

令和元年5月17日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09845

研究課題名(和文) クラスリン依存性エンドサイトーシス関連分子CALMを標的とした白血病治療の可能性

研究課題名(英文) Leukemia Therapy Targeting Clathrin-dependent Endocytosis

研究代表者

石川 裕一 (Ishikawa, Yuchi)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80721092

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)：エンドサイトーシスは細胞の恒常性維持において不可欠なメカニズムであり、本研究では、急性骨髄性白血病(AML)においてクラスリン依存性エンドサイトーシス(CDE)を標的とする治療の可能性、特にトランスフェリンレセプター-1(TFR1)との関わりについて検討を行った。白血病患者検体での検討では、白血病細胞は他の細胞と比べてTFR1の発現の亢進が認められ、同細胞でCDE関連分子の発現量とTFR1発現は相関した。また、それらの発現を標的とすることにより白血病細胞の増殖の減少が認められた。これらより、TFR1、CDEを標的とする白血病治療の有効性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、造血器悪性疾患においてクラスリン依存性エンドサイトーシスおよびその関連分子CALM、トランスフェリンレセプター(TFR1)を標的とする治療が有効である可能性が示された。その有効性はTFR1の発現量、CALM等の発現量とは必ずしも一致が認められず、TFR1、クラスリン依存性エンドサイトーシスに依らない細胞内への鉄の取り込み機構の存在も考えられた。一方で、これらエンドサイトーシスを標的とする治療法の有効性に関連する新たなバイオマーカーの存在が示唆され、その全容解明には更なる研究が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Endocytosis is the essential machinery for many cellular processes. One of the endocytic pathways, Clathrin-dependent endocytosis (CDE) is an important mechanism for internalization of Transferrin receptor (TFR1) and other receptors. Since leukemia cells demanded iron for cell proliferation, in this study, we evaluated the efficacy of leukemia therapy targeting CDE and TFR1 endocytosis. TFR1 and CALM, a component of clathrin-coated vesicles, was highly expressed in primary AML cells and there was a correlation between their expression levels. CALM shRNA transduced AML cells showed a proliferative disadvantage compared to shRNA non-transduced cells. Our data indicated that CALM is essential for leukemia cell proliferation by regulating CDE, especially, TFR1 internalization. Since CALM inactivation significantly blocked the leukemia cell proliferation, our findings provide new therapeutic strategies for leukemia treatment.

研究分野：造血器悪性腫瘍

キーワード：造血器腫瘍 急性骨髄性白血病 エンドサイトーシス CALM トランスフェリンレセプター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エンドサイトーシスは細胞の恒常性維持において不可欠なメカニズムの一つであり、特に増殖が盛んな腫瘍細胞において、その機能亢進が認められている。種々のエンドサイトーシスのメカニズムが報告されている。クラスリン依存性エンドサイトーシス(Clastrin-dependent Endocytosis)は、エンドサイトーシスの中でも最も代表的なものであり、サイトカインレセプター、トランスフェリンレセプター1(TFR1) など細胞表面に発現している数多くの受容体の内在化に関わっているとされる。また、血液悪性腫瘍および固形腫瘍において、エンドサイトーシスに関与する分子異常が腫瘍の発症・進展に関与している事が示唆されているが、それら分子異常が腫瘍形成に関わるメカニズムは明らかでなく、治療標的としての可能性も不明瞭である。

2. 研究の目的

本研究では、造血器悪性腫瘍、特に急性骨髄性白血病(AML)におけるクラスリン依存性エンドサイトーシスの役割、それらが関わる細胞内シグナル伝達と腫瘍発症・進展の関わりを解明し、造血器腫瘍におけるクラスリン依存性エンドサイトーシスおよびその関連分子CALM、TFR1を標的とする治療法の可能性の探索を目的とした。

3. 研究の方法

本研究はAMLにおけるレセプター型チロシンキナーゼ、TFR1など細胞増殖に重要なレセプター内在化と、CALM及びエンドサイトーシス関連分子の関わりを解明を目的に次のように研究を進めた。

- (1) AML患者細胞における細胞表面のトランスフェリンレセプターの発現、エンドサイトーシスに関わる遺伝子の発現レベルとAMLの病型、遺伝子異常の関係について検討した。
- (2) 白血病腫瘍細胞の増殖におけるエンドサイトーシスの機能、CALM分子の役割についてCALM欠損白血病細胞を用いて検討した。
- (3) AMLでのRTK異常、そのシグナル伝達と受容体内在化とエンドサイトーシスの関わりを検討、CALM、トランスフェリンレセプターなどクラスリン依存性エンドサイトーシス関連分子を標的とする治療法の有効性、およびそれに関わるバイオマーカーの探索を行った。

4. 研究成果

CALM分子が深く関わるクラスリン依存性エンドサイトーシスは、AMLで高発現が報告されているトランスフェリンレセプター1(TFR1)、および、その病態形成の深く関わるレセプター型チロシンキナーゼの内在化に深く関わりとされている。AML患者細胞におけるTFR1発現の詳細な解析を目的に、フローサイトメトリーにてAML44例でのTFR1の発現の検討を行った。各症例における正常リンパ球分画でのTFR1発現と比較すると、AML芽球分画全体では、有意なTFR1の高発現が認められた(図1)。しかし、急性前骨髄球性白血病(APL)では、細胞表面のTFR1発現量が他のAMLと比べて有意に低く、正常リンパ球分画との発現量の比較においても有意な差は認められなかった。また、APL以外のAML各病型間ではTFR1発現量に差は認められなかった。

次いで、AML81例を用いてTFR1およびクラスリン

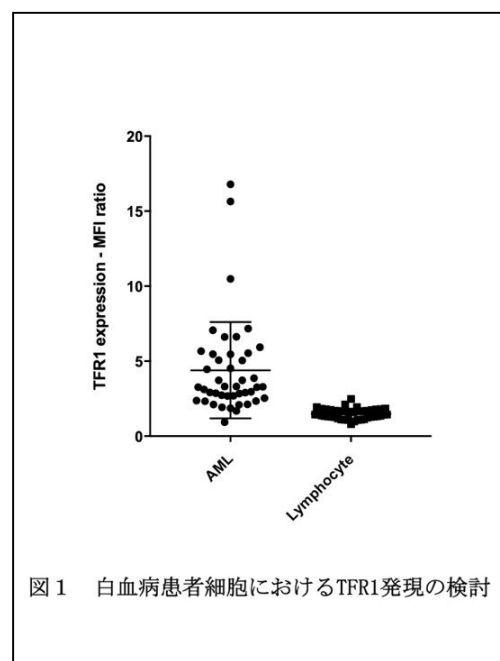


図1 白血病患者細胞におけるTFR1発現の検討

依存性エンドサイトーシス関連分子 CALM、EPS15 の mRNA 発現について検討を行ったところ、全ての検体において TFR1、CALM、EPS15 の発現が認められ、これらには正の相関が認められた(図2)。これらより、実際の AML 患者細胞においても TFR1、CALM の高発現が認められた。そして、細胞表面の TFR1 発現量が低かった APL においても、mRNA レベルでは他の AML 細胞と同程度の TFR1 発現が認められ、翻訳後修飾等による TFR1 発現調節機構の存在も考えられた。

AML 細胞における TFR1 発現とクラスリン依存性エンドサイトーシスを標的とする治療法の有効性の関連を検討する目的で、AML 細胞株で shRNA による CALM ノックダウンを行い細胞増殖への影響について検討したところ、ほとんど全ての細胞株で CALM に対する shRNA 導入により細胞増殖における負の影響が観察された。さらに、細胞内鉄濃度を減少させる鉄キレート剤 deferoxamine (DFO) との併用によりその効果は増強された。このように、白血病細胞株においてクラスリン依存性エンドサイトーシス、および鉄の細胞内取り込みを標的とする白血病治療の有効性が示唆された。

また、患者 AML 細胞を用いてレセプター型チロシンキナーゼ(RTK)における活性型異常、それらに対するチロシンキナーゼ阻害剤による in vitro での増殖抑制効果、APL 以外の一部 AML 細胞でも有効とされる ATRA などレチノイン酸による抗腫瘍効果とそのレセプター RAR の発現等と TFR1、CALM 等の発現について検討を行ったところ、それらの間には相関性が認められなかった。しかし、FLT3、KIT といった AML で高頻度に認められる変異型 RTK を発現させた細胞株を低濃度のチロシンキナーゼ阻害剤へ暴露すると、変異型 RTK の総蛋白発現量は一定であったにもかかわらず、細胞表面への RTK 発現の増加が認められ、細胞増殖の増加が認められた。一方で、野生型 RTK 発現細胞での検討では、低濃度チロシンキナーゼ阻害剤暴露による野生型 RTK の細胞表面の発現亢進は認められず、細胞増殖への影響も認められなかった。これらの結果は、チロシンキナーゼ阻害剤により活性型変異 RTK 特異的な細胞表面への発現亢進、すなわちエンドサイトーシスによる細胞内内在化の阻害と細胞増殖との関わりが考えられた。

細胞増殖が盛んな細胞ほど細胞増殖に必要な鉄の需要量が多いと考えられ、TFR1 の高発現が考えられる。また、そのような細胞では細胞増殖における TFR1 依存性、すなわちクラスリン依存性エンドサイトーシスへの依存度も高いと考えられ、shRNA 導入による CALM ノックダウンの細胞増殖に与える影響が大きいと考えられる。このような仮説に基づき、各種 AML 細胞株を用いて細胞表面 TFR1 発現量と shRNA による CALM 欠損の細胞増殖に与える影響との関係について検討を行ったところ、両者間に有意な相関は認められなかった。この結果は、AML 細胞における TFR1 発現量は必ずしもクラスリン依存性エンドサイトーシスへの依存性を示すものではなく、同経路以外の TFR1 内在化経路もしくは TFR1 を介さない細胞内への鉄の取り込み経路の存在も考えられた。これらの結果も踏まえ、各種 AML 細胞株における shRNA による CALM ノックダウンによる細胞増殖抑制と関連するバイオマーカーの探索を行ったところ、その候補因子を同定した。これらより、クラスリン依存性エンドサイトーシス、TFR1 の内在化を標的とする治療法の有効性の指標と関連するような新たなバイオマーカーの存在が示唆された。

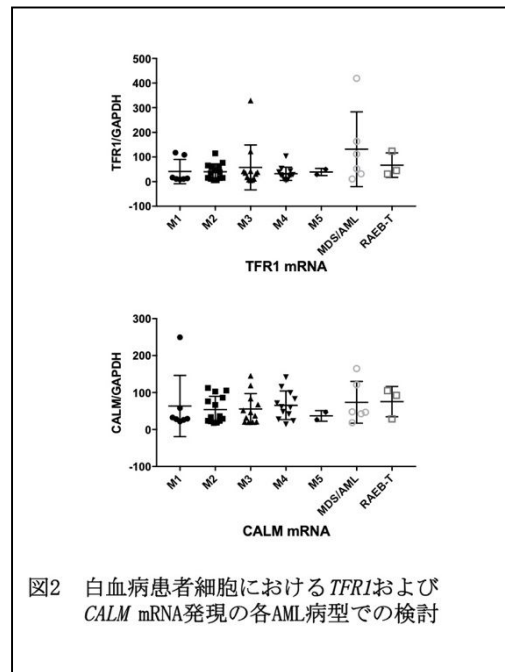


図2 白血病患者細胞における TFR1 および CALM mRNA 発現の各 AML 病型での検討

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1. 石川裕一 CBF白血病の分子病態と治療. 臨床血液.2018;59(10):1997-2006. doi: 10.11406/rinketsu.59.1997. (査読有り)
2. Hattori H, Ishikawa Y, Kawashima N, Akashi A, Yamaguchi Y, Harada Y, Hirano D, Adachi Y, Miyao K, Ushijima Y, Terakura S, Nishida T, Matsushita T and Kiyoi H. Identification of the novel deletion-type *PML-RARA* mutation associated with the retinoic acid resistance in acute promyelocytic leukemia. PLOS One. 2018, 13(10): e0204850. doi:10.1371/journal.pone.0204850. (査読有り)
3. Nishiyama T, Ishikawa Y, Kawashima N, Akashi A, Adachi Y, Hattori H, Ushijima Y, Kiyoi H. Mutation analysis of therapy-related myeloid neoplasms. Cancer Genetics 2018; 222-223:38-45. doi: 10.1016/j.cancergen.2018.02.006. (査読有り)

〔学会発表〕(計2件)

1. Yasuhiko Harada, Yuichi Ishikawa, Naomi Kawashima, Hikaru Hattori, Yohei Yamaguchi, Yoshiya Adachi, Yoko Ushijima and Hitoshi Kiyoi. Anti-leukemic effect of retinoic acid in non-APL AML cells. 60th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, 2018
2. Naomi Kawashima, Yuichi Ishikawa, Akimi Akashi, Hikaru Hattori, Yohei Yamaguchi, Takahiro Nishiyama, Rika Kihara, Yukiyasu Ozawa and Hitoshi Kiyoi. Dynamics of Genetic Landscapes and Clonal Evolution between Patients and PDX Models in Acute Myeloid Leukemia. 60th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, 2018

〔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〕

なし

6. 研究組織

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。