

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25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591031

研究課題名（和文） 受容体型チロシンキナーゼROR1による癌化機構解明とその治療応用

研究課題名（英文） Analysis of oncogenic mechanisms induced by receptor tyrosine kinase receptor, ROR1

研究代表者

福田 哲也（FUKUDA TETSUYA）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：70332624

研究成果の概要（和文）：

ROR1 の発現調節について検討し、腫瘍細胞における ROR1 発現に、MYB が強く関わる事が明らかとなった。また、ROR1 を癌関連抗原として、免疫療法の確立を目指し、人工抗原提示細胞の作製し、ROR1 及び、HLA-A24 分子の遺伝子導入し、これを用いて T 細胞を *in vitro* にて培養した所、T 細胞の増殖が得られ、この T 細胞において、ROR1 遺伝子導入細胞に対しての細胞障害活性が認められた。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed the transcriptional regulation of ROR1 and found that MYB induced the ROR1 expression in malignant cells. In parallel, we did *ex vivo* expansion of ROR1-specific cytotoxic T lymphocytes by engineered artificial antigen presenting cells expressing CD137 ligand co-stimulatory molecule

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	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：RORI ・ CLL

1. 研究開始当初の背景

近年、多くのチロシンキナーゼが癌化と深く関わり、これを標的とした、分子標的療法等が治療応用されてきている。受容体型チロシンキナーゼ ROR1 が、慢性リンパ性白血病 (CLL) 細胞に特異的に発現し、癌関連抗原となることを申請者は明らかとしてきた。また、ROR1 の発現が細胞死を抑制する効果がある

ことが示唆されている。

2. 研究の目的

本研究では ROR1 の発現調節機構や、機能の解析を行うことにより、細胞死抑制効果、の機序解明を行う。その上で、そのメカニズムの人為的制御による造血器腫瘍に対する治療応用を目指す。また、ROR1 を標的とした免疫療法の確立についても、検討を行う。

3. 研究の方法

(1) ROR1 の発現を RQ-PCR 法と FACS にて解析した。ROR1 のプロモーター領域、及び第一 intron 内の領域をクローニングし、ルシフェラーゼ遺伝子上流に組み入れ、転写調節能を検討した。また、転写調節領域のシーケンスを用いて、EMSA を行い、結合転写調節因子の検討を行った。MYB 遺伝子や MYBshRNA を導入した際の ROR1 の発現について、検討した。

(2) K562 細胞に、CD64、CD137L 遺伝子を導入し、人工抗原提示細胞を作製した。ここに、日本人で最も頻度の高い HLA A24:02 と ROR1 を遺伝子導入し、HLA 上に ROR1 由来のペプチドが表出されるようにした。この人工抗原提示細胞と、HLA24:02 陽性健康人から得られた CD8 陽性 T 細胞を共培養し、得られた T 細胞の細胞障害性を検討した。

4. 研究成果

(1) ROR1 の発現を FACS, RT-PCR で確認した。ROR1 は慢性リンパ性白血病、マンツル細胞リンパ腫、脾辺縁帯リンパ腫、バーキットリンパ腫のサンプルで高度に発現していた。ROR1 mRNA と細胞表面の ROR1 タンパクの発現レベルには正の相関 ($R^2=0.55$) が見られ ROR1 の発現は主に転写で調整されていた。そこで我々は ROR1 の転写開始点上流 2.5kb をクローニングし、ROR1 陽性細胞および陰性細胞でプロモーターアッセイを行った。ROR1 陽性細胞株である MD901 ではプロモーター活性が著明に増加していたが、ROR1 陽性細胞株だけでなく、陰性細胞株でもプロモーター活性が観察されたことから、この上流部位だけが唯一の制御部位ではないことが示唆された。そこで、我々はおおよそ 230kb と長い部位である Intron 1 の中で種を超えて保存されている部位に転写制御に重要な役割があるのではないかと考えた。

BLAST で検索し、ヒトとラットの ROR1 で 19 か所の保存部位 (CR1-19) を同定した。特に CR3 と CR7 はチキンとも相同性を有していた。我々は CR 部位をクローニングし、転写への役割を検討した。CR3 と CR7 は ROR1 陽性細胞株において選択的にエンハンサーとしてふるまい、他の 4 つの CR 部位では ROR1 陽性細胞株、陰性細胞株の両方で転写を強めていた。したがって、これらのエンハンサーは ROR1 の特異的な発現に貢献している可能性が考えられた。この CR 部位のシーケンスを検討した所、癌原遺伝子である MYB の結合配列が有ることが明らかとなった。実際、EMSA 法によりそのエンハンサー領域に複数の転写結合しうることが明らかとなった。MYB の tag 付き発現ベクターを使った supershift assay

により、同部位への MYB の結合が示唆された。ROR1 陰性細胞への MYB 発現ベクターの導入や、ROR1 陽性細胞への MYB shRNA の導入 (図 1) により、ROR1 の発現は変化し、腫瘍細胞における ROR1 発現に、MYB が強く関わる事が明らかとなった。

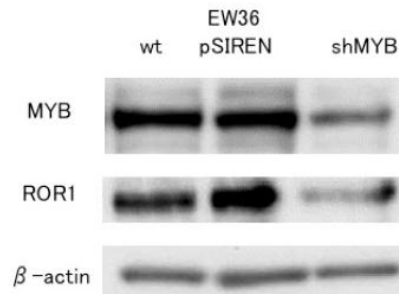


図 1 MYB 発現減弱による ROR1 発現の変化

(2) また、ROR1 を癌関連抗原として、免疫療法の確立を目指し、ヒト K562 細胞株を用いた、人工抗原提示細胞の作製を行った。K562 に、Fc 受容体である CD64 と、共刺激因子 CD137 のリガンドである CD137L を遺伝子導入することで遺伝子改変人工抗原提示細胞 (aAPC) を作製した。この aAPC により、CD3/CD28 抗体存在下で、ヒトおよびマウス T 細胞は細胞増殖が増強することを認めた。次に、aAPC に、HLA-A2402 と ROR1 を遺伝子導入し、ROR1 を発現する aAPC (ROR1-aAPC) を作製した。ROR1-aAPC を用いて、HLA-A2402 陽性健康者の CD8 を、CD28 抗体存在下で、IL-2 を加えて増殖させた。こうして得られた T 細胞を、aAPC とともに培養したところ、T 細胞は ROR1-aAPC に特異的な細胞障害活性を示した (図 2)。この細胞傷害性 T 細胞 (CTLs) は、aAPC による HLA-A2402 拘束性抗原提示を認識して増殖したものと考えられた。こうした ROR1 特異的 CTLs を用いた養子免疫療法が、治療抵抗性 CLL の臨床応用できるものと期待される。

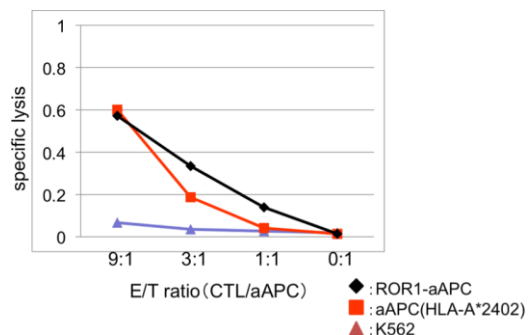


図 2 ROR1-aAPC に対する CTL

(3) ROR1 陽性 CLL 細胞を用いて、免疫調節因子の発現機能解析を行い、CD40 シグナルによ

り、共刺激因子である CD137 の発現が誘導されることを明らかとした (PLOS ONE 2013)

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 件)

Nakaima Y, Watanabe K, Koyama T, Miura O, Fukuda T CD137 Is Induced by the CD40 Signal on Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells and Transduces the Survival Signal via NF- κ B Activation. PLoS One、査読あり 2013 May 16;8(5):e64425. DOI: 10.1371/journal.pone.0064425. Print 2013.

[学会発表] (計 3 件)

① 霞流彩, 渡邊健, 若林志穂子, 遠藤咲恵, 清川歩美, 鈴木敏恵, 工藤秀機, 三浦修, 福田哲也
トリプトファン代謝産物のリンパ系腫瘍に対する効果、Tryptophan metabolites inhibit the proliferation of lymphoma cells
第 73 回日本血液学会学術集会 2012 年 10 月 15 日、名古屋

② Ken Watanabe, Miyu Kato, Shihoko Suwa, Aya Kasubata, Osamu Miura, Tetsuya Fukuda
Transcriptional regulatory mechanisms for ROR1 expression in B cell malignancies
第 74 回日本血液学会学術集会 2012 年 10 月 19 日～2012 年 10 月 21 日、京都

③ 諏訪志穂子、加藤未有、渡邊健、三浦修、福田哲也
Ex vivo 人工抗原提示細胞を用いた腫瘍関連抗原 ROR1 特異的細胞傷害性 T 細胞の誘導、expansion of ROR1-specific cytotoxic T lymphocytes by engineered artificial antigen presenting cells expressing CD137 ligand co-stimulatory molecule 第 74 回日本血液学会学術集会 2012 年 10 月 19 日～2012 年 10 月 21 日、京都

[図書] (計 0 件)

[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

福田哲也 (FUKUDA TETSUYA)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：70332624

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：