

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究(B)
研究期間：2007～2008
課題番号：19790665
研究課題名（和文） 成人 T 細胞白血病の腫瘍特異的治療の開発に向けた基礎的研究
研究課題名（英文） Identification of therapeutic targets for adult T-cell leukemia
研究代表者
菱澤 方勝 (Hishizawa Masakatsu)
京都大学・医学研究科・特定病院助教
研究者番号：90444455

研究成果の概要：

成人 T 細胞白血病 (ATL) に対する腫瘍特異的治療法の開発のため、SEREX 法にて候補遺伝子のスクリーニングをおこない、その中でも有力であった serine-arginine protein kinase 1 (SRPK1) の解析を中心におこなった。siRNA によるノックダウンでは ATL 細胞株の SRPK1 は、効率よく mRNA や蛋白の発現は抑制され、これを用いてアポトーシスや細胞増殖、抗癌剤耐性との関連などを検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1800000	0	1800000
2008 年度	1500000	450000	1950000
年度			
年度			
年度			
総計	3300000	450000	3750000

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：血液内科学

成人 T 細胞白血病

1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞白血病 (Adult T-cell leukemia: ATL) は、Human lymphotropic virus type I (HTLV-I) が CD4 陽性 T 細胞に長期間感染した後に発症するリンパ増殖性疾患である。ATL

患者の中でも急性型およびリンパ腫型は、通常の化学療法での平均生存期間が 1 年以内と極めて予後不良であり、新たな治療法が開発が望まれている。新規治療の開発には、ATL の病態に関連しかつ腫瘍細胞特異的に発現

する分子を標的にすることが重要だが、HTLV-I由来の遺伝子のなかで腫瘍化の中心的役割を果たしていると考えられるTax遺伝子は、ATL発症後には大半の腫瘍細胞で発現が抑制されており、より多くの患者に応用可能な新規の標的分子の同定が必要である。

2. 研究の目的

臨床的に免疫学的な抗腫瘍効果が観察されたATL症例の検体を使用して、serological identification of antigens by recombinant cDNA expression cloning (SEREX)法により、新規標的抗原の単離をおこない、有力な候補については腫瘍特異的な治療法の開発を念頭にして詳細な解析をおこなう。

これまでに同定した分子のうち serine-arginine protein kinase 1 (SRPK1) は、正常組織での発現に特異性があり、精巢で高発現する癌精巣抗原様の発現形式であり、我々の解析では、正常人末梢血単核球や慢性型ATL細胞と比較し急性型ATL細胞では mRNA および蛋白とも過剰発現していることが判明した。SRPK1は様々なsplicing factor proteinのserine-arginine (SR) domainsをリン酸化し、mRNAのalternative splicingを制御する分子であり、ATLの病態との関連につき解析を試みる。

3. 研究の方法

SRPK1については、small interfering RNA (siRNA) によるノックダウンによって、細胞増殖やアポトーシス、抗ガン剤耐性への影響を解析した。また、SRPK1由来のペプチドをもちいて cytotoxic T-cell (CTL) の誘導を試み、免疫療法の標的となりうるかを検討した。この他に、標的抗原の候補となりうるものがないか、SEREX法にてスクリーニングをおこなった。

4. 研究成果

SRPK1 mRNA に対する siRNA を合成し、AMAXA社の siRNA 遺伝子導入システムを用いて、ノックダウンの実験をおこなった。ATL 患者由来細胞株 ED-40515(+)およびATL-43Tを用いた実験では、real-time PCR 法およびウェスタンブロット法で、効率よく SRPK1 の mRNA および蛋白発現は抑制されていた(図 1)。

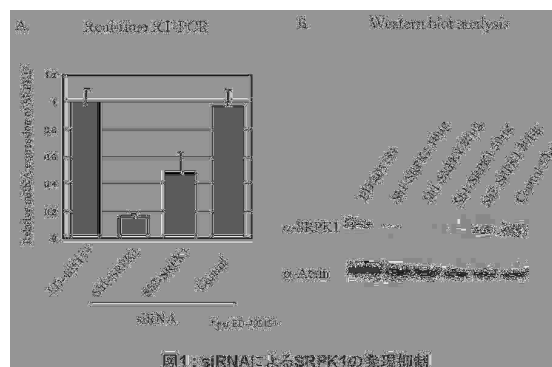
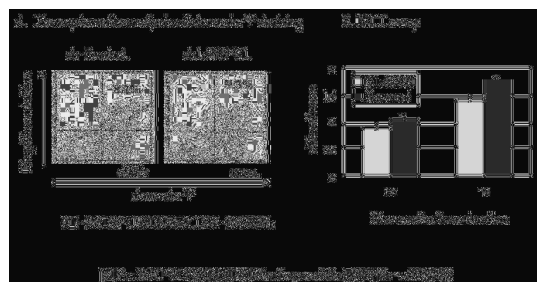


図1: siRNAによるSRPK1の発現抑制

しかし、Anexin V などでのアポトーシス解析や MTT 法による細胞増殖の解析で、ノックダウンによる影響は確認されなかった。次に、etoposide や doxorubicine などの抗癌剤耐性との関連を解析するため、これら抗癌剤を添加した条件化でアポトーシスや細胞増殖の解析をした。SRPK1 の発現抑制により、抗癌剤に対する感受性が高まる傾向が認められたが、統計学的に有意な差を証明できなかった(図 2)。



ATL では HTLV-I 遺伝子のほか、IL-2 receptor、Fas、IKK、MEL1 など遺伝子の splicing のパターンが正常とは異なり、病態形成に関連していることが推測されている。SRPK1 がこれら遺伝子の splicing に関わるものであるか

を検討するために、SRPK1 をノックダウンや強発現させた後の細胞株から抽出した mRNA を解析した。RT-PCR 法やシーケンス解析によって、一部の遺伝子では splicing に変化がみられたが、アポトーシスへの影響や NF- κ B の活性化との関連などを証明するにはいたらなかった。

さらに、SRPK1 が免疫療法の標的抗原となりうるかを、蛋白由来のペプチドを合成して CTL の樹立を試みた。患者や健常人の末梢血単核球から、CD8 陽性 T 細胞および単球を分離し、後者から誘導した樹状細胞とペプチドで刺激を繰り返しおこない、増加した細胞を ELISPOT などで解析した。しかし、ペプチド特異的な CTL は樹立できず、免疫療法の抗原候補としての適切さを証明できなかった。このように、SRPK1 の分子標的治療や免疫療法の標的となりうるかを、様々な解析によって検討をおこなったが、その妥当性を示すことはできなかった。

したがって、ほかに有力な標的候補となるものがないかを検索するために、複数の ATL 患者の腫瘍細胞と血清を用いて SEREX 法でのスクリーニングを引き続きおこなった。これまでに 3 名の患者検体でスクリーニングをおこなったが、複数の遺伝子が単離されている。その遺伝子の正常組織や腫瘍での発現の解析をおこない、文献から病態との関連を推定することによって標的候補遺伝子の検討を引き続きおこなっている。

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 6 件)

① Shimizu Y, Takamori A, Utsunomiya A, Kurimura M, Yamano Y, Hishizawa M,

Hasegawa A, Kondo F, Kurihara K, Harashima N, Watanabe T, Okamura J, Masuda T, Kannagi M. Impaired Tax-specific T-cell responses with insufficient control of HTLV-1 in a subgroup of individuals at asymptomatic and smoldering stages. *Cancer Science*, 100(3):481-9, 2009 Mar; 査読有

② 菱澤方勝 内山卓 成人 T 細胞白血病. *医学と薬学*, 61 (2) 163-169, 2009 査読無

③ 菱澤方勝 成人 T 細胞白血病(ATL)と HTLV-I. *医学のあゆみ*, 224 (9) 665-668, 2008 査読無

④ Yamamoto Ryo, Nishikori Momoko, Kitawaki Toshio, Sakai Tomomi, Hishizawa Masakatsu, Tashima Masaharu, Kondo Tadakazu, Ohmori Katsuyuki, Kurata Masayuki, Hayashi Takamasa, and Uchiyama Takashi. PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma *Blood*, 111 (6): 3220-3224, 2008, 査読有

⑤ 内山 卓, 菱澤方勝. ATL の発見とその後の展開 *最新医学・別冊 新しい診断と治療の ABC 血液 5*, p9-15, 2007 査読無

⑥ Hishizawa Masakatsu, Okamoto Kohei, Chonabayashi Kazuhisa, Kaneko Hitomi, Watanabe Mitsumasa and Tsudo Mitsuru. Primary large B-cell lymphoma of the bone marrow. *British Journal of Haematology*, 136 (3): 351, 2007. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

Hishizawa Masakatsu, et. al. Allografting for Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma: a Nationwide Retrospective Analysis. 第 49 回米国血液学会, アトランタ, 米国, 12 月 8-11 日, 2007

〔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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菱澤方勝 (Hishizawa Masakatsu)

京都大学・医学研究科・特定病院助教

研究者番号：90444455

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし