

氏名	さとう けいすけ 佐藤 啓介		
学位の種類	博士（薬学）		
報告番号	甲第 1828 号		
学位授与の日付	令和 2 年 3 月 16 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）		
学位論文題目	成人 T 細胞白血病/リンパ腫に対する新規治療法の検討		
論文審査委員	(主査) 福岡大学	教授	本田 伸一郎
	(副査) 福岡大学	教授	松末 公彦
	福岡大学	准教授	大江 賢治

内容の要旨

成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (ATL) は、ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 (HTLV-1) に長期感染後、約 5% のキャリアから発症する。近年、造血幹細胞移植や分子標的薬などにより白血病の治療は飛躍的に進歩し、ATL 患者の生命予後が大きく改善されてきたが、急性型のほとんどの患者は発病後 1 年以内に死亡する (Katsuya et al. Blood 2015)。現在、年間 1000 人以上の ATL 患者が死亡し、その割合は白血病による死亡者数の約 14% にのぼる。従って、腫瘍細胞の増殖を効果的に抑制するような、新規作用機序の薬剤による ATL 治療法の確立が、焦眉の急となっている。

近年、オートファジーは細胞内での異常なタンパク質の蓄積を防ぎ、飢餓応答だけではなく、癌や細菌感染防御などにも関与することが報告されている。オートファジー誘導薬である STF-62247 は、がん抑制遺伝子である VHL (von Hippel-Lindau) 欠損腎細胞がんにおいてアポトーシスを介さず、オートファジーを伴う細胞死を導く (Sandra T et al. Cancer Cell 2008)。しかし、ATL におけるオートファジーの知見はない。第 1 章では STF-62247 によるアポトーシス及びオートファジーを介する ATL 関連細胞株の細胞死について検討した。

TNF receptor superfamily member である CD30 抗原は、未分化大細胞型リンパ腫 (ALCL) 細胞や ATL 細胞などに発現し、血清中の可溶性 CD30 (sCD30) 濃度は ATL 患者において有意に上昇している。一方、A Disintegrin And Metalloproteinase (ADAM) ファミリーは、ALCL 細胞において細胞膜上の CD30 抗原を切断する。しかし、ATL における ADAM ファミリーの機能は不明である。また、Brentuximab vedotin (BV) は、抗 CD30 抗体と微小管阻害作用を示す monomethyl auristatin E (MMAE) を酵素切断可能なリンカーで結合させた抗体薬物複合体であり、ALCL をはじめとする CD30 陽性の悪性リンパ腫などで臨床応用されている。更に、BV は HTLV-1 感染細胞株において細胞死を引き起こすことが報告されている (Maeda N et al. Cancer Science 2010)。しかし、BV による

HTLV-1 感染細胞株の細胞死に対する sCD30 濃度の影響は不明である。第 2 章では、BV による細胞死に対する sCD30 の影響及び ADAM10/17 阻害剤による BV の効果増強の可能性を検討した。

第 1 章 STF-62247 によるアポトーシスおよびオートファジーを介する細胞死に関する検討

HTLV-1 感染細胞株である S1T、MT-2 細胞および HTLV-1 非感染細胞株である Jurkat 細胞における STF-62247 処理後の細胞生存率を測定した。STF-62247 処理により、各白血病細胞株の生存率は未処理群と比較して、用量かつ時間依存的に有意に低下した (図 1)。

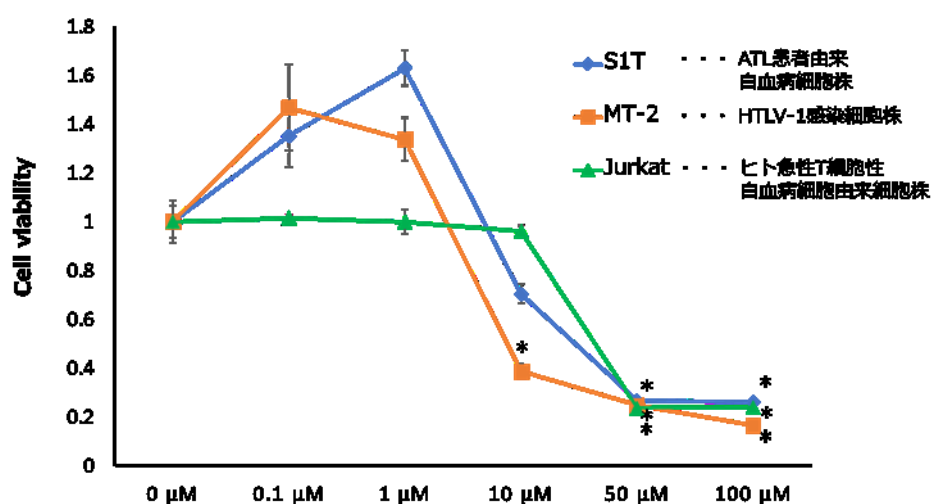


図 1 STF-62247 による各種細胞株の細胞死

また、Flow Cytometry 法によりアポトーシス (Annexin V)、DNA 断片化 (TUNEL) を解析したところ、Annexin V 陽性細胞の増加と DNA の断片化も認めた (図 2)。一方、カスパーゼ阻害剤 (zVAD-fmk) は、STF-62247 による細胞死を抑制しなかった (図 3)。更に、Annexin V 陽性細胞の増加と共に、オートファジーの指標であるオートファゴソムの蓄積とカスパーゼ非依存的な細胞死に関与する核内のエンドヌクレアーゼ G の増加が認められた (図 4, 5)。以上の結果より STF-62247 は、白血病細胞株においてアポトーシスとオートファジーを介して細胞死を誘導することが示唆された。今後、白血病細胞におけるオートファジーの意義や STF-62247 による細胞死のメカニズムについてさらなる検討を行い、新規治療法に結び付けたい。

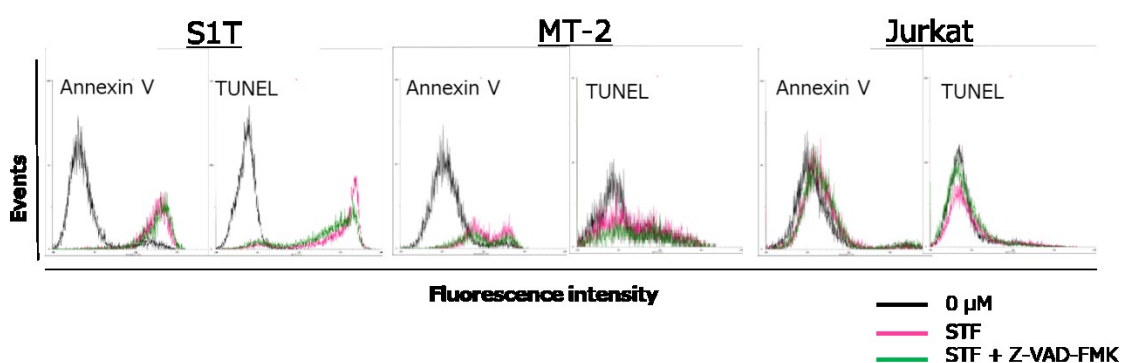


図 2 STF-62247 によるアポトーシスの誘導

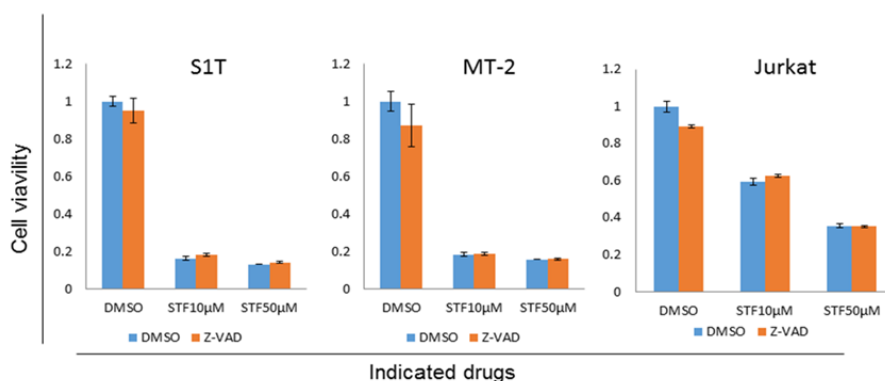


図 3 STF-62247 によるカスパーゼ非依存的細胞死

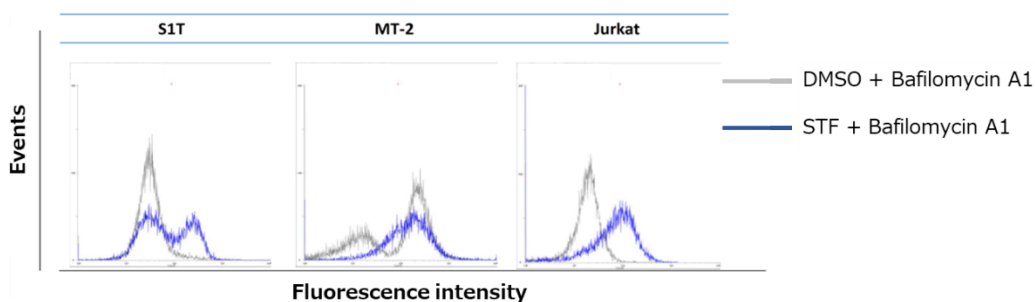


図 4 オートファゴソムの蓄積

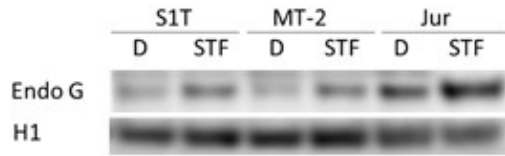


図5 STF-62247によるエンドヌクレアーゼGの上昇

第2章 BVによる細胞死に対する可溶性CD30およびADAM10/17の影響

MMAEは、S1T、MT-2およびCD30陽性ALCL細胞株であるKarpas 299の生存率を優位に低下させた。一方、全ての細胞株の細胞膜表面上にCD30の発現を同等に認めていたが、BV処理におけるIC₅₀は各々0.03μg/ml (S1T)、0.24μg/ml (MT-2)、0.05μg/mlであり、MT-2における効果が最も低かった。興味深いことに、MT-2におけるsCD30濃度は他の細胞株より高かった(表1)。さらにrecombinant CD30がBV誘導性の細胞死を抑制したことから、sCD30がBV活性を中和することが示唆された(図6)。

	S1T	MT-2	Karpas 299
sCD30 (ng/10⁵cells)	19.92±1.69	79.42±3.97	39.95±1.54

表1 各種細胞株におけるsCD30の濃度

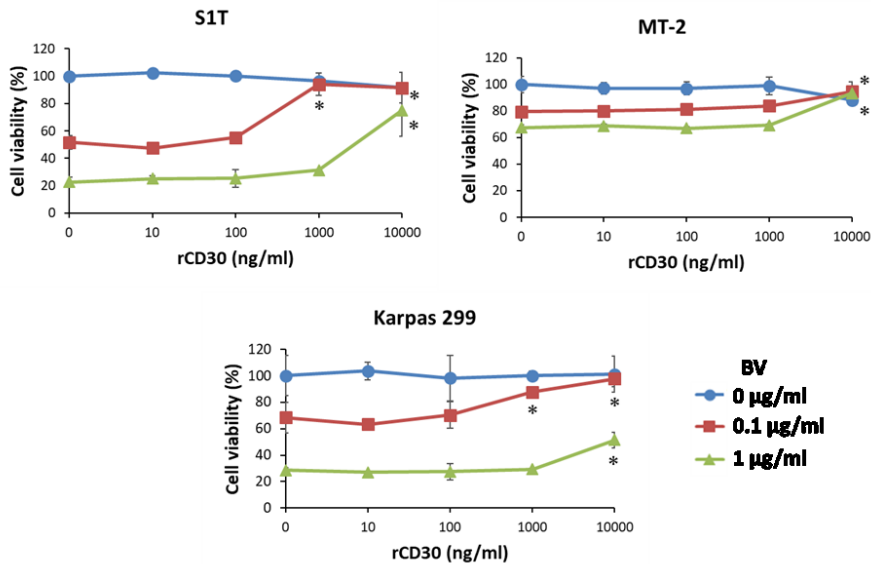


図6 rCD30添加による細胞生存率の回復

一方、HTLV-1 感染細胞株において、calcium ionophore および PMA 刺激により sCD30 濃度は上昇し、その上昇は ADAM10/17 阻害剤により有意に低下した。その際、ADAM10/17 は PMA 刺激により活性化され、ADAM10/17 阻害剤によりその活性は低下した。これらの結果より、HTLV-1 感染細胞株において、CD30 の切断に ADAM10/17 が関与していることが示唆された。さらに ADAM10/17 阻害剤は S1T 細胞において sCD30 の産生を抑制し、BV による細胞死を増加させた (図 7)。

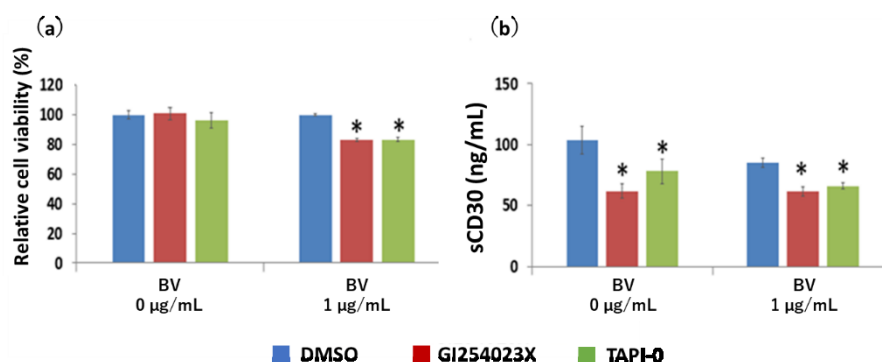


図 7 BV による細胞死及び sCD30 に対する ADAM の影響

以上の結果より、BV による HTLV-1 感染細胞株の細胞死に対して ADAM10/17 を介する sCD30 濃度が影響することが示唆された。sCD30 が ATL に対する BV 療法のバイオマーカーとして有用であることが言える。今後は ATL 患者細胞での検証や抗体薬の効果に影響を及ぼす他の因子の探索をすることにより、ATL の予後改善に貢献していきたい。

審査の結果の要旨

成人 T 細胞白血病 (ATL) は、約 5% のヒト T 細胞白血病ウイルス 1 (HTLV-1) キヤリアから発症する予後不良の造血器悪性腫瘍である。本疾患は 5 年生存率が 17.5% と予後不良であるため、新規治療法の開発が待ち望まれている。申請者は ATL の新たな治療法を確立するために、異なる 2 つのアプローチによって薬物作用の発現メカニズムを解析している。

第 1 章では新規化合物である STF-62247 によるアポトーシスおよびオートファジーを介する細胞死に関する検討をおこなっている。STF-62247 処理は HTLV-1 感染 T 細胞株 (S1T、MT-2 細胞) およびヒト急性 T 細胞性白血病細胞株 (Jurkat 細胞) のいずれの細胞でも細胞生存率を低下させた。これらの細胞株を STF-62247 処理すると、LC3-II の上昇やオートファゴゾームの形成が確認されることから、STF-62247 はオートファジーを誘導することが明らかとなった。STF-62247 によるアポトーシスの発生を調べたが、Jurkat 細胞ではアポトーシスの指標となる Annexin V 陽性細胞の増加および DNA の断片化は認められなかった。一方、HTLV-1 関連細胞株では、Annexin V 陽性細胞の増加、および、DNA の断片化が認められ、STF-62247 はアポトーシスを誘導した。また、カスパーゼ阻害剤である Z-VAD-FMK 処理により、DNA の断片化や細胞死は抑制されず、STF-62247 による細胞死はカスパーゼ非依存性であることが明らかとなった。

第 2 章では ATL 細胞が、その細胞表面に TNF 受容体ファミリーである CD30 を様々な頻度で発現していることに注目している。既存の治療薬である Brentuximab vedotin (BV) は、抗 CD30 抗体と monomethyl auristatin E (MMAE) を結合させた抗体薬物複合体であり、再発・難治性 CD30 陽性ホジキンリンパ腫あるいは再発・難治性 CD30 陽性未分化大細胞リンパ腫に適用されている。BV の ATL 細胞に対する効果を解析し、それが HTLV-1 感染細胞株の増殖を抑制することを示した。一方、可溶性 CD30 (sCD30) は、aggressive-type の ATL で増加することが報告されているが、ATL での BV 誘発細胞死に対する sCD30 の影響は不明である。同様に、A disintegrin and metalloproteinase (ADAM) 10 および 17 は、未分化大細胞リンパ腫 (ALCL) において CD30 から sCD30 を生成する能力を持つが、ATL での挙動は確認されていない。そこで、sCD30 濃度や ADAM10/17 活性の阻害が BV 誘導細胞死にどのような影響を及ぼすのか調べた。MMAE は、HTLV-1 感染 T 細胞株 (S1T、MT-2) および CD30 陽性 ALCL 細胞株 (Karpas 299) の生存率を大幅に低下させる。これら細胞において、CD30 の発現はいずれも同程度だが、MT-2 は、S1T および Karpas 299 に比べて BV に対して耐性であった。MT-2 は S1T および Karpas 299 よりも高い sCD30 レベルを有しており、組換え sCD30 の添加は BV 誘導性の細胞死を抑止した。この結果は sCD30 が BV 活性を中和する可能性を示唆する。HTLV-1 感染細胞株において、CD30 から sCD30 への変換には、ADAM10/17 が関与

していることを示し、ADAM10/17 阻害剤は sCD30 生成の阻害により BV 誘導細胞死を増加させた。これらの結果は、sCD30 と ADAM10/17 が BV の効果に重要な分子であり、ADAM10/17 阻害剤が ATL での BV の有効性を高める治療的価値を持つ可能性があることを示している。

以上のように、今回の研究内容は薬物作用の発現メカニズムを分子レベルで解析した独創性のある結果であり、ATL の治療法の確立に新たな可能性を示した。また、申請者は、業績として共同第一筆者の論文を 2 報報告しており、その他の原著論文や学会発表などと照らし合わせて、将来に活躍が期待できる研究能力を有すると判断できる。さらに、公開学位審査の発表および質疑応答についても適切に応答していることが確認できた。したがって、申請者には博士の学位を授与するに応分の能力が認められると結論した。