbo.2022.100430	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 山本 佳輝, 伊藤 貴浩, 服部 鮎奈	4. 巻 84
2. 論文標題 代謝からみえる幹細胞の機能制御と造血管腫瘍	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 血液内科	6. 最初と最後の頁 658-665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 3.Ohtawa T, Hattori A, Isokawa M, Harada M, Funatsu T, Ito T, Tsunoda M.	4. 巻 1
2. 論文標題 Determination of intracellular 2-hydroxyglutarate enantiomers using two-dimensional liquid chromatography	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Chrom Open	6. 最初と最後の頁 100005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Fujiwara Takuya, Hattori Ayuna, Ito Takahiro, Funatsu Takashi, Tsunoda Makoto	4. 巻 12
2. 論文標題 Analysis of intracellular $\alpha$ -keto acids by HPLC with fluorescence detection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Methods	6. 最初と最後の頁 2555 ~ 2559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0ay00556h	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Jimbo Koji, Hattori Ayuna, Koide Shuhei, Ito Takahiro, Sasaki Katsuhiko, Iwai Kazuhiro, Nannya Yasuhito, Iwama Atsushi, Tojo Arinobu, Konuma Takaaki	4. 巻 37
2. 論文標題 Genetic deletion and pharmacologic inhibition of E3 ubiquitin ligase H0IP impairs the propagation of myeloid leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 122 ~ 133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-022-01750-7	査読の有無 無
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 Shinohara Haruka, Sawado Rie, Nakagawa Makoto, Hattori Ayuna, Yamagata Kazutsune, Tauchi Kimiharu, Ito Jumpei, Kuwahara Yasumichi, Okuda Tsukasa, Ogawa Chitose, Kitabayashi Issay	4. 巻 27
2. 論文標題 Dual targeting of EZH1 and EZH2 for the treatment of malignant rhabdoid tumors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Oncolytics	6. 最初と最後の頁 14 ~ 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omto.2022.09.006	査読の有無 無
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 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Yamamoto Y. and Hattori, A.
2. 発表標題 Regulation of branched-chain amino acid metabolism in chondrosarcoma.
3. 学会等名 The 5th Annual Meeting of the Japanese Society of Sarcoma
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yamamoto Y. and Hattori, A.
2. 発表標題 The DBHS family proteins in leukemogenesis.
3. 学会等名 The 26th Annual Meeting of Hematologic Malignancies.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hattori, A
2. 発表標題 The RNA binding protein Nucleolin is essential for stem cell maintenance in myeloid leukemia.
3. 学会等名 The 26th Annual Meeting of Hematologic Malignancies.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yamamoto Y. and Hattori, A
2. 発表標題 Essential Role of activated BCAA metabolism in chondrosarcoma
3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hattori, A
2. 発表標題 Metabolic changes during leukemia progression
3. 学会等名 The 31st Annual Conference on New Drug Discovery
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ayuna Hattori, Issai Kitabayashi, Takahiro Ito
2. 発表標題 Regulation of amino acid metabolism in myeloid leukemia
3. 学会等名 The 80th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ayuna Hattori, Issai Kitabayashi, Takahiro Ito
2. 発表標題 Amino acid metabolism regulates leukemia propagation
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 服部 鮎奈, 山本 佳輝, 中野 隆斗, 長船 花音, 中山 泰斗, 慶澤 遥, 伊藤 貴浩
2. 発表標題 アミノ酸代謝制御を介したがん細胞運命決定機構
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022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

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