

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 7 日現在

機関番号：14401
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011～2012
課題番号：23659488
研究課題名（和文） 細胞増殖・不死化を阻害する低分子化合物スクリーニングと創薬化
研究課題名（英文） Screening of low molecular compounds, which inhibit cell proliferation and survival
研究代表者 金倉 譲 (KANAKURA YUZURU) 大阪大学・医学系研究科・教授 研究者番号：20177489

研究成果の概要（和文）：

Baf3 細胞株の増殖・生存を阻害する低分子化合物のスクリーニング→各化合物が標的とする分子の精製・同定→各化合物の臨床応用の可能性の検討、という手順で研究を進めた。約 10000 個の低分子化合物をスクリーニングした結果、Baf3 細胞増殖を抑制する 61 個の低分子化合物を選別できた。類似の構造を持つ新たな化合物を加えて、骨髄性白血病細胞株 32D、赤白血病細胞株 MEL などに及ぼす作用を解析するとともに、化合物が水溶性であること、化合物がアミノ基や水酸基をもつこと、などを指標にして、候補化合物を 4 個 (T-167317, T-170633, T-005170, T-051702) に絞り込んだ。T-167317 は、Baf3 細胞特異的に細胞周期を制御した。T-170633 は、Baf3 細胞・32D 細胞・MEL 細胞に対し、細胞の多核化を誘導し細胞周期を制御した。Baf3 細胞・32D 細胞・MEL 細胞に対し、T-0051706 は細胞死を、T-051702 は細胞周期静止を、誘導した。これら 4 化合物の標的分子の精製・同定をおこなうために、各化合物を FG ビーズに固相化する過程を終了した。

研究成果の概要（英文）：

We tried to establish a new anti-proliferative drug through a following process: (1) screening of compounds to inhibit Baf3 cell growth (2) identification of target molecules for the selected compounds (3) analysis of physical effects of each possible compound. We screened approximately 10,000 low molecular compounds, which were provided from Tokyo University, and successfully isolated 61 compounds. Some inhibited Baf3 cell growth, or induced apoptosis, and the others induced morphological changes. Among them, we selected 4 compounds, T-167317, T-170633, T-005170, T-051702, which is water-soluble and has a specific structure. To identify their molecular targets, we just fixed the compounds onto FG beads.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：低分子化合物、増殖、細胞周期、細胞株

1. 研究開始当初の背景

分子生物学の発展に伴い、DNA 複製・染色体分配・細胞周期進行・細胞死制御に関わる分子機構が解明されつつある。結果、細胞内外のシグナル分子の機能に基づき癌・感染・

炎症など様々な生命現象を理解できるようになってきた。近年、これらシグナル分子を標的とした疾患治療薬の開発が盛んに行われており、種々の疾患における治療成績の飛躍的な向上に繋がっている。我々は、c-kit

変異・FLT3 変異や白血病キメラ遺伝子の細胞増殖・分化および腫瘍化における役割を解析してきた。また、新規抗アポトーシス分子 Anamorsin や新規インターフェロン IFN-zeta/Limitin を同定してきた。このように、我々は、血液細胞の細胞増殖・分化をはじめとして生死や腫瘍化について研究を進めている。現在の合意事項として、細胞増殖亢進や不死化（クラス I 異常）や細胞分化の障害（クラス II 異常）が腫瘍細胞の特徴として挙げられている。これら腫瘍化に必須なイベントのより詳細なメカニズムを解明できれば、新たな治療標的分子の同定に繋がりが得る。また、細胞増殖や不死化を制御する化合物を開発できれば、新しい腫瘍治療薬としての展開も可能である。Baf3 細胞株は、IL-3 存在下では、細胞増殖シグナルやアポトーシス阻害シグナルが惹起される。一般的に、IL-3 受容体からのシグナルとして Jak2→Stat5 経路・Ras→Raf→MEK→ERK 経路・PI3-K→Akt/PKB 経路が知られており、さらに、これらの下流に存在する分子群を調節することにより細胞増殖や細胞生存が誘導されると考えられている。本研究では、IL-3 依存性増殖を示す Baf3 細胞株の増殖・生存を阻害する低分子化合物のスクリーニングを行う。さらに、ナノ磁性微粒子 (FG ビーズ) を用いて、選別した化合物が標的とする分子を精製・同定する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「(1) 細胞増殖や細胞生存における鍵となる分子を網羅的に同定する (2) 新規治療薬の候補となる新しい低分子化合物を選別する」ことである。

3. 研究の方法

(1) 低分子化合物ライブラリーのスクリーニング：化合物ライブラリーは、東京大学生物機能制御化合物ライブラリー機構から約 10,000 化合物の提供を既に受けている。Baf3 細胞株の IL-3 依存性増殖・生存を阻害することを指標に、以下の手順にて低分子化合物ライブラリーのスクリーニングを行う。

(手順 1) IL-3 存在下の Baf3 細胞培養に、各低分子化合物を 5 μ M の濃度で添加する。

(手順 2) 3 日間培養後の生細胞数を MTT assay にて解析する。さらに、細胞数増加が抑制されている培養中の Baf3 細胞の生死を確認する。

(手順 3) 選別された各低分子化合物について、種々の細胞株における細胞増殖や細胞生存に対する影響を解析する。

(2) 選別された各低分子化合物の分類：作用（細胞周期制御、アポトーシス制御など）および構造から、選別した化合物のグループ割り振りを行う。

(3) 選別した化合物が標的とする分子の精製・同定：ナノ磁性微粒子 (FG ビーズ) は、フェライト粒子をポリマーで被覆した 200nm の粒子であり、表面に設けられたリンカーの先端に低分子化合物をリガンドとして固定化できる (図 1 参照)。リンカーとして、エポキシ基・トシル基・活性化エステル基・アミノ基・チオール基・プロモアセトアミドなどが用意されており、選別した各低分子化合物の構造に関わらず固定化できるようデザインされている。この FG ビーズを用いた各低分子化合物が標的とする分子の精製・同定を以下の手順にて行う

(手順 1) 選別した化合物の構造に適した FG ビーズを選択し、FG ビーズに化合物を固定化する。

(手順 2) Baf3 細胞株から抽出液を作製し、化合物固定化 FG ビーズと混合する。

(手順 3) 磁気分離を行いつつ洗浄した後に、FG ビーズから結合蛋白を溶出する。

(手順 4) 精製蛋白を電気泳動し、特異的バンドを切り出す。ゲルからの蛋白抽出・トリプシン処理を行った後に、質量分析

(MALDI/TOF) にて解析する。

4. 研究成果

スクリーニング法は、(1) 標的細胞：Baf3 細胞株 (2) 低分子化合物濃度：5 μ M (3) 培養期間：3 日 (4) 細胞増殖評価：MTT アッセイ、の条件で行った。約 10000 個の低分子化合物を本アッセイ系にてスクリーニングした。IL-3 依存性 Baf3 細胞増殖を抑制する可能性がある 61 個の低分子化合物を選別できた。これら化合物の中には、アポトーシスを誘導するもの、細胞周期を制御するもの、Baf3 細胞を凝集させるもの、などそれぞれ特徴ある変化を誘導するものが含まれていた。第 1 段階スクリーニングで選別した 61 化合物に加え、それらと類似の構造を持つ化合物の増殖抑制効果に関して、Baf3 細胞・32D 細胞・MEL 細胞を用いて解析した。結果、少しの構造変化により増殖抑制作用が消失するものや作用が増強するものがあり、各化合物の作用発揮に重要な官能基などの情報が得られた。上記情報に加えて、水溶性であること、官能基(NH₂ や OH)を持つこと、を基準にし、7 個の候補化合物に絞り込んだ。また、7 個の候補化合物のうち、1 化合物の標的蛋白が小胞体カルシウムチャネル SERCA であり、他の 1 化合物の標的蛋白が heat shock protein 90 や nuclear receptor ROR-gamma であった。さらに、1 化合物の作用活性部位に OH 基が必須であると考えられた。以上より、最終候補化合物として 4 個の低分子化合物 (T-167317, T-170633, T-005170, T-051702) を得た。T-167317 は、Baf3 細胞特異的に細胞周期を制御した。T-170633 は、

Baf3 細胞・32D 細胞・MEL 細胞に対し、細胞の多核化を誘導し細胞周期を制御した(図1)。Baf3 細胞・32D 細胞・MEL 細胞に対し、T-005170 は細胞死を、T-051702 は細胞周期静止を、誘導した。

次に、これら4化合物の標的分子の精製・同定をおこなうために、各化合物をFG ビーズに固相化する過程を終了した。

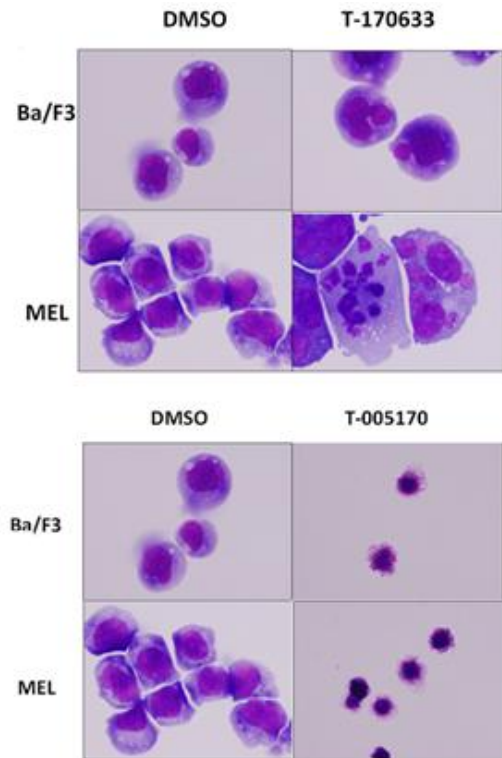


図1 選択化合物の造血細胞株への影響
T-170633は多核化を、T-005170は細胞死を、誘導する。

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 15 件)

- ① Satoh Y, Matsumura I, Tanaka H, Harada H, Harada Y, Matsui K, Shibata M, Mizuki M, Kanakura Y. C-terminal mutation of RUNX1 attenuates the DNA-damage repair response in hematopoietic stem cells. *Leukemia* 26:303-311, 2012 (査読: 有)
- ② Matsui K, Ezoe S, Oritani K, Shibata M, Tokunaga M, Fujita N, Tanimura A, Sudo T, Tanaka H, McBurney MW, Matsumura I, Kanakura Y. NAD-dependent histone deacetylase, SIRT1, plays essential roles in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 418:811-817, 2012 (査読: 有)
- ③ Kiyomizu K, Kashiwagi H, Nakazawa T, Tadokoro S, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y. Recognition of highly restricted regions in the β -propeller domain of α IIb β 3 autoantibodies in primary immune thrombocytopenia. *Blood* 120:1499-1509, 2012 (査読: 有)
- ④ Sudo T, Yokota T, Oritani K, Satoh Y, Sugiyama T, Ishida T, Shibayama H, Ezoe S, Fujita N, Tanaka H, Maeda T, Nagasawa T, Kanakura Y. The endothelial antigen ESAM monitors hematopoietic stem cell status between quiescence and self-renewal. *J Immunol* 189:200-210, 2012 (査読: 有)
- ⑤ Yoshida A, Mizote I, Sakata Y, Maeda T, Kanakura Y, Yamauchi-Takahara K, Komuro I. Effect of vasodilators in patient with pulmonary hypertension associated with hemolytic anemia. *J Cardiol Cases* 6:e75-e77, 2012 (査読: 有)
- ⑥ Murakami Y, Inoue N, Shichishima T, Ohta R, Noji H, Maeda Y, Nishimura JJ, Kanakura Y, Kinoshita T. Deregulated expression of HMG2 is implicated in clonal expansion of PIGA deficient cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 156:383-387, 2012 (査読: 有)
- ⑦ Kanakura Y, Ohyashiki K, Shichishima T, Okamoto S, Ando K, Ninomiya H, Kawaguchi T, Nakao S, Nakakuma H, Nishimura J, Kinoshita T, Bedrosian CL, Valentine ME, Khursigara G, Ozawa K, Omine M. Safety and efficacy of the terminal complement inhibitor eculizumab in Japanese patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: the AEGIS Clinical Trial. *Int J Hematol* 93:36-46, 2011 (査読: 有)
- ⑧ Tadokoro S, Nakazawa T, Kamae T, Kiyomizu K, Kashiwagi H, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y. A potential role for α -actinin in inside-out α IIb β 3 signaling. *Blood* 117:250-258, 2011 (査読: 有)
- ⑨ Saitoh N, Oritani K, Saito K, Yokota T, Ichii M, Sudo T, Fujita N, Nakajima K, Okada M, Kanakura Y. Identification of functional domains and novel binding partners of STIM proteins. *J Cell Biochem* 112:147-156, 2011 (査読: 有)
- ⑩ Shibata M, Ezoe S, Oritani K, Matsui K,

- Tokunaga M, Fujita N, Saito Y, Takahashi T, Hino M, Matsumura I, Kanakura Y. Predictability of the response to tyrosine kinase inhibitors via in vitro analysis of Bcr-Abl phosphorylation. *Leuk Res* 35:1205-1211, 2011 (査読:有)
- ⑪ Fujita J, Mizuki M, Otsuka M, Ezoe S, Tanaka H, Satoh Y, Fukushima K, Tokunaga M, Matsumura I, Kanakura Y. Myeloid neoplasm-related gene abnormalities differentially affect dendritic cell differentiation from murine hematopoietic stem/progenitor cells. *Immunol Lett* 136:61-73, 2011 (査読:有)
- ⑫ Otsuka M, Mizuki M, Fujita J, Kang S, Kanakura Y. Constitutive active FGFR3 Lys650Glu mutation enhances the bortezomib-sensitivity in plasma cell malignancy. *Anticancer Res* 31:113-122, 2011 (査読:有)
- ⑬ Saito Y, Shibayama H, Tanaka H, Tanimura A, Kanakura Y. A cell-death-defying factor, anamorsin mediates cell growth through inactivation of PKC and p38MAPK. *Biochem Biophys Res Commun* 405:303-307, 2011 (査読:有)
- ⑭ Saito Y, Shibayama H, Tanaka H, Tanimura A, Matsumura I, Kanakura Y. PICOT is a molecule which binds to anamorsin. *Biochem Biophys Res Commun* 408:329-333, 2011 (査読:有)
- ⑮ Kamae T, Kiyomizu K, Nakazawa T, Tadokoro S, Kashiwagi H, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y. Bleeding tendency and impaired platelet function in a patient carrying a heterozygous mutation in the thromboxane A₂ receptor. *J Thromb Haemost* 9:1040-1048, 2011 (査読:有)
- [学会発表] (計 20 件)
- ① Kiyomizu K, et al : Platelet-associated anti-GPIIb/IIIa autoantibodies in primary immune thrombocytopenia recognize highly restricted regions in the beta-propeller domain of GPIIb with clonality. The 17th Congress of the European Hematology Association (2012. 6. 14-17, Amsterdam, Netherlands)
- ② Fujita N, et al : Identification of osteoblast stimulating factor-5 as a novel regulator of early lymphocyte development. The 17th Congress of the European Hematology Association (2012. 6. 14-17, Amsterdam, Netherlands)
- ③ Tanimura A, et al : An anti-apoptotic molecule, Anamorsin, is essential for erythropoiesis through the regulation of cellular labile iron pool. The American Society of Hematology 54th Annual Meeting (2012. 12. 8-11, Atlanta, USA)
- ④ Nishimura J, et al : A rare genetic polymorphism in C5 confers poor response to the anti-C5 monoclonal antibody eculizumab by nine Japanese patients with PNH. The American Society of Hematology 54th Annual Meeting (2012. 12. 8-11, Atlanta, USA)
- ⑤ Yamamoto M, et al : Crucial role of complement receptor type 1 on the accumulation of complement component 3 on erythrocytes in patients with PNH treated with eculizumab. The American Society of Hematology 54th Annual Meeting (2012. 12. 8-11, Atlanta, USA)
- ⑥ 桐生幸歩ら : 骨髄異形成症候群(MDS)からの急性骨髄性白血病(overt AML)に化学療法とアザシチジンが著効した1症例、第109回日本内科学会講演会(2012. 4. 13-15, 京都)
- ⑦ Oritani K, et al : Involvement of STAP-2 in BCR-ABL-mediated signals for CML development. 第3回日本血液学会(JSH)国際シンポジウム(2012. 5. 26-27, 埼玉)
- ⑧ Sudo T, et al : The endothelial antigen ESAM monitors hematopoietic stem cell status between dormancy and self-renewal. 第10回幹細胞シンポジウム(2012. 5. 31-6. 2, 兵庫)
- ⑨ Tanimura A, et al : An anti-apoptotic molecule, Anamorsin, functions in both Fe/S cluster assembly and iron homeostasis. 第74回日本血液学会学術集会(2012. 10. 19-21, 京都)
- ⑩ Sudo T, et al : Role of endothelial antigen ESAM in hematopoietic stem cells status. 第74回日本血液学会学術集会(2012. 10. 19-21, 京都)
- ⑪ Hamanaka Y, et al : Detection of change in LIC by MRI in a transfusion dependent MDS patient treated with deferasirox. 第74回日本血液学会学術集会(2012. 10. 19-21, 京都)
- ⑫ Ishibashi T, et al : Significance of novel HSC marker ESAM expression in cord blood. 第74回日本血液学会学術集会(2012. 10. 19-21, 京都)

- 集会 (2012.10.19-21, 京都)
- ⑬ Matsui K, et al : Energy metabolism of glucose and ATP affects the growth and differentiation of hematopoietic stem/progenitor cells. The 16th Congress of the European Hematology Association (2011.6.9-12, London, UK)
 - ⑭ Otsuka M, et al : Constitutive active FGFR3 Lys650Glu mutation enhances the bortezomib-sensitivity in plasma cell malignancy. The 16th Congress of the European Hematology Association (2011.6.9-12, London, UK)
 - ⑮ Satoh Y, et al : Satb1 promotes hematopoietic stem cell differentiation toward the lymphoid lineages. The American Society of Hematology 53rd Annual meeting (2011.12.10-13, San Diego, USA)
 - ⑯ Tanimura A, et al : An anti-apoptotic molecule, Anamorsin, functions in both iron-sulfur protein assembly and cellular iron homeostasis. The American Society of Hematology 53rd Annual meeting (2011.12.10-13, San Diego, USA)
 - ⑰ Sudo T, et al : The endothelial antigen ESAM monitors reversible conversion of hematopoietic stem cells between dormancy and self-renewal. The American Society of Hematology 53rd Annual meeting (2011.12.10-13, San Diego, USA)
 - ⑱ Satoh Y, et al : SATB1 induces early lymphocyte differentiation from primitive hematopoietic progenitors. 第 73 回日本血液学会学術集会 (2011.10.14-16, 愛知)
 - ⑲ Shibata M, et al : Predictability of the response to tyrosine kinase inhibitors via in vitro analysis of Bcr-Abl signal. 第 73 回日本血液学会学術集会 (2011.10.14-16, 愛知)
 - ⑳ 福島健太郎 ら : 同種造血細胞移植における ATG(サイモグロブリン)投与後の EB ウイルス再活性化・LPD の発症の検討、第 73 回日本血液学会学術集会 (2011.10.14-16, 愛知)

[図書] (計 1 件)

- ① Yokota T, Oritani K, Butz S, Ewers S, Vestweber D, Kanakura Y. Advances in Hematopoietic Stem Cell Research, Intech Open Access Publisher, 2012, pp77-88

[その他]

ホームページ等

<http://www.hematology.pro/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金倉 譲 (KANAKURA YUZURU)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号 : 20177489

(2) 研究分担者

織谷 健司 (ORITANI KENJI)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号 : 70324762

齊藤則充 (SAITOH NORIMITSU)

大阪大学・医学系研究科・特任助教 (常勤)

研究者番号 : 30597399

(3) 連携研究者

なし