

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19581

研究課題名(和文) 白血病幹細胞の代謝リプログラミングを標的とした治療法の開発

研究課題名(英文) Targeted therapy for metabolic-reprogramming in leukemia stem cell

研究代表者

齋藤 祐介 (Saito, Yusuke)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：20585674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：白血病細胞が骨髄で生存・増殖するための代謝リプログラミング制御機構を解明し、その代謝経路阻害剤の評価を行った。まず、ヒトAML細胞株においてAMPKはその生存とグルコース飢餓耐性に必須でありAMPK阻害剤は効率よく白血病エネルギー代謝を阻害した。また、AMLの予後不良因子であるEV11は白血病発症過程においてグルタミン依存的な酸化リン酸化の活性化に寄与し代謝活性を亢進させる。EV11高発現AMLではL-アスパラギナーゼの感受性が著しく亢進しており、白血病マウスモデルにおいて治療群では白血病増殖抑制効果と生存期間の延長を認めた。AMPK阻害剤とL-アスパラギナーゼは代謝阻害療法の候補である。

研究成果の概要(英文)：Leukemia cells can survive and proliferate under the metabolic stress environment of bone marrow. We aim to identify a specific metabolic inhibitor and clarify change of energy metabolism in refractory leukemia. 1) Based on anti-proliferative and energy metabolism inhibitory effects in human AML cells, AMPK inhibitor (Compound C) had a high anti-leukemic effect in MLL-rearranged (MLL-r) leukemia. 2) We analyzed metabolic change during the leukemia development process in the EV11 high expression (EV11+) MLL-r AML mice model by Extracellular flux analyzer, and revealed the predominant accelerated oxidative phosphorylation (OXPHOS) prior to activation of glycolysis and higher dependency on glutamine as energy source. We revealed that L-Asparaginase suppressed OXPHOS and cell proliferation of the EV11+ AML cells effectively in vitro and in vivo. Further clarification of metabolic reprogramming in leukemia cells can be a new tool to realize a breakthrough of refractory leukemia treatment.

研究分野：血液腫瘍学、小児科学、がん代謝

キーワード：急性骨髄性白血病 代謝リプログラミング グルタミン代謝 白血病幹細胞

1. 研究開始当初の背景

白血病細胞は低酸素・低栄養といった増殖には極めて不利な環境においてもエネルギー代謝を巧みに変化させること(代謝リプログラミング)によって生存・増殖することが可能である。この代謝リプログラミングを阻害すると、白血病細胞は骨髄の過酷な代謝ストレス環境下においてエネルギー枯渇状態に陥り死滅すると考えられる。しかし、どのような代謝センサーが白血病細胞特異的な代謝を誘導し骨髄での生存・増殖に寄与しているのかこれまで不明であった。申請者は代謝センサーである AMPK の活性阻害が白血病幹細胞特異的なエネルギー代謝阻害を引き起こすことことから、新規白血病幹細胞の治療標的になることを報告した¹⁾。難治性急性骨髄性白血病(AML)において代謝リプログラミングを制御する因子と特異的な阻害剤を同定することができれば白血病の新規治療法として治療成績改善に寄与することが可能である。しかし、白血病原因遺伝子や白血病分類の違いによってどのようなエネルギー代謝を利用するのかその「生存戦略」はこれまで明らかにされていなかった。種々の白血病原因遺伝子に特徴的な白血病エネルギー代謝表現型を解析することにより、難治性白血病に対する新規治療の選択が可能になることが予想される。

2. 研究の目的

MLL 再構成 AML(MLL-r AML)では、成人小児ともに転写因子 EVI1 の高発現を伴うことで末梢血の芽球は著しく増殖し、その予後は極めて不良となる^{2,3)}。本研究ではこの EVI1 と代謝センサー AMPK に着目し、ヒト白血病細胞と難治性白血病幹細胞における代謝リプログラミング機構の解明と新規代謝阻害療法を開発するために以下の解析を行う。

I. AMPK 阻害剤による代謝阻害効果を検討し、標的となる代謝経路を同定する。

II. 各種ヒト AML 細胞株に対する AMPK 阻害剤の抗白血病効果を明らかにする。

III. 難治性白血病マウスモデル (EVI1 高発現 MLL 再構成白血病:EVI1+MLL-r AML) を樹立し白血病発症過程における代謝リプログラミング機構の解明と新規代謝阻害剤の同定を行う。

3. 研究の方法

I. AMPK 阻害剤による解糖系代謝阻害効果を検討し、標的となる代謝経路を同定する。

a) ヒト AML 細胞株に AMPK 阻害剤を添加し、その解糖系活性の指標である Extra cellular acidification rate (ECAR)ならびに酸化リン酸化の指標である Oxygen consumption rate (OCR)の変化を XF analyzer を用いて解析する。
b) 同様の実験系を用いて AMPK 阻害剤を添加した細胞を回収し、DNA マイクロアレイを用いて網羅的な遺伝子発現変化を Gene Set Enrichment analysis (GSEA)を用いて解析する。

II. 各種ヒト難治性白血病に対する AMPK 阻害剤の抗白血病効果を明らかにする。

a) ヒト AML 細胞株に AMPK を標的とした shRNA ベクターを導入し、AMPK 発現抑制株を作製する。この細胞株を低栄養、低酸素、抗がん剤存在下などのストレス環境で培養し、細胞生存率あるいはエネルギー産生能(解糖系活性)がどのように変化するか検討する。
b) AML 細胞株に AMPK 阻害剤(Compound C)を各種濃度(10, 1, 0.1, 0.01 μ M)で添加し、細胞増殖阻害効果(IC50)を算出する。

III. EVI1 高発現 AML の代謝リプログラミングを阻害する薬剤を同定する。

a) EVI1+MLL-r AML のマウスモデルを樹立し、白血病発症過程における代謝変化と代謝関連遺伝子の変化を細胞外フラックスアナライザーおよびマイクロアレイで解析する

b) Evi1 高発現 AML 特異的に活性化している代謝経路に対して解糖系阻害剤(2-DG),グルタミン代謝阻害剤(BPTES, L-アスパラギナーゼ)阻

害剤を添加し in vitro, in vivo における抗白血病効果を検討する。

4. 研究成果

(1) AMPK 阻害剤は白血病細胞の解糖系と酸化的リン酸化を効率良く阻害する。

ヒト白血病細胞株 (MOLM13, K562) に AMPK を標的とした shRNA を導入し細胞生存率および解糖系、酸化的リン酸化活性の測定を行った。MLL 再構成を有する MOLM13 では AMPK 発現抑制により細胞生存率は著しく低下した。一方、BCR-ABL を有する K562 においては細胞増殖能に変化は認めなかったもののグルコース飢餓状態における解糖系および酸化的リン酸化の代謝活性が著しく低下した。このことから AMPK 非依存的な細胞においても代謝飢餓抵抗性に AMPK が寄与している可能性が示唆された。次に白血病細胞株 (MOLM13, MOLM14) に Compound C を 1 μ M 添加し 1 時間培養した白血病細胞の解糖系、酸化的リン酸化活性を細胞外フラックスアナライザーで測定した。Compound C の添加により解糖系活性のみならず酸化的リン酸化も阻害されることが明らかとなった。さらに AMPK 阻害剤による代謝関連遺伝子の発現変化を GSEA で解析したところ解糖系関連遺伝子の発現変化を同定した。

Compound C による AMPK の阻害は極めて効率的にエネルギー産生を阻害することが明らかとなった。

(2) AMPK 阻害剤は MLL 再構成白血病において高い抗白血病効果を有する。

種々の AML 細胞株を用いて増殖阻害効果の検討を行った。Compound C は MLL 再構成陽性 AML 細胞株 (MOLM13, MOLM14, MV4;11, KOCL48) で $IC_{50} < 1 \mu$ M と高い増殖阻害効果を示した (図 2)。次に、白血病患者検体を用いて増殖阻害効果を測定したところ細胞株と同様に MLL 再構成陽性 AML で

高い抗白血病効果を示した。

図1. Compound Cの50%増殖阻害濃度 (μ M)

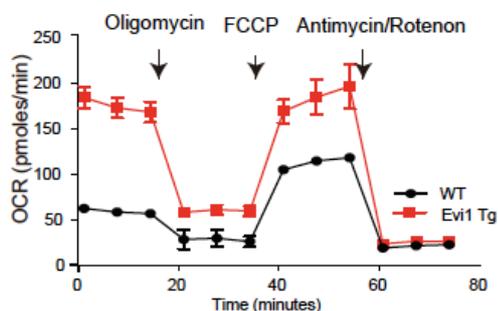
UCSD/AML1	2.456	HL60	0.49
MOLM1	2.87	MOLM13	0.002
U937	2.38	MOLM14	0.005
NB4	3.78	MV4;11	0.005
K562	0.59	KOCL48	0.12

はMLL再構成AML

(3) MLL 再構成白血病では EVI1 高発現によって酸化的リン酸化と解糖系が活性化する。

MLL 再構成 AML (MLL-r AML) では、成人小児ともに転写因子 EVI1 の高発現を伴うことで末梢血の芽球は著しく増殖し、その予後は極めて不良となる。我々は、造血幹前駆細胞特異的に Evi1 が発現する Tg マウスの造血幹前駆細胞を採取し MLL-AF9 発現レトロウイルスベクターを導入することで Evi1+MLL-r AML マウスモデルを作製した。Evi1+MLL-r AML マウスは白血病発症能が亢進し末梢血芽球が著増することからヒト白血病と同様の表現系が再現された。次に、MLL 白血病発症過程におけるエネルギー代謝変化を細胞外フラックスアナライザーで解析したところ、Evi1+MLL-r AML では解糖系の活性化よりも先に酸化的リン酸化が優位に亢進することが明らかとなった (図 2)。

図2. Evi1+MLLでは酸化的リン酸化が優位に亢進する

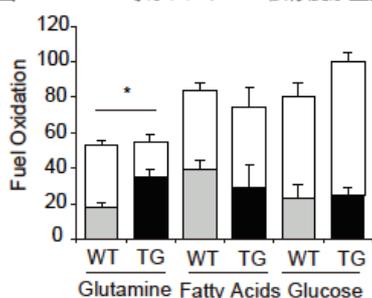


(4) Evi1 はグルタミン代謝依存的に酸化的リン酸化を活性化する。

Evi1 が酸化的リン酸化を活性化する機序を明らかにするために Evi1+MLL-r 白血病細胞がどのような基質をエネルギー源として利用して

いるか細胞外フラックスアナライザーを用いて解析した。WT MLL-r AML と比較して Evi1+MLL-r AML ではグルタミン依存的なエネルギー代謝が亢進していた(図 3)。さらに Evi1 が制御する代謝関連遺伝子を網羅的に解析し、Slc1a5, Idh2, Asns を候補遺伝子として抽出した。

図3. Evi1+MLLではグルタミン依存度が上昇する



(5) Evi1+MLL-r AML では L-アスパラギナーゼの感受性が亢進する。

Evi1 が活性化する解糖系およびグルタミン依存的なエネルギー代謝を阻害する薬剤を検索したところグルタミナーゼ活性を有する⁴⁾ L-アスパラギナーゼに著しく感受性を有することが明らかとなった(図 4)。Evi1+MLL-r AML マウスに対して L-アスパラギナーゼ(1000U/kg) 週 5 日腹腔内投与を行った結果、骨髄・末梢血における芽球の抑制と生存期間の延長を認めた(図 5)。さらに、ヒト EVI1 高発現 AML 細胞株 UCSD/AML1 の xenograft モデルにおいても L-アスパラギナーゼ投与群では有意に腫瘍抑制効果を確認した。

図4. Evi1+MLL-r AML に対する L-アスパラギナーゼの効果

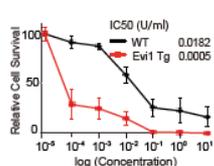
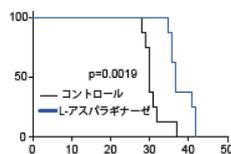


図5. 白血病マウスでのL-アスパラギナーゼ投与による白血病抑制効果



(結論と考察)

これらの結果から MLL 再構成白血病では AMPK 阻害剤が、EVI1 高発現白血病では L-アスパラギナーゼが代謝リプログラミングを阻害するために有効な治療薬剤であるこ

とが示された。また、これまで一部の AML において L-アスパラギナーゼの有効性が報告されていたもののその機序や感受性の指標は不明であった⁵⁾。本研究によりグルタミン依存度が高いAMLおよびSlc1a5, Idh2の高発現とAsns低発現が感受性を予測する因子であることが示唆された。今後、難治性 AML 治療の新たな選択肢として AMPK 阻害剤の開発ならびに L-アスパラギナーゼの drug repositioning を推進していく。

<引用文献>

- 1) Saito Y, Chapple RH, Lin A, Kitano A, Nakada D. AMPK Protects Leukemia-Initiating Cells in Myeloid Leukemias from Metabolic Stress in the Bone Marrow. *Cell Stem Cell* 2015 Nov; **17**(5): 585-596.
- 2) Gröschel S, Schlenk RF, Engelmann J, et al. Deregulated expression of EVI1 defines a poor prognostic subset of MLL-rearranged acute myeloid leukemias: a study of the German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group and the Dutch-Belgian-Swiss HOVON/SAKK Cooperative Group. *J Clin Oncol* 2013 Jan; **31**(1): 95-103.
- 3) Matsuo H, Kajihara M, Tomizawa D, et al. EVI1 overexpression is a poor prognostic factor in pediatric patients with mixed lineage leukemia-AF9 rearranged acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2014 Nov; **99**(11): e225-227.
- 4) Chan WK, Lorenzi PL, Anishkin A, et al. The glutaminase activity of L-asparaginase is not required for anticancer activity against ASNS-negative cells. *Blood* 2014 Jun; **123**(23): 3596-3606.
- 5) Willems L, Jacque N, Jacquelin A, et al. Inhibiting glutamine uptake represents an attractive new strategy for treating acute myeloid leukemia. *Blood* 2013 Nov; **122**(20): 3521-3532.

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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

齋藤 祐介 他, 難治性白血病のエネルギー代謝特性を標的とした治療法の探索, 第6回がんと代謝研究会, 2018年

(2)研究分担者

()

齋藤 祐介 他, 転写因子 EVI1 による白血病代謝制御, 第5回がんと代謝研究会, 2017年

研究者番号:

齋藤 祐介, 白血病代謝を標的とした治療研究に関する最近の話題, 造血器腫瘍セミナー(招待講演, 2017年

(3)連携研究者

()

[図書](計 0件)

研究者番号:

[産業財産権]

(4)研究協力者

()

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

齋藤 祐介 (SAITO, Yusuke)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号: 20585674