

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19548

研究課題名(和文) 白血病幹細胞の未分化性制御での代謝リプログラミングの役割

研究課題名(英文) Role of metabolic regulation in leukemia stem cells

研究代表者

大田 久美子(Ohta, Kumiko)

金沢大学・がん進展制御研究所・博士研究員

研究者番号：30416177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：急性骨髄性白血病(AML)は、造血幹・前駆細胞を起源として発生する悪性腫瘍であり、その病態は異常増殖と分化ブロックに起因する。本研究では、白血病幹細胞の未分化性維持に寄与する栄養シグナルと分化プログラムを結ぶ分子としてFOXOに着目して解析した。AML細胞株にFOXOを特異的に阻害し、遺伝子発現解析、メタボローム解析、代謝遺伝子変動解析を行った。その結果、FOXOは白血病の分化を直接制御するのみではなく、グルコースを中心とした栄養シグナルにより活性調節を受け、白血病細胞の生存調節に寄与しているものと考えられた。今後、新たな白血病治療の標的として、FOXOが有用であることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Myeloid leukemias are essentially hematopoiesis gone awry at hematopoietic stem cells(HSCs)/progenitor cells. Forkhead members of the class O transcription factor (FOXO), plays a critical role of maintenance of HSCs, leukemia initiating cells. In this study, we attempted to establish a system for identification of molecules regulating differentiation blockade of leukemia stem cells by monitoring FOXO activity. Analysis of effects of the pharmaceutical inactivation of FOXO on leukemia differentiation revealed unique FOXO function in maintaining LSCs and coupling it with cellular metabolism. FOXO inhibition induced glycolysis and consequently increased apoptosis and cell differentiation, thereby suppressing tumor formation in vivo. These results indicate that FOXO is involved in metabolic reprogramming and differentiation in LSCs, and thus is a promising target for leukemia.

研究分野：細胞生物学

キーワード：白血病 FOXO 細胞分化 解糖系

### 1. 研究開始当初の背景

白血病幹細胞の生存・増殖・未分化性制御機構の理解は、治療抵抗性の克服の重要な鍵となる。正常造血幹細胞と白血病幹細胞動態制御の共通性と相違点を見極めることは、白血病根治を目指した治療法開発には重要である。

最近の幹細胞制御機構のひとつに、細胞内代謝調節の重要性が挙げられている。静止期造血幹細胞は、活性酸素(ROS)が低く保たれることが重要であり、解糖系の亢進とミトコンドリア活性の抑制によって維持されている。つまりワーバーグ効果に類似した代謝状態だと考えられる。一方、急性骨髄性白血病(AML)幹細胞では、ROSが低いものの、造血幹細胞とは対照的に解糖系の抑制が知られ

(Lagadinou E.D. et al, Cell stem cell, 2013)、白血病幹細胞特有の代謝調節機構の存在が示された。代謝状態と分化の調節のバランスは、白血病幹細胞の維持に必須の機構であると考えられるが、両者を結ぶ機構は明らかとなっていない。これまでに、造血幹細胞と白血病幹細胞に共通して、フォークヘッド転写因子FOXOが重要な分子であることが知られている。申請者は、栄養と分化プログラムを結ぶ分子として、FOXOに着目し、白血病幹細胞維持メカニズムを解明することが、新たな白血病治療法の開発へ応用できるのではないかという着想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、白血病幹細胞の未分化性維持に寄与する栄養シグナルと分化プログラムを結ぶ分子としてFOXOに着目し、白血病幹細胞維持メカニズムを明らかにすることを目的とした。FOXOを標的とした新たな白血病治療法への応用を目標とした。

### 3. 研究の方法

申請者は、急性骨髄性白血病細胞株を用いて、栄養シグナルによるFOXO活性制御機構と白血病幹細胞維持メカニズムについて、

最新技術(DNAマイクロアレイ、CAGE法)を用いた白血病細胞におけるFOXO下流分子の特定 FOXO直接標的候補分子の白血病細胞における機能解析 メタボローム解析、代謝遺伝子変動解析を用いたFOXOによる代謝調節機構の解析、栄養シグナルによるFOXO活性制御機構の解析と主に4つを軸として機能評価を行った。

まず、DNAマイクロアレイ、CAGE法で得られた結果を比較検証し、白血病分化に関与するFOXOの直接標的遺伝子候補を選別した。直接標的遺伝子候補について、shRNAによる機能解析を行い、FOXO活性阻害による効果と比較検討を行った。栄養シグナルによるFOXO活性制御機構については、細胞外フラックスアナライザー(ECAR)を指標とした糖代謝変動、酸素消費速度(OCR)を指標としたミトコンドリア活性、ATPおよび乳酸産生量を測定した。また、定量的PCRによって、糖、アミノ酸代謝酵素発現変動について評価した。さらに、解糖系阻害剤(2-デオキシグルコース、3-プロモピルビン酸)やグルタミン代謝阻害剤(BPTES, 6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン)との併用による、白血病への効果を解析した。In vivoでの効果を検証するために、免疫不全マウスに白血病細胞株を皮下移植した後、FOXO阻害剤や代謝阻害剤の併用投与し、腫瘍形成能への効果を解析した。

### 4. 研究成果

転写開始点を網羅的に抽出するCAGE法を用いて、FOXO阻害によって変動する遺伝子の探索を試みた。AML由来細胞株THP-1を用いて、FOXO阻害化合物を処理し、解析を行った。転写因子結合モチーフ解析により、FOXO標的遺伝子の発現が抑制することが明らかとなった。また、解糖系関連因子の発現誘導および糖新生酵素の発現抑制が検出された。これは、予備的実験でのDNAマイクロアレイの結果を裏付ける結果であった。CAGE解析により、FOXO阻害によって、FOXO下流

分子の発現が減少するのに対し、HIF1 標的遺伝子の発現増加することが明らかとなった。HIF1 は、FOXO と同様に解糖系に關与する遺伝子の発現を制御し、白血病幹細胞の栄養代謝シグナルを司る分子として知られている。このことから、FOXO と HIF1 が、栄養シグナルによる活性調節で機能し、協調的に白血病細胞の生存調節に關与することが示唆された。網羅的解析によって得られた結果から、FOXO および HIF1 によって発現制御される直接標的分子の候補について選別した。

AML 由来細胞株 (THP-1、HL60) を用いて、FOXO 阻害化合物を処理することにより、分化誘導刺激 24 時間後に S 期細胞の割合が一過的に亢進した。分化誘導刺激を 72 時間処理した細胞では、アポトーシスや分化抗原 (CD11b) の発現誘導が惹起されることを明らかにした。長期的 (30 日間) に刺激した細胞では、持続的な細胞増殖の抑制が觀察された。網羅的解析で見出した FOXO 直接標的候補分子については、shRNA による機能抑制を行い、機能を評価した。機能抑制した細胞では、細胞増殖の抑制や細胞分化の誘導が觀察された。さらに、CRISPR/Cas9 システムを用いて、直接標的候補分子を欠損した細胞株の樹立を試みたが、研究期間内に完了することができなかった。今後の詳細な解析により、白血病幹細胞維持に關与する FOXO シグナルカスケードが解明できると考えられた。

続いて、分化誘導刺激した細胞内での代謝経路について、培地中のグルコースと乳酸を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定し、コントロール細胞と比較検討を行った。分化誘導刺激によって、グルコース消費、乳酸の産生が経時的に増加することを明らかにした。細胞外フラックスアナライザー解析により、FOXO 阻害によって解糖系の亢進することが明らかとなった。また、分化誘導刺激した細胞では、アミノ酸不含培地、グルコース不含培地で培養すると、通常培地と比較

して有意な細胞増殖の抑制が見られた。FOXO 阻害化合物と解糖系やグルタミン代謝酵素阻害剤を共処理した細胞での細胞増殖抑制効果について検討した。FOXO 阻害化合物と代謝酵素阻害剤の共処理した細胞では、相乗的に細胞増殖が抑制することが明らかとなった。免疫不全マウスに白血病細胞株 (THP-1、HL60) を皮下移植した後、FOXO 阻害剤と解糖系経路阻害剤の併用投与し、腫瘍形成能を解析した。その結果、FOXO 阻害によって腫瘍形成能が抑制された。また、FOXO 阻害剤と解糖系経路阻害剤との併用によって、腫瘍形成抑制効果が高まることが明らかとなった。

以上の結果から、AML 細胞で FOXO 阻害により解糖系が活性化することが明らかとなった。解糖系の亢進に伴って、分化、アポトーシス、ROS 産生が誘導することから、FOXO は白血病の分化を直接制御するのみではなく、グルコースを中心とした栄養シグナルにより活性調節を受け、白血病細胞の生存調節に寄与しているものと考えられた。新たな白血病治療において、FOXO を治療標的とすることは有用であると期待できる。

## 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 4 件 ) ( すべて査読あり )

1. 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. Therapeutic Strategy for Targeting Aggressive Malignant Gliomas by Disrupting Their Energy Balance. *J Biol Chem.*, 291, 21496-21509, (2016).
2. Kawahara T., Kagaya N., Masuda Y, Doi T., Izumikawa M., Ohta K., Hirao A. and Shin-ya K. Foxo3a inhibitors of microbial origin, JBIR-141 and JBIR-142. *Org Lett.*, 17, 5476-5479, (2015).
3. Tanaka S., Nakada M., Yamada D., Nakano I., Todo T., Ino Y, Hoshii T., Tadokoro Y., Ohta K., Ali MAE., Hayashi Y., Hamada JI. and Hirao A. Strong therapeutic potential of  $\gamma$ -secretase

inhibitor MRK003 for CD44-high and CD133-low glioblastoma initiating cells. *J Neurooncol.*, 121, 239-250, (2015).

4. Ali MAE., Naka K., Yoshida A., Fuse K., Kasada A., Hoshii T., Tadokoro Y., Ueno M., Ohta K., Kobayashi M., Takahashi C. and Hirao A.  
Association of a murine leukaemia stem cell gene signature based on nucleostemin promoter activity with prognosis of acute myeloid leukaemia in patients. *Biochem Biophys Res Commun.*, 450, 837-843, (2015).

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Kumiko Ohta, Kyoko Fuse, Mayasa Ueno, Susumu Kohno, Chiaki Takahashi and Atsushi Hirao  
Role of FOXO on metabolic regulation in acute myeloid leukemia 第 74 回日本癌学会学術総会 2015.10/8-10 名古屋
2. 大田久美子、布施香子、上野将也、河野晋、高橋智聡、平尾敦  
急性骨髄性白血病での FOXO による代謝シグナル調節機構 第 3 回がんと代謝研究会 2015/7/15,16 金沢

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

金沢大学がん進展制御研究所 遺伝子・染色体構築研究分野ホームページ

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

大田 久美子 (OHTA KUMIKO)

金沢大学・がん進展制御研究所・博士研究員  
研究者番号：30146177

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

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