

令和 4 年 5 月 6 日現在

機関番号：33942

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17875

研究課題名(和文)急性骨髄性白血病(AML)におけるTXNIPによるオートファジー制御機構の解明

研究課題名(英文)Deciphering the regulatory mechanism of autophagy by TXNIP in acute myeloid leukemia (AML)

研究代表者

能浦 三奈(Noura, Mina)

修文大学・医療科学部・助手

研究者番号：90828401

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):近年がんに対する様々な分子標的薬が開発されているが、AMLの標準治療法は依然としてシタラピンを中心とした化学療法であり、耐性獲得により予後不良となる。本研究は難治性AMLを克服する新たな治療戦略を構築することを目的とする。我々は臨床検体データベースを用いた予後解析より、腫瘍抑制因子TXNIPの低発現が予後不良に関連することを明らかにした。TXNIPは様々ながんで発現低下が報告されているが、その詳細な分子機構は不明である。本研究において我々はAMLにおけるTXNIPの機能の一部を明らかにすると共に、TXNIP制御とBcl-2ファミリー阻害薬のコンビネーションによる新たな治療法の有効性を示す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TXNIPは様々な組織において腫瘍抑制に重要な役割を果たす。本研究では、MLL遺伝子再構成を伴うAMLにおいてTXNIPが細胞増殖を抑制し、オートファジーを誘導することを明らかにした。この成果は難治性MLL白血病の新規治療法の開発に寄与する。また本研究ではTXNIPの過剰発現が既存のBcl-2ファミリー阻害薬であるABT-263のアポトーシス誘導作用を増強することを明らかにした。この成果はTXNIPによるオートファジー誘導がアポトーシスに与える影響について新たな知見をもたらし、オートファジーとアポトーシスのクロストークを制御する革新的治療法の確立につながると展望する。

研究成果の概要(英文): Various molecular-targeted drugs for cancer have been developed and are expected as effective therapeutic methods for acute myeloid leukemia (AML). The standard treatment for AML is chemotherapy with a combination of cytarabine and anthracycline; however, it often results in a poor prognosis due to the acquired resistance. This study tried to develop a new therapeutic strategy to overcome refractory AML. Using the clinical database, we revealed that downregulation of the tumor suppressor TXNIP is associated with a poor prognosis. Although the expression of TXNIP is suppressed in various cancers, its detailed molecular mechanism has not been elucidated. Here, we clarify the roles of TXNIP in AML and show the antitumor effect of combined treatment with TXNIP overexpression and Bcl-2 family protein inhibitor.

研究分野: 細胞生物学、血液腫瘍学

キーワード: AML TXNIP オートファジー

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病(AML)は骨髄中で異常な芽球が増殖する悪性疾患である。AML の治療成績は改善傾向にあるが、若年成人 AML 全体の 5 年無再発生存率は 40%程度である。AML には様々なサブタイプが存在し、その背景により治療感受性や予後は大きく異なる。AML の標準治療法はシタラビンとアントラサイクリンの併用による化学療法であるが、薬剤耐性獲得によりしばしば予後不良となる。Mixed-lineage leukemia 遺伝子再構成を伴う AML (MLL-r AML) は、急性白血球の 5-10%にみられ、特に DNA トポイソメラーゼ II 阻害剤治療後の二次性白血球の約 85%で陽性となる。MLL 関連白血球の転座形式はこれまでに 100 種類以上報告されており、その融合パートナーにより異なる臨床像を呈するが、しばしば白血球の悪性化や治療抵抗性に関連する。従って MLL-r AML のような難治性 AML の悪性化に関わる根本的な原因を特定し、新規治療法を開発することが切望されている。

我々は抗酸化ストレス蛋白質チオレドキシシンと結合する蛋白質として TBP-2(Thioredoxin binding protein-2)/TXNIP (Thioredoxin interacting protein)を世界に先駆けて同定し、その生体内での機能について追求してきた。現在では TXNIP という表記が国際的に多く使われているため、これ以降 TXNIP と表記する。TXNIP はグルコース代謝、脂質代謝、免疫炎症反応など広範な生理作用において、多彩な機能を有する。TXNIP ノックアウトマウスは飢餓時に高脂血症、低血糖、出血傾向および肝腎不全などの症状を示すことが報告されており、絶食応答における TXNIP の重要性が示唆される。TXNIP は細胞の増殖や分化においても重要な役割を果たしており、乳がん、大腸がん、肺がんなど様々ながんで発現低下が報告されている。また膀胱がんにおいて腫瘍の悪性度が高くなるにつれ TXNIP の発現が低下することが報告されており、TXNIP の発現低下が腫瘍の悪性化に関与していることが示唆される。AML においてもエピジェネティクス異常により TXNIP の発現が低下しているが、白血球発症との関連性は不明である。また AML サブタイプと TXNIP 発現の関係についても報告はない。以上の背景より TXNIP の発現低下が白血球の発症および維持に重要であることが示唆されるが、そのメカニズムは未解明である。

2. 研究の目的

急性骨髄性白血病 (AML) における TXNIP 過剰発現細胞株を樹立し、AML における TXNIP の機能解析を行う。TXNIP の抗腫瘍メカニズムを解明し、新規がん治療薬開発への基盤とする。また TXNIP 過剰発現 AML 細胞株において抗腫瘍効果を増強する薬剤を探索することを目的とする。

3. 研究の方法

①臨床検体データセットを用いた予後解析および AML サブタイプ別 TXNIP 発現の解析

既存の臨床検体データセットを用いて、TXNIP 発現と AML 患者の予後の関係を調べた。また AML サブタイプ別の TXNIP 発現量を解析し、TXNIP 発現誘導が治療に有用となりうる AML サブタイプを同定した。

②AML 細胞株への TXNIP 遺伝子導入

TXNIP の機能解析をするにあたり、AML 細胞株において TXNIP の発現量を過剰に増加または減少させ、フェノタイプを検証するという方法がある。一方で、TXNIP を特異的に増加または減少させるような薬剤は未だ開発されていない。そこでまず AML 細胞株への TXNIP 遺伝子導入を試みた。細胞株は、①の解析により TXNIP 発現量が最も低いことが明らかになった MLL-r AML 細胞株 2 種類 (MOLM-13, MV4-11) を使用した。遺伝子導入には、レンチウイルスベクターを使用した。この発現ベクターはドキシサイクリン (テトラサイクリン誘導体) 存在下のみで発現するため、遺伝子導入による継代培養中の形質転換を防ぐことができる。またドキシサイクリン添加により Tet-on することで、毎回同じ条件で TXNIP を過剰発現させることが可能である。

③TXNIP 過剰発現 AML 細胞株を用いた AML における TXNIP の機能解析

まず TXNIP 過剰発現による細胞増殖抑制効果を確認した。さらに TXNIP による抗腫瘍メカニズムを明らかにするため、細胞周期解析、アポトーシスアッセイを行った。また TXNIP は細胞内代謝や絶食応答に関連する分子であることから、オートファジーの誘導がみられるか調べるため、オートファジー関連蛋白の検出および電子顕微鏡によるオートファゴソームの検出を試みた。

④TXNIP 過剰発現 AML 細胞株において抗腫瘍効果を増強する薬剤の探索

TXNIP の過剰発現は AML 細胞の増殖を抑制するがアポトーシスの誘導には至らないことから、TXNIP 過剰発現と組み合わせることで細胞死を増強させる既存の薬剤を探索した。

4. 研究成果

まず既存の臨床検体データセット (GSE5122) を用いた予後解析により、難治性 AML において TXNIP の低発現は予後不良に関連することを明らかにした (図 1A)。次に AML のサブタイプごとの TXNIP 発現量を調べるため、既存の AML 臨床検体データセット (GSE6891) を用いて解析を行った。これより MLL-r AML において TXNIP の発現量が最も低下していることを発見した (図 1B)。AML における TXNIP の発現低下は複数報告されてきたが、実際にはすべての AML で発現が低下しているわけではなく、サブタイプによって発現量が大きく異なることが判明した。そこで MLL-r AML 細胞株の MOLM-13 および MV4-11 を用いて TXNIP の機能解析を行った。

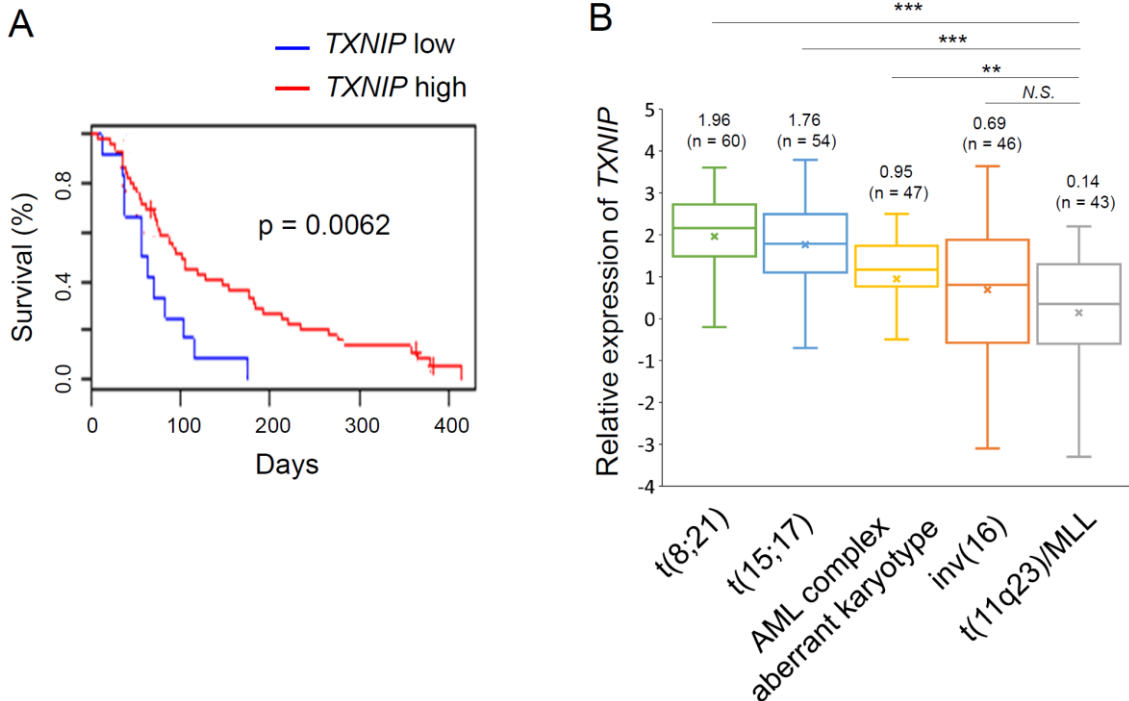


図 1. 既存の AML 臨床検体データセットを用いた解析結果

A: AML における TXNIP 発現と予後の関係

B: 様々なサブタイプの AML における TXNIP 発現レベル

まず MOLM-13 および MV4-11 にテトラサイクリン誘導性 TXNIP 過剰発現ベクターを導入し、テトラサイクリン添加により TXNIP の発現が mRNA およびタンパクレベルで増加することを確認した。TXNIP 過剰発現により両細胞株において細胞増殖が有意に抑制されたが (図 2)、tet-on 開始から day7 までにおいて、細胞周期の進行に変化はみられなかった。アポトーシスアッセイにおいても有意な差は認められなかったが、TXNIP 過剰発現下では Annexin V 陰性 DAPI 陽性分画の有意な増加がみられ、細胞膜の透過性が亢進していることを示す知見が得られた。

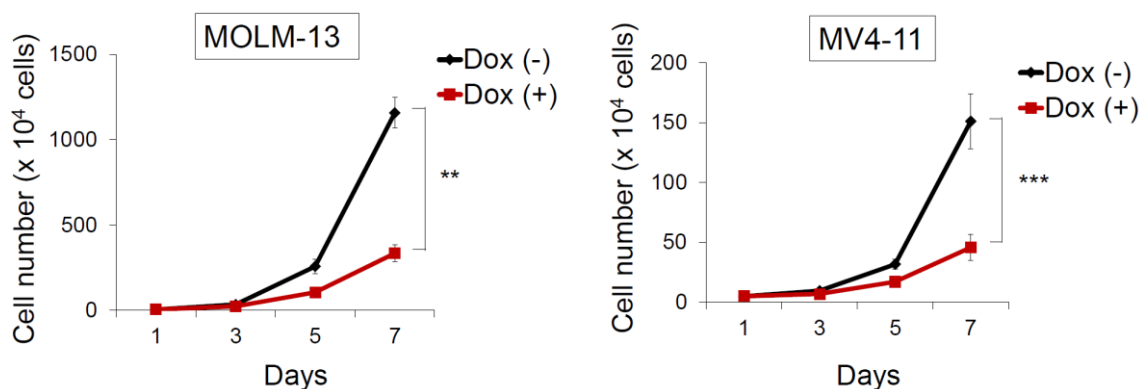
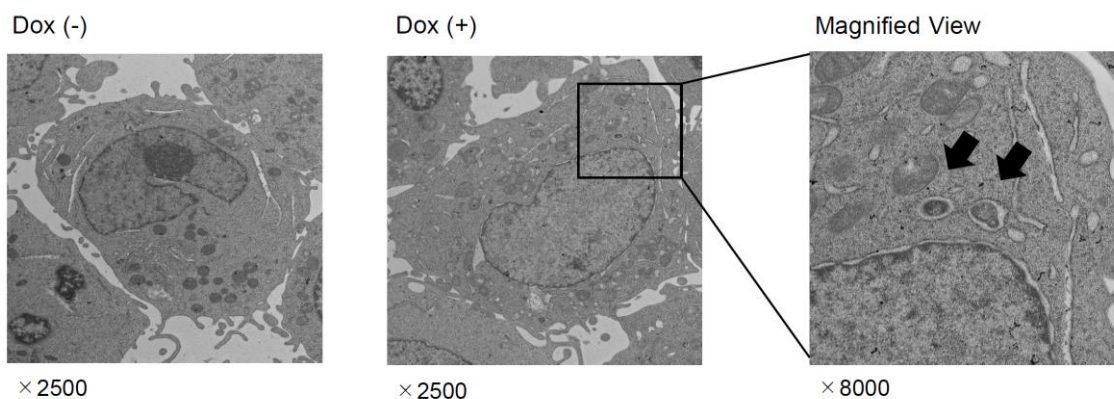


図 2. TXNIP による細胞増殖抑制効果

TXNIP は代謝制御や飢餓応答において重要な役割を果たすことから、TXNIP はオートファジーを誘導することで細胞増殖を抑制するのではないかと考えた。TXNIP 過剰発現 AML 細胞ではオートファジー関連蛋白である Beclin-1 および LC3B-II の発現が増加し、電子顕微鏡観察においてオートファゴソームの形成が認められた (図 3)。

MOLM-13



MV4-11

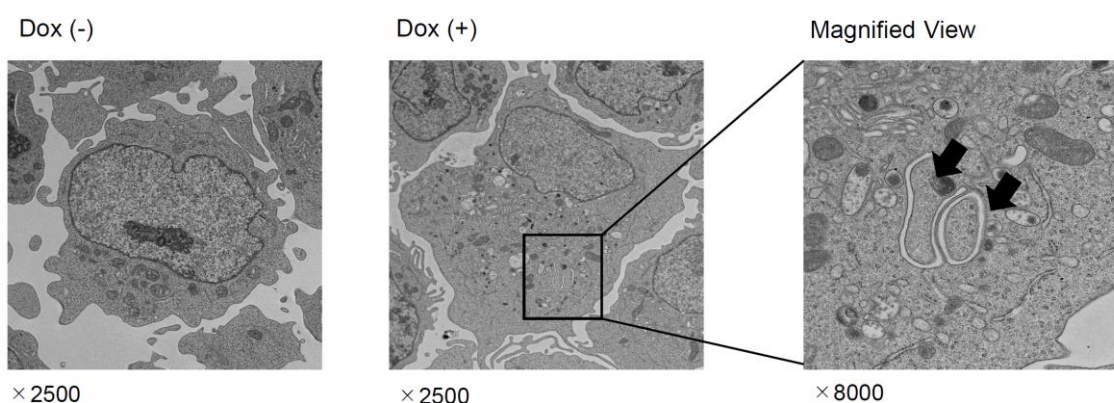


図 3. TXNIP 過剰発現 AML 細胞株の電子顕微鏡像

TXNIP はグルコースの取り込みを抑制することが報告されているため、グルコース飢餓誘導性オートファジーが生じているのではないかと考えた。TXNIP 過剰発現 AML 細胞株を高濃度グルコース培地で培養したところ、短期の培養では細胞増殖抑制がレスキューされたが、長期の培養では再び細胞増殖が有意に抑制された。

TXNIP 過剰発現による遺伝子発現の変化を調べるため、TXNIP 過剰発現 AML 細胞株の mRNA を抽出しマイクロアレイを実施した。TXNIP 過剰発現によりコントロールに対して発現が 2 倍以上上昇する遺伝子を抽出し、パスウェイ解析を行ったところ、脂質代謝に関与する遺伝子群が変動していることが明らかになった。またキナーゼアレイにより TXNIP 過剰発現によるリン酸化の変化を調べたところ ERK のリン酸化の増加が認められた。

次に TXNIP 過剰発現 AML 細胞株において抗腫瘍効果を増強する薬剤の探索を行った。まずは AML の標準治療薬であるシタラビンで検討したが、TXNIP 過剰発現との相乗効果はみられなかった。また TXNIP 過剰発現によりオートファジー誘導が認められたことから、TXNIP 過剰発現 AML 細胞株において代表的なオートファジー阻害剤である 3-MA、クロロキン、バフィロマイシン A1 を添加したところ、いずれの薬剤についても明らかな相乗効果はみられなかった。先行研究において Beclin-1 は Bcl-2 ファミリーの一つである Bcl-xL と結合することでアポトーシスを抑制することが報告されている。そこで TXNIP 過剰発現 AML 細胞に Bcl-2 および Bcl-xL の阻害剤である ABT-263 を投与すると、細胞増殖抑制効果が増強し、アポトーシスが誘導された。一方で Bcl-2 のみを阻害する ABT-199 の投与では同様の効果は得られなかった。これより TXNIP 過剰発現 AML 細胞のアポトーシス誘導には Bcl-xL の阻害が重要であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kubota Hirohito, Masuda Tatsuya, Noura Mina, Furuichi Kana, Matsuo Hidemasa, Hirata Masahiro, Kataoka Tatsuki R., Hiramatsu Hidefumi, Yasumi Takahiro, Nakahata Tatsutoshi, Imai Yoichi, Takita Junko, Adachi Souichi, Sugiyama Hiroshi, Kamikubo Yasuhiko	4. 巻 2
2. 論文標題 RUNX inhibitor suppresses graft versus host disease through targeting <i>RUNX</i> NFATC2</i> axis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eJHaem	6. 最初と最後の頁 449 ~ 458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jha2.230	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Matsuo Hidemasa, Nakatani Kana, Harata Yutarou, Higashitani Moe, Ito Yuri, Inagami Aina, Noura Mina, Nakahata Tatsutoshi, Adachi Souichi	4. 巻 27
2. 論文標題 Efficacy of a combination therapy targeting CDK4/6 and autophagy in a mouse xenograft model of t(8;21) acute myeloid leukemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101099 ~ 101099
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2021.101099	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Noura Mina, Morita Ken, Kiyose Hiroki, Okuno Yukiko, Matsuo Hidemasa, Koyama Asami, Nishinaka Arai Yoko, Kamikubo Yasuhiko, Adachi Souichi	4. 巻 194
2. 論文標題 Albendazole induces the terminal differentiation of acute myeloid leukaemia cells to monocytes by stimulating the Kruppel like factor 4 dihydropyrimidinase like 2A (KLF4 DPYSL2A) axis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 598 ~ 603
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.17557	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 -
1. 著者名 Mina Noura, Hidemasa Matsuo, Asami Koyama, Souichi Adachi, Hiroshi Masutani	4. 巻 10
2. 論文標題 TXNIP induces growth arrest and enhances ABT263 induced apoptosis in mixed lineage leukemia rearranged acute myeloid leukemia cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1532 ~ 1541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12908	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mina Noura, Ken Morita, Hiroki Kiyose, Hidemasa Matsuo, Yoko Nishinaka-Arai, Mineo Kurokawa, Yasuhiko Kamikubo, Souichi Adachi	4. 巻 10
2. 論文標題 Pivotal role of DPYSL2A in KLF4-mediated monocytic differentiation of acute myeloid leukemia cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-76951-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kana Nakatani, Hidemasa Matsuo, Yutarou Harata, Moe Higashitani, Asami Koyama, Mina Noura, Yoko Nishinaka-Arai, Yasuhiko Kamikubo, Souichi Adachi	4. 巻 113
2. 論文標題 Inhibition of CDK4/6 and autophagy synergistically induces apoptosis in t(8;21) acute myeloid leukemia cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 243-253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-020-03015-4	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 -

1. 著者名 Tomoo Daifu, Masamitsu Mikami, Hidefumi Hiramatsu, Atsushi Iwai, Katsutsugu Umeda, Mina Noura, Hirohito Kubota, ..., Junko Takita, Hiroshi Sugiyama, Souichi Adachi, Yasuhiko Kamikubo	4. 巻 68
2. 論文標題 Suppression of malignant rhabdoid tumors through Chb-M'-mediated RUNX1 inhibition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatric Blood & Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pbc.28789	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 該当する

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 能浦三奈、森田剣、清瀬大樹、奥野友紀子、松尾英将、小山朝美、西中瑤子、上久保靖彦、足立壮一
2. 発表標題 アルペンダゾールはKLF4-DPYSL2A軸を介して急性骨髄性白血病細胞の単球への分化誘導を促進する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 能浦三奈、松尾英将、小山朝美、足立壯一、増谷弘
2. 発表標題 MLL遺伝子再構成陽性急性骨髄性白血病におけるTXNIPの機能解析
3. 学会等名 第79回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 能浦三奈
2. 発表標題 Pivotal role of DPYSL2A in KLF4-mediated monocytic differentiation of acute myeloid leukemia cells
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019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
---------	---------