

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15392

研究課題名（和文）概日リズム制御分子を標的とした新規白血病治療薬の開発

研究課題名（英文）Development of Novel Leukemia Therapeutics Targeting Circadian Rhythm Regulatory Molecules

研究代表者

木村 朋子（兵田朋子）（Kimura, Tomoko）

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：20632772

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）：新規化合物で概日リズム調節因子を抑制すると、ヒト及びマウスの血液腫瘍細胞株において増殖抑制効果があり、白血病マウスの脾臓・骨髄において概日リズムの消失や延長が認められた。遺伝子発現解析では、ミトコンドリア機能関連因子が有意に低下していた。白血病細胞のミトコンドリア機能を低下させることで、代謝抑制や増殖抑制が誘導され、抗腫瘍効果が引き起こされている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

地球上に生息するほぼすべての生物が有する概日リズムは、様々な疾患の発病との関連が報告されている。我々は概日リズム調節因子を抑制する新規化合物が、抗白血病効果を持つことを示し、概日リズムと急性骨髄性白血病（AML）を直接関連付ける新たな作用機序の一端を解明した。現在使用されている抗がん剤とは異なる作用点を持つ、より選択性の高い抗白血病治療薬となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In human and mouse hematologic tumor cell lines, inhibition of circadian rhythm regulators with the new compound had a growth inhibitory effect and loss or prolongation of circadian rhythm was observed in the spleen and bone marrow of leukemic mice. Gene expression analysis showed that factors related to mitochondrial function were significantly decreased. It was suggested that the anti-tumor effect may be caused by induction of metabolic and proliferative inhibition by reducing mitochondrial function in leukemia cells.

研究分野：血液検査学

キーワード：概日リズム 急性白血病 CK2 ミトコンドリア代謝

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

地球上に生息するほぼすべての生物は、体内に正確に時間を刻む概日リズムを有しており、この異常は、睡眠障害、がんや生活習慣病、精神疾患等の発病と関連がある。概日リズムの混乱により様々な癌の発生率が増加することが示されているが、最近の報告で、概日リズム調節因子が、急性骨髄性白血病 (AML) 細胞の増殖に影響を及ぼすことが明らかになった。AML は骨髄芽球の分化障害、異常増殖により発症する難治性の疾患である。概日リズム調節因子の抑制は、がん幹細胞の増殖抑制や分化を誘導し、抗白血病効果を生み出すことが期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、概日リズム調節因子の抑制が、腫瘍細胞の増殖抑制と正常造血の促進などを引き起こし、抗白血病効果につながるか解明することである。我々は網羅的スクリーニングによって概日リズム調節因子を修飾する化合物を特定し、抗腫瘍効果を証明する。現在使用されている抗がん剤とは異なる作用点を持つ、より安全かつ選択的毒性の高い新規白血病治療薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

小分子化合物スクリーニングによって得られた概日リズムの主要調節因子の活性を修飾する化合物を、ヒト及びマウスの血液腫瘍細胞株とマウス正常造血細胞に作用させ、*in vitro* における抗腫瘍効果を検討する。また、CRISPR/Cas9 によって標的因子をノックアウトし、それらの変化が特異的か、もしくはオフターゲット効果によるものかを解析する。

臨床応用へのステップとして、時計遺伝子 Per2-ルシフェラーゼ (Luc) を発現する MLL-AF9 白血病マウスモデルを作成する。白血病マウスにおける概日リズムの変化を観察し、化合物処理により Per2 発現の日内変動の有無やリズムの発振効果へ影響はあるかを解析する。さらに、ヒト血液腫瘍細胞株に化合物を作用させ、遺伝子発現解析を用いて概日リズムへ作用するメカニズム解明に取り組む。

4. 研究成果

(1) *in vitro* における抗腫瘍効果

候補の化合物の内、時計遺伝子 PER 及び CRY の発現を調節する BMAL 遺伝子の発現を制御する Casein kinase2 α (CK2 α) を抑制する G0289 は、ヒト及びマウス血液腫瘍細胞株 K562 (ヒト慢性骨髄性白血病) OCI-AML3 (ヒト急性骨髄性白血病) MDS-L (ヒト骨髄異形成症候群) 5TGM1 (マウス骨髄腫) において増殖抑制効果が認められた (図1)。マウス正常造血前駆細胞 (LSK) への増殖抑制はほとんど認められなかった。

CRISPR/Cas9 によって、OCI-AML 細胞株における CK2 α ノックアウトを行うと、control に比べ有意に増殖抑制が引き起こされ、また細胞質の空胞増加、核形不整などの形態変化も認められた。G0289 は CK2 を標的因子とし、増殖抑制を引き起こしていることが示唆された。

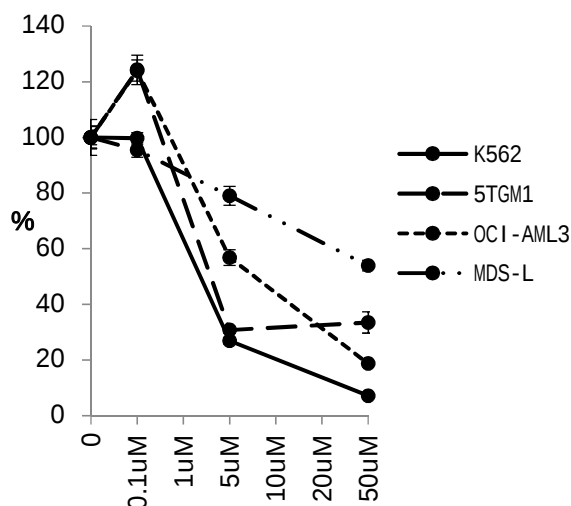


図1 G0289処理による細胞増殖抑制

(2) MLL-AF9 白血病マウスモデルにおける概日リズムの変化の観察

時計遺伝子 per2-ルシフェラーゼを発現する造血前駆細胞にレトロウイルスで MLL-AF9 を導入した白血病マウスを作製し、G0289 の白血病細胞への効果を検討した。Per2 :: Luc レポーターマウス由来の WT 骨髄細胞を移植した対照マウスと比較して、MLL-AF9 白血病マウスにおいて脾臓及び骨髄抽出物のリズムが著しく消失し (図 2a, b) G0289 処理において概日リズムの周期延長 (図 2d) が認められた。さらに、G0289 は LSK に比べ、MLL-AF9 白血病細胞の増殖を有意に減少させた (図 2c)。ヒト AML 細胞株も G0289 に対して感受性であったことから、G0289 が白血病細胞の増殖を特異的に阻害することを証明した。

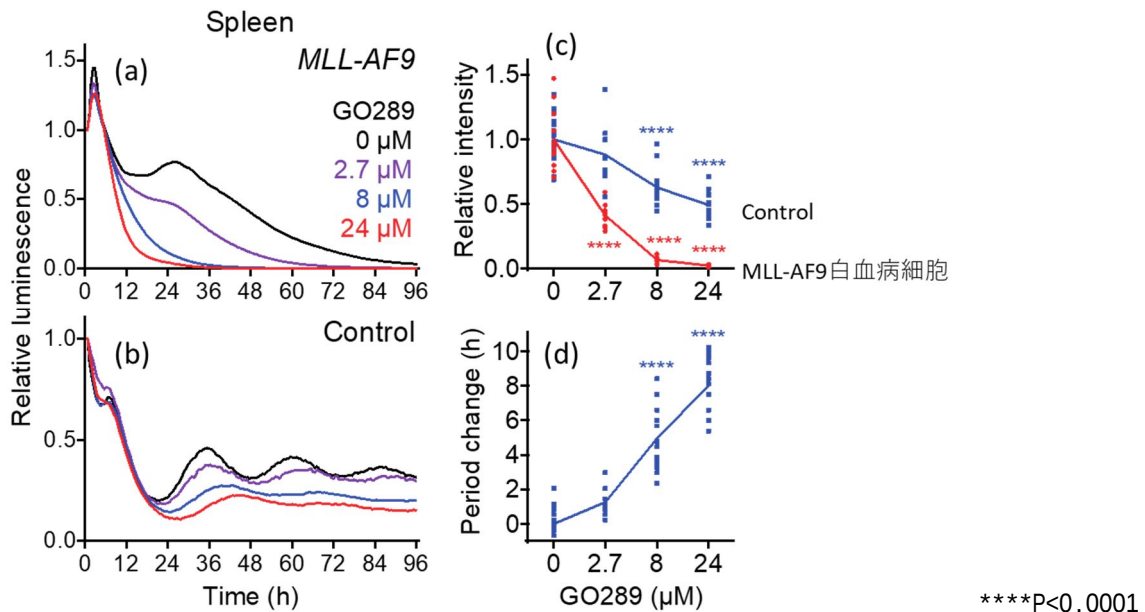


図2 (a) マウス脾臓白血病細胞における概日リズム (上から GO289 0 μM、2.7 μM、8 μM、24 μM 処理後) (b) 対象マウスの脾臓細胞における概日リズム (同上) (c) マウス control 細胞及び白血病細胞における GO289 の増殖抑制効果、(d) GO289 処理における概日リズムの周期変化

(3) 代謝関連因子に着目したメカニズム解明

白血病マウスの骨髄細胞をコントロール細胞 () と白血病細胞 () に分別し、ミトコンドリア関連因子の測定を行った。ミトコンドリア量の増加 (図 3a) ミトコンドリア ROS の増加 (図 3b) ミトコンドリア代謝に関連する因子 (12s、16s、ND1、ND2、ND3) 発現の有意な増加 (図 3c) が認められた。そこで、ヒト AML 細胞株において細胞代謝能を相対的に評価したところ、GO289 処理で解糖系、ミトコンドリア代謝能共に低下し、低代謝状態になることが認められた (図 3d)。概日リズムと白血病を繋ぐメカニズムにミトコンドリア代謝が深く関わっていると考えられ、より詳細な遺伝子発現解析を行った。Pathway 解析では、ミトコンドリア関連の pathway (mitochondrial translation など) が多く変動しており、エンリッチメント解析では、ミトコンドリア機能に関連する因子が有意に低下していることが認められた (図 3e)。

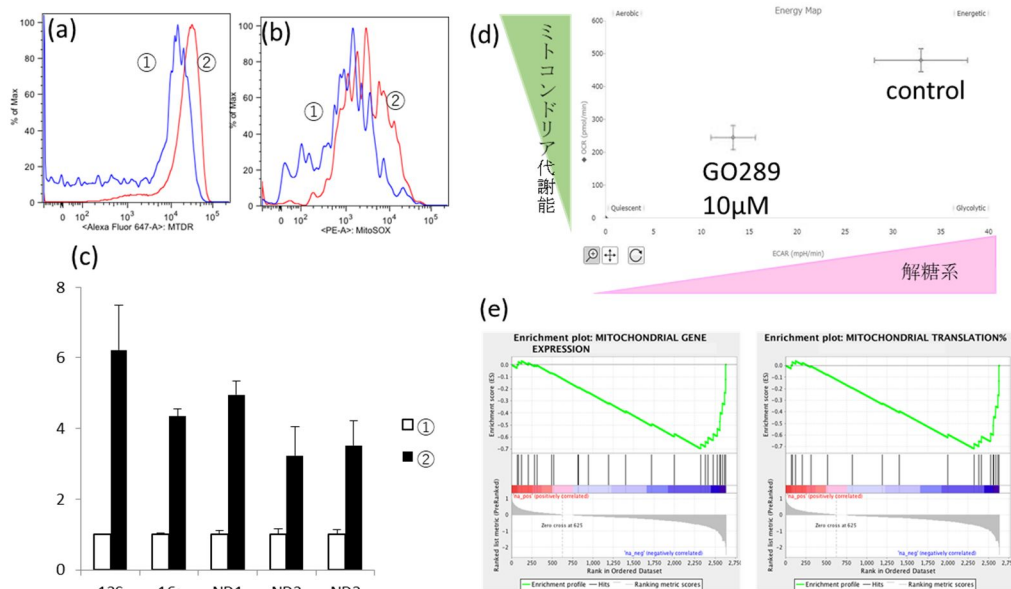


図3 ヒト及びマウス白血病細胞における代謝関連因子発現解析

概日リズム調節因子 CK2α の新規阻害薬 GO289 は、白血病細胞特異的に概日リズムを障害し、増殖抑制を引き起こすこと、白血病細胞のミトコンドリア機能を低下させることで、代謝を抑制すること、ミトコンドリア機能抑制によって白血病細胞の増殖抑制が引き起こされることが認められ、既存の CK2 阻害剤より選択性の高い抗白血病治療薬となる可能性が示唆された。

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 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1 . 著者名 Oshima Tsuyoshi, Niwa Yoshimi, Kuwata Keiko, Srivastava Ashutosh, Hyoda Tomoko, Tsuchiya Yoshiki, Kumagai Megumi, Tsuyuguchi Masato, Tamaru Teruya, Sugiyama Akiko, Ono Natsuko, Zolboot Norjin, Aikawa Yoshiki, Oishi Shunsuke, Nonami Atsushi, Arai Fumio, Hagihara Shinya, Yamaguchi Junichiro, Tama Florence, et al	4 . 巻 5
2 . 論文標題 Cell-based screen identifies a new potent and highly selective CK2 inhibitor for modulation of circadian rhythms and cancer cell growth	5 . 発行年 2019年
3 . 雑誌名 Science Advances	6 . 最初と最後の頁 eaau9060
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.aau9060	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

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 Tomoko Hyoda, Yuya Kunisaki, Kentaro Hosokawa, Tsuyoshi Hirota, Kazuhito Gotoh, Daiki Setoyama, Dongchon Kang, Fumio Arai
2 . 発表標題 The circadian modulating drug exhibits an anti leukemia effect through the mitochondrial oxidation
3 . 学会等名 第80回日本血液学会
4 . 発表年 2018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
研究協力者	新井 文用 (Arai Fumio)		
研究協力者	廣田 毅 (Hirota Tsuyoshi)		

6．研究組織（つづき）

	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
研究協力者	國崎 祐哉 (Kunisaki Yuya)		
研究協力者	細川 健太郎 (Hosokawa Kentaro)		

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
---------	---------