

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461421

研究課題名(和文)白血病発症に関与する時計遺伝子の解明と革新的治療の開発

研究課題名(英文)Analysis of the role of circadian clock gene in leukemogenesis

研究代表者

湯尻 俊昭 (YUJIRI, Toshiaki)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80346551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：シフトワーカーに大腸癌、前立腺癌や乳癌の発症率が優位に高いことや、癌細胞では時計遺伝子発現の異常などの報告がされ、2007年にサーカディアンリズム障害を伴う交替制勤務がWHOから発がんのリスク因子に挙げられた。ヒトの様々な疾患とサーカディアンリズムとの関連が注目されているが、白血病との関連についての解析はほとんどない。そこで白血病細胞株や白血病患者検体を用いた時計遺伝子の解析を行うことにより、その白血病発症と時計遺伝子との関連や時計遺伝子を標的とした新規治療法の開発に着手した。

研究成果の概要(英文)：The circadian rhythm, defined as daily oscillation in various biological processes, is controlled by an endogenous clock in most normal cells in the body. Circadian rhythm disruption by shift work is associated with greater risk for cancer development and poor prognosis, suggesting a putative tumor-suppressive role for circadian rhythm homeostasis. Recent findings demonstrate a previously unrecognized role for the core circadian clock genes in acute myeloid leukemia. In hematopoietic cancers, the regulatory role of circadian clock genes has not yet been entirely clarified. Using cell lines, primary leukemic cells, and a genetically engineered mouse model of leukemia, we have characterized the effects of circadian rhythm disruption on leukemogenesis. The drugs that alter the circadian rhythm may sensitize leukemia cells to traditional anti-cancer therapies and facilitate targeting of leukemic stem cells to eliminate disease more effectively.

研究分野：血液内科

キーワード：時計遺伝子 白血病

### 1. 研究開始当初の背景

近年の研究でサーカディアンリズムと精神、循環器、内分泌疾患など様々な疾患との関連が指摘されている。なかでも2007年には「サーカディアンリズム障害を伴う交替制勤務」がWHOから発がんのリスク因子に挙げられた。シフトワーカーに大腸癌、前立腺癌や乳癌の発症率が優位に高いことや、癌細胞では時計遺伝子発現の異常などのエビデンスが報告された。このことは社会的にみて癌とサーカディアンリズムの相関メカニズムの解明は極めて重要な研究テーマとなっていくことを示唆するものである。しかし残念ながら現在までその詳細はほとんど未解明のままである。サーカディアンリズムの分子機構として正の時計因子である CLOCK と BMAL1 が複合体を形成して Per と Cry 遺伝子の転写を活性化する。その結果として増加した負の時計因子の PER と CRY は CLOCK-BMAL1 による転写促進活性を抑制するため、自らの遺伝子転写を負に制御することになる。この自己制御フィードバックを構成する時計遺伝子群の合成・核移行・リン酸化を介したバランスが生み出すタイムラグによって約24時間周期の遺伝子発現リズムが作り出されると考えられている。分子レベルで時計と発癌の関係をはじめて指摘した研究は2002年に報告された(Fu, L. Cell, 2002)。Per2 変異マウスが放射線照射によるリンパ腫発症が野生型マウスと比べ約10倍の頻度で増加したこと、Per2 は細胞周期やDNA損傷応答に関与し腫瘍抑制因子として機能していることをはじめて明らかにした。また生物時計調節の中心となる Bmal1 遺伝子は、プロモーター領域のDNAメチル化により発現抑制されているが、ヒト Bmal1 遺伝子プロモーター領域のDNAメチル化異常と血液腫瘍の悪性度との相関関係が指摘され、Bmal1 遺伝子プロモーター領域のメチル化による遺伝子不活性化によってサーカディアンリズムが乱れることで血液悪性腫瘍が引き起こされる可能性が示唆されている(Taniguchi, Cancer Res, 2009)。さらに細胞分化とサーカディアンリズムという観点においても最近、ES細胞やiPS細胞を用いたin vitro 分化誘導システムにおいてES、iPS細胞ともにサーカディアンリズムは消失しており、分化に伴いそのリズムが誘導されることが報告されている(Yagita, PNAS, 2010)。このようにリプログラミングに関与しているエピジェネティクス(DNA塩基配列の変化によらない遺伝子発現の変化)がサーカディアンリズムの分子基盤を攪乱させ、造血器腫瘍発症に関与しているのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

生体内でサーカディアンリズムは臓器・細胞レベルに至るまで広く存在し、その機能について新たな知見が集積されている。白血病発

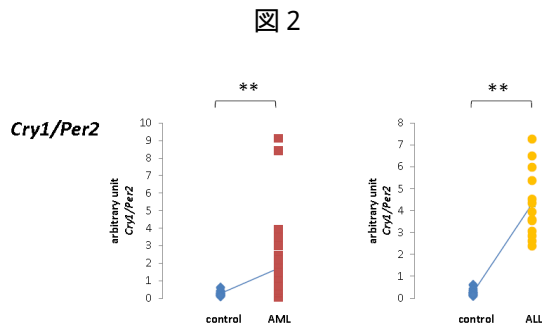
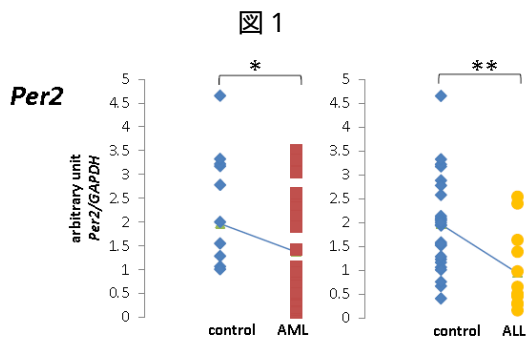
症に関与する構成成分(時計遺伝子)の解析は、この調節機構が如何に破綻し生体内で白血病の発症に関わるのか、さらに広義の癌の発症に関わる課題も明らかになってくるものと思われる。そこで時計遺伝子発現変化と白血病腫瘍化の関係について着目し、臨床検体を用いた解析から時計遺伝子の基本因子である Per2, Bmal1, Cry1 発現レベルと造腫瘍能について研究を行う。

### 3. 研究の方法

患者検体および白血病細胞株を用いた検討(探索研究)サーカディアンリズムはヒトの個々の細胞、さらには培養細胞においても存在する。このため培養細胞はこの研究の実験系の一つとして確立されている。まず初めに血清ショックにより同期培養を行い、Bmal1, Clock, Per1, Per2, Per3, Cry1, Cry2 の mRNA 発現レベルを real time PCR 法にて解析し、細胞株でのサーカディアンリズムを検討する。小児期に発症する急性白血病や治療関連二次性白血病などにおいて高頻度にみられる11番染色体長腕(11q)23転座の切断点の解析によって単離された遺伝子 MLL と AF9 融合遺伝子は t(9;11)転座による白血病に認められる。この MLL-AF9 融合遺伝子を、レトロウイルスベクターを用いて細胞株に発現させ、各時計遺伝子の発現レベルを親株と比較することによって MLL-AF9 がサーカディアンリズムに与える影響を検討する。個々の時計遺伝子発現レベルに大きな変化が得られた際には、その時計遺伝子の発現レベルを small interfering RNA (siRNA) 法によって低下させ、その発現レベルの変化が MLL-AF9 陽性細胞に与える影響について細胞増殖、細胞周期、細胞死、細胞接着、細胞遊走などの観点から検討していく。前述した系での研究が予定通り進行しない場合は、急性前骨髄球性白血病の PML-RAR 融合遺伝子を同様に細胞株に発現させ、サーカディアンリズムに与える影響、時計遺伝子の変化を検討する。そして優位な変化が認められれば siRNA 法による発現抑制実験によってその機能を評価する。

### 4. 研究成果

我々は、当科に入院した急性白血病患者の初診時骨髄検体を用いて時計遺伝子群の mRNA 発現レベルを real time PCR 法にて解析した(この研究は当院 IRB にて承認され、患者の文書による同意を得ている)。図1に示すように Per1-3, Bmal1 遺伝子は健常人骨髄に比べ発現低下し、一方で Cry1, 2, Clock 遺伝子は発現増加していることが示された。臨床的には Cry1/Per2 比が予後予測因子と相関していることが明らかとなった(図2)。このように白血病患者の芽球において優位な時計遺伝子の変動を認められたことは、白血病発症機構に時計遺伝子およびその産物が何らかの役割を果たしていることを示唆するものである。



末梢循環血中の造血幹細胞の動態は厳格な日内変動を有しており、それは薬剤によって強制的に動員された際においても維持されている。しかし、造血因子である granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) による末梢造血幹細胞 (peripheral blood stem cell : PBSC) 動員時の白血球時計遺伝子の動態については、未だ十分に解明されていない。そこで我々は健康な末梢血造血幹細胞移植ドナー 21 人の PBSC 動員時の白血球の時計遺伝子の変化を検討した。その結果、CRY1 mRNA の発現量は G-CSF 投与後に約 3.9 倍と著増 ( $p < 0.01$ ) していた一方、PER3、CRY2 及び BMAL1 mRNA の発現量は著減していた (それぞれ 0.2 倍、0.2 倍、0.6 倍、 $p < 0.001$ )。更に、CRY1 mRNA の発現量は血漿中のノルアドレナリン値と逆相関 ( $r = -0.36$ ,  $p < 0.05$ ) しており、PER3、CRY2 および BMAL1 の発現量はノルアドレナリン値と相関していた ( $r = 0.55$ ,  $r = 0.66$ ,  $r = 0.57$ ,  $p < 0.001$ )。これらの結果より、時計遺伝子の発現量と交感神経の伝達物質であるノルアドレナリンの血漿中濃度に強い関係性があることが明らかになった。今後、交感神経系および概日リズムの調整が PBSC ドナーにおける幹細胞採取量増加の新たな治療標的となりうる可能性が示唆された。

## 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 1 1 件)

1. Nakamura Y, Matsuguma M, Tokunaga Y, Yamamoto K, Tanaka M, Tanaka Y, Yujiri T, Tanizawa Y. Successful treatment of Behçet's disease associated with

acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes using azacitidine and tacrolimus before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Intern Med 56:1199-1202. 2017

DOI:10.2169/internalmedicine.56.7808 査読有

2. Ichimura T, Yoshida K, Okuno Y, Yujiri T, Nagai K, Nishi M, Shiraishi Y, Ueno H, Toki T, Chiba K, Tanaka H, Muramatsu H, Hara T, Kanno H, Kojima S, Miyano S, Ito E, Ogawa S, Ohga S. Diagnostic challenge of Diamond-Blackfan anemia in mothers and children by whole-exome sequencing Int J Hematol 105:515-520. 2017 DOI:10.1007/s12185-016-2151-7 査読有
3. Nawata T, Kubo M, Okuda S, Omoto M, Yujiri T, Kanda T, Yano M. Successful treatment with intravenous cyclophosphamide for anti-melanoma differentiation-associated gene 5 antibody-positive dermatomyositis associated with myelodysplastic syndrome. Scand J Rheumatol 9:1-3. 2016 DOI:1080/03009742.2016.1253770 査読有
4. Tanaka N, Kunihiro Y, Kobayashi T, Yujiri T, Kido S, Ueda K, Matsunaga N. High-resolution CT findings of idiopathic pneumonia syndrome after haematopoietic stem cell transplantation: based on the updated concept of idiopathic pneumonia syndrome by the American Thoracic Society in 2011. Clin Radiol. 71:953-9. 2016 DOI:10.1016/j.crad.2016.06.109 査読有
5. Sugiyama A, Yujiri T, Tanaka M, Tanaka Y, Nakamura Y, Tanizawa Y. SIRT1 is downregulated during peripheral blood stem cell mobilization in healthy donors by granulocyte-colony stimulating factor. Ann Hematol. 95:1381-1382. 2016 DOI: 10.1007/s00277-016-2701-3 査読有
6. Yasuda T, Tsuzuki S, Kawazu M, Hayakawa F, Kojima S, Ueno T, Imoto N, Kohsaka S, Kunita A, Doi K, Sakura T, Yujiri T, Kondo E, Fujimaki K, Ueda Y, Aoyama Y, Ohtake S, Takita J, Sai E, Taniwaki M, Kurokawa M, Morishita S, Fukayama M, Kiyoi H, Miyazaki Y, Naoe T, Mano H. Recurrent DUX4 fusions in B cell acute lymphoblastic leukemia of adolescents and young adults. Nat Genet 48:569-74. 2016 DOI:10.1038/ng.3535 査読有
7. Itonaga H, Iwanaga M, Aoki K, Aoki J, Ishiyama K, Ishikawa T, Sakura T,

- Fukuda T, Najima Y, Yujiri T, Mori T, Kurokawa M, Nawa Y, Uchida N, Morishita Y, Hashimoto H, Eto T, Hirokawa M, Morishima Y, Nagamura-Inoue T, Atsuta Y, Miyazaki Y. Impacts of graft-versus-host disease on outcomes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for chronic myelomonocytic leukemia: A nationwide retrospective study. *Leukemia Res* 41:48-55. 2016 DOI: 10.1016/j.leukres.2015.12.009  
査読有
8. Nakamura Y, Tanaka Y, Tanaka M, Sugiyama A, Yamamoto K, Tokunaga Y, Yujiri T, Tanizawa Y. Soluble interleukin-2 receptor index predicts the development of acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Int J Hematol* 103:436-43. 2016 DOI: 10.1007/s12185-016-1936-z.  
査読有
9. Nishiwaki S, Imai K, Mizuta S, Kanamori H, Ohashi K, Fukuda T, Onishi Y, Takahashi S, Uchida N, Eto T, Nakamae H, Yujiri T, Mori S, Nagamura-Inoue T, Suzuki R, Atsuta Y, Tanaka J. Impact of MRD and TKI on allogeneic hematopoietic cell transplantation for Ph+ALL: a study from the Adult ALL WG of the JSHCT. *Bone Marrow Transplant* 51:43-50. 2016 DOI: 10.1038/bmt.2015.217  
査読有
10. Sugiyama A, Yujiri T, Tanaka M, Tanaka Y, Nakamura Y, Tanizawa Y. Altered expression of circadian clock genes during peripheral blood stem cell mobilization induced by granulocyte colony-stimulating factor. *Chronobiol Int* 32: 934-41, 2015 DOI: 10.3109/07420528.2015.1053910  
査読有
11. Hayakawa F, Sakura T, Yujiri T, Kondo E, Fujimaki K, Sasaki O, Miyatake J, Handa H, Ueda Y, Aoyama Y, Takada S, Tanaka Y, Usui N, Miyawaki S, Suenobu S, Horibe K, Kiyoi H, Ohnishi K, Miyazaki Y, Ohtake S, Kobayashi Y, Matsuo K, Naoe T. Markedly improved outcomes and acceptable toxicity in adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia following treatment with a pediatric protocol: a phase II study by the Japan Adult Leukemia Study Group. *Blood Cancer Journal* 4: e252, 2014 DOI: 10.1038/bcj.2014.72  
査読有

〔学会発表〕(計6件)

1. Nakamura Y. Significance of TBI/G-CSF-combined high-dose AraC/CY in allogeneic HSCT for myeloid malignancies 第78回日本血液学会学術集会 平成28年10月13日、14日、15日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
2. Tanaka M. A case of intravascular large B-cell lymphoma presenting as refractory autoimmune hemolytic anemia 第78回日本血液学会学術集会 平成28年10月13日、14日、15日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
3. Tanaka Y. Salvage and maintenance therapy using 5-azacitidine after allo-SCT in patients with AML and MDS 第78回日本血液学会学術集会 平成28年10月13日、14日、15日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
4. Sasaki T. Concomitant fulminant myocarditis and HHV6 viremia during uBMT in a patient with PNH 第78回日本血液学会学術集会 平成28年10月13日、14日、15日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
5. Yamamoto K. CSF3R T618I mutation in a patient with chronic neutrophilic leukemia 第78回日本血液学会学術集会 平成28年10月13日、14日、15日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
6. Sugiyama A. The mutation profile of JAC2, CALR, and MPL in Japanese patients with Ph-negative MPNs 第78回日本血液学会学術集会 平成28年10月13日、14日、15日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計1件)

湯尻俊昭 抗原同定(フローサイトメトリー) Principles and Practice 血液・造血器・リンパ系(千葉 滋、長谷川雄一)408(96-100), 文光堂(東京都), 2015

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

湯尻 俊昭 (YUJIRI, Toshiaki)  
山口大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：80346551

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

研究者番号：

なし