

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591413

研究課題名(和文) エネルギー代謝因子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 SIRT1 inhibitors induce cell death in leukaemia 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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：成人T細胞白血病(ATL)は、ヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV-1)の長期潜伏後発症する。これまでにATL患者において長寿遺伝子であるSIRT1が高発現している知見を得ている。本研究では、ATLにおける新規SIRT1阻害剤によるアポトーシスの誘導効果を検討した。

我々が開発した新規SIRT1阻害剤は、白血病細胞株およびATL患者の細胞生存率を低下させた。更に、その細胞死にはアポトーシス及びオートファジーが関与することが明らかとなった。従って、新規SIRT1阻害剤は、ATLに対する有効な分子治療標的薬であり、ATLの予後を改善する治療法開発の基盤になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Adult T-cell leukaemia/lymphoma (ATL) is an aggressive T-cell malignancy that develops after long-term infection with human T-cell leukaemia virus (HTLV)-1. We previously reported that ATL patients had significantly higher SIRT1 protein levels than healthy controls. Here, we demonstrate that two novel small-molecule SIRT1 inhibitors, NCO-01/04, reduced cell viability and enhanced apoptotic cells in peripheral blood monocyte cells of patients with acute ATL, which has a poor prognosis. Interestingly, NCO-01/04 increased the LC3-II-enriched protein fraction, indicating autophagosome accumulation as well as autophagy. Thus, NCO-01/04 simultaneously caused caspase activation and autophagy. These results suggest that NCO-01/04 is highly effective against ATL cells in caspase-dependent or -independent manners with autophagy, and that its clinical application might improve the prognosis of patients with this fatal disease.

研究分野：血液腫瘍学

キーワード：ATL HTLV-1 SIRT1

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 (Tsukasaki et al. *J Clin Oncol* 2007)。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 NAD⁺ を補酵素とするヒストン脱アセチル化酵素のクラスに分類され、ヒストンの他、がん抑制遺伝子である p53、細胞の老化や寿命、参加ストレス応答に関与する FOXO 遺伝子、DNA 損傷応答タンパクである Ku70、細胞生存や TNF- α 産生による炎症反応を制御する NF- κ B などを基質としている。よって、これらタンパクの脱アセチル化は、細胞の老化、寿命、遺伝子発現制御によるアポトーシスに関与しており、老化やがん化など多くの生命機能に関与することも知られている (Bordone et al. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005)。従って、SIRT1 の制御機構の解明及び制御する薬剤は、癌治療応用に重要な意味を持っている。

2. 研究の目的

SIRT1 を標的とする新薬は、ATL 患者における新たな治療薬として期待されている。しかし、ATL をはじめ、造血器腫瘍における SIRT1 の報告は少ないが、申請者は、健常人と比較して ATL 患者の末梢血単核球に SIRT1 タンパクが高発現し、急性転化と共に SIRT1 タンパクが増加したことを明らかにした。そこで、本研究では、SIRT1 を標的とした新規化合物の白血病細胞株に及ぼす影響について検討した。

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、新規 SIRT1 阻害剤である NCO-01 及び NCO-04 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、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。

4. 研究成果

白血病細胞株において NCO-01 及び NCO-04 処理により、有意な細胞生存率の低下が認められた。また、NCO-01/04 処理により ATL 患者 PBMC の細胞生存率の低下が認められたが、健常人の PBMC においては、有意な細胞生存率の低下は認められなかった。

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 NCO-01 及び NCO-04 処理によりアポトーシス細胞の割合が増加した。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。

NCO-01/04 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、NCO-01/04 処理が LC-3 の量を増加させたことから、NCO-01/04 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。

HTLV-1 感染細胞株をはじめとする白血病細胞株において、SIRT1 のノックダウンにより NCO-01/04 による細胞死が抑制されたことから、NCO-01/04 は SIRT1 活性の阻害を介して細胞死を誘導することが示唆された。

以上の結果より、我々が合成した新規 SIRT1 阻害剤は、*in vitro* 及び *ex vivo* において白血病細胞を細胞死に導くことが示唆された。従って、今後、*in vivo* における検討を行うことにより、新規 SIRT1 阻害剤が、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。

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 7 件)

Kozako T, Suzuki T (他 4 名, 1 番目) Anticancer agents targeted to sirtuins. *Molecules* 19: 20295-20313, 2014. (査読有) doi: 10.3390/molecules191220295.

White Y, Yoshimitsu M, Kozako T, (他 6 名, 3 番目) Effects of exogenous interleukin-7 on CD8(+) T-cell survival and function in human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infection. *Leuk Lymphoma* 54: 2243-50, 2013. (査読有) doi: 10.3109/10428194.2013.772174.

Akimoto M, Kozako T, (他 11 名, 8 番目) Assessment of peripheral blood CD4+ adenosine triphosphate activity in patients with rheumatoid arthritis. *Mod*

*Rheumatol.*23: 19-27, 2013. (査読有) doi: 10.1007/s10165-012-0621-1.

Kozako T., Aikawa A, (他 9 名 ,1 番目) High expression of SIRT1, a longevity gene-encoded protein, and induction of apoptosis by its inhibition in adult T-cell leukemia cells. *Int J Cancer* 131: 2044-55, 2012. (査読有) doi: 10.1002/ijc.27481.

Kozako T., Matsumoto N, (他 9 名 , 1 番目) Vasohibin induces prolyl hydroxylase-mediated degradation of hypoxia-inducible factor-1 α in human umbilical vein endothelial cells. *FEBS Lett.* 586: 1067-72, 2012. (査読有) doi: 10.1016/j.febslet.2012.03.007.

Honda SI, Kozako T. (他 3 名 , 2 番目) LIM-homeodomain transcription factor, Lhx2, is involved in transcriptional control of brain-specific promoter/exon 1f of the mouse aromatase gene. *J Neuroendocrinol.* 24: 1367-74, 2012. (査読有) doi: 10.1111/j.1365-2826.2012.02356.x.

Kozako T. Arima N, (他 3 名 , 1 番目) Liposomes and nanotechnology in drug development: focus on oncotargets. *International Journal of Nanomedicine* 7: 4943-4951, 2012. (査読有) doi: 10.2147/IJN.S30726.

[学会発表](計 20 件)

本田伸一郎、小迫知弘ら 核内レセプターによるアロマターゼ遺伝子の転写制御 日本薬学会第 135 年会 神戸学院大学(兵庫県神戸市) 2015.3.28

相川晃慶、小迫知弘ら Compound C、AICAR および Metformin は HTLV-1 感染細胞株の細胞死を誘導する 日本薬学会第 135 年会 神戸学院大学(兵庫県神戸市) 2015.3.28

相川晃慶、小迫知弘ら Compound C、AICAR および Metformin による HTLV-1 感染細胞株の増殖抑制効果 第 31 回日本薬学会九州支部会 第一薬科大学(福

岡県福岡市) 2014.12.7

山口貴広、本田伸一郎、小迫知弘ら アロマターゼの脳特異的プロモーターに存在するシスエレメント、AII サイトに結合する転写因子の解析 第 31 回日本薬学会九州支部会 第一薬科大学(福岡県福岡市) 2014.12.7

本田伸一郎、小迫知弘ら 脳特異的アロマターゼプロモーターの活性に及す Deaf1 の SUMO 化の影響 第 37 回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2014.11.27

小迫知弘、有馬直道 新規 SIRT1 阻害剤による成人 T 細胞白血病細胞の増殖抑制効果に関する検討 第 73 回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2014.9.25

内田友一郎、小迫知弘、鈴木孝禎ら 新規 SIRT1 阻害剤による白血病細胞の細胞死に関する検討 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会 東大医科研(東京都港区) 2014.8.23

相川晃慶、小迫知弘ら Compound C、AICAR および Metformin は AMPK を介さずに HTLV-1 感染細胞株の増殖抑制作用を示す 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会 東大医科研(東京都港区) 2014.8.23

小迫知弘、馬島 礼、鈴木孝禎ら SIRT1 を標的とした成人 T 細胞白血病治療法に関する検討 日本薬学会第 134 年会 熊本大学(熊本県熊本市) 2014.3.28

相川晃慶、小迫知弘ら 成人 T 細胞白血病における AMP 活性化プロテインキナーゼ標的薬による抗腫瘍効果 日本薬学会第 134 年会 熊本大学(熊本県熊本市) 2014.3.28

本田伸一郎、小迫知弘ら Deaf1 タンパク質の機能ドメインの解析 日本薬学会第 134 年会 熊本大学(熊本県熊本市)

2014.3.28

相川晃慶、小迫知弘ら AMPK を標的とした薬剤を用いた新規成人 T 細胞白血病治療法の検討 第 30 回日本薬学会九州支部大会 長崎国際大学(長崎県佐世保市) 2013.12.7

小迫知弘、有馬直道 新規 SIRT1 阻害剤による白血病細胞の増殖抑制効果に関する検討 第 72 回日本癌学会総会 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2013.10.3

馬島 礼、小迫知弘、鈴木孝禎ら 新規 SIRT1 阻害剤による白血病細胞の増殖抑制効果に関する検討 第 6 回 HTLV-1 研究会 東大医科研(東京都港区) 2013.8.23

相川晃慶、小迫知弘ら AMPK 活性化剤による新規成人 T 細胞白血病治療法の検討 第 6 回 HTLV-1 研究会 東大医科研(東京都港区) 2013.8.23

Tomohiro Kozako, Takayoshi Suzuki et al. A novel small-molecule SIRT1 inhibitor induces apoptosis in leukemic cell lines. 16th International Conference of Human Retrovirology; HTLV Holiday Inn (Montreal, Canada) 2013.6.26

本田伸一郎、大下遥子、小迫知弘ら アロマトラーゼの脳特異的発現に関する転写因子 Deaf-1 第 85 回日本生化学会大会 マリンメッセ福岡(福岡県福岡市) 2012.12.16

相川晃慶、小迫知弘ら エネルギー代謝因子 AMPK を標的とした新規成人 T 細胞白血病治療法の検討 第 5 回 HTLV-1 研究会 東大医科研(東京都港区) 2012.8.25

植村陽菜、小迫知弘ら SIRT1 活性化剤による白血病細胞の増殖抑制効果に関する検討 第 5 回 HTLV-1 研究会 東大医科研(東京都港区) 2012.8.25

蒲原裕典、小迫知弘ら エネルギー代謝因子を標的とした成人 T 細胞白血病治療法の検討 日本生化学会九州支部例会 福岡大学(福岡県福岡市) 2012.5.26

〔図書〕(計 2 件)

Yoshimitsu M, Kozako T, Arima N. Prevention of Human T-Cell Lymphotropic Virus Infection and Adult T-Cell Leukemia. T-Cell Leukemia - Characteristics, Treatment and Prevention (ISBN 980-953-307-735-7) InTech 2013.

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 (ISBN: 978-1-61942-999-4) Nova Science Publishers, Inc. 2012.

〔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：
出願年月日：
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/user/seika/web/>

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

鈴木 孝禎 (SUZUKI, Takayoshi)

京都府立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90372838