

令和元年5月31日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08653

研究課題名(和文) 高齢者白血球細胞の脂肪酸代謝制御マーカーの探索と代謝・転写メカニズムの解明

研究課題名(英文) Survival of acute monocytic leukemia cells is driven by activation of fatty acid oxidation in adipocytes rich bone marrow microenvironment

研究代表者

田部 陽子 (Tabe, Yoko)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：70306968

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、高齢者骨髄(黄色髄/脂肪髄)内で生き残り、治療後の再発を多く認める急性骨髄単球性白血病(AMoL)細胞に対する骨髄脂肪細胞の働きを明らかにした。骨髄脂肪細胞は、AMoL細胞における脂肪酸代謝を促進し、HSPシャペロンを含む細胞シグナルネットワークを活性化した。この代謝バランスは、エネルギーセンサーであるAMPKによって調節されていた。さらに本研究では、新規脂肪酸代謝阻害剤AvocatinBの抗腫瘍作用について評価を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臓器予備能が低下した高齢者のがん治療の選択肢は少なく予後は不良となる。急性骨髄性白血病もその例外ではなく、副作用の少ない新しい治療戦略の開発が求められている。本研究では、脂肪成分が豊富な高齢者骨髄(黄色髄/脂肪髄)が難治性のAMoL細胞の生存に関与する分子機序の一端を明らかにした。本研究で得られた知見は、白血病にとどまらず、将来の高齢者のがん代謝制御治療に有用な情報を提供する。

研究成果の概要(英文)：In acute monocytic leukemia (AMoL) cells, the prevention of spontaneous apoptosis by BM adipocytes was associated with an increase in fatty acid β -oxidation (FAO). The novel FAO inhibitor avocatin B induced apoptosis and growth inhibition in mono-cultured AML cells. In AML cells co-cultured with BM adipocytes, FAO inhibition with avocatin B caused adaptive stimulation of free fatty acid (FFA) uptake through upregulation of FABP4 mRNA, enhanced glucose uptake and switch to glycolysis. These changes facilitate the protection of AMoL cells from avocatin B induced apoptosis in the presence of BM adipocytes. However, the combination treatment of avocatin B and cytarabine (AraC) increased reactive oxygen species and demonstrated highly synergistic effects on AMoL cells under BM adipocyte co-culture condition. These findings highlight the potential for combination regimens of AraC and FAO inhibitors that target bone marrow-resident chemoresistant AMoL cells.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：高齢者白血病 骨髄微小環境 脂肪酸代謝 骨髄脂肪細胞 急性骨髄単球性白血病

1. 研究開始当初の背景

がんは、高齢者に多発する疾患であり、高齢者人口比率が世界一というわが国の医療は、がんとの闘いに直面している。しかし、現在の高齢者がん治療では、併存疾患と臓器予備能の低下によって治療の選択肢や抗癌剤投与量が制限され、高齢者悪性腫瘍の予後は極端に不良である。例えば急性骨髄性白血病(AML)は、75%が60歳以上で発症する高齢者疾患であるが、治療後死亡率は65歳以上で急増する(若年成人の5~10倍、Hassan, Haematologica, 2014)。現在求められているのは、若年者に対する治療法とは異なる高齢者に優しく効果的な治療戦略である。AMLの中でも難治性の急性単球性白血病(AMoL)についても、高齢者は治療に抵抗性で、寛解に達した後で骨髄中に残存する白血病幹細胞から再発することが多い(WHO Classification of Tumors of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues, the 4th edition, Tallman, J Clin Oncol, 2004)。高齢者の骨髄は脂肪髄(黄色髄)となっているのが特徴だが、治療抵抗性との関連はこれまで不明であった。がん細胞は、脂肪酸代謝の亢進とこれに伴う活性酸素の産生抑制を介して抗アポトーシスを獲得することが知られており、PPAR δ 活性化によって誘導される脂肪酸代謝が造血幹細胞の自己再生に寄与するとの報告がある(Ito, Nat Med, 2012)。その一方で、脂肪酸代謝酵素阻害剤の抗腫瘍効果を検討した研究は散見されるものの、腫瘍細胞周囲の脂肪細胞が腫瘍の脂肪酸代謝に及ぼす影響に着目した研究はほとんどない。そこで申請者は、副作用が少なく高齢者に優しいがん治療戦略として微小環境の代謝制御を着想し、骨髄微小環境でAMoL細胞が治療抵抗性を獲得するメカニズムについて、骨髄脂肪細胞から放出される脂肪酸が果たす役割に注目して研究を行った。

2. 研究の目的

本研究では、脂肪細胞が豊富な高齢者骨髄微小環境におけるAMoL細胞の生存に脂肪酸代謝が寄与すると考え、AMoL細胞中の脂肪酸代謝関連因子が、遺伝子の転写や生存シグナル活性化に果たす役割を解明することを目的とした。さらに、高齢者の骨髄中で生き残るAMoL細胞を標的としたがん代謝制御マーカーを同定し、新規脂肪酸代謝阻害の効果についても評価を行った。個別の研究目的は以下の4点である。

- (1) AMoL細胞内に取り込まれた脂肪酸によって生じる脂肪酸代謝(ミトコンドリア内)と遺伝子転写(核内)の変化を明らかにする。
- (2) 脂肪酸代謝を介してAMoL細胞が獲得する抗アポトーシス能と脂肪酸代謝阻害剤による細胞内シグナルの活性変化を検出する。
- (3) AMoL細胞の生存に関わる脂肪酸代謝 - 転写 - 細胞内シグナルネットワークを明らかにし、脂肪酸代謝を調整する因子を抽出する。
- (4) 新規に開発された脂肪酸代謝阻害剤 AvocatinB の抗腫瘍効果を評価し、化学療法剤との併用効果とその作用機序を明らかにする。

3. 研究の方法

AMoL細胞株(U937, THP1, MOLM13, MV4;11, OCI-AML3)およびインフォームドコンセントを得て採取した患者由来AMoL細胞と正常ヒト骨髄間質系幹細胞(mesenchymal stem cell; MSC)およびMSCから分化誘導した骨髄脂肪細胞を用いた。

- (1) AMoL細胞に対して血清非添加条件でアポトーシスを誘導し、これらが骨髄脂肪細胞との共培養で抑制されるか否かを調べた(Annexin V, PI cell cycle; フローサイトメトリー法)。
- (2) 脂肪細胞由来の脂肪酸がAMoL細胞の代謝と遺伝子転写に及ぼす影響と脂肪酸代謝阻害剤の作用を明らかにするために、脂肪細胞から放出される脂肪酸を測定し(ELISA法)共培養AMoL細胞の脂肪酸代謝の変化(FAO促進とROS抑制)を確認した。同時に、CETOF-MSシステム(Agilent Technologies)を用いてAMoL細胞内の代謝変化を網羅的に測定し、代謝ネットワークの変化を検出した。
- (3) 骨髄脂肪細胞との共培養および脂肪酸代謝阻害剤使用後のAMoL細胞(U937, THP-1)の遺伝子転写プロファイルの変化をRNA-seqおよびcap analysis of gene expression (CAGE)解析により検出し(Hiseq 2000, illumina) U937, THP-1細胞で共通して変動した遺伝子発現を抽出した。
- (4) AMoL細胞の生存に関わる脂肪酸代謝 - 転写 - 細胞シグナルネットワークを検出するために先行研究およびRNA-seq, CAGE解析の結果から予測されるAMPK, S6K, 4EBP1, ERK, NF κ B, I κ Bなどのリン酸化レベルの上昇をWestern blot法により確認した。同時にiTRAQ LC-MS/MSを用いたリン酸化タンパクの網羅的検出を行い、活性化シグナルネットワークの変化を検出した。
- (5) CETOF-MSメタボローム解析結果、CAGE法で得られたトランスクリプトーム解析結果、シグナルタンパクの変動結果を統合的に解析し、検出されたネットワークの中で、脂肪酸代謝制御標的マーカー候補と転写因子とシグナル因子を抽出した。
- (6) 上記の検討により抽出された標的マーカー候補を選択し、shRNAを用いてノックダウンした。ノックダウン細胞を脂肪細胞との共培養および脂肪酸代謝阻害剤添加実験に付し、それぞれの作用の変化を検証した(Annexin V, PI cell cycle, 細胞計数)。
- (7) 新規に開発された脂肪酸代謝阻害剤 AvocatinB のAMoL細胞に対する抗腫瘍効果を骨髄脂肪細胞との共培養(-/+条件下で評価するとともに化学療法剤との併用効果とその作用機序につ

いて検討した。(Annexin V, PI cell cycle; フローサイトメトリー法)。

4. 研究成果

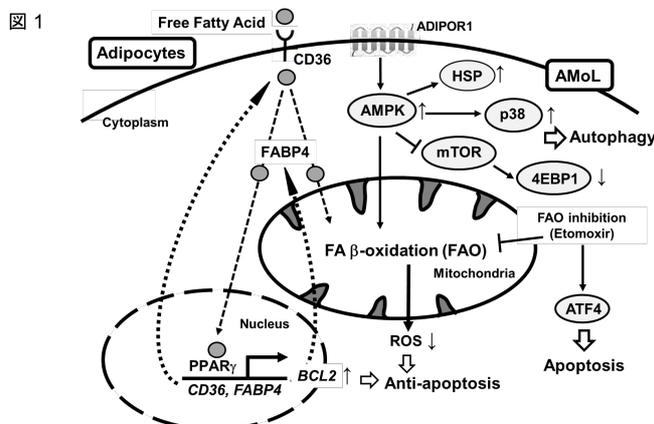
本研究は、高齢者骨髄(黄色髄 / 脂肪髄)内で生き残り、治療後再発を多く認める急性骨髄単球性白血病(AMoL)をモデルとして、AMoL細胞中の脂肪酸代謝が、遺伝子転写や生存シグナル活性化に果たす役割を明らかにした。まず AMoL細胞に対して血清非添加条件下でアポトーシスを誘導し、これらが MSC や骨髄脂肪細胞との共培養で抑制されるか否かを調べた。その結果、骨髄脂肪細胞が AMoL細胞に対して抗アポトーシス効果を発揮することを確認した。さらに遺伝子転写、脂肪酸代謝、ミトコンドリアにおける活性酸素 (ROS) 産生に及ぼす影響について検討を行った。その結果、骨髄脂肪細胞の存在下で AMoL細胞内への脂肪酸の取り込みとミトコンドリアでの脂肪酸酸化が亢進し、ケトン体産生が亢進することがわかった。AMoL細胞に取り込まれた脂肪酸そのものが、核内受容体 PPAR γ の転写活性を亢進させ、脂肪酸の細胞内輸送やミトコンドリア内への取り込みに関与する遺伝子の転写を活性化することが示された。また、PPAR γ の標的遺伝子である CD36 (脂肪酸 scavenger 受容体)遺伝子、FABP4 (脂肪酸輸送蛋白)遺伝子、脂肪酸のミトコンドリア取り込みを制御する CPT-1 遺伝子、抗アポトーシス BCL2 遺伝子等の発現が亢進することが明らかになった。CD36 については、骨髄脂肪細胞との共培養下の AMoL細胞において、遺伝子発現のみならず細胞表面での受容体としての発現レベルにおいても有意に上昇することが確認された。CD36 は細胞表面マーカーとして検出可能であり、検査マーカーとしての有用性が示唆された。一方、脂肪酸代謝マーカー候補として測定したカルニチンの分泌濃度は骨髄脂肪細胞との共培養前後で変化を認めず、検査指標としての有用性は否定的と考えられた。

これらの知見は、脂肪細胞が増生した高齢者の骨髄中において AMoL細胞の生存が脂肪酸代謝に強く依存していることを示唆するとともに、脂肪酸代謝と遺伝子転写との明確な関連性を示唆するものと考えられる。

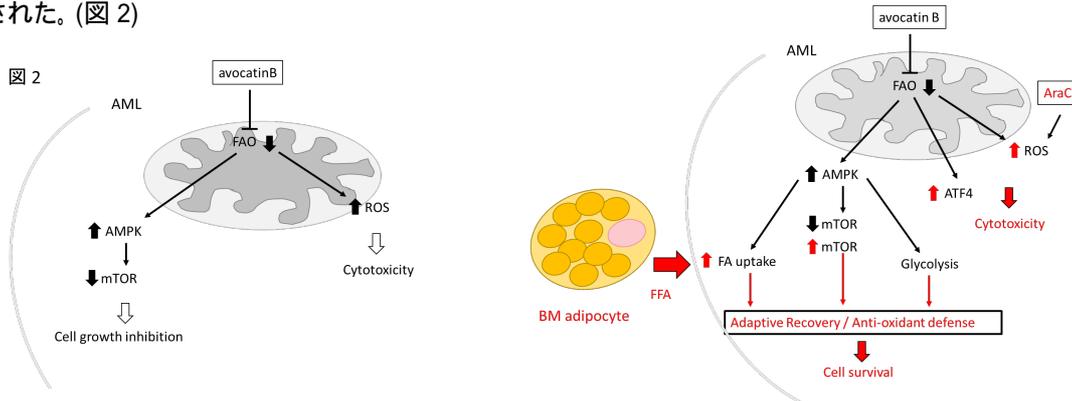
次に、骨髄脂肪細胞との共培養および脂肪酸代謝阻害剤使用後の AMoL細胞株の遺伝子転写プロファイルの変化を RNA-seq および CAGE 解析により検出した。その結果、(1) AMoL細胞が骨髄脂肪細胞との相互作用の中で脂肪酸酸化を亢進させる一方、脂肪酸合成を抑制すること、(2) 骨髄脂肪細胞との共培養下の AMoL細胞では脂肪酸合成に働く SREBP1 が抑制され、SREBP1 の発現は脂肪酸代謝阻害によって回復することがわかった。これは、AMoL細胞が脂肪細胞との相互作用の中で脂肪酸酸化を亢進させる一方、脂肪酸合成を抑制しているということを証明するものと考えられた。また、脂肪細胞との共培養時に活性化されるシグナルとして p38MAPK の経路が特定されたほか、脂肪酸代謝阻害剤 (Etomoxir) によって、小胞体ストレス因子である ATF4 の誘導が認められた。これらの結果は、骨髄脂肪細胞との共培養下の AMoL細胞では、遺伝子転写や細胞シグナルによる調整のもとで脂肪酸酸化の亢進や細胞の増殖抑制等が起こり、これらはいずれも抗アポトーシス能の獲得に作用していると考えられた。一方、脂肪酸代謝抑制時の ATF4 の誘導についてはアポトーシスとの関連が示唆された。

骨髄脂肪細胞との共培養下での AMoL細胞を用いて CETOF-MS メタボローム解析および iTRAQ LC-MS/MS を用いたリン酸化タンパクの網羅的検出を行い、脂肪酸代謝制御標的マーカー候補を抽出した。CETOF-MS メタボローム解析の結果、AMoL細胞中のグルコース 6-リン酸、フルクトース 6-リン酸およびピルビン酸が骨髄脂肪細胞との共培養後に上昇したが、ATP 産生は増加しなかった。脂肪酸代謝は酸化リン酸化による ATP 合成効率を低下させることから、これらの結果より骨髄脂肪細胞が AMoL細胞における ATP 生成を増加させることなく脂肪酸代謝を促進することが示唆された。さらに Etomoxir による脂肪酸代謝阻害は乳酸を増加させた。乳酸の蓄積は、アシドーシスを引き起こし、細胞外マトリックスを分解するプロテアーゼの活性を高め、エネルギー生成に用いられるアミノ酸を遊離させる。Etomoxir 添加後、クレブス回路内のクエン酸塩、コハク酸塩、フマル酸塩、リンゴ酸塩は著減したが、これらの減少はグルタミンを含むほとんどのアミノ酸の増加を伴った。また、Etomoxir によって AMP の有意な増加と ATP の減少を認めた。iTRAQ プロテオーム解析では、骨髄脂肪細胞と共培養した AMoL細胞において HSP70 の発現上昇と AMPK および p38 MAPK の活性化が抽出され、これらの変化は Etomoxir によって解消された。AMPK は、重要な細胞エネルギーセンサーおよび代謝調節因子であることから、本研究で求める分子マーカーとなる可能性があることがわかった。

すなわち、骨髄脂肪細胞が代謝エネルギーバランスを調節することにより AMoL細胞の生存を支持するが、脂肪酸代謝阻害剤がこの AMoL細胞の代謝恒常性を破壊することがわかった。また、骨髄脂肪細胞が、AMoL細胞における脂肪酸代謝を促進し、HSP シャペロンを含む細胞シグナルネットワークを活性化することともに、この代謝バランスが、エネルギーセンサーである AMPK によって調節されることが示唆された。(図 1)



最後に、新規に開発された脂肪酸代謝阻害剤 AvocatinB を用いた検討を行い、AvocatinB の抗腫瘍効果を評価するとともに化学療法剤との併用効果とその作用機序について考察した。また、これまでの研究で抽出された標的マーカー候補 (AMPK, ATF4) のノックダウン細胞を作成し、骨髄脂肪細胞との共培養下で AvocatinB の効果がどのように変化するかを検討した。予想に反して、AvocatinB の AMoL 細胞に対するアポトーシス誘導効果は、骨髄脂肪細胞との共培養によって減弱した。その際、AMoL 細胞のグルコース取り込みや FABP4 遺伝子・蛋白発現の上昇が観察された。これらの現象は、脂肪酸代謝抑制に対する代償反応と考えられ、AMPK ノックダウン細胞でアポトーシス阻害効果が減弱したため、AMPK シグナルが骨髄脂肪細胞存在下での白血病細胞の抗アポトーシス作用に寄与することが示唆された。一方、AvocatinB と化学療法剤シタラピン (AraC) を併用した場合、骨髄脂肪細胞と共培養下においても AMoL 細胞内で活性酸素の増加が認められ相乗的抗腫瘍効果が認められた。転写因子 ATF4 は、ストレス環境下でアポトーシス誘導性あるいはアポトーシス抵抗性の両方に作用することが知られているが、骨髄脂肪細胞共培養下での AvocatinB と AraC 併用によるアポトーシス誘導は ATF4 ノックダウンによって減弱したことから、ATF4 がアポトーシス誘導性に作用していることが示唆された。(図 2)



以上より、化学療法抵抗性の AMoL に対して AvocatinB などの脂肪酸代謝阻害剤と AraC などの化学療法剤の併用の有効性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 15 件)

1. Tabe Y, Saitoh K, Yang H, Sekihara K, Yamatani K, Ruvolo V, Taka H, Kaga N, Kikkawa M, Arai H, Miida T, Andreeff M, Spagnuolo PA, Konopleva M. Inhibition of FAO in AML co-cultured with BM adipocytes: mechanisms of survival and chemosensitization to cytarabine. *Sci Rep.* 8:16837. 2018 (査読有)
2. Molina JR, Sun Y, Protopopova M, Gera S, Bandi M, Bristow C, McAfoos T, Morlacchi P, Ackroyd J, Agip AA, Al-Atrash G, Asara J, Bardenhagen J, Carrillo CC, Carroll C, Chang E, Ciurea S, Cross JB, Czako B, Deem A, Daver N, de Groot JF, Dong JW, Feng N, Gao G, Gay J, Do MG, Greer J, Giuliani V, Han J, Han L, Henry VK, Hirst J, Huang S, Jiang Y, Kang Z, Khor T, Konoplev S, Lin YH, Liu G, Lodi A, Lofton T, Ma H, Mahendra M, Matre P, Mullinax R, Peoples M, Petrocchi A, Rodriguez-Canale J, Serreli R, Shi T, Smith M, Tabe Y, Theroff J, Tiziani S, Xu Q, Zhang Q, Muller F, DePinho RA, Toniatti C, Draetta GF, Heffernan TP, Konopleva M, Jones P, Di Francesco ME, Marszalek JR. An inhibitor of oxidative phosphorylation exploits cancer vulnerability. *Nat Med.* 24:1036-46. 2018 (査読有)
3. Tabe Y, Yamamoto S, Saitoh K, Sekihara K, Monma N, Ieko K, Mogushi K, Shikami M, Ruvolo VR, Ishizawa J, Hail N, Kazuno S, Igarashi M, Matsushita H, Yamanaka Y, Arai H, Nagaoka I, Miida T, Hayashizaki Y, Konopleva M, Andreeff M. Survival of acute monocytic leukemia cells is driven by fatty acid oxidation-mediated activation of AMPK in bone marrow adipocytes. *Cancer Res.* 77:1453-64. 2017 (査読有)
4. Tabe Y, Konopleva M. Role of Microenvironment in Resistance to Therapy in AML. *Curr Hematol Malig Rep.* 10:96-103. 2015 (査読有)
5. Tabe Y, Konopleva M. Advances in understanding the leukaemia microenvironment. *Br J Haematol.* 164:767-78. 2014 (査読有)

[学会発表](計 7 件)

1. Haeun Yang, Yoko Tabe, Kaori Saito, Rodrigo Jacamo, Helen Ma, Vivian Ruvolo, Junichi Imoto, Kazuho Ieko, Kaoru Mogushi, Masaki Hosoya, Shigeo Yamaguchi, Kotoko Yamatani, Yuko Murakami-Tonami, Koya Suzuki, Takashi Miida, Michael Andreeff, Joseph R Marszalek, and Marina Y. Konopleva. Mitochondrial transfer confers microenvironment-mediated resistance to OxPhos inhibition in AML. 60th American Society of Hematology Annual Meeting,

SanDiego, USA (12/1-4) 2018 (査読有)

2. Yoko Tabe, Kazumasa Sekihara, Haeun Yang, Kaori Saito, Vivian Ruvolo, Hikari Taka, Naoko Kaga, Takashi Miida, Michael Andreeff, Paul A Spagnuolo, Marina Konopleva. Inhibition of FAO in AML co-cultured with BM adipocytes: mechanisms of survival and chemosensitization to cytarabine. 59th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, Atlanta, U.S.A (12/9-12/12), 2017(査読有)

3. Yoko Tabe, Kazumasa Sekihara, Kaori Saitoh, Vivian Ruvolo, Takashi Miida, Michael Andreeff, Paul A. Spagnuolo, Marina Konopleva. Novel fatty acid oxidation inhibitor avocatinB induces AMPK-dependent apoptosis of AML cells co-cultured with BM-adipocytes. 58th American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting and Exposition. San Diego,USA (12/3-6) 2016(査読有)

4. Yoko Tabe, Shinichi Yamamoto, Mika Kikkawa, Hikari Taka, Naoko Kaga, Kaoru Mogushi, Hiromichi Matsushita, Takashi Miida, Michael Andreeff, Paul A. Spagnuolo, Marina Konopleva. Novel FAO inhibitor avocatin B induces apoptosis of acute monocytic leukemia cells in adipocyte co-culture system via ER stress and ATF4 activation. 57th American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting and Exposition. Orlando,USA (12/5-8) 2015 (査読有)

5. Yoko Tabe, Marina Konopleva, Norikazu Monma, Kazuho Ikeo, Kaoru Mogushi, Yasunari Yamanaka, Hiromichi Matsushita, Takashi Miida, Yoshihide Hayashizaki, Michael Andreeff. Cap analysis of gene expression (CAGE) sequencing reveals alterations of the transcript signatures in acute monocytic leukemia cells by fatty acid oxidation inhibition.57th American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting and Exposition. Orlando,USA (12/5-8) 2015(査読有)

6. Yoko Tabe, Masako Harada, Yuka Miyamae, Kaoru Mogushi, Saiko Kazuno, Tsutomu Fujimura, Hiromichi Matsushita, Takashi Ueno, Takehiko Yokomizo, Takashi Miida, Ismael Samudio, Michael Andreeff, Marina Konopleva. Bone marrow adipocyte-derived free fatty acids induce gene signature linking transcription with metabolic changes that contribute to survival of acute monocytic leukemia cells. 56th American Society of Hematology Annual Meeting. San Francisco,USA (12/6-9) 2014 (査読有)

[その他]

ホームページ

<http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/byotaikaiseki/k4.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田部 陽子(TABE, Yoko)

順天堂大学・医学部・特任教授

研究者番号：70306968

(2)研究分担者

三井田 孝(MIIDA, Kazuhisa)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：80260545

(3) 研究分担者

原田 聖子(HARADA, Masako)

順天堂大学・医学部・研究員

研究者番号：60714871