

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17826

研究課題名(和文) 悪性リンパ腫における腫瘍性糖代謝とNF- κ B活性化のクロストークの検証

研究課題名(英文) Crosstalk between Glycolysis and NF-kappa B activation in malignant lymphoma cells

研究代表者

中嶋 圭(Nakajima, Kei)

山梨大学・大学院総合研究部・臨床助教

研究者番号：20447709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：B細胞性リンパ腫細胞株ではc-MYC、NF- κ B-p65リン化を介したHIF1によるHexokinase2(HK2)発現誘導、再発難治リンパ腫のキードラッグであるシスプラチンへの耐性が見られた。HK2発現とNF- κ B-p65リン化のポジティブフィードバック機構の解明のためAMPKに注目した。低グルコース環境、ビッグアナイド系糖尿病薬メトホルミンはAMPKのリン酸化をもたらし、メトホルミンはNF- κ Bの脱アセチル化(acetyl K310)に引き続いて脱リン酸化(p65 Ser536)をもたらした。AMPKのリン酸化を起点としたポジティブフィードバック機構が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再発難治の悪性リンパ腫では近年新規治療薬や移植細胞治療により治療成績は改善してきているが薬剤が高額であったり、地理的な問題で治療施設へのアクセスが限られてしまう場合もある。既存の薬剤の組み合わせ等で糖系による抗がん剤耐性を解除することができれば、難治患者においても治療成績を向上させることができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In B-cell lymphoma cell lines, c-MYC and NF- κ B-p65 phosphorylation induced Hexokinase2(HK2) expression by HIF1 and resistance to anticancer drugs, and we focused on AMPK to prove the positive feedback mechanism between HK2 expression and NF- κ B-p65 phosphorylation. Inhibition of glycolysis by low glucose medium and metformin(Biguanide antidiabetic) caused phosphorylation of AMPK, and metformin caused deacetylation (acetyl K310) of NF- κ B followed by dephosphorylation (p65 Ser536), suggesting a positive feedback mechanism initiated by AMPK phosphorylation.

研究分野：血液学

キーワード：悪性リンパ腫 解糖系 ヘキソキナーゼ2 NF- κ B AMPK

1. 研究開始当初の背景

がん細胞のエネルギー代謝が解糖系に依存した特徴を持つことは、古くより Warburg 効果として知られている。悪性リンパ腫は、解糖系の機能亢進が特徴的に認められる。悪性リンパ腫症例では乳酸代謝酵素 LDH が上昇しており、また FDG-PET スキャンにおいて多くのリンパ腫組織は強い糖代謝活性を示すことが直接的に示されている。また、病理学的な研究により、悪性リンパ腫組織においても解糖系の律速酵素である Hexokinase 2 : HK 2 の発現が上昇していることが報告されている。HK 2 は糖代謝のみならず、ミトコンドリア外膜において、voltage- dependent anion channel (VDAC) と結合することにより、チトクローム c の放出を抑制し、アポトーシスを抑制する作用を有している。HK2 の発現は様々な調節を受けており、悪性リンパ腫細胞における HK 2 の発現亢進に関わる分子生物学的なメカニズムは明らかになっていない。一方、NF- κ B の異常活性化も悪性リンパ腫で幅広く認められる分子病態である。過剰な解糖系亢進と NF- κ B の異常活性化とのリンクが存在するのではないかと考え、HK2 に焦点をあてた研究を開始した。

2. 研究の目的

NF- κ B 経路の異常活性化および解糖系亢進がポジティブ・フィードバックとして相互に影響しあうと予想した。NF- κ B の異常活性化は低酸素応答転写因子 HIF を介して HK2 の発現を誘導する一方、HK2 は解糖系を亢進させることにより、NF- κ B の制御分子である IKK を活性化する。このループを介して過剰発現された HK2 はアポトーシス抑制やオートファジー制御により腫瘍細胞の生存維持を促すという仮説をたてこれを検証することを目的とした。さらに HK2 をターゲットとした悪性リンパ腫の治療法の可能性についても探求した。

3. 研究の方法

細胞培養：悪性リンパ腫細胞のモデルとして、9種類の細胞株(RL, Raji, Ramos, Namalwa, Daudi, ATCC-#2631, ATCC-#2632, ATCC-#2289およびHT)を用いた

臨床検体：

病理学的解析には、山梨大学医学部を受診したB細胞性悪性リンパ腫症例を対象とし、初発時のリンパ節生検検体を用いる。本研究課題については臨床研究として山梨大学医学部倫理委員会に申請を行い承認が得られている（承認番号1477）、免疫染色によりタンパク発現を解析した。抗HK2抗体for IHC(Santa Cruz Biotechnology, sc-374091) for IHC

試薬：HK 2 阻害薬として2-Deoxy-D-glucose (2DG)、HIF阻害剤としてPanobinostat、NF- κ B阻害にBAY11-7028、 c-MYC阻害に10058-F4を用いた。

ウェスタンブロット：以下の抗体を用いウェスタンブロット法でタンパクの発現を解析した。

抗HK2抗体for WB(Santa Cruz Biotechnology, sc-6521)

抗c-MYC抗体(Cell Signaling Technology, #5605),抗HIF-1 α 抗体(BD Biosciences,#610959)

抗phospho-NF- κ Bp65抗体(Cell Signaling Technology,#3039),抗NF- κ Bp65抗体(Cell

Signaling Technology,#3034),抗Bcl-xL抗体(Cell Signaling Technology,#2762),抗MCL1抗体

(Santa Cruz Biotechnology,sc-819),抗GLUT1抗体(Santa Cruz Biotechnology,sc-377228),抗

PFKFB3抗体(Cell Signaling Technology,#9645),抗cleaved caspase3抗体(Cell Signaling

Technology,#9661),抗caspase3抗体(Cell Signaling Technology,#9662),抗beta-actin抗体(Cell

4 . 研究成果

< 悪性リンパ腫細胞株における HK2 発現亢進、NF- B 活性化について >

パーキットリンパ腫 (BL) 由来細胞株では DLBCL 由来細胞株に比べ HK2 が強く発現していた。c-MYC を介した HK2 の発現誘導は BL 細胞株、DLBCL 細胞株ともに共通してみられたが、NF- B-p65 リン酸化を介した HIF1 による発現誘導は BL のみで見られた。

< 臨床検体での評価 >

臨床検体で免疫染色をおこない HK2 の発現レベルを比較したところ BL では DLBCL よりも強い発現がみられた。BL では NF- B-p65 リン酸化が亢進することで HK2 発現が DLBCL よりも強力に起きていることを支持する結果であった。

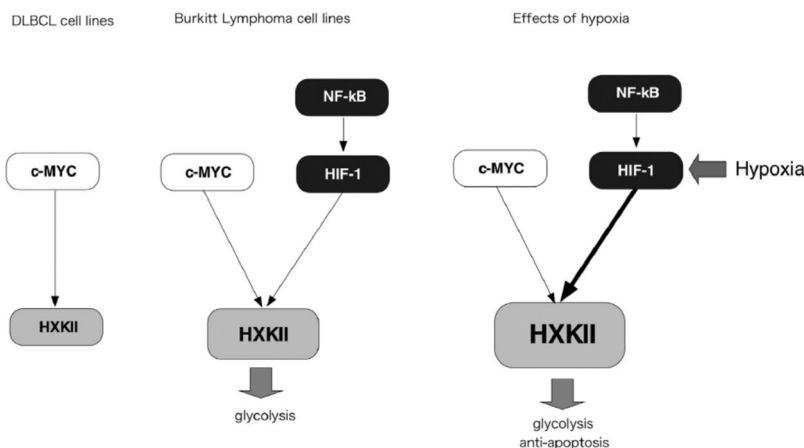
< HK2 による抗がん剤耐性 >

・ BL 細胞株、DLBCL 細胞株を低酸素環境下で培養したところ HIF1 の発現亢進とともに HK2 の発現もさらに亢進した。また再発難治リンパ腫治療のキードラッグのシスプラチン (CDDP) への抵抗性がみられた。低酸素環境下による HK2 の誘導が CDDP 抵抗性を導いていると考えられた。

< HK2 発現亢進による抗がん剤耐性の解除 >

・ BL 細胞株、DLBCL 細胞株においてヒストン脱アセチル化酵素阻害剤：パノピノスタットは低酸素環境下での HIF1、HK2 の発現を抑制し CDDP 抵抗性を解除した。パノピノスタットを用いることで HK2 を抑制し低酸素環境下の治療抵抗性細胞にアポトーシスを誘導させられる可能性が示唆された。

本研究から考えられた B 細胞性リンパ腫における HK2 の機能と制御モデルをいかに示す。



ポジティブフィードバック機構の解明のため実験を行い以下の結果が得られた。

< エネルギーセンサーとしての AMPK に与えるメトホルミンの作用 >

HK2 を高発現するパーキットリンパ腫細胞株を解糖系を抑制する目的で低グルコース培地で培養したところ AMPK のリン酸化がもたらされた。ビッグナイド系糖尿病薬であるメトホルミンによっても AMPK のリン酸化をもたらされた。

< メトホルミンによる NF- B の抑制 >

メトホルミンは NF- κ B の脱アセチル化 (acetyl K310) に引き続いて脱リン酸化 (p65 Ser536) をもたらした。AMPK のリン酸化はタンパク質脱アセチル化酵素である SIRT1 の活性化をもたらすことが報告されており、SIRT1 が NF- κ B の脱アセチル化 (acetyl K310) に引き続き、脱リン酸化 (p65 Ser536) が引き起こしポジティブフィードバック機構が成立すると仮説を立てた。

SIRT1 活性化薬である SRT2183 による刺激で total NF- κ B の発現低下がみられたが、NF- κ B の脱アセチル化 (acetyl K310) は免疫沈降法を用いても確認できなかった。AMPK による SIRT1 活性化を介したポジティブフィードバックを証明することはできなかった。

< 現在行っている実験 >

現在は、解糖制御転写因子であり細胞内グルコース濃度の上昇によりミトコンドリア外膜から核へ移行するとされている MondoA に注目している。BL 細胞株をグルコースフリーの培地で培養すると HK2 の発現が低下すること、同時に MondoA の核内移行が抑制されさらに thioredoxin-interacting protein (TXNIP) の発現が低下していることが分かった。これが HK2 高発現のポジティブフィードバック形成の一端を担っていると予想し実験を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakajima Kei, Kawashima Ichiro, Koshiisi Megumi, Kumagai Takuma, Suzuki Megumi, Suzuki Jun, Mitsumori Toru, Kirito Keita	4. 巻 78
2. 論文標題 Glycolytic enzyme hexokinase II is a putative therapeutic target in B-cell malignant lymphoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Hematology	6. 最初と最後の頁 46-55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.exphem.2019.09.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------