

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09919

研究課題名(和文) mTOR複合体2による白血病の治療耐性制御機構の解明

研究課題名(英文) Understanding of the regulation mechanisms of therapy resistance by mTOR complex 2

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：白血病の根治を目指した治療法の開発には、白血病幹細胞の特性を知り、その制御を司る重要な分子を特定することが必要である。研究代表者らは、これまで白血病幹細胞の代謝調節に着目し研究を進め、mTOR複合体2が白血病幹細胞の抗がん剤抵抗性に重要な役割を果たすことを見いだした。mTOR複合体2の下流分子群を対象に、CRISPRカスタムライブラリーを用いた機能スクリーニング法を実施し、脂質代謝経路およびメチオニン代謝経路が白血病細胞の抗がん剤耐性に重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

白血病の根治を目指した治療法の開発には、白血病細胞の特性を知り、その制御を司る重要な分子を特定することが必要である。研究代表者らは、白血病細胞の代謝調節に着目し研究を進め、脂質代謝経路およびメチオニン代謝経路が白血病細胞の抗がん剤耐性に重要であることを明らかにした。これらの知見は、代謝経路の阻害剤と抗がん剤を組み合わせた新たな治療法の確立に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to develop therapeutic methods for cure of leukemia, it is necessary to know the characteristics of leukemia stem cells and identify the important molecules that regulate them. Previously, we studied about the regulation of metabolisms in leukemia stem cells, and we found that mTOR complex 2 (mTORC2) is important for the resistance of leukemia stem cells to anticancer drugs. A functional screening using a CRISPR custom library targeting downstream molecules of mTORC2 revealed that lipid and methionine metabolism are important for anticancer drug resistance in leukemia cells.

研究分野：白血病幹細胞

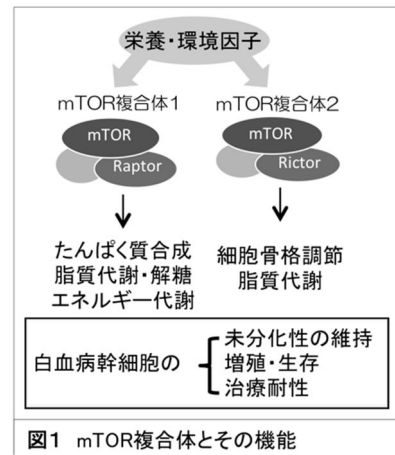
キーワード：抗がん剤耐性 白血病 白血病幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

白血病幹細胞は、白血病の発症や再発の根源となる細胞集団であり、その制御メカニズムを理解することにより、白血病の根治を目指した治療法の開発が可能となる。最近の研究で、生体内での白血病幹細胞は、解糖系の抑制や低 ATP 産生など、代謝的静止期(metabolic dormancy)と呼ばれる状態にあり、正常造血幹細胞とも異なる特徴的な代謝プロファイルを呈することが示された。この白血病幹細胞特有の代謝調節は、再発や治療耐性に寄与していると考えられるが、その詳細は不明である。

mTOR キナーゼは、複数の制御因子と結合し、機能が異なる二つの複合体を形成する(図1)。mTOR 複合体 1 (mTORC1) は生体内の様々な栄養素を感知して活性化し、mRNA 翻訳、タンパク質合成、解糖系、脂質代謝、エネルギー代謝を調節することによって、がんの生存や悪性化に重要な役割を果たしている。一方、mTOR 複合体 2 (mTORC2) は細胞接着や細胞骨格を制御しているものの、代謝調節における機能は全く不明である。研究代表者は、造血組織における mTORC2 の役割を解明する目的で、本複合体の必須コンポーネントの一つの遺伝子改変マウスを用いて解析を行った結果(H26-H28 基盤研究(C))、mTORC2 機能欠損マウスでは、造血幹細胞には大きな異常は認められないものの、白血病幹細胞の抗がん剤感受性が亢進することを見いだした。さらに、mTORC2 機能を欠損させたヒト白血病細胞株を解析した結果、同様に抗がん剤感受性が高まることを確認した。このことから mTORC2 を特異的に失活させることができれば、正常造血には影響せず、白血病の根絶に寄与できる理想的な治療標的になるという着想を持つに至った。



## 2. 研究の目的

複数の製薬企業によって mTOR 阻害剤(両複合体ともに阻害)が開発され、造血器腫瘍を含む多くのがんを対象とした臨床治験も進行中であるが、これらは正常組織への影響が大きく、適切な治療ウィンドウが設定できるか疑問が持たれている。また、mTORC2 の構造は複雑であり、その特異的阻害剤の開発は未だ報告されていない。そこで研究代表者は、mTORC2 そのものではなく、その下流分子を詳細に解析することによって、新たな白血病幹細胞治療の有望な標的分子を同定できると考えた。本研究では、研究代表者が本目的のために開発した「CRISPR カスタムライブラリーを用いた機能スクリーニング法」を駆使し、mTORC2 の下流分子を網羅的に同定し、白血病幹細胞治療耐性の克服を目指すこととした。具体的には後述の3つの研究を実施し、白血病における mTORC2 による抗がん剤耐性機構の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

### 研究1: 抗がん剤耐性における mTOR 複合体 2 の機能解析

mTORC2 の必須コンポーネントの一つを欠損させた mTORC2 機能欠損白血病細胞株を作製し、*in vitro* および *in vivo* における抗がん剤感受性(アポトーシス、細胞周期など)を解析した。さらに、抗がん剤処理時における mTOR 複合体 2 の標的タンパク(AKT, FOXOs, SGK1 など)のリン酸化を評価するとともに、遺伝子発現解析により、抗がん剤耐性に関与する経路の探索を行った。

### 研究2: CRISPR カスタムライブラリーを用いた抗がん剤耐性機能分子スクリーニング

mTORC2 機能欠損白血病細胞株を用いて、mTORC2 に依存して抗がん剤処理後に発現変動を示す約 1,000 遺伝子を対象に、CRISPR カスタムライブラリーを作製し、スクリーニングを実施した（詳細を以下に示した）。この実験系はゲノム編集とバーコード技術を組み合わせた機能スクリーニングであり、標的遺伝子が破壊された場合に、細胞にどのような影響を及ぼすのかを、ハイスループットにスクリーニングすることを可能とした。

候補遺伝子の選択： mTORC2 機能欠損細胞に抗がん剤処理を行い、mTORC2 活性に依存して発現変動を示す約 1,000 の遺伝子を候補として選別した。

CRISPR カスタムライブラリーの作製： 1 候補遺伝子につき 10 種類の sgRNA(計 10,000 sgRNA)からなるカスタムライブラリー（レンチウイルス）を作製し、白血病細胞株に感染させた。

抗がん剤処理： カスタムライブラリーを感染させた白血病細胞株に対して抗がん剤処理を行った。

抗がん剤感受性を示すクローンの選択： 抗がん剤処理前後の白血病細胞株から DNA を抽出し、次世代シーケンサーで sgRNA の鋳型配列（バーコード）を解析し、抗がん剤処理前後で有意に変動するバーコードを同定した。

### 研究 3: 抗がん剤耐性解除のための標的分子の特定

上記スクリーニングにて得られた個々の候補分子、および、予備的に実施したスクリーニングや発現パターン解析から得られた候補分子に関して、それぞれの分子の特性に合わせて解析を進めた。それぞれの候補分子に関して、再度個別に遺伝子欠損細胞を作製し、抗がん剤感受性に関わる表現型を確認した。さらに効率よく機能分子を同定する方法を模索し、得られたデータを基にバイオインフォマティクス解析を進め、治療耐性に関わる経路を統合的に解析した。

## 4 . 研究成果

### 研究 1 : 抗がん剤耐性における mTOR 複合体 2 の機能解析

CRISPR/Cas9 法により、TOR 複合体 2 の機能を欠損する複数の白血病細胞株を樹立した。作成した遺伝子改変細胞では、mTORC2 の下流分子である AKT のリン酸化が完全に抑制されていることを western blot 法で確認した。作出した mTORC2 機能欠損細胞の抗がん剤感受性を解析したところ、いくつかの細胞株で抗がん剤抵抗性が上昇していた。したがって、mTORC2 は一部の白血病細胞において、抗がん剤抵抗性の獲得に寄与していることが示唆された。

### 研究 2 : CRISPR カスタムライブラリーを用いた抗がん剤耐性機能分子スクリーニング

上述の mTORC2 機能欠損細胞に抗がん剤処理を行い、mTORC2 活性の有無により 2 倍以上発現変動を示す遺伝子をマイクロアレイ法で同定した。これらの発現変動遺伝子のランキングを作成し、上位 1,000 遺伝子をスクリーニングの候補とした。候補遺伝子の 1 つにつき 10 種類の sgRNA を設計し、計 10,000sgRNA からなるカスタム sgRNA ライブラリー（レンチウイルス）を作製した。これを白血病細胞株に感染させ、抗がん剤処理を行った。抗がん剤処理前後の白血病細胞株から DNA を抽出し、それぞれの sgRNA の頻度を次世代シーケンサーで定量した。抗がん剤処理前後で有意に変動するバーコードを同定し、遺伝子欠損により、細胞の抗がん剤抵抗性が解除されるものを選別した。

### 研究3：抗がん剤耐性解除のための標的分子の特定

上記のスクリーニングから mTOR 複合体 2 の下流分子から治療抵抗性に関与する機能分子として、複数の遺伝子を同定した。それぞれの候補遺伝子を欠損した細胞を作製し、その抗がん剤感受性に関わる表現型を解析した。その結果、通常の培養条件下の生存にほとんど影響を示さないが、抗がん剤抵抗性を著しく減少する遺伝子を複数同定した。転写因子、トランスポーター、代謝酵素など、様々な分子経路が白血病の治療抵抗性に重要であることが明らかになった。

本研究では、特に脂質代謝経路およびメチオニン代謝経路に焦点をしばり、解析を行った。ある脂質代謝に関わる代謝酵素の遺伝子を破壊すると、抗がん剤感受性が著明に上昇することを見出した。さらに、この脂質代謝経路の阻害剤でも、同様に白血病細胞の抗がん剤感受性を著明に上昇させることができ、抗がん剤との併用は相乗的に白血病細胞の増殖を阻害した。これらのことから、脂質代謝が抗がん剤抵抗性の獲得に極めて重要であることが示唆された。

一方、メチオニン代謝経路の一つの酵素の遺伝子を破壊することでも、白血病細胞の抗がん剤感受性が著明に上昇した。次に代表研究者らは、本代謝酵素を阻害する化合物のスクリーニングを実施した。リコンビナントタンパク質を作成し、無細胞酵素反応系を確立した。この系を用いて化合物を大規模にスクリーニングし、3万の化合物から複数の代謝酵素阻害剤を同定した。これらのうち、少なくとも一つは、マウスに投与した場合においても、標的酵素に対する阻害活性があった。さらに担がんマウスへの投与実験では、本剤の抗腫瘍効果も観察された。したがって、本代謝酵素は新たながん治療のターゲットとして有望であることが示唆された。

一方、遺伝子欠損マウスを用いた解析から、体内の本酵素活性を完全に欠損させても、個体発生や組織機能には異常が見られず、本代謝経路は正常組織の機能には必須ではないことが明らかになった。このことから、本酵素は、抗がん剤耐性に特異的に重要な代謝分子であり、この酵素を標的とすることで、効率よく腫瘍形成を抑制することができることが強く示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tadokoro Yuko, Hoshii Takayuki, Yamazaki Satoshi, Eto Koji, Ema Hideo, Kobayashi Masahiko, Ueno Masaya, Ohta Kumiko, Arai Yuriko, Hara Eiji, Harada Kenichi, Oshima Masanobu, Oshima Hiroko, Arai Fumio, Yoshimura Akihiko, Nakauchi Hiromitsu, Hirao Atsushi	4. 巻 22
2. 論文標題 Spred1 Safeguards Hematopoietic Homeostasis against Diet-Induced Systemic Stress	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 713 ~ 725.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stem.2018.04.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Vu Ha Thi, Kobayashi Masahiko, Hegazy Ahmed M., Tadokoro Yuko, Ueno Masaya, Kasahara Atsuko, Takase Yusuke, Nomura Naho, Peng Hui, Ito Chiaki, Ino Yasushi, Todo Tomoki, Nakada Mitsutoshi, Hirao Atsushi	4. 巻 109
2. 論文標題 Autophagy inhibition synergizes with calcium mobilization to achieve efficient therapy of malignant gliomas	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2497 ~ 2508
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13695	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Peng H, Kasada A, Ueno M, Hoshii T, Tadokoro Y, Nomura N, Ito C, Takase Y, Vu HT, Kobayashi M, Xiao B, Worley PF, Hirao A.	4. 巻 495
2. 論文標題 Distinct roles of Rheb and Raptor in activating mTOR complex 1 for the self-renewal of hematopoietic stem cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 1129-1135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.11.140.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ali MAE, Fuse K, Tadokoro Y, Hoshii T, Ueno M, Kobayashi M, Nomura N, Vu HT, Peng H, Hegazy AM, Masuko M, Sone H, Arai F, Tajima A, Hirao A.	4. 巻 7
2. 論文標題 Functional dissection of hematopoietic stem cell populations with a stemness-monitoring system based on NS-GFP transgene expression.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 11442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-11909-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ueno M, Hirao A
2. 発表標題 mTORC2-mediated metabolic processes contributes drug resistance in leukemia
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ueno M, Hirao A
2. 発表標題 mTORC2-mediated metabolic processes contributes drug resistance in leukemia
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上野将也, 彭 卉, 笠田篤郎, 星居孝之, 平尾敦
2. 発表標題 Rhebの欠損はT-ALLの発症を抑制するが、正常造血に影響を及ぼさない
3. 学会等名 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上野将也, 河野晋, 西村建徳, 後藤典子, 高橋 智聡, 平尾敦
2. 発表標題 Rhebの欠損はT-ALLの発症を抑制するが、正常造血に影響しない
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----