

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591398

研究課題名(和文)成人T細胞白血病幹細胞の遺伝子治療

研究課題名(英文)Gene therapy of adult T cell leukemia stem cell

研究代表者

鈴木 紳介 (Suzuki, Shinsuke)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：20437974

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：癌特異的増殖型アデノウイルス(conditionally replicating adenovirus:CRA)による成人T細胞白血病(adult T-cell leukemia:ATL)治療の基礎的確立を目的とした。非増殖型アデノウイルスベクターを用いてヒトT細胞白血病ウイルスI型(HTLV-1)感染T細胞株への導入・発現条件を明らかにし、サービンプロモーター依存性CRA(Surv.CRA)の殺細胞効果を明らかにした。6種類のATL細胞株とくすぶり型、慢性型ATL患者由来の細胞で、Surv.CRAの感染、増殖そして殺細胞効果を確認した。一方健康人由来の末梢血リンパ球では、認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Adult T-cell leukemia (ATL) develops after long-term infection with the human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1). Survivin-responsive conditionally replicating adenoviruses (Surv.CRAs) in which expression of the adenoviral early region 1A (E1A) gene is regulated by the survivin promoter, has been demonstrated to treat a variety of cancers. Six ATL cell lines were infected with Surv.CRAs at a various multiplicity of infection. The survivin promoter was strongly activated in 6 cell lines. Moreover, the expression of the coxsackie and adenovirus receptor (CAR), important for cell infection by adenoviruses, was highly upregulated in these cell lines. In contrast, weak activation of the survivin promoter and low expression of CAR were observed in peripheral blood lymphocytes (PBLs) of healthy subjects. Surv.CRAs efficiently replicated and induced cell death in 5 out of 6 cell lines compared to minimal viral replication in normal PBLs, in which there was no significant cytotoxicity.

研究分野：造血器腫瘍

キーワード：癌特異的増殖型アデノウイルス 成人T細胞白血病 サービピン

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (Human T cell leukemia virus type I: HTLV-1) は成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) の原因ウイルスである。我が国においては、特に鹿児島などの南九州を中心として、約 20 万人もの感染者が存在し、毎年 100 人以上の ATL 患者が発生している。現在、急性型・リンパ腫型・予後不良因子を有する慢性型 ATL には、10 種類前後の抗癌剤を組み合わせる周期的に投与する多剤併用化学療法が基本で、一部の症例に治癒を目指した大量化学療法併用の同種幹細胞移植が施行されているが、決定的な治療法は確立されていない。

(2) 近年、癌治療には癌特異的増殖型アデノウイルス (conditionally replicating adenovirus: CRA) ベクターが有望視されている。アポトーシス抑制タンパクであるサービビン (Survivin) を特異的に発現している胃・肝・大腸癌細胞において、サービビンプロモーター依存性 CRA (Surv.CRA) を用いた基礎的検討が報告されている (Kamizono et al. *Cancer Res*, 2005)。ATL 患者白血病細胞と HTLV-1 感染 T 細胞株においても、Survivin が高発現していることが明らかとなっており (Che et al. *Blood*, 2006)。Surv.CRA は大変魅力的な治療ツールである。

(3) 白血病幹細胞を含むすべての HTLV-1 感染細胞で、3' 側プロウイルスは保存されており、HTLV-1 マイナス鎖にコードされる HTLV-1 bZIP factor (HBZ) 遺伝子は発現している (Satou et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2006)。HBZ プロモーターの 300 塩基配列はすでに同定されている。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、CRA による ATL 治療の基礎的確立を目的とする。ATL では、アポトーシス抑制タンパクである Survivin が高発

現していることが明らかとなっている。

(2) CRA はプロモーター遺伝子を改変することにより、白血病を再発させる白血病幹細胞と呼ばれる少数の細胞を標的とすることが可能である。白血病幹細胞を含むすべての HTLV-1 感染 T 細胞で発現していると考えられる HBZ.CRA の作成に着手した。

3. 研究の方法

(1) 非増殖型アデノウイルスベクターを用いて HTLV-1 感染 T 細胞株と ATL 患者白血病細胞の至適導入・発現条件を明らかにする目的で、2 種類の ATL 細胞株 (S1T, Su9T01)、3 種類の HTLV-1 感染 T 細胞株 (Oh13T, K3T, F6T) と MT-2、6 種類の細胞株と 3 例の低悪性度 ATL 患者白血病細胞を使用した。健常人由来の末梢血単核球 (PBLs) を陰性コントロールとした。Surv.CRA が ATL 特異的に殺細胞効果を示す必要条件である Survivin プロモーターの活性を評価するため、Survivin promoter 依存性・LacZ 遺伝子発現・非増殖型アデノウイルスベクター (Ad.Surv-LacZ) CAR を用いた (Kamizono, J. et al., *Cancer Res.*, 2005)。CAR の発現は、RmcB 抗体を phycoerythrin で標識し、フローサイトメーターで解析した。至適導入・発現条件を明らかにするために、Survivin プロモーターの下流に enhanced green fluorescent protein (EGFP) を内包させた Surv.CRA を用いた (Kamizono, J. et al., *Cancer Res.*, 2005)。Surv.CRA を用いて HTLV-1 感染 T 細胞株と ATL 患者白血病細胞への殺細胞効果を明らかにするため、3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) アッセイで評価した。

(2) HBZ プロモーターの 300 塩基配列を、遺伝子工学的手法により人工的に DNA 合成し、ATL 幹細胞を標的にできる HBZ.CRA 作

成の足がかりとする。

4. 研究成果

(1) S1T を除くすべての細胞株で高い Survivin プロモーター活性を示した (Figure 1)

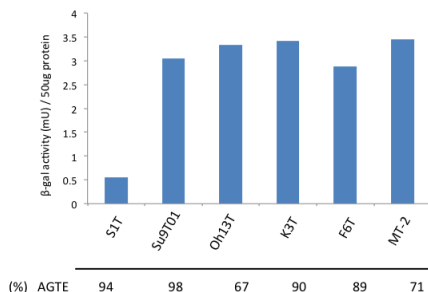


Figure 1. *Survivin* promoter activity and AGTE. β-gal enzyme activity was detected 48 hours after infection with Ad.Surv-LacZ at an MOI of 30. Columns, mean of three independent experiments. AGTE is presented as the percentage of EGFP-stained cells observed among the total cells at 48 hours after Ad.E1 infection at an MOI of 30.

また ATL 細胞株と、HTLV-1 感染 T 細胞株では、健常者 PBLs に比較して CAR の高発現を認めた (Figure 2)

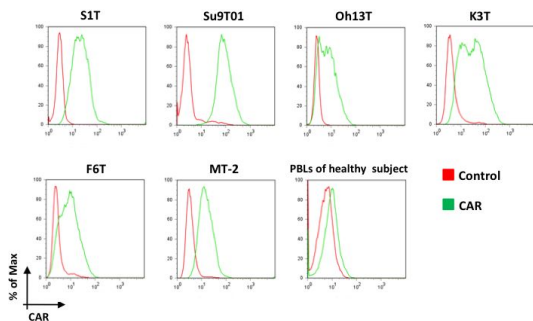


Figure 2. Flow cytometric analysis of CAR expression in ATL cell lines and HTLV-1 infected T-cell lines. CAR was labeled using the primary antibody RmcB and isotype control, with a phycoerythrin-linked, secondary antibody.

K3T 細胞株を用いた解析では、感染した Surv.CRA は時間とともに増殖し、48 時間後には 98.8%の細胞に感染したが、非増殖型の Ad. E1 は、55.3%の感染率に留まった。6 細胞株中 5 細胞株で Surv.CRA の殺細胞効果を認めたが、健常者 PBLs には認めなかった (Figure 3)

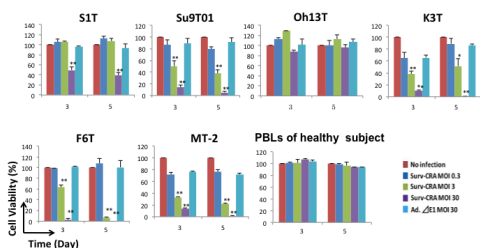


Figure 3. Cytotoxic effects of Surv. CRA in ATL cell lines and HTLV-1 infected T cell lines. Cells were infected with Surv.CRA or Ad. ΔE1 at a various MOI. Cell viability was determined by MTT assay 3 or 5 days after infection. *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.001$ (statistical significance in comparison with the Ad. ΔE1 infection).

(2) HBZ プロモーターの 300 塩基配列を、遺伝子工学的手法により人工的に DNA 合成に成功し、現在 HBZ.CRA を作成中である。

<引用文献>

Che XF, Zheng CL, Owatari S, Mutoh M, Gotanda T, Jeung HC, Furukawa T, Ikeda R, Yamamoto M, Haraguchi M, Arima N, Akiyama S. Overexpression of survivin in primary ATL cells and sodium arsenite induces apoptosis by down-regulating survivin expression in ATL cell lines. *Blood*. 2006 Jun 15;107(12):4880-7.

Kamizono J, Nagano S, Murofushi Y, Komiya S, Fujiwara H, Matsuishi T, Kosai K. Survivin-responsive conditionally replicating adenovirus exhibits cancer-specific and efficient viral replication. *Cancer Res*. 2005 Jun 15;65(12):5284-91.

Satou Y, Yasunaga J, Yoshida M, Matsuoka M. HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jan 17;103(3):720-5.

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0件)

[学会発表](計1件)

Suzuki S, Kofune H, Uozumi K, White Y, Yoshimitsu M, Kozako T, Matsushita K, Kawad H, Hamada H, Inoue H, Nakamura D, Hyashida M, Kosai K and Arima N., Induction of cell death in Adult T-cell leukemia

cell lines by survivin-responsive
conditionally replicating
adenoviruses., 日本血液学会, 2011
年 10 月 15 日「名古屋国際会議場(愛
知県名古屋市)」.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：サービンプロモーターを含む
増殖制御型ウイルスベクターによる
造血器腫瘍の遺伝子治療

発明者：鈴木紳介、有馬直道、小財 健
一郎

権利者：国立大学法人 鹿児島大学

種類：特許

番号：特願 2010-070942

出願年月日：平成 22 年 3 月 25 日

国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 紳介 (SUZUKI, Shinsuke)

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科先進
治療科学専攻臨床腫瘍学講座・特任助教
研究者番号：20437974

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

小財 健一郎 (KOSAI, Kenichirou)

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科先進
治療科学専攻 運動機能修復学講座遺伝
子治療・再生医学分野・教授

研究者番号：90301663