

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間： 2008～2009  
 課題番号：2070314  
 研究課題名 (和文) 成人 T 細胞白血病の制圧を目標とした、モデル動物を用いた治療法の開発

研究課題名 (英文) The development of novel therapy for the treatment of adult T cell leukemia using animal models.

研究代表者

辻 隆裕 (TSUJI TAKAHIRO )  
 国立感染症研究所 感染病理部 研究員  
 研究者番号：50462776

研究成果の概要 (和文)：

成人 T 細胞白血病 (Adult T cell Leukemia: ATL) は、ヒト T 細胞白血病ウイルスタイプ 1 (Human T-cell leukemia virus type I : HTLV-I) の感染によって引き起こされる予後不良の腫瘍性疾患である。わが国は HTLV-I の流行地域のひとつであり、現在国内に約 120 万人のキャリアが存在している。今後そのうちの 5 万～10 万人が ATL を発症すると推測されており、発症メカニズムの解明や治療法の開発は、差し迫った研究課題となってきた。

我々はヒト T 細胞性白血病(ATL)のモデル動物の作製を試み lck プロモーターで発現をコントロールした HTLV-1 の Tax トランスジェニックマウスを作製した。このマウスは生後 10 から 23 ヶ月後に T 細胞性のリンパ腫・白血病の発症が認められ白血球細胞は形態学的に flower cells 様の末梢血像を示し、発症した個体ではカリニ肺炎等の日和見感染がみられヒト ATL に類似した病態を示した。本マウスの白血球では、ヒト ATL と同様に NF-kappaB の恒常的活性化が認められるため、この経路を標的とした治療法の基礎的検討を本モデルマウスを用いて行った。実験では NF-kappaB の上流で IKKbeta を阻害する NF-kappaB 阻害剤：Bay65-1942 を用いた。Bay65-1942 を培養液中に添加することで、in vitro でマウス ATL 細胞に対してアポトーシスを誘導し、DNA の断片化を引き起こすことが、アガロース電気泳動法および TUNEL 法にて確認された。ウェスタンブロット法では薬剤処理により Caspase 3 および 9 の活性化が 3 時間後から観察されるのに対し、Caspase8 の活性化は 12 時間後まで観察されなかった。さらに Caspase の活性化と平行して Bcl2 の発現が著明に減少していた。以上の結果から NFkB 経路の抑制を介して Bcl2 発現量が減少することで、ミトコンドリア経路を介したアポトーシスが誘導される薬剤作用機序が考えられた。

次に NOD-SCID マウス腹腔内にマウス ATL 細胞を  $1 \times 10^6$  個移植し、薬剤を腹腔内投与することで in vivo での薬剤の効果を検討した。薬剤未投与群では生存期間が 30 日前後であったものが、Bay65-1942 を 800ug/day 投与した群では最大で 42 日間生存するものが観察され、約 1.3 倍の延命効果が認められた。また投与群では組織への腫瘍細胞の浸潤の程度が低く抑えられていることが病理組織学的に確認された。以上の結果から Bay65-1942 による NF-kappaB 経路の阻害は、今後 ATL 治療法候補のひとつとなり得る可能性があると考えられた。

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	1,700,000	0	1,700,000
平成 21 年度	1,600,000	0	1,600,000
年度			

年度			
年度			
総計	3,300,000	0	3,300,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：疾患モデル動物、予防・治療

### 1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞白血病 (Adult T cell Leukemia: ATL) は、ヒト T 細胞白血病ウイルスタイプ 1 (Human T-cell leukemia virus type I: HTLV-I) の感染によって引き起こされる予後不良の腫瘍性疾患である。わが国は HTLV-I の流行地域のひとつであり、現在国内に約 120 万人のキャリアが存在している。今後そのうちの 5 万~10 万人が ATL を発症すると推測されており、発症メカニズムの解明や治療法の開発は、差し迫った研究課題となっている。

### 2. 研究の目的

本研究は、長谷川らが開発した ATL の動物モデル (Nat Med, 12(4):466-72. 2006) を用い、NFkB 経路を特異的に阻害する新規薬剤 (Bay65-1943) を使った治療実験を行い解析を進めることで、臨床へ還元できる有効かつ安全な新しい治療法を開発することを目的としている。

### 3. 研究の方法

ATL モデルマウスに発生した T 細胞性白血病・リンパ腫 (mouse ATL: mATL) に対して、新規 NFkB 阻害薬 Bay65-1943 を用いて治療実験を行い、治療効果を病理組織学的に判定し、またその治療効果を発揮するメカニズムについて in vivo / vitro の両側面から解析を行なう。

### 4. 研究成果

平成 20 年度は in vitro と vivo での薬剤の効果をマウスモデルを用いて検討した。まず薬剤を培養液中に添加することで、in vitro でマウスモデルの白血病細胞 (マウス ATL 細胞) に対してアポトーシスを誘導し、DNA の断片化を引き起こすことが、アガロース電気泳動法および TUNEL 法にて確認された。次に NOD-SCID マウス腹腔内にマウス ATL 細胞を  $1 \times 10^6$  個移植し、薬剤を腹腔内投与することで in vivo での薬剤の効果を検討したところ、薬剤未投与群では生存期間が 30 日前後であったものが、薬剤を 800ug/day 投与した群で

は最大で 42 日間生存するものが観察され、約 1.3 倍の延命効果が認められた。また薬剤投与群では組織への腫瘍細胞の浸潤の程度が低く抑えられていることが病理組織学的に確認された。このように新規 NFkB 阻害剤は in vivo と vitro の両面で ATL モデルマウスに対して一定の効果を示すことが明らかになった。

平成 21 年度は、マウスモデル白血病細胞 (マウス ATL 細胞) に対する薬剤の作用メカニズムについて詳細な検討を行なった。EMSA 法では薬剤処理で NFkB/DNA 複合体の形成が特異的に抑制されることが明らかになった。薬剤処理で、Bax、Bnip31、Cideb、Atf5 などのアポトーシス誘発因子の発現が亢進し、Bcl2、Mcl1、Hells、Naip2 などのアポトーシス抑制因子の発現が減少していることが PCR array 法で明らかになった。ウエスタンブロット法では薬剤処理により Caspase 3 および 9 の活性化が 3 時間後から観察されるのに対し、Caspase8 の活性化は 12 時間後まで観察されなかった。さらに Caspase の活性化と平行して Bcl2 の発現が著明に減少していた。以上の結果から NFkB 経路の抑制を介して Bcl2 発現量が減少することで、ミトコンドリア経路を介したアポトーシスが誘導される薬剤作用機序が考えられた。

以上、平成 20, 21 年度の実験結果から、新規薬剤による NFkB 経路の抑制は、ATL 治療の標的となり得るものと考えられた。

### 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 5 件)

1) Ohno H, Ogata Y, Suguro H, Yokota S, Watanabe A, Kamei K, Yamagoe S, Ishida-Okawara A, Kaneko Y, Horino A, Yamane K, Tsuji T, Nagata N, Hasegawa H, Arakawa Y, Sata T, Miyazaki Y.

An outbreak of histoplasmosis among healthy young Japanese women after

traveling to Southeast Asia.  
Intern Med. 2010;49(5):491-5. Epub 2010  
Mar 1. 査読有

2) Nakamura T, Sato Y, Watanabe D, Ito H, Shimonohara N, Tsuji T, Nakajima N, Suzuki Y, Matsuo K, Nakagawa H, Sata T, Katano H.

Nuclear localization of Merkel cell polyomavirus large T antigen in Merkel cell carcinoma.

Virology. 2010 Mar 15;398(2):273-9. Epub 2010 Jan 13. 査読有

3) Katano H, Ito H, Suzuki Y, Nakamura T, Sato Y, Tsuji T, Matsuo K, Nakagawa H, Sata T.

Detection of Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma and Kaposi's sarcoma.

J Med Virol. 81(11):1951-8, 2009 査読有

4) Kawaguchi A, Orba Y, Kimura T, Iha H, Ogata M, Tsuji T, Ainai A, Sata T, Okamoto T, Hall WW, Sawa H, Hasegawa H.

Inhibition of the SDF-1alpha-CXCR4 axis by the CXCR4 antagonist AMD3100 suppresses the migration of cultured cells from ATL patients and murine lymphoblastoid cells from HTLV-I Tax transgenic mice.

Blood. 114(14):2961-8, 2009 査読有

5) Dean J, Hashimoto K, Tsuji T, Gautier V, Hall WW, Sheehy N.

Functional interaction of HTLV-1 tax protein with the POZ domain of the transcriptional repressor BCL6.

Oncogene. 28(42):3723-34, 2009 査読有

[学会発表] (計 7 件)

1) 辻 隆裕, 神戸 光彦, 相内 章, 岡本 尚, 佐多 徹太郎, 長谷川 秀樹  
マウス ATLL モデルに対する新規 NF-kappaB 阻害剤の治療効果

第 2 回 HTLV 研究会、東京、2009 年 8 月

2) Takahiro TSUJI, Mitsuhiko KANBE, Akira AINAI, Tetsutaro SATA, Takashi OKAMOTO, William W. HALL, Hideki HASEGAWA

Therapeutic Effects of a Novel NF-kB Inhibitor, BAY65-1942, in a Mouse Model of ATLL

14th International Conference on Human Retrovirology, Salvador, Brazil, July 1-4, 2009.

3) 辻 隆裕, 佐多徹太郎, 長谷川秀樹

ATL マウスモデルを用いた NF-kB 阻害薬による新規治療法の開発

第 98 回日本病理学会総会、京都、2009 年 5 月

4) 辻 隆裕, 神戸 光彦, 相内 章, 岡本 尚, 佐多徹太郎, 長谷川秀樹

NF-kappaB 阻害剤を用いた ATL モデルマウス治療の試み

第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008 年 10-11 月

5) 辻 隆裕, 神戸 光彦, 相内 章, 佐多 徹太郎, 長谷川秀樹

Evaluation of Bay65-1942, a nuclear factor kappa B inhibitor, in mouse ATL models.

第 70 回日本血液学会総会、京都、2008 年 10 月

6) 辻 隆裕, 神戸光彦, 相内章, 岡本尚, 佐多徹太郎, 長谷川秀樹

NF-kB 阻害剤を用いた ATL モデルマウス治療の基礎的検討

第 1 回 HTLV 研究会、東京、2008 年 8 月

7) 辻 隆裕, 阿部 賢治, 長谷川秀樹, 佐多徹太郎, 鈴木 昭, 深沢 雄一郎

エイズ剖検例での HBV による広汎性肝壊死の一例

第 97 回日本病理学会総会、金沢、2008 年 5 月

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

辻 隆裕 (TSUJI TAKAHIRO )

国立感染症研究所 感染病理部 研究員

研究者番号 : 50462776