

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 26 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591222

研究課題名（和文）NK 細胞リンパ腫における eIF4E 高発現と L-asparaginase によるその抑制機序の検討

研究課題名（英文）Analysis of the mechanism of L-asparaginase to suppress the highly expressed eIF4E in NK-cell lymphoma

研究代表者

杉本 耕一（SUGIMOTO KOICHI）

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：50281358

研究成果の概要（和文）：治療抵抗性のNK細胞リンパ腫にも有効であるL-asparaginase（L-ASP）の2つの新しい作用機序を明らかにした。1つめとしてL-ASPはeIF4Eをはじめとする翻訳開始因子を著明に減少させて、MYC、BCL-2、eIF4E自体など腫瘍の増殖、アポトーシス抑制に必要な蛋白質の翻訳を阻害した。2つめとしてL-ASPはグルタミン欠乏を介してTCAサイクルの枯渇・機能不全を起こし、最終的にアポトーシスを引き起こした。この結果から急性リンパ性白血病を含めたリンパ系腫瘍のグルタミン依存性、TCAサイクルのアポトーシス抑制における中心的な役割が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We have shown two new mechanism of L-asparaginase (L-ASP), which is efficient even for chemotherapy-resistant NK-cell lymphoma. First, L-ASP decreased expression levels of various translation initiation factors including eIF4E, which in turn suppressed the translation of MYC, BCL-2 and eIF4E itself with tumor promoting and apoptosis inhibiting activities. Second, L-ASP depleted glutamine, induced TCA cycle depletion and insufficiency, and finally caused apoptosis. The result showed glutamine addiction of various lymphoid malignancies including acute lymphoblastic leukemia and the central role of TCA cycle in the suppression of apoptosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：血液腫瘍学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：L-asparaginase、NK細胞リンパ腫、eIF4E、グルタミン、TCAサイクル

## 1. 研究開始当初の背景

翻訳開始因子の1つeIF4Eは、癌への形質転換能を有し、種々の悪性腫瘍において高発現している。我々は治療抵抗性のNK細胞リンパ腫においてeIF4Eが高発現しているが、L-asparaginase（L-ASP）がその発現量を特異

的に低下させることを見出した。L-ASPは、mTOR阻害剤であるrapamycinと同様にp70 S6 kinase、4E-BP1のリン酸化を抑制することが報告されているが、eIF4Eの発現を抑制する作用はrapamycinにはなく、L-ASPに特異的であった。NK細胞株に対して同程度にS6 kinase

を抑制する濃度でrapamycinはほとんど殺細胞効果を示さないのに対して、L-ASPは強力な抗腫瘍効果を発揮する。このことからeIF4Eの発現を抑制する経路がNK細胞リンパ腫の治療において重要な鍵となることが想定された。

## 2. 研究の目的

- 1) NK細胞リンパ腫に対するL-ASPの殺細胞効果においてeIF4Eの抑制が中心的な役割を果たすことを実験的に確認する。また、L-ASPによる特定の蛋白質の量の変化がsiRNAによるeIF4Eの抑制で再現できるかを調べる。
- 2) L-ASPからeIF4Eの発現量低下にいたる機序、経路に関して解明する。
- 3) L-ASPの作用を解明する過程で、臨床的に達成可能な濃度においてグルタミンの枯渇をもたらすことが明らかになりこれによる殺細胞効果について検討する。
- 4) L-ASPによるグルタミンの枯渇が臨床検体に対して殺細胞効果を示すか検討する。

## 3. 研究の方法

- 1) L-ASP処理後にMYC、BCL-2、eIF4E自体などのmRNAおよび蛋白質の量をそれぞれ定量的RT-PCRおよびWestern blot解析で経時的に調べた。Jurkat細胞に対してsiRNA法によりeIF4Eの発現を抑制した場合にMYC、BCL-2などの蛋白質発現に関してL-ASP処理と同様の効果を再現できるかを検討した。
- 2) L-ASPからeIF4Eの発現低下に至る経路に関して解明する目的で細胞内のアミノ酸濃度、TCAサイクルの構成分子群の濃度の変化を検討した。これにはL-8900FF分析計およびLC/MS（質量分析計）を用いた。また細胞周期変化、細胞内ATP濃度、ミトコンドリア膜電位、活性化酸素量とアポトーシス割合の関係を主にflow cytometryを用いて検討した。
- 3) L-ASPの作用を解明する過程で、グルタミンの枯渇によるTCAサイクルの機能不全がeIF4Eの発現抑制につながることを明らかとなったため、これによる殺細胞効果について検討した。特にTCAサイクルの構成分子を外来性に補うことでL-ASPの殺細胞効果を抑制できるか、逆にTCAサイクルの特異的な抑制によりL-ASPと同様のアポトーシス、eIF4Eの低下などを再現できるか検討した。
- 4) L-ASPによるグルタミンの枯渇が急性リンパ性白血病の臨床検体に対して殺細胞効果を示すかを検討した。検体の使用に関しては所属機関の倫理委員会の承諾のもとでインフォームドコンセントを得て行った。

## 4. 研究成果

L-asparaginase (L-ASP)は治療抵抗性のNK細胞リンパ腫において高発現している翻訳開始因子eIF4Eをほぼ消失させて抗腫瘍効果

を発揮した。L-ASP処理によるeIF4E量の低下に一致してMYC、BCL-2の蛋白質量が著明に減少した。NK-YSおよびNK-92細胞においてL-ASP処理後に経時的にMYC、BCL-2のmRNA量を観察したところまだmRNA量が変化していない時点ですでに蛋白質量は低下しており、eIF4Eが関与する翻訳レベルでのMYC、BCL-2の減少が強く示唆された。更にJurkat細胞においてsiRNAを用いてeIF4Eの発現を抑制したところ、L-ASP処理と同様にMYC、BCL-2の蛋白質量が著明に低下しアポトーシスが誘導された。このことはL-ASPによるeIF4Eの低下が直接に殺細胞効果につながることを強く示唆した。抗腫瘍効果を発揮した。eIF4Eが消失すると翻訳段階でMYC、BCL-2およびeIF4E自体が著明に減少しアポトーシスが誘導された。L-ASPによるeIF4Eの消失は、培養液中のグルタミン欠乏によるTCAサイクルの枯渇、機能不全によって引き起こされ、alpha-ケトグルタル酸の補充で解除された。この結果はアポトーシス抑制におけるTCAサイクルの中心的な役割、急性リンパ性白血病を含めたリンパ系腫瘍のグルタミン依存性を明らかにした。

また、Jurkat細胞においてeIF4E発現をほぼ消失させるには1 U/mLのL-ASPが必要である。この濃度は臨床的に数日間達成されるL-ASP濃度であるがグルタミンを枯渇させ、これによって細胞内のTCAサイクル構成分子群であるalpha-ケトグルタル酸、スクシニル酸、オキサロ酢酸の濃度を著明に低下させた。TCAサイクルの枯渇はATPの減少、膜電位の低下で示されるミトコンドリアの機能不全、更にはeIF4E発現の消失などを起こし、最終的にアポトーシスを惹起した。外来性にalpha-ケトグルタル酸を補充すると、L-ASP処理または培養液中のグルタミン除去によるeIF4E低下を含めたこれら一連の変化は解消した。Jurkat細胞のみならず急性リンパ性白血病10検体のうち5検体ではTCAサイクルの維持に細胞外からのグルタミンが必須であり、これをL-ASPによって阻害するとeIF4Eの消失、アポトーシスが起った。この結果はアポトーシス抑制におけるTCAサイクルの中心的な役割、リンパ系腫瘍のグルタミン依存性を明らかにした。今後、リンパ腫を含む造血器腫瘍の細胞内代謝、翻訳調節の特徴を明らかにすることで副作用の少ない特異的な治療が可能になると考えられる。

## 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9件)

①Kanemitsu N, Isobe Y, Masuda A, Momose S, Higashi M, Tamaru J, Sugimoto K, Komatsu N: Expression of Epstein-Barr virus-encoded proteins in extranodal T/NK cell lymphoma, nasal type (ENKL): differences in biological and clinical behaviors of LMP1-positive and negative ENKL. Clin Cancer Res 18: 2164-2172, 2012 査読有

②Suzuki HI, Arase M, Matsuyama H, Choi YL, Mano H, Sugimoto K, Miyazono K: MCP1P1 ribonuclease antagonizes Dicer and terminates microRNA biogenesis through precursor microRNA degradation. Mol Cell 44: 424-436, 2011 査読有

③Matsuyama H, Suzuki HI, Nishimori H, Noguchi M, Yao T, Komatsu N, Mano H, Sugimoto K, Miyazono K: Oncogenic NPM-ALK/miR-135b axis mediates Th17 skewing in anaplastic large cell lymphoma. Blood 118: 6881-6892, 2011

④Ichikawa K, Sugimoto K, Isobe Y, Kuwatsuru R, Sasaki M, Horiguchi I, Komatsu N: Usefulness of Systemic CT Scanning in the Detection of Malignant Lymphadenopathy. Medicine 90: 396-403, 2011 査読有

⑤Iwata S, Yano S, Ito Y, Ushijima Y, Gotoh K, Kawada JI, Fujiwara S, Sugimoto K, Isobe Y, Nishiyama Y, Kimura H: Bortezomib induces apoptosis in T lymphoma cells and natural killer lymphoma cells independent of epstein-barr virus infection. Int J Cancer 129: 2263-2273, 2011 査読有

⑥Suto H, Yasuda H, Isobe Y, Sasaki M, Imai H, Tsutsui M, Oshimi K, Komatsu N, Sugimoto K: Suppression of eIF4E expression by L-asparaginase. Acta Haematol-Basel 123: 215-219, 2010 査読有

⑦Tsutsui M, Yasuda H, Suto H, Imai H, Isobe Y, Sasaki M, Kojima Y, Oshimi K, Sugimoto K: Frequent STAT3 activation is associated with Mcl-1 expression in nasal NK-cell lymphoma. Int J Lab Hematol 32: 419-426, 2010 査読有

⑧Kiyono K, Suzuki HI, Morishita Y, Matsuyama H, Komuro A, Kano MR, Sugimoto K, Miyazono K: TGF- $\beta$  signaling activates autophagy in human cancer cells. Cancer Res 69: 8844-8852, 2009 査読有

⑨Suzuki HI, Yamagata K, Sugimoto K, Iwamoto T, Kato S, Miyazono K: Modulation of microRNA processing by p53. Nature 460: 529-533, 2009 査読有

[学会発表] (計7件)

①杉本耕一、鈴木洋、藤村務、大野麻美、磯部泰司、佐々木純、森健、宮園浩平、小松則夫: L-アスパラギナーゼのリンパ系腫瘍への殺傷効果はglutaminolysisの抑制を介する。臨床血液 52: 1123, 2011

②鈴木洋、山形薫、杉本耕一、岩本隆司、加藤茂明、宮園浩平: "The p53 world", a wide variety of physiological functions: from signal network to pathogenesis of diseases Dynamics of microRNA biogenesis: crosstalk between p53 network and microRNA processing pathway. 日本生化学会大会・日本分子生物学会年会合同大会講演要旨集83回・33回: 1 W11-7, 2010

③Nakamura H, Sugimoto K, Yasuda H, Isobe Y, Sasaki M, Komatsu N: L-asparaginase reduces several components of translational machinery eIF4F. 臨床血液 51: 1087, 2010

④Sugimoto K, Isobe Y, Sasaki M, Nakamura H, Komatsu N: Metformin inhibits lymphoid tumor cell growth through the suppression of translational machinery eIF4F. 臨床血液 51: 1258, 2010

⑤鈴木洋、山形薫、杉本耕一、岩本隆司、加藤茂明、宮園浩平: p53によるmicroRNAプロセッシングの制御 (Modulation of microRNA processing by p53). 日本癌学会総会記事 68回: 239-240, 2009

⑥杉本耕一、佐々木純、簾藤紘子、磯部泰司、稲垣直子: eIF4E抑制を介したL-asparaginaseによるdoxorubicinの殺細胞効果の増強。臨床血液 50: 1162, 2009

⑦簾藤紘子、佐々木純、磯部泰司、安田肇、今井英則、筒井深雪、押味和夫、杉本耕一: L-asparaginaseのeIF4E抑制とその抗腫瘍効果。臨床血液 50: 1161, 2009

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉本 耕一 (SUGIMOTO KOICHI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 50281358

(3)連携研究者

鈴木 洋 (SUZUKI HIROSHI)  
東京大学・大学院医学系研究科・特任助教  
研究者番号：00587793

藤村 務 (FUJIMURA TSUTOMU)  
順天堂大学・医学系・准教授  
研究者番号：70245778

高木 正稔 (TAKAGI MASATOSHI)  
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・講師  
研究者番号：10406267