

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08851

研究課題名(和文) 脱アシル化酵素サーチュインを標的とした新規白血病治療法の開発

研究課題名(英文) Novel small-molecule sirtuin inhibitors induce cell death in leukemia cells

研究代表者

小迫 知弘 (Kozako, Tomohiro)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号：40398300

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)：成人T細胞白血病(ATL)患者のほとんどは治療抵抗性を示し、特に急性型のほとんどの患者が発病後1年以内に死亡し予後不良である。従って、腫瘍細胞の増殖を効果的に抑制するような、新規作用機序の薬剤によるATL治療法の確立が、焦眉の急となっている。我々が合成した新規SIRT2阻害剤は、ATL細胞を細胞死に導いた。また、SIRT1活性化剤のSRT1720はSIRT1非依存的にカスパーゼ非依存的なアポトーシス及びオートファジーを伴う細胞死を誘導し、腫瘍抑制の効果が得られることが示唆された。今後サーチュインを標的とした薬剤が、白血病治療薬の選択肢の一つとなることができるよう、研究開発を継続していきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規SIRT2阻害剤およびSRT1720がオートファジー細胞死を誘導することから、両薬剤の新たな細胞死の作用機序が明らかとなった。また、ATLモデルマウスにおいて、SRT1720は腫瘍量を有意に減少させた。興味深いことにSRT1720はSIRT1ノックダウン細胞においても細胞死を誘導したことから、SRT1720はSIRT1非依存的な経路で抗腫瘍効果を示すことが示唆された。我々が合成した新規SIRT2阻害剤およびSRT1720をはじめとするサーチュインを標的とした薬剤が、白血病治療薬の選択肢の一つとなることができるよう、研究開発を継続していきたい。

研究成果の概要(英文)：Adult T-cell leukemia (ATL) patients are refractory to treatment, and most acute-type patients die within 1 year of onset and have a poor prognosis. Therefore, the establishment of an ATL treatment method using a drug with a novel mechanism of action that effectively suppresses the growth of tumor cells is urgently needed. The novel SIRT2 inhibitor we synthesized led to cell death of ATL cells. It was also suggested that SRT1720 induces SIRT1-independent, caspase-independent apoptosis and cell death with autophagy, and has a tumor-suppressing effect. In the future, we would like to continue research and development so that drugs targeting sirtuins can become one of the options for leukemia treatment drugs.

研究分野：腫瘍薬理学

キーワード：ATL エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞白血病 (ATL) は、ヒト T 細胞白血病ウイルス-1 (HTLV-1) の CD4 陽性 T 細胞への感染後、約 3~6% の HTLV-1 のキャリアが 50~60 年の長期潜伏期間を経て発症する悪性腫瘍である。高度の治療抵抗性と日和見感染症の合併により極めて予後不良の疾患である。高カルシウム血症、皮膚病変を特徴とし、急性型、リンパ腫型、くすぶり型、慢性型に分類される。近年、白血病の治療は飛躍的に進歩し、患者の生命予後が大きく改善されてきたが、ATL 患者のほとんどは治療抵抗性を示し、特に急性型のほとんどの患者が発病後 1 年以内に死亡し予後不良である (Katsuya et al. Blood 2015)。従って、腫瘍細胞の増殖を効果的に抑制するような、新規作用機序の薬剤による ATL 治療法の確立が、焦眉の急となっている。

サーチュインは、ヒストン脱アセチル化酵素 class III に分類され、ヒトでは 7 種類が存在する (SIRT1 - 7)。サーチュインは、カロリー制限により NAD⁺ 依存的に活性化され、脱アセチル化された領域の遺伝子発現を低下させることから、細胞内代謝やがん化に至るまで多くの生命機能に関与している (Bordone et al. Nat Rev Mol Cell Biol 2005)。更に近年、サーチュインはリジン残基の脱アシル化酵素として働くことが明らかとなった (Tanabe et al. Sci Rep. 2018)。故に、サーチュインの制御に関する研究は、がん治療をはじめとして長寿などの幅広い研究に有益である。これまでに申請者は、予後不良の急性型 ATL 患者において SIRT1 が高発現し、新規 SIRT1/2 阻害剤が白血病細胞増殖抑制効果を示すことを明らかにした (Kozako et al. Int J Cancer 2012, Kozako et al. Sci Rep. 2015)。更に我々は、新規 SIRT2 阻害剤が白血病細胞株の細胞死を誘導する知見を得ている (基盤研究 C : 16K09863)。

SIRT7 は低酸素かつ低グルコース環境下で増加し、低酸素誘導因子-1 (HIF-1) と相互作用して HIF-1 依存性の遺伝子発現を促す (中川宏治、基盤研究 C、24590074)。また、SIRT7 によるヒストン H3K18 の低アセチル化は発がん性形質転換に関与することから、SIRT7 阻害剤は抗がん剤として期待されている (Barber et al. Nature 2012)。しかし、SIRT7 阻害剤の合成及び抗腫瘍効果に関する報告はない。従って、サーチュインを標的とする薬剤は、癌治療応用に重要な意味を持っている。

2. 研究の目的

本研究では、新たに合成したサーチュイン阻害剤および SIRT1 活性化剤の ATL をはじめとする白血病細胞増殖抑制効果及び抗腫瘍効果を検証することにより、サーチュインを標的とした新規 ATL 及び白血病治療応用への可能性を検討する。

3. 研究の方法

ATL 患者由来細胞である S1T、HTLV-1 感染細胞株である MT2 細胞、HTLV-1 非感染細胞株である Jurkat 及び HL60 細胞を用いて、新規 SIRT2 阻害剤 (NCO-90, NCO-141) および SIRT1 活性化剤 (SRT1720) 処理後の細胞生存率を Cell Counting Kit-8 により測定した。また、Annexin V を指標とした Flow Cytometry 法によりアポトーシス細胞を測定した。更に、CytoID を指標とした Flow Cytometry 法によりオートファジー細胞を測定した。新規 SIRT2 阻害剤 (0.1-10mg/kg) および SRT1720 (0.1-10mg/kg) の ATL モデルマウスへの腹腔内投与 (週 3 回) 後、48 週齢での ATL 発症マウスの匹数及び腫瘍量を指標に、ATL の発症予防及び抗腫瘍効果を評価した。

4. 研究成果

白血病細胞株において新規 SIRT2 阻害剤および SRT1720 処理により、有意な細胞生存率の低下が認められた (Fig. 1A)。また、Annexin V を指標としたアポトーシス細胞の検出を行ったところ、各白血病細胞株においてアポトーシス細胞の割合が増加した (Fig. 1B, C)。しかし、そのアポトーシス細胞の増加は、カスパーゼ阻害剤 (z-vad-fmk) により抑制されなかったことから、カスパーゼ非依存的な細胞死が関与することが示唆された。

新規 SIRT2 阻害剤および SRT1720 処理により、Cyto-ID を指標としたオートファジー細胞が増加した。また、ウエスタンブロット法により、LC-3 の量を増加させたことから、新規 SIRT2 阻害剤および SRT1720 はアポトーシスと同時にオートファジーを誘導することが示唆された。

ATL モデルマウスにおいて、新規 SIRT2 阻害剤は腫瘍細胞の臓器浸潤を抑制したが、腫瘍体積を有意に減少させなかった。一方、SRT1720 は腫瘍量を有意に減少させた (Fig. 2)。

興味深いことに SRT1720 は SIRT1 ノックダウン細胞においても細胞死を誘導したことから、SRT1720 は SIRT1 非依存的な経路で抗腫瘍効果を示すことが示唆された。

以上の結果より、我々が合成した新規 SIRT2 阻害剤は、in vitro において白血病細胞を細胞死に導くが抗腫瘍効果を有さないことが示唆された。また、SRT1720 は SIRT1 非依存的にミト

コンドリアの機能を変化させカスパーゼ非依存的なアポトーシス及びオートファジーを伴う細胞死を誘導し、腫瘍抑制の効果が得られることが示唆された (Kozako et al. FEBS J. 2022)。今後サーチェインを標的とした薬剤が、白血病治療薬の選択肢の一つとなることができるよう、研究開発を継続していきたい。

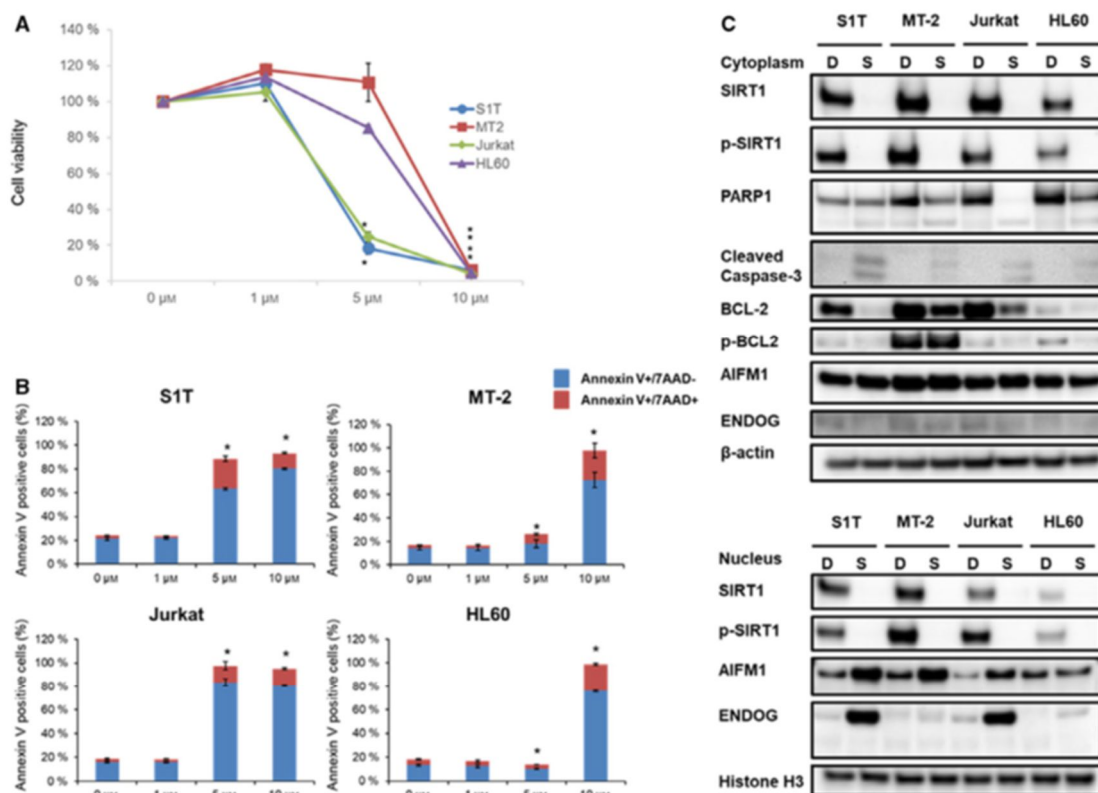


Fig. 1 SRT1720 decreases the cell viability of leukemic cell lines by enhancing apoptosis. S1T, MT-2, Jurkat, HL60 (at a density of 2×10^5 cells·mL⁻¹), and PBMCs (at a density of 1×10^6 cells·mL⁻¹) were incubated in the presence of various concentrations of SRT1720. (A) Viability of the cultured cells after 72 h was measured by Cell Count Reagent SF. Cells cultured in the absence of SRT1720 were assigned a relative viability of 100%. Data are expressed as mean \pm SD from three independent experiments. (B) Annexin V-positive cells detected as apoptotic cells that were cultured for 72 h were analyzed by flow cytometry. Data are expressed as mean \pm SD from three independent experiments. (C) S1T, MT-2, Jurkat, and HL60 cells were treated with SRT1720 (S1T, Jurkat, and HL-60, 5 μM ; MT-2, 10 μM) for 24 h. Protein concentrations of cells treated with dimethyl sulfoxide (DMSO, D) or SRT1720 (S) were detected by Western blotting with antibodies against each protein. * $P < 0.05$ vs. 0 μM . PARP1, poly (ADP-ribose) polymerase 1.

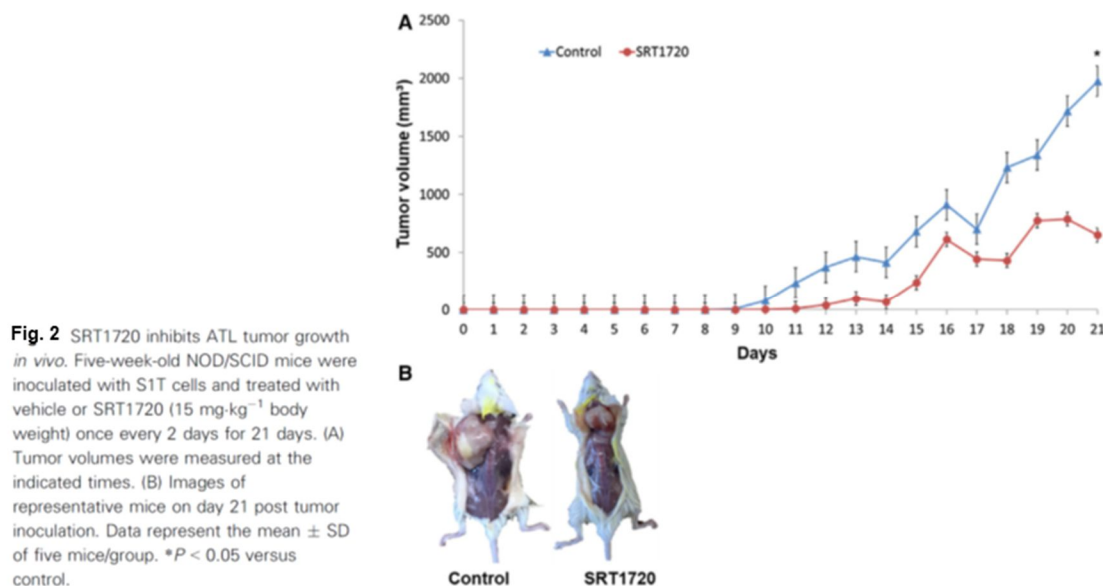


Fig. 2 SRT1720 inhibits ATL tumor growth *in vivo*. Five-week-old NOD/SCID mice were inoculated with S1T cells and treated with vehicle or SRT1720 (15 mg·kg⁻¹ body weight) once every 2 days for 21 days. (A) Tumor volumes were measured at the indicated times. (B) Images of representative mice on day 21 post tumor inoculation. Data represent the mean \pm SD of five mice/group. * $P < 0.05$ versus control.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Kozako T, Kato N, Ohsugi T, Uchida YI, Yoshimitsu M, Ishitsuka K, Higaki Y, Sato H, Aikawa A, Honda SI.	4. 巻 16353
2. 論文標題 SRT1720 induces SIRT1-independent cell death in adult T-cell leukemia/lymphoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS J.	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16353	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 Daniel J Klionsky, Amal Kamal Abdel-Aziz, Sara Abdelfatah, Mahmoud Abdellatif, Asghar Abdoli, Steffen Abel, Tomohiro Kozako, Claudine Kraft et al.	4. 巻 17
2. 論文標題 Guidelines for the Use and Interpretation of Assays for Monitoring Autophagy (4th edition)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1-382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2020.1797280	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 Nakano T, Nakamura Y, Irie K, Okano S, Morimoto M, Yamashita Y, Kozako T, Hayashi T, Honda SI, Matsuo K, Kamimura H, Ishikura H, Egawa T, Mishima K.	4. 巻 252
2. 論文標題 Antithrombin gamma attenuates macrophage/microglia activation and brain damage after transient focal cerebral ischemia in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Sci	6. 最初と最後の頁 117665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lfs.2020.117665.	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 Aikawa A, Kozako T, Uchida Y, Yoshimitsu M, Ishitsuka K, Ohsugi T, Honda SI.	4. 巻 287
2. 論文標題 Cell death induced by dorsomorphin in adult T-cell leukemia/lymphoma is AMPK-independent.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS J.	6. 最初と最後の頁 4005-4015
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.15239.	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 Kozako T, Aikawa A, Ohsugi T, Uchida YI, Kato N, Sato K, Ishitsuka K, Yoshimitsu M, Honda SI.	4. 巻 865
2. 論文標題 High expression of NAMPT in adult T-cell leukemia/lymphoma and anti-tumor activity of a NAMPT inhibitor.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur J Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 172738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2019.172738.	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 Tomohiro Kozako, Takeo Ohsugi, Yu-ichiro Uchida, Makoto Yoshimitsu, Kenji Ishitsuka, Naho Kato, Keisuke Sato, Akiyoshi Aikawa, and Shin-ichiro Honda	4. 巻 30 (suppl 5)
2. 論文標題 High NAMPT expression and anti-tumor activity of NAMPT inhibitor in adult T-cell leukemia/lymphoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Oncology	6. 最初と最後の頁 505P
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/annonc/mdz244.067	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 Ohsugi T, Tanaka S, Iwasaki K, Nagano Y, Kozako T, Matsuda K, Hirose T, Takehana K.	4. 巻 2
2. 論文標題 A novel mouse model of adult T-cell leukemia cell invasion into the spinal cord	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Animal Models and Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 64-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ame2.12053.	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 小迫知弘、鈴木孝禎	4. 巻 51
2. 論文標題 サーチュインを標的とした新規成人T細胞白血病治療法の開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 38-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 加藤 奈歩、小迫 知弘、大杉 剛生、相川 晃慶、本田 伸一郎
2. 発表標題 成人T細胞白血病関連細胞株の細胞死に対するCDK9阻害剤の影響
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（名古屋、Web開催）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小迫 知弘
2. 発表標題 SRT1720による成人T細胞白血病細胞株の細胞死に関する検討
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会（横浜）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯沼海仁、猪狩陽希、橋本祐樹、加藤 奈歩、佐藤 陽菜、相川 晃慶、小迫知弘、本田 伸一郎、大杉剛生
2. 発表標題 SIRT1活性化剤SRT1720の成人T細胞白血病（ATL）細胞株に対する腫瘍抑制効果
3. 学会等名 第68回日本実験動物学会総会（さいたま市）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相川 晃慶、山崎 七恵、堀ノ内 好香、小迫 知弘、佐藤 陽菜、大杉 剛生、本田 伸一郎
2. 発表標題 AICARによるヒトT細胞白血病ウイルス1型感染細胞株の細胞死誘導機序
3. 学会等名 日本薬学会第141年会（広島、Web開催）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小迫 知弘、加藤奈歩、大杉剛生、相川 晃慶、佐藤 陽菜、本田 伸一郎
2. 発表標題 成人T細胞白血病におけるSRT1720の抗腫瘍効果
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（神戸、Web開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 相川 晃慶、小迫 知弘、内田 友一朗、吉満 誠、大杉 剛生、副田 二三男、戸田 晶久、本田 伸一郎
2. 発表標題 DorsomorphinによるヒトT細胞白血病1型感染細胞株のアポトーシス誘導
3. 学会等名 日本薬学会第140年会（京都）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山崎 七恵、相川 晃慶、小迫 知弘、大杉 剛生、本田 伸一郎
2. 発表標題 AICARによる成人T細胞白血病細胞株のアポトーシス誘導
3. 学会等名 日本薬学会第140年会（京都）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹内 薫、小迫 知弘、佐藤 陽菜、相川 晃慶、本田 伸一郎
2. 発表標題 SRT1720による成人T細胞白血病細胞株の細胞死
3. 学会等名 日本薬学会第140年会（京都）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横山智也、相川晃慶、小迫知弘、大杉剛生
2. 発表標題 成人T細胞白血病 (adult T-cell leukemia:ATL) 由来細胞株に対する AMPK阻害剤Dorsomorphinの効果
3. 学会等名 北海道実験動物研究会 (北海道)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤奈歩、小迫知弘、大杉剛生、内田友一朗、吉満誠、石塚賢治、佐藤啓介、相川晃慶、本田伸一郎
2. 発表標題 NAMPT阻害剤による成人T細胞白血病細胞における抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第6回日本HTLV-1学会学術集会 (宮崎)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 啓介、小迫 知弘、緒方 憲太郎、神村 英利、佐々木 秀法、高松 泰、武本 重毅、本田 伸一郎
2. 発表標題 Brentuximab vedotinによる細胞死に対する可溶性CD30とADAM10/17の影響
3. 学会等名 第6回日本HTLV-1学会学術集会 (宮崎)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎 七恵、相川 晃慶、小迫 知弘、大杉 剛生、本田 伸一郎
2. 発表標題 AICARによるHTLV-1感染細胞株の細胞死誘導機序についての検討
3. 学会等名 第6回日本HTLV-1学会学術集会 (宮崎)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎 七恵、相川 晃慶、小迫 知弘、大杉 剛生、本田 伸一郎
2. 発表標題 AICARによるHTLV-1感染細胞株のアポトーシス性細胞死誘導機序についての検討
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会(福岡)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohiro Kozako, Takeo Ohsugi, Yu-ichiro Uchida, Makoto Yoshimitsu, Kenji Ishitsuka, Naho Kato, Keisuke Sato, Akiyoshi Aikawa, and Shin-ichiro Honda
2. 発表標題 High NAMPT expression and anti-tumor activity of NAMPT inhibitor in adult T-cell leukemia/lymphoma
3. 学会等名 ESMO 2019 Congress (Barcelona, Spain) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Tomohiro Kozako, Yukihiro Itoh, Shin-ichiro Honda, Takayoshi Suzuki	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 483
3. 書名 Epigenetic Control Using Small Molecules in Cancer	

〔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
---------	---------