

様 式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 2 年 5 月 30 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16094

研究課題名(和文) 白血病増殖を抑制する骨髄代謝環境の構築

研究課題名(英文) Construction of bone marrow metabolic environment that suppresses leukemia growth

研究代表者

齋藤 祐介 (Saito, Yusuke)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：20585674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：白血病細胞はグルコース飢餓状態においてもフルクトースとマンノースを解糖系エネルギー源として利用可能である。マンノースはマンノース-6-リン酸イソメラーゼ(MPI)によって解糖系に動員されるが、MPIを抑制することで白血病細胞のマンノース代謝は阻害される。さらにMPI抑制白血病細胞にマンノースを過剰に負荷すると中間代謝産物のマンノース-6-リン酸が過剰に蓄積し解糖系代謝を抑制することが明らかとなった。MPI高発現白血病では骨髄低グルコース環境においてマンノースを利用し代謝的なアドバンテージを得ているため、マンノース-解糖系代謝は白血病の新規治療標的となり得る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで白血病細胞が骨髄でのグルコース飢餓状態においてどのように解糖系を維持しているのか明らかになっていなかった。白血病細胞がグルコース以外の糖質としてマンノースを解糖系エネルギー源として利用することを始めて明らかにした。MPI高発現は白血病の予後不良因子であり、マンノース-解糖系代謝は白血病の新規治療標的となり得る。今後の展開として、MPI低発現のがん細胞に対してはグルコースに変えてマンノースを糖質として摂取する、MPI高発現のがん細胞ではMPI阻害とマンノース負荷を併用することでがん増殖を抑制するがん代謝食療法の開発に繋げる。

研究成果の概要(英文)：Proliferating leukemic cells consume substantial glucose, which lead to glucose insufficiency in bone marrow. However, leukemia cells can survive under low glucose conditions. In this study, we aim to identify a metabolic pathway of leukemia cells to provide the energy source for glycolysis under low glucose conditions. Our results showed that fructose and mannose are used as the energy source for glycolysis. Cells uptake mannose via the same transporter as glucose and covert mannose to glucose by Mannose-6-phosphate isomerase (MPI) for glycolysis. We established leukemia cell lines with a reduced MPI expression and showed that cell growth is suppressed and mannose reduces glycolysis activity in MPI knockdown cells. Surprisingly, mannose inhibited the regular metabolic pathway of glucose in MPI knockdown cells. The mannose metabolic pathway can be the therapeutic targets for leukemia.

研究分野：血液・腫瘍

キーワード：がん代謝 白血病 解糖系

※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。

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

急性白血病は低栄養環境の骨髄を増殖の場とする血液のがんである。急性白血病は化学療法・造血幹細胞移植あるいは分子標的療法の開発によってその治療成績は向上したものの、治療抵抗性の白血病の生存率は頭打ちの状態が続いており新規治療戦略の開発が急務である。白血病細胞は AKT, mTOR といった代謝制御分子を巧妙に操ることで解糖系あるいは酸化的リン酸化からのエネルギー維持が可能となる。解糖系の活性化は白血病発症における重要なプロセスであり急性骨髄性白血病(AML)では解糖系代謝関連遺伝子群の発現亢進が抗がん剤抵抗性に寄与することが報告されている(Chen WL, et al. Blood 2014)。白血病細胞がグルコースの取り込みと解糖系を活性化する過程では大量のグルコース消費が生じ骨髄内のグルコースの枯渇が生じる。低グルコース環境で解糖系からエネルギーを産生するためにはグルコース以外の基質を利用する必要があるもののその機序は明らかになっていない。

また、急性白血病の治療である多剤併用化学療法や造血幹細胞では重篤な粘膜障害が必発であるため中心静脈栄養が頻用され、また寛解導入療法では大量輸液が必須であることから輸液は支持療法の中心であるにもかかわらず白血病細胞への栄養基質供給の観点から輸液が選択される機会は皆無である。白血病細胞が生存する骨髄においてグルコース以外に代謝可能な糖質を同定し、その代謝経路を阻害することで白血病細胞が解糖系エネルギーを利用不可能な真の飢餓状態を構築することが可能となる。

2. 研究の目的

本研究は白血病細胞のエネルギー供給源を阻害し、白血病増殖に有利な環境を阻害すると同時に宿主の栄養状態の改善を可能にする新しいがん支持療法ならびに治療コンセプトの確立を目的として下記の研究を遂行する。

- (1) 高グルコース輸液が白血病細胞の増殖とエネルギー産生に与える影響についてエビデンスを構築する。マウス白血病モデルに中心静脈カテーテルを留置し中心静脈栄養(TPN)を行い白血病発症能および増殖能を促進するか解析する。
 - (2) 白血病が増殖する骨髄環境すなわち骨髄液中のグルコースと乳酸を測定する。白血病患者において骨髄内がグルコース飢餓状態であるのか解糖系活性が亢進しているのか明らかにする。
 - (3) 糖ライブラリーを用いて白血病細胞が代謝可能な糖基質を明らかにする。白血病細胞株に単糖類を添加し、解糖系が活性化する糖質を細胞外フラックスアナライザーで同定する。さらにそれぞれの糖質を加えた培地で白血病細胞が増殖可能であるか検討する。
 - (4) 白血病細胞が代謝可能である糖代謝経路を阻害することで白血病の増殖を抑制することが可能であるか検討する。
- (1)-(4)の解析から骨髄における白血病細胞の解糖系エネルギー源を同定し、エネルギー源として利用可能な糖質の代謝経路を阻害することで白血病細胞を飢餓状態に陥らせる新たな治療戦略を構築する。

3. 研究の方法

- (1) 高グルコース輸液が白血病細胞の増殖ならびにエネルギー代謝に与える影響の解析

MLL-AF9 を導入した骨髄前駆細胞を 9.0Gy の X 線を照射したレシピエントに移植する。白血病発症後の骨髄細胞を採取し、4.5 Gy の X 線を照射した中心静脈カテーテル挿入マウスに二次移植する。移植日から TPN 製剤を 3-7ml /24 時間で持続投与し 7-10 日間継続する。白血

病マウスモデルの生存曲線ならびに骨髄での白血病細胞数を検討する。

(2) 骨髄環境におけるグルコースと乳酸の測定

急性白血病 (AML, ALL) と診断された患者の骨髄液から血漿成分を採取し、グルコース濃度と解糖系活性として乳酸を測定する。骨髄で低グルコース濃度を認めた場合、白血病細胞株(K562, U937, NB4, THP1, MOLM13, MOLM14, MV4-11)を用いてグルコース飢餓における細胞生存率を検討する。

(3) 白血病細胞が代謝基質として利用可能な糖質の同定

白血病細胞株(K562, U937, NB4, THP1, MOLM13, MOLM14, MV4-11)に様々な糖類(グルコース、フルクトース、マンノース、タガトースト、ガラクトース、ソルビトール、スクロース、ラクトース)10mMを添加し細胞外フラックスアナライザーを用いて解糖系を活性化する糖類を同定する。さらに、各種糖質の白血病増殖能の評価: 通常の細胞培地に含まれるグルコースを様々な糖類(グルコース、フルクトース、マンノース、タガトースト、ガラクトース、ソルビトール、スクロース、ラクトース)に変換し、白血病細胞の生存・増殖能をMTTアッセイで比較検討する。それぞれの細胞で増殖に寄与する糖質を同定する。

(4) 新規解糖系活性化代謝経路の阻害による抗白血病効果の検討

白血病細胞が代謝可能な糖質であるマンノースについて、マンノースを解糖系に取り込む際に必要な酵素 Mannose-6 phosphate isomerase (MPI)の白血病細胞での機能を明らかにする。まず、shRNAを用いてMPI発現抑制K562細胞を樹立する (K562shMPI)。K562shMPIのグルコースおよびマンノース添加による細胞増殖能、K562shMPIにおいてマンノースがどのように代謝されるかをFluxメタボローム解析で同定する。

4. 研究成果

(1) 高グルコース輸液が白血病細胞の増殖ならびにエネルギー代謝に与える影響の解析

MLL-AF9 白血病細胞 2×10^3 を 4.5 Gy の X 線を照射した中心静脈カテーテル挿入マウスに二次移植した。移植日(day0)から TPN(ネオパレン 1 号液, グルコース 17.2%)を 4.8ml/day 24 時間持続投与を行なった。生存期間ならびに末梢血の白血病細胞数に有意差は認めず TPN の白血病増殖促進効果は認められなかった(図 1)。今後は他の白血病モデルを用いて検討を行う必要がある。

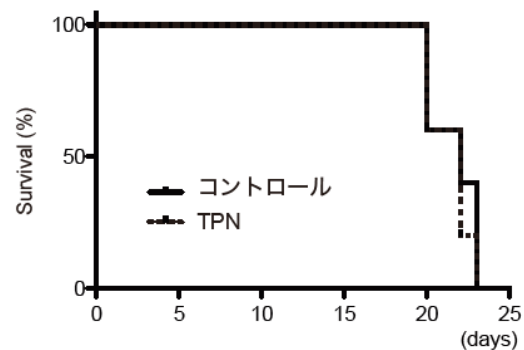


図1. マウス白血病モデルにおけるTPNの影響

(2) 骨髄環境におけるグルコースと乳酸の測定

グルコースは白血病細胞の解糖系エネルギー源である。骨髄は末梢血中と比較して閉鎖空間であり、飢餓ストレスがかかりやすい環境であると推測される。我々は急性骨髄性白血病(AML)と急性リンパ性白血病(ALL)患者の骨髄液におけるグルコースと乳酸を測定した。グルコース消費と乳酸蓄積は相関があり、グルコース濃度が 10mg/dl 以下の検体においてはいずれも乳酸が蓄積していた(図 2)。つまり、骨髄内の白血病細胞はグルコースを消費し乳酸が蓄積している条

件においても生存と増殖が可能であることが示された。白血病細胞株 (K562, U937, NB4, THP1, MOLM13, MOLM14, MV4-11)を用いてグルコース飢餓耐性を解析してみると K562, NB4, U937 は 0.2g/L 以下の低グルコース培地で 48 時間生存することができなかった。MOLM13, MOLM14, MV4-11 は 50%以上の生存が可能であった。これらの細胞株は MLL 再構成白血病で酸化的リン酸化(OXPHOS)への依存度が比較的高い傾向があった。

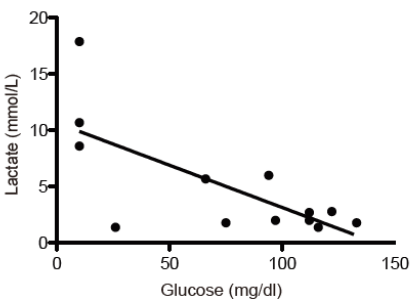


図2. 白血病検体におけるグルコースと乳酸値

上記の解析から、白血病細胞は骨髄の低グルコース環境で生存するために、グルコース以外の糖質を解糖系に利用している可能性を考えた。

(3) 白血病細胞が代謝基質として利用可能な糖質の同定

グルコースの代替として代謝可能な糖質を同定するため、各種糖質 10mM (グルコース、フルクトース、マンノース、タガトースト、ガラクトース、ソルビトール、スクロース、ラクトース)を添加し、細胞外フラックスアナライザーで解糖系活性を評価した。解糖系活性は細胞外酸性化速度(ECAR)で測定し、糖質添加後 ECAR/糖質添加前 ECAR で算出した(図 3)。解糖系活性高かったのはフルクトース、マンノースでありマンノースではグルコースと有意差を認めなかった(図 3)。次に各種糖質添加による白血病細胞の増殖能を MTT アッセイで評価した。その結果、フルクトースとマンノースは細胞増殖能も有していた。マンノースはグルコース非存在下においても解糖系を活性化させ細胞増殖を維持する糖基質であることが示された。

	glucose	fructose	xylitol	sorbitol	tagatose	mannose	galactose	sucrose	palatinose	lactose	maltose
K562	5.336	2.002	1.475	1.289	1.297	4.754	2.116	1.632	1.758	1.566	1.392
U937	2.849	2.518	1.117	1.173	1.071	2.331	1.560	2.289	2.138	1.785	1.803
NB4	5.454	3.918	3.042	1.703	1.306	3.573	1.981	1.568	1.433	1.324	1.511
THP1	4.979	4.260	2.162	1.877	1.434	5.412	2.746	2.122	2.475	2.017	1.885
MOLM13	4.328	2.630	1.830	1.650	1.566	3.361	2.919	2.361	1.484	1.638	1.901
MOLM14	4.219	2.326	1.589	1.147	0.986	2.980	1.649	1.427	1.434	1.459	1.521
MV4-11	5.291	3.826	1.774	1.866	1.502	5.190	2.375	1.921	1.784	1.127	1.728

図3. 白血病細胞株の糖質代謝

(4) 新規解糖系活性化代謝経路の阻害による抗白血病効果の検討

マンノースはグルコースと同一のトランスポーターから細胞内に取り込まれマンノース-6-ホスホイソメラーゼ (MPI) によりフルクトース-6-リン酸に変換され解糖系で利用される。 MPI に対する shRNA をレンチウイルスで K562 に導入した MPI 発現抑制株 (K562shMPI)を樹立した。K562shMPI はグルコース添加培地では増殖可能であったが、マンノース添加培地では増殖不可能であり細胞死が誘導された。安定同位体で標識したマンノースを添加し、培養 6 時間後のメタボローム解析を行った。K562 shScr (コントロール)においてマンノースは解糖系のみならず TCA cycle、PPP の代謝基質として利用されていたが、一方で K562shMPI ではマンノース-6-リン酸が過剰に蓄積し解糖系、TCA cycle、PPP の代謝が阻害されていた。驚くべきことに K562shMPI にマンノースとグルコースを同時に添加するとグルコースが存在するにも関わらず解糖系活性が抑制されることが明らかとなった。

マンノースはグルコースの代替の基質として白血病細胞の解糖系エネルギー源として利用される一方で、MPI の発現が低い腫瘍細胞においてはマンノースの中間代謝産物が蓄積し細胞増殖を抑制する。さらに、MPI 高発現白血病ではその予後が不良であり、骨髄低グルコース環境においてマンノースを利用可能である代謝的なアドバンテージを得ている可能性が示唆された。今回、我々が同定したマンノース-解糖系代謝は白血病の新規治療標的であり、MPI 阻害とマンノース負荷を併用することで白血病の増殖を抑制可能である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齋藤 祐介
2. 発表標題 第81回 日本血液学会学術集会
3. 学会等名 マンノースはグルコース飢餓時におけるAMLの解糖系を制御する
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

—

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----