

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月16日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659286

研究課題名（和文） TCR-V β 特異的ヒト抗体を用いたT細胞性リンパ腫治療薬の開発研究課題名（英文） A study of TCR-V β targeted antibody therapy against human T cell lymphoma

研究代表者

有馬 直道 (ARIMA NAOMICHI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30175997

研究成果の概要（和文）：

施設内研究倫理委員会承認下に、同意を得られた ATL 患者末梢血白血病細胞の TCRV β のレパートアが V β 2 であることを確認。抽出 RNA より 5'RACE 法を用い、TCR の α と β の全長をクローニングし単離した。TCR β の発現ベクターをレンチウイルスベクター系により樹立し、Jurkat 細胞株に感染し、TCR β 2 の発現系を確立した。同時にヒト抗体重鎖・軽鎖発現ファージライブラリーの構築を、正常ヒトリンパ球 RNA をもとに構築した。

研究成果の概要（英文）：

Under admission of IRB, repertoire of TCRV β of leukemic cells derived from an ATL patient was demonstrated V β 2. Full length of TCR α and β were separated from extracted RNA by 5'RACE method. TCR β expressing vector was established using lenti-virus vector system, and infected into Jurkat cells which expresses successfully transduced TCR β 2 protein. On the other hands, human antibody heavy and light chain expressing phage library was constructed using normal health lymphocyte RNA. Using these two materials, we further study establishment of malignant T cell targeted antibody therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
交付決定額	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：境界医学 応用薬理学

キーワード：抗体療法、TCR-V β 、T細胞性リンパ腫、治療薬

1. 研究開始当初の背景

申請者らの鹿児島県はT細胞性リンパ腫のひとつである成人T細胞白血病 (Adult T cell leukemia:ATL) の多発地域である。ATLの原因は鹿児島を中心に西南日本に侵淫し

ているウイルス Human T leukemia virus type-1(HTLV-1)に感染したTリンパ球が腫瘍化することによる¹⁾。主にウイルス保持母親の母乳中のウイルス感染リンパ球から児へ感染し、そのうち約50名に1名が60歳

70歳になって発症する。一旦発症すると従来のリンパ腫治療法では治療が困難であり、新規治療法開発が急務となっている²⁾。

近年、造血期腫瘍に対して抗体療法が登場した。標的に特異的に作用する点で副作用が少ないことが期待され、事実、B細胞性リンパ腫に対して抗CD20抗体リツキシマブが臨床応用され、既に標準療法に組み入れられている³⁾。一方、T細胞性リンパ腫に対しては、抗CD2抗体や最近では抗CCR4抗体が一部ベッドサイドで用いられ、または治験中であるが、未だ有効性が確立していない。問題は、T細胞全般に作用すること、さらには他の細胞種にも作用することから起こる副作用である。この克服のため、より特異的な標的を選出することが今後の課題となる。

ATLを始めとして多くのT細胞性リンパ腫における腫瘍細胞はT細胞受容体(TCR)を発現する。

TCRは α 鎖と β 鎖のヘテロ二量体である。 β 鎖の抗原結合部分はV β 遺伝子にコードされるが、V β 遺伝子領域には50種類の遺伝子が並んでおり、T細胞クローンごとに、即ちT細胞性腫瘍ごとにひとつが選択される。最近、フローサイトメトリー法でT細胞性腫瘍細胞ごとに発現している β 鎖が容易に測定できるようになった。そこで、各患者に特有のV β を標的とする抗体を作製すればクローン選択的な抗腫瘍作用が期待でき、正常T細胞への影響が少ない優れた治療法となる。

2. 研究の目的

申請者の有馬は鹿児島大学病院血液膠原病内科で長年ATLやその他のT細胞性リンパ腫患者を多数診療し、その過程で多くの腫瘍細胞のストックがある。また、これまでこれらの腫瘍細胞から多くの細胞株を樹立し

ている。他方、伊東はこれまでの研究で優れたファージ抗体ライブラリーを作製し、パンニング法を用い多くの抗体を樹立してきた実績がある⁴⁾。両者の経験をもとに共同研究する事で、平成23年度中には10種ほどのV β に対する特異的scFvヒト抗体を作製し、かつFc部分を加工しADCC活性を高め、またはToxinを結合させる。平成24年度には細胞株や患者腫瘍細胞を用いてin vitroでの殺細胞効果を確認する。

3. 研究の方法

T細胞性リンパ腫に対する抗体治療薬として、TCR-V β を標的とした特異的抗体を作製する。そのために、既に準備している単鎖Fv(scFv)ヒト抗体ファージライブラリーを用いる。同時にTCR-V β をまったく発現しないATL細胞株に、単離されているTCR-V β 発現ベクターを用いて発現させた細胞との結合性をフローサイトメーターで分離する(バイオパンニング)。分離したscFvファージからscFvcDNAを抽出し、さらにfull IgG cDNAを作製する。

大腸菌で抗体を産生させ、単離し、前もってTCR-V β を確認してある細胞株もしくは患者リンパ腫細胞との結合性、およびADCC活性を検討し、抗体医薬としての可能性を検討する。

4. 研究成果

今回の研究期間において、施設内研究倫理委委員会承認下に、文書にて同意を得られたATL患者より末梢血の最終を行った。末梢血単核球分離後、フローサイトメトリー法を用いたTCR-V β のレパトアを確信した。TCR-V β 2が養成であった患者末梢血単核球よりRNAを抽出し、5' RACE法を用いてその患者ATL細胞

胞 TCR の α と β の全長をクローニングし、シークエンスにより単離を確認した。TCR β の発現べくツアーをレンチウイルスベクター系により樹立した。尚、本レンチウイルスベクターは培地へのドキシサイクリン添加により TCR の発現を制御することが可能である。当初の計画では、申請者により既に樹立されている ATL 患者細胞由来 S1T 細胞株への、今回の ATL 患者由来の TCR 遺伝子移入を予定していたが、TCR の発現を全く確認できなかった。後に、S1T 細胞株は CD3 の発現が低下しており、そのため TCR の細胞膜表面への発現を妨げていることが判明したため、他の細胞株でヒト急性リンパ性白血病細胞株である Jurkat 細胞株への遺伝子導入を試みた。その結果、Jurkat 細胞株での ATL 患者 TCR β 遺伝子の導入と発現が、フローサイトメトリー法で確認できた。この細胞株を用いて、ファージディスプレイ法により、TCRV-b2 に特異的に結合する単鎖 Fv ヒト抗体の作製を試みた。具体的には正常ヒトリンパ球より抽出した RNA から cDNA を作製し、抗体重鎖と軽鎖特異的プライマーを用いて、重鎖遺伝子ライブラリーと軽鎖遺伝子ライブラリーを作製し、リンカ DNA により重鎖と軽鎖を結合させたのちに pCANTTAB5 ベクターへ挿入し、単鎖 Fv ヒトファージライブラリーを構築した。

現在、TCR β 2 発現 Jurkat 細胞と、単鎖 Fv ヒトファージライブラリーを用いて、バイオパンニング法により、結合性の高いファージの選別を図っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Hamada T, White Y, Nakashima M, Oiso Y, Fujita MJ, Okamura H, Iwagawa T, Arima N. The bioassay-guided

isolation of growth inhibitors of adult T-cell leukemia (ATL), from the Jamaican plant *Hyptis verticillata*, and NMR characterization of Hyptoside.

Molecules, **17**: 9931-9938, (2012). (査読有り)

2. Nakamura D, Yoshimitsu M, Kawada H, Inoue H, Kuroki T, Kaieda T, Fujino S, Hamada H, Suzuki S, Matsushita K, Uozumi K, Arima N. Recombinant human soluble thrombomodulin for the treatment of hepatic sinusoidal obstructive syndrome post allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplantation*, **47**: 463-464, (2012). (査読有り)

3. Kozako T, Aikawa A, Shoji T, Fujimoto T, Yoshimitsu M, Shirasawa S, Tanaka H, Honda SI, Shimeno H, Arima N, Soeda S. High expression of SIRT1, a Longevity gene-encoded protein, and induction of apoptosis by its inhibition in adult T-cell leukemia cells. *Int J Cancer*, **131**:2044-2955, (2012). (査読有り)

4. Kozako T, Arima N, Yoshimitsu M, Honda S-I, Soeda S. Liposomes and nanotechnology in drug development: focus on oncotargets. *Int J Nanomed*, **7**:4943-4951, (2012). (査読有り)

5. 川田英明、有馬直道 多発性骨髄腫の最新治療；骨髄腫腎や分子標的薬を含めて
日本腎臓学会誌、第 54 巻第 5 号、586-592, 2012

6. 有馬直道 成人 T 細胞白血病・リンパ腫 今日の治療指針 医学書院、586-588, 2012

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Suzuki S, Uozumi K, Yoshimitsu M, Kawada H, Hamada H, Nakamura D, Arima N, Shiraishi M, Matsushita K, Arima N. Achieving clear status of recalcitrant psoriasis during low-dose dasatinib in a patient with CML74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Oct 20, 2012, Kyoto.

2. Yoshimitsu M, White Y, Hamada T, Nakashima M, Hachiman M, Uozumi K, Furukawa T, Arima N. A novel cytotoxic agent, 4-MTDND, induces apoptosis

and overcomes multidrug resistance against ATLL. 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Oct 20, 2012, Kyoto.

3. Arima N, Yoshimitsu M, Kawada H, Arai A, Nakamura D, Shiraishi M, Hamada H, Suzuki S, Matsushita K, Uozumi K, Arima N. Establishment of a BCL2/MYC dual hit lymphoma (DHL) cell line from a patient with B cell lymphoma. 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Oct 21, 2012, Kyoto.

4. Nakamura D, Yoshimitsu M, Niimoto J, Kuroki A, White Y, Uozumi K, Okada S, Arima N. Establishment of an ATLL xenotransplant mouse model using the NOD/SCID/Jak3 null (NOJ) mouse. 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Oct 19, 2012, Kyoto.

5. 植村陽菜、小迫知弘、有馬直道、田中宏暁、本田伸一郎、添田泰司
SIRT1 活性化剤による白血病細胞の増殖抑制効果に関する検討
第 5 回 HTLV 研究会, 8 月 2012 年、東京

6. 新居亮彦, 川田英明, 林田真衣子, 中村大輔, 吉満 誠, 井上大栄, 浜田平一郎, 鈴木紳介, 魚住公治, 有馬直道
POEMS 症候群に対する新規薬の効果 第 109 回日本内科学会講演会、4 月 13 日、2012, 京都

7. 小迫知弘、平田真哉、清水佳隆、占野廣司、添田泰司、有馬直道
オリゴマンノース被覆リポソームによる効率的な HTLV-1 特異的細胞障害性 T 細胞の誘導 第 132 年会、3 月 28 日、2012 年、札幌

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 抗腫瘍剤及びその製造法

発明者: 有馬直道、濱田俊之、ホワイトヨハン

権利者: 鹿児島大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2012/083379

出願年月日: 2012 年 12 月 25 日

国内外の別: 全指定 (日本含む)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有馬直道 (ARIMA NAOMICHI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 30175997

(2) 研究分担者

伊東祐二 (ITO YUJI)

鹿児島大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号: 60223195