

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 26 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860742

研究課題名(和文) NUP98白血病と代謝異常

研究課題名(英文) Metabolic Disorder in NUP98 Fusion Gene-Induced Leukemia

研究代表者

島 豊 (Shima, Yutaka)

国立研究開発法人国立がん研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：90572298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：NUP98白血病細胞内の代謝物質について網羅的に解析を行い、正常造血細胞や他の白血病細胞の代謝物質と比較したが、NUP98白血病細胞の代謝動態が他の細胞と比較して大きく違うということはない。しかしながら、脂質代謝に絞って検討するとNUP98-HOXA9はFASNの活性を負に制御することが明らかとなり、実際にNUP98白血病細胞内の脂肪酸量は正常細胞と比較して減少していた。この結果は選択的にFASN阻害剤がNUP98白血病細胞に有効であった理由だと考えられる。またこのFASN阻害剤はNUP98白血病細胞の細胞周期をS期で止めることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We have identified that NUP98-HOXA9 interacts with FASN and orlistat, which is the inhibitor of FASN, selectively inhibits the colony formation of NUP98 fusion protein-expressing cells. To measure the amount of each metabolite in NUP98 fusion protein- and other fusion protein-expressing cells and normal hematopoietic cells, we performed CE-MS analysis. However, the status of metabolites in NUP98 fusion protein-expressing cells was not significantly different from the other cells. Next, we focused on fatty acids. In vitro analysis showed that NUP98-HOXA9 reduced the FASN activity. Furthermore, LC-TOFMS analysis showed that the amount of fatty acids in NUP98-HOXA9-expressing cells was less than in normal hematopoietic cells. The inhibition of FASN resulted in S-phase arrest in NUP98-HOXA9-expressing cells. These results suggest that FASN activity is low but is essential for NUP98 fusion-mediated leukemia cells, and that FASN can be a therapeutic target for the leukemia.

研究分野：血液腫瘍学

キーワード：leukemia NUP98

1. 研究開始当初の背景

白血病において、核膜孔構成タンパク質 NUP98 をコードする NUP98 遺伝子は、染色体転座の結果、様々なパートナー遺伝子と融合し、N 末端側に NUP98 領域を持つ異常な融合タンパク質が生じることが知られる。また NUP98 融合遺伝子を有する白血病 (NUP98 白血病) は予後不良であるが、その発症・維持機構については不明な点が多い。私は NUP98 融合タンパク質が脂肪酸合成酵素 FASN と結合すること、また NUP98 白血病細胞を用いた解析から FASN 阻害が NUP98 白血病細胞に選択的に有効であることを見だしていたが、その詳しい分子メカニズムについては不明であった。

2. 研究の目的

NUP98 白血病と脂質代謝の関連性を調べ、なぜ、FASN 阻害が NUP98 白血病細胞に有効なのか、また NUP98 白血病が FASN によって維持される機構を解明し、NUP98 白血病の治療につなげることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 代謝の網羅的解析

NUP98-HOXA9 を始めとする白血病で見られる各種融合遺伝子をそれぞれマウスの未分化造血細胞にレトロウイルスを用いて導入し、不死化させた細胞と、コントロールとして正常未分化造血細胞をメチルセルロース培地上で培養し、コロニーを形成させた。その細胞からメタノールを用いて代謝物質を溶出させ、キャピラリー電気泳動と質量分析装置を組み合わせて、網羅的に代謝物質を測定した。

(2) *in vitro* FASN 活性試験

FLAG-tag をつけた NUP98-HOXA9 と FASN は、それぞれ 293FT cells に過剰発現させ、その細胞の lysate から抗 FLAG 抗体を用いて精製した。精製したこれらタンパク質と *in vitro* で acetyl-CoA, NADPH, <sup>14</sup>C でラベルされた malonyl-CoA をまぜ、37 °C で 30 分インキュベートした。クロロホルムとメタノールを用いる Bligh-Dyer 法で脂質を抽出して、液体シンチレーションカウンターで <sup>14</sup>C を測定することにより、新規に合成された脂質の量を測定し、FASN の活性を評価した。

(3) 脂質の解析

(1)と同様に細胞を調整し、その細胞の抽出物を LC-TOFMS の質量分析装置で解析することにより、脂質量を測定した。

(4) 細胞周期解析

BrdU を NUP98 白血病細胞に取り込ませ、細胞を固定後、細胞膜に穴を開け、anti-BrdU-FITC antibody で染めた。その後さらに 7-AAD を加え、核を染めた。染めた細胞をフローサイトメーターで展開するこ

とで、G0/G1, S, G2/M 期を観察した。また、細胞死については、NUP98 白血病細胞を用いてトリパンプルー細胞外排出実験を行うことで評価した。

4. 研究成果

(1) NUP98-HOXA9 を始めとした融合遺伝子を未分化なマウス造血細胞に導入して白血病細胞化し、細胞内の代謝物質を網羅的に測定した。その結果をもとに主成分分析 (PCA) を行った (図1)。図1に示すように、NUP98-HOXA9 や NUP98-DDX10 といった NUP98 融合遺伝子を有する細胞の代謝動態はそれ以外の白血病細胞や正常細胞と比べて大きな違いは見られなかった。ただし、急性前骨髄球性白血病で見られる PML-RAR $\alpha$ を導入した細胞の代謝動態はその他の細胞とは異なるものであった。特に PCA の y 軸を規定する Inosine や Histamine の量が PML-RAR $\alpha$  を発現する細胞で、著しく高いことが明らかとなった (図2)。

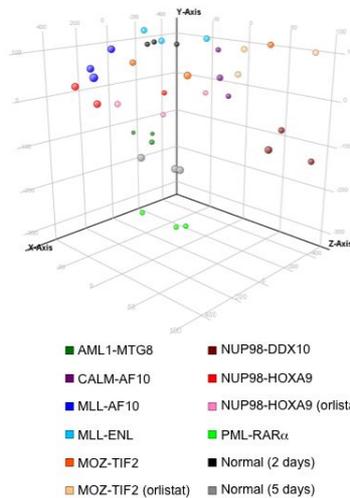


図1 各種細胞内の代謝物質質量を用いた主成分分析

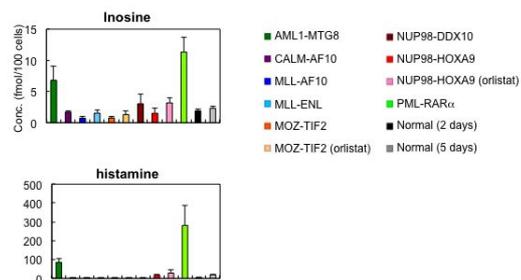


図2 PML-RAR $\alpha$ を発現する白血病細胞では特徴的な代謝動態を示す。

(2) 既に FASN と NUP98-HOXA9 は結合することを明らかにしていたが、この結合がどのような意味を持つかは明らかとなっていなかった。そこで今回、*in vitro* の FASN 活性試験を行った。*in vitro* で malonyl-CoA, acetyl-CoA, NADPH に FASN を加えると、脂肪酸合成が促進した (図3)。そこに、NUP98-HOXA9 を加えると脂肪酸合成が阻害さ

れることが明らかとなった (図3)。以上のことから、NUP98-HOXA9 は FASN の活性を負に制御することが明らかとなった。

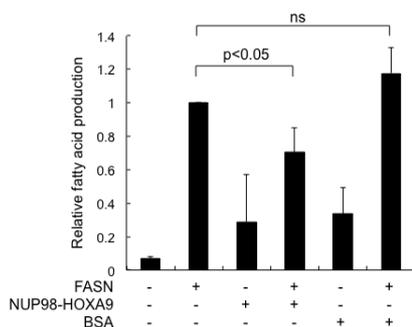


図3 NUP98-HOXA9はFASNの活性を抑制する。

(3) NUP98-HOXA9 は FASN の活性を負に制御することが、*in vitro*の実験より明らかとなったので、実際に NUP98-HOXA9 を発現する細胞内では脂肪酸量は少ないのかを LC-TOFMS を用いて検討した。その結果、正常な造血細胞に比べて、NUP98-HOXA9 を発現する白血病細胞は各種脂肪酸の量が少ないことが明らかとなった (図4)。この結果は、NUP98-HOXA9 が FASN と結合することで、その活性を負に制御するという図3の結果を指示するものである。固形腫瘍の中には FASN が過剰発現し、脂肪酸合成が促進している腫瘍が報告されているが、今回の NUP98 白血病細胞の結果はそれら報告とは逆であり、大変興味深い。

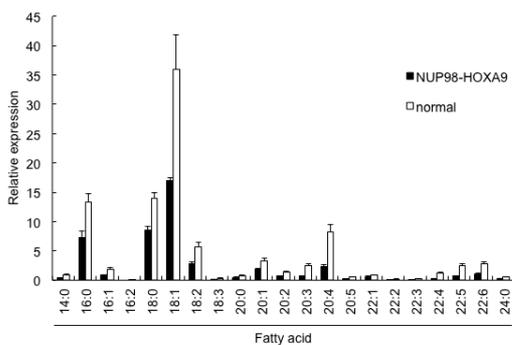


図4 NUP98-HOXA9発現細胞では脂肪酸合成量が低い

(4) 平成24年度-25年度若手研究 (B) で脂肪酸合成阻害剤が NUP98 融合遺伝子を有する白血病細胞に選択的に有効であるという結果を得ていた。今回、NUP98 融合遺伝子を有する細胞では脂肪酸合成が低下していることが明らかとなった。この二つの結果から、脂肪酸合成阻害剤が選択的に NUP98 融合遺伝子を有する細胞に有効であった理由は、脂肪酸合成は必須であるが、それが NUP98 融合遺伝子を有する細胞では低下しているためであることが示唆された。そこで、さらに脂肪酸合成阻害剤がどのようなメカニズムで NUP98 融合遺伝子を有する細胞のコロニー形成を阻害するのか検討した。その結果、阻害剤

orlistat を処理すると、細胞の S 期停止が起きる一方で、細胞死はほとんど起こらないことが明らかとなった (図5)。従って、その詳細なメカニズムは不明であるが、脂肪酸合成阻害剤が NUP98 融合遺伝子を有する細胞に有効なのは脂肪酸合成を阻害し、細胞を S 期に停止させるためであることが示唆された。また、NUP98 白血病の発症に重要な Hoxa5, Hoxa6, Hoxa7 の発現に与える orlistat の影響を qPCR で検討した結果、orlistat は Hoxa 遺伝子の発現には影響を与えなかった (図6)。従って、FASN 阻害は NUP98 白血病細胞の未分化性を阻害するのではなく、S 期で細胞周期を停止させることによって、NUP98 白血病細胞の増殖を停止させることが示唆された。

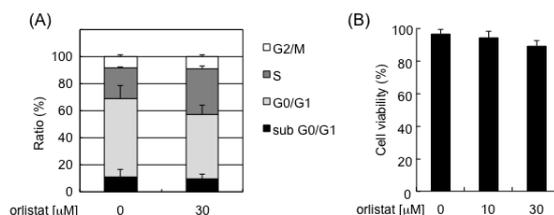


図5 orlistatはS期停止を誘導する  
(A) orlistatの細胞周期に与える影響  
(B) orlistatの細胞死に与える影響

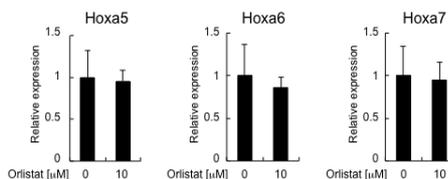


図6 orlistatはHoxa遺伝子の発現には影響を与えない

本研究では、NUP98 白血病細胞の代謝について、さまざまなアプローチを試みた。NUP98 白血病細胞に選択的に FASN 阻害剤が有効であることをすでに見いだしていたが、NUP98 白血病細胞内の代謝物質を測定すると、他の白血病細胞や正常細胞と比較して、大差なかった。しかしながら、脂質代謝を見ると FASN の活性が低下し、実際に細胞内の脂肪酸量も低かった。これらの結果から、仮に脂肪酸合成が阻害されても、代謝の恒常性を保つ機構が働いていると考えられる。また、FASN 阻害剤が NUP98 白血病細胞に選択的に有効なのは、S 期で細胞増殖を停止させることが本研究より示された。今後は *in vivo* のマウスモデルを用いて、NUP98 白血病に対して FASN 阻害が有効であるか検証する必要があると考えている。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

Yutaka Shima, Issay Kitabayashi. FASN is important for maintenance of NUP98 fusion-induced leukemia. 2015 Conference on Integrating Metabolism and Tumor Biology. 2015年1月14日-1月17日 Vancouver (Canada)

Yutaka Shima, Issay Kitabayashi. FASN is critical for maintenance of NUP98 fusion-induced leukemias. 56<sup>th</sup> ASH Annual Meeting & Exposition 2014年12月6日-12月9日 San Francisco (United States)

島 豊, 北林 一生. FASN は NUP98 融合遺伝子により誘導される白血病細胞の維持に必須である. 第37回日本分子生物学会年会 2014年11月25日-11月27日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

島 豊, 北林 一生. FASN は NUP98 融合遺伝子により誘導される白血病細胞の維持に必須である. 第76回日本血液学会学術集会. 2014年10月31日-11月2日 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

島 豊, 北林 一生. FASN は NUP98 融合遺伝子により誘導される白血病細胞の維持に必須である. 第2回がんと代謝研究会. 2014年7月10日-7月11日 東京理科大学葛飾キャンパス(東京都葛飾区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

島 豊 (SHIMA YUTAKA)

国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号: 90572298

(2)研究分担者

なし ( )

研究者番号:

(3)連携研究者

なし ( )

研究者番号: