

## 成人T細胞白血病におけるAMPK標的薬の抗白血病効果

特定チーム（課題番号：147303）

研究期間：平成26年7月29日～平成27年3月31日

研究代表者：相川晃慶

### 【背景】

成人T細胞白血病（ATL）は、ヒトT細胞白血病ウイルス1型（HTLV-1）が主にCD4陽性T細胞に感染後、数十年の潜伏期を経て発症する難治性のウイルス発がんである<sup>1)</sup>。HTLV-1感染者は九州・沖縄地方に多く、全国に約108万人、世界では1000～2000万人いると推定されており、その約5%のキャリアがATLを発症する<sup>2)</sup>。ATLは白血病とリンパ腫の両方の性質を有しており、悪性リンパ腫の病期分類が適応できない。そのため、ATLはShimoyamaらの報告に従って、臨床病態の特徴から、急性型、リンパ腫型、慢性型、くすぶり型の4つの病型に分類されている<sup>3)</sup>。特に急性型およびリンパ腫型の生存期間中央値は1年未満と予後が悪く、早急に治療を行う必要がある<sup>4)</sup>。

ATLの治療法には、抗悪性腫瘍薬を組み合わせた化学療法と造血幹細胞移植がある。化学療法はmLSG15療法をはじめ、様々な治療プロトコルが実施されているが、化学療法に抵抗性を示す場合が多く、寛解後に再発する例も少なくない。一方、造血幹細胞移植は寛解する確率が高いとされているが、拒絶反応や治療に関連する致死的なリスクが高いなどの問題が多く残されている。近年、ATL腫瘍細胞表面にあるケモカイン受容体CCR4を標的とするモガムリズマブがATL治療に使用されているが、皮膚障害や免疫低下などの問題があることから、ATLに対する効果的な治療法を確立することが急務となっている。

AMP活性化プロテインキナーゼ（AMPK）は、細胞内のエネルギー恒常性を司る重要な因子である。触媒作用を持つ $\alpha$ サブユニット（AMPK $\alpha$ ）と、調節作用を持つ $\beta$ と $\gamma$ サブユニットから構成され、低グルコースや低酸素状態、虚血、あるいは熱ショックなどによるAMP/ATP比の増加に伴い、AMPK $\alpha$ のThr172がリン酸化されることで活性化される<sup>5)</sup>。近年、AMPKはエネルギー代謝や糖尿病などの生活習慣病のみならず、セリン・ス

レオニンキナーゼ mammalian target of rapamycin や長寿遺伝子産物SIRT1を介して細胞増殖や腫瘍化に関与することが明らかになっている<sup>6)</sup>。

AMPKは生活習慣病の治療標的として研究が行われてきた。その歴史において、AMPK活性が変化した際の影響を解析するために様々なAMPK標的薬が使用されている。なかでも、阻害剤であるCompound C、活性化剤であるAICARやピグアナイド系薬物は特に多くの研究において使用されている。Compound CはDorsomorphinとも呼ばれており、ATPと競合することによってAMPKを阻害する<sup>7)</sup>。一方、5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside（AICAR）は細胞膜透過性のAMPアナログである。AICARは細胞内に入ると、アデノシンキナーゼによってリン酸化され、5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside -5'-monophosphateに代謝されてAMPKを活性化することが知られている<sup>8)</sup>。Metforminはピグアナイド系薬物の1種であり、2型糖尿病の治療薬として広く使用されている。MetforminはAMP/ATP比を増大させてAMPKを活性化し、GLUT4の細胞膜表面への移行を促進し、グルコースの細胞への取り込みを増加させることが報告されている<sup>9)</sup>。

この3つの薬剤について、Compound Cは大腸がん細胞<sup>10)</sup>、AICARは神経膠芽腫の増殖を抑制し<sup>11)</sup>、ピグアナイド系薬物の一つであるMetforminを服用している糖尿病患者ではがんリスクが低下することが報告されている<sup>12,13)</sup>。しかし、ATLをはじめとする白血病におけるAMPKの役割、およびAMPKを標的とする薬剤がどのような影響を与えるのか十分に明らかになっていない。そこで、本研究ではAMPK阻害剤であるCompound C、ならびにAMPK活性化剤であるAICARおよびMetforminがATL細胞に及ぼす影響について検討を行った。

## 【方法】

生体におけるAMPK発現量の評価のために、急性型ATL患者およびHTLV-1非感染者由来末梢血単核球を用いた。急性型ATL患者およびHTLV-1非感染者の全血からFicollを用いた密度勾配遠心法によって末梢血単核球を分離した。in vitro評価系にはHTLV-1感染細胞株としてMT-2細胞およびSIT細胞を用いた。MT-2細胞は国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所JCRB細胞バンクから入手した。細胞生存率は生細胞数測定試薬SF（ナカライテスク）を添加後、吸光度を測定し算出した。アポトーシス細胞はAnnexin V-FITCおよび7-Amino-Actinomycin Dを指標としたFlow cytometry法によって検出した。タンパクの変化についてWestern blot法を用いて解析した。

## 【結果・考察】

### ①ATL患者におけるAMPKの発現

急性型ATL患者およびHTLV-1非感染者の末梢血単核球におけるAMPKタンパク量をWestern blot法によって確認を行ったところ、急性型ATL患者はHTLV-1非感染者と比較してAMPKタンパク量が多かった。一方、AMPKの活性化の指標であるAMPK  $\alpha$  T172リン酸化レベルには差が見られなかった。この結果から、AMPKはATL細胞の生存または増殖に関与している可能性が考えられた。また、AMPK  $\alpha$  T172リン酸化レベルにおいて差が見られなかったことから、ATL細胞ではAMPKの活性のバランスが重要なのではないかと考えた。

### ②Compound C

Compound C がHTLV-1感染細胞株であるMT-2細胞およびSIT細胞にどのような影響を及ぼすか検討を行った。MT-2細胞およびSIT細胞をCompound Cで24時間処理したところ、濃度依存的に生存率の低下がみられた。また、Western blot法を用いてタンパクの変化について確認したところ、AMPKとAMPKの基質であるAcetyl-CoA Carboxylase (ACC) のリン酸化はともに減少していた。この結果から、HTLV-1感染細胞株において、Compound CはAMPKの活性を阻害していることが確認できた。

次に、Compound CによるHTLV-1感染細胞株の生存率低下がアポトーシスによるか確認するため、Flow cytometry法によってアポトーシス細胞を検出した。Compound Cで24時間処理したMT-2細胞およびSIT細胞は、ともに濃度依存的なアポトーシス細胞の増加がみられた。また、アポトーシスの指標となるCaspase3の開裂をWestern blot法によって確認したところ、

Compound C処理によってCaspase3の開裂と、その基質であるPARPの分解がみられた。この結果はCompound CがHTLV-1感染細胞株においてCaspase3を介したアポトーシスを誘導することを示唆する。

さらに、Compound Cによる細胞死がAMPK活性の阻害によるものか確認するため、AMPK直接活性化剤であるA-769662とCompound Cを同時処理したときの影響について検討した。A-769662でMT-2細胞およびSIT細胞を24時間処理したところ、AMPKのリン酸化が増加した。また、A-769662はHTLV-1感染細胞株の生存率を低下させなかった。Compound CとA-769662の同時処理したSIT細胞では、Compound C 単独処理したものと比較して、AMPKのリン酸化が増加していたにもかかわらず、生存率は回復しなかった。この結果から、Compound CによるアポトーシスはAMPK活性の阻害によるものではない可能性が示唆された。

### ③AICAR

AMPKの活性化剤として知られるAICARが、HTLV-1感染細胞株にどのような影響を及ぼすか検討を行った。AICARで処理したMT-2細胞およびSIT細胞は、24時間では生存率に変化はみられなかったが、48時間以降において濃度依存的な生存率の低下がみられた。また、AMPKの活性化剤であるにもかかわらず、AMPKおよびACCのリン酸化は減少していた。

次に、AICARによるHTLV-1感染細胞株の生存率低下がアポトーシスによるか確認するため、Flow cytometry法によってアポトーシス細胞を検出した。AICARで処理したMT-2細胞、SIT細胞ともに、48時間以降においてアポトーシス細胞の増加がみられた。また、Caspase3の開裂をWestern blot法によって確認したところ、MT-2細胞、SIT細胞ともに、AICAR処理によってCaspase3の開裂と、PARPの分解がみられた。この結果はAICARがHTLV-1感染細胞株においてCaspase3を介したアポトーシスを誘導することを示唆する。

近年、AICARはT細胞には影響を与えずに、B細胞由来の慢性リンパ球性白血病細胞のアポトーシスを誘導することが報告されている<sup>14)</sup>。今回の結果とあわせて考慮すると、AICARは正常なT細胞には影響を与えず、ATL細胞特異的にアポトーシスを誘導すると考えられる。これは、HTLV-1によってT細胞の性質が変異したためと推察されるが、詳細は今後明らかにする必要がある。

### ④Metformin

AMPKの活性化剤として知られるMetforminが、HTLV-1感染細胞株にどのような影響を及ぼすか検討を行った。MT-2細胞およびSIT細胞をMetforminで処理したところ、48時間以降において生存率の低下がみられ

た。また、AICARと同様に、AMPKおよびACCのリン酸化は減少していた。

次に、Metforminによる細胞生存率の低下がオートファジーによるものか確認するため、Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B (LC3) の変化についてWestern blot法を用いて観察した。LC3は細胞質で合成された後すぐにAtg4によってC末端を切断されLC3-Iとなる。さらにAtg7、Atg3が順次作用し、C末端グリシンにphosphatidylethanolamineが共有結合することによってLC3-IIとなる。オートファゴソーム形成が促進するとLC3-IからLC3-IIに変化することため、オートファジーの指標として有用である<sup>15,16)</sup>。MT-2細胞およびS1T細胞をMetforminで処理したところ、48時間以降においてLC3-Iは減少しLC3-IIの割合が増加した。また、3-メチルアデニン(3-MA)は細胞透過性のクラスIII PI 3-キナーゼを阻害することから、オートファジー阻害剤として使用される<sup>17)</sup>。S1T細胞を3-MAで前処理したところ、Metforminによる細胞生存率の低下は減弱された。この結果から、MetforminはHTLV-1感染細胞株においてオートファジーを介して細胞死を誘導する可能性が示唆された。

#### 【まとめ】

今回使用したCompound C、AICARおよびMetforminは、アポトーシスまたはオートファジーを誘導することによってHTLV-1感染細胞株の生存率を低下させることが明らかとなった。また、AMPK直接活性化剤であるA-769662の結果から、Compound C、AICARおよびMetforminはAMPKの活性とは無関係にHTLV-1感染細胞株の細胞死を誘導する可能性が示唆された。今後、さらに詳細な作用機序を明らかにすることで、Compound C、AICARおよびMetforminは新規のATL治療や発症の予防の選択肢となり得ると考えられる。

#### 【付記】

本報告は、日本薬学会第135年会(2015年、神戸)にて発表された「Compound C、AICARおよびMetforminはHTLV-1感染細胞株の細胞死を誘導する」の内容に追加したものである。

#### 【謝辞】

本研究を行うにあたり、貴重な検体の分与等、多大なご協力とご指導を賜りました鹿児島大学大学院医学総合研究科難治ウイルス病態制御学血液・免疫疾患研究分野の有馬直道教授ならびに吉満誠准教授に厚く御礼申し上げます。また、本研究の一部は、福岡大学研究推進

部の研究経費によるものである。(課題番号:146006、147303)

#### 【研究業績】

##### 学会発表

- 1) 相川晃慶、小迫知弘、横松恵里佳、吉満誠、有馬直道、坂田晃、本田伸一郎、添田泰司、HTLV-1感染細胞株に対するCompound C、AICARおよびMetforminによるHTLV-1感染細胞株の増殖抑制効果、第31回日本薬学会九州支部大会、2014年12月6日、福岡
- 2) 相川晃慶、小迫知弘、横松恵里佳、吉満誠、有馬直道、坂田晃、本田伸一郎、添田泰司、Compound C、AICARおよびMetforminはHTLV-1感染細胞株の細胞死を誘導する、日本薬学会第135年会、2015年3月28日、神戸

#### 【引用文献】

- 1) Jun-ichirou Yasunaga, Tatsunori Sakai, Kisato Nosaka, Ken-ichiro Etoh, Sadahiro Tamiya, Shin Koga, Shuji Mita, Makoto Uchino, Hiroaki Mitsuya, and Masao Matsuoka. "Impaired production of naive T lymphocytes in human T-cell leukemia virus type I-infected individuals: its implications in the immunodeficient state." BLOOD-NEW YORK-97.10 (2001) : 3177-3183.
- 2) Satake, Masahiro, Kazunari Yamaguchi, and Kenji Tadokoro. "Current prevalence of HTLV - 1 in Japan as determined by screening of blood donors." Journal of medical virology 84.2 (2012) : 327-335.
- 3) Masanori Shimoyama. "Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T - cell leukaemia - lymphoma." British journal of haematology 79.3 (1991) : 428-437.
- 4) Hiroo Katsuya, Kenji Ishitsuka, Atae Utsunomiya, Shuichi Hanada, Tetsuya Eto, Yukiyo Moriuchi, Yoshio Saburi, Takeharu Yamanaka, Junji Suzumiya, Kazuo Tamura. "A nationwide survey of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) newly diagnosed over the last decade in Japan." ANNALS OF ONCOLOGY. Vol. 23. GREAT CLARENDON ST, OXFORD OX2 6DP, ENGLAND: OXFORD UNIV PRESS, 2012.
- 5) Hardie, D. Grahame, Fiona A. Ross, and Simon A. Hawley. "AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis." Nature reviews Molecular cell biology 13.4 (2012) : 251-262.
- 6) Zhang, Bei B., Gaochao Zhou, and Cai Li. "AMPK:

- an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome.” *Cell metabolism* 9.5 (2009) : 407-416.
- 7) Benoit Viollet, Sandrine Horman, Jocelyne Leclerc, Louise Lantier, Marc Foretz, Marc Billaud, Shailendra Giri, and Fabrizio Andreelli. “AMPK inhibition in health and disease.” *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 45.4 (2010) : 276-295.
- 8) Hideyuki Sakoda, Takehide Ogihara, Motonobu Anai, Midori Fujishiro, Hiraku Ono, Yukiko Onishi, Hideki Katagiri, Miho Abe, Yasushi Fukushima, Nobuhiro Shojima, Kouichi Inukai, Masatoshi Kikuchi, Yoshitomo Oka, Tomoichiro Asano. “Activation of AMPK is essential for AICAR-induced glucose uptake by skeletal muscle but not adipocytes.” *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 282.6 (2002) : E1239-E1244.
- 9) Gaochao Zhou, Robert Myers, Ying Li, Yuli Chen, Xiaolan Shen, Judy Fenyk-Melody, Margaret Wu, John Ventre, Thomas Doebber, Nobuharu Fujii, Nicolas Musi, Michael F. Hirshman, Laurie J. Goodyear and David E. Moller. “Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action.” *Journal of clinical investigation* 108.8 (2001) : 1167.
- 10) Weng-Lang Yang, William Perillo, Deanna Liou, Philippe Marambaud and Ping Wang “AMPK inhibitor compound C suppresses cell proliferation by induction of apoptosis and autophagy in human colorectal cancer cells.” *Journal of surgical oncology* 106.6 (2012) : 680-688.
- 11) Deliang Guo, Isabel J. Hildebrandt, Robert M. Prins, Horacio Soto, Mary M. Mazzotta, Julie Dang, Johannes Czernin, John Y.-J. Shyy, Andrew D. Watson, Michael Phelps, Caius G. Radu, Timothy F. Cloughesy and Paul S. Mischel “The AMPK agonist AICAR inhibits the growth of EGFRvIII-expressing glioblastomas by inhibiting lipogenesis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.31 (2009) : 12932-12937.
- 12) Josie M M Evans, Louise A Donnelly, Alistair M Emslie-Smith, Dario R Alessi, Andrew D Morris. “Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients.” *Bmj* 330.7503 (2005) : 1304-1305.
- 13) Gillian Libby, Louise A. Donnelly, Peter T. Donnan, Dario R. Alessi, Andrew D. Morris, and Josie M.M. Evans. “New Users of Metformin Are at Low Risk of Incident Cancer A cohort study among people with type 2 diabetes.” *Diabetes care* 32.9 (2009) : 1620-1625.
- 14) Antonio F. Santidrián, Diana M. González-Gironès, Daniel Iglesias-Serret, Llorenç Coll-Mulet, Ana M. Cosialls, Mercè de Frias, Clara Campàs, Eva González-Barca, Esther Alonso, Verena Labi, Benoit Viollet, Adalberto Benito, Gabriel Pons, Andreas Villunger, and Joan Gil. “AICAR induces apoptosis independently of AMPK and p53 through up-regulation of the BH3-only proteins BIM and NOXA in chronic lymphocytic leukemia cells.” *Blood* 116.16 (2010) : 3023-3032.
- 15) Mizushima, Noboru, and Tamotsu Yoshimori. “How to interpret LC3 immunoblotting.” *Autophagy* 3.6 (2007) : 542-545.
- 16) Yukiko Kabeya, Noboru Mizushima, Takashi Ueno, Akitsugu Yamamoto, Takayoshi Kirisako, Takeshi Noda, Eiki Kominami, Yoshinori Ohsumi, Tamotsu Yoshimori. “LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing.” *The EMBO journal* 19.21 (2000) : 5720-5728.
- 17) You-Tong Wu, Hui-Ling Tan, Guanghou Shui, Chantal Bauvy, Qing Huang, Markus R. Wenk, Choon-Nam Ong, Patrice Codogno and Han-Ming Shen. “Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase.” *Journal of Biological Chemistry* 285.14 (2010) : 10850-10861.