

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460361

研究課題名(和文) 静止期制御因子を指標とした造血幹細胞不均一性の解明

研究課題名(英文) Understanding of the molecular mechanisms of hematopoietic stem cell heterogeneity by quiescence regulatory factors

研究代表者

上野 将也 (Ueno, Masaya)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：20334766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：最近の研究により、造血幹細胞は極めて多様な生物活性を持ったヘテロな集団であることが判明している。生体はこの造血幹細胞の不均一性を維持することで、造血システムを長期間維持し、様々なストレスに対応していると考えられる。本研究では、分裂活性や細胞周期制御に極めて重要なmTORキナーゼ複合体とフォークヘッド転写因子Foxoに着目し、これらの分子に制御を受ける遺伝子を網羅的に解析した。さらに、CRISPR/Cas9を利用した分子機能スクリーニングを実施することで、造血幹細胞や白血病幹細胞の不均一性に寄与する分子経路を複数同定した。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have revealed that hematopoietic stem cells (HSCs) form heterogeneous population with extremely diverse biological properties. By maintaining the heterogeneity, HSCs maintain the hematopoietic system for whole life, and it seems that it contributes to respond to various stresses. In this study, we focused on mTOR complex and forkhead transcription factor, FOXO, which are essential for survival and cell cycle regulation, and we identified molecules that are regulated by these pathways. Furthermore, by performing CRISPR/Cas9 screening system, we identified multiple functional molecules that contribute to regulate heterogeneity of HSCs and leukemic stem cells.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：幹細胞 白血病 不均一性 治療抵抗性

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は自己複製能と多分化能を併せ持った特殊な細胞であり、自己複製により幹細胞プールを維持し、分化することで造血システムを維持している。この造血幹細胞の自己複製と分化活性は環境的因子と内在的因子により厳密に制御を受けており、この制御機構を詳細にする事は、健常時のみならず、細菌感染や貧血等の様々なストレス下における造血システムの維持機構や、白血病の発症機序の解明に重要である。近年、複数の未分化マーカーに対する抗体を組み合わせることで、造血幹細胞を高度に純化できるようになり、造血幹細胞の機能を単一細胞レベルで解析する事が可能になってきた。最近、造血幹細胞“1個”を移植し、その分裂・分化運命を経時的に解析した研究(Yamamoto et al., 2013, *Cell*)と、レトロウイルスを用いて個々の造血幹細胞とその子孫細胞を識別できるラベル法の開発(Verovskaya et al., 2013, *Blood*)により、個々の造血幹細胞の性質は多様でかつダイナミックに変動している事が明らかとなり、造血幹細胞は極めて多様な生物活性を持った不均一な集団であることが判明した。生体は幹細胞の“不均一性”を保持する事で、造血システム全体で長期間、安定して多様な血液細胞を供給し、さらに様々なストレスに迅速に応答できると考えられる。

2. 研究の目的

これまでに本研究代表者が所属する研究室では、フォークヘッド転写因子 FOXO ファミリーと mTOR 複合体が造血幹細胞の静止期制御

に極めて重要である事を明らかとした(Naka et al., 2010, *Nature*; Hosii et al., 2012, *J Clin Invest*)。造血幹細胞と前駆細胞ではその分裂活性が大きく異なり、造血幹細胞では FOXO ファミリー分子が活性化(核に局在)し、静止期関連分子の発現誘導により細胞分裂を休止していると考えられる。前駆細胞では FOXO ファミリー分子の核外移行が誘導され、FOXO の転写活性は抑制されている。一方、mTOR 複合体 1 (mTORC1) の活性は、前駆細胞で活性化しており、代謝関連遺伝子や細胞周期関連分子の発現を誘導する事で、細胞分裂を制御している。これらのことから、研究代表者は造血幹細胞においても FOXO および mTOR の活性が異なっており、これが造血幹細胞の不均一性に起因するのではないかと考えた。そこで本研究では、これらの造血幹細胞静止期制御因子を軸として、(1)静止期制御分子(FOXO あるいは mTOR)により制御を受ける遺伝子を同定し、(2)同定した候補遺伝子の機能を次世代シーケンサーを用いてハイスループットにスクリーニングすることで、幹細胞の不均一性に関わる遺伝子の同定を目指した。一方、白血病幹細胞は正常な幹細胞と共通する分子機構を利用することで、宿主内で有利に生存していることが報告されている。また、がん細胞はヘテロな集団を形成することで、抗がん剤に対する抵抗性を付与していることが想定されている。これらのことから、上述の候補遺伝子から、CRISPR/Cas9 ライブラリーを用いた機能スクリーニングを実施し、抗がん剤抵抗性に寄与する分子を同定した。

3. 研究の方法

造血幹細胞の不均一性制御に関わる候補遺伝子を探索する目的で、CRISPR/Cas9 システムを用いて、FOXO1, 3, 4 を欠損するヒト白血病細胞株を作成した。これらの細胞と FOXO 阻害剤に暴露した細胞の遺伝子プロファイリングを CAGE 法にて実施し、FOXO 転写因子に制御を受ける遺伝子群を同定した。さらに、これらの遺伝子群から細胞の生存に関わる遺伝子を同定する目的で、新規の CRISPR ライブラリーを用いたスクリーニング法を確立し実施した。

また、造血幹細胞では FOXO が活性化していることが知られているが、この FOXO の活性は Akt により負に制御されている。さらに Akt の活性は mTOR キナーゼ複合体 2 (mTORC2) に正に制御されている。従って mTORC2 を阻害することで FOXO を間接的に活性化できることが想定される。そこで、CRISPR/Cas9 システムを用いて、mTORC2 の機能に必須である Rictor 遺伝子を欠損するヒト白血病細胞株を樹立した。この細胞を用いて、マイクロアレイ法により遺伝子プロファイリングを実施し、mTORC2 に制御を受ける遺伝子群を同定した。さらに、これらの候補遺伝子から抗がん剤耐性に関わる遺伝子を同定する目的で、上述と同様に CRISPR/Cas9 ライブラリーを用いたスクリーニングを実施した。

4. 研究成果

造血幹細胞の不均一性制御に関わる候補遺伝子の探索を行う目的で、CRISPR/Cas9 シス

テムを用いて、FOXO1, 3, 4 を欠損する白血病細胞株を作成した。FOXO1, 3, 4 遺伝子の単独欠損はその細胞増殖にほとんど影響を示さなかったが、特に FOXO1, 3, 4 の 3 重欠損細胞は細胞分裂が強く抑制されていた。したがって、FOXO 転写因子は協調的に細胞分裂を制御していることが示唆された。次に、FOXO により転写制御を受ける遺伝子を同定する目的で、FOXO 阻害剤を暴露した細胞、先に作成した FOXO 欠損細胞株、および親株の遺伝子発現プロファイリングを実施し、およそ 800 の遺伝子が FOXO により制御されていることが示唆された。

同定した 800 の遺伝子候補から、細胞の生存に機能する遺伝子を同定する目的で、新規の CRISPR/Cas9 システムを利用した機能スクリーニング法を確立した。この方法では解析対象遺伝子 1 つに対して 10 個の sgRNA をデザインし、すなわち対象遺伝子はゲノム上で異なる 10 箇所の領域でゲノム編集を受ける。さらに、バーコード技術を組み合わせることで、一度に 1 万種類のゲノム編集された細胞の挙動を経時的に解析することが可能である。このスクリーニングにより、FOXO の下流では細胞周期調節や RNA スプライシングなどの経路が制御されており、これらの分子経路が細胞の生存に極めて重要であることが示唆された。

以上の結果から、造血幹細胞では FOXO は下流の細胞周期調節因子や RNA スプライシング経路を制御することで不均一性の維持に貢献していることが示唆された。

一方で、mTORC2 の機能を阻害する目的で、

Rictor を欠損するヒト白血病細胞株を樹立した。この細胞では mTORC2 による Akt のリン酸化が完全に阻害されていた。興味深いことに、Rictor 欠損細胞は抗がん剤に対する感受性が促進していた。そこで、mTORC2 により制御を受ける遺伝子を同定する目的で、野生型（親株）および Rictor 欠損株の遺伝子発現の差異をマイクロアレイ法で解析した。その結果、mTORC2 の不活性化により発現が増加あるいは減少する遺伝子をおよそ 1,000 遺伝子同定した。次に、上述の CRISPR/Cas9 を用いたスクリーニングを実施し、mTORC2 により制御を受ける分子の中から、抗がん剤暴露した細胞の生存や耐性獲得に寄与する分子の同定を試みた。その結果、脂質代謝、メチオニン代謝、転写調節等に関わる分子が抗がん剤耐性獲得に寄与していることが明らかになった。

以上の結果から、mTORC2 は脂質代謝、メチオニン代謝、mRNA 転写を制御し造血幹細胞の不均一性制御に寄与していることが示唆された。さらに、白血病幹細胞は、この mTORC2 を介した不均一性維持機構を利用することで、抗がん剤耐性を獲得していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

（研究代表者に下線）

[雑誌論文]（計 4 件）

1. Therapeutic Strategy for Targeting Aggressive Malignant Gliomas by Disrupting Their Energy Balance. Hegazy AM, Yamada D, Kobayashi M, Kohno S, Ueno M, Ali MA, Ohta K, Tadokoro Y, Ino Y, Todo T, Soga T, Takahashi C, Hirao A. *J Biol Chem.* 2016; 291(41): 21496-21509. 査読有
2. Hes1 suppresses acute myeloid leukemia development through FLT3 repression. Kato T, Sakata-Yanagimoto M, Nishikii H, Ueno M, Miyake Y, Yokoyama Y, Asabe Y, Kamada Y, Muto H, Obara N, Suzukawa K, Hasegawa Y, Kitabayashi I, Uchida K, Hirao A, Yagita H, Kageyama R, Chiba S. *Leukemia.* 2015; 29(3): 576-585. doi: 10.1038/leu.2014.281. 査読有
3. Association of a murine leukaemia stem cell gene signature based on nucleostemin promoter activity with prognosis of acute myeloid leukaemia in patients. Ali MA, Naka K, Yoshida A, Fuse K, Kasada A, Hoshii T, Tadokoro Y, Ueno M, Ohta K, Kobayashi M, Takahashi C, Hirao A. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 450(1): 837-43. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.06.066. 査読有
4. Loss of Tsc1 accelerates malignant gliomagenesis when combined with oncogenic signals. Yamada D, Hoshii T, Tanaka S, Hegazy AM, Kobayashi M, Tadokoro Y, Ohta K, Ueno M, Ali MA, Hirao A. *J Biochem.* 2014; 155(4): 227-233. doi: 10.1093/jb/mvt112. 査読有

〔その他〕

ホームページ等

<http://cri-mol-gen.w3.kanazawa-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 将也 (UENO, Masaya)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：20334766

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし