

令和元年度
博士学位論文

成人 T 細胞白血病/リンパ腫に
対する新規治療法の検討

分野名 生化学

指導教授 本田 伸一郎

薬学部 薬学研究科 PD161002 佐藤 啓介

目次

第1章 緒言	3
第2章 各論	
第1節 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	
第1項 STF-62247による白血病細胞株の細胞死	6
第2項 白血病細胞株のオートファジーに対するSTF-62247の影響	7
第3項 白血病細胞株のアポトーシスに対するSTF-62247の影響	10
第2節 BVによる細胞死に対する可溶性CD30およびADAM10/17の影響	
第1項 BVによる細胞生存率の変化	13
第2項 HTLV-1感染細胞株における CD30切断に対してのADAM10/17の関与	17
第3項 ADAM阻害剤によるBV誘導細胞死の変化	19
第3章 総括	20
第4章 実験方法	
第1節 試薬及び抗体	22
第2節 細胞培養法	23
第3節 細胞生存率の測定	23
第4節 タンパク質濃度の測定	23
第5節 タンパク抽出とウエスタンブロッティング法	23
第6節 フローサイトメトリー法によるアポトーシス細胞の測定	24
第7節 フローサイトメトリー法によるオートファゴソーム形成の測定	25
第8節 フローサイトメトリー法による細胞膜表面抗原の測定	25
第9節 ELISA法による上清sCD30の測定	25
引用文献	27
謝辞	29

略語

ADAM : a disintegrin and metalloprotease

AIF : apoptosis inducing factor

ALCL : anaplastic large cell lymphoma

AP : autophagosome

ATL : adult T-cell leukemia

BV : brentuximab vedotin

CCR4 : C-C chemokine receptor type 4

DMSO : dimethyl sulfoxide

ELISA : enzyme-linked immuno sorbent assay

EndoG : endonuclease G

HTLV-1 : human T-cell leukemia virus 1

mLSG15 : modified VCAP/AMP/VECP

MMAE : monomethyl auristatin E

PMA : phorbol 12-myristate 13-acetate

rCD30 : recombinant CD30

sCD30 : soluble CD30

VHL : von Hippel-Lindau

第1章 緒言

成人T細胞白血病/リンパ腫（ATL）は、レトロウイルスであるヒトT細胞白血病ウイルス1型（HTLV-1）に感染後、数十年の潜伏期間を経て、キャリアの約5%でATLを発症する（図1）。ATLの主な感染経路は母乳を介した母子感染、性行為感染、輸血による感染である。ATLは、急性型、リンパ腫型、くすぶり型に分類され、特に、ATLの急性型およびリンパ腫型の5年生存率は17.5%と予後不良である¹。

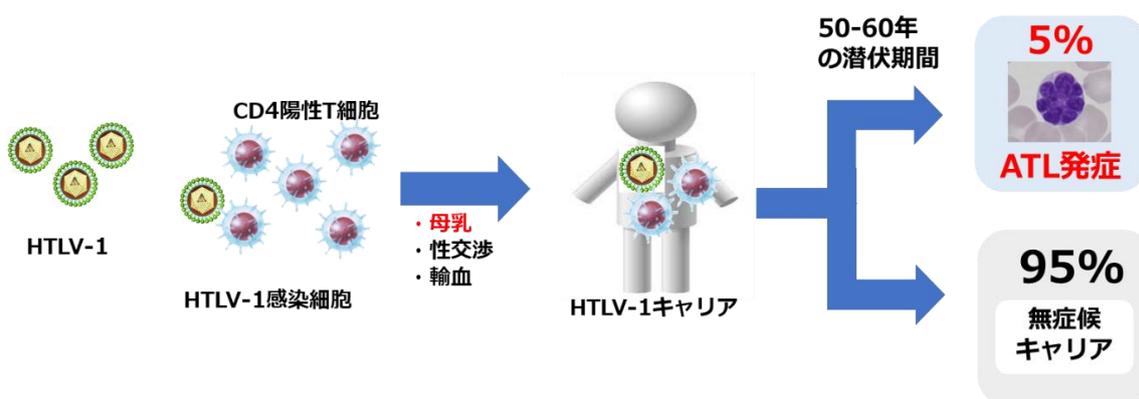


図1 ATL発症機序

ATLの初期治療としてはmodified LSG15療法挙げられるが、1年無増悪生存率は28%であり、生存期間中央値は12.7ヵ月と、ほとんどの患者において再発もしくは病勢の進行が見られる²。また、ATL発症患者は高齢であり、大量化学療法に耐えられる患者も多くはない。現在ではCCケモカイン受容体4（CCR4）陽性のATL患者においては抗CCR4抗体であるモガムリズマブを中心とした治療も行われている。国内の再発又は再燃したCCR4陽性のATL患者を対象とした臨床試験において、モガムリズマブの奏効率は50%であった。しかし無増悪生存期間の中央値は5.2ヵ月であり、全生存期間の中央値は13.7ヵ月とモガムリズマブによる治療においても依然として予後は不良である³（図2）。

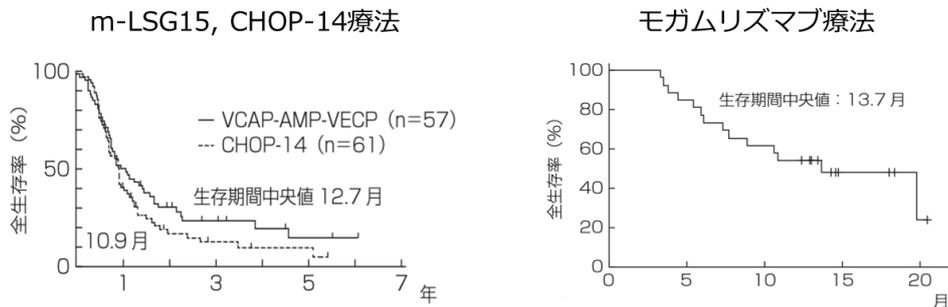


図2 m-LSG15療法、モガムリズマブ療法の全生存率

最近では、再発または難治性のATL患者に対して、免疫調整作用を有しているレナリドミドが適応を取得している。国内第2相試験においての奏功割合は42.3%と良好な結果が得られている⁴。しかし、連日内服に伴う骨髄抑制を来し、治療を継続することが難しい症例を多々経験する。ATLは再発を繰り返し、再発や病勢の進行にしたがって、治療抵抗性を示す事が多く、早急な新規治療薬開発が待ち望まれている。

オートファジーは、リソソーム依存性のプロセスであり、細胞は自身の細胞質オルガネラを分解する⁵。オートファジーは複数のストレスに反応して活性化され、腫瘍細胞の生存と薬剤耐性を促進することが言われている⁶。すでに、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) 欠損の腎細胞がんに対してアポトーシスを介さずにオートファジーを伴う細胞死を誘導することが報告されている⁷。そこで、本研究の第1節では、STF-62247によるHTLV-1感染細胞の細胞死に対する影響について検討した。

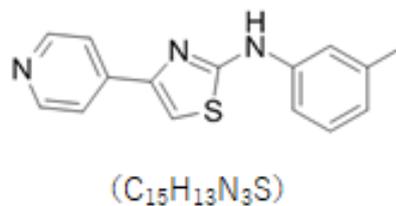


図3 STF-62247の構造

第2節では既存の治療薬を焦点にATLでの治療の可能性について検討を行った。CD30はドイツのキール大学の研究グループによって発見された分子であり、ホジキンリンパ腫や未分化大細胞リンパ腫に特異的に発現している⁸。CD30は腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーに属する膜貫通糖たんぱく質であり、アポトーシスの誘導に加えてIκBのリン酸化によってNFκBを活性化し、サイトカインの分泌、炎症の調整など様々な機能

を有している⁹。CD30 は ATL 患者において 19.6%の患者で発現していると報告されており、発現過剰や CD30 リガンドとの結合により感染細胞の増殖、分裂異常をきたす¹⁰。

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からなる vedotin で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保険適用となっている。

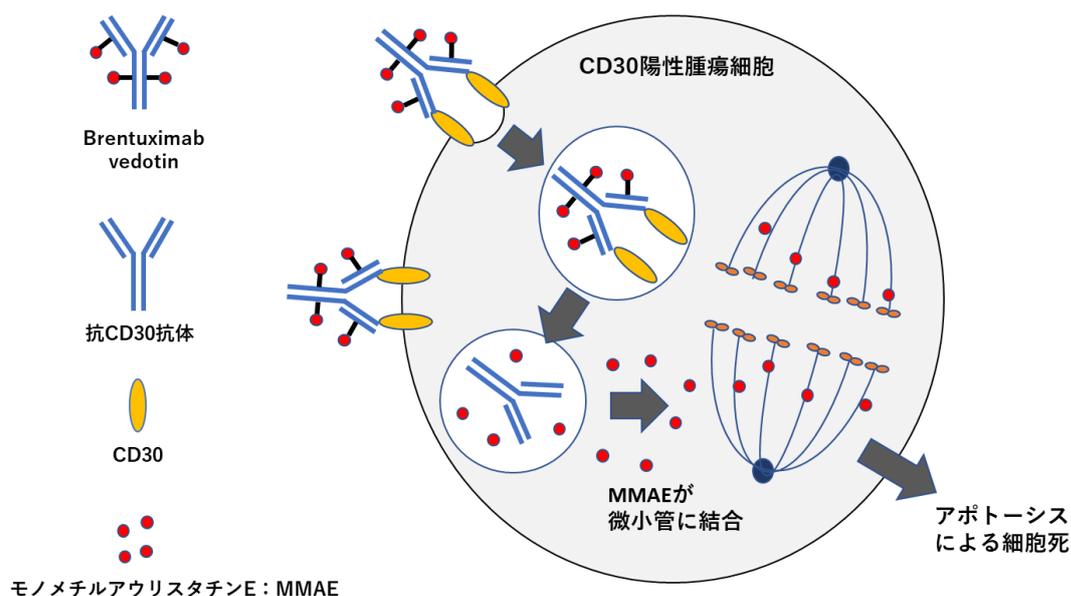


図4 Brentuximab vedotin の作用機序

CD30 抗原は、ATL 細胞や未分化大細胞型リンパ腫 (ALCL) 細胞に高発現し、ATL 患者において血清中の可溶性 CD30 (sCD30) 濃度が有意に上昇している¹¹。また、マトリックスメタロプロテアーゼである A Disintegrin And Metalloproteinase (ADAM) ファミリーは ALCL 細胞において細胞膜上の CD30 抗原を切断し、sCD30 を産生することが報告されている¹²。ADAM ファミリーは、シェディングや、インテグリンなどへの結合により細胞の接着、運動、増殖に関与している。

この研究では、HTLV-1 感染細胞株の BV による細胞死に対する sCD30 および ADAM10/17 の影響を調べた。

第1節 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

第1項 STF-62247 による白血病細胞株の細胞死

まず初めに SIT、MT-2 細胞 (HTLV-1 感染細胞株) 及び Jurkat 細胞 (ヒト急性 T 細胞性白血病細胞株) を用い STF-62247 の効果について細胞生存率を測定した。いずれの細胞株も用量依存的に細胞生存率の低下を認めた (図 5)。各種細胞株の IC_{50} は $21.2 \mu M$ (SIT)、 $7.6 \mu M$ (MT-2) および $27.9 \mu M$ (Jurkat) と 72 時間において強力な活性を示し、MT-2 において最も効果が得られた。

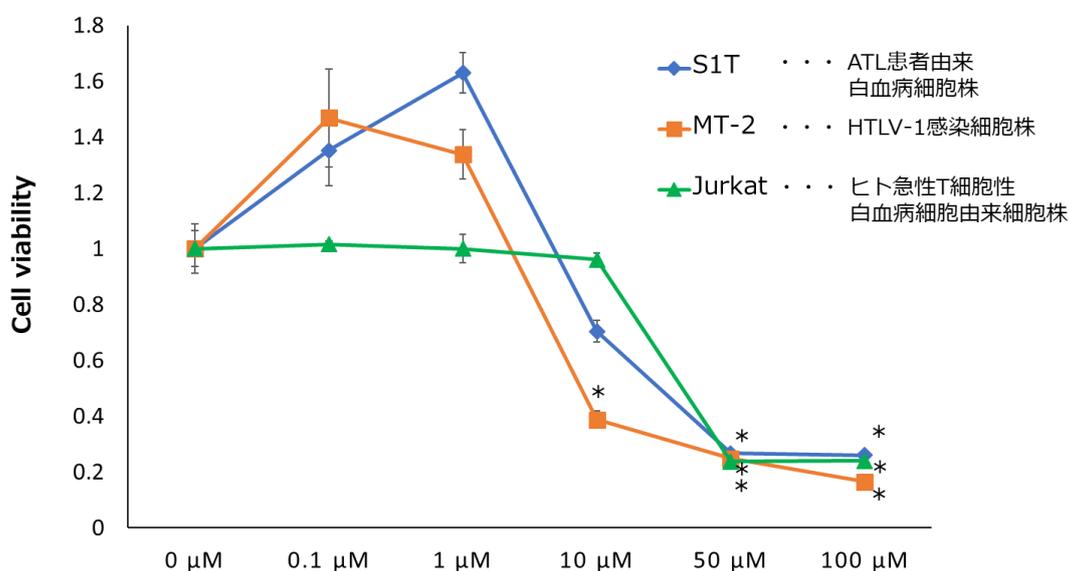


図 5 STF-62247 による各種細胞株の細胞死

SIT、MT-2 および Jurkat 細胞に STF-62247 (0-100 μM) 添加後、72 時間 培養し、細胞生存率を生細胞測定試薬 SF で測定した。*P < 0.01 vs. 0 μM of STF-62247.

エラーバーはすべて標準偏差を示す。

第2項 白血病細胞株のオートファジーに対する STF-62247 の影響

次に、STF-62247 による細胞増殖の抑制がオートファジーを伴う細胞死か検討を行った。オートファジーの仕組みとしては下記に示す通り、細胞が飢餓条件下におかれると、細胞質に隔離膜と呼ばれる扁平な小胞が現れる。その後、膜は細胞質を取り込みながら伸長し、先端どうしが融合して、オートファゴソーム (AP) が形成され、AP 内にはミトコンドリアなどの大きなオルガネラも含まれる。AP がリソソームと融合すると、内包物は分解され、自己消化で得られたアミノ酸は栄養源として再利用される (図 6)。LC3 は、翻訳された直後に LC3-I となり、さらにオートファジーが誘導されると、LC3-I とホスファチジルエタノールアミンが結合して LC3-II となる。LC3-II は膜結合型でありオートファゴソーム膜に存在すると考えられており、LC3-II の量はオートファゴソームの量と相関するとされている。今回、ウエスタンブロッティングにて STF-62247 によりすべての細胞株において LC3-II の上昇が認められたことから、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 (図 7)。

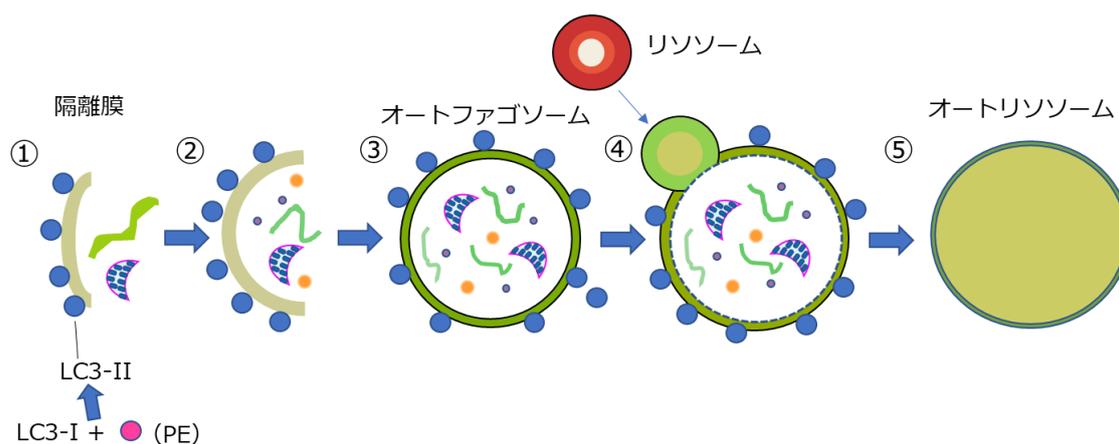


図 6 オートファジーの仕組み

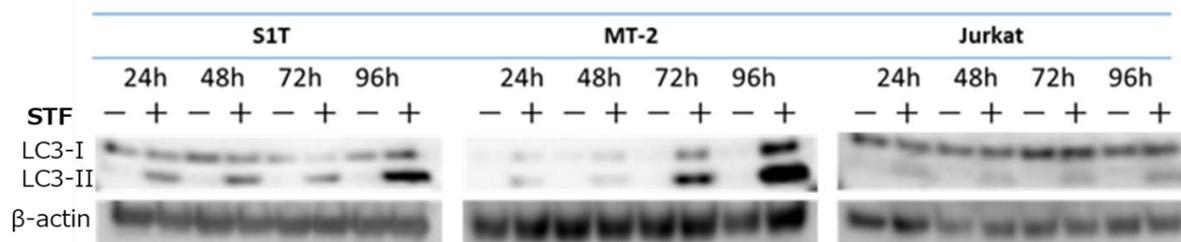


図7 ウェスタンブロッティングによるオートファゴソームの確認

S1T と MT-2 および Jurkat 細胞に DMSO または STF-62247 (S1T、Jurkat: 50 μM; MT-2: 10 μM) 添加後、24-96 時間培養し、LC3 タンパクをウェスタンブロット法で検出した。

次にオートファゴソームを選択的に染色する蛍光プローブを用い、蛍光顕微鏡とフローサイトメトリーにて評価した。STF-62247 を添加し、72 時間処理後、測定の 30 分前にオートファジー阻害剤である Bafilomycin A1 で前処理し、オートファゴソームの蓄積をフローサイトメトリー法にて確認した。いずれの細胞株においても STF-62247 の添加により蛍光強度が高い細胞のピークが右側にシフトしていることからオートファジーが誘導されたことが分かった (図 8)。さらに蛍光顕微鏡では S1T 細胞を例に、緑色の蛍光が増加したことから、STF-62247 はオートファゴソームの形成を促進することが明らかとなった (図 9)。

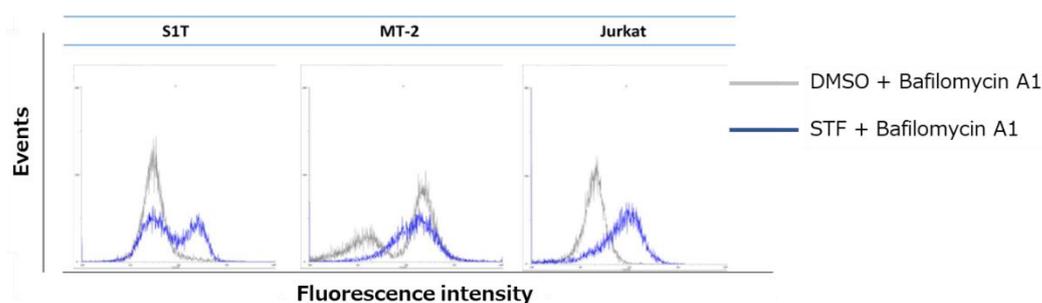


図8 フローサイトメトリーによるオートファゴソームの蓄積

S1T と MT-2 および Jurkat 細胞に DMSO または STF-62247 (0-50 μM) 添加後、72 時間培養し、Cyto-ID を用いてオートファゴソームの蓄積をフローサイトメーターにて測定した。

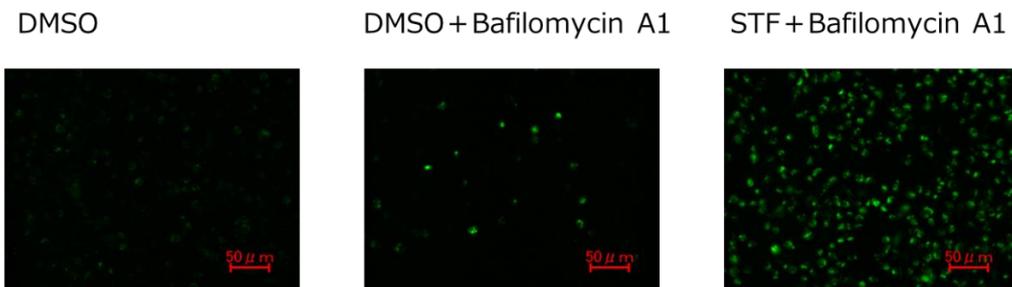


図9 蛍光顕微鏡によるオートファゴソームの蓄積

S1T 細胞において STF-62247 を添加後、72 時間培養し、測定の 30 分前にオートファジー阻害剤の Bafilomycin A1 で前処理し、Cyto-ID を用いてオートファゴソームの蓄積を蛍光顕微鏡で確認した。

第3項 白血病細胞株のアポトーシスに対する STF-62247 の影響

次に STF-62247 によるアポトーシスの誘導について検討した。アポトーシスは DNA の断片化を伴う細胞死であり、アポトーシスの開始に伴い、フォスファチジルセリンが内側から外側に移行します。Annexin V は Ca^{2+} 存在下で Phosphatidylserine(PS) に結合し、強い親和性をもつため、アポトーシス細胞を検出する指標となる。さらに TUNEL 法は DNA 断片化を検出する方法として用いられ、アポトーシスによって細胞内の核における断片化 DNA の 3'-OH 末端部分に fluoresceind-UTP を結合させることで断片化 DNA に特異的な蛍光検出が行える。

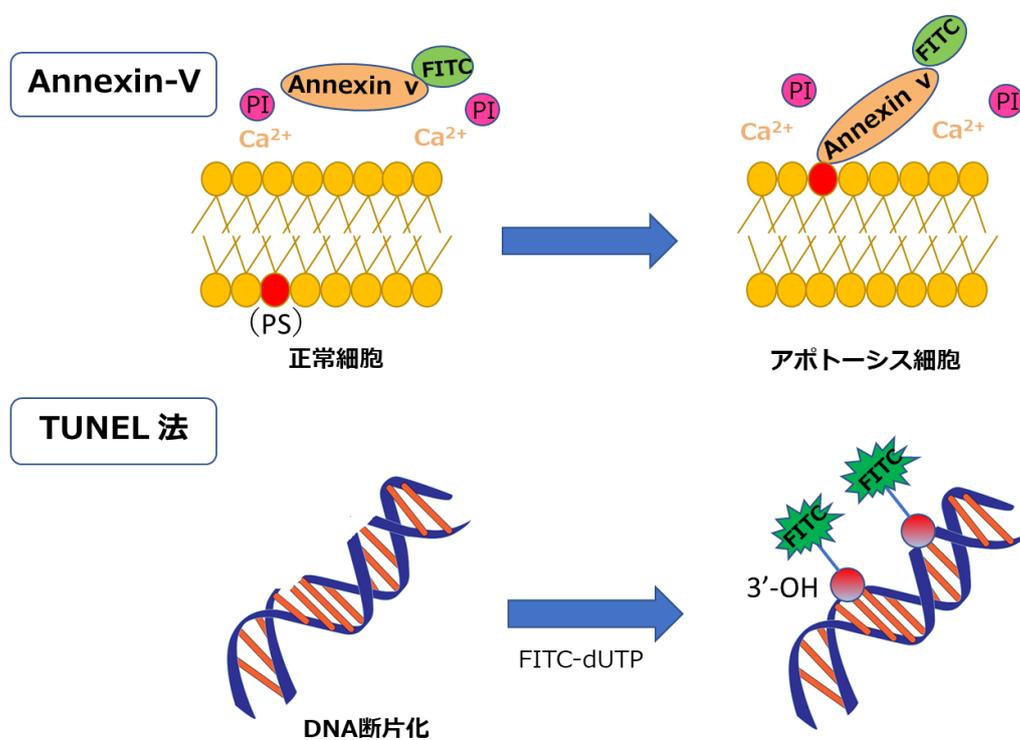
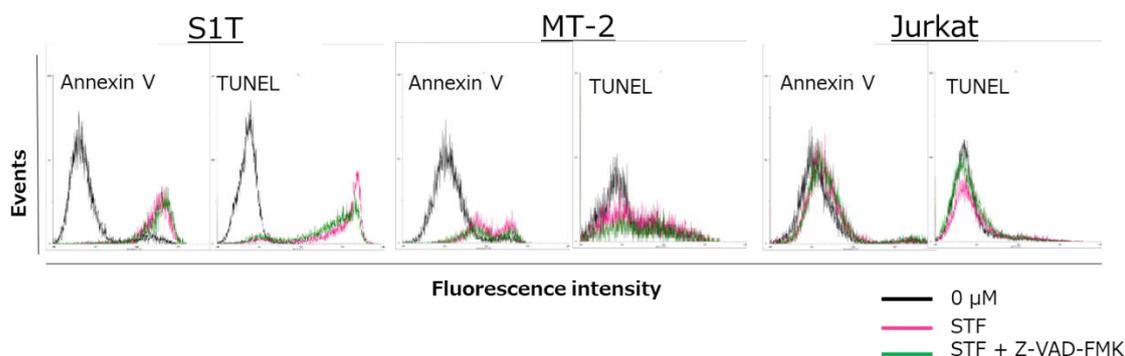


図 10 アポトーシス細胞の検出方法

実験結果として、Jurkat 細胞では 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 (図 11 (A))。一方、興味深いことに、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たことから、STF-62247 がアポトーシスを誘導することが明らかとなった。さらに、汎カスパーゼ阻害剤である Z-VAD-FMK 処理により、STF-62247 による DNA の断片化および細胞死は抑制されなかったことからカスパーゼ非依存性の細胞死を誘導することも明らかとなった (図 11 (B))。

(A)



(B)

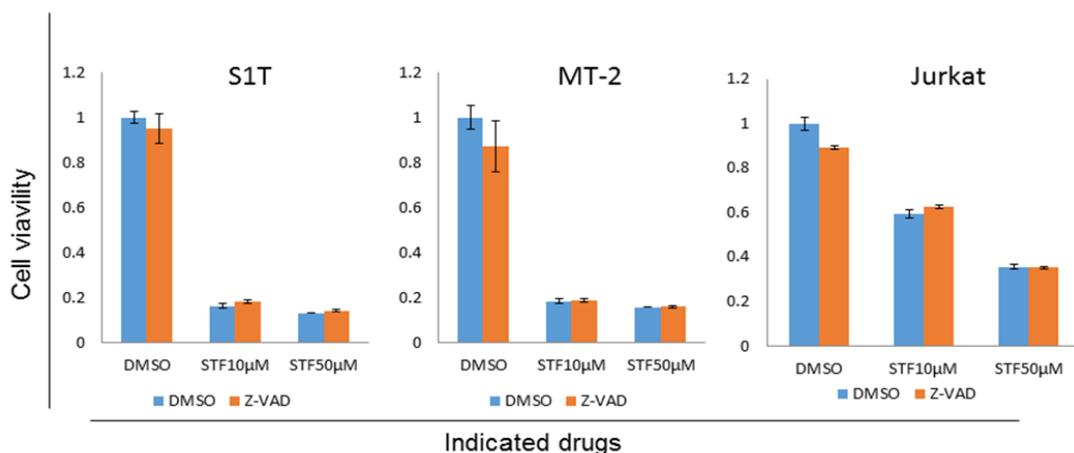


図 11 STF-62247 によるカスパーゼ依存および非依存の細胞死

S1T、MT-2 および Jurkat 細胞を用いた。(A) :DMSO または汎カスパーゼ阻害剤である Z-VAD-FMK (10μM) 処理し、72 時間培養 した後、Annexin-V、TUNEL 陽性細胞についてフローサイトメーターにて測定した。(B) :DMSO または汎カスパーゼ 阻害剤である Z-VAD-FMK (10μM) で 1 時間処理し、STF-62247 (0-50μM) 添加後、48 時間培養し、細胞生存率を生細胞測定試薬 SF で測定した。エラーバーは全て標準偏差を示す。

STF-62247 はカスパーゼ非依存性の細胞死を誘導することから、カスパーゼ非依存の経路（図）として AIF や EndoG などのタンパクについてウエスタンブロッティングにて確認を行った。STF-62247 処理により AIF レベルは、S1T および MT-2 細胞で安定していた。対照的に、核エンドヌクレアーゼ G レベルは増加していたことが分かった（図 13）。

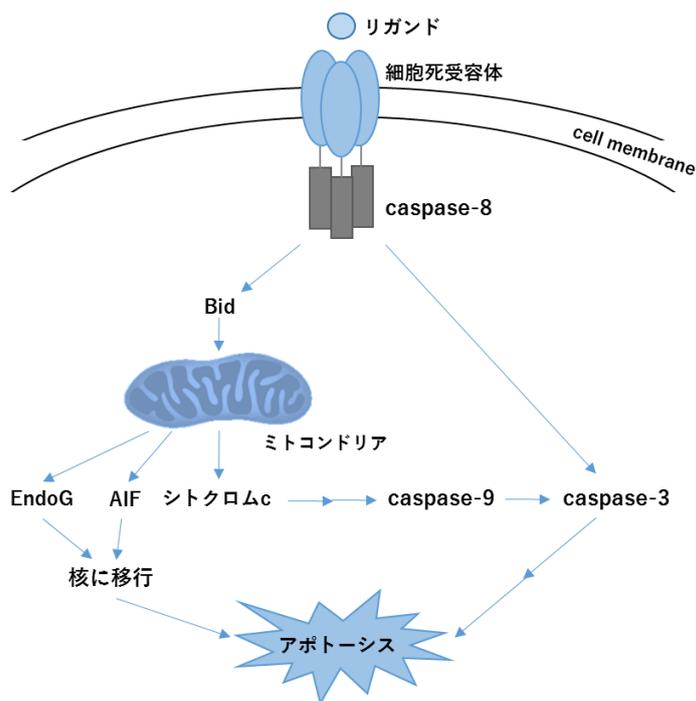


図 12 アポトーシスの機序

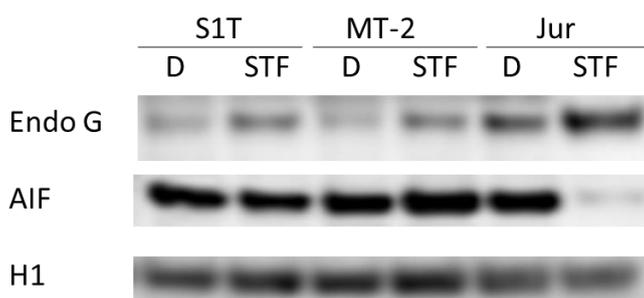


図 13 ウエスタンブロッティングによる End G および AIF の確認

S1T と MT-2 および Jurkat 細胞に DMSO または STF-62247 (S1T, Jurkat: 50 μ M; MT-2: 10 μ M) 添加後、72 時間培養し、Endo G および AIF タンパクをウエスタンブロット法で検出した。

第2節 BVの効果に対する可溶性CD30およびADAM10/17の影響

第1項 BVによる細胞生存率の変化

ここでは、初めにS1T、MT-2細胞（HTLV-1感染細胞株）及びKarpas299細胞（ALCL細胞）を用い、MMAE単独処理による細胞生存率を生細胞測定試薬SFで測定した。いずれの細胞株もMMAE単独処理にて細胞生存率の有意な低下が認められた（図14）。MMAEは72時間で強力な活性を示し、各種細胞株における IC_{50} は0.14 nM(S1T)、0.19 nM(MT-2)および0.11 nM(Karpas299)であった。

次に、BVの標的となるCD30についてフローサイトメトリーを使用し、各種細胞株の細胞表面のCD30発現について測定した。結果、いずれの細胞株においてもCD30の発現が確認できた（図15）。CD30の発現を踏まえて、BV処理による細胞生存率について測定した。BVにおいても72時間で強力な活性を示し、各種細胞株における IC_{50} は各々0.03 μ g/ml(S1T)、0.24 μ g/ml(MT-2)、0.05 μ g/ml(Karpas 299)であった（図16）。MMAEによる効果はいずれも同等であったが、BVにおいてはCD30の発現はいずれの細胞株も類似していたにもかかわらず、MT-2においてS1T、Karpas299と比較して効果が低く、CD30の発現とは関連しないことが分かった。

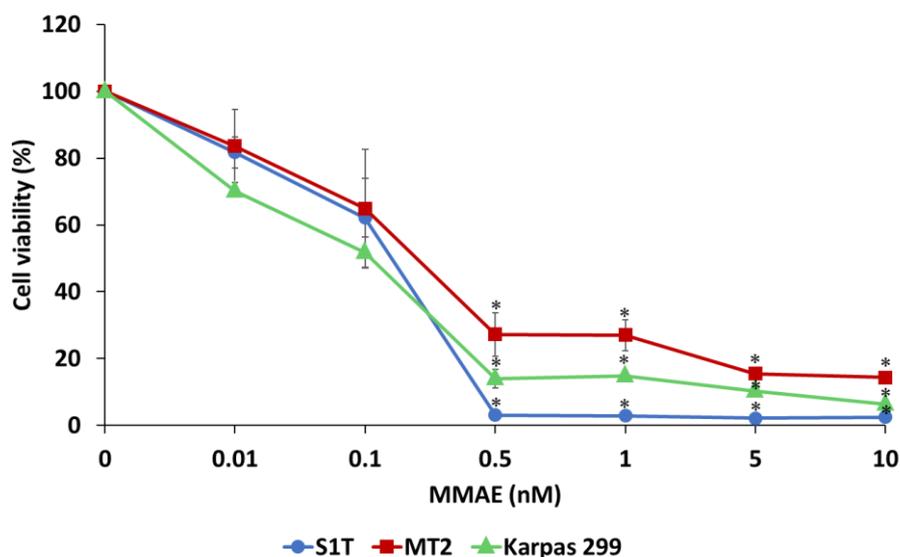


図14 MMAEによる各種細胞株の細胞死

S1TとMT-2およびKarpas299細胞にMMAE添加後、72時間培養し細胞生存率を生細胞測定試薬SFで測定した。72時間後の IC_{50} は、各々0.14 nM(S1T)、0.19 nM(MT-2)、0.11 nM(Karpas 299)であった。* $P < 0.01$ vs. 0 nM of MMAE. エラーバーはすべて標準偏差を示す。

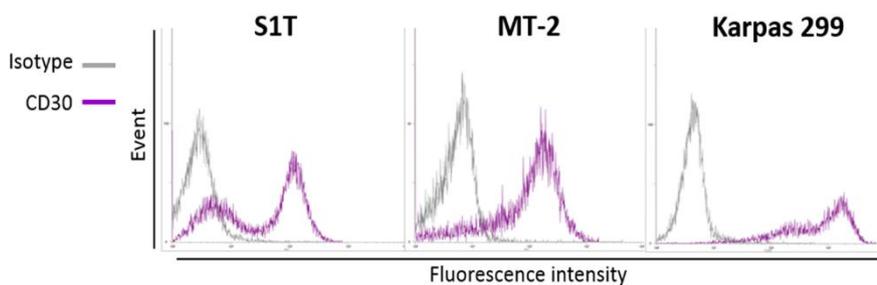


図 15 各種細胞株における CD30 の発現

S1T と MT-2 および Karpas 299 の細胞膜表面の CD30 陽性細胞について抗 CD30 抗体を用いてフローサイトメトリー法により測定した。

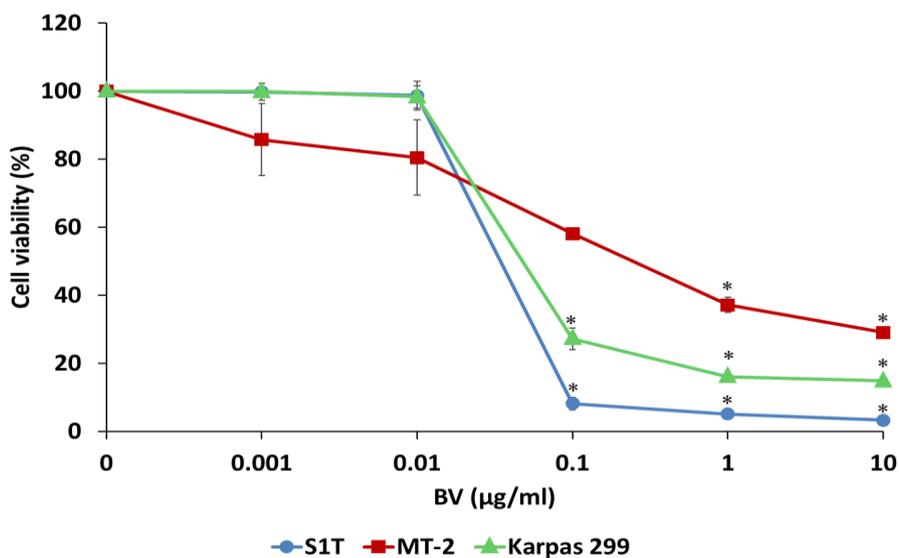


図 16 BV による各種細胞株の細胞死

S1T と MT-2 および Karpas299 細胞に BV 添加後、72 時間培養し細胞生存率を生細胞測定試薬 SF で測定した。72 時間後の IC₅₀ は、各々 0.03 μg/ml (S1T)、0.24 μg/ml (MT-2)、0.05 μg/ml (Karpas 299) であった。*P<0.01 vs. 0 μg/ml of BV. エラーバーはすべて標準偏差を示す。

MMAE の効果と CD30 の発現はいずれの細胞株においても同等であったのにも関わらず、BV の効果に差が生じた。そこで細胞培養上清中の sCD30 濃度を ELISA 法にて測定したところ、興味深いことに、MT-2 における sCD30 濃度は他の 2 つの細胞株と比較して高かった (表 1)。この事より sCD30 が BV の細胞への結合を阻害して MT-2 において感受性の低下を引き起こした可能性が考えられた。そこで、recombinant CD30 (rCD30) を BV と共に添加することで、BV による細胞死に対する影響を調べた。rCD30 が高濃度の時に細胞生存率低下の回復が見られたことから sCD30 が BV による効果を低下させることが分かった (図 17)。

	S1T	MT-2	Karpas 299
sCD30 (ng/10 ⁵ cells)	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

S1T と MT-2 および Karpas 299 細胞の培養上清中の sCD30 濃度 (ng/mL) を ELISA 法にて測定した。

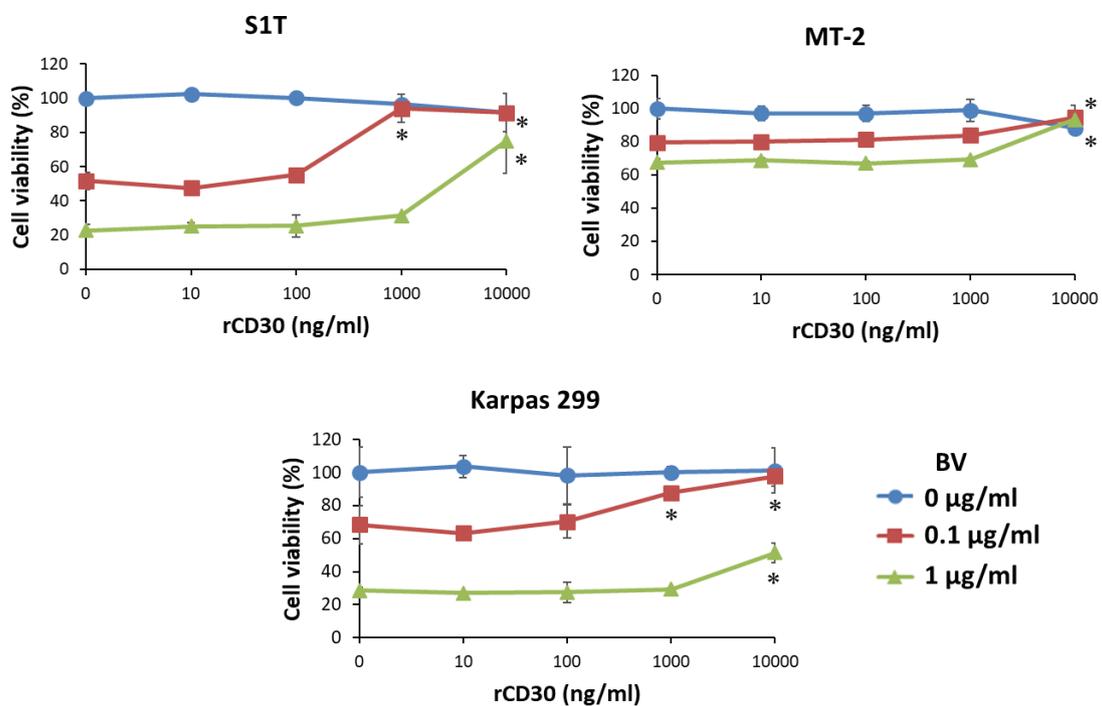


図 17 rCD30 添加による細胞生存率の回復

S1T と MT-2 および Karpas 299 細胞に recombinant CD30 (rCD30) と共に BV (0-1 μg/mL) 添加後 48 時間培養し、細胞生存率を測定した。* $P < 0.05$ vs rCD30 (0 ng/mL)、エラーバーはすべて標準偏差を示す。

第2項 HTLV-1 感染細胞株における CD30 切断に対する ADAM10/17 の関与

ADAM10/17 は、ALCL 細胞において、細胞膜上の CD30 を切断し、sCD30 を産生する。しかし、ATL における ADAM10/17 の機能は不明である。ここでは、ATL における ADAM10/17 の関与について検討した。

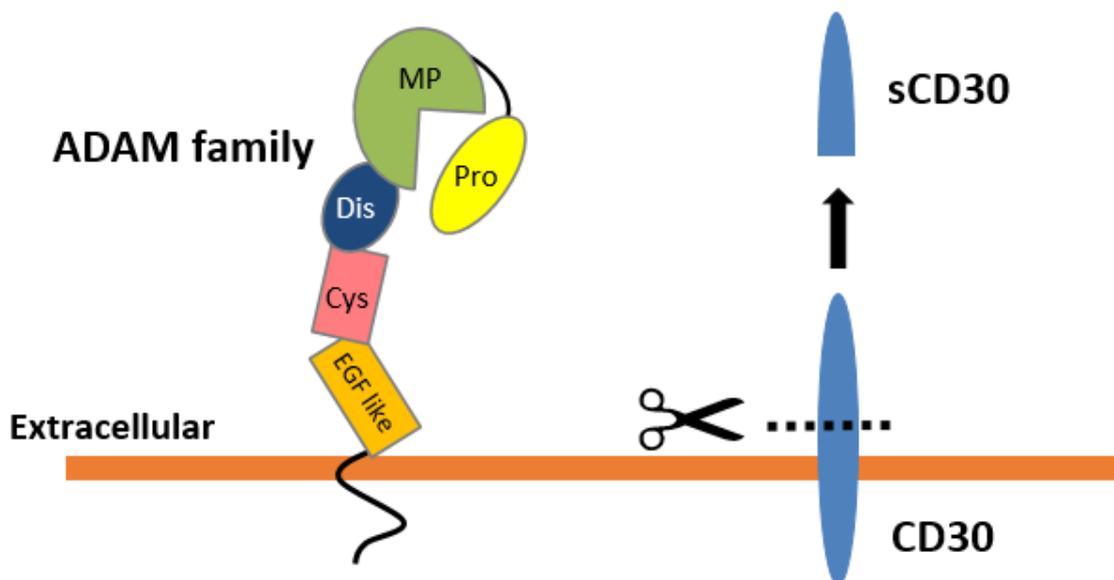


図 18 CD30 と ADAM ファミリー

S1T、MT-2 および Karpas 299 細胞において、ADAM 活性化作用を持つ PMA (30 ng/mL; a, c, e) および Calcium Ionophore (1 μ M; b, d, f)、ADAM10 阻害剤である GI254023X (2.5 μ M)、ADAM17 阻害剤である TAPI-0 (25 μ M)、ADAM17 およびマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤である Marimastat (1 μ M) で処理し、40 分後 (a, c-f) または 4 時間後 (b) における sCD30 量 (ng/ml) を ELISA 法により測定した。S1T、MT-2 において PMA および Calcium ionophore 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 (図 19)。従って、HTLV-1 感染細胞株において CD30 の切断に、ADAM10/17 が関与する可能性が示された。

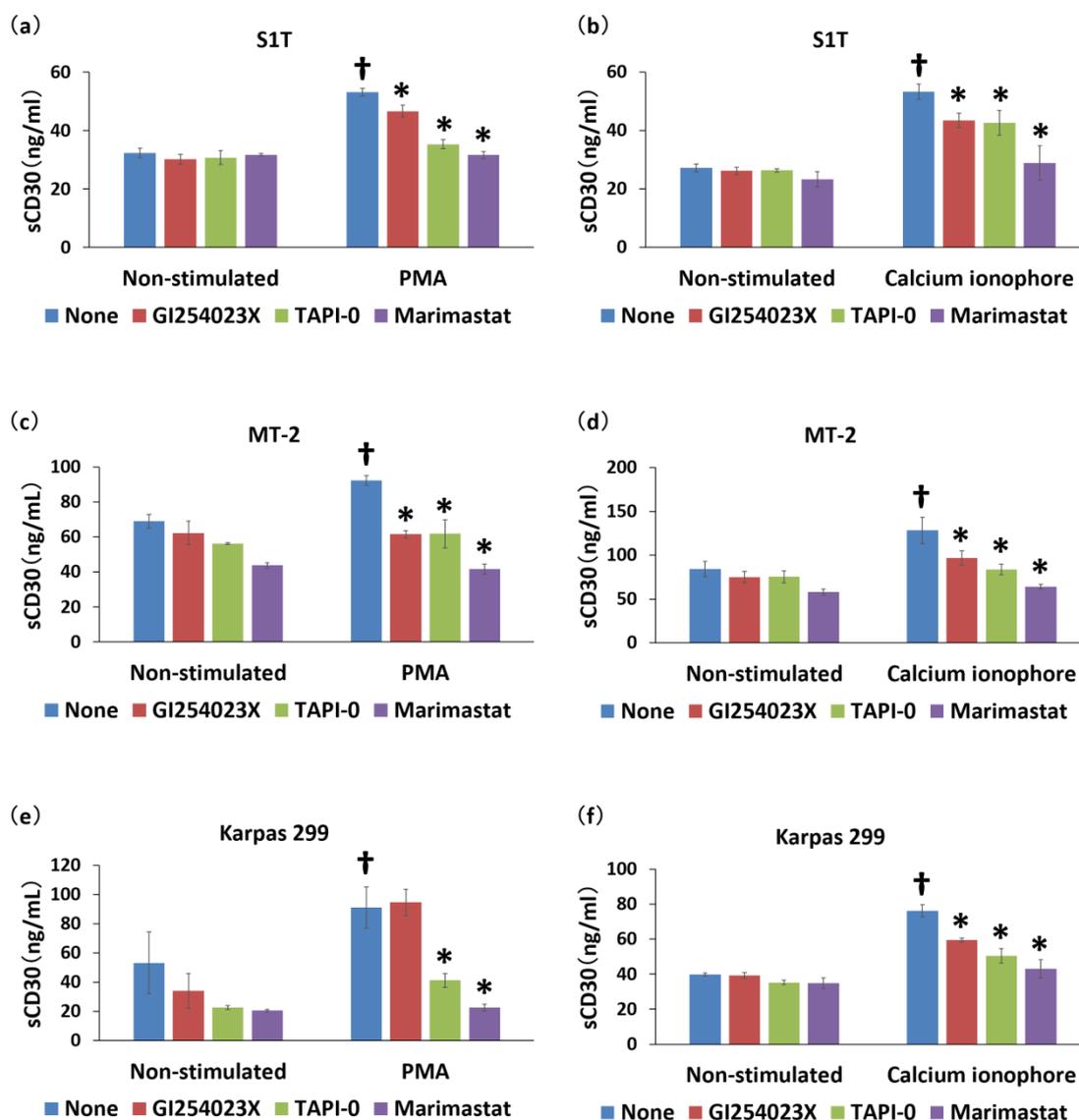


図 19 ADAM 阻害剤添加後の白血病細胞株における sCD30 の濃度

S1T、MT-2 および Karpas 299 細胞を PMA (30 ng/mL; a, c, e)、Calcium Ionophore (1 μ M; b, d, f)、GI254023X (2.5 μ M)、TAPI-0 (25 μ M) および Marimastat (1 μ M) で処理し、40 分後 (a, c-f) または 4 時間後 (b) における sCD30 の濃度 (ng/mL) を ELISA 法により測定した。*P < 0.05 vs None/PMA, †P < 0.05 vs None/Non-stimulated. エラーバーは標準偏差を示す。

第3項 ADAM 阻害剤による BV 誘導細胞死の変化

sCD30 の増加により、BV による細胞死が中和されたため、反対に sCD30 の減少により細胞死が増加するのかを検証した。ADAM10 阻害剤である GI254023X および ADAM17 阻害剤である TAPI-0 と共に BV を添加し、細胞生存率および sCD30 濃度を測定した。BV と ADAM 阻害剤の併用により、細胞死の増加が認められた (図 20 (a))。また、ADAM 阻害剤による sCD30 の産生の抑制も確認できた (図 20 (b))。このことから、sCD30 の減少によって BV による細胞死が増加することが示唆された。

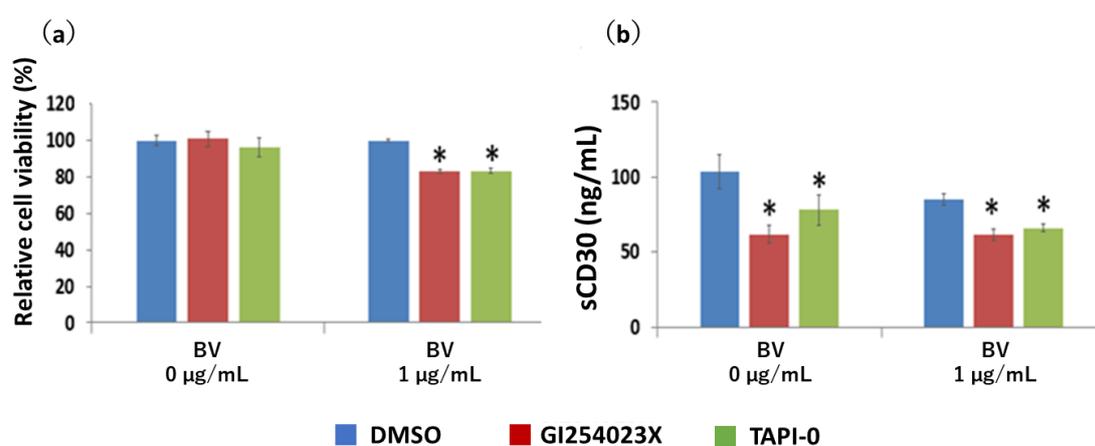


図 20 ADAM 阻害剤による細胞死の増加と sCD30 産生の抑制

S1T 細胞に ADAM10 阻害剤 (2.5 µM) および ADAM17 阻害剤 (25 µM) と共に BV (1 µg/mL) を添加後、48 時間培養した。(a) は細胞生存率、(b) は sCD30 量 (ng/mL) を示す。*P < 0.05 vs DMSO、エラーバーはすべて標準偏差を示す。

総括

オートファジーは正常なホメオスタシスに必要であるが、癌を含む多くの病理学的進展に関わる。もしくは発癌性タンパク質基質、および損傷したオルガネラを排除することにより、腫瘍を抑制することもできる。これまでに STF-62247 は細胞毒性を誘導し、オートファジーを介して VHL 欠損腎細胞がんの腫瘍成長を低下させることが発見された。

第1節では STF-62247 が白血病細胞株の成長を阻害し、オートファジーを誘導することを発見した。さらに STF-62247 は、HTLV-1 感染細胞株においてオートファジーのみならずアポトーシスによる細胞死を引き起こし、VHL 欠損腎細胞癌や Jurkat 細胞ではアポトーシスを誘発しなかったことが分かった。HTLV-1 感染細胞株において STF-62247 と汎カスパーゼ阻害剤である Z-VAD-FMK 併用処理により、DNA の断片化および細胞死を抑制しなかったことから、カスパーゼ非依存性の細胞死を誘導することも明らかとなった。さらにウエスタンブロッティングにて Endo G のタンパクレベルの上昇を認めたことより、カスパーゼを介さず、Endo G を介した細胞死を誘導することが分かった。STF-62247 は白血病細胞におけるアポトーシスおよびカスパーゼ非依存性のオートファジーによる新たな機序での治療薬としての可能性が示された。

第2節では ATL 患者で発現している CD30 において新規治療の分子となる可能性を検討した。CD30 を標的とする BV は現在、ホジキンリンパ腫および ALCL に対して適応を有している。今回の実験結果より HTLV-1 感染細胞に対しての効果が見られた。興味深いことに、MMAE による成長阻害効果は S1T および MT-2 細胞は同等にもかかわらず、BV による成長阻害効果において、MT-2 細胞は S1T 細胞よりも低下していることが分かった。BV は ATL の臨床試験にてシクロホスファミド、ドキソルビシン、エトポシド、およびプレドニゾンと組み合わせて臨床試験中である (clinicaltrials.gov identifier : NCT03264131)。ATL の臨床応用については BV の効果に影響するマーカーが重要だと考えられる。sCD30 濃度はびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫および末梢 T 細胞リンパ腫における BV の効果と相関しないが、ATL における BV の効果に対する sCD30 の影響は不明である^{13,14}。重要なことに MT-2 細胞の sCD30 の濃度が S1T 細胞と比較して高く、MT-2 細胞において BV の効果が低いことが分かった。さらに rCD30 の添加にて HTLV-1 感染細胞の BV 誘導細胞死を中和した。したがって sCD30 は CD30 陽性の腫瘍において低濃度である患者に最も有効である可能性があり、ATL に対する BV 療法のバイオマーカーとして有用であると言える。

急性型 ATL では血清 sCD30 レベルが大幅に上昇しており¹¹、sCD30 は HTLV-1 感染細胞株の BV による細胞死を中和することから ATL における CD30 の切断に関与する酵素が重要と考えられる。ADAM10/17 はホジキンリンパ腫および ALCL 細胞株において、CD30 の切断に関与していることが示唆されている。HTLV-1 感染細胞株において PMA および Calcium ionophore 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。従って、HTLV-1 感染細胞株において CD30 の切断に、ADAM10/17

が関与する可能性が示された。実験結果より BV の細胞死は sCD30 濃度に依存し、ADAM10 / 17 は CD30 切断に関与していた。さらに ADAM10/17 阻害剤は CD30 の切断を阻害し BV による細胞死を増強させたことが分かった。しかし、S1T 細胞での ADAM10 / 17 阻害剤による BV 細胞死の増加はそれぞれ 17.8% と 17.7% であり、BV と ADAM10 / 17 阻害剤の併用における BV と間に有意差は見られず、効果が不十分であった。HER2 陽性乳癌細胞株に由来するエクソソームは、モノクローナル抗体トラスツズマブに結合し、その活性を阻害することが言われている¹⁵。今回、データは示していないが、MT-2 細胞の CD9 陽性エクソソームの濃度は S1T 細胞と比較して高く、HTLV-1 感染細胞由来のエクソソームが BV 誘発細胞死に関与している可能性がある。

結論として、BV の細胞死減効果は sCD30 濃度と ADAM10 / 17 に依存することを示した。さらに、ADAM10 / 17 阻害剤は、CD30 放出の減少を介して BV 誘発細胞死を増加させた。これは、ADAM10 / 17 活性により切断された sCD30 が HTLV-1 感染細胞株の BV 効果に関与する重要な分子であることを示された。私たちの結果は sCD30 が ATL の 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。

第4章 実験方法

第1節 試薬及び抗体

本研究に用いた試薬及び抗体は以下の通りである。

RPMI 1640 (日研生物医学研究所)
L - Glutamine (Sigma)
Penicillin&Streptomycin (Invitrogen)
PBS (DS PHARMA BIOMEDICAL)
生細胞測定試薬 SF (ナカライテスク)
STF-62247 (Merck Millipore)
Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo)
RIPA buffer (SANTA CRUZ)
Protease inhibitor cocktail (SANTA CRUZ)
Phosphatase inhibitor Cocktail 2 (SIGMA)
Phenylmethanesulfonyl fluoride (Wako)
NuPAGE LDS Sample Buffer (4×) (Invitrogen)
Blocking One (Nacalai tesqu)
Chemi-Lumi One (Nacalai tesqu)
Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution 1 (TOYOBO)
Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution 2 (TOYOBO)
Cyto-ID Autophagy detection kit (Enzo)
β-Actin Antibody (Cell Signaling)
Annexin V-FITC (MBL)
TUNEL Kit Direct (MBL)
Binding buffer (Invitrogen)
Z-VAD-FMK (MBL)
LC3 Antibody-Based Assay Kit (Merck Millipore)
MMAE (Tocris Bioscience)
Brentuximab vedotin (武田薬品工業)
Recombinant CD30 (R&D System)
抗 CD30 抗体 (eBioscience)
Human sCD30 Platinum ELISA (eBioscience)
G1254023X (SIGMA-ALDRICH)
TAPI-0 (Santa Cruz Biotechnology)

第2節 細胞培養法

S1T と MT-2 細胞 (以上、HTLV-1 感染細胞株)、Karpas 299 細胞 (未分化大細胞型リンパ腫細胞株) を 1 mM L-glutamine、1 % penicillin / streptomycin を加えた 10 % FBS – RPMI 1640 培地で 5 % CO₂、37°C 条件にて培養した。

第3節 細胞生存率の測定

細胞浮遊液を 2×10^5 cells / mL の濃度となるように調整し、96 well plate に最終容量 100 μ L となるように各試薬を添加培養した。

↓

生細胞測定試薬 SF (ナカライテスク) を 10 μ L 加え、37°C、5 % CO₂ の条件で 2 時間インキュベートした。

↓

Micro Plate Reader (TECAN) を用いて 450 nm の吸光度を測定した。

第4節 タンパク質濃度の測定

BCA Protein Assay Kit 取扱説明書に従い、Reagent A : Reagent B が 50 : 1 となるように混合し、BCA Working Reagent (WR) を調製した。

↓

BSA を 0, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/mL となるように調製し、Standard とした。

↓

WR を Micro plate に 100 μ L ずつ入れ、細胞抽出液および調製した BSA Standard を 2 μ L ずつ加え、室温で 30 分間インキュベートした。

↓

Micro plate Reader (TECAN) を用いて、562 nm で吸光度を測定した。

↓

Standard より検量線を作成し、タンパク質濃度を算出した。

第5節 タンパク抽出とウエスタンブロッティング法

試薬処理した細胞を採取し、500 \times g で 5 分間遠心分離した。

↓

得られた細胞 pellet を氷冷 PBS で 2 回洗浄した。

↓

Protease inhibitor cocktail, Phosphatase inhibitor cocktail 2, PMSF を含む RIPA buffer で再懸濁し、氷上で 10 分間インキュベートした。

↓

26 G × 1/2 (0.45 × 13 mm) シリンジに 10 回通し、氷上で 30 分間インキュベートした。

↓

4 °C、10,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清をタンパク抽出液とした。

↓

電気泳動用既製ゲルに、調製した sample を各レーンに 20 μL ずつ apply した。

↓

1 枚あたり 250 V、30 mA で 60 分間 SDS-PAGE を行った。

↓

1 枚あたり 40 V、150 mA で 60 分間 PVDF 膜に転写した。

↓

Blocking One を用いて 30 分間 blocking を行った。

↓

一次抗体 1 μL を Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution 1 (TOYOBO) 1 mL で希釈した液中で一晩インキュベートした。

↓

PEROXIDASE 標識二次抗体 1 μL を Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution 2 (TOYOBO) 10 mL で希釈した液中で 60 分間インキュベートした。

↓

Chemi - Lumi One 試薬を用いて蛍光発色させた。

↓

Chemi Doc XRS (BIO - RAD) を用い、撮影および画像解析を行った。

第 6 節 フローサイトメトリー法によるアポトーシス細胞の測定

細胞浮遊液を 2×10^5 cell/well の濃度となるように調製し、96 well plate に最終容量 200 μL となるように各試薬を加えた後、所定の時間培養した。

↓

細胞採取後、FACS buffer で洗い、400 × g で 5 分間遠心分離した。

↓

上清を除去し、Annexin V-FITC (MBL)と TUNEL Kit Direct (MBL)をそれぞれ加え、Binding buffer 100 μ L で再懸濁し、Cell Analyzer EC 800 (SONY) を用いて測定した。

第7節 フローサイトメトリー法によるオートファゴソーム形成の測定

細胞浮遊液を 1×10^5 cells/mL の濃度となるように調製し、96well plate に最終容量 200 μ L と
なるように各試薬を添加培養した。

↓

BafilomycinA1 で処理し、2 時間後、CytoID (Enzo) を加え、Cell Analyzer EC 800 (SONY)
を用いて測定した。

第8節 フローサイトメトリー法による細胞膜表面抗原の測定

細胞浮遊液を 2×10^5 cells / mL の濃度となるように調整し、96 well plate に最終容量 100 μ L
となるように各試薬を添加培養した。

↓

細胞採取後、FACS buffer で洗い、400 G で 5 分間遠心分離した。

↓

上清を除去し、各抗体を加え、室温で 60 分間インキュベートした。

↓

FACS buffer で洗い、400 G で 5 分間遠心分離した。

↓

上清を除去し、FACS buffer を 200 μ L 加え、Cell Analyzer EC800 (SONY) を用いて測定し
た。

第9節 ELISA 法による上清 sCD30 の測定

Human CD30 Platinum ELISA 取扱説明書に従い、Human CD30 Standard を 100、50、25、
12.5、6.3、3.1、1.6 ng/mL とするよう Sample Diluent で調整し、Standard とした。

↓

CD30 に対する抗体 (捕獲抗体) を固相に吸着させた 96 well plate に培養細胞上清 25 μ L と
Sample Diluent 75 μ L を加えた。Sample Diluent を 100 μ L のみ加えたものを Blank とした。

↓

調整した HRP-conjugate を 50 μ L 加え、粘着フィルムを貼り 37°C で 3 時間インキュベートした。

↓

粘着フィルムをはがし、Wash Buffer で洗い TMB Substrate Solution を 100 μ L 加え、遮光し室温で 10 分間インキュベートした。

↓

Stop Solution を 100 μ L 加え、1 時間以内に Micro Plate Reader (TECAN) を用いて 450 nm の吸光度を測定した。

引用文献

1. Katsuya H, Ishitsuka K, Utsunomiya A, et al. Treatment and survival among 1594 patients with ATL. *Blood*. 2015;126(24):2570-2577.
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. *Journal of Clinical Oncology*. 2007;25(34):5458-5464.
3. Ishida T, Joh T, Uike N, et al. Defucosylated Anti-CCR4 Monoclonal Antibody (KW-0761) for Relapsed Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma: A Multicenter Phase II Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(8):837-842.
4. Ishida T, Fujiwara H, Nosaka K, et al. Multicenter Phase II Study of Lenalidomide in Relapsed or Recurrent Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma: ATLL-002. *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(34):4086-+.
5. Ohsumi Y. Historical landmarks of autophagy research. *Cell Research*. 2014;24(1):9-23.
6. Chen N, Debnath J. Autophagy and tumorigenesis. *Febs Letters*. 2010;584(7):1427-1435.
7. Turcotte S, Chan DA, Sutphin PD, Hay MP, Denny WA, Giaccia AJ. A molecule targeting VHL-deficient renal cell carcinoma that induces autophagy. *Cancer Cell*. 2008;14(1):90-102.
8. Schwab U, Stein H, Gerdes J, et al. PRODUCTION OF A MONOCLONAL-ANTIBODY SPECIFIC FOR HODGKIN AND STERNBERG-REED CELLS OF HODGKINS-DISEASE AND A SUBSET OF NORMAL LYMPHOID-CELLS. *Nature*. 1982;299(5878):65-67.
9. Kurts C, Carbone FR, Krummel MF, Koch KM, Miller J, Heath WR. Signalling through CD30 protects against autoimmune diabetes mediated by CD8 T cells. *Nature*. 1999;398(6725):341-344.
10. Ohtsuka E, Kikuchi H, Nasu M, Takitasonoda Y, Fujii H, Yokoyama S. CLINICOPATHOLOGICAL FEATURES OF ADULT T-CELL LEUKEMIA WITH CD30 ANTIGEN EXPRESSION. *Leukemia & Lymphoma*. 1994;15(3-4):303-310.
11. Takemoto S, Iwanaga M, Sagara Y, Watanabe T. Plasma Soluble CD30 as a Possible Marker of Adult T-cell Leukemia in HTLV-1 Carriers: a Nested Case-Control Study. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(18):8253-8258.
12. Hansen HP, Dietrich S, Kisseleva T, et al. CD30 shedding from Karpas 299 lymphoma cells is mediated by TNF-alpha-converting enzyme. *Journal of Immunology*. 2000;165(12):6703-6709.

13. Jacobsen ED, Sharman JP, Oki Y, et al. Brentuximab vedotin demonstrates objective responses in a phase 2 study of relapsed/refractory DLBCL with variable CD30 expression. *Blood*. 2015;125(9):1394-1402.
14. Horwitz SM, Advani RH, Bartlett NL, et al. Objective responses in relapsed T-cell lymphomas with single-agent brentuximab vedotin. *Blood*. 2014;123(20):3095-3100.
15. Ciravolo V, Huber V, Ghedini GC, et al. Potential role of HER2-overexpressing exosomes in countering trastuzumab-based therapy. *Journal of Cellular Physiology*. 2012;227(2):658-667.

謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、終始懇切な御指導ならびに御鞭撻を賜りました福岡大学薬学部生化学教室の本田 伸一郎教授、小迫 知弘准教授、相川 晃慶助教、佐藤 陽菜助教に謹んで感謝の意を表します。併せて、本研究に際し、多大なる御指導と御助言を賜りました松末 公彦教授、大江 賢治准教授に感謝の意を表します。また、ともに議論、実験を行ってくださった豊島 萌恵女史、田中 めぐ美女史、今石 果奈女史、讃井 美保女史、加藤 奈歩女史をはじめとする福岡大学薬学部生化学教室の皆様に深く感謝申し上げます。

最後に学生生活を通じて精神的、経済的支援を賜りました家族をはじめ、多くの方々に深く感謝致します。

誠にありがとうございました。