

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

### 組み換えアデノウイルスを用いた 成人T細胞性白血病の遺伝子治療の基礎的検討

指導教官 浅野茂隆教授

東京大学大学院医学系研究科

平成10年4月1日入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 渡辺卓郎

成人T細胞性白血病(ATL)はヒトT細胞性白血病ウイルス1型(HTLV-1)が原因ウイルスとされ、本邦では沖縄、九州、海外ではカリブ地域、ラテンアメリカ、中央アジアに分布が偏在する。ウイルスの主な感染は母乳を介して乳幼児期に成立し、中年から老年に至って発症する。本邦では約120万人のHTLV-1感染者から毎年約1,000人の患者が新たに発症し、決して希な疾患ではない。造血幹細胞移植を含む従来のあらゆる治療法に対して抵抗性を示し、発症後の進行も早く、殆どの報告では生存期間の中央値が1年に満たない。最近報告された多剤併用療法の成績でも20年前の報告と比べて大きな改善は認められず、一方では同種骨髄移植により治療成績が改善するとの報告もあるが、高齢患者の多いATLでは、大半の患者が適応外となるため、スタンダードな治療法とはなり得ていない。近年では化学療法に加えて、抗ウイルス剤とインターフェロンを用いるなど、治療成績を上げるための多くの試みがなされてきたが、十分な治療成績が報告されたものはなく、ATLは今日でも最も予後不良な血液腫瘍とされ、従来の治療法にかわる遺伝子治療も含めた新しい治療戦略の開発が強く望まれている。

遺伝子治療の開発において、一般に腫瘍細胞への遺伝子導入の効率、及び特異性が解決すべき大きな問題となっており、その条件をみたく遺伝子導入ベク

ターの開発が大きな関心事となっている。組み換えアデノウイルスは一般に高い力価と遺伝子導入効率の高さから、遺伝子治療における遺伝子導入ベクターとしての可能性が注目されてきた。しかし、血球系細胞においてはその遺伝子導入効率は低く、血液腫瘍の遺伝治療における遺伝子導入ベクターとしての可能性はこれまで十分に検討されてこなかった。

本研究では GFP を搭載した組み換えアデノウイルス (AxCAGFP) を用いた培養細胞への感染実験の系で、レーザー共焦点顕微鏡、蛍光顕微鏡、フローサイトメトリー、サザン・プロットを用いた解析を行い、HTLV-1 感染細胞株 (MT1、MT2、Tlom1、HUT102)、ホジキン由来細胞株 (HDLM2、L428、L540) では組み換えアデノウイルスによって血球系細胞では例外的に高い効率で遺伝子導入が可能であることを示した。特に HTLV-1 感染細胞株の感受性の高さは解析に用いた他の T 細胞株 (Jurkat、CEM、Molt4) に比べてオーダーのレベルで高く、アデノウイルスに対する感受性の高い細胞として知られる HeLa に匹敵するなど、血球系細胞としては突出した感受性の高さを示した。

アデノウイルスの感染効率を規定する宿主側の因子としてコクサッキーウイルス・アデノウイルス・レセプター (CAR) や、インテグリン $\alpha\beta 3$  及び $\alpha\beta 5$  等が知られている。一般に血球系細胞では CAR の発現レベルは低く、そのことが組み換えアデノウイルスによる遺伝子導入効率の低さの原因と考えられている。また、多発性骨髄腫や慢性 B リンパ性白血病等の血液腫瘍細胞を含むいくつかの腫瘍細胞において、組み換えアデノウイルスによる遺伝子導入の効率とこれらの因子の発現レベルとの間に相関があることが報告されている。本研究では HTLV-1 感染細胞株におけるこれら既知の宿主側因子の発現についての解析を RT-PCR 及びフローサイトメトリー等により行った。インテグリンは MT1 で $\alpha\beta 5$  の発現が認められる以外は発現を認めなかった。CAR の発現は HTLV-1 感染細胞株の全てで認められたが、比較対象とした他の T 細胞株の全てでも CAR の発現が認められ、HTLV-1 感染細胞株の突出した感受性の高さは CAR の発現のみでは説明できず他に未知の宿主因子の関与が示唆された。

ATL 患者から得られた末梢血検体を用いた AxCAGFP の感染実験では、末梢血単核球の一部で GFP の発現が認められ、フローサイトメトリーを用いた解析では、GFP の発現が CD25 陽性細胞に特異的であり、組み換えアデノウイルスによる腫瘍細胞選択的な遺伝子導入の可能性が示唆された。また CAR の発現が CD25 陽性細胞に特異的に認められ、腫瘍細胞選択的な遺伝子導入へ

の CAR の腫瘍特異的な発現の関与が示唆された。一方 CAR 陽性細胞においてもその遺伝子導入の効率は 100%には至らず、既知の宿主因子以外の因子の関与が示唆された。

ATL 腫瘍細胞では NF- $\kappa$ B の構成的活性化が見られることが報告され、腫瘍の増殖に関与していることが示唆されている。本研究では培養細胞の系で、I $\kappa$ B $\alpha$  の変異体である mI $\kappa$ B の遺伝子をドミナント・ネガティブ体として搭載した組み換えアデノウィルス (AxCAMI $\kappa$ B-M) を用いた感染実験を行い、mI $\kappa$ B 遺伝子の導入により HTLV-1 感染細胞において NF- $\kappa$ B の構成的な活性化が抑制されることを EMSA による解析で示した。また MTT アッセイ等を用いた解析で mI $\kappa$ B 遺伝子の導入により cell viability が低下すること、TUNEL 法による解析ではアポトーシスが誘導されることを示した。

以上の知見は組み換えアデノウィルスを用いた ATL の遺伝子治療の可能性を示唆するものと考えられた。しかし遺伝子導入効率が不十分であること、アデノウィルスの感染に対して高い感受性を示す組織は広くにわたり、また導入遺伝子として広く分布する NF- $\kappa$ B のドミナント・ネガティブ体を用いているなど殺細胞効果の腫瘍特異性がないことなど、臨床応用を考えた場合に多くの課題があり、その応用への距離は大きいと考えられた。しかしながら、一般にアデノウィルスに対して感受性が低いとされる血球系細胞に高い効率で遺伝子導入が可能であること、腫瘍特異的な遺伝子導入の可能性のあることを示した本研究は、アデノウィルス感染に関与する新たな宿主因子の存在を示唆し、腫瘍への高い効率、高い特異性での遺伝子導入を実現する上での基礎的知見となると考えられた。

アデノウィルスに対する高い感染感受性が認められるホジキン病へも同様の検討を併行して行った。ホジキン細胞でも NF- $\kappa$ B の構成的活性化が報告され、細胞増殖や抗アポトーシス効果への関与が示唆されている。ホジキン細胞における NF- $\kappa$ B の構成的活性化は、過剰に発現した CD30 がリガンドによるクロスリンクなしに自己凝集し、CD30 の細胞質内領域に TRAF が動員されてシグナルを通ることによることが明らかになり、CD30 の細胞質内領域を欠失させた変異体 CD30d はドミナント・ネガティブ体として働く可能性が示唆されている。本研究では CD30 の細胞質内領域を欠失させた変異体 CD30d の遺伝子をドミナント・ネガティブ体として搭載した組み換えアデノウィルス AxCACD30d を作成し、ホジキン由来細胞株への感染実験を行った。CD30d

遺伝子の導入により NF- $\kappa$ B の構成的活性化が抑制されることをリポータージーン・アッセイにより示し、さらにその下流にある IL-13 の過剰産生が抑制されることを ELISA 及びノザン・プロットにより示した。また、MTT アッセイを用いた解析で CD30d 遺伝子の導入により cell viability が低下すること、TUNEL 法による解析ではアポトーシスが誘導されることを示した。CD30 の過剰発現による NF- $\kappa$ B の構成的活性化はホジキン細胞特異的な分子機構と考えられ、CD30d による殺細胞効果の腫瘍特異性は高いと考えられ、臨床応用への高い可能性が示唆された。

#### 〔総括〕

- 1) ホジキン由来細胞株、HTLV-1 感染細胞株、ATL 細胞に高い効率で組み換えアデノウィルスによる遺伝子導入が可能である。
- 2) 臨床検体を用いた解析では末梢血では ATL 細胞への組み換えアデノウィルスによる選択的な遺伝子導入の可能性が示唆された。その選択性に CAR の ATL 細胞特異的な発現が一部には関与していることが示唆された。
- 3) HTLV-1 感染細胞株、ATL 細胞の組み換えアデノウィルスに対する高い感受性は、CAR の発現のみでは説明できず、他の未知の宿主因子の関与が示唆された。
- 4) 組み換えアデノウィルスによる遺伝子導入による NF- $\kappa$ B の抑制によりホジキン由来細胞株、HTLV-1 感染細胞株で cell viability の抑制とアポトーシスが誘導された。
- 5) 上記知見は組み換えアデノウィルスによるホジキン病、ATL の遺伝子治療の可能性を示唆するものと考えられた。