

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：20101
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591043
 研究課題名（和文）mTOR を標的としたオートファジー誘導型の新しい B 細胞リンパ腫治療法の開発
 研究課題名（英文）Development of mTOR-targeted novel therapy inducing autophagy for B-cell lymphoma
 研究代表者
 佐藤 勉 (Sato Tsutomu)
 札幌医科大学・医学部・講師
 研究者番号：40404602

研究成果の概要（和文）：悪性リンパ腫は未だ予後不良な血液悪性疾患のひとつであるが、予後不良にする最大の原因は抗がん剤に対する抵抗性にある。抗がん剤はリンパ腫細胞にアポトーシスやネクロシスなどの細胞死を誘導する目的で使用されるが、このような従来型の薬剤とは一線を画する治療法が希求されている。そこで本研究では、アポトーシスやネクロシスなどの細胞死シグナルとクロストークしない自己融解型の細胞死、オートファジーを誘導する治療法を試みた。オートファジーの誘導には mTOR に対する siRNA を用い、siRNA のデリバリーと B 細胞リンパ腫のターゲティングには、CD19 抗体で標識した siRNA-PEG/KALA PECM システムを開発した。

研究成果の概要（英文）：Malignant lymphoma has been one of the hematological malignancies of which prognosis is still poor. The most possible reason of poor-prognosis is the resistance against conventional chemotherapeutic reagents, which are expected to induce apoptotic and/or necrotic death in lymphoma cells. Therefore, novel therapy with unique mechanism is required. Then, we have chosen the strategy inducing autolytic cell death, autophagy since the signaling of autophagic cell death does not depend on the apoptotic and necrotic signaling. For the induction of autophagy, we have used siRNA against mTOR. For the delivery of siRNA and the targeting of B-cell lymphoma, we have developed anti-CD19-targeted siRNA-PEG/KALA PECM system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：リンパ腫、オートファジー、mTOR、治療

1. 研究開始当初の背景

悪性リンパ腫は、リツキシマブなど画期的な分子標的薬の普及にも関わらず、未だ予後不良な血液悪性疾患のひとつである。臓器障害

を有する高齢者に発症した場合など、化学療法による十分な寛解導入が困難な場合もあるが、患者に治癒をもたらせない最大の原因はリンパ腫細胞の抗がん剤に対する抵抗性

にある。この抵抗性を解除する方法が模索されて久しいが、決定的な解決策は見出されていない。抗がん剤はリンパ腫細胞にアポトーシスやネクローシスなどの細胞死を誘導する目的で使用されるが、このような従来型の薬剤とは一線を画する治療法が希求されている。

これまで我々は、T細胞性リンパ腫細胞株 Jurkat を対象に、Fas 刺激が誘導するアポトーシスやネクローシスの細胞死シグナルを解析してきた (Sato T, et al. *J Immunol* 2004; Sato T, et al. *J Immunol* 2008)。この刺激により ATP 産生を担うミトコンドリアに膜透過性亢進 (MPT) が誘導されるものの、ATP が枯渇することではなく、この ATP とミトコンドリアに由来する活性酸素 (ROS) によってアポトソーム形成が促進され、ミトコンドリア下流のカスパーゼ群が活性化されると、アポトーシス細胞死が誘導される。一方、ミトコンドリアの重篤なダメージが先行して ATP が枯渇する場合は、ミトコンドリア下流のカスパーゼ群が活性化されず、ミトコンドリアに由来する多量な ROS によってライソゾーム酵素の放出がおこると、ネクローシス細胞死が誘導される。すなわち、それぞれの細胞死は別個の形態学な特徴を有するものの、シグナル伝達では ROS やミトコンドリアなど主要な経路を共有していることを明らかにしてきた。この事実は、アポトーシス細胞死に抵抗性を有するリンパ腫細胞は、同時にネクローシス細胞死にも抵抗性を示すことを示唆している。

一方、第三の細胞死として、近年、オートファジーが着目されている。オートファジーとは、細胞が飢餓状態に陥った際に生存を維持する目的で自己融解する現象を指し、腫瘍細胞が抗がん剤によって誘導される細胞死を回避するためのメカニズムのひとつとして機能することもある。しかしながら、このオートファジーを強く誘導する事で、多発性骨髄腫の細胞株が自己融解型の細胞死に至ると報告された (1)。更に、オートファジーのシグナルは Atg タンパク質群によってつかさどられ、アポトーシスやネクローシスのシグナルとクロストークしないため、オートファジー誘導型の新規抗がん剤が、従来型の抗がん剤に抵抗性を有するリンパ腫細胞に有効なのではないかと期待される。

オートファジーを誘導する標的として、現在のところ最も確かな分子は、mTOR

(mammalian target of rapamycin) である。この分子は抗生物質ラパマイシンによって阻害される標的として同定された。mTOR の

活性を低下させると Atg1 や Atg13、Atg17 を介してオートファジーが誘導されるため、急性リンパ性白血病の細胞株を対象に mTOR 阻害剤を用いてオートファジー型細胞死の誘導効果が検討されている (2)。また、悪性リンパ腫細胞でも mTOR を標的とした治療が有効なのではないかと考えられはじめている (3)。実際、再発・難治のマントル細胞リンパ腫を対象とした第Ⅲ相臨床試験では、mTOR 阻害剤テムシロリムス単剤で 22% の有効率と 12.8 ヶ月の平均生存期間が得られた (4)。そこで今回我々は、mTOR に対する siRNA を用いた悪性リンパ腫に対する治療の可能性を検討することとした。

《引用文献》

- (1) Crazzolara R, Cisterne A, Thien M, et al. *Blood*. 2009 Apr 2;113(14):3297-306.
- (2) Tormo D, Chечиńska A, Alonso-Curbelo D, et al. *Cancer Cell*. 2009 Aug 4;16(2):103-14.
- (3) Johnson PW. *Ann Oncol*. 2008 Jun;19 Suppl 4:iv56-9.
- (4) Hess G, Herbrecht R, Romaguera J, et al. *J Clin Oncol*. 2009 Aug 10;27(23):3822-9.

2. 研究の目的

siRNA を治療に用いる場合、最大の問題点はデリバリーにある。体内で siRNA はヌクレアーゼによる破壊に晒され、またそれ自体で細胞膜を貫通することはない。しかしながら、近年、この問題点を解決する画期的な方法、PECM (polyelectrolyte complex micelle) システムが報告された (5)。このシステムにおいて siRNA は、S-S 結合によりポリエチレングリコール (PEG) と複合体を形成し、更にカチオン性 KALA ペプチドで被覆される。このようにして調整された siRNA-PEG/KALA PECM は、ヌクレアーゼに耐性で、容易に細胞膜を貫通するという。一方、リンパ腫細胞に対する厳密なターゲティングが施されない限り、テムシロリムスを用いた第Ⅲ相臨床試験で約 90% の患者に観察された Grade 3-4 の副作用、すなわち血小板減少や貧血および好中球減少を避けることは難しい。しかしながらこれまでわれわれは、このターゲティングに関し、いくつかの有効な解決策を見出してきた。すなわち、ビタミン A で修飾することによりリポソームを肝星細胞へ特異的に搬送できることを見出し、この DDS (drug delivery system) を用いた HSP47 siRNA による肝硬変治療の試みを報告した (Sato Y, Sato T, et al. *Nature Biotechnol* 2008)。また、抗 CD19 抗体で標

識した PEG 修飾血中滞在型 (ステルス) リポソームが、B細胞リンパ腫の治療における DDS として極めて有効であることを明らかにしている (平成 19 年度基盤研究 (C))。これらのノウハウを活用し、上述した siRNA-PEG/KALA PECM を抗 CD19 抗体で標識すれば、極めて特異的な B細胞リンパ腫のターゲティングになると思われる。補足的に説明すれば、CD20 と同様に CD19 は B細胞リンパ腫にあまりなく発現しているが、CD20 と異なり CD19 は細胞内ヘインテグレートされるため、本研究における標的対象として最適である。また、リツキシマブなど CD20 を標的とした治療法に抵抗性となる過程で、CD20 の発現が弱まった B細胞リンパ腫にも有効であろうと推測される。また、B細胞性急性リンパ性白血病への応用も期待できる。更に、CD33 を標的とすることで急性骨髄性白血病などにも適応拡大が可能かもしれない。

本研究において我々は、mTOR を標的に、抗 CD19 抗体で標識した siRNA-PEG/KALA PECM システムをその抑制方法に選択し、オートファジー誘導型 B細胞リンパ腫治療の開発を試みる。

《引用文献》

(5) Lee SH, Kim SH, Park TG. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Jun 1;357(2):511-6.

3. 研究の方法

mTOR siRNA の 3' 側に付加したヘキシルアミンを SPDP で活性化し、これを Biotin-PEG-SH の SH 基と S-S 結合させる。一方、抗 CD19 抗体をビオチン化し、ストレプトアビジンを通して Biotin-PEG-SH のビオチンと結合させる。更に、この抗 CD19 抗体標識 mTOR siRNA-PEG の mTOR siRNA をカチオニック KALA ペプチドで被覆し、抗 CD19 抗体標識 mTOR siRNA-PEG/KALA PECM を完成する。この *in vitro* における mTOR 発現抑制効果を、CD19 陽性 B細胞リンパ腫細胞株や患者リンパ節より得た B細胞リンパ腫細胞を対象として検討する。次に、死細胞の蛍光顕微鏡観察や、抗 LC3 抗体を用いたウエスタンブロット法で検出する LC3-II の出現などを指標として、オートファジー細胞死の誘導効果を検討する。*in vivo* では抗アシアロ GM1 抗体で処理した SCID マウス皮下に CD19 陽性 B細胞リンパ腫細胞株や患者リンパ節より得た B細胞リンパ腫細胞を移植し、これらを対象として抗 CD19 抗体標識 mTOR siRNA-PEG/KALA PECM の

抗腫瘍効果を検討する。

4. 研究成果

(1) 抗 CD19 抗体標識 mTOR siRNA-PEG/KALA PECM の効果 (*in vitro*)
まず Ambion 社製の siRNA Target Finder を用いて mTOR siRNA のデザインを行った。複数の配列を選定して siRNA を合成し、これらを各種の細胞株へ導入した。mTOR の発現量をウエスタンブロット法で定量し、最も有効な配列を決定した。なお、siRNA の合成に際しては、その 3' 側をヘキシルアミンで修飾した。次に、mTOR siRNA-PEG/KALA PECM の抗 CD19 抗体による標識を試みた。すなわち、mTOR siRNA 3' 側のヘキシルアミンを SPDP で活性化、これを Biotin-PEG-SH の SH 基と S-S 結合させ、Biotin-PEG-mTOR siRNA を調整した。また、抗 CD19 抗体をビオチン化し、ストレプトアビジンを通して Biotin-PEG-mTOR siRNA のビオチンと結合させ、抗 CD19 抗体-PEG-mTOR siRNA を調整した。更に、電気的な相互作用により、陰性荷電の mTOR siRNA を陽性荷電の KALA ペプチドで被覆した。そして、この抗 CD19 抗体標識 mTOR siRNA-PEG/KALA PECM の *in vitro* における効果を検討した。具体的には、まず CD19 を高発現する B細胞リンパ腫細胞株、Namalwa 細胞などを対象に、マウス IgG 標識 mTOR siRNA-PEG/KALA PECM (以下 IgG-mTOR)、マウス IgG 標識 scramble siRNA-PEG/KALA PECM (以下 IgG-scramble) および抗 CD19 抗体標識 scramble siRNA-PEG/KALA PECM (以下 CD19-scramble) を陰性コントロールとして、抗 CD19 抗体標識 mTOR siRNA-PEG/KALA PECM (以下 CD19-mTOR) のオートファジー誘導効果を確認した。オートファジー誘導の判定は、ウエスタンブロット法による LC3-II の検出などにより行った。

(2) 患者由来 B細胞リンパ腫細胞を対象とした検討 (*in vitro*)
悪性リンパ腫疑いの患者を対象として病理学的検索を目的に通常の医療行為の範疇でリンパ節生検が施行される際、事前に本研究の目的と意義を文書により説明し、文書により同意を受ける方法により被験者からインフォームド・コンセントが得て、生検されたリンパ節の一部を細切し、浮遊したリンパ腫細胞を回収した。通常の病理学的検索により CD19 陽性 B細胞リンパ腫と診断された場合は、そのリンパ腫細胞を対象として CD19-mTOR のオートファジー誘導効果を

検討した。陰性コントロールには IgG-mTOR、IgG-scramble および CD19-scramble を用いた。細胞数の定量化は MTT 法で、細胞死の性状は Hoechst 33342 による核染色を用いた蛍光顕微鏡観察で、LC3-II の出現はウエスタンブロット法で検討した。その結果、すべてのリンパ腫細胞で CD19-mTOR の抗腫瘍活性を確認した。特に、通常の化学療法に不応な症例や寛解後の再発症例などから得られたリンパ腫細胞は、通常のアポトーシスやネクローシスなどの細胞死に抵抗性であるが、このような細胞にも CD19-mTOR は効果的にオートファジー細胞死を誘導した。

(3) 患者由来 B 細胞リンパ腫細胞を対象とした検討 (*in vivo*)

in vitro 実験で用いた Namalwa 細胞は Severe Combined Immunodeficiency (SCID) マウスに移植可能であり、これを *in vivo* 実験に用いた。同細胞を SCID マウスの背部皮下へ移植し、腫瘍が形成され直径 6 mm に達した時点で、尾静脈より各種濃度の CD19-mTOR を投与した。陰性コントロールには、IgG-mTOR、IgG-scramble および CD19-scramble を用いた。投与後、腫瘍径を経時的に測定したところ、CD19-mTOR の腫瘍増殖に対する濃度依存的な抑制効果を確認した。

更に、B 細胞リンパ腫患者のリンパ節から採取したリンパ腫細胞を用いて検討を進めた。リンパ節からリンパ腫細胞を得る手順は前述のとおりである。これらのリンパ腫細胞を、あらかじめ抗アジアロ GM1 抗体を腹腔内投与した SCID マウスの背部皮下へ移植した。腫瘍が形成され直径 6 mm に達した時点で、尾静脈より CD19-mTOR を投与した。CD19-mTOR の投与量は、*in vitro* の検討結果を参考にして決定した。陰性コントロールには、IgG-mTOR、IgG-scramble および CD19-scramble を用いた。投与後、腫瘍径を経時的に測定したところ、CD19-mTOR の腫瘍増殖に対する抑制効果を確認した。特に、通常の化学療法に不応な症例や寛解後の再発症例などから得られたリンパ腫細胞は、通常のアポトーシスやネクローシスなどの細胞死に抵抗性であると予想されるが、このような細胞にも CD19-mTOR は効果的であった。

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 4 件)

① Iyama S, Sato T, Murase K, Kikuchi S, Kamihara Y, Ono K, Takada K, Miyanishi K, Sato Y, Takimoto R, Kobune M, Obama T, Miyajima M, Watanabe A, Higami T, Hirayama Y, Kato J. Successful treatment by fibrin glue sealant for pneumothorax with chronic GVHD resistant to autologous blood patch pleurodesis. Intern Med. 2012;51(15):2011-4. 査読有

② Iyama S, Sato T, Murase K, Kamihara Y, Ono K, Kikuchi S, Takada K, Miyanishi K, Sato Y, Takimoto R, Kobune M, Kato J. Intermittent administration of recombinant human soluble thrombomodulin successfully controlled chronic disseminated intravascular coagulation in a patient with dissecting aortic aneurysm on an outpatient basis. Blood Coagul Fibrinolysis. 2012 Sep;23(6):548-50. 査読有

③ Sato T, Kobune M, Murase K, Kado Y, Okamoto T, Tanaka S, Kikuchi S, Nagashima H, Kawano Y, Takada K, Iyama S, Miyanishi K, Sato Y, Takimoto R, Kato J. Iron chelator deferasirox rescued mice from Fas-induced fulminant hepatitis. Hepatol Res. 2011 Jul;41(7):660-7. 査読有

④ Sato T, Iyama S, Murase K, Kamihara Y, Ono K, Kikuchi S, Takada K, Miyanishi K, Sato Y, Takimoto R, Kobune M, Kato J. Novel missense mutation in the TMPRSS6 gene in a Japanese female with iron-refractory iron deficiency anemia. Int J Hematol. 2011 Jul;94(1):101-3. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

① Iyama S, Sato T, et al. Intermittent administration of recombinant human soluble thrombomodulin for chronic DIC. 第 74 回日本血液学会学術集会 平成 24 年 10 月 20 日 国立京都国際会館

② Kamihara Y, Sato T, et al. Novel missense mutation in the TMPRSS6 gene in a patient with iron-refractory iron deficiency anemia. 第 73 回日本血液学会学術集会 平成 23 年 10 月 15 日 名古屋国際会議場

[図書] (計 2 件)

① 佐藤 勉ら 日本臨牀社 血液症候群 I 「溶血性尿毒症症候群」 2013 534

② 佐藤 勉ら 総合医学社 分子標的治療薬—最新の選び方・使い方—「ゲムツズマブ オゾガマイシン」 2011 450

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 勉 (Sato Tsutomu)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：40404602

(2) 研究分担者

小船雅義 (Kobune Masayoshi)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90336389

(3) 連携研究者

加藤淳二 (Kato Junji)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：20244345