

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17369

研究課題名(和文) 白血病における脂質代謝リプログラミングを標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel therapy targeting alteration of lipid metabolism in leukemia

研究代表者

水野 秀明(Mizuno, Hideaki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70869594

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)：白血病における糖・アミノ酸代謝などの細胞内の主要代謝経路の変容が生み出す白血病に独特の代謝様式が白血病癌幹細胞性や化学療法抵抗性といった白血病難治性の特徴に関与していることがわかりつつある。一方で、これら特徴的な代謝プロファイルにおける脆弱性を見出し、治療標的化することも可能である。本研究は白血病の脂質代謝を治療標的化し新規治療を確立するものである。これまでの研究からコレステロール代謝に関わる複数の遺伝子が白血病細胞において異常発現していることがわかり、本研究ではこれらの遺伝子の阻害や代謝経路の阻害の効果について評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性白血病であるEVI1高発現白血病マウスモデル、公開データベースによる急性骨髄性白血病患者のmRNAと予後の解析、治療抵抗性急性骨髄性白血病患者検体の単一細胞トランスクリプトーム解析のそれぞれから、脂質代謝経路の遺伝子発現異常が治療抵抗性に関与していると考えられる結果が得られた。これらの代謝経路の主要細胞における機能的な探索を今後継続して行う必要があるが、難治性白血病の新規治療法開発につながる成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：It is becoming clear that unique metabolic patterns created by alterations in key intracellular metabolic pathways such as glucose and amino acid metabolism in leukemia are involved in leukemia stemness and chemotherapy resistance. On the other hand, vulnerabilities generated by these metabolic alteration can be novel therapeutic targets. This study aims to establish a novel therapy by targeting lipid metabolism in leukemia. We have shown that several genes involved in cholesterol metabolism are aberrantly expressed in leukemia cells. In this study, we evaluated the effects of inhibiting these genes and metabolic pathways.

研究分野：造血器腫瘍

キーワード：急性骨髄性白血病 脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

造血器腫瘍の治療では抗体医薬や分子標的治療薬などの新規治療による治療成績の向上が見られる一方、急性骨髄性白血病(Acute Myeloid Leukemia; AML)などの骨髄系腫瘍では新規治療の開発が遅れており特に難治性白血病に対する効果的な治療薬が切望されている。近年、メタボローム解析技術の発展に伴い、悪性腫瘍における糖・アミノ酸代謝などの細胞内の主要な代謝経路の変容が生み出す悪性腫瘍独自の代謝様式が、がん幹細胞性、化学療法抵抗性といった難治性悪性腫瘍の特徴に寄与しているということがわかりつつある。一方で、この代謝様式の変容が結果として悪性腫瘍特有の脆弱性を付与しており、治療標的化することが可能である。

申請者はこれまでに難治性白血病の代表例である Ecotropic viral integration site 1 (EVI1)高発現白血病マウスモデルを用いた RNA-seq によるトランスクリプトーム解析および EVI1 に対する抗体を用いた ChIP-seq 解析と、EVI1 高発現白血病細胞株を用いた糖・アミノ酸代謝を中心としたメタボローム解析の結果に基づき、EVI1 高発現白血病において EVI1 によって糖新生の律速酵素である Fructose-1,6-bisphosphatase (FBP1)の転写亢進を介したペントースリン酸経路の活性化および酸化リン酸化の活性化を来していることを見出し、これが EVI1 高発現白血病の治療標的となり得ることを見出した(未発表データ)。興味深いことに、同様の EVI1 高発現白血病マウスモデルを用いた解析において脂肪酸の一種である Monounsaturated Fatty Acid (MUFA)産生に関わる Stearoyl CoA desaturase (SCD)ファミリー遺伝子の発現が EVI1 高発現白血病で亢進しており(図1) 既存の AML 患者のデータベースにおいて SCD が高発現している患者群では生存期間が有意に短いことがわかった(図2)(未発表データ)。これらの結果に基づき、SCD をはじめとする脂質代謝に関連する酵素または代謝経路において AML の治療抵抗性を特徴づける脂質代謝プロファイルが存在し、それを治療標的化することが可能であると仮説を立てた。本研究では、AML における脂質代謝プロファイルを Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)法を用いて網羅的に明らかにし、AML に特異的に亢進している脂質代謝経路を同定するとともに新規治療標的の発見に繋げることを目的とする。なお、AML における網羅的な脂質代謝プロファイルはほとんど研究されておらず、本研究を以て本領域における新規治療開発の基盤を確立することを目指す。

2. 研究の目的

急性骨髄性白血病は近年の分子標的治療の進歩にもかかわらず依然として予後不良の疾患であり、新規治療標的の開発が望まれている。近年、白血病における糖・アミノ酸代謝などの細胞内の主要代謝経路の変容が生み出す白血病に独特の代謝様式が白血病癌幹細胞性や化学療法抵抗性といった白血病難治性の特徴に関与していることがわかりつつある。一方で、この特徴を逆手にとって代謝プロファイルにおける脆弱性を見出し、治療標的化することも可能である。そこで本研究では、これまで研究が遅れている白血病の脂質代謝に着目し、申請者の所属する研究室が擁する豊富な白血病マウスモデルを用いて *in vivo* における白血病の脂質代謝プロファイルを LC-MS 法を用いて網羅的に解析し、新規治療標的の同定を行う。更に *in vitro*, *in vivo* の系において脂質代謝経路への介入が実際に治療標的となり得るかを検証し、本領域における新規治療標的開発の基盤とすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 急性白血病に特異的な脂質代謝プロファイルの網羅的解析

AML マウスモデルの白血病細胞と正常マウスの骨髄造血幹細胞・造血前駆細胞において脂質を対象とするメタボローム解析を行い、AML 細胞に特徴的な脂質代謝プロファイルを同定する。このとき用いる AML マウスモデルとして、申請者がこれまで用いてきた難治性白血病マウスモデルである EVI1 高発現白血病および MLL 遺伝子異常白血病マウスモデルを用いる。申請者が所属する研究室において以前の研究で得られている RNA-seq 結果および ChIP-seq 結果との統合的解析を行うことでより確実に AML 特異的な脂質代謝プロファイルを同定することが可能である。EVI1 はヒトにおける AML の原因遺伝子であり、レトロウイルスを用いて Evi1-GFP をマウスの造血幹細胞に導入し同系マウスに移植すると 4~6 カ月を経て白血病を発症する(Blood 2011)が、このマウスの GFP 陽性 Linnegc-kitpos 分画と、正常マウスの Linnegc-kitpos 分画をフローサイトメトリーを用いてソートした後、脂質を対象としたメタボローム解析を行う。また、ヒトにおいて AML の原因遺伝子となる MLL-ENL 融合遺伝子をレトロウイルスを用いてマウスの造血幹細胞に導入し同系マウスに移植すると 1-2 カ月で白血病を発症するが、この白血病マウスモデルを用いて同様の解析を行う。これらの解析により、AML 細胞において特異的に亢進している脂質代謝経路および増加・減少している脂質を特定し、治療標的として介入可能な脂質または脂質代謝酵素を同定する。

(2) 同定された脂質または脂質代謝酵素に対する介入効果の解析

1. で得られた解析結果を基に同定された代謝物または代謝酵素について介入を行い、白血病細

胞に対する効果を *in vitro* および *in vivo* において解析する。具体的には、*in vitro* においてはマウス造血幹細胞に Evi1 または MLL-ENL 融合遺伝子を導入し、メチルセルロース半固形培地を用いたコロニー形成実験において、培地中への代謝物の添加や代謝酵素の阻害薬または shRNA 技術を用いたノックダウンによってコロニー形成能の変化を評価する。更に annexinV, PI を用いたアポトーシスの評価、Ki-67, PI または CFSE を用いた増殖能の評価を行う。*in vivo* においては 1. と同様のマウスモデルにおいて利用可能な阻害薬や標的酵素のノックダウン、ノックアウトを用いて白血病幹細胞性および白血病増殖能への影響を評価する。また、AML の難治性に関与している可能性があるため、AML 治療薬であるシタラピンやイダルビシンとの併用効果についても *in vitro*, *in vivo* のそれぞれにおいて評価する。また、それぞれの実験系において正常造血細胞への効果を同時に解析し、新規治療標的としての可能性を評価する。

(3) 脂質または脂質代謝酵素が制御する因子の解析

2. で同定された AML の幹細胞性や増殖能に影響を及ぼす治療標的化可能な脂質または脂質代謝酵素に対して、その脂質または脂質代謝経路が制御する因子を同定する。具体的には、例えば特定の脂質代謝経路の亢進による脂質の量的バランスが AML 細胞において重要であれば、標的となりうる脂質を過量に添加した培地で AML 細胞を培養するか、代謝経路の酵素を阻害して脂質の量的バランスを損なった後で RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行う。脂質のバランスが損なわれた AML 細胞と通常の AML 細胞を比較することで、同定された脂質または脂質代謝酵素が制御する因子を明らかにすることが可能である。網羅的遺伝子解析により下流の因子または経路を推定した後、その因子・経路の阻害により脂質代謝経路への介入と同様の効果が得られるかを *in vitro* の系で検証する。

4. 研究成果

難治性白血病の代表例である EVI1 高発現白血病のマウスモデルを用いた RNA-seq 解析から、難治性白血病において SCD をはじめとする脂肪酸代謝酵素の発現上昇を見出した。これらの遺伝子群の高発現は TCGA の mRNA 発現量-生存期間解析から、急性骨髄性白血病の予後不良因子である可能性が示唆された。また、治療抵抗性急性骨髄性白血病患者検体の単一細胞トランスクリプトーム解析により、一部の治療抵抗性白血病クラスターにおいて細胞内への脂質取り込みに関連する LDLR の高発現および関連する脂質経路遺伝子群および LDLR の下流シグナルの遺伝子群が高発現していることを見出した。白血病細胞株においてコレステロール過剰投与やこれらの遺伝子のノックダウンでは細胞増殖の程度に差は見られなかった。これらの遺伝子の高発現が治療抵抗性病態に寄与するか SCD、LDLR を強制発現した細胞株に標準的白血病治療薬であるシタラピン、ダウノルビシンを投与することで継続して解析を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mizuno H, Koya J, Masamoto Y, Kagoya Y, Kurokawa M	4. 巻 112
2. 論文標題 Evi1 upregulates Fbp1 and supports progression of acute myeloid leukemia through pentose phosphate pathway activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4112-4126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15098.	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 -

1. 著者名 Kurihara Y, Mizuno H, Honda A, Shimura A, Fujioka Y, Maki H, Kurokawa M.	4. 巻 26
2. 論文標題 CCDC88C-FLT3 gene fusion in CD34-positive haematopoietic stem and multilineage cells in myeloid/lymphoid neoplasm with eosinophilia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of cellular and molecular medicine	6. 最初と最後の頁 950-952
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jcmm.17143.	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hideaki Mizuno, Akira Honda, Mineo Kurokawa
2. 発表標題 Inpatient Complex Transcriptional Responses to Conventional Chemotherapy in Relapsed Acute Myeloid Leukemia Revealed By Single Cell RNA-Seq Analysis
3. 学会等名 63rd ASH annual meeting（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hideaki Mizuno, Akira Honda, Mineo Kurokawa
2. 発表標題 Intratumoral complex responses to conventional chemotherapy in AML revealed by single cell RNA-seq
3. 学会等名 第83回 日本血液学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hideaki Mizuno, Akira Honda, Mineo Kurokawa.
2. 発表標題 Intratumoral complex responses to conventional chemotherapy in AML revealed by single cell RNA-seq
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会
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
---------	---------