

抗アポトーシス蛋白を標的とする新規治療法の開発

抗アポトーシス蛋白の標的化治療研究チーム（課題番号：117021）

研究期間：平成 23 年 7 月 22 日～平成 24 年 3 月 31 日

研究代表者：石塚賢治 研究員：辻岡 寛

【背景】

成人 T 細胞白血病／リンパ腫（ATLL）は、human T-lymphotropic virus type-I（HTLV-1）によって引き起こされる末梢性 T 細胞腫瘍である。急性型、リンパ腫型、慢性型、くすぶり型の 4 病型に分けられ、急性型、リンパ腫型と慢性型の一部に対しては、強力な化学療法が実施されるが、その予後は極めて不良で、最近の臨床試験でも 50% 生存期間は約 1 年であり、新規治療法の導入が急務である^{1,3}。

ATLL の治療成績が未だに改善されない原因として、P 糖蛋白や Lung Resistant Protein（LRP）を発現しているために化学療法薬に耐性を示すことや、HTLV-1 感染者が ATLL 発症以前から既に細胞性免疫不全状態にあり感染症を併発しやすいことが指摘されてきた。また、ATLL 細胞が抗アポトーシス蛋白である Bcl-2 と Bcl-X_L を高率に発現していることも少数例での検討で知られていた^{4,5}。

このような背景から、従来から ATLL 治療に使用されてきた抗がん剤でなく、正常細胞に対する傷害の少ない抗アポトーシス蛋白を標的とする治療を ATLL 治療に導入することは、非常に理想的な治療戦略となる。

ABT-737（米国アボット社）は、Bcl-2 homology domain（BH3）を占拠する小分子化合物で、抗アポトーシス作用のある Bcl-2、Bcl-X_L、Bcl-w 蛋白を選択的に強力に阻害する。現在、本剤の経口投与可能な誘導体である ABT-263 による臨床試験が造血器腫瘍や固形腫瘍において海外で実施されている^{6,7}。

この研究は、ABT-737 が ATLL 細胞株の増殖を抑制することと、従来から使用されてきた抗癌剤の作用を増強することを調べ、抗アポトーシス蛋白を標的とする治療の有効性を検討したものである。

【方法】

HTLV-1 感染 T 細胞株として MT-1、MT-2、HUT 102 細胞、HTLV-1 陰性 T 細胞白血病株として Jurkat 細胞、バーキットリンパ腫細胞株として Raji と Ramos 細胞を使用した。

Bcl-2 関連抗アポトーシス蛋白阻害薬 ABT-737 は米国アボット社から供与を受けた。

細胞増殖は WST アッセイにより評価し、アポトーシスの誘導は APO 2.7 の発現をフローサイトメトリーで検出することにより評価した。

【結果】

ATLL 細胞は Bcl-2 と Bcl-X_L 蛋白を発現している。

ATLL 患者がその診断のために生検されたリンパ節標本を使用して、患者リンパ節 ATLL 細胞での Bcl-2、Bcl-X_L、Mcl-1 蛋白の発現を調べた。Bcl-2 と Bcl-X_L 蛋白はそれぞれ 60%（25 例中 15 例）、56%（25 例中 14 例）に発現し、80%（25 例中 20 例）の症例で Bcl-2 と Bcl-X_L 蛋白の少なくともどちらかを発現していた。また、もう一つの抗アポトーシス蛋白である Mcl-1 蛋白は 44%（25 例中 11 例）に発現していた（Table1）。

患者末梢血から得られた ATLL 細胞と細胞株の Bcl-2、Bcl-X_L、Mcl-1 蛋白の発現はウエスタンブロット法で確認した。患者細胞は Bcl-2 と Bcl-X_L 蛋白を強く発現していた。細胞株では、Bcl-X_L 蛋白は MT-1、MT-2、Raji、Ramos 細胞に発現し、Bcl-w 蛋白は Raji 細胞で強力に発現していた。一方 Mcl-1 蛋白は Raji と Ramos 細胞で強く発現していたが、MT-1、MT-2、Jurkat 細胞での発現は弱く、HUT 102 細胞では発現していなかった（Figure1）。

Table1. Expression of Bcl-2, Bcl-X_L and Mcl-1 in lymph node ALTT cells.

Case	Bcl-2	Bcl-X _L	Mcl-1
1	4+	4+	-
2	4+	2+	3+
3	4+	1+	-
4	3+	2+	-
5	3+	1+	3+
6	3+	1+	3+
7	3+	1+	-
8	2+	4+	4+
9	1+	1+	2+
10	4+	-	2+
11	4+	-	-
12	4+	-	-
13	4+	-	-
14	4+	-	-
15	4+	-	-
16	-	4+	4+
17	-	4+	-
18	-	2+	3+
19	-	1+	1+
20	-	1+	-
21	-	-	4+
22	-	-	2+
23	-	-	-
24	-	-	-
25	-	-	-

Protein expression was determined immunohistochemically and the percentage of positively stained cells was quantified using the following scale: 1+: 10-25%, 2+: 25-50%, 3+: 50-75% and 4+: >75%.

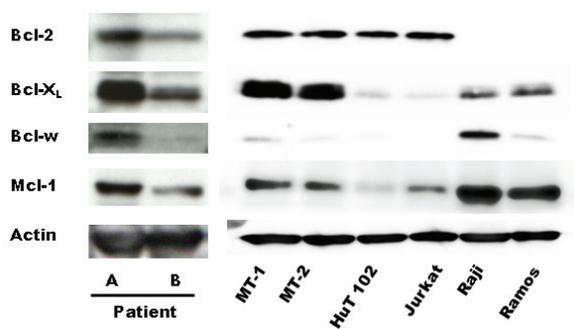


Figure1. Expression of Bcl-2 family proteins in ATLL cells and cell lines. Whole cell lysates of freshly isolated peripheral blood ATLL cells in patients A and B; MT-1, MT-2, HUT 102, Jurkat, Raji, and Ramos cell lines were subjected to Western blotting to assess the expression of Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, and Mcl-1 proteins. Actin expression was used as a loading control.

ABT-737 は HTLV-1 感染細胞の増殖を抑制する。

ABT-737 の細胞株に対する増殖抑制効果を調べるために、それぞれの細胞株を ABT-737 あるいはその非活性型誘導体である A-793844 を添加し、72 時間培養後、WST アッセイを行った (Figure 2)。ABT-737 は MT-1、MT-2、HUT 102、Jurkat、Ramos 細胞株の増殖を著明に抑制し、それぞれの IC₅₀ は 72 時間で 2.4、0.23、0.008、0.23、6.79 μM であった。一方、Raji 細胞は ABT-737 に対する感受性が低く、72 時間での IC₅₀ は 23.7 μM であった。

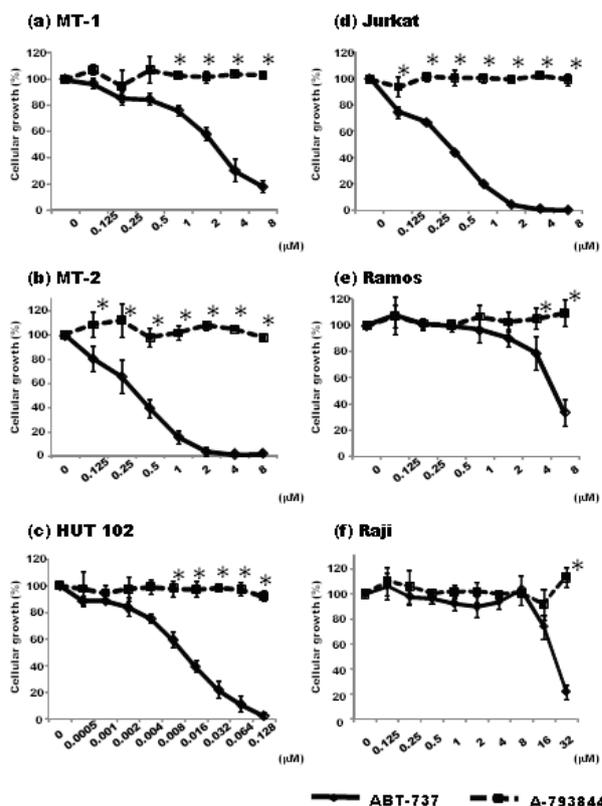


Fig.2. ABT-737 inhibits the growth of cell lines, including HTLV-1 infected T-cell lines, and augments the cytotoxicity of conventional chemotherapeutic agents towards MT-1 and MT-2 cells. Growth inhibition of cell lines by either ABT-737 or its less active enantiomer A-793844, was assessed by colorimetric assay after 72-h culture (a: MT-1, b: MT-2, c: HUT 102, d: Jurkat, e: Ramos, f: Raji cells). Data represent means ± SD (standard deviation) of 3 independent experiments (*:p < 0.05 by the Student's t-test).

ABT-737 は HTLV-1 感染細胞株と患者由来新鮮 ATLL 細胞にアポトーシスを誘導体する

ABT-737 存在下に MT-1、MT-2、HUT 102 細胞と、患者由来新鮮 ATLL 細胞を 48 時間培養すると、アポトーシスが誘導された (Table 2)。

Table2. Induction of apoptosis by ABT-737 in MT-1, MT-2, and fresh ATLL cells.

ABT-737 (μM)	MT-1	MT-2	HuT102	Patient A		Patient B
	72 h	72 h	72 h	48 h	72 h	72 h
0	2.46	3.72	4.28	9.61	25.6	29.5
0.125	n.t.	10.5	74.2	n.t.	n.t.	n.t.
0.25	n.t.	15.4	90.7	n.t.	n.t.	n.t.
0.5	n.t.	24.7	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
1	7.86	45.1	n.t.	30.5	53.2	61.8
2	11.9	n.t.	n.t.	32.8	58.8	53.1
4	21.4	n.t.	n.t.	35.8	61.9	64.5

Cells were treated as indicated, and the percentage of apoptotic cells was determined by flow cytometric analysis using APO2.7.
n.t.: not tested

ABT-737 は抗がん剤の効果を相乗的に増強する

抗アポトーシス蛋白によるアポトーシス誘導抑制は、従来から使用されている抗がん剤に対する耐性メカニズムの一つと考えられていることから、ABT-737によって抗がん剤の作用を増強することができることが期待できる。そこで ATLL に対するファーストラインの治療で使用されることの多いドキシソルビシン、ビンクリスチン、エトポシドと ABT-737 を同時に添加し、MT-1、MT-2 細胞を培養した。相乗効果の有無は、Chou-Talalay 法によって解析した。いずれの薬剤との併用においても Combination Index (CI) は 0.9 未満であり、相乗的な効果が得られることが分かった (Figure 3)。

次に、ABT-737 と抗がん剤の併用による相乗的な作用が、アポトーシス誘導の増強によるものか、またカスパーゼ依存性であるかどうかを調べるために、それぞれの薬剤単独と併用下で、それぞれ汎カスパーゼ阻害剤 z-VAD-fmk 前処置によるアポトーシス誘導阻害を調べた。ABT-737 と抗がん剤の併用は、アポトーシス誘導を著明に増強し、z-VAD-fmk はそれを抑制した (Figure 4)。

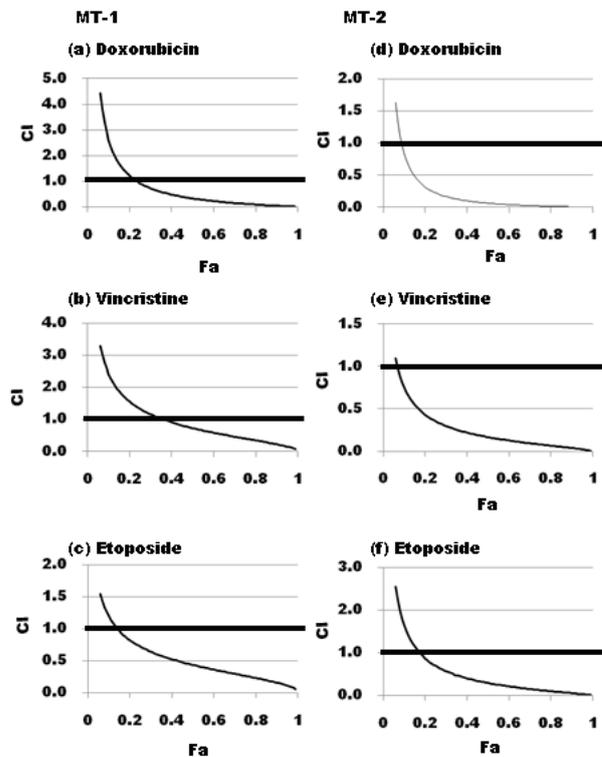


Figure 3. ABT-737 augments the cytotoxicity of conventional chemotherapeutic agents towards MT-1 and MT-2 cells. MT-1 (a, b, and c) and MT-2 (d, e, and f) cells were treated with doxorubicin, vincristine, or etoposide in combination with ABT-737 at the fixed ratio for 72 h, and the effects of the combined treatment were evaluated using CalcuSyn software. Fraction affected (Fa) - combination index (CI) plots illustrating the effects of fixed drug ratio combinations are shown. CI values <0.9 are considered synergistic, >1.1 are antagonistic, and values of 0.9 to 1.1 are additive. Representative data from triplicate experiments are shown.

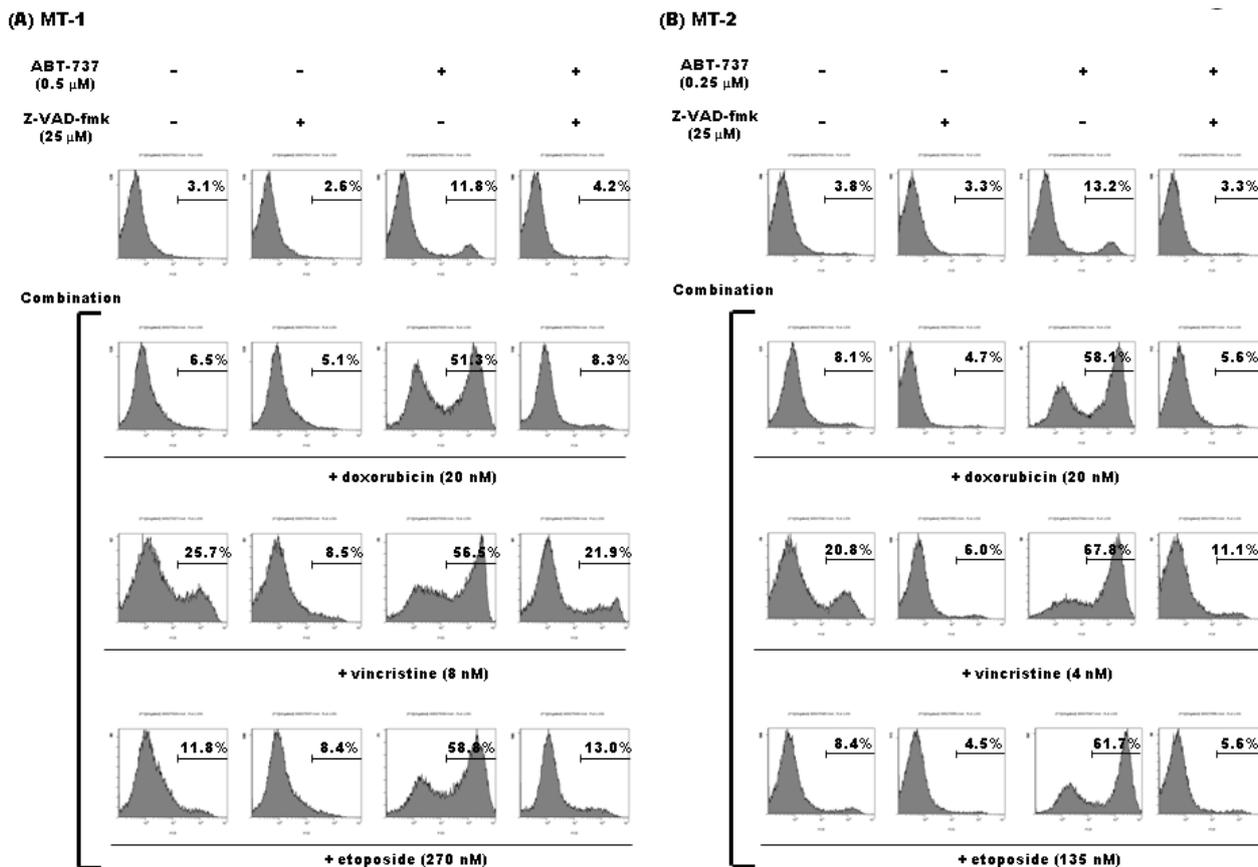


Fig.4. Induction of apoptosis in MT-1 and MT-2 cells by conventional agents with or without ABT-737. MT-1 (A) and MT-2 (B) cells were treated with doxorubicin, vincristine, etoposide, or the vehicle control, in the presence or absence of ABT-737 for 48 h, and the induction of apoptosis was assessed using an APO2.7 assay. Pretreatment by z-VAD-fmk at the concentration of 25 μM for 1 h prior to exposure to the conventional agents with or without ABT-737 was conducted as indicated. The percentage of APO2.7-positive cells is shown. Representative data from triplicate experiments are shown.

【考察】

抗アポトーシス蛋白はがん細胞の生存や維持に重要な役割を果たすのみならず、抗がん剤治療に対する抵抗性にも関係している^{8,9}。

難治性の造血器腫瘍である ATLL は新規治療の開発が急がれるが、本研究では ATLL 細胞に強く発現している抗アポトーシス蛋白を標的とする治療戦略の可能性を調べた。

まず、リンパ節あるいは末梢血の患者 ATLL 細胞が高率に抗アポトーシス蛋白を発現していることを確認し、次に Bcl-2、Bcl-XL、Bcl-w を標的とする新規化合物 ABT-737 が HTLV-1 感染細胞株の増殖を抑制すること、さらに HTLV-1 感染細胞株と新鮮患者 ATLL 細胞株にアポトーシスを誘導することを証明した。

新規治療戦略を考える上で最も魅力的なことは、本剤が従来から ATLL の治療に使用されている抗がん剤の作用を相乗的に増強させることである。ATLL 患者では ATLL 発症前から存在する細胞性免疫低下のため、化学療法中の骨髄抑制期に感染症を併発することが多い。抗

アポトーシス蛋白を標的とする薬剤を併用することによって抗がん剤の投与量を増加させることなく、腫瘍細胞を障害させることができる。その結果、正常細胞の傷害を増やすことなくより強力な抗腫瘍効果が得られることが期待される。

以上の結果より、抗アポトーシス蛋白を標的とする治療は ATLL 治療に有望であることが強く示唆された。

【参考文献】

1. Shimoyama M: Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). *Br J Haematol* 79:428-37, 1991.
2. Tsukasaki K, Utsunomiya A, Fukuda H, et al: VCAP-AMP-VECP compared with biweekly CHOP for adult T-cell leukemia-lymphoma: Japan Clinical Oncology Group Study JCOG9801. *J Clin Oncol* 25:5458-64, 2007.
3. Ishitsuka K, Tamura K: Treatment of adult T-cell leukemia/lymphoma: past, present, and future. *Eur J Haematol*

80:185-96, 2008.

4. Nicot C, Mahieux R, Takemoto S, et al: Bcl-X (L) is up-regulated by HTLV-I and HTLV-II in vitro and in ex vivo ATLL samples. *Blood* 96:275-81, 2000.

5. Mahieux R, Pise-Masison C, Gessain A, et al: Arsenic trioxide induces apoptosis in human T-cell leukemia virus type 1- and type 2-infected cells by a caspase-3-dependent mechanism involving Bcl-2 cleavage. *Blood* 98:3762-9, 2001.

6. Vogler M, Dinsdale D, Dyer MJ, et al: Bcl-2 inhibitors: small molecules with a big impact on cancer therapy. *Cell Death Differ*, 2008.

7. Stolz C, Hess G, Hahnel PS, et al: Targeting Bcl-2 family proteins modulates the sensitivity of B-cell lymphoma to rituximab-induced apoptosis. *Blood* 112:3312-21, 2008.

8. Reed JC: Apoptosis-targeted therapies for cancer. *Cancer Cell* 3:17-22, 2003.

9. Fesik SW: Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer* 5:876-85, 2005.

【研究業績】

Ishitsuka K, Kunami N, Katsuya H, Nogami R, Ishikawa C, Yotsumoto F, Tanji H, Mori N, Takeshita M, Miyamoto S, Tamura K. Targeting Bcl-2 family proteins in adult T-cell leukemia/lymphoma: in vitro and in vivo effects of the novel Bcl-2 family inhibitor ABT-737. *Cancer Lett.* 2012 Apr 28;317 (2) :218-25.

【謝辞】

本研究の一部は、福岡大学研究推進部の研究経費によるものである。(課題番号：117021)