

概日リズム制御遺伝子を標的とした新たな白血病治療薬の開発

國崎祐哉

九州大学病院 遺伝子細胞療法部

【研究の背景】

体内時計は、生体機能に周期性を与える内因性の自律振動体である。ほ乳類では、CLOCKとBMAL1という時計遺伝子が、*Period(per)*や*Cryptochrome(cry)*遺伝子発現を促進する。発現したタンパク質は結合することで安定化して蓄積し、*Per*および*Cry*遺伝子の発現を抑制する。このループが24時間で1サイクルし、リズムが生み出されている。概日リズムの混乱により様々な癌の発生率が増加することが示されている。最近ではヒト細胞モデルを用いた広範囲の遺伝子 siRNA スクリーニングで、概日リズムに影響する遺伝子が新たに特定され、多くの細胞機能と密接に相互反応を起こすことが明らかにされた¹⁾。AML モデルマウスでは、概日リズム調節因子 Clock と Bmal1 が AML 細胞増殖に必要な因子であることが報告された²⁾。概日リズム調節因子の抑制は、がん幹細胞増殖の抑制や分化を誘導し、抗白血病効果を生み出すことが示唆されるため、その分子や分子間相互作用の阻害が新たな白血病の治療標的となることが予想される。

【目的】

地球上に生息するほぼ全ての生物は、体内に正確に時間を刻む概日リズムを獲得しており、このリズムの異常が、生活習慣病やがんを引き起こすと考えられている。近年新たに、概日リズムの調節遺伝子が急性骨髄性白血病(AML)細胞の増殖に影響を及ぼすことが報告された。概日リズム調節因子の抑制は、がん幹細胞増殖の抑制や分化を誘導し、抗白血病効果を生み出すことが示唆されるため、その分子や分子間相互作用の阻害が新たな白血病の治療標的となることが予想される。AML 治療としての有用性を証明することを本研究の目的とする。

【方法】

化合物ライブラリーのスクリーニングによって得られた概日リズム調節因子の活性を阻害する化合物の抗白血病効果を *in vitro* 及び *in vivo* で検証し、抗がん剤とは異なる作用点を持つ新たな白血病治療の開発を目指す。ヒト白血病細胞株やマウス骨髄腫株を用いて、3種類の化合物(longdaysin, GO289, KL001)の *in vitro* での腫瘍増殖抑制効果を検証した。更に、MLL-AF9 融合遺伝子導入によるマウス白血病モデル作製した³⁾。

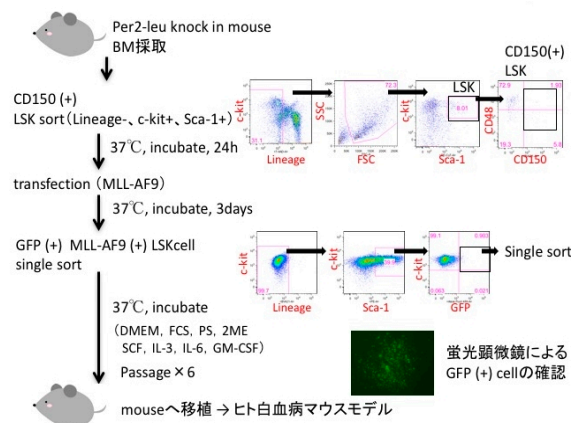
① 3種類の化合物(longdaysin, KL001, GO289)の *in vitro* における抗腫瘍効果を検討した。

各細胞株を様々な濃度(0 μ M, 0.1 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 50 μ M)・時間(24時間, 72時間, 96時間)条件下で培養した。培養は96wellマイクロプレートを用いて triplicate で行った。培養後、Cell counting kit-8(同仁化学研究所)の試薬を加え、450nmで吸光度を測定し、生細胞数を計測した。

① *in vivo* のマウス白血病マウスモデルの作製

in vivo における白血病細胞の概日リズムを観察するために、概日リズム調節因子 Per2 遺伝子に予めルシフェラーゼ(luc)標識をしたマウ

図1 概日リズム観察可能なヒト白血病マウスモデルの作製



ス白血病モデルの作成を行った。研究協力者の廣田准教授(名古屋大学)に Per2-luc マウスの骨髓細胞を提供頂き、前白血病細胞を作成した。Per2-luc マウスの骨髓細胞から造血幹細胞(CD150(+)) LSK (Lineage-, c-kit+, Sca-1+) をソートし、ヒト白血病融合遺伝子 MLL-AF9(GFP+) 遺伝子導入を行った(図 1)。

【結 果】

ルシフェラーゼ導入した U2OS 細胞株を用いた小分子化合物ライブラリーのスクリーニングより概日リズムの主要調節因子の活性を修飾する化合物:longdaysin, KL001、GO289 を同定した⁴⁾(図 2)。

これら3つの化合物が、抗白血病効果を持つか、ヒト及びマウスの血液腫瘍細胞株 K562(ヒト慢性骨髄性白血病)、OCI-AML3(ヒト急性骨髄性白血病)、MDS-L(ヒト骨髓異形成症候群)、5TGM1(マウス骨髓腫)を用いて検討した。longdaysin は、どの細胞株においても増殖抑制効果は得られなかったが、GO289 は、ヒト白血病細胞株(K562、OCI-AML3)、マウス骨髓腫(5TGM1)に対し、KL001 はK562、5TGM1 に対し増殖抑制効果が認められた(図 3)。腫瘍増殖抑制効果が得られた KL001 と GO289 に関し、正常造血細胞への影響を見るために、正常マウスより分離した造血前駆細胞にも同様に処理を行ったが、抑制効果はほぼ認められなかった(図 4)。

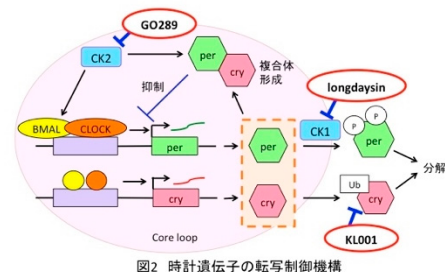


図2 時計遺伝子の転写制御機構

【考 察】

longdaysin は、Casein kinase 1 を阻害することで、PER の分解機能を、KL001 は CRY を阻害することで CRY の分解機能を抑制することを報告している^{5,6)}。GO289 は、PER や CRY の発現を調節する BMAL の発現を制御する Casein kinase2 を抑制することで概日リズムに影響を与えるというデータも得ている(未発表データ)。以上の結果より、これらの化合物は概日リズム修飾分子を標的としている点で、現在使用されている DNA 架橋や、DNA 合成阻害といった抗がん剤とは異なる作用点を持つ抗腫瘍薬となる可能性があると期待される。概日リズム修飾化合物 KL001 や GO289 は、正常造血に影響を与えず、腫瘍特異的に増殖を抑制する腫瘍特異的治療薬となる可能性が示唆された。今後、これらの結果の再現実験を行うと同時に、これらの化合物が、他の抗がん剤と作用増強効果、または拮抗作用があるかなど検討を行う。

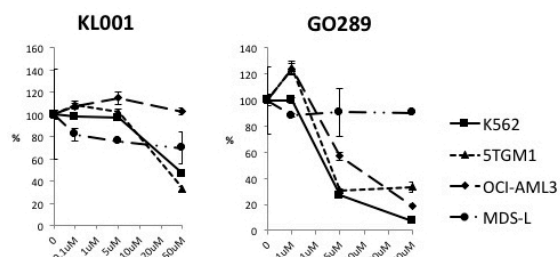


図3 KL001、GO289の各細胞株における増殖抑制

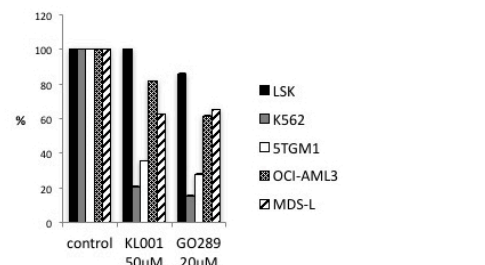


図4 正常造血前駆細胞(LSK)との比較

【臨床的意義・臨床への貢献度】

概日リズムの主要な調節因子を標的とし、腫瘍細胞の増殖抑制と正常造血の促進など抗白血病効果を見出した報告は未だなされていない。抗白血病治療薬の開発においては、従来の抗がん剤とは異なるアプローチであり、難治性造血器腫瘍の治療における新たな側面となり得ると考えられる。AML の新規治療薬探索として欠かせない研究であり、その意義はきわめて高い。

【参考・引用文献】

1. Zhang, E. E. et al. A genome-wide RNAi screen for modifiers of the circadian clock in human cells. Cell 139, 199-210, doi:10.1016/j.cell.2009.08.031 (2009).

2. Puram, R. V. et al. Core Circadian Clock Genes Regulate Leukemia Stem Cells in AML. *Cell* 165, 303–316, doi:10.1016/j.cell.2016.03.015 (2016).
3. Krivtsov, A. V. et al. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL–AF9. *Nature* 442, 818–822, doi:10.1038/nature04980 (2006).
4. Hirota, T. & Kay, S. A. High-throughput screening and chemical biology: new approaches for understanding circadian clock mechanisms. *Chem Biol* 16, 921–927, doi:10.1016/j.chembiol.2009.09.002 (2009).
5. Hirota, T. et al. A chemical biology approach reveals period shortening of the mammalian circadian clock by specific inhibition of GSK-3beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 20746–20751, doi:10.1073/pnas.0811410106 (2008).
6. Hirota, T. et al. Identification of small molecule activators of cryptochrome. *Science* 337, 1094–1097, doi:10.1126/science.1223710 (2012).