

81. CML 幹細胞における代謝制御メカニズムの解明

仲 一仁

Key words : CML 幹細胞,
チロシンキナーゼ阻害薬抵抗性, 代謝, 微小環境,
造血幹細胞

*金沢大学 がん進展制御研究所
がん幹細胞探索プロジェクト

緒 言

慢性骨髄性白血病 (Chronic myelogenous leukemia: CML) は BCR-ABL1 を原因遺伝子とする骨髄増殖性疾患である。CML 患者の治療成績は ABL1 のチロシンキナーゼ活性を阻害するメシル酸イマチニブなどのチロシンキナーゼ阻害剤 (Tyrosine kinase inhibitor: TKI) の開発によって劇的な改善を遂げた。しかし、近年、TKI 治療をもってしても CML は根治せず再発が起こることが臨床上の重大な問題となっている。このような CML の再発の原因として、CML 細胞を生み出す源となる CML 幹細胞に注目が集まっている。CML 幹細胞は TKI 治療に対して抵抗性を示すことから、TKI 治療後も根絶を免れた CML 幹細胞が再び大量の CML 細胞を産生して CML の再発を引き起こす原因になると考えられている。すなわち、CML の再発を克服するためには、CML 幹細胞の維持機構を解明し、そのメカニズムを抑制する新しい CML 幹細胞に特異的な根治療法の開発が求められている。この CML 幹細胞は造血幹細胞を起源とすることから、正常幹細胞への副作用の少ない CML 幹細胞特異的な治療薬を開発するためには、CML 幹細胞を選択的に抑制する分子メカニズムを明らかにすることが重要となる^{1,2)}。本研究では、テトラサイクリン誘導型 CML マウスモデルを用い、CML 幹細胞、並びに正常造血幹細胞の代謝制御機構を比較・解析して、正常造血幹細胞に対する副作用の少ない CML 幹細胞に特異的な治療薬を開発するための分子基盤を確立することを目的とする。

方 法

1. テトラサイクリン誘導型マウス CML モデル

CML 幹細胞、並びに正常造血幹細胞の比較を行うため、テトラサイクリン誘導型 CML マウスモデル、並びに同腹仔の健常マウスを用いて解析を行った。幹細胞特異的にテトラサイクリン制御性転写活性化因子 (tTA) を発現するトランスジェニックマウス Scl-tTA マウス (ジャクソン研究所より購入: #6209) と、tTA によって発現制御を行うことが可能な tetO-BCR-ABL1 トランスジェニックマウス TRE-BCR-ABL1 マウス (ジャクソン研究所より購入: #6202) の交配を行い、両トランスジーンを有する Scl-tTA・tetO-BCR-ABL1 ダブルトランスジェニックマウスを樹立した^{3,4)}。Scl-tTA・tetO-BCR-ABL1 ダブルトランスジェニックマウスは、テトラサイクリン誘導体であるドキシサイクリン (Dox) (20 mg/l, Sigma 社製) の投与により BCR-ABL1 の発現を抑制し、Dox 投与中止により BCR-ABL1 の発現を誘導できる CML マウスモデルとして知られている^{5,7)}。この Scl-tTA・tetO-BCR-ABL1 ダブルトランスジェニックマウスの Dox 投与を中止して BCR-ABL1 の発現を誘導し、5 週間後、CML 発症マウスを得た。比較対照として同腹仔の Scl-tTA 単独トランスジェニックマウスを正常な健常マウスとして用いた。

2. マウス造血幹細胞、及びマウス CML 幹細胞の純化

Scl-tTA・tetO-BCR-ABL1 ダブルトランスジェニックマウス、並びに同腹仔の Scl-tTA 単独トランスジェニックマウスの Dox 投与を中止し、5 週間後、CML 発症マウス、並びに健常マウスから骨髄単核球を取得した。この骨髄単核細胞を、抗 CD4 (L3T4)、抗 CD8 (53-6.7)、抗 B220 (RA3-6B2)、抗 TER119 (Ly-76)、抗 Gr-1 (RB6-8C5)、抗 Mac1 (M1/70)、抗 Sca-1 (E13-161.7)、並びに抗 c-Kit (2B8) 抗体を用いて染色した。これらの染色を行ったマウス CML 細胞、並びに正常骨

*現所属：広島大学 原爆放射線医科学研究所 幹細胞機能学研究分野

髓単核細胞から、セルソーター (FACS Aria III, BD 社製) を用いて、それぞれ、マウス CML 幹細胞 (cKit⁺, 分化マーカー陰性, Sca-1⁺細胞, KLS⁺細胞), 並びに造血幹細胞 (KLS⁺細胞) の純化を行った。

さらに、CML 発症マウス, 並びに健常マウスを用い、より未分化な長期 CML 幹細胞, 並びに長期正常造血幹細胞を純化した。上記の Dox 投与を中止して 5 週間後の CML 発症マウス, 並びに健常マウスから骨髓単核球を取得した。この骨髓単核細胞を、抗 CD4 (L3T4), 抗 CD8 (53-6.7), 抗 B220 (RA3-6B2), 抗 TER119 (Ly-76), 抗 Gr-1 (RB6-8C5), 抗 Mac1 (M1/70), 抗 Sca-1 (E13-161.7), 並びに抗 c-Kit (2B8), 抗 CD150/SLAM (TC15-12F12.2), 抗 CD48 (HM48-1) 抗体, 抗 CD135/Fli2 (A2F10) 抗体を用いて染色した。これらの染色を行ったマウス CML 細胞から、セルソーター (FACS Aria III) を用いて、マウス長期 CML 幹細胞 (CD150⁺CD48⁻CD135⁻KLS⁺細胞), マウス短期 CML 幹細胞 (CD150⁻CD48⁻CD135⁻KLS⁺細胞), 及び CML 前駆細胞 (cKit⁺, 分化マーカー陰性, Sca-1⁻細胞: KLS⁻細胞) の純化を行った (図 1)。また、上記の染色を行った健常マウスの骨髓単核細胞から、マウス長期正常造血幹細胞 (CD150⁺CD48⁻CD135⁻KLS⁺細胞), マウス短期正常造血幹細胞 (CD150⁻CD48⁻CD135⁻KLS⁺細胞), 及び正常血液前駆細胞 (cKit⁺, 分化マーカー陰性, Sca-1⁻細胞: KLS⁻細胞) の純化を行った。

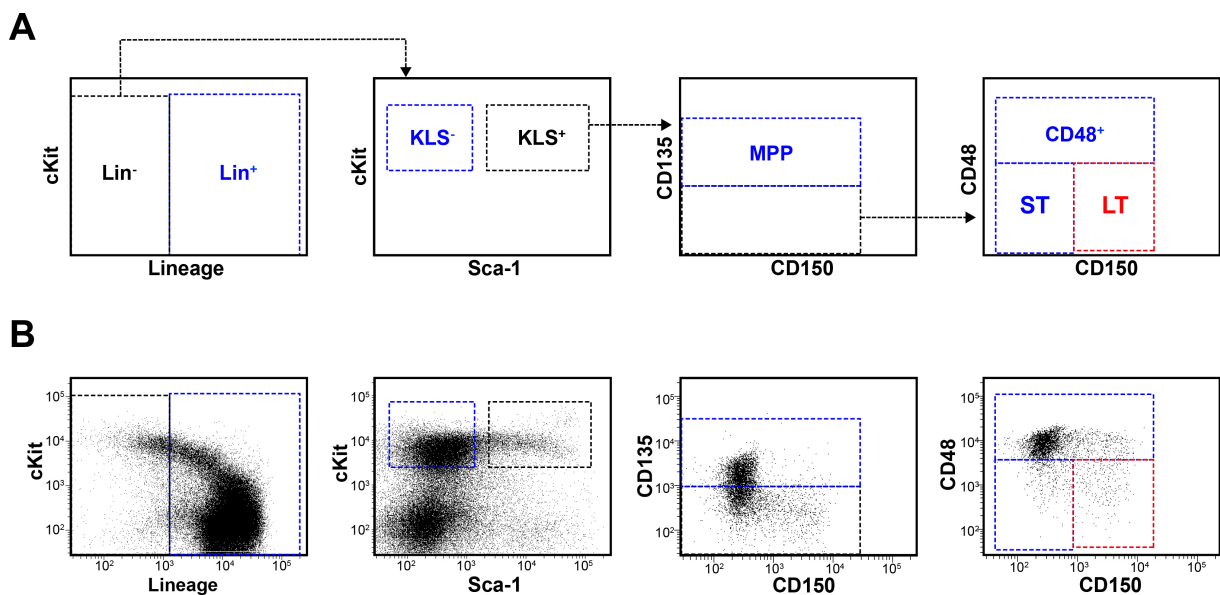


図 1. テトラサイクリン誘導型 CML マウスモデルを用いた CML 細胞の分画。

A) Scl-tTA・tetO-BCR-ABL1 ダブルトランスジェニックマウスのドキシサイクリン投与中止 5 週間後, CML 発症マウスから骨髓単核球を取得した。骨髓単核細胞を、抗 CD4 (L3T4), 抗 CD8 (53-6.7), 抗 B220 (RA3-6B2), 抗 TER119 (Ly-76), 抗 Gr-1 (RB6-8C5), 抗 Mac1 (M1/70), 抗 Sca-1 (E13-161.7), 抗 c-Kit (2B8) 抗 CD150/SLAM (TC15-12F12.2), 抗 CD48 (HM48-1) 抗体, 及び抗 CD135/Fli2 (A2F10) 抗体を用いて染色し, マウス長期 CML 幹細胞 (LT: CD150⁺CD48⁻CD135⁻KLS⁺細胞), マウス短期 CML 幹細胞 (ST: CD150⁻CD48⁻CD135⁻KLS⁺細胞), CML KLS⁺細胞 (cKit⁺, 分化マーカー陰性, Sca-1⁺細胞), 及び CML KLS⁻細胞 (cKit⁺, 分化マーカー陰性, Sca-1⁻細胞) の純化を行った。B) 代表的な FACS パターンを示す。

3. マウス CML 幹細胞, 並びに正常造血幹細胞のメタボローム解析

マウス CML 幹細胞, 並びに造血幹細胞における代謝産物を明らかにするため, メタボローム解析を行った。Dox 投与中止 5 週間後の CML 発症マウス (4 匹 × 3), 並びに正常マウス (6 匹 × 4) からマウス CML 幹細胞 (KLS⁺細胞), 並びに造血幹細胞 (KLS⁺細胞) (細胞数 $1.8-2.5 \times 10^5$) をセルソーター (FACS Aria III, BD Bioscience 社製) を用いて純化した。単離した CML 幹細胞, 並びに造血幹細胞は -80°C で凍結し, メタボロン社 (Durham, ノースカロライナ州, アメリカ) にてメタボローム解析を行った。メタボローム解析は超高速液体クロマトグラフィー/質量分析装置 (Ultrahigh Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry: UPLC/MS/MS) Waters Acquity UPLC (Waters 社製) と Q-Exactive high resolution/accurate mass spectrometer (Thermo Scientific 社製) を用いて実施した。

4. マウス長期 CML 幹細胞, 並びに正常長期造血幹細胞における RNA シークエンス解析

CML 発症マウス, 並びに健常マウスから純化したマウス長期 CML 幹細胞 (CD150⁺CD48⁻CD135⁻KLS⁺細胞), マウス短期 CML 幹細胞 (CD150⁻CD48⁻CD135⁻KLS⁺細胞), 及び CML 前駆細胞 (cKit⁺, 分化マーカー陰性, Sca-1⁻細胞: KLS⁻細胞), 並びにマウス正常長期造血幹細胞 (CD150⁺CD48⁻CD135⁻KLS⁺細胞), マウス正常短期造血幹細胞 (CD150⁻CD48⁻CD135⁻KLS⁺細胞), 及び正常血液前駆細胞 (cKit⁺, 分化マーカー陰性, Sca-1⁻細胞: KLS⁻細胞) を用い, 次世代 RNA シークエンス法により遺伝子発現を解析した. RNA シークエンス解析は北海道システムサイエンス社に委託した. Isogen 溶液より回収した RNA の品質は RIN (RNA integrity number) が 8.5 以上であることを確認した. ライブラリーを SMARTer Ultra Low Input RNA キット for Illumina Sequencing (Takara Clontech) を用いて構築した. RNA シークエンスは HiSeq2000 (Illumina 社製) を用いて解析した.

結 果

1. マウス CML 幹細胞, 並びに造血幹細胞におけるメタボローム解析

CML 幹細胞に特異的な代謝機構を明らかにするため, 正常造血幹細胞と CML 幹細胞との間での代謝産物の比較解析を行った. CML の発症をコントロールすることのできる CML トランスジェニックマウスモデルと同腹仔の健常マウスを用い, それぞれのマウスから CML 幹細胞と正常造血幹細胞を純化してメタボローム解析を行った.

正常造血幹細胞は骨髄内の微小環境において低酸素環境で維持させており, 正常造血幹細胞では嫌氣的解糖系によりエネルギー産生を行うことが知られている^{8,9)}. しかし, 正常造血幹細胞と CML 幹細胞の間では, 解糖系に関わるグルコース, フルクトース-1,6-ビスリン酸, AMP などの発現レベルに明らかな差は認められなかった. また, 個々のアミノ酸レベルを解析した結果, 両細胞間で, 有意差は認められなかった. しかし, CML 幹細胞において, 二つのアミノ酸が結合したジペプチド種が高発現していることが明らかとなった (図 2).

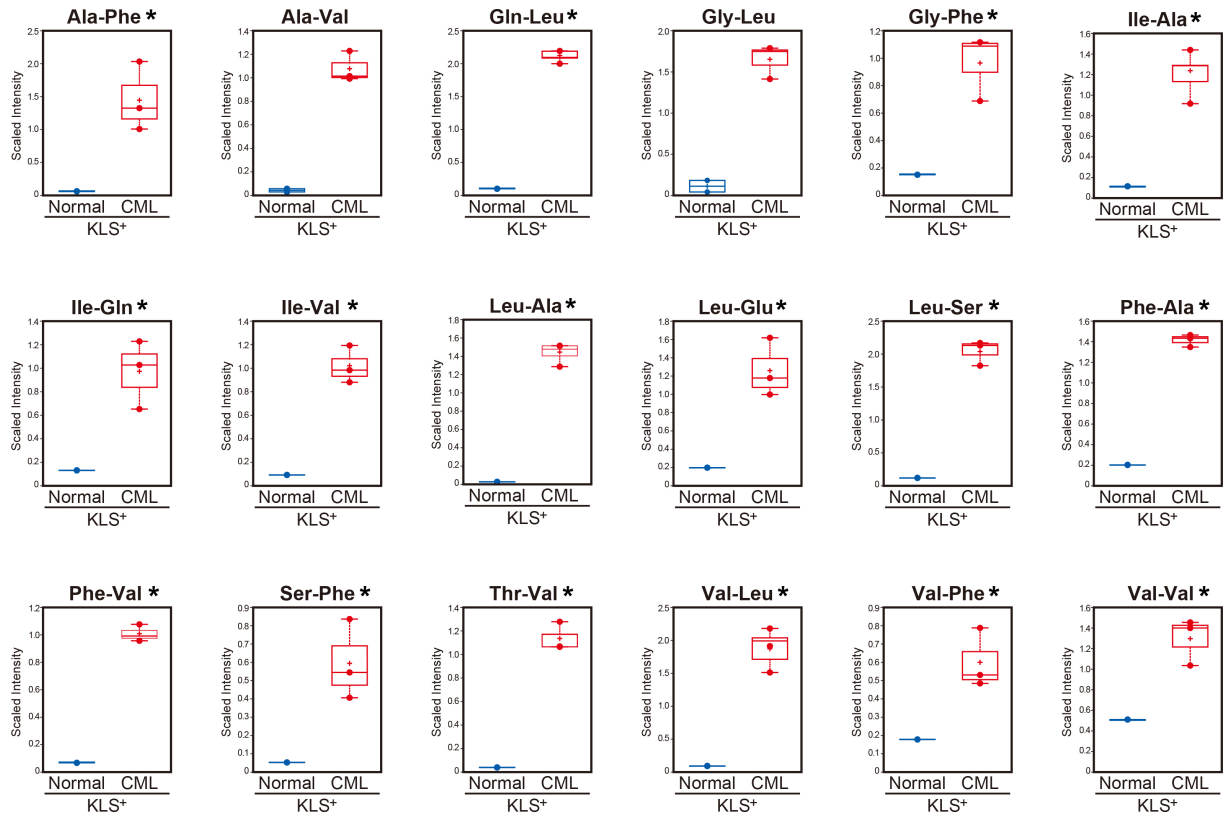


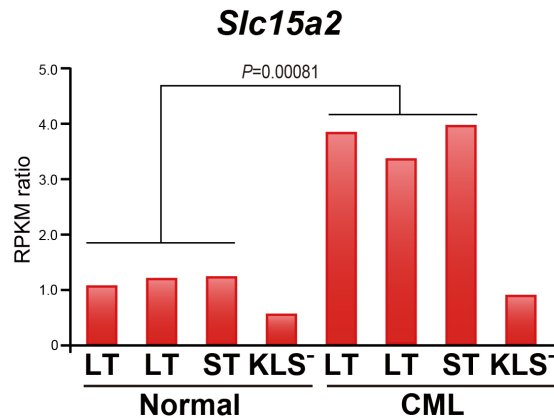
図2. 正常造血幹細胞，並びにCML幹細胞におけるメタボローム解析.

Scf-tTA・tetO-BCR-ABL1 ダブルトランスジェニックマウス，並びに同腹仔のScf-tTA 単独トランスジェニックマウスのドキシサイクリン投与を中止し，5週間後，CML発症マウス，並びに健常マウスより骨髓単核球を取得した．これらマウス骨髓単核細胞よりCML KLS⁺細胞，及び正常 KLS⁻細胞を純化し，メタボローム解析を行った．正常造血幹細胞，並びにCML幹細胞におけるジペプチド種の発現レベルを示す．

2. マウス長期CML幹細胞，並びに長期造血幹細胞におけるトランスクリプトーム解析

CML幹細胞の代謝制御機構に関わる遺伝子発現を明らかにするため，CML発症マウス，並びに健常マウスより純化したCML幹細胞，並びに正常造血幹細胞を用いて遺伝子発現を解析した．上記のように，マウス長期CML幹細胞，短期CML幹細胞，及びCML前駆細胞，並びにマウス正常長期造血幹細胞，正常短期造血幹細胞，及び正常血液前駆細胞を純化し，次世代RNAシーケンス法により遺伝子発現を解析した．その結果，細胞内へのジペプチド種の取り込みに関わるSlc15a2遺伝子が，正常マウス由来の長期正常造血幹細胞，短期正常造血幹細胞，及び正常血液前駆細胞と比較し，マウス長期CML幹細胞，マウス短期CML幹細胞において，高発現していることを見出した(図3)．

a



b

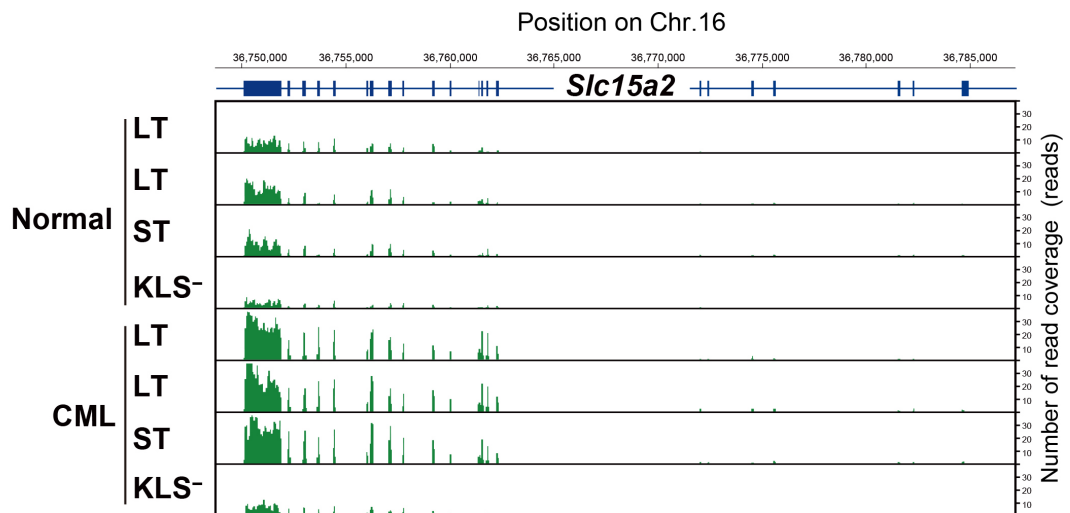


図3. 正常造血幹細胞，及びCML幹細胞のトランスクリプトーム解析。

Scf-tTA・tetO-BCR-ABL1 ダブルトランスジェニックマウス，並びに同腹仔の Scf-tTA 単独トランスジェニックマウスのドキシサイクリン投与を中止し，5週間後，CML発症マウス，並びに健康マウスより骨髓単核球を取得した．これらマウス骨髓単核細胞よりマウス長期CML幹細胞，短期CML幹細胞，及びCML KLS-細胞，並びにマウス長期正常造血幹細胞，短期正常造血幹細胞，及び正常造血前駆細胞（KLS⁻細胞）を純化し，次世代RNAシーケンスにより遺伝子発現の解析を行った．オリゴ/ジペプチド特異的トランスポーター Slc15a2 遺伝子の RPKM (Reads Per Kilobases per Million) 値 (A)，マウス16番染色体におけるゲノムマッピング解析の結果を示す (B)．

考 察

マウスCML幹細胞と正常造血幹細胞を用いたメタボローム解析を行った結果，マウスCML幹細胞では正常造血幹細胞と比較してジペプチド種が高発現していることが明らかとなった．ジペプチド種の産生機序として，プロテアソームやオートファジーといったタンパク質分解系の亢進や，トランスポーターによる取込み活性の関与が推察された．RNAシーケンス法によりマウス正常造血幹細胞とCML幹細胞での遺伝子発現を解析した結果，細胞へのジペプチド種の取込みに関わるオリゴ/ジペプチドトランスポーターをコードする Slc15a2 遺伝子がCML幹細胞において高発現していることを見出した．今後，Slc15a2によるジペプチドの取り込み機構の解析，ジペプチド種によるCML幹細胞の未分化性維持・TKI抵抗性機構の解析，当該分子機構を指標とするCML幹細胞の超早期診断法の開発，並びにCML幹細胞を選択的ターゲットとする治療法の開発を行う計画である．

共同研究者

本研究の共同研究者は、大韓民国 CHA 医科大学校癌研究所, Seong-Jin Kim 教授, 大島 章教授である。

文 献

- 1) Ren, R. : Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat. Rev. Cancer*, **5** : 172-183, 2005.
- 2) O'Hare, T., Zabriskie, M. S., Eiring, A. M. & Deininger, M. W. : Pushing the limits of targeted therapy in chronic myeloid leukaemia. *Nat. Rev. Cancer*, **12** : 513-526, 2012.
- 3) Huettner, C. S., Zhang, P., Van Etten, R. A. & Tenen, D. G. : Reversibility of acute B-cell leukaemia induced by BCR-ABL1. *Nat. Genet.*, **24** : 57-60, 2000.
- 4) Koschmieder, S., Göttgens, B., Zhang, P., Iwasaki-Arai, J., Akashi, K., Kutok, J. L., Dayaram, T., Geary, K., Green, A. R., Tenen, D. G. & Huettner, C. S. : Inducible chronic phase of myeloid leukemia with expansion of hematopoietic stem cells in a transgenic model of BCR-ABL leukemogenesis. *Blood*, **105** : 324-334, 2005.
- 5) Reynaud, D., Pietras, E., Barry-Holson, K., Mir, A., Binnewies, M., Jeanne, M., Sala-Torra, O., Radich, J. P. & Passegué, E. : IL-6 controls leukemic multipotent progenitor cell fate and contributes to chronic myelogenous leukemia development. *Cancer Cell*, **20** : 661-673, 2011.
- 6) Li, L., Wang, L., Li, L., Wang, Z., Ho, Y., McDonald, T., Holyoake, T. L., Chen, W. & Bhatia, R. : Activation of p53 by SIRT1 inhibition enhances elimination of CML leukemia stem cells in combination with imatinib. *Cancer Cell*, **21** : 266-281, 2012.
- 7) Zhang, B., Ho, Y. W., Huang, Q., Maeda, T., Lin, A., Lee, S. U, Hair, A., Holyoake, T. L., Huettner, C. & Bhatia, R. : Altered microenvironmental regulation of leukemic and normal stem cells in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Cell*, **21** : 577-592, 2012.
- 8) Simsek, T., Kocabas, F., Zheng, J., Deberardinis, R. J., Mahmoud, A. I., Olson, E. N., Schneider, J. W., Zhang, C. C. & Sadek, H. A. : The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell*, **7** : 380-390, 2010.
- 9) Takubo, K., Goda, N., Yamada, W., Iriuchishima, H., Ikeda, E., Kubota, Y., Shima, H., Johnson, R. S., Hirao, A., Suematsu, M. & Suda, T. : Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*, **12** : 49-61, 2013.