

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16273

研究課題名（和文）骨髄微細環境における造血器腫瘍に対する神経ペプチドTIP39の機能解析

研究課題名（英文）Function of neuropeptide, TIP39, in bone marrow microenvironment with hematopoietic neoplasm

研究代表者

堀口 拓人（HORIGUCHI, HIROTO）

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：70634674

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：TIP39添加の有無で増殖能を比較検討したが、明らかな変化は認められなかった。このため、無血清下、飢餓状態での培養で、TIP39を添加し培養したところ、添加群で有意に細胞数が多く残存していた。さらに無血清条件下での白血病細胞株の培養で、TIP39添加群ではウェスタンブロット法で、LC3 - 分画が増加していることが明らかとなった。さらに、血清存在下での培養でも、TIP39添加によりLC3 - 分画の増加を認めた。TIP39添加群では、アポトーシスが有意に非添加群より減少していることが明らかとなり、TIP39がオートファジーを誘導し、アポトーシスを減少させる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オートファジーは正常細胞でも細胞生存のため必要な機構であるが、悪性腫瘍でも細胞生存とアポトーシスに大きく関与しており、治療標的としても注目され、それを標的とした薬剤が腎臓がんや乳がんの治療薬として用いられている。神経ペプチドであるTIP39がオートファジーを誘導することは、いままで報告はなく、白血病細胞株での効果も明らかではなかった。今回TIP39がオートファジーを誘導することが明らかになり、白血病細胞株で細胞生存に関わるということが明らかとなることで、造血器腫瘍のみならず固形癌への波及効果が期待される。

研究成果の概要（英文）：First, we analyzed proliferation of AML cell lines under TIP39 stimulation. The difference has not observed between culture with TIP39 and without TIP39.

Next, we conducted AML cell culture without serum, in starved condition, to research the effect to survival of AML cell. Surprisingly, TIP39-stimulated AML cells were significantly survival under starved condition. Moreover, increased LC3-II expression in TIP39-stimulated AML cell at one to two hours after the stimulation was observed compared to unstimulated AML cell by western blot analysis.

In addition, under normal culture the increased LC3-II was also revealed in the stimulated cells. Furthermore, the proportion of apoptosis in TIP39-stimulated AML cell was decreased compared to unstimulated AML cell. These results suggest that TIP39-induced autophagy could affect survival advantage over normal cell.

研究分野：Hematology

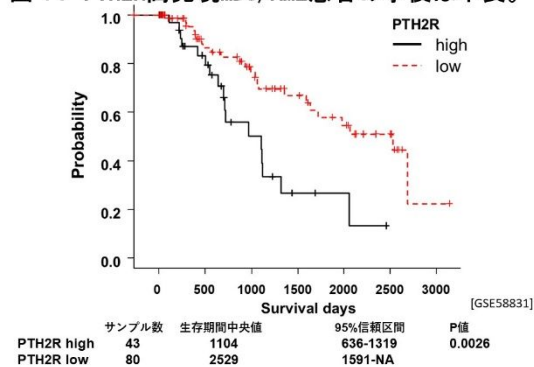
キーワード：neuropeptide acute myeloid leukemia TIP39

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血液腫瘍に対する化学療法や分子標的療法は日々進歩をとげているが、再発・難治症例や移植非適応患者に対しての治療法は未だ不十分であり、新たな治療戦略の開発が望まれる。また、AML および MDS を始めとした造血器腫瘍では、腫瘍細胞の遺伝子変異のほか、申請者らは骨髄微細環境を形成する Mesenchymal stem/stromal cell (MSC) の機能異常が、その病態進展に關与することを見出してきた [Horiguchi H, Kobune M, et al. Haematologica. 2016]。さらに近年、骨髄内神経システムが正常造血及び造血障害に關与することが見出されつつある。最近、シナプス小胞内の神経ペプチドが造血幹細胞維持に關与することが報告された。Tuberoinfundibular peptide of 39 residues (TIP39) は、parathyroid hormone 2 receptor (PTH2R) のリガンドとして同定され、TIP39 や PTH2R は視床下部を始めとした脳内に多く発現しており、TIP39 は神経修飾物質として機能しているとされている。Bornardi らは、従来明らかとなっていた CD47、CD44 や ITGA5 に加えて、CD82 や PTH2R が新しい AML 幹細胞マーカーとして報告しており [Bornardi F, et al. Mol Cell Proteomics. 2013]、さらに MSC が TIP39 を産生する他、神経細胞との共培養で TIP39 の発現が著増することが報告された [Qi X, et al. J Clin Neurosci. 2010]。さらに申請者らは、GSE58831 のデータより MDS/AML 細胞において PTH2R の高発現群と低発現群に分けて、予後解析を行ったところ、PTH2R が高発現した MDS/AML 患者の予後が有意に不良であることが明らかとなった(図1)。以上より、骨髄微細環境の神経細胞と間葉系幹細胞が、TIP39-PTH2R 系を介して、AML/MDS の病態増悪に關与している可能性を想定した。

図1. PTH2R高発現MDS/AML患者の予後は不良。



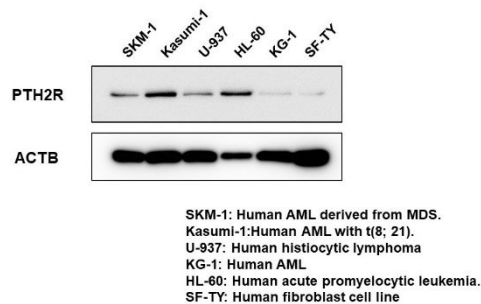
2. 研究の目的

本研究では、神経ペプチドである TIP39 とその受容体 PTH2R に着目し、造血器腫瘍である MDS/AML における TIP39 PTH2R の役割、骨髄微細環境内の TIP39 産生細胞を同定、そして正常骨髄微細環境との比較により、TIP39 - PTH2R がどのように腫瘍の増殖に寄与するか明らかにすることで、新たな治療標的を発見することを目指すものである。

3. 研究の方法

最初に白血病細胞株 (SKM-1、Kasumi-1、KG-1、HL-60) における PTH2R の発現をウェスタンブロット法と RT-PCR 法で確認し、PTH2R のリガンドである TIP39 を添加して細胞培養を行う。細胞培養の後、細胞増殖能、アポトーシスを TIP39 非添加群と比較した。その後 TIP39 添加群と非添加群でウェスタンブロット法でオートファゴソームのマーカーである LC3 の発現を比較した。また、血清非添加培養で TIP39 添加群と非添加群でもウェスタンブロット法で LC3 の発現を比較した。

図2. AML 細胞株で PTH2R の発現を認める。



4. 研究成果

ウェスタンブロット法で発現量の違いはあるものの白血病細胞株で PTH2R の発現を認めていた(図2)

図3. TIP39は無血清培養AML細胞株の生存を誘導する。

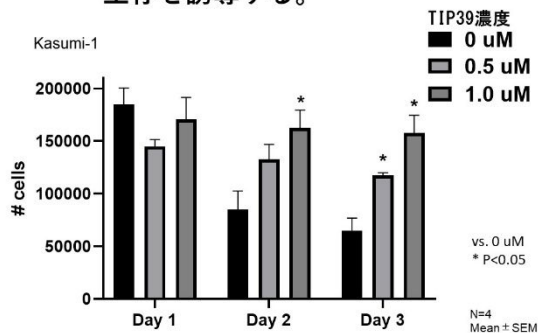


図4. TIP39はオートファジーを誘導する。

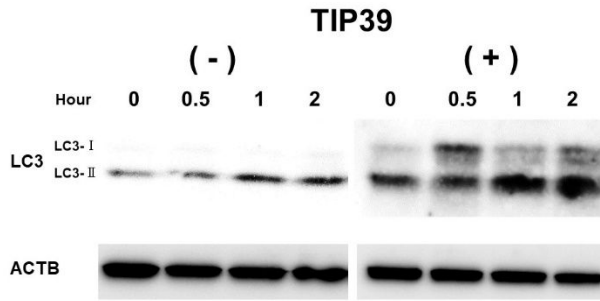
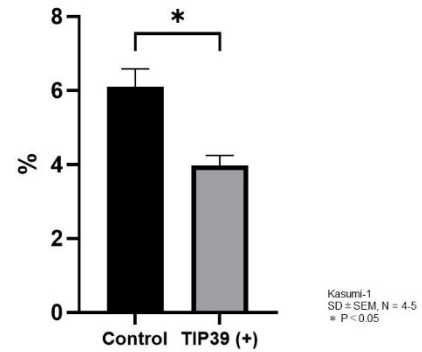


図5. TIP39はapoptosisを抑制する。



そこで、TIP39 添加の有無で増殖能を比較検討したが、明らかな変化は認められなかった。このため、無血清下、飢餓状態での培養で、TIP39 を添加し培養したところ、添加群で有意に細胞数が多く残存していた (図3)。このため、飢餓状態での細胞生存にオートファジーが関与していることが考慮され、無血清条件下での白血病細胞株の培養で、TIP39 添加群ではウェスタンブロット法で、LC3 - 分画が増加していることが明らかとなった。さらに、血清存在下での培養でも、TIP39 添加により LC3 - 分画の増加を認めた (図4)。

これに加えて、TIP39 添加群では、アポトーシスが有意に非添加群より減少していることが明らかとなり (図5)、TIP39 がオートファジーを誘導し、アポトーシスを減少させる可能性が示唆された。

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 1件）

1. 発表者名 Arai H, Chi S, Utsu Y, Masuda S, Aotsuka N, Ueda T, Fukushima K, Ikeda D, Hosono N, Yamauchi T, Yoshimoto G, Horiguchi H, Iyama S, Kanda J, Katagiri S, Gotoh A, Koyama D, Ikezoe T, Kondo T, Nakamura Y, Ogasawara F, Fukuhara S, Izutsu K, Yamauchi N, Yuda J, Minami Y.
2. 発表標題 A Practice-Oriented Genome Profiling Study with the Novel Halo-Shape Annealing and Defer-Ligation Enrichment (HANDLE) System: HM-Screen-JAPAN02.
3. 学会等名 American Society of Hematology annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2022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
---------	---------