

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390153
 研究課題名（和文）：表面糖鎖を標的とした成人 T 細胞白血病に対する抗体療法に関する研究
 研究課題名（英文）：Studies of antibody therapy for treatment of adult T-cell leukemia targeting surface carbohydrate molecules
 研究代表者
 馬場 昌範 (BABA MASANORI)
 鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
 研究者番号：70181039

研究成果の概要（和文）：DNA マイクロアレイ法を用いた成人 T 細胞白血病（ATL）細胞株と human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) 非感染 T 細胞株における遺伝子発現の網羅的比較検討により、ATL 細胞特異的に高発現している CD70 分子を同定した。さらに、糖転移酵素遺伝子の発現解析と質量分析法による網羅的糖鎖解析を行い、ATL 細胞株特異的糖鎖の存在を確認するとともに、新規開発したリンカーを用いて、ATL 細胞に特異的な糖鎖を固定化したシュガーチップを作製することに成功した。また、ファージディスプレイライブラリーを用いて、ATL 細胞株に特異的に高発現している細胞膜表面分子として HLA-DR1 β を同定し、これに対する single chain Fv (scFv) dimer が低濃度で ATL 細胞株に apoptosis を誘導することを見いだした。また、ATL 細胞表層の糖鎖に特異的な抗体の取得を目的として、新規の合成ヒト抗体ライブラリーの構築を試み、抗体の相補性決定領域 (CDR) に人工的な変異を導入した scFv ライブラリーを構築することに成功した。

研究成果の概要（英文）：Comprehensive analysis for the gene expression of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-infected and uninfected T cell lines by DNA microarray revealed that CD70 was a molecule highly and specifically expressed on the surface of adult T-cell leukemia (ATL) cells. Further analysis for the gene expression of glycosyltransferases by real-time PCR and high-throughput analysis of cell surface sugar chains by mass spectrometry demonstrated the existence of several ATL cell-specific sugar chains. In addition, with a newly developed fluorescent linker compound, the surface sugar chains of ATL cells were successfully immobilized on a chip. Using a human single chain Fv (scFv) phage library, a scFv specific to an ATL cell line was successfully isolated. The antigen recognized by the scFv was HLA-DR1 β , which was also highly expressed on the surface of ATL cells. The scFv could induce the apoptosis of the ATL cell line at low concentrations in its dimer form. To obtain the scFv that binds to ATL cell-specific surface sugar antigens, a novel synthetic scFv library was constructed by introducing random mutations on the complementary determining regions (CDR) of a single frame antibody.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度			
2006年度			
2007年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2008年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2009年度	3,300,000	990,000	4,290,000
総計	12,500,000	3,750,000	16,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：HTLV-1, ATL, 表面分子, 糖鎖, 抗体分子

1. 研究開始当初の背景

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) は、初めて発見されたヒトレトロウイルスである。このウイルスは、成人 T 細胞白血病 (ATL) と炎症性疾患である HTLV-1 関連脊髄症/熱帯性痲痺性対麻痺 (HAM/TSP) を引き起こすことが知られている。HTLV-1 キャリアの分布は、日本、アフリカ、カリブ海、南アメリカに集積しており、特に日本は、世界の中でも HTLV-1 キャリアの分布がきわめて高い地域である。また、日本においてもその分布は一様ではなく、九州を中心とする西南日本に多い。日本の HTLV-1 キャリア数はおよそ 120 万人で、キャリアからの ATL 発症率は約 2.5% で、毎年約 1,000 人が ATL を発症している。

HTLV-1 は、特にヒト CD4 陽性 T 細胞を標的にして感染し、その細胞をトランスフォームさせることで単クローン性に無限増殖させる。このような細胞に、癌遺伝子の活性化や抑制遺伝子産物の機能障害などが蓄積した結果、ATL が発症すると考えられている。

現在、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。これまで悪性リンパ腫に準じて、CHOP 療法などの抗癌剤の多剤併用療法が行われているが、上で述べたように、初期治療においてはかなり有効であるが、再燃が極めて早く起こる。現段階ではどの治療法も成績は良くないため、ATL 発症後の生存率はきわめて低い。したがって、有効な ATL 治療法の確立が急務とされている。

2. 研究の目的

「糖鎖」は「核酸」および「タンパク質」に次ぐ「第 3 の生命鎖」と呼ばれ、生体内においてはタンパク質や脂質と結合し、糖タンパク質や糖脂質を形成している。これらは細胞内外の情報伝達や免疫システムに深く関与し、細胞の癌化や転移、そしてウイルス感染に重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら、糖鎖は核酸やタンパク質よりも構造が複雑なことや、その合成が複数の糖転移酵素により制御されているため、タ

ンパク質と比較して、構造や機能の解析が遅れている。

そこで、本研究はこのような背景に立脚し、ATL 細胞に特異的に発現する「糖鎖」や「タンパク質」という新たな分子に標的を定め、「DNA マイクロアレイ法」、「糖鎖チップ」や「ファージ・ディスプレイ法」など、最新のテクノロジーを駆使して、ATL の診断および治療確立に向けたアプローチを行う「医工連携」のプロジェクト研究である。具体的には、本研究により、ATL 細胞に特異的に発現する異常分子を同定し、これに結合する抗体やペプチド、あるいは低分子化合物を作製することにより、ATL の早期発症診断や抗体療法への応用を目指す。

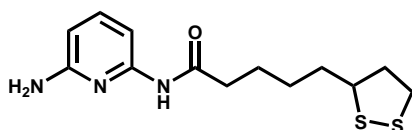
3. 研究の方法

1) DNA マイクロアレイによる ATL 細胞特異的に発現している分子の同定：ATL 細胞 (HTLV-1 の感染細胞を含む) と非 ATL 細胞における遺伝子発現を DNA マイクロアレイで比較し、ATL 細胞特異的に発現しているいくつかの細胞表面分子について検討した。具体的には、HTLV-1 非感染 T 細胞株の MOLT-4 細胞を基準に、性質が異なる 3 種類の HTLV-1 感染 T 細胞株 (S1T, MT-2, M8166) の遺伝子発現を比較した。

2) ファージ・ディスプレイ法を用いた ATL 細胞特異的抗体の作成：正常人リンパ球の抗体遺伝子をもとに構築したヒト抗体ファージディスプレイライブラリーを、S1T 細胞と MOLT-4 細胞に反応させ、フローサイトメーターで細胞を分離し、これと結合するファージのみを回収した。このバイオパンニングという操作を数回繰り返すことにより、S1T 細胞特異的に結合するヒト抗体ファージを得た。次に、選び出されたファージの遺伝子情報をもとに、S1T 細胞の表面にのみ特異的に反応する抗体を作製した。具体的には、単離された S1T 細胞を特異的に認識するヒト抗体ファージの DNA から、ヒト抗体遺伝子の Fv 領域を取り出し、これを別に作製しておいたヒト Fab 抗体もしくは、ヒト完全抗体発現用のプラスミドベクターに組み換え、大腸菌もしくは動物細胞への形質転換により、抗体を発現させた後、これを精製した。さらに、作製された抗体の中に、S1T 細胞に対して何らかの生理活性を有するものがあるかどうか

について、抗体の S1T 細胞増殖に与える影響や細胞死誘導の有無について調べた。

3) ATL 細胞表面糖鎖の解析: 新たに開発された蛍光性リンカー (f-mono) を用いて、微量でしか得ることができない ATL 細胞表面より遊離した糖鎖の分析とチップ化を行った。具体的には、ATL 細胞株 (S1T 細胞)、非 ATL 細胞株 (MOLT-4 細胞)、ヒト末梢血単核球細胞 (PBMC) から N-型と O-型糖鎖を切り出し、N-型糖鎖に絞って解析を行った。まず、BlotGlyco 法によって、切り出した糖鎖を捕捉し、f-mono リンカーを還元アミノ化反応によって導入して糖鎖を複合体化した。次いで、HPLC により S1T 細胞、MOLT-4 細胞では 4 つ、PBMC では 2 つのフラクションに分画した。それらのフラクションを、予め端面を金ナノ粒子で表面修飾した光ファイバーに固定化して、ファイバー型のシュガーチップを調製し、局在プラズモン共鳴センサーにより種々のレクチンとの相互作用解析を行った。



f-mono リンカーの構造

4. 研究成果

1) ATL 細胞に特異的に発現する分子としての CD70 の同定: 3 種類の HTLV-1 感染 T 細胞株の全てにおいて、MOLT-4 細胞と比較して mRNA の発現が 10 倍以上増加していた遺伝子が 108 個同定された。さらに、3 種類全てにおいて 100 倍以上増加していた遺伝子が 8 個あった。また、細胞表面に発現している分子に対応する遺伝子について検討すると、3 種類全てにおいて、MOLT-4 細胞より 10 倍発現が増強しているものが 11 個存在した。その中でも、CD70 遺伝子は 3 種類の HTLV-1 感染細胞において、MOLT-4 細胞よりも 1,000 倍以上の発現の増加が認められた。さらに、この分子がタンパク質レベルにおいても HTLV-1 感染 T 細胞株の表面に特異的に高発現していることを明らかにした。また、6 例ずつの ATL 患者由来の PBMC と健康成人由来の PBMC について、CD70 発現を比較したところ、前者の CD4 細胞には平均で約 80% の細胞に CD70 が発現しているのに対し、後者のそれでは平均で約 3% と大きな違いが認められた。

2) ATL 細胞と特異的に反応する scFv 抗体とその生理活性: 得られたファージクローン由来の scFv 抗体を精製し、種々の HTLV-1 感

染細胞への結合活性を評価したところ、HTLV-1 感染細胞への結合が確認された。一方で、HTLV-1 非関連細胞への結合は見られなかった。また、この scFv 抗体を S1T 細胞に添加すると、短時間で強い細胞死を誘導出来ることが分かった。そこで、この scFv 抗体の認識する抗原の同定を行ったところ、この scFv 抗体の認識する抗原は、HLA-DR β 鎖であると断定した。また、scFv 抗体の細胞死誘導活性がどのようなメカニズムで誘導されているかを明らかにする過程で、この scFv 抗体には、モノマーとダイマー (diabody) の 2 つのフォームが、含まれることがわかった。このうち、どちらの分子種が、細胞死誘導活性に重要であるのかを検討した結果、モノマーでは、ほとんど細胞死が見られないのに対し、diabody では、数 nM の濃度で強力に細胞死を誘導できることがわかった。

3) ATL 細胞に特異的な表面糖鎖に対する scFv 抗体の分離: HPLC 分析により S1T 細胞と MOLT-4 細胞を比較し、最も形状に違いがみられたフラクションに注目して、レクチンである WGA の結合性を調べたところ、細胞間で異なる結合挙動が観測された。WGA はシアル酸や N-アセチルグルコサミンを特異的に認識することが知られているため、それぞれの細胞表面にはそれらの糖を含んだ異なる構造の糖鎖が発現していると推測された。次に、S1T 細胞由来のファイバー型チップを用いて、ヒト scFv 合成ライブラリーから、それぞれのチップに結合するファージをスクリーニングし、3 種のファージクローンを得た。得られたクローンの MOLT-4 由来 N-型糖鎖との結合交差性を調べた結果、S1T 細胞の糖鎖に優位に結合することを確認した。さらに、それぞれのクローンから DNA を抽出し、抗原結合部位のシーケンスを調べ、全て異なるクローンであることを確認した。

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 7 件)

① Nakamura M, Hamasaki T, Tokitou M, Baba M, Hashimoto Y, Aoyama H. Discovery of hydrotetramethylnaphthalene analogs as adult T-cell leukemia cell-selective proliferation inhibitors in a small chemical library constructed based on multi-template hypothesis. *Bioorg. Med. Chem.* **17**: 4740-4746 (2009). 査読有

② Sato M, Ito Y, Arima N, Baba M, Sobel M, Wakao M, Suda Y. High sensitivity analysis of

naturally occurring sugar chains, using a novel fluorescent linker molecule. *J. Biochemistry* **146**: 22-41 (2009). 査読有

③Muraoka S, Ito Y, Kamimura M, Baba M, Arima N, Suda Y, Hashiguchi S, Torikai M, Nakashima T, Sugimura K. Effective induction of cell death on adult T-cell leukemia cells by HLA-DRβ- specific small antibody fragment isolated from human antibody phage library. *J. Biochemistry* **145**: 799-810 (2009). 査読有

④Baba M, Okamoto M, Hamasaki T, Horai S, Wang X, Ito Y, Suda Y, Arima N. Highly enhanced expression of CD70 on human T-lymphotropic virus type 1-carrying cell lines and adult T-cell leukemia cells. *J. Virol.* **82**: 3843-3852 (2008). 査読有

〔学会発表〕(計 12 件)

①外山政明, 濱崎隆之, 馬場昌範. 抗 ATL 活性を有する新規薬剤の探索とその作用機序解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 2009 年 10 月 26 日, 東京.

②伊東祐二, 杉村和久, 鳥飼正治, 中島敏博, 隅田泰生, 有馬直道, 馬場昌範. 抗体ファージライブラリから得られた HLA-DR 特異的な低分子抗体による HTLV-1 感染細胞への効果的な細胞死誘導. 第 2 回 HTLV-1 研究会・合同班会議, 2009 年 8 月 30 日, 東京.

③佐藤昌紀, 時任真衣子, 濱崎隆之, 馬場昌範, 有馬直道, 伊東祐二, 伊藤浩美, 澤木弘道, 成松久, 若尾雅広, 隅田泰生. 成人 T 細胞白血病細胞株 S1T に特異的に発現する糖鎖の解析. BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会), 神戸, 平成 20 年 12 月 10 日.

④Muraoka S, Ito Y, Kamimura M, Baba M, Torikai M, Nakashima T, Hashiguchi S, Sugimura K. Improvement of human antibody fragment to enhance apoptosis-inducing activity against HTLV-1 infected T cells. 第 38 回日本免疫学会総会学術集会, 京都, 2008 年 12 月 2 日.

⑤時任真衣子, 濱崎隆之, 馬場昌範. ATL 細胞特異的に抗腫瘍効果を有する薬剤の探索. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会, 岡山, 2008 年 10 月 27 日.

⑥佐藤昌紀, 時任麻衣子, 濱崎隆之, 馬場昌範, 有馬直道, 伊東祐二, 伊藤浩美, 澤木弘道, 成松久, 若尾雅広, 隅田泰生. 成人 T

細胞白血病細胞表層に特異的に発現する糖鎖解析. 第 28 回日本糖質学会年会, つくば, 2008 年 8 月 18 日.

⑦Baba M, Okamoto M, Hamasaki T, Muraoka S, Horai S, Wang X, Suda Y, Ito Y, Arima N. Identification of surface molecules overexpressed on HTLV-1-carrying cells as potential targets of monoclonal antibodies for inhibition of adult T-cell leukemia (ATL). Joint Seminar under the Japan-Korea Basic Scientific Cooperation Program “Novel Approach to Antiviral Chemotherapy and Its Practical Application”. Cheju, Korea, December 6, 2007.

⑧Muraoka S, Ito Y, Baba M, Arima N, Suda Y, Nakashima T, Torikai M, Hashiguchi S, Sugimura K. Human single chain antibody specific to ATL-derived leukemic clone cells by biopanning from human antibody phage library can effectively induce apoptosis-like cell death. IBC's 18th Annual International Conference “Antibody Engineering”. San Diego, USA, December 3, 2007.

⑨Baba M. Targeting surface molecules overexpressed on HTLV-1-carrying cells as potential approach to anti-adult T-cell leukemia therapy. 3rd Symposium of High Technology Research Center. Narashino, Japan, November 16, 2007.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 3 件)

①名称: 成人 T 細胞白血病治療薬
発明者: 馬場昌範, 橋本祐一
権利者: 鹿児島大学
種類: 特願
番号: 2009-068750
出願年月日: 2009 年 3 月 19 日
国内外の別: 国内

②名称: 多岐用途型蛍光性リンカー化合物、及びその製造方法ならびにそれらを用いて製造するリガンド複合体
発明者: 隅田泰生, 若尾雅広, 佐藤昌紀, 馬場昌範, 有馬直道, 伊東祐二
権利者: (株) スディックスバイオテック, 鹿児島大学
種類: 特願
番号: 2008-108561
出願年月日: 2008 年 4 月 18 日
国内外の別: 国内

③名称: アポトーシス誘導能を有するヒト抗体

発明者：伊東祐二，馬場昌範，有馬直道，隅田泰生，中島敏博，鳥飼正治
権利者：鹿児島大学，財団法人化学及血清療法研究所

種類：特願

番号：2007-299551

出願年月日：2007年11月19日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 昌範 (BABA MASANORI)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：70181039

(2) 研究分担者

有馬 直道 (ARIMA NAOMICHI)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：30175997

隅田 泰生 (SUDA YASUO)
鹿児島大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：70179282

伊東 祐二 (ITOU YUJI)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・准教授
研究者番号：60223195