

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）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：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390290

研究課題名（和文） 細胞老化・寿命制御シグナルによる白血病幹細胞の発生・維持・分化

研究課題名（英文） Roles of longevity/senescence-relating molecules in the development, maintenance and differentiation of leukemia stem cells

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）：

本研究では、細胞老化・寿命制御シグナルの知見をもとに、正常幹細胞と白血病幹細胞の共通性と相違点を明らかにし、白血病幹細胞の実体を解明することを目指した。その結果、寿命制御遺伝子として知られている FOXO が、白血病幹細胞の維持に必須の役割を果たしていることが明らかとなった。また、細胞老化シグナルとして知られる Ras の活性化は、細胞分化特異的な因子と関連し、白血病化の決定的因子として機能していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we investigated roles of senescence/longevity related molecules in the development, maintenance and differentiation of leukemia stem cells. We found that FOXO, which is a critical regulator of longevity of *C.elegans*, is essential for maintenance of leukemia stem cells. In addition, it was suggested that constitutive Ras, which is known to induce cellular senescence, causes leukemogenesis, collaborating with factors controlling cellular differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2011年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：血液学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：白血病、寿命、老化

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は、骨髓微小環境において、細胞周期から逸脱した G0 期で存在している。また、外界からのストレスにも抵抗性を示し自己複製能を維持している。一方で白血病においても、白血病幹細胞を頂点として階層的

に増殖能の低い分化細胞が作り出されると考えられるようになり、治療的観点から白血病幹細胞の研究が精力的に展開されている。

我々は、これまで造血幹細胞制御を解明する目的で、寿命や老化と関連する分子に着目して研究を行ってきた。その結果、寿命制御

分子が造血幹細胞の維持には必須の役割を果たしていることを明らかにしてきた。例えば、FOXO は、PI3K-AKT シグナルによって、その活性が制御され、サイトカインや栄養シグナルを感知している。FOXO を欠損させることにより、活性酸素が上昇し、造血幹細胞機能に大きく影響していること観察した。

これらの知見より、寿命や細胞老化に関わる分子が、白血病幹細胞の分化、維持メカニズムにも深く関与しているのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、細胞老化を誘導することで知られる Ras や Myc のようなオンコジーンが生体中で幹細胞分化の制御にいかに関わっているか検討する。また、寿命制御因子として知られる FOXO の白血病幹細胞における役割を解析する。以上のようなアプローチにより、白血病幹細胞制御における新たな分子メカニズムに関する知見を得ることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 誘導的活性型 K-ras 発現モデル

Cre リコンビネースにより K-ras 遺伝子第一エクソン内第 12 コドンのグリシンがアスパラギン酸に置換する変異が誘導される LSL-K-rasG12D マウスと、タモキシフェンで活性化が誘導可能な Cre 酵素 (CreERT2) を恒常的に発現する Rosa26-CreERT2 マウスを交配し、LSL-K-rasG12D;Rosa26-CreERT2 マウス (KrasG12D マウス) を樹立した。本マウスにタモキシフェンを投与し、全身の組織において Cre リコンビナーゼを活性化し、活性化型 K-Ras を誘導的に発現させた。

(2) BCR-ABL 導入による慢性骨髄性白血病モデル

マウス造血幹細胞を単離し、レトロウイルスベクターにより Bcr-abl/GFP 遺伝子を導入後、放射線照射マウスに骨髄移植を行うことによって白血病モデルを作製した。腫瘍発生後骨髄および脾臓より GFP 陽性の BCR-ABL 陽性細胞を採取し、さらに細胞表面抗原にて細分画を行い、細胞培養と放射線照射マウスへの移植によって、機能評価を行った。

4. 研究成果

2 ヶ月齢のコントロールマウスと KrasG12D マウスに対し、タモキシフェンを投与した後に、溶媒あるいはラパマイシンを

2 週間腹腔内投与し、解析を行った。末梢血の血球数計測を行った結果、既報の通り、K-Ras 活性化にて、白血球の増加が認められた。コントロールマウスと比較し、KrasG12D マウスで Mac-1 陽性 Gr-1 弱陽性集団の増加傾向が見られ、骨髄増殖性疾患(MPN)を発症させることを観察した。この現象が、環境因子に依存していないことを確認するために、KrasG12D マウス由来骨髄細胞を 9.5Gy の致死放射線照射した野生型マウスへ移植し、骨髄置換を行った。移植から 1 ヶ月後 (タモキシフェン投与前) にドナー細胞の割合を評価し、K-Ras 活性化前では、レシビエントマウス中で、野生型競合細胞と同程度の造血能を示すことを確認した。次にレシビエントマウスにタモキシフェンを投与し、K-ras を活性化させ、1 ヶ月および 2 ヶ月後に再度ドナー細胞の割合を解析した。タモキシフェン投与後、ドナー細胞集団の増加を認め、MPN の発症が認められた。本実験系を用い、MPN の起源細胞を検証した。KrasG12D マウスより、造血幹細胞および様々な前駆細胞を採取し、それぞれを移植すると同時にタモキシフェンを投与し、K-Ras を活性化させた。MPN の発症を観察したところ、造血幹細胞集団を移植した群のみで MPN の発症が観察できた。このことから、本病態の細胞起源は造血幹細胞であり、前駆細胞ではないことが判明した。一方、これらのマウスをさらに長期的に観察すると、約 8 週後より、急激な白血数の増加を示し死亡する症例が認められた。それらのマウスでは、胸腺の著明な肥大を認め、骨髄細胞や末梢血単核球の Giemsa 染色により、リンパ芽球様細胞の増加が認められた。FACS 解析により、骨髄細胞にて、CD4 陽性 CD8 陽性及び、CD4 陰性 CD8 陽性の T 細胞が 50%以上の割合で存在しており、T 細胞性急性リンパ球性白血病 (T-ALL) の発症が死因であると考えられた。以上の結果から、K-ras による MPN の発症には、造血幹細胞が起源となり、一方で、追加的遺伝子異常により、リンパ球系細胞を起源として T-ALL の発症が誘導されると推察された。このように、K-ras 活性化は、細胞分化特異的な因子と関連することにより、白血病化においても異なる役割を果たしていることが推察された。

慢性骨髄性白血病モデルにおいて発症した白血病細胞を、表面抗原を用い細分画し解析したところ、c-Kit 陽性 Sca1 陽性 Lin 陰性細胞という造血幹細胞と一致した集団の中に、高いコロニー形成能と移植後の白血病を発症させる細胞が濃縮されており、ここが白血病幹細胞集団であることが判明した。白血病幹細胞集団では、その一部に FOXO3a が核内に局在している細胞が見られ、前駆細胞集団では、主に細胞質に局在していた。また FOXO3a が核内に局在して

いるものは、Ki-67 が陰性であるものが多く、比較的細胞周期が抑制されていることも判明した。さらに、FOXO3a を欠損させると長期的に白血病を産生する能力が低下していることが明らかとなった。これらの細胞では著名なアポトーシスの亢進が認められ、本分子が白血病幹細胞の生存に必須であることが明らかとなった。

以上の結果より、寿命制御や細胞老化に関わるシグナルが、造血幹細胞及び白血病幹細胞の維持・分化に大きな役割を果たしていることが明らかとなった。今後、これらの分子がいかなる経路を介して、白血病発症や白血病幹細胞動態を制御しているのか解明する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 17 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 (review) 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 (review) 査読あり
10.1111/j.1440-1827.2011.02688.x
10. Muraguchi T, Tanaka S, Yamada D, Tamase A, Nakada M, Nakamura H, Hoshii H, Ooshio T, Tadokoro Y, Naka K, Ino Y, Todo T, Kuratsu J, Saya H, Hamada J, Hirao A. NKX2.2 suppresses self-renewal of glioma-initiating cells. *Cancer Res.* 71:1135-45, 2011. 査読あり
10.1158/0008-5472.CAN-10-2304
11. Su YW, Hao Z, Hirao A, Yamamoto K, Lin WJ, Young A, Duncan GS, Yoshida H, Wakeham A, Lang PA, Murakami K, Hermeking H, Vogelstein B, Ohashi P, Mak TW. 14-3-3sigma regulates B-cell homeostasis through stabilization of FOXO1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:1555-60, 2011. 査読あり
10.1073/pnas.1017729108
12. Naka K, Hoshii T, Muraguchi T, Tadokoro Y, Ooshio T, Kondo Y, Nakao S, Motoyama N, Hirao A. TGF β -FOXO signalling maintains leukaemia-initiating cells in chronic

- myeoid leukaemia. Nature, 463:676-80.2010. 査読あり
10.1038/nature08734
13. Takubo K, Goda N, Yamada W, Iriuchishima H, Ikeda E, Kubota Y, Shima H, Johnson RS, Hirao A, Suematsu M, Suda T. Regulation of the HIF-1 α level is essential for hematopoietic stem cells. Cell Stem Cell. 7:391-402, 2010 査読あり
10.1016/j.stem.2010.06.020
 14. Takeuchi S, Takahashi A, Motoi N, Yoshimoto S, Tajima T, Yamakoshi K, Hirao A, Yanagi S, Fukami K, Ishikawa Y, Sone S, Hara E, Ohtani N. Intrinsic Cooperation between p16INK4a and p21Waf1/Cip1 in the Onset of Cellular Senescence and Tumor Suppression In vivo. Cancer Res. 70:9381-90, 2010 査読あり
10.1158/0008-5472.CAN-10-0801
 15. Naka K, Hoshii T, Hirao A. Novel therapeutic approach to eradicate tyrosine kinase inhibitor resistant chronic myeloid leukemia stem cells. Cancer Sci. 101:1577-81, 2010 (review) 査読あり
10.1111/j.1349-7006.2010.01584.x
 16. Tamase A, Muraguchi T, Naka K, Tanaka S, Kinoshita M, Hoshii T, Ohmura M, Shugo H, Ooshio T, Nakada M, Sawamoto K, Onodera M, Matsumoto K, Oshima M, Asano M, Saya H, Okano H, Suda T, Hamada JI, Hirao A. Identification of tumor-initiating cells in a highly aggressive brain tumor using promoter activity of nucleostemin. Proc Natl Acad Sci U S A. 106:17163-8, 2009 査読あり
10.1073/pnas.0905016106
 17. Yamakoshi K, Takahashi A, Hirota F, Nakayama R, Ishimaru N, Kubo Y, Mann DJ, Ohmura M, Hirao A, Saya H, Arase S, Hayashi Y, Nakao K, Matsumoto M, Ohtani N, Hara E. Real-time in vivo imaging of p16Ink4a reveals cross talk with p53. J Cell Biol. 186:393-407, 2009. 査読あり
10.1083/jcb.200904105
- [学会発表] (計 24 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. 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)
 3. 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)
 4. 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)
 5. Hirao A: Regulation of stem cell homeostasis and tumorigenesis. BMB2010, 平成 22 年 12 月 8 日、神戸国際会議場(兵庫)
 6. Hirao A: Molecular mechanisms regulating maintenance of leukemia stem cells. The 15th Japanese Foundation for Cancer Research-International Symposium on Cancer Chemotherapy (JFCR-ISCC), 平成 22 年 12 月 2-3 日、ホテル日航東京 (東京)
 7. Hirao A: Role of PI3K-AKT signals in the maintenance of normal and leukemia stem cells, Tokyo iPS/Stem cell symposium, 平成 22 年 11 月 24 日、東京大学安田講堂 (東京)
 8. 平尾敦: 造血幹細胞および白血球幹細胞維持制御メカニズム 日本顕微鏡学会、平成 22 年 11 月 12 日、金沢市ホール(石川)
 9. 平尾敦: 腫瘍悪性進展制御と細胞分化、第 48 回日本癌治療学会、平成 22 年 10 月 27 日、国立京都国際会館 (京都)
 10. Hirao A: Roles of PI3-K signals in the maintenance of normal and leukemia stem cells, ESH-ICMLF Twelfth International Conference. CHRONIC MYELOID LEUKAEMIA - Biological Basis of Therapy Sep 24-16, 2010, Washignton DC, USA
 11. Hirao A: Molecular mechanisms regulating self-renewal of glioma-initiating cells. 第 69 回日本癌学会, 平成 22 年 9 月 22-24 日、大阪国際会議場 (大阪)
 12. 平尾敦: 栄養代謝制御シグナルと造血幹細胞、第 31 回日本炎症・再生医学会、平成 22 年 8 月 6 日、京王プラザホテル (東京)
 13. Hirao A: Roles of TGF β /FoxO in the maintenance of leukemia stem cells,

The 59th Fujihara Seminar, Molecular mechanisms of TGF- β signaling and disease, 平成 22 年 7 月 14 日 グランドホテルニュー王子(北海道)

14. 平尾敦：白血病幹細胞制御機構の解明と治療戦略 第 14 回日本がん分子標的治療学会学術集会、平成 22 年 7 月 8 日、タワーホール船堀（東京）
15. 平尾敦：幹細胞研究に基づいた脳腫瘍の発生・病態制御機構解明へのアプローチ、第 19 回日本がん転移学会学術集会、平成 22 年 6 月 16 日、金沢市ホール(石川)
16. 平尾敦：寿命制御シグナルと造血幹細胞、第 10 回日本抗加齢医学会総会、平成 22 年 6 月 11 日、国立京都国際会館（京都）
17. 平尾敦：フォークヘッド転写因子 FoxO による造血幹細胞および白血病幹細胞制御第 9 回日本再生医療学会、平成 22 年 3 月 19 日、広島国際会議場（広島）
18. Hirao A: Regulation of hematopoietic stem cell homeostasis and leukemia. AACR/JCA 8th Joint Conference: Cancer Genomics, Epigenomics, and the Development of Novel Therapeutics, Feb 7,2010 Hilton Waikoloa Village (USA)
19. Hirao A: Roles of FoxO3a in normal hematopoiesis and leukemia. The 4th International workshop on Cell Regulations in Division and Arrest, Okinawa, 平成 21 年 11 月 30 日 OISI (沖縄)
20. 平尾敦：フォークヘッド転写因子 FoxO による造血幹細胞および白血病幹細胞制御、第 82 回日本生化学大会、平成 21 年 10 月 21 日、神戸国際会議場(兵庫)
21. Hirao A: Roles of FoxO3a in normal hematopoiesis and leukemia. The 8th Japan-China Joint Conference for Cancer Research, 平成 21 年 10 月 5 日 リーガ ロイヤルホテル大阪(大阪)
22. 平尾敦：Regulation of stem cell homeostasis and tumorigenesis by microenvironmental factors、第 68 回日本癌学会学術総会、平成 21 年 10 月 1 日、パシフィコ横浜（神奈川）
23. 平尾敦：寿命制御シグナルと幹細胞、第 51 回日本老年医学会、平成 21 年 6 月 19 日、パシフィコ横浜(神奈川)
24. 平尾敦：幹細胞可視化システムを用いたがん組織不均一性の解析、第 98 回日本病理学会総会、平成 21 年 5 月 1 日、国立京都国際会館（京都）

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