

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 24 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23650593

研究課題名（和文） マルチオミクス解析システムによる白血病幹細胞分化制御機構の解明

研究課題名（英文） Understanding of molecular mechanisms regulating leukemia stem cell behavior by multi-omics analysis

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

研究成果の概要（和文）：

蛋白翻訳・細胞成長を司る mTOR 複合体 1 は、様々な腫瘍組織において、その発がんや悪性進展過程におけるがん動態と深くかかわっている。我々は、mTOR 複合体 1 活性制御が白血病幹細胞分化にとって極めて重要な因子ではないかと考え、マルチオミクス解析システム解析を行った。その結果、mTOR 複合体 1 欠損により、多くの分子においてリン酸化状態の変動が確認された。この手法により、白血病幹細胞制御因子に関する多くの手掛かりが得られると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

mTOR is an evolutionarily conserved kinase in eukaryotes that plays a critical role in sensing and responding to factors such as nutrient availability, energy sufficiency, stress, hormones, and mitogens. Since it was reported that mTOR complex 1 (mTORC1) dysregulation promotes leukemogenesis and depletes hematopoietic stem cells, we attempted to understand the pathological roles of mTORC1 in leukemia behavior by multi-omics technology. In this study, we found that there are particular cell population showing obvious resistance to mTORC1 inactivation, and found several candidate molecules that are involved in the regulation of leukemia stem cells.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：幹細胞生物学

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：白血病幹細胞、mTOR

1. 研究開始当初の背景

mTOR は、Raptor、mLST8/GβL、PRAS40 などからなる mTOR 複合体 1 と Rictor、mLST8、SIN1、Protor からなる mTOR 複合体 2 を構成するセリンスレオニンキナーゼである。mTOR 複合体 1 は、蛋白翻訳抑制に働く 4E-BP をリン酸化し、その機能を抑制する。また、リボソームの生合成を促進する S6K のリン酸化・活性化に寄与する。その他、多くの標的蛋白をリン酸化することにより、

広く細胞内の蛋白翻訳を亢進させ、細胞成長（細胞の大きさ）を制御する。一方、mTOR 複合体 2 は、AKT、SGK1、PKC α などをリン酸化し、細胞骨格、シグナル伝達の制御などに関与している。

mTOR 複合体 1 を活性化するシグナル伝達経路として最も知られているのは、インスリン・成長因子受容体から惹起される PI3K-AKT シグナルである。また、低栄養・低酸素条件下や AMP 増加時には AMPK を介して、TSC 複合体の活性化と mTOR 複合体

1 の不活性化を誘導することが知られている。さらに、RagGTPase を介したアミノ酸シグナルの関与が報告されている。mTOR 複合体 1 は、蛋白合成の促進だけではなく、自身の細胞小器官の消化・再利用に重要なオートファジー制御や、ミトコンドリアの代謝制御に関わることも報告されている。以上のように、mTOR は、成長因子、糖、アミノ酸などを含む栄養センサーとして中心的役割を果たしているが、生体内でのシグナル制御の詳細は不明である。

mTOR は、白血病を含む多くのがんで活性化していることが知られている。PTEN 欠損マウスは、白血病を発生するが、mTOR 複合体 1 阻害剤である Rapamycin を投与すると、その白血病化が抑制される。このように、白血病の発症において、mTOR 複合体 1 は必須の役割を果たしているが、一方で、発症後の白血病に対する影響は明らかではない。また、Rapamycin のようなアロステリック型阻害剤は、mTOR 複合体 1 の活性を十分に抑制できないということも知られてきた。

以上のような状況から、我々は、遺伝子改変マウスを駆使し、発症そのものではなく、発症後の白血病細胞の挙動に関する mTOR 複合体 1 の役割を解析しようという着想するに至った。特に、代謝産物およびリン酸化蛋白の変動を解析することによって、白血病幹細胞動態制御が理解できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目標は、mTOR 複合体 1 に焦点を当て、栄養代謝シグナルによる白血病幹細胞制御機構を明らかにすることである。そのため、mTOR 複合体 1 の必須のコンポーネントである Raptor の変異マウスを用いて、白血病モデルを作成した。このモデルでの白血病表現型とプロテオーム、メタボローム解析を組み合わせ、白血病幹細胞制御因子の解明を目指した。

3. 研究の方法

mTOR 複合体 1 の活性を遺伝的に失活させるため、Raptor 遺伝子のエクソン 2 を挟む形で loxP サイトを挿入した遺伝子改変マウス (Raptor flox/flox) を準備した。このマウスは、C57BL6 と交配を続け、遺伝背景を均一にし、実験に使用した。さらに、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。白血病モデルの作製には、変異マウスより骨髓細胞を採取し、

レトロウイルスにて MLL-AF9 遺伝子を導入し、放射線照射をレシビエントマウスの尾静脈より注入し移植を行った。移植後タモキシフェンを投与し、白血病細胞でのノックアウトを誘導した。

リン酸化プロテオーム解析のためには、細胞を破碎して得られるタンパク質抽出物に対して還元アルキル化反応を行った後、トリプシンによる酵素消化を行った。得られたペプチド混合物に対してチタニアカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーを行い、リン酸化ペプチドを濃縮した。最終的に得られたリン酸化ペプチドをナノ LC-MS/MS により分析し、リン酸化ペプチドの同定、及び定量を行った。リン酸化ペプチド濃縮には HAMMOC 法 (Hydroxy Acid Modified Metal Oxide Chromatography 法) を使用し、リン酸化ペプチドを高選択的かつ高回収率で濃縮した。また、定量解析は安定同位体標識したアミノ酸存在下で培養する手法 (Stable Isotope Labeled Amino acid Culture: SILAC) を用いた。

メタボローム解析のためには、イオン性物質に対して高分離能を有するキャピラリー電気泳動 (CE) に高選択、高感度検出器である質量分析計 (MS) を組み合わせた CE-MS 法により計測した。

4. 研究成果

Raptor 欠損マウスとコントロールマウスより胎児線維芽細胞を採取し、培養中にタモキシフェンを添加した。Raptor 欠損により、顕著な増殖抑制が認められた。ウェスタンブロットティングにより、mTOR 複合体 1 の下流である S6 および 4EBP1 のリン酸化の低下が認められた (図)。このことから、本実験系で mTOR 複合体 1 の活性低下あるいは消失状態を誘導することを確認した。

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、骨髓細胞、脾臓、胸腺などの造血組織の重量が有意に低下した。これらの表現型は、mTOR 複合体 1 の活性低下による増殖抑制および細胞死によるものであると考えられた。

白血病モデルにおいては、コントロール白血病マウスは、20 日程度で白血病死亡したのに対して、Raptor を欠損させると有意に死亡期間が延長した。骨髓細胞を調べると、Raptor 欠損白血病で顕著にアポトーシスが誘導されていた。しかし、一部の細胞集団は mTOR 複合体 1 の活性を低下させるにも拘らず、抵抗性を示した。

白血病細胞中約 5000 のリン酸化ペプチド

を解析することができた。そのうちの 63 ペプチドで、mTOR 複合体 1 欠損によるリン酸化レベルの低下を認めた。この中の 19 ペプチドでは rapamycin によるリン酸化の低下が認められた。この結果により、アロステリック阻害剤と遺伝子欠損との間に mTOR 複合体 1 活性低下に対する効果の相違があることが判明した。今回得られたリン酸化蛋白の中に、白血病幹細胞動態を制御する重要な分子が含まれることが考えられた。一方、代謝産物の解析に関しては、75 の陽イオンと 100 余りの陰イオンが検出された。その中でも特に核酸代謝に関連するメタボライトの変動が確認された。今回の研究では、これらの分子、代謝経路の意義については十分な理解に至っていないが、今後の白血病幹細胞病態解明に大きく進む萌芽的意義のある研究となったと考えられた。

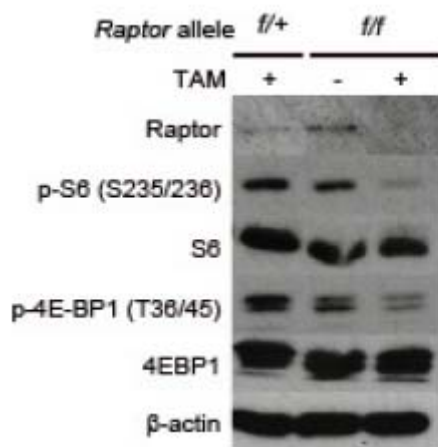


図 Raptor 欠損繊維芽細胞における mTOR 下流分子の変化

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① 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.*, 2012, in press 査読あり
- ② Shugo H, Ooshio T, Naito M, Naka K, Hoshii T, Tadokoro Y, Muraguchi T, Tamas A, Uema N, Yamashita T, Nakamoto Y, Suda T, Kaneko S, Hirao A. Nucleostemin in injury-induced liver regeneration. *Stem Cells and Develop.*, 2012, in press 査読あり
- ③ 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.* 2012 188:4736-40 査読あり 10.4049/jimmunol.1200069
- ④ 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.* 2012 1:360-373 査読あり 10.1016/j.celrep.2012.02.007
- ⑤ El Ghamrasni S, Pamidi A, Halaby MJ, Bohgaki M, Cardoso R, Li L, Venkatesan S, Sethu S, Hirao A, Mak TW, Hande MP, Hakem A, Hakem R. Inactivation of chk2 and mus81 leads to impaired lymphocytes development, reduced genomic instability, and suppression of cancer. *PLoS Genet.* 7:e1001385, 2011 査読あり 10.1371/journal.pgen.1001385
- ⑥ Sampetean O, Saga I, Nakanishi M, Sugihara E, Fukaya R, Onishi N, Osuka S, Akahata M, Kai K, Sugimoto H, Hirao A, Saya H. Invasion precedes tumor mass formation in a malignant brain tumor model of genetically modified neural stem cells. *Neoplasia.* 13:784-91, 2011. 査読あり 10.1593/neo.11624
- ⑦ Motohara T, Masuko S, Ishimoto T, Yae T, Onishi N, Muraguchi T, Hirao A, Matsuzaki Y, Tashiro H, Katabuchi H, Saya H, Nagano O. Transient depletion of p53 followed by transduction of c-Myc and K-Ras converts ovarian stem-like cells into tumor-initiating cells. *Carcinogenesis.* 32:1597-606, 2011 査読あり 10.1093/carcin/bgr183
- ⑧ Naka K, Hirao A. Maintenance of genomic integrity in hematopoietic stem cells. *Int J Hematol.* 93:434-9,

2011. 査読あり
10.1007/s12185-011-0793-z

- ⑨ Naka K, Hoshii T, Tadokoro Y, Hirao A. Molecular pathology of tumor-initiating cells: lessons from Philadelphia chromosome-positive leukemia. *Pathol Int.* 61:501-8, 2011.
査読あり
10.1111/j.1440-1827.2011.02688.x

〔学会発表〕(計 6 件)

- ① Hirao A: Roles of PI3K-AKT signaling in the maintenance of stem cell properties in normal hematopoiesis and leukemia, G0 symposium, 平成 23 年 10 月 24 日 OIST (沖縄)
- ② 平尾 敦: 白血病治療抵抗性と幹細胞制御 第 16 回分生研シンポジウム 平成 23 年 10 月 12 日、東京大学弥生講堂(東京)
- ③ Hirao A: Molecular mechanisms regulating maintenance of leukemia stem cells by PI3K-AKT pathway 第 70 回日本癌学会 平成 23 年 10 月 3 日、名古屋国際会議場 (名古屋)
- ④ Hirao A: Role of PI3K-AKT signals in the maintenance of stem cells in normal hematopoiesis and leukemia 第 84 回日本生化学会, 平成 23 年 9 月 24 日、国立京都国際会館 (京都)
- ⑤ 平尾 敦: 白血病治療的抵抗性メカニズムと幹細胞、北海道大学遺伝子病制御研究所 共同研究集会 平成 23 年 9 月 7 日、北海道大学講堂(北海道)
- ⑥ 平尾 敦: PI3K-AKT シグナルによるがん幹細胞制御機構の解明と治療戦略、日本がん分子標的治療学会 平成 23 年 6 月 24 日、ホテル日航東京 (東京)

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)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし