

平成 30 年 6 月 10 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09470

研究課題名(和文) 骨髄線維化進展における乳酸シャトル現象の役割解明とその制御方法の開発

研究課題名(英文) Role of glucose metabolism in development of myelofibrosis

研究代表者

桐戸 敬太 (KIRITO, Keita)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：90306150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄増殖性腫瘍(MPN)細胞は、低酸素環境では低酸素応答転写因子(HIF)を介して、乳酸の細胞外移送に関わるMCT1/MCT4の発現が上昇し、細胞外に乳酸を排出させることを明らかにした。一方、糖代謝センサーAMPKを活性化させることにより、過剰な蛋白合成が抑制され、その結果として小胞体ストレス応答が低下し、最終的には線維化の進行に関わる酵素lysyl oxidaseの発現が抑制されることも見出した。さらに、MetforminはPP2Aの活性化を介して、MPNの発症に中心的な役割を果たしている変異型JAKキナーゼ(JAK2V617F)の機能を抑制し、MPN細胞の増殖を抑制していた。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we focused our attention on the role of microenvironment and cell to cell interaction to understand the mechanisms for development of myelofibrosis in myeloproliferative neoplasms (MPN). We found that JAK2V617F-positive cell lines derived from MPN patients showed elevation of several ER stress markers including phosphorylation of eIF2-alpha, nuclear localization of ATF6 and XBP1s and upregulation of glucose response protein 78. We also confirmed elevation of Lysyl-oxidase (LOX), an enzyme that regulates the crosslinking of extracellular matrix proteins such as collagen in these cells. Treatment with metformin diminished activation of ER stress pathways and suppressed LOX levels. These results indicated that LOX levels were regulated by ER stress in MPN cells. In addition, it is suggested that metformin might be a new and attractive compounds to suppress myelofibrosis in MPN.

研究分野：血液内科学

キーワード：myelofibrosis JAK2V617F metformin lysyl oxidase PP2A

1. 研究開始当初の背景

骨髄線維化は、骨髄増殖性腫瘍 (myeloproliferative neoplasms; MPN)における終末的な病態であり、一旦進行するとその生命予後は非常に不良となる。このため、骨髄線維化のメカニズム解明とその進行を抑制する方法の構築は、血液内科領域の重要課題の一つであった。本研究を着想した時点では、MPNに伴う骨髄線維化の病態解明は遺伝子変異同定が中心であり、細胞間相互作用や微小環境変化が骨髄線維化進行に及ぼす影響は注目されていなかった。一方、固形癌における局所線維化進行には、がん細胞と周囲間質細胞とのグルコース代謝を介した相互作用が重要であることが明らかになりつつあった。この時点で、我々は骨髄内の酸素やグルコースなどの基礎的な環境変化が、骨髄系腫瘍細胞の増殖に大きな影響を示すことを明らかにしており(Mitsumori, et al. Exp.Hematol, 2014)、MPNにおける線維化進行にも糖代謝変化やそれによる細胞間相互作用が重要な役割をはたしているのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、MPNにおける骨髄線維化進行において、グルコース代謝およびその代謝産物である乳酸がどのような役割を果たしているかを明らかにすることを目的とした。さらに、ピグアナイド系薬剤 metformin を用い、糖代謝を制御することにより、この過程がどのように変化するかを検討し、骨髄線維化制御のための新たな手法へと発展させ得るかについても検討した。

3. 研究の方法

JAK2V617F 変異を有する MPN 由来細胞株 (HEL および SET-2)、ヒト骨髄間質細胞由来細胞株 HS-5 を用いて in vitro での解析を行った。低酸素環境の影響を調べるために、上記の細胞について 1%O₂ 環境での培養も行っている。タンパクの発現については、ウェスタンブロットにより解析を行い、定量的解析のために、画像解析ソフトウェア Image J を用いた。得られた結果についての統計的解析には、Mann-Whitney U test (2群の比較の場合) もしくは Kruskal Wallis test (3群以上の比較の場合)。PP2A の各サブユニットの機能を解析するために、Neon transfection system を用いて siRNA を各細胞に導入し、それぞれのタンパクのノックアウトを行なっている。細胞のアポトーシス解析は、Annexin V 染色を用いて行なっている。

4. 研究成果

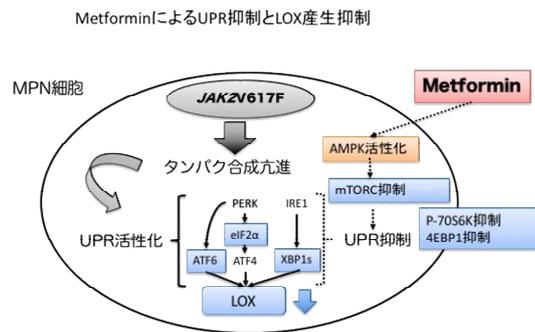
(1) MPN 細胞を低酸素で処理することにより、乳酸の移送に関わる MCT1/MCT4 の発現が誘導された。また、メディアム中への乳酸の産生が増加した。この現象は、低酸素応答転写因子(HIF)の阻害剤により抑制された。

(2) MPN 細胞を、ミトコンドリアの電子伝達経路を抑制するピグアナイド系薬 metformin で処理すると、MPN のドライバー分子である JAK2V617F のキナーゼ活性が抑制された。また、この過程にはフォスファターゼ分子 PP2A が関与しており、その中でも B56 サブユニットが重要な役割を果たしていた。なお、Metformin による JAK2V617F 抑制は、JAK2 阻害剤 ruxolitinib と相乗的に認められた。Metformin は JAK2V617F を抑制するのみでなく、その増殖をも抑制した。

(3) 骨髄間質細胞株である HS-5 について、骨髄線維化に関わるサイトカインである TGF- β で処理すると、SMAD2 の活性化が誘導された。同時に、骨髄間質組織の線維化に関わる Lysyl oxidase (LOX) の発現が誘導された。HS-5 を低酸素環境下で培養した場合にも、LOX の発現が誘導されることも確認した。

(4) LOX は骨髄間質細胞のみでなく、MPN 細胞株においても発現していた。MPN 細胞株における LOX の発現は、JAK2 阻害剤 ruxolitinib により抑制はされなかった。一方、metformin で処理した場合には LOX の発現が抑制された。

(5) metformin による LOX の発現抑制のメカニズムとしては、metformin がエネルギーセンサータンパク AMPK を活性化させることが重要と考えられた。すなわち、AMPK は p-70S6 キナーゼや 4EBP1 の機能を抑制し、過剰なタンパク合成が抑制する。タンパク合成が低下することにより、小胞体ストレスが緩和され、結果として Unfolded protein response (UPR) 経路の活性が低下する。UPR の低下により、その下流で制御される LOX の発現が低下することが考えられた。(下図)



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 17 件)

1. Takaku T, Iriyama N, Mitsumori T, Sato E, Gotoh A, Kirito K, et al. Clinical Efficacy and Safety of First-Line Dasatinib Therapy and the Relevance of Velocity of BCR-ABL1 Transcript Decline for Achievement of Molecular Responses in Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia: Report from the Juntendo

Yamanashi Cooperative Study Group. Oncology. 2018;94(2):85-91. (査読有)

2.Oritani K, Ohishi K, Okamoto S, Kirito K, Komatsu N, Tauchi T, et al. Effect of ruxolitinib therapy on the quality-of-life of Japanese patients with myelofibrosis. Curr Med Res Opin. 2018;34(3):531-7. (査読有)

3.Kirito K, Suzuki K, Miyamura K, Takeuchi M, Handa H, Okamoto S, et al. Ruxolitinib is effective and safe in Japanese patients with hydroxyurea-resistant or hydroxyurea-intolerant polycythemia vera with splenomegaly. Int J Hematol. 2018;107(2):173-84. (査読有)

4.Kirito K, Okamoto S, Ohishi K, Tauchi T, Handa H, Saito S, et al. Evaluation of the dose and efficacy of ruxolitinib in Japanese patients with myelofibrosis. Int J Hematol. 2018;107(1):92-7. (査読有)

5.Nakajima K, Kirito K, Kawashima I, Koshiishi M, Kumagai T, Mitsumori T. Aberrant Activation of NF- κ B and Hypoxia Enhances Glycolytic Enzyme Hexokinase II Expression in B-Cell Lymphoma through Activation of HIF-1. Blood. 2017;130(Suppl 1):4025. (査読有)

6.Koshiishi M, Sueki Y, Kawashima I, Nakajima K, Mitsumori T, Kirito K. Tumor Lysis Syndrome after the Administration of Ruxolitinib in a Patient with Post-polycythemia Vera Myelofibrosis. Internal Medicine. 2017;56(17):2335-8. (査読有)

7.Komatsu N, Kirito K, Shimoda K, Ishikawa T, Ohishi K, Ohyashiki K, et al. Assessing the safety and efficacy of ruxolitinib in a multicenter, open-label study in Japanese patients with myelofibrosis. Int J Hematol. 2017;105(3):309-17. (査読有)

8.Yoshimi A, Toya T, Nannya Y, Takaoka K, Kirito K, Ito E, et al. Spectrum of clinical and genetic features of patients with inherited platelet disorder with suspected predisposition to hematological malignancies: a nationwide survey in Japan. Ann Oncol. 2016;27(5):887-95. (査読有)

9.Verstovsek S, Vannucchi AM, Grieshammer M, Masszi T, Durrant S, Passamonti F, et al. Ruxolitinib versus best available therapy in patients with polycythemia vera: 80-week follow-up from the RESPONSE trial. Haematologica. 2016;101(7):821-9. (査読有)

10.Tamura K, Kawai Y, Kiguchi T, Okamoto M, Kaneko M, Maemondo M, et al. Efficacy and safety of febuxostat for prevention of tumor lysis syndrome in patients with malignant tumors receiving chemotherapy: a phase III, randomized, multi-center

trial comparing febuxostat and allopurinol. Int J Clin Oncol. 2016;21(5):996-1003. (査読有)

11.Omori M, Oishi N, Nakazawa T, Nakazawa K, Mitsumori T, Yuminochi T, et al. Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type of the uterine cervix: A case report. Diagn Cytopathol. 2016;44(5):430-3. (査読有)

12.Mitsumori T, Komatsu N, Kirito K. A CSF3R T618I Mutation in a Patient with Chronic Neutrophilic Leukemia and Severe Bleeding Complications. Intern Med. 2016;55(4):405-7. (査読有)

13.Kirito K, Sakamoto M, Enomoto N. Elevation of the Hepatitis B Virus DNA during the Treatment of Polycythemia Vera with the JAK Kinase Inhibitor Ruxolitinib. Intern Med. 2016;55(10):1341-4. (査読有)

14.Kawashima I, Kirito K. Metformin inhibits JAK2V617F activity in MPN cells by activating AMPK and PP2A complexes containing the B56alpha subunit. Exp Hematol. 2016;44(12):1156-65 e4. (査読有)

15.Oishi N, Kondo T, Nakazawa T, Mochizuki K, Tanioka F, Oyama T, et al. High prevalence of the MYD88 mutation in testicular lymphoma: Immunohistochemical and genetic analyses. Pathol Int. 2015;65(10):528-35. (査読有)

16.Nakajima K, Sueki Y, Koshiishi M, Kawashima I, Nozaki Y, Mitsumori T, et al. Gastric invasion of multiple myeloma presenting as gastrointestinal bleeding. Int J Hematol. 2015;101(6):525-6. (査読有)

17.Kawashima I, Mitsumori T, Nozaki Y, Yamamoto T, Shobu-Sueki Y, Nakajima K, et al. Negative regulation of the LKB1/AMPK pathway by ERK in human acute myeloid leukemia cells. Exp Hematol. 2015;43(7):524-33 e1. (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

1.Nakajima K, Kirito K, Kawashima I, Koshiishi M, Kumagai T, Mitsumori T. Aberrant Activation of NF- κ B and Hypoxia Enhances Glycolytic Enzyme Hexokinase II Expression in B-Cell Lymphoma through Activation of HIF-1. 第 59 回米国血液学会、2017.12. Atlanta (米国)

2.Kiladjian J-J, Verstovsek S, Grieshammer M, Masszi T, Durrant S, Passamonti F, et al. Results from the 208-Week (4-Year) Follow-up of RESPONSE Trial, a Phase 3 Study Comparing Ruxolitinib (Rux) with Best Available Therapy (BAT) for the Treatment of Polycythemia Vera (PV). 第 59 回米国血液学会、2017.12. Atlanta (米国)

3. Kirito K, Komatsu N, Shimoda K, Okada H, Amagasaki T, Yonezu T, et al. Assessing the Safety and Efficacy of Ruxolitinib in a Multicenter, Open-Label, Expanded-Access Study in Japanese Patients with Myelofibrosis (MF). 第 57 回米国血液学会、2015.12. Orlando (米国)

4. Kawashima I, Kirito K. Metformin Inhibits JAK2V617F Activity By Activating AMPK and PP2A Containing B56 Alpha Subunits in MPN Cells. 第 57 回米国血液学会、2015.12. Orlando (米国)

〔その他〕

ホームページ等

山梨大学医学部血液腫瘍内科ホームページ
(<http://www.yamanashi-hematology.com/>)
において、研究成果の報告を行った。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桐戸 敬太 (KIRITO, Keita)
山梨大学・大学院総合研究部・教授
研究者番号：90306150

(2) 研究分担者

三森 徹 (MITSUMORI, Toru)
山梨大学・大学院総合研究部・講師
研究者番号：80377514

川島 一郎 (KAWASHIMA, Ichiro)
山梨大学・大学院総合研究部・助教
研究者番号：20622369

野崎 由美 (NOZAKI, Yumi)
山梨大学・大学院総合研究部・助教
研究者番号：80530104

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし