

令和元年6月19日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08972

研究課題名(和文) T細胞性急性リンパ性白血病発症マウスのタンパク質解析による新規病態解明

研究課題名(英文) Elucidation a novel development mechanism of T cell acute lymphoblastic leukemia by quantitative proteome analysis

研究代表者

木村 明佐子 (Kimura, Asako)

国際医療福祉大学・成田保健医療学部・講師

研究者番号：40727939

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)：T細胞性急性リンパ芽球性白血病(T-ALL)を発症するc-myc遺伝子転写抑制因子FIRのヘテロ欠損マウスの胸腺リンパ腫組織を用い、比較プロテオームにより網羅的解析を行った。その結果、T-ALLマウスにおいて648個のタンパク質の発現が健常マウスよりも増加/減少しており、特にピルビン酸キナーゼ(PK)M2が高発現していることを確認した。また、FIRはPKM1とPKM2のスイッチングに關与するhnRNPA1の発現を抑制することも確認され、FIRハプロ不全により発症するT-ALLにおいてPKの選択的スプライシングに關与することでT-ALL発症に寄与していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、腫瘍の形成と糖代謝にかかわるPKM2が、FIRハプロ不全によるhnRNPA1発現増大により引き起こされるPKの選択的スプライシングの影響により増大していることが確認され、これらのタンパク質相互作用によるT-ALL発症の可能性という新たなメカニズムが見いだされた。今回の結果より、PKM2が新たなT-ALLの早期診断マーカー候補となり、これをターゲットとした新たな治療開発などに大きく貢献しうると期待される。

研究成果の概要(英文)：FIR (FUSE binding protein -interacting repressor) is a transcriptional repressor of the c-myc gene and its heterozygous mice develop T-ALL (T cell acute lymphoblastic leukemia). In this study, Tandem Mass Tag (TMT) quantitative proteome analysis of thymic lymphoma tissues in T-ALL model mice revealed that 648 proteins, involved in regulation of transcriptional activity, DNA repair and replication, activation and proliferation of T cells, induction of apoptosis, and so on, were up- or downregulated in T-ALL mice compared to normal mice. Above all, pyruvate kinase (PK) M2 involved in tumor development and glucose metabolism was upregulated expressed at protein and mRNA levels significantly (around 2.5 times; $p < 0.002$). And also it was confirmed FIR suppressed the expression of hnRNPA1 involved in the switching of PKM1 and PKM2. Our result suggested FIR would contribute to T-ALL development by participating in alternative splicing of PK in T-ALL developed due to FIR haploinsufficiency.

研究分野：疾患プロテオミクス

キーワード：T細胞性急性リンパ芽球性白血病 c-myc ノックアウトマウス LC-MS/MS Tandem Mass Tag (TMT) pyruvate kinase M2

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

c-myc 遺伝子の転写抑制因子である FIR(FBP-interacting repressor)は FUSE binding protein(FBP)に結合するタンパク質で、p89 DNA ヘリカーゼ活性を抑制することにより *c-myc* 遺伝子の転写を抑制し、その結果正常細胞はアポトーシスを起こす。しかしそのスプライシングバリエーションである FIR- Δ exon2 は FIR のドミナントネガティブとして働き、*c-myc* 遺伝子の持続的な賦活化が惹起されてがん化が促進されていると考えられている。一方で、T-ALL (T 細胞性急性リンパ性白血病) ではポリユビキチンリガーゼ FBW7(F-box and WD-repeat domain-containing 7)の機能低下により c-Myc や Notch1 が分解されずに蓄積し、さらに p53 機能喪失を伴うことが報告されている。我々の先行研究において、T 細胞性急性リンパ芽球性白血病 (T-ALL) を発症する *c-myc* 遺伝子転写抑制因子 FIR のヘテロ欠損マウスモデル(T-ALL マウス; p53^{-/-}FIR^{+/-})を確立し、T-ALL では Notch1 の遺伝子変異によらず、c-Myc の発現増大と p53 の機能喪失が発症に重要であり、FIR が癌の増悪に重要な役割を果たしている可能性を報告した。

2. 研究の目的

本研究は、癌や白血病の発症及び進展の分子メカニズムを、既報の白血病 Notch シグナル変異とは異なる『FIR-SAP155 の相互作用及び FBW7 の機能不全による *c-myc* 遺伝子の制御機構の逸脱』という観点から解明しようとするものである。T-ALL マウスから得られた白血病細胞やリンパ腫細胞あるいは癌浸潤組織を対象としてタンパク質の比較定量質量分析による網羅的な解析を行うと同時に、それらのタンパク質機能解析を、クロマチン免疫沈降及び培養細胞を用いた qRT-PCR や siRNA による遺伝子解析等により行い、T-ALL の発症及び進展・臓器浸潤に関与するタンパク質の同定とそれらの相互作用の解明を目指す。

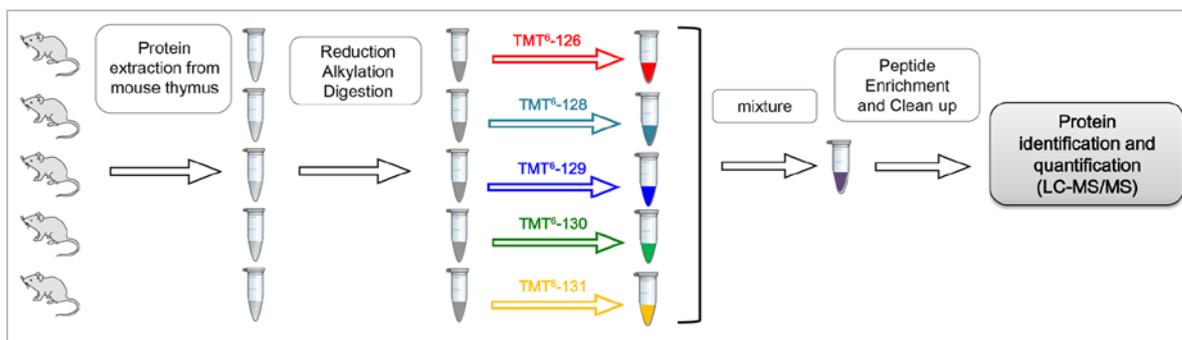
3. 研究の方法

1) マウス胸腺由来のタンパク質抽出・前処理・TMT ラベリング

T-ALL マウス 12 例 (FIR^{+/-}p53^{-/-}マウス及び FIR^{+/+}p53^{-/-}マウス各 6 例) と健常マウス 1 例 (FIR^{+/+}p53^{+/+}マウス) の胸腺組織をホモジナイズ、ソニケーションし、超遠心分離して得られた上清を回収してタンパク質抽出サンプルとした。この抽出サンプルを lysyl endopeptidase と trypsin で消化してペプチドを得た。このサンプルを Stage Tip を用いて脱塩・濃縮し、TMT sixplex™ Isobaric Label Reagent Set (Pierce, Idaho, ID, USA)を用いてラベリングを行った。

2) LC-MS/MS

1) で前処理したサンプルを複数種の TMT タグで各々ラベルしてすべて混合し、精製・分画後、LC-MS/MS による分析タンパク質同定と比較定量を行い、健常マウスと比較して T-ALL マウスで有意な増減がみられるタンパク質を網羅的に解析した。



3) qRT-PCR とウエスタンブロッティング

2) で同定されたタンパク質のうち、PKM2 (pyruvate kinase M2) について qRT-PCR とウエスタンブロッティングを行った。

4) FIR と hnRNPA1 の siRNA

HeLa 細胞・Jurkat 細胞を FIR siRNA でトランスフェクションして培養後、FIR および hnRNPA1 発現を確認した。

4. 研究成果

定量比較質量分析(TMT-MS)により、T-ALL マウスの腫瘍組織 (胸腺) から抽出したサンプルから、健常・T-ALL マウス両者間で発現に変化がみられるタンパク質が 648 個同定され、そのうち 45 個のタンパク質は両者の発現に 1.5 倍以上の増減がみられた。これらのタンパク質は、転写活性調節、DNA 修復や複製、T 細胞の活性化や増殖、アポトーシス誘導等に関わるものであった。特に腫瘍の形成と糖代謝にかかわる PKM2 が T-ALL マウスの胸腺リンパ腫で約 2 倍と高発現しており、ウエスタンブロッティングでも同様に有意に高発現し ($p < 0.002$; 図 1A,B)、qRT-PCR により mRNA レベルでも有意に高発現していた (図 1C)。さらに、HeLa 細胞・Jurkat 細胞において、hnRNPA1 の発現は FIRsiRNA によりともに減少し、FIR の発現は hnRNPA1 siRNA により増加していた (図 2-A,B,C)。PKM は選択的スプライシングにより PKM1 あるいは PKM2 のいずれかに発現するかが決定されるが、HeLa 細胞を用いた siRNA による FIR のノックダウンによりこの PKM1 と PKM2 のスイッチングに関与する hnRNPA1 の発現が抑制されると確認できた。さらに、hnRNPA1 の siRNA により FIR 発現は増大することも確認され、hnRNPA1 は FIR を抑制するというフィードバック機構が存在する可能性が考えられた。以上より、FIR ハプロ不全が hnRNPA1 の発現に影響することにより、T-ALL において PKM1 から PKM2 へのスイッチングに関与していると考えられた (図 3)。

また、T-ALL 発症マウスの胸腺リンパ腫では DNA 結合タンパクであるヒストンタンパク質 (H1.2,H3.3C,H4) が健常マウスの 20-30%にまで発現低下し、*FIR* 遺伝子を過剰発現させるとヒストンタンパク質のアセチル化やスプライシングに変化をきたすことを見出した (未発表)。加えて BRG1 が発現増大していることが確認された。BRG1 は、クロマチンリモデリング及び T 細胞の自己複製に関わる SWI/SNF1 複合体を形成するタンパク質であることから、T-ALL 発症に際して SWI/SNF1 複合体増大によるクロマチンリモデリングが過度に生じることにより、幼若 T 細胞がより容易に増殖できる可能性があることが示唆された (未発表)。

図 1:

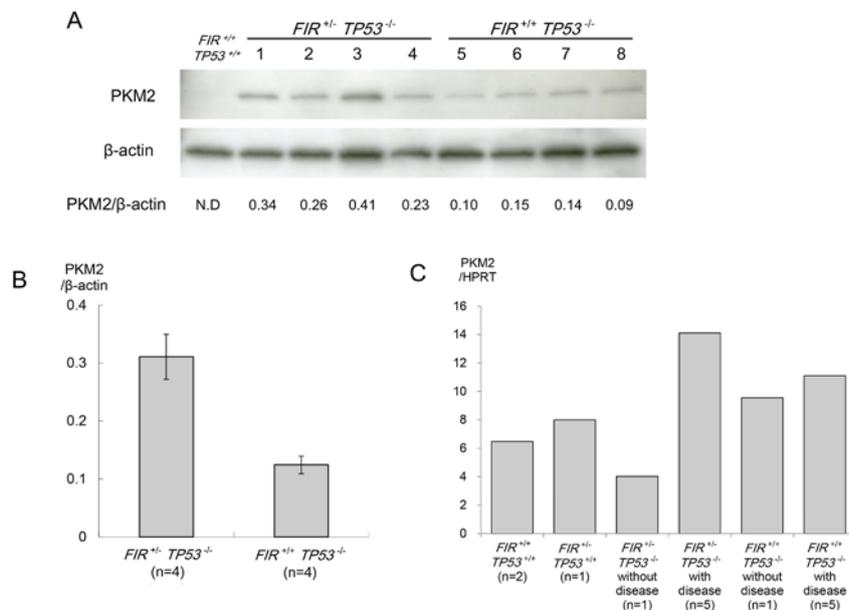


図 2 :

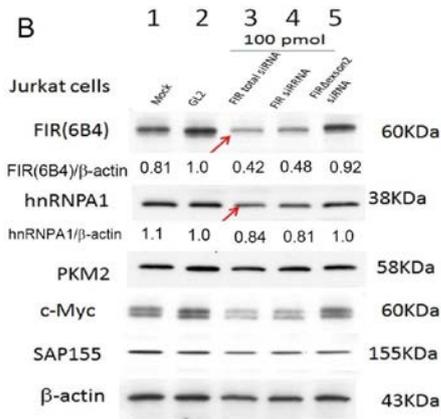
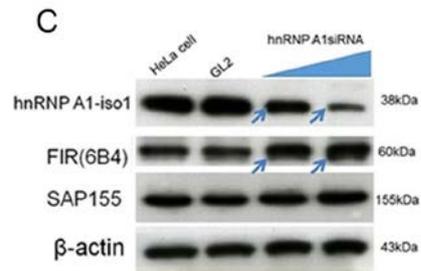
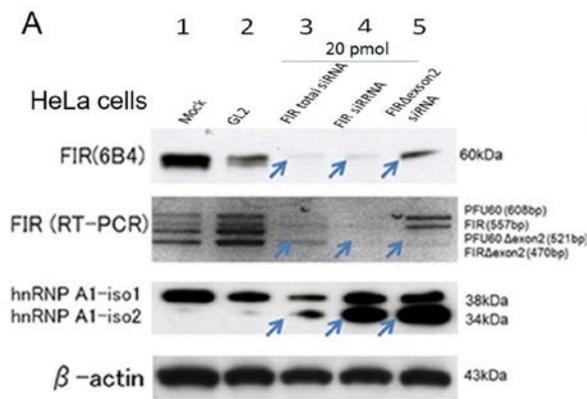
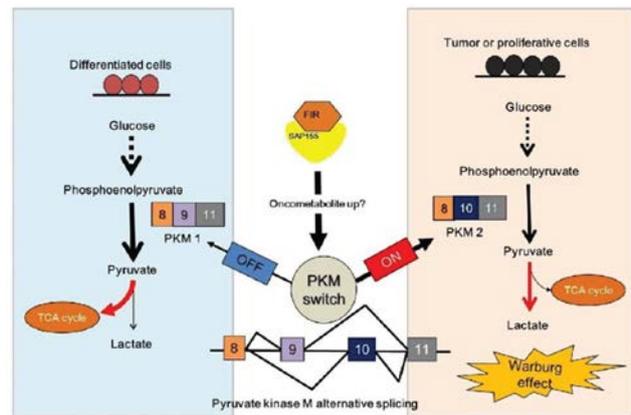


図 3 :



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Kobayashi S, Hiwasa T, Ishige T, Rahmutulla B, Kano M, Hoshino T, Minamoto T, Shimada H, Nomura F, Matsubara H, Matsushita K. Anti-FIRΔexon2, a splicing variant form of PUF60, autoantibody is detected in the sera of esophageal squamous cell carcinoma. (査読あり) *Cancer Sci.* 2019 Jun;110(6):2004-2013. doi: 10.1111
2. Ogura Y, Hoshino T, Tanaka N, Ailiken G, Kobayashi S, Kitamura K, Rahmutulla B, Kano M, Murakami K, Akutsu Y, Nomura F, Itoga S, Matsubara H, Matsushita K. Disturbed alternative splicing of FIR (PUF60) directed cyclin E overexpression in esophageal cancers. (査読あり) *Oncotarget.* 2018 May 1;9(33):22929-22944. doi: 10.18632
3. Kimura A, Kitamura K, Ailiken G, Satoh M, Minamoto T, Tanaka N, Nomura F, Matsushita K. *FIR* haploinsufficiency promotes splicing to pyruvate kinase M2 in mice thymic lymphoma tissues revealed by six-plex tandem mass tag quantitative proteomic analysis. (査読あり) *Oncotarget.* 2017 Jul 7;8(40):67955-67965. doi: 10.18632

[学会発表] (計 2 件)

1. A. Kimura, K Kitamura, G Ailiken, M Satoh, N Tanaka, F Nomura, K Matsushita. *FIR* haploinsufficiency switches PKM1 to PKM2 in mice thymic lymphoma revealed by quantitative proteomic analysis. The 32nd World Congress of Biomedical Laboratory Science. Kobe, Hyogo

2. A.Kimura, K Kitamura, G Ailiken, M Satoh, N Tanaka, F Nomura, K Matsushita. FIR haploinsufficiency promotes splicing to pyruvate kinase M2 in mice thymic lymphoma revealed by six-plex tandem mass tag quantitative proteomic analysis. EUROMEDLAB ATHENS 2017 (22nd IFCC - EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) Athen, Greece

〔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：
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：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：佐藤 守

ローマ字氏名：Mamoru Satoh

所属研究機関名：千葉大学

部局名：医学部附属病院

職名：特任准教授

研究者番号（8桁）：20401002

研究分担者氏名：野村 文夫

ローマ字氏名：Fumio Nomura

所属研究機関名：千葉大学

部局名：医学部附属病院

職名：特任教授

研究者番号（8桁）：80164739

研究分担者氏名：松下 一之

ローマ字氏名：Kazuyuki Matsushita

所属研究機関名：千葉大学

部局名：医学部附属病院

職名：准教授

研究者番号（8桁）：90344994

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。