

令和元年6月4日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19185

研究課題名(和文) 選択的抗ATL効果作用を有する新規薬剤TMNAAの作用機序解析

研究課題名(英文) Microarray Analysis of the mechanism of action of novel drug TMNAA with selective anti-ATL activity

研究代表者

外山 政明(Masaaki, Toyama)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：80747600

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：成人T細胞白血病(ATL)はHTLV-1の感染が原因で起こる致死的な造血器悪性腫瘍であり、現在のところ有効な治療法は確立されていない。これまでに我々は、選択的な抗ATL効果を有するTMNAAを同定しており、本研究は、選択的な抗ATL効果を有するTMNAAの作用機序解析を目的としている。作用機序解析のため、マイクロアレイ解析を行ったが、薬剤処理されたATL細胞株において共通する遺伝子発現の増減については得られなかった。一方で、TMNAAがATL細胞に対しアポトーシスを誘導することで抗ATL効果を示すことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成人T細胞白血病(ATL)はHTLV-1の感染が原因で起こる致死的な悪性腫瘍であり、未だ有効な治療法は確立されていない。本研究は、選択的な抗ATL効果を有するTMNAAの作用機序の網羅的解析を行った。しかし、本解析法では決定的な遺伝子群は同定されなかった。一方、TMNAAはアポトーシスを誘導することでATL細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。このことから、TMNAAはユニークな作用機序を有することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Adult T-cell leukemia (ATL) is caused by infection with HTLV-1, and there is no effective treatment for ATL. We have found that TMNAA is potent and selective inhibitor of the ATL. In this study, we evaluated the mechanism of action of TMNAA for ATL using DNA microarray. However, we did not obtain the common gene expression to TMNAA treated ATL cell lines. On the other hand, we found that the inhibitory effect of TMNAA for ATL cell lines exert anti-ATL effect by inducing apoptosis.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：TMNAA マイクロアレイ ATL

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

成人T細胞白血病(ATL)はヒトレトロウイルスであるHuman T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)の感染が原因で起こる致死的な造血器悪性腫瘍である。ATLは、一旦発症すると他の白血病や悪性リンパ腫と比較して予後の極めて悪い白血病で、現在のところ有効な治療法は確立されていない。ATLの治療は病型分類に従って行われている。急性型やリンパ腫型に対しては、悪性リンパ腫に準じた強力な化学療法(mLSG15やCHOP療法など)を行うことにより、初回治療では80%以上の症例を寛解に導入できる。しかし、その寛解期間は非常に短く、再び急速に腫瘍細胞の増殖・浸潤が始まる。また、造血幹細胞移植や抗CCR4抗体療法も用いられているが、造血幹細胞移植は寛解期などの一部の症例にしか適用できず、一方、抗CCR4抗体療法は非常に有効であるが、重篤な皮膚症状等の副作用が問題となっている。したがって、有効なATL治療法の確立が急務とされている。

以上の背景から、申請者はこれまでにATLの治療法の確立を目的として、選択的にATL細胞の増殖を抑制する新規薬剤の探索を行ってきた。具体的には、ATL発症患者から樹立されたATL細胞株のS1T細胞とHTLV-1非感染T細胞株のMOLT-4細胞を用いて、ランダムスクリーニングを行い、ATL細胞選択的に細胞増殖抑制作用を有するテトラヒドロテトラメチルナフタレン骨格を有するTMNAA及びその誘導体MN417を同定した。しかし、TMNAAはこれまでに報告されているATL患者由来のPBMCやATL細胞株において高(低)発現している遺伝子であるTSLC1, TCF8, FACN1などには影響しない。また、ATL発症に深く関与しているウイルス遺伝子のTaxタンパク質、HBZのRNAやHBZタンパク質、そしてこれらによって調節されるNF- κ Bにも影響を与えない。

以上の事から、TMNAAの作用機序(標的分子)を明らかにする事で、選択的な抗ATL効果を有する新規薬剤の開発に寄与するものと考えられ、本研究内容を着想するに至った。

2. 研究の目的

HTLV-1の感染が原因で起こるATLは、一旦発症すると致死的な造血器悪性腫瘍であり、現在、ATLに対する有効な治療法は確立していない。そこで本研究は、選択的な抗ATL効果作用を有する低分子化合物TMNAAの作用機序(標的分子)を明らかにすることを目的とする。TMNAAの作用機序(標的分子)が明らかとなれば、臨床応用可能なATLに対する新規分子標的薬開発の一助となると思われる。

3. 研究の方法

(1) ATL細胞株(S1T細胞, Su9T01細胞)及びHTLV-1感染細胞株(MT-2細胞)、その比較対照としてHTLV-1非感染細胞株(MOLT-4細胞)を用いて、DNAマイクロアレイ解析を行った。

(2) 抽出された遺伝子の発現をRT-PCR法及びウェスタンブロット法を用いて検討した。

(3) TMNAAのアポトーシス誘導について、ウェスタンブロット法及びフローサイトメトリー法を用いて検討した。

4. 研究成果

DNAマイクロアレイ解析からWntシグナル経路の下流に存在する転写因子が上昇していることが確認されたため、TMNAAがWntシグナル経路に与える効果をATL細胞株であるS1T細胞を用いてReal time RT-PCR法により検討を行った。その結果、TMNAAで処理された細胞は未処理細胞に比べて、Wntシグナル経路の下流にあるTCF7L2遺伝子が上昇していた。しかしながら、Wntファミリーの遺伝子発現には影響を与えなかった。このことからTMNAA処理によるTCF7L2遺伝子の発現上昇はWntシグナル経路を介したものではないことが示唆された。

次に、ATL細胞株のS1T細胞株、Su9T01細胞株、HTLV-1感染細胞株のMT-2細胞株に共通して遺伝子発現が2倍以上増加している遺伝子及び1/2倍以下減少している遺伝子を抽出した。抽出された遺伝子からHTLV-1非感染細胞株であるMOLT-4細胞株では増減のない遺伝子を抽出した。しかしながら、抽出された遺伝子群はこれまでにATL細胞株やATL患者末梢血単核細胞を用いたマイクロアレイ解析で報告のある遺伝子群との重複はなかった。また、エンリッチメント解析、パスウェイ解析等を行った結果、有意な結果は得られなかった。そのため、新規化合物TMNAAは当然ながらmRNAにも影響は与えているが、DNAマイクロアレイだけの解析からは作用機序(標的分子)は明らかとはならなかったため、タンパク質やマイクロRNA等の網羅的解析も含めて検討を行う必要があることが示唆された。

一方、TMNAAはATL細胞株に選択的な細胞増殖抑制効果を有し、その効果がアポトーシス誘導であるかの検討をAnnexin V及びPI染色によりフローサイトメトリー法とアポトーシスの実行に大きく関わるカスパーゼをウェスタンブロット法により検討を行った。その結果、TMNAAで処理されたS1T細胞は時間依存的にAnnexin Vが増加し、また、カスパーゼタンパク質が増加した。これらに加えて、アポトーシスを阻害する化合物(Z-VAD-FMK)を用いて、アポトーシスが阻害されるかの検討を行った。その結果、Z-VAD-FMKで前処理されたS1T細胞は、TMNAA単独で処理された細胞よりもAnnexin V及びカスパーゼタンパク質が減少した(図1及び2)。このことからTMNAAはアポトーシスを誘導することで抗ATL効果を発揮することが示唆された。

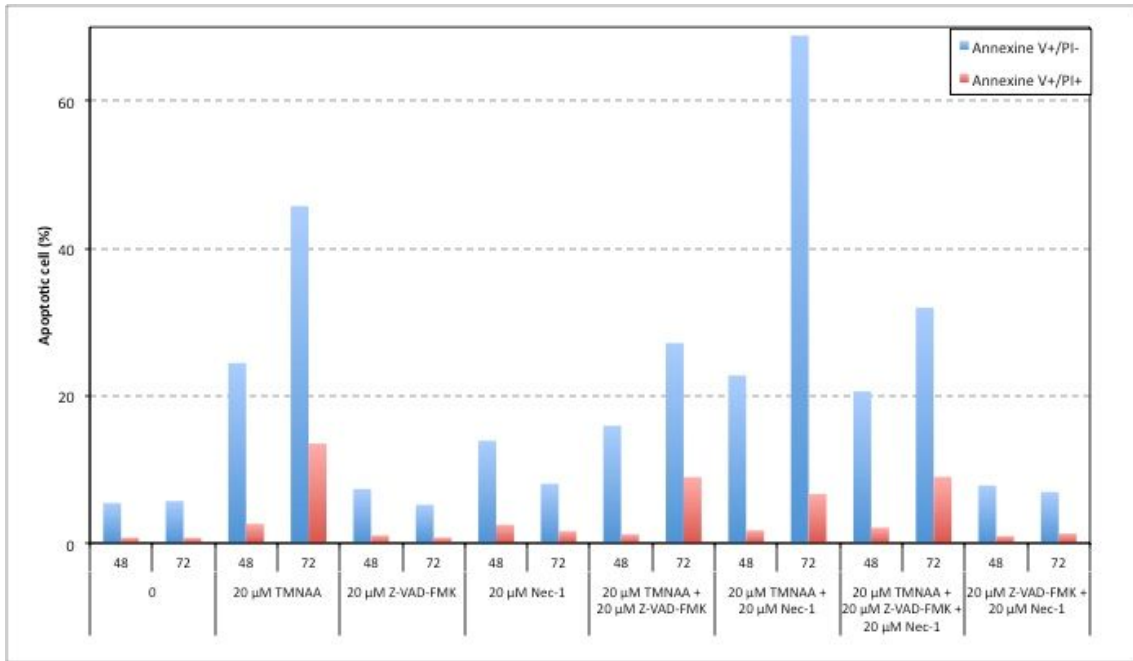


図1. TMNAAのS1T細胞に対するアポトーシス誘導効果作用. S1T細胞を20 μM TMNAAで48, 72時間処理後に全タンパク質を抽出した. 48, 72時間培養後, S1T細胞をAnnexin V及びPIにて染色後, フローサイトメトリーを用いて解析した.

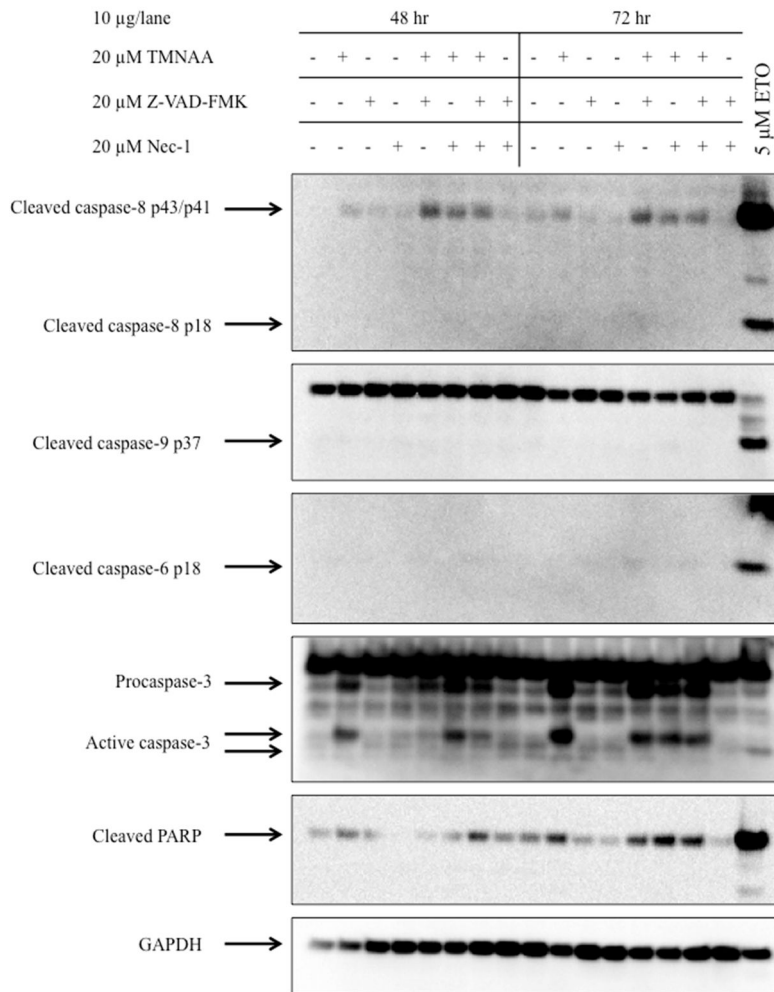


図2. TMNAAのS1T細胞に対するアポトーシス誘導因子に対する効果. S1T細胞を20 μM TMNAAで48, 72時間処理後に全タンパク質を抽出した. 抽出したタンパク質10 μgをウェスタンブロット法により検討した.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

1. M. Okamoto, A. Hidaka, M. Toyama, M. Baba. Galectin-3 is involved in HIV-1 expression through NF- κ B activation and associated with Tat in latently infected cells. *Virus Research* 2018;260:86-93. 査読あり
2. Y. Sakurai, N. Sakakibara, M. Toyama, M. Baba, Robert A. Davey. Novel amodiaquine derivatives potently inhibit Ebola virus infection. *Antiviral Research* 2018;160:175-182. 査読あり
3. M. Baba, M. Toyama, N. Sakakibara, M. Okamoto, N. Arima, M. Saijo. Establishment of an antiviral assay system and identification of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus inhibitors. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 2017;25(3):83-89. 査読あり
4. T. Uto, T. Akagi, M. Toyama, M. Akashi, M. Baba. Induction of innate and adaptive immunity with a polyion complex nanoparticle adjuvant carrying human immunodeficiency virus type-1 gp120. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 2017; 13:848-857. 査読あり

〔学会発表〕(計8件)

1. M. Toyama, T. Hamasaki, M. Okamoto, M. Ikeda, K. Watashi, T. Wakita, A. Yamashita, K. Moriishi, A. Sharon, M. Baba. Neplanocin A derivatives as selective inhibitors of HBV transcription. 31st International Conference on Antiviral Research, ポスター, 2018年6月12-14日, ポルトガル.
2. M. Toyama, N. Sakakibara, M. Okamoto, M. Ikeda, K. Watashi, T. Wakita, M. Baba. Anti-HBV activity of novel pyrimidotriazinone derivatives through the inhibition of viral nucleocapsid assembly. 2018 International HBV Meeting, ポスター, 2018年10月3-6日, イタリア.
3. 外山政明, 岡本実佳, 池田正徳, 渡士幸一, 脇田隆字, Ashoke Sharon, 馬場昌範. Neplanocin A 誘導体の HBV cccDNA から HBV RNA への転写抑制効果について. 第28回抗ウイルス療法学会総会, 口頭, 2018年6月7-9日, 札幌.
4. 横田璃里, 橋本 駿, 渡邊いく子, 伊東祐二, 外山政明, 岡本実佳, 馬場昌範. CD70 を標的とする抗 ATL 抗体薬物複合体の開発研究. 第5回日本 HTLV-1 学会学術集会, ポスター, 2018年8月31-9月2日, 東京.
5. M. Toyama, N. Sakakibara, T. Hamasaki, M. Okamoto, K. Watashi, T. Wakita, M. Baba. Anti-hepatitis B virus (HBV) activity of novel pyrimidotriazinone derivatives through the inhibition of viral nucleocapsid assembly. 30th International Conference on Antiviral Research, ポスター, 2017年5月21-24日, アメリカ.
6. M. Baba, M. Toyama, N. Sakakibara, M. Okamoto, M. Saijo. Establishment of an antiviral assay system and identification of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) inhibitors. ポスター, 30th International Conference on Antiviral Research, ポスター, 2017年5月21-24日, アメリカ.
7. 外山政明, 濱崎隆之, 岡本実佳, 渡士幸一, 脇田隆字, Ashoke Sharon, 馬場昌範. 抗 HBV 効果を有する Neplanocin A 誘導体の作用機序解析. 口頭, 第26回抗ウイルス療法学会総会, 2017年5月18日, 熊本.
8. 馬場昌範, 外山政明, 榊原紀和, 岡本実佳, 西條政幸. 抗 SFTSV アッセイ系の構築とアモジアキン誘導体の抗 SFTSV 効果. 第26回抗ウイルス療法学会総会, 口頭, 2017年5月18日, 熊本.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者: なし

(2)研究協力者: なし