

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 10 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790921

研究課題名（和文）長寿遺伝子を標的とした新規成人 T 細胞白血病治療法の開発

研究課題名（英文） SIRT1, a longevity gene encoded protein, regulates apoptosis of adult T-cell leukemia cells and its inhibition by sirtinol induces apoptosis

研究代表者

小迫 知弘 (KOZAKO TOMOHIRO)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：40398300

研究成果の概要（和文）：

成人 T 細胞白血病（ATL）は、化学療法等の治療法の進歩に関わらず平均生存期間は 10.9 ヶ月と予後不良であり、白血病による死亡者数の約 14% にのぼる。NAD<sup>+</sup>依存性ヒストン脱アセチル化酵素である SIRT1 は、細胞内エネルギー代謝センサーとして生命機能に関与する。本研究では ATL における SIRT1 機能を解析し、その ATL 治療応用への可能性を検討した。

急性型 ATL 患者における SIRT1 の発現は増加しており、SIRT1 阻害剤である Sirtinol は、急性型 ATL 患者細胞の細胞生存率を有意に低下させ、アポトーシスを誘導した。SIRT1 のノックダウンにより HTLV-1 感染細胞株である MT-2 細胞では、Caspase-3 の活性化及びアポトーシス陽性細胞の検出が確認された。以上の結果より、SIRT1 阻害剤による ATL 治療法の可能性に関する研究基盤が確立できた。

研究成果の概要（英文）：

Adult T-cell leukemia-lymphoma (ATL) is an aggressive peripheral T-cell neoplasm that develops after long-term infection with human T-cell leukemia virus (HTLV-1). SIRT1, a nicotinamide adenine dinucleotide(+) -dependent histone/protein deacetylase, plays a crucial role in various physiological processes, such as aging, metabolism, neurogenesis and apoptosis, owing to its ability to deacetylate numerous substrates, such as histone and NF- $\kappa$ B, which is implicated as an exacerbation factor in ATL. Here, we assessed how SIRT1 is regulated in primary ATL cells and leukemic cell lines. SIRT1 expression in ATL patients was significantly higher than that in healthy controls, especially in the acute type. Sirtinol, a SIRT1 inhibitor, induced significant growth inhibition or apoptosis in cells from ATL patients and leukemic cell lines, especially HTLV-1-related cell lines. Sirtinol-induced apoptosis was mediated by activation of the caspase family and degradation of SIRT1 in the nucleus. Furthermore, SIRT1 knockdown by SIRT1-specific small interfering RNA caused apoptosis via activation of caspase-3 and PARP in MT-2 cells, HTLV-1-related cell line. These results suggest that SIRT1 is a crucial antiapoptotic molecule in ATL cells and that SIRT1 inhibitors may be useful therapeutic agents for leukemia, especially in patients with ATL.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：血液免疫学・長寿遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

ATL は日本で発見された世界最初のヒトレトロウイルスである HTLV-1 の長期潜伏後発症し、平均発症年齢は 60 歳であり年齢・長寿との関連も興味深い。日本には約 110 万人の HTLV-1 キャリアが存在し、ATL は九州出身者に多発する一方、キャリアの移動により関東地方などでもその絶対数は無視することができない。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。有効な治療法がない現状において、ATL 細胞の増殖抑制する新規作用機序の薬剤による ATL 治療法の確立が焦眉の急であると考えられる。

SIRT1 は HDAC classIII に分類され、カロリー制限による細胞内  $NAD^+$  の増加に伴い活性化され、脱アセチル化された領域の遺伝子発現が低下する事から、細胞内代謝状態のセンサー、DNA 損傷修復、癌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)。SIRT1 の制御に関する研究は癌治療研究をはじめとする長寿研究など幅広い研究に有益であり、高齢者人口が 20% を超える高齢化社会への波及効果も高い。SIRT1 は神経細胞において抗アポトーシス効果による老化防止に寄与する一方、腫瘍細胞の生存にも重要であり前立腺癌において SIRT1 が高発現している (Brooks et al. *Nat Rev Cancer* 2009)。SIRT1 は老化と癌化の両方に重要な意義を持っており、SIRT1 活性は厳密な管理を要する“両刃の刃”であるともいえる。これまで HDAC classI/II 阻害剤は、p53 の活性化作用等により抗腫瘍効果を示し、現在

FDA でボリナスタット (メルク社) が皮膚 T 細胞リンパ腫に対し唯一承認されている。一方 classIII の SIRT1 に関しては、活性化剤が 2 型糖尿病治療薬として臨床試験中であるが、阻害剤は基礎研究の段階であり SIRT1 と白血病に関する知見は乏しい。従って、本研究は癌化機序における SIRT1 の制御機構の解明及び癌治療応用に重要な意味を持っている。

## 2. 研究の目的

申請者はこれまでに、非感染者と比較し ATL 患者において SIRT1 タンパクが高発現している事と、白血病細胞株における SIRT1 阻害薬 (Sirtinol) による濃度依存的な細胞生存率の低下及びアポトーシスの誘導を確認した。そこで、本研究では、SIRT1 阻害によるアポトーシス誘導のメカニズムに加え、白血病細胞における SIRT1 活性化剤の効果を検討することにより、SIRT1 を標的とした新規 ATL 治療法について研究した。

## 3. 研究の方法

HTLV-1 感染細胞株である S1T 及び MT2 細胞、HTLV-1 非感染細胞株である Jurkat 及び HL60 細胞、また、ATL 患者及び健常人の末梢血単核球 (PBMC) を用いて、SIRT1 阻害剤 (Sirtinol) 及び 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、AnnexinV 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、Invitrogen 社の Neon を用いて SIRT1 をノックダウンした。

## 4. 研究成果

健常人由来の PBMC と比較し、急性型 ATL 患者由来のそれでは SIRT1 が高発現し

ており、Sirtinol 処理による ATL 患者の PBMC の細胞生存率は、健常人細胞と比較し、有意に減少していた。更に、白血病細胞株において、Sirtinol 処理により細胞生存率は濃度依存的に抑制され、アポトーシス細胞が濃度依存的に増加した。特に、HTLV-1 感染細胞株である S1T 細胞においては、この傾向が顕著であった。

一方、SRT1720 処理によっても白血病細胞株の細胞生存率は濃度依存的に抑制され、アポトーシス細胞の割合は増加した。そこで、白血病細胞株において Sirtinol と SRT1720 を同時に処理した結果、2 つの薬剤は競合的な拮抗作用を示さず、単独処理と比較して細胞生存率の低下、アポトーシス陽性細胞の増加が有意に認められた。また、SIRT1 のノックダウンにより HTLV-1 感染細胞株である MT-2 細胞では、Caspase-3 や PARP の活性化及びアポトーシス陽性細胞の検出が確認されたが、非 HTLV-1 感染細胞株の Jurkat 細胞においては、アポトーシスが認められなかった。

HTLV-1 感染細胞株において、SIRT1 のノックダウンによりアポトーシスが起こったことから、SIRT1 は抗アポトーシス因子として作用していることが示唆された。更に、HTLV-1 感染細胞において SIRT1 を標的とした薬剤である Sirtinol 及び SRT1720 は、直接的及び間接的に SIRT1 に対して作用することが示唆された。従って、SIRT1 に対する活性化剤及び阻害剤の作用メカニズムを解明することが、SIRT1 を標的とした創薬の ATL に対する治療応用に繋がると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. **Kozako T.** Yoshimitsu M, Akimoto M, (他 7 名, 1 番目) PD-1/PD-L1 Pathway-Mediated Immune Responses Against Human T-Lymphotropic Virus Type

I in HAM/TSP and Carriers with Collagen Diseases. *Human Immunology* 72:1001-6, 2011. (査読有り)

2. White Y, Hamada T, Yoshimitsu M, Nakashima M, Hachiman M, **Kozako T.** et al. (他 5 名, 6 番目) Novel Cytotoxic Isolated from Jamaican *Hyptis verticillata* jacq Induces Apoptosis and Overcomes Multidrug Resistance. *Anticancer Res.* 12:4251-7, 2011. (査読有り)
3. **Kozako T.** New Strategy of Adult T-cell Leukemia Treatment Targeted for Anti-tumor Immunity and a Longevity Gene-encoded Protein. *Yakugaku Zasshi* 131: 1061-1072, 2011. (査読有り)
4. **Kozako T.** Hirata S, Shimizu Y, Satoh Y, Yoshimitsu M, White Y, Lemonnier F, Shimeno H, Soeda S, Arima N. Oligomannose-coated liposomes efficiently induce human T-cell leukemia virus-1-specific cytotoxic T lymphocytes without adjuvant. *FEBS Journal* 278: 1358-1366, 2011. (査読有り)
5. **Kozako T.** Akimoto M, Toji S, (他 11 名, 1 番目) Target epitopes of HTLV-1 recognized by class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocytes in patients with myelopathy and spastic paraparesis and infected patients with autoimmune disorders. *J. Med. Virology* 83: 501-509, 2011. (査読有り)
6. Hayashida S, Arimoto A, Kuramoto Y, **Kozako T.** Honda SI, Shimeno H, Soeda S. Fasting promotes the expression of SIRT1, an NAD(+)-dependent protein deacetylase, via activation of PPARalpha in mice. *Molecular Cell Biochemistry* 339: 285-292, 2010. (査読有り)

〔学会発表〕（計 30 件）

1. 小迫知弘、平田真哉ら オリゴマンノース被覆リポソームによる効率的な HTLV-1 特異的細胞障害性 T 細胞の誘導 日本薬学会第 132 年会 2012.3.30 札幌市
2. 久保光範、小迫知弘ら 長寿遺伝子 SIRT1 を標的とした新規白血病治療法の開発 第 28 回日本薬学会九州支部大会 2011.12.10 福岡市
3. 中山利香、本田伸一郎、小迫知弘ら サフラン成分クロシンによるレドックス制御 第 28 回日本薬学会九州支部大会 2011.12.10 福岡市
4. 中山利香、本田伸一郎、小迫知弘ら サフラン成分クロシンの神経細胞死抑制効果 第 19 回ステロイドホルモン学会 2011.11.26 福岡市
5. 糸永昇平、小迫知弘ら SIRT1 を標的とした創薬による新規成人 T 細胞白血病治療法の開発 第 39 回薬学活性シンポジウム 2011.11.21 福岡市
6. 民本愛、本田伸一郎、小迫知弘ら 発生工学的手法を用いた脳内アロマトーゼの機能解析 第 39 回薬学活性シンポジウム 2011.11.21 福岡市
7. 大下遥子、本田伸一郎、小迫知弘ら アロマトーゼの脳特異的プロモーター結合因子の解析 第 39 回薬学活性シンポジウム 2011.11.21 福岡市
8. 小迫知弘、有馬直道、占野廣司、添田泰司 成人 T 細胞白血病発症予防と治療をめざして～抗腫瘍免疫と抗老化分子に注目して～ 第 39 回薬学活性シンポジウム 2011.11.21 福岡市
9. 久保光範、小迫知弘ら SIRT1 を標的とした創薬の成人 T 細胞白血病治療法に対する検討 第 4 回 HTLV-1 研究会 2011.9.18 東京都
10. 小迫知弘、平田真哉ら オリゴマンノース被覆リポソームワクチンによる HTLV-1 特異的 CTL の誘導 第 3 回造血器腫瘍免疫療法研究会 2011.8.20 別府市
11. Tomohiro Kozako et al. Overexpression of SIRT1 and induction of apoptosis by its inhibition in adult T-cell leukemia cells 15th International Conference of Human Retrovirology; HTLV 2011.6.5 Leuven, Belgium
12. 賀茂奈保子、小迫知弘ら エネルギー代謝因子をターゲットとした新規白血病治療法の開発 日本生化学会九州支部例会 2011.5.21 久留米市
13. 前村由佳、小迫知弘ら 新規 SIRT1 阻害剤による成人 T 細胞白血病治療法の開発 日本生化学会九州支部例会 2011.5.21 久留米市
14. 坪根未歩、藏元佑嘉子、小迫知弘ら 抗腫瘍活性を持つ天然物の血管内皮細胞（HUVEC）増殖に及ぼす影響 日本生化学会九州支部例会 2011.5.21 久留米市
15. 瓜生健太郎、藏元佑嘉子、小迫知弘ら 抗腫瘍活性を持つ天然物の血管内皮細胞増殖因子（VEGF）発現に及ぼす影響 日本生化学会九州支部例会 2011.5.21 久留米市
16. 原口美紀、古田展也、安田千穂、本田伸一郎、小迫知弘ら 脳特異的なアロマトーゼ発現に関与する Deaf-1 タンパク質の機能解析 日本生化学会九州支部例会 2011.5.21 久留米市
17. 小迫知弘ら マリンバイオ創出シーズの長寿遺伝子制御による生活習慣病予防の可能性 第 4 回薬学研究フォーラム

- 2011.1.7 東京都
18. 今村翔、藏元佑嘉子、小迫知弘ら ガンの予防および治療における民間伝承植物の効果検討 第 27 回日本薬学会九州支部大会 2010.12.12 長崎市
  19. 野見山融、本田伸一郎、小迫知弘ら NAD 依存性脱アセチル化酵素 SIRT1 及び転写因子 FOXO1 による筋細胞の分化制御 第 27 回日本薬学会九州支部大会 2010.12.12 長崎市
  20. 安田千穂、本田伸一郎、小迫知弘ら 転写因子 Deaf-1 の転写制御メカニズムの解析 第 27 回日本薬学会九州支部大会 2010.12.12 長崎市
  21. 小迫知弘 宿主抗腫瘍免疫と長寿遺伝子を標的とした成人 T 細胞白血病治療法の開発 第 27 回日本薬学会九州支部大会 2010.12.12 長崎市
  22. Kozako T, et al. Overexpression of SIRT1, a Longevity Gene-Encoded Protein, and Induction of Apoptosis by Its Inhibition In Adult T-Cell Leukemia Cells. The American Society of Hematology 52th Annual Meeting 2010.12.4 Orland, Florida
  23. Masamoto I, Horai S, Kozako T, et al. CD70 Expression on HTLV-1 Infected T Cells of Carriers and ATL Patients and Its Clinical Significance. The American Society of Hematology 52th Annual Meeting 2010.12.4 Orland, Florida
  24. 安田千穂、本田伸一郎、小迫知弘ら アロマトラーゼの脳特異的プロモーターに作用する転写因子 Deaf-1 の機能ドメインの解析 日本ステロイドホルモン学会 2010.11.27 名古屋
  25. 今村翔、藏元佑嘉子、小迫知弘ら 民間伝承植物を用いたガン治療及び予防効果の検討 日本生薬学会第 57 回年会・第 5 回日中韓生薬学合同シンポジウム 2010.9.25 徳島市
  26. 小迫知弘、占野廣司、有馬直道 SIRT1 を標的とした ATL の新規治療法の開発 第 69 回日本癌学会総会 2010.9.22 大阪市
  27. Tobina T, Nakashima H, Kozako T, et al. Differences in high molecular weight adiponectin and adiponectin receptor alterations based on exercise and diet. Integrative Physiology of Exercise 2010.9.22 Miami, Florida
  28. 小迫知弘、吉満誠ら HTLV-1 感染者における HTLV-1 特異的 CTL の発現の多様性 第 3 回 HTLV-1 研究会 2010.8.28 東京都
  29. 折田聡一、小迫知弘ら ATL 関連細胞株における長寿遺伝子 SIRT1 の阻害剤によるアポトーシスの誘導 日本生化学会九州支部例会 2010.5.22 鹿児島市
  30. 添田泰司、小柳悟、藏元佑嘉子、木村公彦、小田真稔、小迫知弘ら 中枢神経系における PAI 1 の神経栄養因子としての機能 第 87 回日本生理学会大会 2010.5.19 盛岡市
- [図書] (計 1 件)
1. Kozako T, Hirata S, Yoshimitsu M, Arima N. Prophylactic and Therapeutic Approach for Adult T-cell Leukemia Based on Targeting Anti-tumor Immunity. Major Histocompatibility Complex: Biology, Functions and Roles in Disease. Nova Science Publishers, Inc. Pages: 7 x 10, ISBN: 978-1-61942-999-4, 2011.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pha.fukuoka-u.ac.jp/~seika/pg17.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

小迫 知弘 (KOZAKO TOMOHIRO)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：40398300

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：