

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告

ATL 研究のための新しい急性型 ATL 実験モデルの創出と小分子治療薬のスクリーニング

都築 忍 愛知県がんセンター研究所・遺伝子医療研究部 室長

研究要旨

ATL の発症・維持には HTLV-1 ウイルス由来の遺伝子と細胞由来の遺伝子との協調が必要である。この協調作用を個体レベルで解明するために、T 細胞性腫瘍を迅速に作成するシステムを新たに構築し応用した。その結果、HBZ, AKT, BCLxL の 3 遺伝子協調による急性型 ATL モデルを新たに作成することに成功した。作成した ATL モデル細胞は *in vitro* での培養が可能であることから、この培養系を用いて ATL の発症予防や治療に有用な薬剤の開発をめざして、化合物ライブラリーのスクリーニングを開始した。

A. 研究目的

ATL の発症には HTLV-1 ウイルスの感染が必須だが、それだけでは発症せず、細胞由来の遺伝子（変異遺伝子を含む）との協調作用が必要である。

本研究では、（1）HTLV-1 ウイルス由来の遺伝子と細胞由来の遺伝子との腫瘍化における協調作用を迅速に評価するための新しいシステムを構築・最適化し、同システムを応用して急性型 ATL 実験モデルを創出すること、（2）作成した ATL モデル細胞を利用して、ATL の発症予防や治療に役立つ薬剤の候補を見出すために化合物スクリーニングを行うことの 2 点を目的とする。

B. 研究方法

われわれは、リンパ性腫瘍の発症・維持機構を解明するために、初代培養リンパ球にレトロウイルスにより任意の遺伝子や shRNA を導入

し、同細胞をマウスに移植することによってリンパ性白血病や悪性リンパ腫のマウスモデルを作成し解析してきた（Arita K, *Leukemia* 2014; Tsuzuki S, *Stem Cells* 2013; Arita K, *Exp. Hematol.* 2014; Tsuzuki S, *Blood* 2011）。

本研究では同手法を改変し、マウス胎児由来造血細胞をサイトカイン（Flt3 Ligand, IL7）存在下に OP9DL1 ストローマ上で培養することによって *in vitro* で T 細胞を誘導し、この T 細胞にレトロウイルスにより任意の遺伝子を導入するシステムを最適化した。本システムを利用して、HTLV-1 ウイルス由来の遺伝子 HBZ と細胞由来の遺伝子 AKT, BCLxL の 3 者を発現させ、マウスに移植した。コントロールとして AKT, BCLxL の 2 者の組合せを用いた。

さらに、遺伝子導入 T 細胞を *in vitro* で培養し増殖させるシステムを構築し、細胞増殖の抑制を指標にした化合物ライブラリーのスクリーニング法を確立した。化合物ライブラリーは、

東京大学創薬オープンイノベーションセンターから入手したコアライブラリーを用いた。

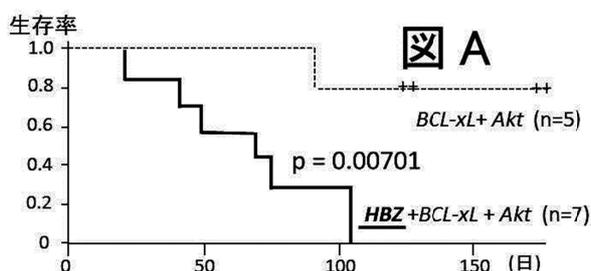
(倫理面への配慮)

本研究は、愛知県がんセンター組換えDNA委員会および動物委員会の承認を得て行われた。

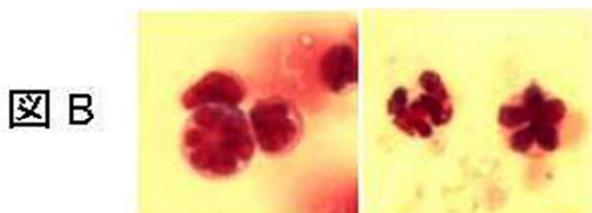
C. 研究結果

(1) ATL 研究のための新しい急性型 ATL 実験モデルの創出

マウス胎児由来造血細胞から *in vitro* で誘導した T 細胞に、HBZ, AKT, BCLxL の 3 者を発現させマウスに移植すると、移植後 1 ~ 4 か月にかけて全例 (n=7) が死亡したのに対し、HBZ を抜いた AKT と BCLxL の 2 遺伝子の場合には 5 匹中 4 匹が 6 か月以上生存し、現在まで無病である (図 A)。



HBZ, AKT, BCLxL の 3 者により T 細胞性腫瘍が発生し、その典型例は CD4 陽性 CD8 陰性であり、形態的にも ATL に特徴的な Flower cell に酷似していた (図 B) が、CD4・CD8 ともに陽性の細胞が主体の例も見られた。

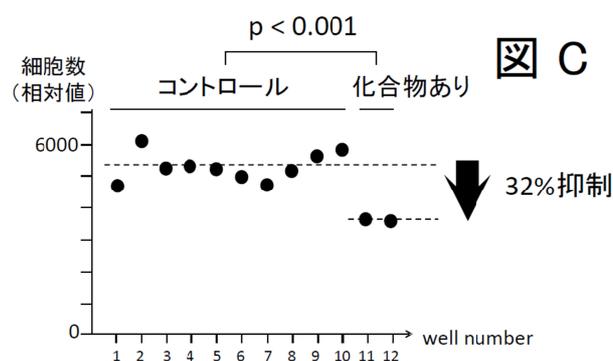


発生した T 細胞性腫瘍は、別のマウスへの 2 次移植でも生着し、2 次移植マウスに腫瘍を発

生せしめたことから、強い造腫瘍性を有していることが明らかとなった。以上より、新しい急性型 ATL 実験モデルを創出することができた。

(2) 小分子治療薬のスクリーニング

HBZ, AKT, BCLxL の 3 者を発現させた T 細胞は、サイトカインを加えない条件でも OP9DL1 ストローマ上で増殖した (7 日で数十倍) のに対して、AKT, BCLxL の組み合わせでは T 細胞はわずかな増殖を示したに過ぎなかった。この差は、HTLV-1 ウイルスに由来する遺伝子 HBZ の有無によることから、本培養系を用いて HBZ, AKT, BCLxL の 3 者を発現させた T 細胞の増殖抑制を指標にすれば、HBZ の機能を抑制し、したがって ATL の治療や発症予防に有用な薬剤の開発に役立つ可能性がある。そこで、96 穴培養プレートフォーマットにより OP9DL1 ストローマ上で HBZ, AKT, BCLxL の 3 者を発現させた T 細胞を培養し、ここに化合物ライブラリーを添加し、細胞に組み込んだ GFP 蛍光強度あるいは Cell Titer Blue 試薬により算定する細胞数の減少を指標としたスクリーニングを開始した。有効薬剤の候補の 1 例の結果を図 C に示す。



D. 考察

本研究により創出した急性型 ATL 実験モデルは、その腫瘍細胞がヒトの急性型 ATL の特徴を備えていることから、今後 ATL の治療や発症

予防のための介入実験にも応用できる。また、現在多施設で行われているヒトATL臨床検体の解析から今後明らかにされることが期待される種々の遺伝子異常につき、その機能的意義を迅速に評価することを可能にする点でも有用性が高い。さらに、本研究により創出したATLモデル細胞は、大規模な薬剤スクリーニングを可能にするものである。

E. 結論

In vitro で誘導したマウス T 細胞に HBZ, AKT, BCLxL の 3 者を発現させマウスに移植することにより、急性型 ATL モデルを新たに作成することに成功した。HBZ, AKT, BCLxL の 3 者導入 T 細胞は in vitro での培養が可能であることから、この培養系を用いて ATL の発症予防や治療に有用な薬剤の開発をめざした、化合物ライブラリーのスクリーニングを開始した。

F. 健康危険情報

記載無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Arita K, Tsuzuki S, Ohshima K, Sugiyama T, Seto M.: Synergy of Myc, cell cycle regulators and the Akt pathway in the development of aggressive B-cell lymphoma in a mouse model. *Leukemia*. 2014, 28(11):2270-2272.

2. 学会発表

1. 在田幸太郎, 都築忍, 大島孝一, 杉山敏郎, 瀬戸加大. レトロウイルスによる正常 B 細胞への遺伝子導入を用いた成熟 B 細胞腫瘍マウスモデル. 第 24 回日本サイ

トメトリー学会. 学術総会 (枚方). 2014 年 6 月 (招聘講演)

2. Arita K, Tsuzuki S, Ohshima K, Sugiyama T, Seto M. Synergy of Myc, cell cycle regulators and the Akt pathway in a mouse model of B-cell lymphoma. 2014 ASH Meeting on Lymphoma Biology (Colorado Springs, CO. 2014 年 8 月 (ポスター))
3. 都築 忍、在田幸太郎、大島孝一、杉山敏郎、瀬戸加大 Myc、細胞周期関連遺伝子、Akt パスウェイの協調によるマウスリンパ腫モデル第 73 回 日本癌学会学術総会 (横浜) 2014 年 9 月 (ポスター)
4. Arita K, Tsuzuki S, Ohshima K, Sugiyama T, Seto M. Synergy of Myc, cell cycle regulators and the Akt pathway in a mouse model of B-cell lymphoma. 第 76 回 日本血液学会学術総会 (大阪) 2014 年 10 月 (口演)
5. 都築 忍 悪性リンパ腫の遺伝子異常 第 32 回 日本染色体遺伝子検査学会 (名古屋) 2014 年 11 月 (招聘講演)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
本研究の成果である、ATL モデルの作成法とその応用につき、特許を出願した (特願 2014-169608)。