

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17833

研究課題名(和文)代謝経路依存性タンパク修飾を標的とした新規白血病治療法の開発

研究課題名(英文)Development of novel therapy for leukemia targeting metabolism-dependent protein modification

研究代表者

森嶋 達也(Morishima, Tatsuya)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特任助教

研究者番号：40421375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：LMO2タンパク質は正常血液の形成に不可欠な役割を果たす一方、その異常はT細胞性急性リンパ性白血病(T-ALL)の発症に関与している。本研究ではLMO2タンパク質の活性化をアセチル化制御を介して阻害するNAMPT・SIRT2経路の特異的阻害薬がT-ALLに対して治療効果をもつかを検討した。LMO2タンパク質を発現するT-ALL細胞株およびT-ALL患者細胞に対しNAMPT阻害剤・SIRT2阻害剤がLMO2タンパク質のアセチル化依存的に抗腫瘍効果を示すことが明らかとなり、RNAシーケンスによりLMO2タンパク質のアセチル化により発現が変化する遺伝子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりLMO2タンパク質がT-ALLにおいて活性化され、腫瘍化を引き起こす分子メカニズムが明らかとなり、NAMPT・SIRT2経路の特異的阻害薬によりT-ALLを治療できる可能性が示された。また我々はLMO2タンパク質のアセチル化部位も同定しており、本研究で得られた知見を応用することにより同部位の脱アセチル化を阻害する低分子化合物を用いたより特異性の高い分子標的療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Hematopoietic transcription factor LMO2 plays an essential role in early hematopoiesis and is frequently activated in T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) patients. In this study, we studied whether NAMPT- or SIRT2-specific inhibitors, which inhibit LMO2 protein activation through regulation of acetylation, have a therapeutic effect on T-ALL. We revealed that NAMPT- or SIRT2-specific inhibitors could suppress proliferation of T-ALL cell lines and T-ALL patient cells which express LMO2 protein in LMO2 acetylation dependent manner. We also identified genes whose expression is regulated by LMO2 acetylation using RNA sequencing analysis.

研究分野：血液学

キーワード：白血病 アセチル化 LMO2 NAD+ NAMPT Sirtuin 代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

T細胞性急性リンパ性白血病(T-ALL)は成人においては依然致死率の高い難治性疾患であり、比較的予後良好な小児においてもB細胞性ALLと比較すると予後不良な疾患である。治療は多剤併用化学療法および造血幹細胞移植が行われているが、特異性の低い治療のため副作用も多く、治療成績も満足できるレベルに達していない。慢性骨髄性白血病においてチロシンキナーゼ阻害薬がその予後を大きく改善したように、**予後改善のためには分子病態に基づいた画期的な分子標的薬の開発**が期待されている。

転写因子 LMO2 は TAL1 など他の転写因子と TAL1 複合体と呼ばれる複合体を形成し、初期造血に不可欠な役割を果たしている。我々は **NAD⁺依存性タンパク質脱アセチル化酵素である Sirtuin2(SIRT2)による脱アセチル化が LMO2 タンパク質の活性化及び TAL1 複合体の形成に必須である**ことを見出し、ヒト iPS 細胞からの血球分化誘導系において NAD⁺の合成を制御する酵素である NAMPT あるいは SIRT2 の特異的阻害剤が血球への分化を著しく阻害すること、ゼブラフィッシュの *in vivo* 実験で NAMPT, SIRT2 の発現抑制が造血を阻害することを明らかにした。

転写因子 LMO2 は正常初期造血に不可欠な役割を果たしている一方、その恒常的な発現は T-ALL の発症に強く関与し、T-ALL 患者の約半数で LMO2 ないし TAL1 の高発現が認められる (Chambers et al, Open Biol 2015)。従って、上記の **NAD⁺代謝経路依存性脱アセチル化による LMO2 タンパク質の活性化は T-ALL の病態に関与している**と考えられる。

2. 研究の目的

LMO2 陽性 T-ALL において NAMPT-NAD⁺-SIRT2 経路を介する LMO2 タンパク質の脱アセチル化を阻害できれば、LMO2 タンパク質の活性化を阻害し TAL1 複合体の転写活性を抑え、その下流で働く細胞内シグナルの変化を介して芽球の増殖を抑えることができると予想される。本研究では *in vitro*, *in vivo* モデルを用いて T-ALL に対する NAMPT、SIRT2 阻害剤の抗腫瘍効果とその分子生物学的作用機序を解析し、**T-ALL における LMO2 タンパク質脱アセチル化依存性の増殖経路の全容を明らかにする**ことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) NAMPT、SIRT2 阻害剤の抗腫瘍効果の解析

LMO2 タンパク質の発現がみられる T-ALL 細胞株と患者細胞を NAMPT および SIRT2 特異的阻害剤存在下に *in vitro* 培養し、生細胞数の変化を経時的にカウントした。また、野生型またはアセチル化部位変異体の LMO2 を過剰発現させた細胞株を用いたレスキュー実験を行い、これらの薬剤の抗腫瘍効果が LMO2 タンパク質のアセチル化依存性であるかを評価した。*in vivo* モデルでは、免疫不全マウスに LMO2 陽性 T-ALL 患者細胞および野生型またはアセチル化部位変異体の LMO2 を過剰発現させた細胞株を移植し、NAMPT 特異的阻害剤投与後に骨髄内のヒト細胞のキメリズムを評価した。

(2) NAMPT・SIRT2 特異的阻害剤作用機序の分子生物学的解析

(1) で *in vitro* および *in vivo* で NAMPT および SIRT2 特異的阻害剤で処理した細胞を回収し、LMO2-LDB1 タンパク質の結合をタンパク質の相互作用を視覚的に検出可能な手法である PLA(Proximity Ligation Assay)法を用いて評価した。また、qPCR を用いて既知の T-ALL における TAL1 複合体ターゲット遺伝子の発現を測定した。

(3) T-ALL における LMO2 タンパク質脱アセチル化依存性の増殖経路の同定

野生型またはアセチル化部位変異体の LMO2 を過剰発現させた T-ALL 細胞株を NAMPT 阻害剤で処理し、RNA シークエンス解析を行った。LMO2 タンパク質のアセチル化依存性に発現が変化する遺伝子をもとに Pathway overrepresentation analysis および iRegulon analysis を行い、LMO2 タンパク質のアセチル化により影響を受けるパスウェイおよび転写因子結合モチーフの同定を行った。

4. 研究成果

(1) NAMPT、SIRT2 阻害剤の T-ALL に対する抗腫瘍効果

LMO2 タンパク質の発現がみられる T-ALL 細胞株である MOLT-4 細胞を NAMPT 阻害剤である FK-866, SIRT2 阻害剤である AC-93253 存在下に培養したところ、コントロールと比較して細胞増殖の抑制が認められた(図 1A)。レスキュー実験として野生型またはアセチル化部位変異体の LMO2 を過剰発現させた MOLT-4 細胞を NAMPT および SIRT2 特異的阻害剤存在下に培養したところ、アセチル化部位変異体の LMO2 を過剰発現させた細胞においてこれらの薬剤に対する耐性が認められた(図 1B)。LMO2 タンパク質の発現がみられる T-ALL 患者細胞の培養でも同様に NAMPT および SIRT2 特異的阻害剤によって増殖抑制が認められた(図 1C)。

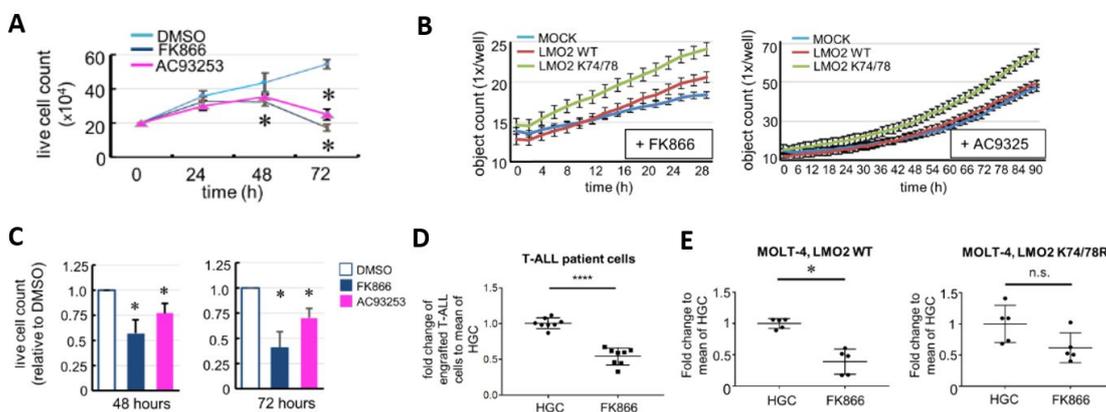


図1 NAMPTおよびSIRT2特異的阻害剤のT-ALL細胞に対する抗腫瘍効果

次に LMO2 陽性 T-ALL 患者細胞を経静脈的に移植した免疫不全マウスを用いて *in vivo* 実験を行った。移植 1 週間後より NAMPT 特異的阻害剤を腹腔内注射にて連日投与し、3 週間後の骨髄内のヒト由来細胞のキメリズムを評価したところ、NAMPT 特異的阻害剤投与により移植した T-ALL 細胞の増殖が有意に抑制されることが明らかになった(図 1D)。レスキュー実験として野生型またはアセチル化部位変異体の LMO2 を過剰発現させた MOLT-4 細胞を用いて同様の移植実験を行ったところ、*in vitro* の実験と同様にアセチル化部位変異体の LMO2 を過剰発現させた細胞において NAMPT 阻害剤に対する耐性が認められた(図 1E)。

これらの結果は NAMPT および SIRT2 特異的阻害剤は LMO2 を発現する T-ALL 細胞に対して抗腫瘍効果をもつこと、その抗腫瘍効果は LMO2 タンパク質のアセチル化を介していることを示している。

(2) NAMPT・SIRT2 特異的阻害剤の T-ALL における作用メカニズムの解析

これまでの我々の初期造血における研究結果から LMO2 タンパク質は脱アセチル化されることによって活性化して LDB1 タンパク質と結合できるようになり、この結合が TAL1 複合体の形成およびその転写活性に必須であるということがわかっており、T-ALL においても同様の機序が考えられる。NAMPT および SIRT2 特異的阻害剤存在下に培養した MOLT-4 細胞において LMO2 タンパク質と LDB1 タンパク質の結合を評価したところ、NAMPT および SIRT2 阻害に

より LMO2 タンパク質と LDB1 タンパク質の結合が阻害されること (図 2A)、その結果として T-ALL における TAL1 複合体のターゲット遺伝子の発現が低下していること (図 2B) が明らかになった。

In vivo の実験で薬剤投与後のマウス骨髄からヒト由来細胞を回収し同様の評価を行ったとこ

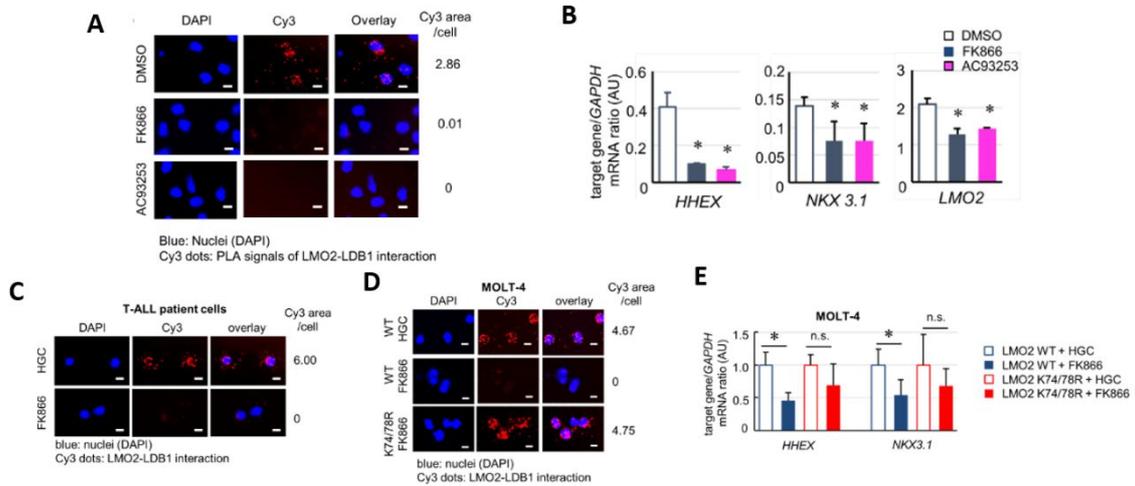


図2 T-ALLにおけるNAMPT・SIRT2特異的阻害剤の作用メカニズム

る、T-ALL 患者細胞で NAMPT 阻害剤投与により LMO2 タンパク質と LDB1 タンパク質の結合が阻害されること (図 2C)、レスキュー実験において野生型 LMO2 を過剰発現させた細胞では LMO2 タンパク質と LDB1 タンパク質の結合が阻害され TAL1 複合体のターゲット遺伝子の発現が低下するのに対し、アセチル化部位変異体の LMO2 を過剰発現させた細胞ではこれらの現象がみられないこと (図 2D-E) が明らかになった。

これらの結果は、初期造血と同様に T-ALL においても LMO2 タンパク質の脱アセチル化による活性化が LDB1 タンパク質への結合を介して TAL1 複合体の転写活性に必須であることを示している。

(3) T-ALL における LMO2 タンパク質脱アセチル化依存性の増殖経路の同定

最後に T-ALL における LMO2 タンパク質脱アセチル化依存性の増殖経路の解明のため、RNA シークエンス解析を行った。野生型またはアセチル化部位変異体の LMO2 を過剰発現させた MOLT-4 細胞を NAMPT 阻害剤有り無しの条件で培養、回収した細胞から RNA を抽出し解析を行った。その結果 NAMPT 阻害剤存在下に野生型 LMO2 を過剰発現させた細胞で発現が変化し、アセチル化部位変異体の LMO2 を過剰発現させた細胞では発現が変化しない遺伝子、すなわち

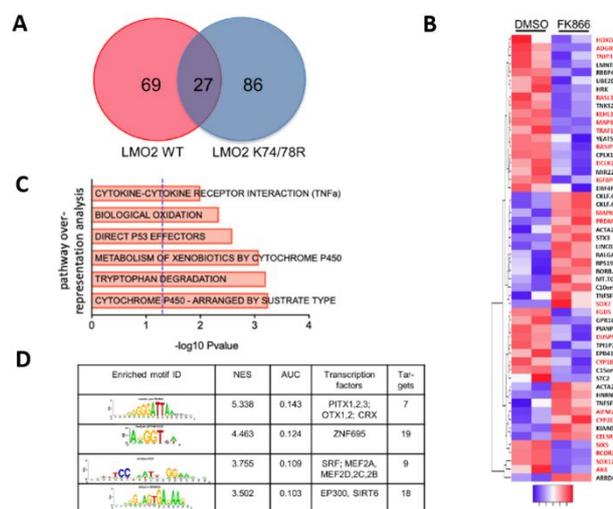


図3 T-ALLにおけるLMO2タンパク質脱アセチル化依存性の増殖経路の同定

その発現がLMO2タンパク質のアセチル化によって制御されていると思われる遺伝子として69の遺伝子を同定した(図3A-B)。さらにこれらの候補遺伝子リストを用いてパスウェイ解析を行ったところ、LMO2タンパク質のアセチル化によって制御されている経路の候補としてチトクロームP450、トリプトファン分解、p53、tumor necrosis factor α (TNF- α) 関連の経路などが同定された(図3C)。また、モチーフ解析ではPITX、ZNF695、MEF2およびEp300などの結合部位が同定された(図3D)。

(4)まとめ

以上の結果からLMO2タンパク質を発現するT-ALLに対し、NAMPTおよびSIRT2特異的阻害剤はLMO2タンパク質のアセチル化を介して抗腫瘍効果を発揮することが明らかとなった。我々はLMO2のアセチル化部位を同定しており、本研究で得られた知見を応用することにより同部位の脱アセチル化を阻害する低分子化合物を用いた分子標的療法の開発につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Morishima T*, Krahl AC, Nasri M, Xu Y, Aghaallaei N, Findik B, Klimiankou M, Ritter M, Hartmann MD, Gloeckner CJ, Stefanczyk S, Lindner C, Oswald B, Bernhard R, Haehnel K, Hermanutz-Klein U, Ebinger M, Handgretinger R, Casadei N, Welte K, Andre M, Mueller P, Bajoghli B, Skokowa J*. (*corresponding authors)	4. 巻 134(14)
2. 論文標題 LMO2 activation by deacetylation is indispensable for hematopoiesis and T-ALL leukemogenesis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1159-1175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2019000095.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Morishima T*, Takizawa H*.(*corresponding authors)	4. 巻 105(3)
2. 論文標題 Genetic fingerprint defines hematopoietic stem cell pool size and function.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 526-528
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2019.241299.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Xu Y, Nasri M, Dannenmann B, Mir P, Zahabi A, Welte K, Morishima T*#, Skokowa J*#.(*corresponding authors, #equally contribution)	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 NAMPT/SIRT2-mediated inhibition of the p53-p21 signaling pathway is indispensable for maintenance and hematopoietic differentiation of human iPS cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13287-021-02144-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Morishima T, Krahl AC, Xu Y, Aghaallaei N, Nasri M, Klimiankou M, Ritter M, Hartmann MD, Findik B, Stefanczyk S, Lindner C, Oswald B, Bernhard R, Haehnel K, Hermanutz-Klein U, Kanz L, Bajoghli B, Andre M, Mueller P, Welte K, Skokowa J
2. 発表標題 LMO2 activation by NAMPT-NAD+-SIRT2 pathway mediated deacetylation is indispensable for early hematopoiesis and T-ALL leukemogenesis
3. 学会等名 第17回幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森嶋達也, 高橋康一, 徳永賢治, 松岡雅雄, 須田年生, 滝澤仁
2. 発表標題 正常および悪性造血における代謝制御の解析
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森嶋達也
2. 発表標題 Phospholipid metabolism regulates cell proliferation in IDH mutated AML
3. 学会等名 第2回若手血液学者の会 “ Hematopoietic and Leukemic Stem Cells ”
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森嶋 達也, Desmond Chin, 高橋 康一, 有田 誠, 徳永 賢治, 松岡 雅雄, 須田 年生, 滝澤 仁
2. 発表標題 アラキドン酸低下を介したIDH関連オンコメタボライト非依存性AML細胞増殖
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森嶋 達也, Desmond Chin, 高橋 康一, 徳永 賢治, 松岡 雅雄, 須田 年生, 滝澤 仁
2. 発表標題 脂質代謝適応獲得によるIDH変異白血病の生存メカニズムの解明
3. 学会等名 第25回造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------