

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590394

研究課題名（和文）フォークヘッド転写因子 Foxo による白血病幹細胞の維持機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms maintaining leukemic stem cells by forkhead transcription factor Foxo

研究代表者

仲 一仁 (NAKA KAZUHITO)

金沢大学・がん研究所・准教授

研究者番号：70372688

研究成果の概要（和文）：ヒト慢性骨髄性白血病(Chronic myeloid leukemia; CML)の治療にはチロシンキナーゼ阻害剤イマチニブが広く用いられているが、イマチニブ抵抗性の白血病幹細胞の残存は CML の再発を引き起す原因となる。本研究では、CML マウスモデルより純化した白血病幹細胞を用いて、TGF- $\beta$ -FOXO シグナルが白血病幹細胞の維持、並びにイマチニブ抵抗性の制御に関わっていることを解明した。さらに、TGF- $\beta$  阻害薬がイマチニブ抵抗性の白血病幹細胞に対して治療効果を有していることを発見した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we demonstrated a critical role for the TGF- $\beta$ -FOXO pathway in maintenance and imatinib resistance of leukemia-initiating cells (LICs) in chronic myeloid leukemia (CML) which are responsible for recurrence of disease. TGF- $\beta$  inhibitor in combination with imatinib treatment led to efficient depletion of LICs *in vivo*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：幹細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：がん幹細胞, 慢性骨髄性白血病, 抗がん剤抵抗性, FOXO, TGF- $\beta$  阻害剤

### 1. 研究開始当初の背景

慢性骨髄性白血病 Chronic myeloid leukemia (CML)は造血幹細胞を発症起源とする骨髄増殖性疾患である。その発症原因としてフィラデルフィア染色体と呼ばれる転座

t(9;22)(q34;q22)によって活性化型チロシンキナーゼ BCR-ABL が産生されることが知られている。CML 患者の治療薬として ABL に対するチロシンキナーゼ阻害薬 Tyrosine kinase inhibitor (TKI)メシル酸イマチニブ,

第二世代 TKI ニロチニブやダサチニブが開発され、慢性期の CML 患者の治療成績を著しく改善した。しかし、近年、CML 細胞の供給源となる白血病幹細胞の存在が明らかとなった。TKI 治療後、根絶を免れた白血病幹細胞は治療抵抗性の再発の原因となる。

FOXO は PI3K-Akt によって負の制御を受ける転写因子であり、FOXO1, 3a, 4, 6 のサブファミリーからなる。増殖因子などの非存在下、PI3K-Akt シグナルは不活化されており、FOXO は細胞核内に存在して、転写因子として下流の遺伝子発現を制御する。一方、増殖因子の刺激が加わると、受容体型チロシンキナーゼは PI3K-Akt シグナルを活性化する。この活性化された Akt は FOXO をリン酸化して細胞核から細胞質へと排出し、転写因子としての機能を抑制する。

これまで、マウス造血幹細胞において Akt は不活化状態にあり、それに伴って FOXO が核内に局在していることが知られている。造血幹細胞を前駆細胞に分化誘導するか、あるいはサイトカイン含有条件下で培養すると FOXO が核外に排出されることから、造血幹細胞の機能制御と FOXO の活性との間には何らかの関連性が存在すると考えられた。事実、*Foxo3a* 欠損マウスを用いた造血幹細胞の自己複製能の解析において、*Foxo3a* 欠損マウス由来の造血幹細胞は、野生型マウス由来の造血幹細胞と比較して、レシピエントマウスに移植したときの骨髄再構築能が低下していることが明らかとなった。この造血幹細胞の機能低下により、加齢した *Foxo3a* 欠損マウスでは、野生型マウスと比較して、造血幹細胞集団の頻度が減少する。従って、Foxo は造血幹細胞の維持に必須な役割を担う。

一方、ヒト CML 患者では複数の成熟血液細胞に分化した CML 細胞が検出されることから、CML の発症母細胞は造血幹細胞レベルである

と考えられてきた。事実、マウスの造血幹細胞に BCR-ABL 遺伝子を導入してレシピエントマウスに移植すると CML 様骨髄増殖性疾患を発症するが、より分化度が進行した血液前駆細胞に BCR-ABL を発現させても CML は発症しない。このような結果から、CML は造血幹細胞を起源とする幹細胞疾患であると理解されている。近年、様々な遺伝子改変マウスを用いた解析により、正常造血幹細胞と CML の白血病幹細胞との間には様々な共通の制御メカニズムが存在することが報告されている。

## 2. 研究の目的

これまでの CML 細胞株を用いた報告において、BCR-ABL は PI3K-Akt シグナルの活性化を介して、FOXO の転写活性を抑制していると考えられてきた。すなわち、FOXO は分化した CML 細胞において細胞質に存在し、抑制された状態にあると考えられている。CML 細胞株に対するイマチニブ処理は、BCR-ABL を抑制して PI3K-Akt を不活化し、FOXO 活性化する。この FOXO の活性化はアポトーシスの誘導や細胞周期の停止を引き起こし、CML 細胞の増殖を抑制することが知られている。

しかし、これまでに白血病幹細胞における FOXO の役割は不明であった。そこで、本研究では、ヒト CML 様骨髄増殖性疾患のマウスモデルを構築し、白血病幹細胞における FOXO の役割を解析した。

## 3. 研究の方法

正常造血幹細胞に BCR-ABL-ires-GFP 遺伝子を導入し、この細胞を放射線照射したレシピエントマウスに移植して CML のマウスモデルを構築した。次に、この CML を発症したマウスの骨髄、及び脾臓から、GFP 陽性の白血病細胞を取得し、さらに、細胞表面マーカーを用いて様々なフラクションの CML 細胞を分

離して、*in vitro*でのコロニー形成能、並びにレシピエントマウスに二次移植を行った時の *in vivo*での白血病発症能を解析した。さらに、フレッシュに純化した白血病幹細胞に対して蛍光免疫染色を行い、FOXOの細胞内局在を解析した。また、野生型マウス、並びに *Foxo3a*欠損マウス由来の CML マウスモデルを用いて白血病幹細胞の連続移植を行い、白血病発症能の維持における FOXO の役割を解析した。この白血病幹細胞を移植したマウスにイマチニブの投与を行って、白血病幹細胞の白血病発症能力を比較し、イマチニブ抵抗性白血病幹細胞の維持における FOXO の役割を解析した。

#### 4. 研究成果

CML を発症したマウスから GFP 陽性の白血病細胞を取得し、白血病幹細胞の純化を試みた。その結果、c-Kit 陽性・Sca-1 陽性・分化マーカー陰性の細胞集団中に *in vitro*でのコロニー形成能が高く、また *in vivo*での CML を発症能力が高い細胞が存在していることが明らかとなった。

次に、CML の白血病幹細胞における FOXO の細胞内局在を解析した。その結果、CML の白血病幹細胞では BCR-ABL が発現しているにも関わらず FOXO の核局在を示す細胞が多数存在することを見いだした。さらに、これらの白血病幹細胞を細胞増殖マーカーである Ki67 で染色し、FOXO の核局在を示す白血病幹細胞と細胞質に存在する白血病幹細胞の細胞増殖能を解析した。その結果、FOXO が細胞質に存在する白血病幹細胞では Ki67 が高発現していたのに対して、FOXO が細胞核に存在する白血病幹細胞では Ki67 の発現レベルが著しく低いことが明らかとなった。従って、FOXO が細胞核に存在する白血病幹細胞の細胞増殖能は低く、細胞周期の G0 期に維持されていると考えられる。FOXO は、この CML の

白血病幹細胞の制御に関わっている可能性が示唆された。

そこで、CML の白血病幹細胞の維持における *Foxo3a* の役割を検証するため、*Foxo3a* 欠損マウスを用いて CML の白血病幹細胞の連続移植を行い、白血病発症能を解析した。野生型マウス由来の CML の白血病幹細胞では、少なくとも3次移植まで白血病発症能が維持されていた。これに対して、*Foxo3a* 欠損マウス由来の CML の白血病幹細胞では、3次移植での白血病発症能が低下していることが明らかになった。このとき発症した白血病を詳細に解析したところ、野生型マウス由来の CML の白血病幹細胞は骨髄性白血病に加え、T細胞性、並びにB細胞性リンパ性白血病を発症した。すなわち、野生型マウス由来の CML の白血病幹細胞は多分化能を有している。しかし、*Foxo3a* 欠損マウス由来の CML の白血病幹細胞は、移植後45日以降、骨髄性白血病、及びリンパ性白血病のいずれの発症も認められなかった。以上の結果から、*Foxo3a* は CML の白血病幹細胞の長期間の自己複製能の維持に必須な役割を担っていることが解明された。

さらに、白血病幹細胞を移植して CML を発症したマウスにイマチニブの投与を行い、イマチニブ抵抗性の白血病幹細胞における FOXO の役割を検証した。白血病幹細胞を移植したマウスへのイマチニブの投与は、白血病の発症を著しく遅延するが、野生型マウス由来の白血病幹細胞を移植したマウスでは60%のマウスが CML を発症・再発した。これに対して、*Foxo3a* 欠損マウス由来の白血病幹細胞を移植したマウスでは、イマチニブ投与後の CML の発症が改善され、生存期間の延長が認められた。さらに、*Foxo3a* 欠損マウス由来の白血病幹細胞を移植したマウスでは、イマチニブ投与後に残存する白血病幹細胞が減少

していた。従って、Foxo3a はイマチニブ抵抗性の白血病幹細胞の維持に必須な役割を担っていると考えられる。

さらに、FOXO を抑制することで、白血病幹細胞を排除する新しい CML 治療法を開発できないか検討を行った。その結果、白血病幹細胞に TGF- $\beta$  の処理を行うと Foxo3a の核局在を示す細胞が増加し、反対に TGF- $\beta$  阻害薬の処理を行うと Foxo3a の核局在を示す細胞が減少することが明らかとなった。従って、TGF- $\beta$  シグナルは白血病幹細胞において Foxo の制御に関わっていると考えられる。さらに、CML の白血病幹細胞を移植したマウスにおいて TGF- $\beta$  阻害薬による治療効果を検討したところ、TGF- $\beta$  阻害薬とイマチニブとの併用は、イマチニブ単独投与に比べ、CML を発症したマウスの病態を改善し、生存期間を延長できることが判明した。このような結果から、TGF- $\beta$  シグナルは白血病幹細胞のイマチニブ抵抗性の制御に重要な役割を担っており、TGF- $\beta$  阻害薬は、FOXO の抑制を介して、イマチニブ抵抗性の CML の白血病幹細胞を抑制できると考えられる。この TGF- $\beta$  阻害薬は白血病幹細胞に対する抑制効果を示すが、正常造血幹細胞は抑制しないことから、副作用の少ない CML の白血病幹細胞を治療できる分子標的薬として期待される。同様の TGF- $\beta$  阻害薬によるイマチニブ抵抗性の白血病幹細胞の抑制効果は慢性期のヒト CML 患者由来の白血病幹細胞でも確認されている。

以上の結果、FOXO の機能は、それまで知られていた分化した CML 細胞でのアポトーシス誘導とは異なっており、白血病幹細胞の維持に必須な役割を担うことが明らかとなった。今後、このような白血病幹細胞と分化した CML 細胞との間での制御メカニズムの相違点、いわゆる“幹細胞パラドックス (Stem cell paradox)”の解明を進めることが、根

絶を免れた CML の白血病幹細胞の診断法や白血病幹細胞を選択的ターゲットとする治療薬を開発していく上で重要になると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- (1) Muraguchi T., Tanaka S., Yamada D., Tamase A., Nakada M., Nakamura H., Hoshii T., Ooshio T., Tadokoro Y., Naka K., Ino Y., Todo T., Kuratsu J., Saya H., Hamada J., and Hirao A. (2011) Suppression of glioma-initiating cell self-renewal by NKX2.2. **Cancer Res.** 71(3):1135-45. 査読有
- (2) Naka K., Hoshii T., Muraguchi T., Tadokoro Y., Ooshio T., Kondo Y., Nakao S., Motoyama N. and Hirao A. (2010) TGF- $\beta$ -FOXO signalling maintains leukaemia-initiating cells in chronic myeloid leukaemia. **Nature** 463(7281): 676-680. 査読有
- (3) Naka K., Hoshii T., and Hirao A. (2010) A novel therapeutic approach to eradicate tyrosine kinase inhibitor resistant chronic myeloid leukemia stem cells. **Cancer Science.** 101(7):1577-1581. 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- (1) Kazuhito Naka, Takayuki Hoshii, Yuko Tadokoro, Takako Ooshio, Yukio Kondo, Shinji Nakao, Noboru Motoyama, and Atsushi Hirao, Molecular Mechanism Regulating Foxo In Leukemia Initiating Cells of Chronic Myeloid Leukemia. The

- 52<sup>nd</sup> American Society of Hematology  
Annual meeting and exposition, December  
4-7, 2010, Orange County Convention  
Center (USA)
- (2) 仲 一仁, TGF- $\beta$ -FOXOシグナルによる白血  
病幹細胞の治療抵抗性機構, 第16回血液  
科学セミナー, 2010, 10, 23-24, 京王プ  
ラザホテル(東京都)
- (3) Kazuhito Naka, Takayuki Hoshii,  
Teruyuki Muraguchi, Yoko Tadokoro,  
Takako Ooshio, Yukio Kondo, Shinji Nakao,  
Noboru Motoyama, Atsushi Hirao,  
Molecular mechanism regulating FOXO in  
leukemia initiating cells of chronic  
myeloid leukemia. 第72回日本血液学会学  
術集会, 2010. 9. 24-26, パシフィコ横浜国  
立横浜国際会議場 (神奈川県)
- (4) Kazuhito Naka, Takayuki Hoshii,  
Teruyuki Muraguchi, Yoko Tadokoro,  
Takako Ooshio, Noboru Motoyama, Atsushi  
Hirao, Analyses of molecular mechanism  
regulating FOXO in leukemia initiating  
cells of chronic myeloid leukemia. 第  
69回日本癌学会学術総会, 2010. 9. 22-24.  
大阪国際会議場(大阪府)
- (5) 仲 一仁, 平尾敦, 白血病幹細胞の抗が  
ん剤抵抗性機構の解析, 第19回日本癌病態  
治療研究会, 2010. 6. 30-7. 1. 東京ステー  
ションコンファレンス (東京都)
- (6) 仲 一仁, 平尾敦, TGF- $\beta$ -FOXOシグナル  
による白血病幹細胞の抗がん剤抵抗性機  
構の解析, 第19回日本がん転移学会,  
2010. 6. 16-17. 金沢市文化ホール (石川県)
- (7) Kazuhito Naka, Takayuki Hoshii,  
Teruyuki Muraguchi, Yoko Tadokoro,  
Takako Ooshio, Noboru Motoyama,  
Masanobu Oshima, Atsushi Hirao, Foxo3a  
is essential for survival of  
leukemia-initiating cells in chronic  
myeloid leukemia. American Association  
for Cancer Research 101st Annual meeting,  
April 17<sup>th</sup>-21<sup>st</sup>, 2010, Walter E.  
Washington Convention Center (USA)
- (8) Kazuhito Naka, Takayuki Hoshii,  
Teruyuki Muraguchi, Yoko Tadokoro,  
Takako Ooshio, Noboru Motoyama, Atsushi  
Hirao, Foxo3a is essential for  
maintenance of chronic myelogenous  
leukemia-initiating cells. 第71回日本  
血液学会学術集会, 2009. 10. 23-25, 国立  
京都国際会館 (京都府)
- (9) Kazuhito Naka, Takayuki Hoshii,  
Teruyuki Muraguchi, Yoko Tadokoro,  
Takako Ooshio, Noboru Motoyama, Atsushi  
Hirao, Foxo3a is essential for  
maintenance of chronic myelogenous  
leukemia-initiating cells. 第68回日本  
癌学会学術総会, 2009. 10. 1-3. パシフィ  
コ横浜国立横浜国際会議場 (神奈川県)
- (10) Kazuhito Naka, Takayuki Hoshii,  
Teruyuki Muraguchi, Takako Ooshio,  
Noboru Motoyama, Atsushi Hirao, Foxo3a  
is essential for survival of chronic  
myeloid leukemia-initiating cells. 7<sup>th</sup>  
International Society of Stem Cell  
Research, July, 8<sup>th</sup>-11th 2009, Centre  
Convencions Internacional  
Barcelona (Spain)
- (11) Kazuhito Naka, Takayuki Hoshii,  
Teruyuki Muraguchi, Yoko Tadokoro,  
Takako Ooshio, Noboru Motoyama, Atsushi  
Hirao, Foxo3a is essential for  
maintenance of chronic myelogenous

leukemia-initiating cells. 第7回幹細胞シンポジウム, 2009. 5.16-17. 泉ガーデンギャラリー (東京都)

[図書] (計3件)

- ① 仲 一仁, 平尾 敦, がんの“幹細胞らしさ”と治療抵抗性のメカニズム, **実験医学** 29(2), 132-139. 2011.
- ② 仲 一仁, 平尾 敦, Annual Review 血液 2010, 中外医学社, 8-13, 2011.
- ③ 仲 一仁, 平尾 敦, がん幹細胞マーカーと分子標的, 癌の分子標的治療, 南山堂, 256-261, 2008.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 白血病治療剤及び該治療剤の新規なスクリーニング

発明者: 平尾敦, 仲 一仁

権利者: 平尾敦, 仲 一仁, 金沢大学

種類:

番号: 特願 2009-134714

取得年月日: 2009年6月4日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.kanazawa-u.ac.jp/~ganken/hirao-hp/index.html>

[http://kurt.kanazawa-u.ac.jp/souran\\_ku/info.php?teacher\\_id=185](http://kurt.kanazawa-u.ac.jp/souran_ku/info.php?teacher_id=185)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

仲 一仁 (NAKA KAZUHITO)

金沢大学・がん研究所・准教授

研究者番号: 70372688

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし