

平成30年6月22日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06911

研究課題名(和文) 発がんウイルスであるHTLV-1を標的にした遺伝子組み替えウイルス療法

研究課題名(英文) Genetically modified virus therapy targeting HTLV-1, a carcinogenic virus

研究代表者

鈴木 紳介 (Suzuki, Shinsuke)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任講師

研究者番号：20437974

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)：ヒトT細胞白血病ウイルスI型(Human T cell leukemia virus type I: HTLV-1)を標的にした特異的増殖型アデノウイルス(conditionally replicating adenovirus: CRA)による新規治療の確立を目的とした。HTLV-1は成人T細胞性白血病(adult T-cell leukemia: ATL)の原因ウイルスである。HTLV-1感染細胞で、HTLV-1 bZIP factor (HBZ) 遺伝子は発現していることを再確認した。HTLV-1感染細胞のみを根絶する、HBZプロモーター依存性CRA (HBZ.CRA)を開発している。

研究成果の概要(英文)：We aimed to establish a novel treatment by conditionally replicating adenovirus (CRA) targeted to human T cell leukemia virus type I (HTLV-1). HTLV-1 is a causative virus of adult T-cell leukemia (ATL). We reconfirmed that the HTLV-1 bZIP factor (HBZ) gene is expressed in HTLV-1 infected cells. We are developing HBZ promoter-dependent CRA (HBZ.CRA) that eradicates only HTLV-1 infected cells.

研究分野：造血器腫瘍

キーワード：成人T細胞性白血病 特異的増殖型アデノウイルス HTLV-1 bZIP factor

1. 研究開始当初の背景

(1) **日本人のがんリスク要因において、慢性感染症は、喫煙を凌ぎ第1位の原因である**(Inoue M et al. *Ann Oncol.* 2012)。特に発がんウイルスへの抗ウイルス療法の確立は喫緊の課題である。抗ウイルス療法の発がん抑制はC型肝炎ウイルス (Hepatitis C virus: HCV) からの肝細胞がん抑制において最も大きな成功をおさめた。HCV感染による炎症の持続により肝線維化が惹起され、肝硬変や肝細胞がんへと進展する (Kiyosawa et al. *Hepatology*, 1990) が、初回 Peginterferon alpha+Ribavirin の併用療法による、発がんリスクの減少は多数の臨床試験で証明された (Fried et al. *N Engl J Med*, 2002; Hadziyannis J et al. *Ann Intern Med*, 2004; MacHutchinson et al. *N Engl J Med*, 2009)。

(2) ヒトT細胞白血病ウイルスI型 (Human T cell leukemia virus type I: HTLV-1) はレトロウイルス科に属し、成人T細胞性白血病 (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、高悪性度ATLに対してのみ、多剤併用化学療法、また一部の症例に治療を目指した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。**更にくすぶり型と慢性型に分類される低悪性度ATLは、高率に高悪性度ATLに進展するにも関わらず、全く治療介入されていないのが我が国の現状である** (Tsukasaka et al. *J Clin Oncol*, 2010)。海外ではATL治療に抗ウイルス・生体応答調節作用を有するインターフェロン (Interferon: IFN) α とヒト免疫不全ウイルス1型 (human immunodeficiency virus type 1: HIV-1) 治療薬である逆転写酵素阻害剤であるアジドチミジン (azidothymidine: AZT) の併用が広く行われている。近年、**低悪性度ATLに対してIFN α /AZTが日本での無治療経過観察よりはるかに優れた治療法であると報告された** (Bazarbachi et al. *J Clin Oncol*, 2010)。しかし、HTLV-1はHIV-1と比較して非常に低いウイルス変異率であることから、その増殖機構には大きな違いがあることが判明している。逆転写反応は変異がしやすいDNA複製ステップであり、HIV-1の高いウイルス変異率の所以である。一方HTLV-1が増殖する際には、プロウイルス

はゲノムに組み込まれて、変異率が低い宿主のDNA複製酵素で複製され、逆転写酵素の関与は極めて乏しい。従って**IFN α /AZT療法の作用機序はHTLV-1感染**

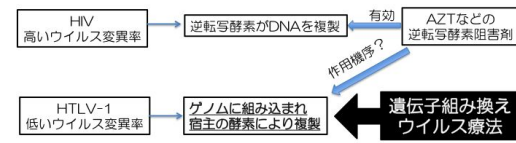


図1. HIVとHTLV-1の複製機構による抗ウイルス療法戦略の違い **において不透明なままである(図1)**。抗ウイルス療法によるHTLV-1感染症の制圧は、感染者数の多い我が国が挑戦しなくてはならない課題である。

(3) 特異的増殖型アデノウイルス (conditionally replicating adenovirus: CRA) は、がん特異的に発現している遺伝子を標的にして、主にがん治療として発達してきた。既に我々はサービピンプロモーター依存性CRA (Surv.CRA) のHTLV-1感染T細胞株への殺細胞効果を報告している (Suzuki et al. 15th EHA 2010)。

2. 研究の目的

(1) **今回我々は革新的な、HTLV-1由来の遺伝子を標的にしたCRAによる低悪性度ATLへの抗ウイルス療法を確立するための研究を行った。**

(2) 前述したようにHTLV-1は、感染細胞のクローン増殖によって維持されている。これまで、HTLV-1がコードするtaxは、発がん等を含めて様々な病態と関連することが多くの研究結果から報告されてきた (Matsuoka. *Retrovirology*, 2005)。しかし実際のATL細胞ではしばしばtax遺伝子を発現出来ない変異・欠失を有している。一方、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. *PNAS*, 2006)。非感染細胞での発現は無いため、**HBZプロモーター依存性CRA (HBZ.CRA) は、正常細胞への影響は皆無で、HTLV-1感染細胞のみを根絶する理想的な抗ウイルス療法となりうる(図2)。**

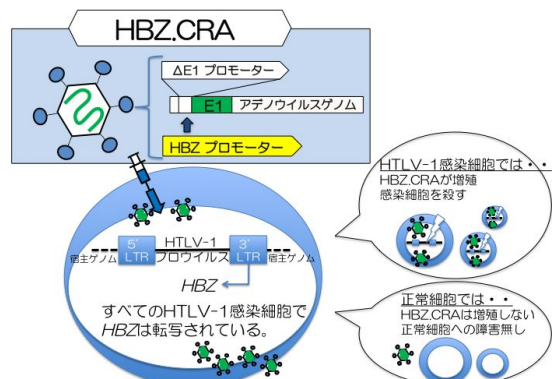


図2. HBZ.CRAでめざす革新的な抗HTLV-1療法

3. 研究の方法

(1) すでに同定されているHBZプロモータ

-300 塩基配列と tax プロモーターの 754 塩基配列を遺伝子工学的的手法により人工的に DNA 合成をすることが可能である。コントロールとしてプロモーター活性を減弱させた変異体クローンも作成する。

(2) HBZ プロモーターと tax プロモーターの活性を評価するため、遺伝子工学的的手法により人工的に合成した DNA を、プロモーターレポーターベクターである、pMetLuc2-レポーターベクターの Multiple Cloning Site にクローニングした。

(3) 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 種類の細胞株を使用した。

(4) 遺伝子工学的的手法により新しい CRA、HBZ.CRA と tax プロモーター依存性 CRA (tax.CRA) を作成する。

(5) HBZ.CRA と tax.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]-2,5diphenyl tetrazolium bromide (MTT) アッセイで評価する。

ATL 幹細胞を標的にできる HBZ.CRA 作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。健康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 pycoerythrin 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]-2,5diphenyl tetrazolium bromide (MTT) アッセイで評価した。

4. 研究成果

(1) 300 塩基対の HTLV-1 bZIP factor (HBZ) プロモーター遺伝子を人工的に DNA 合成した (a)。HBZ プロモーターは、Sp1 が重要な転写因子であることが同定されている (Sugata K et al. *Blood*, 2012)。従って、コントロールとしてプロモーター活性を減弱させた変異体クローン (b-e) も作成した。

(a). 3' LTR 300 (1-300) spans positions -354 to -54、

5' -GCGTCCGCCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGCCTTTGTCCGGCGCTCCCTTGGAGCCTACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTTGCCTGACCCTGCTTGCTCAACTCTACGTCTTTGTTTTCTGTTCTGCGCCGTTACAGATCGAAAGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATT CACGACTGACTGCCGGCTTGCCACGGCCAAGTACCGGCGACTCCGTTGGCTCGGAGCCAGCAGCCCATCTATAGCACTCTCAGGAGAGAAATTTAGTACACAT-3'

(b). 3' LTR 240 (61-300) spans positions -299 to -54、

5' -GCGTCCGCCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGCCTTTGTCCGGCGCTCCCTTGGAGCCTACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTTGCCTGACCCTGCTTGCTCAACTCTACGTCTTTGTTTTCTGTTCTGCGCCGTTACAGATCGAAAGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATT CACGACTGACTGCCGGCTTGCCACGGCCAAGTACCGGCGACTCCGTT-3'

(c). 3' LTR 180 (121-300) spans positions -234 to -54、

5' -GCGTCCGCCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGCCTTTGTCCGGCGCTCCCTTGGAGCCTACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTTGCCTGACCCTGCTTGCTCAACTCTACGTCTTTGTTTTCTGTTCTGCGCCGTTACAGATCGAAAGTTCCACCCCTT-3'

(d). 3' LTR 120 (181-300) spans positions -174 to -54、

5' -GCGTCCGCCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGCCTTTGTCCGGCGCTCCCTTGGAGCCTACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTTGCCTGACCCTGCTTGCTCAA-3'

(e). 3' LTR 300 Sp1 binding domain mutant (1.2.3)

5' -GCGTCCGCCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGCCTTTGTCCGGCGCTCCCTTGGAGCCTACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTTGCCTGACCCTGCTTGCTCAACTCTACGTCTTTGTTTTCTGTTCTGCGCCGTTACAGATCGAAAGTTCCCTAACCTTTCCCTTTCATT CACGACTGACTGCCGGCTTGCCACGGCCAAGTACCGGCGACTCCGTTGGCTCGGATAAAGCGACATAACATCTATAGCACTCTCAGGAGAGAAATTTAGTACACAT-3' (下

線部が、Sp1 結合部位で変異導入部位)
(2)pMetLuc2-reporter ベクターに上記の人工合成した HBZ プロモーターと tax プロモーターを挿入し、領域の塩基配列解析を行った。
(3)pMetLuc2-reporter ベクターを使用して、HTLV-1 感染細胞、あるいは成人 T 細胞性白血病 (adult T-cell leukemia:ATL)を使用した HBZ プロモーター活性測定実験を施行中である。
(4)HBZ.CRA と tax.CRA は現在作成中である。
(5)HBZ.CRA と tax.CRA 合成成功次第にその殺細胞性効果を評価する方針である。
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)

Shinsuke Suzuki, Hiroki Kofune, Kimiharu Uozumi, Makoto Yoshimitsu, Naomichi Arima, Kenji Ishitsuka, Shin-ichi Ueno, and Ken-ichiro Kosai, A survivin-responsive, conditionally replicating adenovirus induces potent cytotoxic effects in adult T-cell leukaemia/lymphoma, Scientific Reports 2018.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

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・特任講師

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

上野 真一 (UENO, Shinichi)

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・特任講師

研究者番号 : 40322317

魚住 公治

独立行政法人国立病院機構鹿児島医療 センター(臨床研究部)・腫瘍内科部長

研究者番号 : 90253864

(4)研究協力者

()