

# 成人T細胞白血病/リンパ腫に対する新規治療法の検討

佐藤 啓介

福岡大学薬学部生化学教室 〒814-0180 福岡市城南区七隈 8-19-1

## Examination of the novel therapy for adult T-cell leukemia/lymphoma

Keisuke Sato

Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

### Abstract

Adult T cell leukemia/lymphoma (ATL) is a human T-cell leukemia virus 1 (HTLV-1) -induced malignancy of mature T lymphocytes with poor outcomes. STF-62247 induces autophagy and selectively kills renal cell carcinoma without apoptotic cell death. Here, we demonstrate that STF-62247 reduced cell viability and resulted in autophagosome accumulation and autophagy in leukemic cell lines (S1T, MT-2, and Jurkat). Interestingly, STF-62247 induced apoptosis in HTLV-1-infected cell lines (S1T and MT-2), as indicated by DNA fragmentation and caspase activation, but not in non-HTLV-1-infected Jurkat cells; a caspase inhibitor did not prevent this caspase-associated cell death. STF-62247 also increased nuclear endonuclease G levels. Therefore, STF-62247 may have novel therapeutic potential for ATL.

ATL cells express CD30, a TNF receptor superfamily member, on their cell surface at variable frequencies. Brentuximab vedotin (BV), an anti-CD30 antibody conjugated with monomethyl auristatin E (MMAE), inhibits growth of HTLV-1-infected cell lines. Soluble CD30 (sCD30) is increased in aggressive-type ATL at diagnosis while the effects of sCD30 on BV-induced cell death in ATL remain unclear. Similarly, a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) 10 and 17 have CD30 sheddase activity in anaplastic large cell lymphoma (ALCL) but are not known in ATL. Here, we examined whether sCD30 inhibits BV-induced cell death and ADAM10/17 inhibitors increase BV-induced cell death by inhibition of CD30 shedding in HTLV-1-infected cell lines. MMAE significantly reduced the viability of HTLV-1-infected T-cell lines, S1T and MT-2 and a CD30+ ALCL cell line, Karpas 299. While there was no difference in expression of CD30, MT-2 cells were more resistant to BV than S1T and Karpas 299 cells. Interestingly, MT-2 cells had higher sCD30 levels than S1T and Karpas 299 counterparts. Addition of recombinant CD30 abrogated BV-induced cell death, suggesting that sCD30 neutralizes BV activity. Furthermore, ADAM10/17 inhibitors blocked sCD30 production by reducing sheddase activity in HTLV-1-infected cell lines, resulting in increased BV-induced cell death. These results demonstrate that sCD30 and ADAM10/17 are key inhibitors of BV activity and ADAM10/17 inhibitors could have therapeutic value to increase the efficacy of BV in ATL.

**keywords** : ATL, HTLV-1, Autophagy, CD30, Brentuximab vedotin

## 【緒言/目的】

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[1]。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。

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[2]。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[3]。しかし、ATLにおけるオートファジーの知見はない。そこで、はじめに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細胞などに発現する[4, 5]。また、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[6]。更に、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[7]。しかし、ATLにおけるADAMファミリーの機能は不明である。一方、Brentuximab vedotin（BV）は、抗CD30抗体と微小管障害作用を示す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。また、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[8]。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。そこで、2つ目の研究課題として、BVによる細胞死に対するADAM10/17の関与およびsCD30の影響について検討した。

## 【実験方法】

### 細胞生存率の測定

細胞浮遊液を $2 \times 10^5$  cells/mlの濃度となるように調整し、96 well plateに最終容量100 $\mu$ 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 $\mu$ l加え、37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>の条件で2時間インキュベートした。Micro Plate Reader（TECAN）を用いて450nmの吸光度を測定した。

### 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 $2 \times 10^5$  cell/wellの濃度となるように調整し、96 well plateに最終容量200 $\mu$ l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 $\times$ gで5分間遠心分離した。その後、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 $\mu$ lで再懸濁し、Cell Analyzer EC 800（SONY）を用いて測定した。

### ウェスタンブロッティング法

電気泳動用既製ゲルに、調製したsampleを各レーンに20 $\mu$ lずつapplyした。1枚あたり250V、30mAで60分間SDS-PAGEを行った。1枚あたり40V、150mA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 $\mu$ lをCan Get Signal<sup>®</sup> Immunoreaction Enhancer Solution 1（TOYOBO）1ml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 $\mu$ lをCan Get

Signal® Immunoreaction Enhancer Solution 2 (TOYOBO) 10ml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。

### 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  $1 \times 10^5$  cells/ml の濃度となるように調製し、96 well plate に最終容量200 $\mu$ lとなるように各試薬を添加培養した。Bafilomycin A1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。

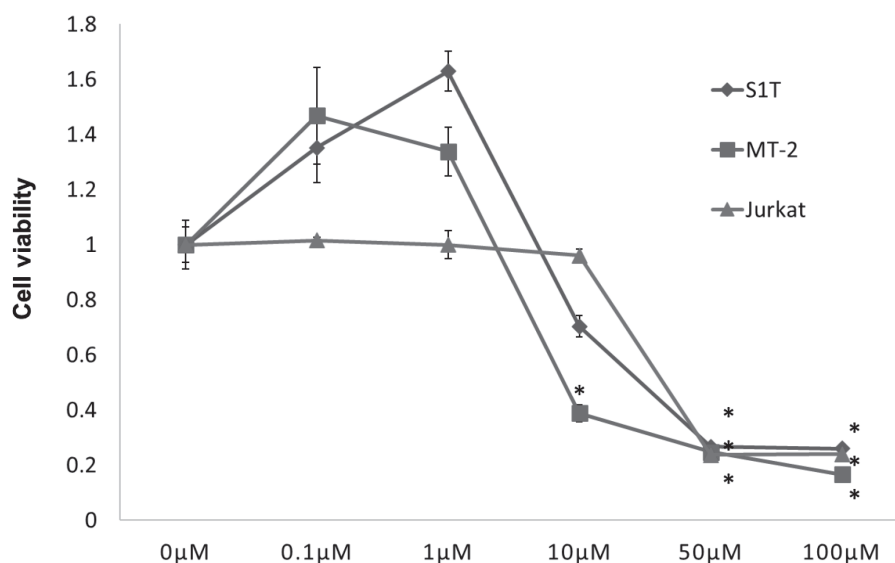
### ELISA 法による上清sCD30 の測定

Human CD30 Platinum ELISA (eBioscience) 取扱説明書に従い、CD30に対する抗体を固相化した96 well plate に培養細胞上清25 $\mu$ lと Sample Diluent 75 $\mu$ lを加えた。Sample Diluentを100 $\mu$ lのみ加えたものを Blank とした。調整した HRP-conjugate を50 $\mu$ l加え、粘着フィルムを貼り37 $^{\circ}$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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。

## **【結果】**

### 1. 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

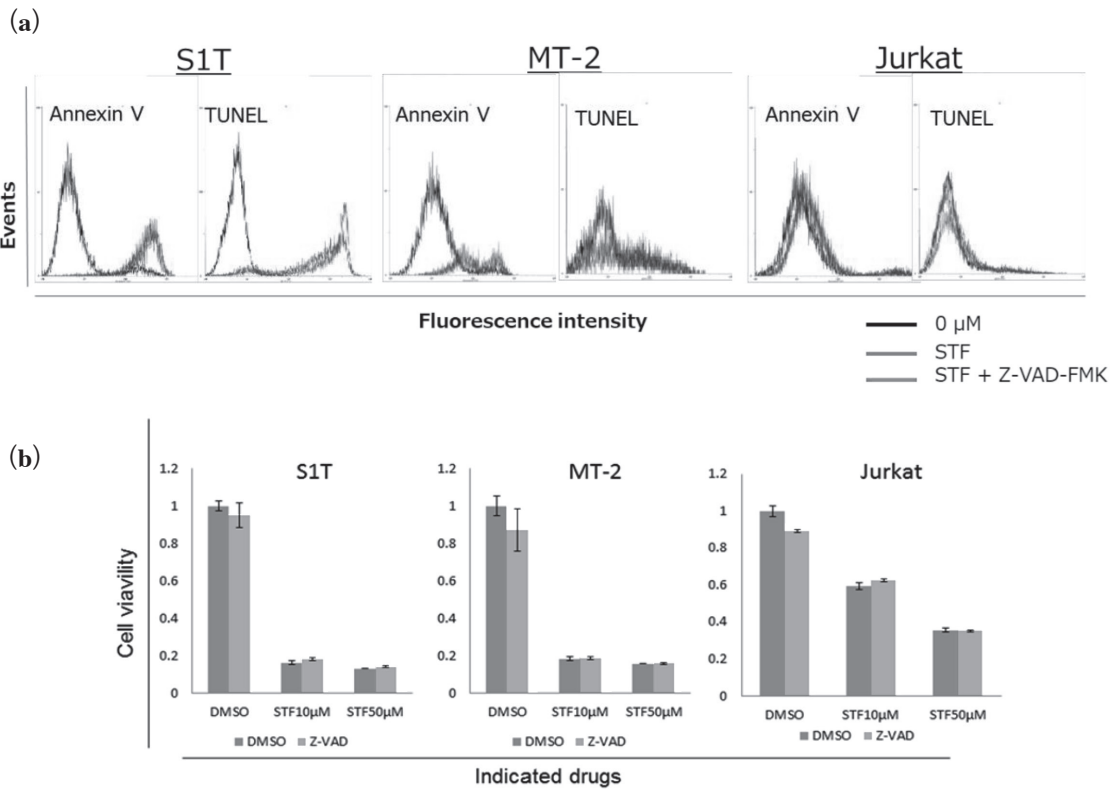
HTLV-1 関連細胞株である S1T, MT-2細胞およびHTLV-1非感染細胞株である Jurkat細胞における STF-62247処理後の細胞生存率を測定した。STF-62247処理により、各白血病細胞株の生存率は未処理群と比較して、用量かつ時間依存的に有意に低下した (Fig. 1)。



**Fig.1** STF-62247 induces cell death of leukemic cell lines.

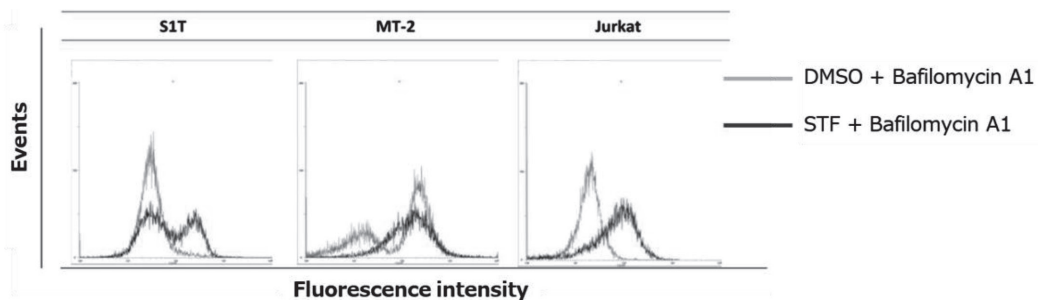
Cell lines were incubated at  $2 \times 10^5$  cells/ml in the presence of the indicated concentrations of STF-62247 for 72 h. Data represent the mean percentage  $\pm$  SD of three independent experiments. \*P < 0.01 vs. 0  $\mu$ M STF 10 62247 .

また, Annexin V陽性細胞の増加とDNAの断片化も認めた (Fig. 2a)。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 (Fig. 2b)。更に, オートファジーの指標であるオートファゴソー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 (Fig. 3, 4)。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。



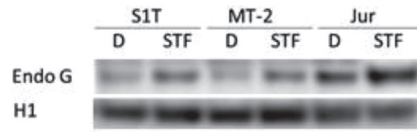
**Fig.2** STF-62247 induces both caspase-independent cell death.

S1T, MT-2 and Jurkat cells were treated with STF-62247 (STF; S1T and Jurkat: 50μM; MT-2: 10μM) and Z-VAD FMK (40μM) for 72 h. (a) Annexin V-positive and TUNEL-positive cells were detected by flow cytometry. (b) Viability of cultured cells was measured by cell viability assay. Data represent the mean percentage  $\pm$  SD of three independent experiments.



**Fig.3** STF-62247 induces autophagy.

S1T, MT-2 and Jurkat cells were treated with STF-62247 (STF; S1T and Jurkat: 50μM; MT-2: 10μM). Cellular autophagic flux after 48 h STF-62247 treatment was evaluated using flow cytometry. Cells were pre-incubated for 30 min with bafilomycin A1 before STF-62247 treatment.



**Fig.4** STF-62247 increases endonuclease G

S1T, MT-2 and Jurkat cells were treated with STF-62247 (S1T and Jurkat: 50  $\mu$ M; MT-2: 10  $\mu$ M) for 72 h. Protein levels were detected by western blotting with the indicated antibodies.

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

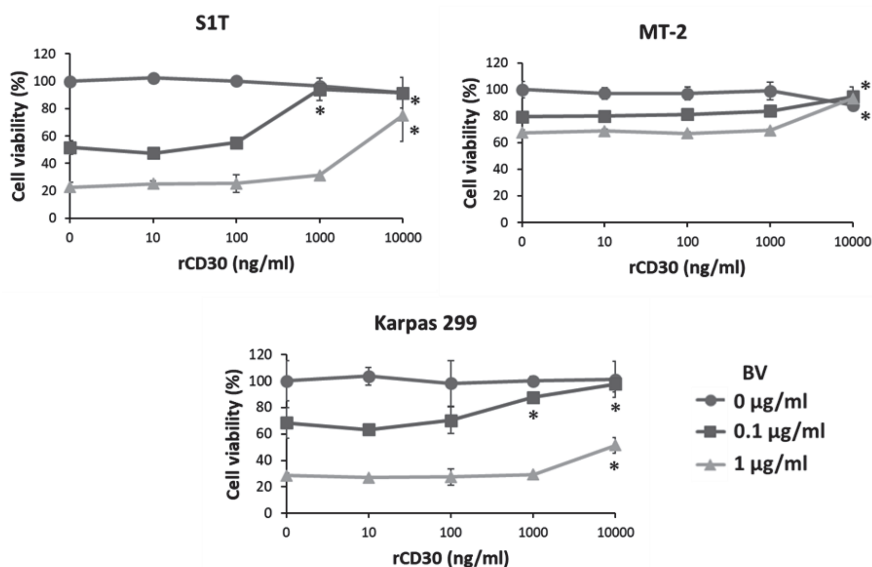
MMAEは、S1T、MT-2およびCD30陽性ALCL細胞株であるKarpas 299の生存率を有意に低下させた。一方、全ての細胞株の細胞膜表面上にCD30の発現を同等に認めていたが、BV処理におけるIC<sub>50</sub>は、各々0.03  $\mu$ g/ml (S1T)、0.24  $\mu$ g/ml (MT-2)、0.05  $\mu$ g/mlであり、MT-2における効果が最も低かった。興味深いことに、MT-2におけるsCD30濃度は他の細胞株より高かった (Table 1)。さらにrecombinant CD30がBVによる細胞死を抑止したことから、sCD30がBV活性を中和することが示唆された (Fig. 5)。

Table 1. Concentration of sCD30 in cell culture supernatant

	S1T	MT-2	Karpas299
sCD30 (ng/10 <sup>5</sup> cells)	19.92 $\pm$ 1.69	79.42 $\pm$ 3.97	39.95 $\pm$ 1.54

S1T, MT-2 and Karpas 299 cells were cultured for 72 hours.

Data represent mean percentage  $\pm$  SD of three independent experiments.



**Fig.5** Recovery of decreased cell viability upon incubation with exogenous CD30.

S1T, MT-2 and Karpas 299 cells were cultured with BV (0–1  $\mu$ g/ml) and rCD30 (0–1  $\times$  10<sup>4</sup> ng/ml) for 48 hours and cell viability was measured. \*P<0.01 vs. rCD30 (0 ng/ml). Statistical analysis was performed by the Student's *t*-test. Data represent mean percentage  $\pm$  SD of three independent experiments.

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 (Fig. 6a)。また、ADAM阻害剤によるsCD30の産生の抑制も確認できた (Fig. 6b)。これらの結果から、sCD30の減少がBVによる細胞死の増加に関与することが示唆された。



**Fig.6** ADAM10/17 inhibitors increase BV-induced cell death via inhibition of CD30 shedding.

S1T was incubated for 48 h with DMSO, ADAM10 inhibitor (2.5 μM) or ADAM17 inhibitor (25 μM) in the presence or absence of BV (1 μg/mL). (a) Cell viability was examined using Cell Count Reagent SF. Cells cultured with or without BV in the absence of ADAM inhibitors (DMSO) were assigned a viability of 100% and the relative cell viability of the remaining groups was calculated. (b) The concentration of sCD30 was examined by ELISA. \*P<0.01 vs. DMSO. Statistical analysis was performed by the Student's *t*-test. Data represent mean percentage ± SD of three independent experiments.

### 【考察】

STF-62247はVHL欠損腎細胞癌やJurkat細胞ではアポトーシスを誘発しないが、HTLV-1感染細胞株においてはオートファジーを伴うアポトーシスによる細胞死を引き起こすことが明らかとなった。また、HTLV-1感染細胞株においてSTF-62247と汎カスパーゼ阻害剤により、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。これらの結果より、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。

次に、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。本研究よりHTLV-1関連細胞に対する細胞増殖抑制効果が見られた。興味深いことにS1T細胞と比較してMT-2細胞でのsCD30の濃度が高く、MT-2細胞においてBVの効果が高いことが分かった。また、rCD30の添加にてHTLV-1感染細胞のBV誘導細胞死を中和したことから、細胞外のCD30がBVによる細胞増殖抑制効果の低下に関与することが示唆された。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から、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。これらの結果より、BVはsCD30をはじめとする細胞外のCD30が低濃度である患者に効果を示す可能性があり、細胞外CD30はATLのBV療法においてバイオマーカーとして有用となり得ることが示唆された。

## 【参考文献】

1. Katsuya, H., Ishitsuka, K., Utsunomiya, A., Hanada, S., Eto, T., Moriuchi, Y., Saburi, Y., Miyahara, M., Sueoka, E., Uike, N., Yoshida, S., Yamashita, K., Tsukasaki, K., Suzushima, H., Ohno, Y., Matsuoka, H., Jo, T., Amano, M., Hino, R., Shimokawa, M., Kawai, K., Suzumiya, J., Tamura, K. & Project, A. T.-P. I. (2015) Treatment and survival among 1594 patients with ATL, *Blood*. **126**, 2570-2577.
2. Ohsumi, Y. (2014) Historical landmarks of autophagy research, *Cell Research*. **24**, 9-23.
3. Turcotte, S., Chan, D. A., Sutphin, P. D., Hay, M. P., Denny, W. A. & Giaccia, A. J. (2008) A molecule targeting VHL-deficient renal cell carcinoma that induces autophagy, *Cancer Cell*. **14**, 90-102.
4. Higuchi, M., Matsuda, T., Mori, N., Yamada, Y., Horie, R., Watanabe, T., Takahashi, M., Oie, M. & Fujii, M. (2005) Elevated expression of CD30 in adult T-cell leukemia cell lines: possible role in constitutive NF-kappa B activation, *Retrovirology*. **2**.
5. Chiarle, R., Voena, C., Ambrogio, C., Piva, R. & Inghirami, G. (2008) The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer, *Nature Reviews Cancer*. **8**, 11-23.
6. Takemoto, S., Iwanaga, M., Sagara, Y. & Watanabe, T. (2015) 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*. **16**, 8253-8.
7. Hansen, H. P., Dietrich, S., Kisseleva, T., Mokros, T., Mentlein, R., Lange, H. H., Murphy, G. & Lemke, H. (2000) CD30 shedding from Karpas 299 lymphoma cells is mediated by TNF-alpha-converting enzyme, *Journal of Immunology*. **165**, 6703-6709.
8. Maeda, N., Muta, H., Oflazoglu, E. & Yoshikai, Y. (2010) Susceptibility of human T-cell leukemia virus type I-infected cells to humanized anti-CD30 monoclonal antibodies in vitro and in vivo, *Cancer Science*. **101**, 224-230.