

クローン性造血における悪性形質転換の分子基盤解明

国立がん研究センター研究所がん RNA 研究分野

武藤 朋也

【背景・目的】

急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia: AML) は、幼若な骨髄系細胞である芽球の増殖をきたす造血器悪性腫瘍である。AML の病態解明にあたり、E3 ユビキチンリガーゼである TNF receptor associated factor 6 (TRAF6) に注目した。TRAF6 は Toll 様受容体や IL-1 受容体ファミリーの下流シグナルの主要なメディエーターであり、正常造血幹細胞の機能維持に関与することが知られている。一方、骨髄系腫瘍において TRAF6 はがん促進的にも抑制的にも機能するという paradoxical な報告が散見され、詳細な理解に至っていない。実際に、AML では TRAF6 は発現が亢進しているが、AML において TRAF6 を欠損させることで機能の検証を行った既報はなく、その意義は不明である。本研究では、AML における TRAF6 の重要性ならびに分子基盤を解明することを目的とした。

【方法】

TRAF6 をノックダウンさせたヒト AML 細胞株の細胞増殖能ならびに TRAF6 欠損 MLL-AF9 AML モデルマウスの生存期間を解析することにより、TRAF6 の AML における重要性を検証した。さらに、TRAF6 ノックダウン白血病細胞株とヒト AML 細胞のデータベースを用いて、TRAF6 が遺伝子発現に与える影響を網羅的に解析した。また、フローサイトメーターを用いたミトコンドリア膜電位測定、細胞外フラックスアナライザーを用いた呼吸能測定、およびメタボローム解析により、TRAF6 によるミトコンドリア機能ならびに代謝制御を網羅的に評価した。さらに TRAF6 を介した代謝制御に関連する遺伝子についてリストアップし、その意義を検討した。

【結果】

1. TRAF6 は AML の疾患維持に重要である

TRAF6 をノックダウンさせた各種 AML 細胞株は有意に細胞増殖能が低下し、MLL-AF9 AML モデルマウスの生存期間解析では、TRAF6 ノックアウト群で有意に生存期間が延長した(図 1)。以上より、AML において TRAF6 はがん遺伝子として機能し、疾患の維持に重要であることが示唆された。

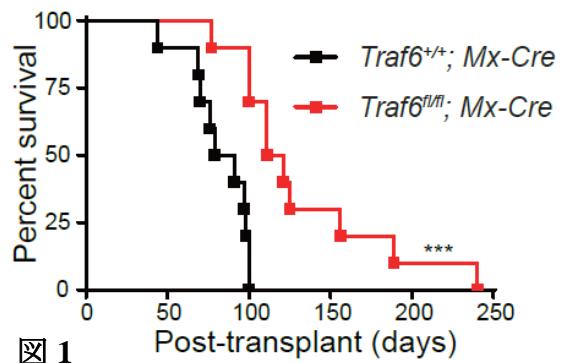
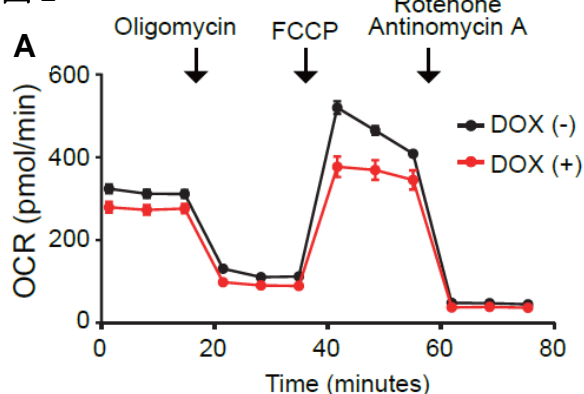


図 1

2. AML 細胞における TRAF6 発現低下により代謝経路が広範に変動する

ヒト AML データベースでは、TRAF6 の AML における発現量は、TCA 回路や電子伝達系に関与する代謝関連遺伝子群ならびにミトコンドリア関連疾患 (アルツハイマー病、ハンチントン病) 遺伝子群の発現量と逆相関がみられ、ヒト白血病細胞株に対して TRAF6 をノックダウンした際にも同様の遺伝子群の発現変化が確認された。実際、AML 細胞における TRAF6 発現低下により、ミトコンドリア膜電位や呼吸能が低下し(図 2)、メタボローム解析では解糖系、TCA サイクル、核酸代謝それぞれの経路における中間産物の低下といった広範な代謝経路の変動が判明した(図 3)。さらに、核酸代謝産物の低下を反映し、DNA 合成期 (S 期) の細胞が減少した。以上を総合し、AML 細胞における TRAF6 発現の低下により、広範な代謝経路の変動を伴い細胞

図 2



B

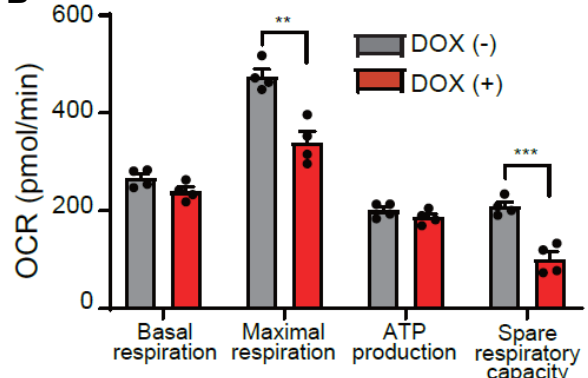
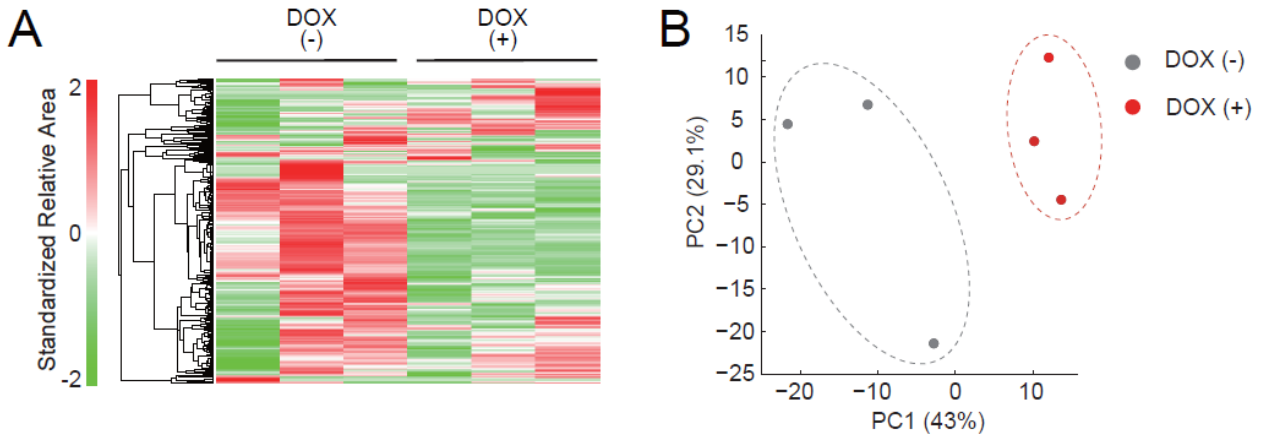


図 3



増殖能が低下することが示された。

3. AML において TRAF6 と OGT の発現は相関する

TRAF6 による代謝制御維持に関連する遺伝子の探索のため、白血病細胞株 HEL で TRAF6 をノックダウンした際に発現低下する遺伝子群と、マウス白血病の維持・発症に重要な遺伝子群 (Yamauchi et al. Cancer Cell. 2018) で共通する遺伝子をリストアップし、代謝に関与する遺伝子として O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) を標的タンパク質に転移させる O-GlcNAc 転移酵素 (OGT) に注目した。各種 AML 細胞株およびヒト AML データベースとともに TRAF6 の発現と OGT の発現は相関しており、OGT 高発現の AML は OGT 低発現群と比較して有意に生存期間が短縮している点から、OGT も TRAF6 と同様に AML の維持に重要であると考えられた。実際に AML 細胞株に対して OGT のノックダウンを行うことで、AML 細胞の増殖能は有意に低下した。さらに、AML 細胞株に OGT 阻害薬 OSMI-1 を添加すると、細胞増殖能の低下に加えてミトコンドリア呼吸能低下といった TRAF6 発現低下時と類似した表現型を呈し、TRAF6 と OGT の関連性を支持する結果となった。

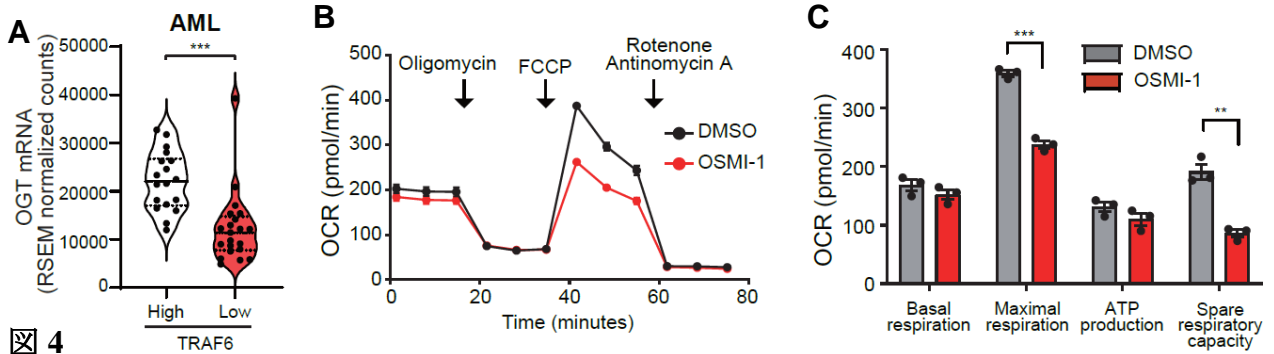


図 4

4. AML 細胞における TRAF6 発現低下の効果は OGA 阻害により減弱する

TRAF6 発現低下による代謝制御変化と増殖能低下が、O-GlcNAc 修飾を介したのか検証するために、TRAF6 ノックダウン白血病細胞株における OGT 強制発現による検証を実施した。しかしながら、OGT 強制発現は、TRAF6 ノックダウンによる細胞増殖能低下をむしろ増強した。このことは、O-GlcNAc 修飾の白血病機能における繊細な制御を示唆している。そこで、O-GlcNAc 修飾は、OGT の他に除去酵素である O-GlcNAcase (OGA)

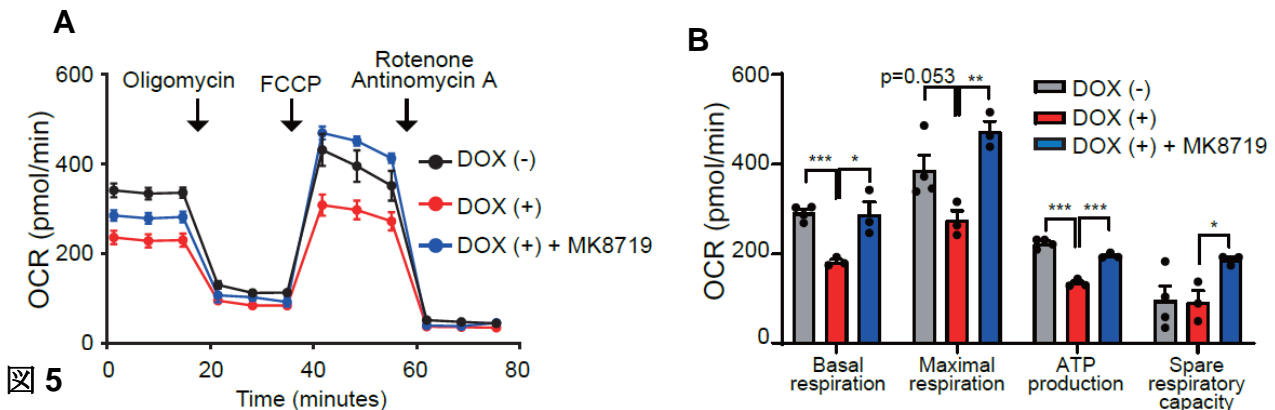


図 5

の両方で精巧に維持されていることを鑑みて、OGA を阻害することで TRAF6 ノックダウン白血病細胞の表現型回復を試みた。TRAF6 ノックダウン AML 細胞に OGA 阻害薬 MK-8719 を加えると、細胞増殖能、ミトコンドリア呼吸能が回復した(図 5)。以上より、OGA の阻害により、AML 細胞における TRAF6 発現低下による影響が OGA の阻害により減弱することが示され、TRAF6 を介した O-GlcNAc 修飾制御が白血病進展に重要である可能性が示唆された。

【考察】

AML は高い増殖能を維持するため、代謝調節をリプログラミングしていることが報告されている。本研究では TRAF6 の発現低下により AML 細胞の広範な代謝中間産物が減少した点から、TRAF6 が代謝リプログラミングの制御に関与していると考えられた。また、これらの代謝経路の多岐にわたる制御酵素が O-GlcNAc 修飾の候補タンパク質であり、TRAF6 を介した各種代謝酵素における O-GlcNAc 修飾が、AML 細胞における代謝リプログラミングに重要な役割を果たしていると考えられた(図 6)。

【結論】

TRAF6 による代謝制御が AML の疾患進行に寄与することが示されるとともに、そのメカニズムにおける O-GlcNAc 修飾の関与が示唆された。

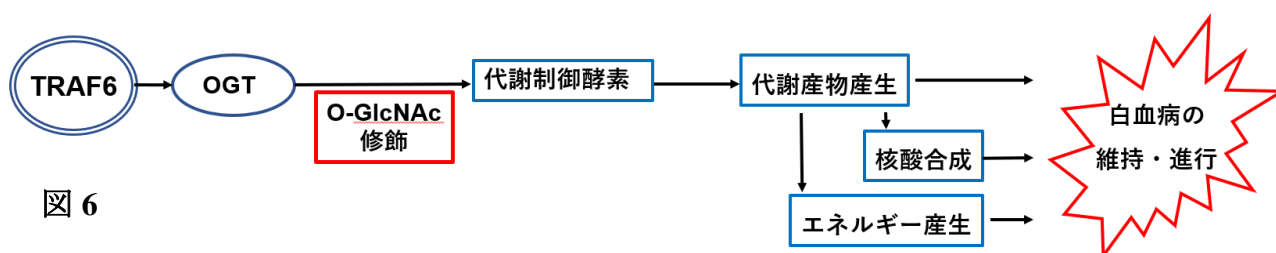


図 6