

■受領No.1462

急性骨髄性白血病に対する新規創薬標的の探索

代表研究者

檜井 栄一

岐阜薬科大学 教授



Identification of novel drug targets for AML

Principal Researcher

Eiichi Hinoi,

Gifu Pharmaceutical University Professor

本研究では、急性骨髄性白血病（AML）の悪性化進展過程における骨芽細胞性ニッチの mTORC1 シグナルの重要性を明らかにすることを目的とした。共培養実験や骨芽細胞特異的 mTORC1 活性化マウスを用いた解析により、AML 細胞由来の液性因子が骨芽細胞の mTORC1 活性を制御するとともに、骨芽細胞内 mTORC1 は、通常造血および AML 進展の制御に重要な役割を果たしていることが示された。

Osteoblasts provide a microenvironment for leukemic stem cells and are implicated in pathogenesis and progression of leukemia as an osteoblastic niche in bone marrow. In this study, we revealed that acute myeloid leukemia (AML) cells enhance the mechanistic target of rapamycin complex-1 (mTORC1) activity in osteoblasts in vivo and in vitro. Subsequent analyses determined that mTORC1 activation in osteoblasts results in an abnormal hematopoiesis and a marked acceleration of AML. These findings highlight a critical role of mTORC1 in normal hematopoiesis and leukemia propagation through its expression in osteoblastic niche.

1. 研究目的

急性骨髄性白血病（Acute Myeloid Leukemia: AML）は、骨髄系造血細胞の異常増殖により引き起こされる造血器腫瘍であり、骨髄微小環境に潜む AML 幹細胞（がん幹細胞）が治療抵抗性を左右することも報告されており、あらたな診断・治療標的の同定と根本治療薬や予防薬（疾患修飾薬）の開発が希求されている。近年、AML の発症進展過程において、「骨髄微小環境における骨芽細胞性ニッチと AML 幹細胞の細胞間連関」が重要な役割を果たすことが示されている。しかしながら、この細胞間連関がどのように AML の発症進展に関与しているのかについては、十分明らかになっておらず、「がん微小環境におけるニッチ細胞とが

ん幹細胞の制御システム連関」を標的とした AML 治療戦略は進んでいない。

骨芽細胞には、骨形成の機能以外にも多様な機能が備わっていることが報告されている。私たちは、骨芽細胞が内分泌細胞として全身エネルギー代謝調節を担っていることを明らかにしてきた。さらに、骨芽細胞がニッチ細胞として、mechanistic target of rapamycin complex-1 (mTORC1) シグナルを介して、AML 悪性化進展に重要な役割を果たしていることを見い出している。したがって本研究では、上述の私たち独自の研究成果を基盤として、AML 幹細胞側の mTORC1 シグナルではなく、ニッチ細胞側（骨芽細胞側）の mTORC1 シグナルに焦点を当て、

「AML 悪性化進展過程におけるがん微小環境の生体制御システム連関」の解明を目指し、遺伝子改変マウスや AML モデルマウスを用いた in vivo 解析、および培養細胞を用いた in vitro 解析を行った。

2. 研究内容

2.1 骨芽細胞の mTORC1 活性を制御する AML 由来因子の探索

野生型マウスから、セルソーターを用いて造血幹前駆細胞の集合である Lineage- Sca-1+ c-kit+ (LSK)細胞を採取した。この LSK 細胞にレトロウイルスを用いて AML の原因遺伝子である MLL-AF9 を導入し、マウスに移植することで AML モデルマウスを作製した。骨髄内の骨芽細胞を CD45-Lin-CD31-Sca-1-CD51+細胞と定義し、フローサイトメーターを用い、eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) のリン酸化を指標にして AML モデルマウスの骨芽細胞内 mTORC1 の活性評価を行った。正常細胞のみを移植したマウスと比較し、AML モデルマウスにおいて骨芽細胞の 4E-BP1 のリン酸化上昇が観察された。また、骨芽細胞と AML 細胞を共培養した場合、骨芽細胞の ribosomal protein S6 kinase beta-1 (S6K1) のリン酸化上昇が認められた。さらに AML 細胞の培養上清を用いて骨芽細胞を培養した場合においても、骨芽細胞の S6K1 のリン酸化上昇が認められた。したがって、モデルマウスを用いた in vivo 解析および細胞を用いた in vitro 解析の結果から、AML 細胞は骨芽細胞の mTORC1 活性を上昇させる能力を有しており、AML 細胞由来の液性因子が直接的にその活性上昇に関与している可能性が示された。今後は、骨芽細胞の mTORC1 活性を調節する AML 細胞由来液性因子の同定を行うとともに、AML 細胞の機能調節に関わる骨芽細胞由来因子の同定についても検討する。

2.2 骨芽細胞の mTORC1 シグナルによる通常造血の制御

Tuberous sclerosis 1 (TSC1)/TSC2 は、mTORC1 抑制因子である。私たちはこれまでに、骨芽細胞の mTORC1 が活性化したマウス(=骨芽細胞特異的 Tsc1 欠損マウス)において、AML 幹細胞の増殖が亢進すること、および AML 悪性化が著明に進展することを見出ししている。本研究では、通常造血と骨芽細胞内 mTORC1 シグナルの活性化との相関性を明らかにする目的で、骨芽細胞特異的 Tsc1 欠損マウスを用いて、定常状態における造血解析を行った。その結果、骨芽細胞特異的 Tsc1 欠損マウス(=Colla1-Cre;Tsc1fl/flマウス)では、LSK 細胞やミエロイド細胞の増加、B 細胞の減少が観察された。この表現型が mTORC1 に依存しているかどうかを検討するために、Colla1-Cre;Tsc1fl/flマウスに Raptorfl/+を導入したところ、大部分の表現型がレスキューされた。以上の結果より、骨芽細胞内 mTORC1 の活性化が異常造血を引き起こす要因の1つである可能性が示された。

3. まとめ

以上の結果より、AML 細胞が液性因子により骨芽細胞の mTORC1 活性を制御するとともに、骨芽細胞内 mTORC1 は、AML 進展メカニズムだけでなく、通常造血の制御にも関与することが示された。本研究成果は、造血幹細胞(白血病幹細胞)の機能異常に伴い誘発される各種血液疾患の発症・進展に対する効果的な制御法開発を指向する研究基盤になることが期待される。今後は、モデルマウスや共培養系で得られた結果のヒトへの外挿性を検証するために、病理検体を用いてヒト AML 悪性化進展と骨芽細胞ニッチと AML 幹細胞とのシグナルネットワークとの相関性を明らかにしていく予定である。

最後に、本研究を遂行するにあたり、公益財団法人日立財団倉田奨励金より多大なるご支援を賜

りましたことを深謝いたします。

4. 発表 (研究成果の発表)

1. Eiichi Hinoi. Amino acid and bone metabolism. 17th Bone Biology Forum (Online). 2021.

2. 徳村和也, 岩橋咲幸, 深澤和也, 家崎高志, 檜井栄一、mTOR は複合体依存のおよび非依存的な経路を介した骨格形成、日本薬学会第 141 年会(広島) 2021 年

3. 岩橋咲幸, 徳村和也, 深澤和也, 家崎高志, 檜井栄一、mTORC1 恒常的活性化による骨格形成異常、日本薬学会第 141 年会 (広島) 2021 年

4. Horie T, Fukasawa K, Yamada T, Mizuno S, Iezaki T, Tokumura K, Iwahashi S, Sakai S, Suzuki A, Kubo T, Osumi R, Tomizawa A, Ochi H, Sato S, Kaneda K, Takahashi S, Hinoi E. Erk5 in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Regulates Bone Homeostasis by Preventing Osteogenesis in Adulthood. Stem Cells. sxac011. 2022.