

胞の腫瘍化を示すものではなく、腫瘍化過程で獲得された形質の一つにすぎないと考えるのが妥当であろう。

#### (4)ATL細胞のクローナリティ

ATL細胞をサザンブロット法で解析するとHTLV-1のモノクローナルな組み込みが検出されることから、一般に「HTLV-1感染細胞が腫瘍化してモノクローナルに増殖したもの」と考えられる。複数のプロウイルスバンドが検出された場合でも、TCRのrearrangementの解析や定量的PCRによる細胞当たりのコピー数の検討から、モノクローナルなATL細胞に複数のプロウイルスが組み込まれていることが証明されている。しかし、症例報告等を調べてみると、実際には同一個体に同時あるいは経時的に複数のATLクローンが検出された以下のような例がある。①CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>とCD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>の2つのクローンが認められた慢性型ATL<sup>10)</sup>、②独立の2個の腫瘍クローンが末梢血とリンパ節で認められた例<sup>11)12)</sup>、③自然緩解後に異なったクローンによって再発した例<sup>13)</sup>、④5個の異なったクローンが認められる巨大な皮膚腫瘍を呈した例<sup>14)</sup>等である。これらの報告は、生体内においては複数のクローンが多段階発がんのプロセスをたどり、ある時点では、同時に2つ以上のクローンが腫瘍細胞として共存しうることを示す例であると考えられる。このような考えを支持する報告としては、複数の患者で慢性期とCrisisの際のATL細胞で異なったクローンが出現していること<sup>12)</sup>、IL-2依存性のcolony forming assayによるキャリアーの末梢血の解析では、ATL発症前の時期でも多数のコロニー形成能を持つクローンが認められることなどが挙げられる<sup>15)</sup>。最近のSetoらの報告では、ATL細胞がリンパ節内でprogressionして末梢血に出現することを示唆している<sup>16)</sup>。したがって、生体内では、多段階のステップを種々のレベルまでたどったいくつかのクローンがオリゴクローナルに存在しており、そのうちの1あるいは数個のクローンが急速に増殖を示して顕在化したものが、臨床的に認知されるATLであり、さらに、腫瘍化後もリンパ節においてclonal progressionを継続していると考えるのが妥当であると思われる。

#### 2. 組み込まれたプロウイルスの状態

ATL細胞に組み込まれたプロウイルスDNAの解析から、欠損型のプロウイルスを持つ症例の割合が約26%であり、5'側のgag-pol領域の欠失がみられ、5'LTRを保存する例と欠損している例の2種が存在することが知られている。また、欠損プロウイルスは急性型に多い傾向があること、2コピー以上のプロウイルスが組み込まれている例が約18%あることが報告されている<sup>17)</sup>。さらに、ATL細胞のプロウイルスの5'LTR(ウイルスの遺伝子発現のプロモーター領域)が選択的にほぼ完全にCpGメチル化されている<sup>18)</sup>。さらに、TaxのORFに高頻度に塩基配列の変異が認められている<sup>19)</sup>。これらの結果は、ATL細胞ではDNAメチル化、ゲノムの欠損またはTaxの変異によってウイルスがshut-offされていることを示すものである。しかし、プロウイルスゲノムの3'側に位置するenv-pX-LTR領域が全例で保存されていることから、3'LTRから転写されるアンチセンス転写産物HBZの機能に注目が集まっている<sup>20)</sup>。

#### 3. ATL細胞の分子生物学的特徴：遺伝子発現解析

ATL細胞の遺伝子発現解析の結果が報告されているが、その内容は、感染細胞株を対象にしたものと新鮮ATL細胞を解析したものに分かれる。in vitroで培養された細胞株を用いたデータの意義づけは限界があると考えられる。検体の解析も複数報告されているが、対象検体数が少ないため、一般性には限界があると考えられる。その中では、Morishitaらは8例のATL検体の解析から、ATL細胞ではTSLC1が過剰発現していることを見出し、この分子をバイオマーカーとした診断系の開発を進めている<sup>21)</sup>。

ATL細胞におけるmiRNAの発現解析を報告した論文は3報ある<sup>22)~24)</sup>。これらの報告に用いられた検体の種類や数を表1にまとめた。

Yeungらの報告では、ATL細胞で過剰発現する6つのmiRNAを報告している。そのうちmiR-93とmiR-130bはTP53INP1を標的遺伝子とすることが示された。実際、TP53INP1の発現はATL細胞では低レベルであり、antagomirを用いて細胞を処理するとその発現は回復した。したがって、miR-93/miR-130b-TP53INP1 axisがHTLV-1で腫

表 1 HTLV-1感染細胞株/ATL細胞のmicroRNAの解析を報告した論文

報告者	対象検体	検体数	対照検体	文献
Pichler K, et al.	細胞株	HTLV-1感染細胞株 12株	HTLV-1非感染 T 細胞株 3 株	22)
Yeung ML, et al.	細胞株および末梢血ATL細胞	細胞株 7, ATL検体 4	正常末梢血単核球 3 検体	23)
Bellon M	末梢血ATL細胞	ATL検体 7	正常末梢血単核球 3 検体	24)

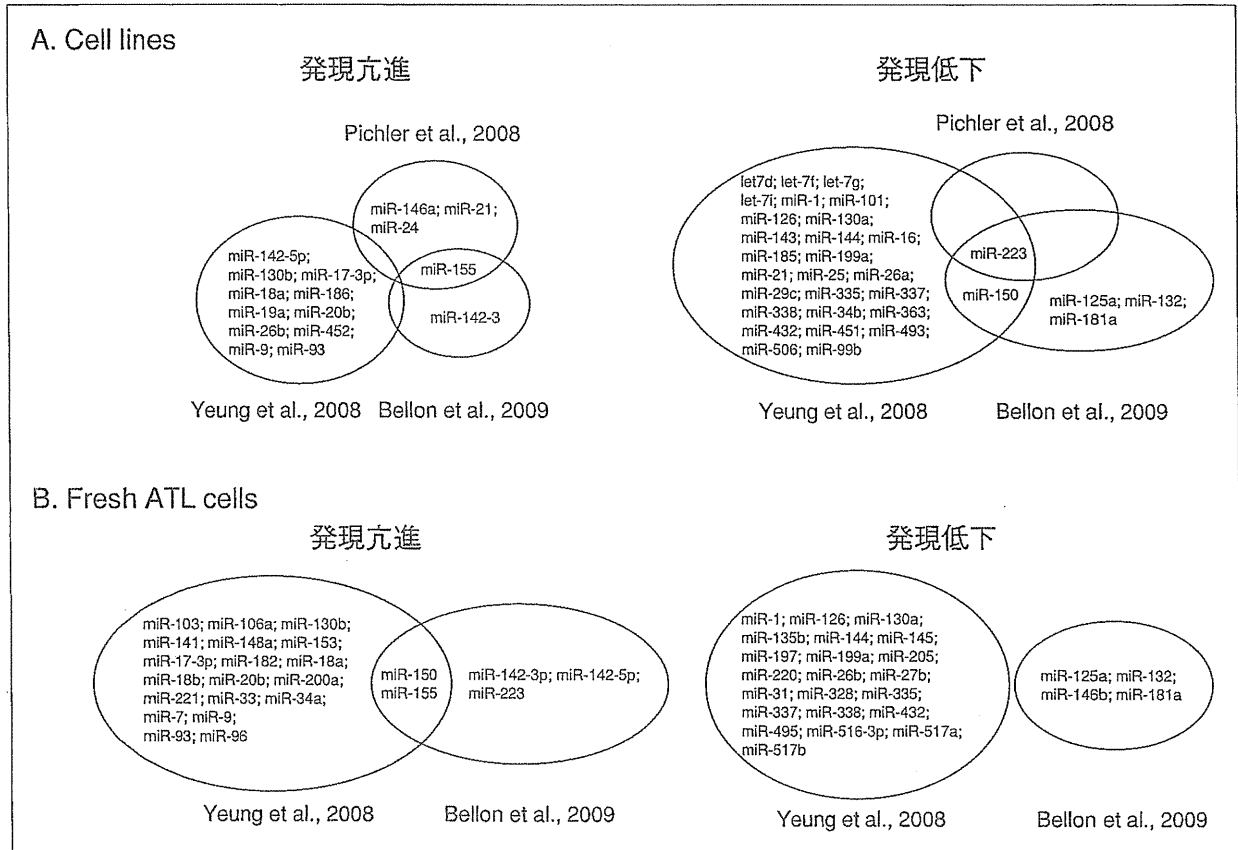


図 3 microRNA発現解析のまとめ

・細胞株の解析では3つの報告で共通するものが少ない。特に過剰発現しているmiRNAでは再現性が少ない。  
 ・新鮮ATL細胞でも2つの報告で共通するものが少ない。多くのがんでは発現低下するものが多いといわれているが、これらの報告ではその特徴は明らかではない。

瘍化した細胞の増殖や生存に影響している可能性があることを報告している。Pichlerらは、HTLV-1で腫瘍化した細胞では、miR-21, miR-24, miR-146aおよびmiR-155が過剰発現していること、一方、miR-223の発現は抑制されていると報告している。また、miR-146aはTaxとNF-κBで発現が誘導されることも報告した。Bellonらは、ATL細胞やHTLV-1感染細胞ではmiR-223, miR-181a, miR-150, およびmiR-142.3pの発現に異常があり、これらはTリンパ球の分化にかかわるmicroRNAであると報告した。特に、miR-150とmiR-223はATL細胞では発現亢進が認められるにもかかわらず、細胞株では発現が低下していることを示し

た。

これらの論文で得られた結果をまとめて図3に示した。

### ATLの治療の現状と課題

#### 1. 治療の現状と基本的方針

##### (1) 化学療法

従来の多剤併用化学療法の臨床治験の試みと成績の取りまとめを表2に示した。現時点では、急性型、リンパ腫型およびハイリスクの慢性型ATLの治療の第一選択はLSG15(あるいはmodified LSG15)プロトコールであると考えられる。しかし、このような細胞毒性の強い治療法を適用で

表 2 JCOG-LSGによるATLの臨床治験

名称	期間	プロトコール名	症例数	CR(%)	PR (%)	MST(月)	生存率(%)
JCOG 7801	1978~1980	LSG1(VEPA)	18	16.7	N/A	5	N/A
JCOG 8101	1981~1983	LSG1(VEPA)	24	16.7	N/A	7.5	8.3 (4年)
JCOG 8701	1987~1990	LSG2(VEPA-M)	30	36.7	N/A	8	12 (4年)
JCOG 9109	1991~1993	LSG11	62	28.3	23.3	7.4	15.5 (2年)
JCOG 9303	1994~1996	LSG15	96	35.5	45.2	13	10.3(5年)
JCOG 9801	1998~2003	mLSG15	57	40	32	12.7	31.3(2年)
		mLSG19	61	25	41	10.9	24(3年)
							13(3年)

CR : complete response, PR : partial response, MST : 生存期間中央値, N/A : not available

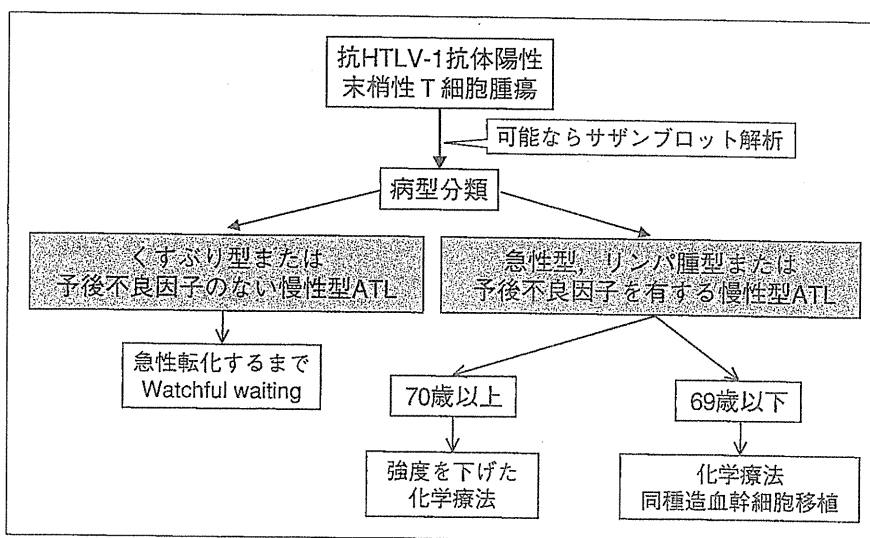


図 4 ATLの診断と治療の流れ

きない患者が大多数であり、CHOP療法あるいは経口剤による対症療法で対処せざるを得ない例が多いのが実態である<sup>25)</sup>。現在の診断と治療の流れを図4に示す。

2007年に箱根で開催された第13回「HTLV-1国際会議」での議論をもとに、ATLの治療法に関する国際的な合意の形成が長崎大学の塚崎らによって取りまとめられた<sup>26)</sup>。

(2) 血液幹細胞移植療法 (SCT)

現在も臨床治験が進められている。予後不良のATLに対して行われたSCTのこれまでの成績を総括すると、生存期間中央値は延長し、30~40%の例で長期生存が期待できるが、治療関連死が多いということになる。ATLのSCTにはいくつかの問題・制約があると考えられる。患者の年齢が高いことで、一般のSCTの適応が限られること、HTLV-1非感染donorが得られにくいことなどである。このような背景から、前処置を軽減

したreduced-intensity conditioning stem cell transplantation (RIST)が注目されており、その有効性に関する検討も進められている。また、臍帯血幹細胞移植(UCBT)の有効性に関してはまだ明確なエビデンスが得られていない。また、HLAが適合したdonorが得られない場合の、HLA-haploidentical donorからのallo-SCTも検討課題であると思われる<sup>25)</sup>。

2. 新たな治療法の模索

既存の治療法の現状が上記のように満足できる状態ではないので、新たな治療法、特に化学療法剤の開発が求められている。現在検討されているさまざまな例の一部を以下に紹介する<sup>25)</sup> (表3)。

(1) 化学療法

a. 抗ウイルス療法

Zidovudine (AZT) と interferon を用いた治療成績が欧米のグループから報告されている。最近

表3 分子標的薬を含む治療法の検討例

経路/分子標的	薬物	作用
NF-κB経路	Bortezomib	Proteasome inhibitor
	Bay 11-7082	IKK inhibitor
	ACHP	IKK inhibitor
	DHMEQ	NF-κB nuclear transport inhibitor
AKT経路	IC87114, LY294002	PI3K inhibitor
	OSU-03012, OSU-03013	PDK1 inhibitor
	BX320, BX-912	PDK1 inhibitor
	Perifosine, PIA5, XL418	AKT inhibitor
	Curcumin	PDK1 inhibitor
HDAC	LBH589	HDAC inhibitor
	SAHA	HDAC inhibitor
	MS-275	HDAC inhibitor
CD25抗原	Anti-Tac-Mab	Mouse Mab, blocks IL-2/Receptor interaction
	Daclizumab	Humanized Mab, IL-2/Receptor interaction
CD52抗原	Alemtuzumab	Humanized Mab, Complement-Dependent Cytotoxicity
CD71抗原	A24	Mouse Mab against transferrin receptor

の報告では、急性型、慢性型およびくすぶり型に関しては完全寛解率が化学療法を上回ることで、慢性型とくすぶり型では5年生存率が100%という結果になっている<sup>27)</sup>。わが国では、平成22年度から塚崎らの班研究で臨床研究が開始された。

#### b. 亜ヒ酸

前骨髄球性白血病(APL)での有効性が知られている亜ヒ酸が、ATLに対しても有効との報告がある。亜ヒ酸+IFN-α+AZTでは慢性型ATL患者10例で、7例に完全寛解、3例で部分寛解という報告がある<sup>28)</sup>。わが国での追試はまだ行われていない。

#### c. レチノイド

All-trans retinoic acid(ATRA)の報告では、20例中PRが8例であり、十分な有効性があるとはいえないが、亜ヒ酸との併用効果に関しては検討の余地がある。新たな合成レチノイドとして、NIK333やAm80についても検討がなされている。

#### d. NF-κB阻害剤

前臨床のデータとして、IKK阻害剤であるBay11-7082およびNF-κB核移行阻害薬DHMEQの報告がある。これらの臨床治験はまだ行われていない。

#### e. プロテアソーム阻害剤

BortezomibがNF-κBを阻害することが報告されており、非ホジキンリンパ腫の一部での有効性が報告されている。ATLに関してはin vitroおよびxenograftを用いて有効性が報告されている。

単独あるいは併用におけるATLに対する有効性を検証する臨床研究が望まれる。

#### f. HDAC阻害剤

一部の薬剤が皮膚型Tリンパ腫(CTCL)に有効であることが報告されている。in vitroの実験ではHTLV-1感染細胞株および新鮮ATL細胞に対しての有効性が確認されており、臨床治験による検証が必要である。

ほかにも、いくつかの臨床応用段階および前臨床段階の薬物が、ATLに対しても有効である可能性が示されている。基礎情報を十分に検討して、優先順位をつけた上で、これらの薬物の有効性に関する臨床治験を進めることが望まれる。

#### (2) 抗体療法

現在、第II相の臨床治験が進んでいる脱フコシル化CCR4抗体(KW-0761)は、早期に承認されて、臨床現場での使用が可能になることが期待される<sup>29)</sup>。ほかにも、CD25, CD2, CD52, CD30およびトランスフェリンレセプター(CD71)に対する単クローン抗体を用いた抗体療法が検討中であり、一部は臨床治験の段階にある。ただ、ATLに対しての有効性を検証する臨床治験が十分に行われていない。

#### おわりに

ATLはウイルス感染によって感染細胞そのもの

が腫瘍化する特異ながんである。したがって、最初にも述べたように、ATL研究の方向性も、ウイルス側と腫瘍細胞側の2方向からのアプローチが可能である。ポストゲノム時代になり、米国でのCancer Genome Anatomy Projectの前例をみるまでもなく、がんの発症機構の理解には、腫瘍細胞内に蓄積された遺伝子異常の実態と、発現する遺伝子の包括的把握が必須である。多くの研究者の真摯な努力の結果、個別の遺伝子異常解析の中からも有意義かつ示唆的な知見がまとめられてきたが、今後は、包括的なゲノム異常および遺伝子発現異常のデータベースを基盤とした知見を整理して、発症までに蓄積された腫瘍化にかかわる遺伝子異常の実体を解明する試みが可能になってきたと考えられる。治療法に関しては、画期的抗体療法の臨床応用が現実になりつつあるが、すでに検討されている多くの薬物に関してATLについての有効性を組織的に検証するとともに、新たな視点に基づく低分子化合物のスクリーニングも進める必要があると考える。これらの解析を通じて、腫瘍化を特徴づけるバイオマーカーの同定と、それに基づく早期診断、発症予防、および新たな分子標的治療法の開発が期待される。

## 文 献

- 1) 渡邊俊樹. HTLV-1の分子生物学: 基礎と臨床をつなぐもの. 渡邊俊樹, 上平 憲, 山口一成・編. HTLV-1と疾患. 東京: 文光堂; 2007. pp. 166-77.
- 2) 上平 憲. ATLの細胞生物学. 渡邊俊樹, 上平 憲, 山口一成・編. HTLV-1と疾患. 東京: 文光堂; 2007. pp. 71-83.
- 3) Fukuda R, Hayashi A, Utsunomiya A, et al. Alteration of phosphatidylinositol 3-kinase cascade in the multilobulated nuclear formation of adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 ; 102 : 15213.
- 4) Kamihira S, Sohda H, Atogami S, et al. Phenotypic diversity and prognosis of adult T-cell leukemia. *Leukemia Res* 1992 ; 16 : 435.
- 5) Tian Y, Kobayashi S, Ohno N, et al. Leukemic T cells are specifically enriched in a unique CD3(dim) CD7(low) subpopulation of CD4(+) T cells in acute-type adult T-cell leukemia. *Cancer Sci* 2011 ; 102 : 569.
- 6) Chen S, Ishii N, Ine S, et al. Regulatory T cell-like activity of Foxp3+ adult T cell leukemia cells. *Int Immunol* 2006 ; 18 : 269.
- 7) Matsubar Y, Hori T, Morita R, et al. Delineation of immunoregulatory properties of adult T-cell leukemia cells. *Int J Hematol* 2006 ; 84 : 63.
- 8) Shimauchi T, Kabashima K, Tokura Y. Adult T-cell leukemia/lymphoma cells from blood and skin tumors express cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 and Foxp3 but lack suppressor activity toward autologous CD8+ T cells. *Cancer Sci* 2008 ; 99 : 98.
- 9) Abe M, Uchihashi K, Kazuto T, et al. Foxp3 expression on normal and leukemic CD4+CD25+ T cells implicated in human T-cell leukemia virus type-1 is inconsistent with Treg cells. *Eur J Haematol* 2008 ; 81 : 209.
- 10) Kondo S, Kotani T, Tsumori S, et al. Identification of biclonal (duplex) leukemia cells expressing CD4+/CD8- or CD4-/CD8+ from a patient with adult T-cell leukemia/lymphoma. *Br J Haematol* 1995 ; 89 : 669.
- 11) Shibata K, Shimamoto Y, Suga K, et al. Adult T-cell leukemia/lymphoma with two distinct clones in peripheral blood and lymph node. *Am J Hematol* 1995 ; 48 : 116.
- 12) Tsukasaki K, Tsushima H, Yamamura M, et al. Integration patterns of HTLV-1 provirus in relation to the clinical course of ATL: frequent clonal change at crisis from indolent disease. *Blood* 1997 ; 89 : 948.
- 13) Shimamoto Y, Kikuchi M, Funai N, et al. Spontaneous remission in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer* 1993 ; 72 : 735.
- 14) Kato N, Sugawara H, Aoyagi S, Mayuzumi M. Lymphoma-type adult T-cell leukemia-lymphoma with a bulky cutaneous tumor showing multiple human T-lymphotropic virus-1 DNA integration. *Br J Haematol* 2001 ; 144 : 1244.
- 15) Hata T, Fujimoto T, Tsushima H, et al. Multi-clonal expansion of unique human T-lymphotropic virus

- type-1-infected T cells with high growth potential in response to interleukin-2 in prodromal phase of adult T-cell leukemia. *Leukemia* 1999 ; 13 : 215.
- 16) Umino A, Nakagawa M, Utsunomiya A, et al. Clonal evolution of adult T-cell leukemia/lymphoma takes place in lymph node. *Blood* 2011 Mar 29[prepublished online].
- 17) Kamihira S, Sugahara K, Tsuruda K, et al. Proviral status of HTLV-1 integrated into the host genomic DNA of adult T-cell leukemia cells. *Clin Lab Haem* 2005 ; 27 : 235.
- 18) Koiwa T, Hamano-Usami A, Ishida T, et al. 5'-LTR-selective CpG methylation of latent HTLV-1 provirus in vitro and in vivo. *J Virol* 2002 ; 76 : 9389.
- 19) Furukawa Y, Tara M, Izumo S, Arimura K, et al. HTLV-I viral escape and host genetic changes in the development of adult T cell leukemia. *Int J Cancer* 2006 ; 118 : 381.
- 20) Satou Y, Yasunaga J, Yoshida M, et al. HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 ; 103 : 720.
- 21) Sasaki H, Nishikata I, Shiraga T, et al. Overexpression of a cell adhesion molecule, TSLC1, as a possible molecular marker for acute-type adult T-cell leukemia. *Blood* 2005 ; 105 : 1204.
- 22) Pichler K, Schneider G, Grassmann R. MicroRNA miR-146a and further oncogenesis-related cellular microRNAs are dysregulated in HTLV-1-transformed T lymphocytes. *Retrovirology* 2008 ; 5 : 100.
- 23) Yeung ML, Yasunaga J, Bennasser Y, et al. Roles for microRNAs, miR-93 and miR-130b, and tumor protein 53-induced nuclear protein 1 tumor suppressor in cell growth dysregulation by human T-cell lymphotropic virus 1. *Cancer Res* 2008 ; 68 : 8976.
- 24) Bellon M, Lepelletier Y, Hermine O, Nicot C. Deregulation of microRNA involved in hematopoiesis and the immune response in HTLV-I adult T-cell leukemia. *Blood* 2009 ; 113 : 4914.
- 25) Uozumi K. Treatment of adult T cell leukemia. *J Clin Exp Hematop* 2010 ; 50 : 9.
- 26) Tsukasaki K, Hermine O, Bazarbachi A, et al. Definition, prognostic factors, treatment and response criteria of adult T-cell leukemia-lymphoma : a proposal from an international consensus meeting. *J Clin Oncol* 2009 ; 27 : 453.
- 27) Bazarbachi A, Plumelle Y, Carlos Ramos J, et al. Meta-analysis on the use of zidovudine and interferon-alfa in adult T-cell leukemia/lymphoma showing improved survival in the leukemic subtypes. *J Clin Oncol* 2010 ; 28 : 4177.
- 28) Kchour G, Tarhini M, Kooshyar MM, et al. Phase 2 study of the efficacy and safety of the combination of arsenic trioxide, interferon alpha, and zidovudine in newly diagnosed chronic adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL). *Blood* 2009 ; 113 : 6528.
- 29) Yamamoto K, Utsunomiya A, Tobinai K, et al. Phase I study of KW-0761, a defucosylated humanized anti-CCR4 antibody, in relapsed patients with adult T-cell leukemia-lymphoma and peripheral T-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2010 ; 28 : 1591.

\* \* \*

# 成人T細胞白血病から明らかになった新たなクロストーク経路の異常とがん

山岸 誠・渡邊俊樹

(東京大学大学院新領域創成科学研究科 メディカルゲノム専攻病態医療科学分野)

email : 山岸 誠, 渡邊俊樹

## **Polycomb-mediated loss of miR-31 activates NIK-dependent NF- $\kappa$ B pathway in adult T cell leukemia and other cancers.**

Makoto Yamagishi, Kazumi Nakano, Aiko Miyake, Tadanori Yamochi, Yayoi Kagami, Akihisa Tsutsumi, Yuka Matsuda, Aiko Sato-Otsubo, Satsuki Muto, Atae Utsunomiya, Kazunari Yamaguchi, Kaoru Uchimaru, Seishi Ogawa, Toshiki Watanabe

*Cancer Cell*, 21, 121-135 (2012) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22264793>

## 要約

成人T細胞白血病は日本人に100万人以上、世界では推定2000万人の感染者がいるHTLV-1により引き起こされる重篤な白血病で、有効な治療法は確立していない。筆者らは、HTLV-1感染者コホート共同研究班の全面的な協力を得て、世界ではじめて成人T細胞白血病患者の細胞のゲノム、mRNA、マイクロRNAの大規模な統合解析を完了した。その結果、成人T細胞白血病の悪性化をひき起こす原因として、マイクロRNAのひとつmiR-31がすべての成人T細胞白血病患者において著しく減少していることを明らかにした。miR-31の減少はその標的遺伝子の産物であるNIKの過剰な発現とそれともなうNF- $\kappa$ Bシグナルの恒常的な活性化を誘発すること、miR-31を再導入すると細胞死が誘導されることが示された。ゲノムの欠損およびPolycombファミリーに依存的なエピジェネティックな異常がmiR-31の発現低下の原因であり、また、成人T細胞白血病だけでなく乳がん細胞やB細胞における免疫応答反応でも同じ機構が保存されていることがわかった。したがって、Polycombファミリー、miR-31、NIKのバランスが細胞の運命に重要であることが示された。Polycombファミリーは細胞の恒常性や分化などの多彩な機能に必須であると同時に、その異常は多くののがん細胞における重要な分子標的となっている。マイクロRNAを介したPolycombファミリーとNF- $\kappa$ Bとのクロストークは新たな概念であり、この研究の成果より、エピジェネティックな異常がNF- $\kappa$ Bシグナルの恒常的な活性化を介しアポトーシスに対する抵抗性の獲得に寄与することが明らかになった。

## はじめに

成人T細胞白血病 (adult T cell leukemia/lymphoma : ATL) はHTLV-1 (human T cell leukemia virus type 1, ヒトT細胞白血病ウイルスI型) の感染により引き起こされる重篤なT細胞性の白血病である。50~60年という長い潜伏期間のあいだHTLV-1に感染した末梢血のT細胞には複数の遺伝子異常が蓄積しがん化がひき起こされる (図1)。現在、世界には2000万人以上の感染者がいるとされるが、わが国ではとくに多く、約120万人の感染者が存在し毎年1000人をこえる感染者がきわめて予後の不良な成人T細胞白血病を発症する。白血病やウイルスが発見された当時からこの分野における日本人研究者の貢献度は多大であるが、ウイルスによる細胞の不死化や腫瘍化、治療への抵抗性などの分子機構にはいまだに不明な点が多く残されており有効な治療法は存在しない。ウイルスの根絶と白血病の予防、新規の治療法の開発をめざした分子レベルでの病態の解明が必須である<sup>1)</sup>。

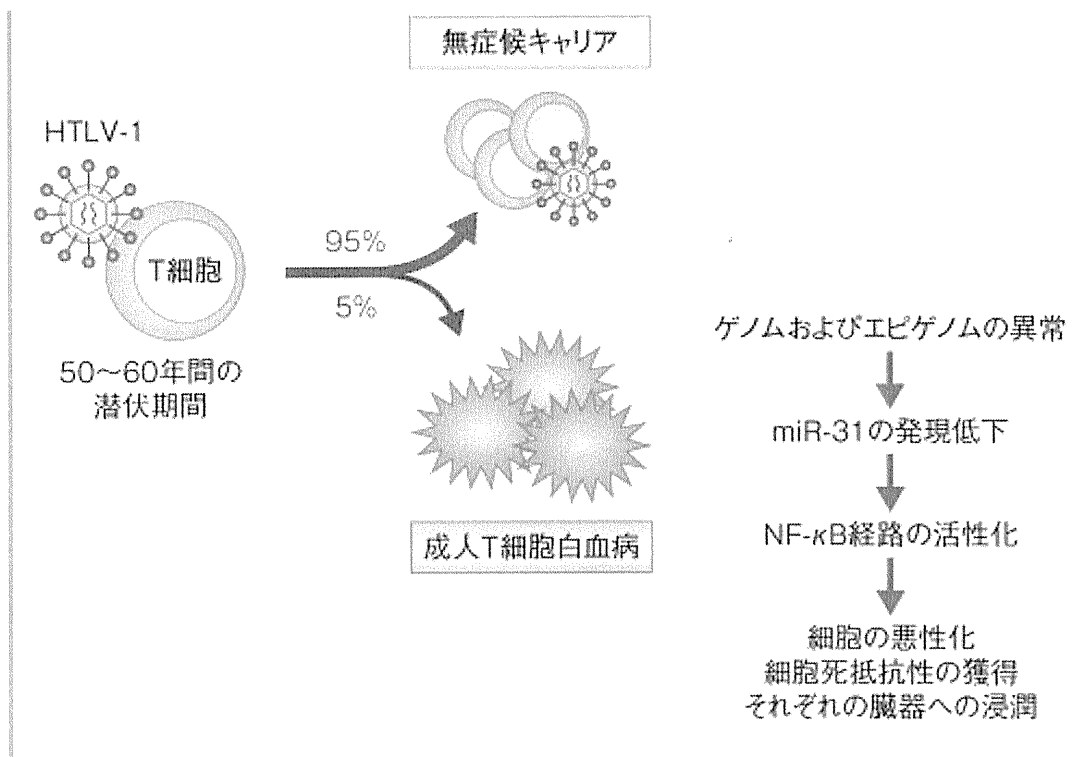


図1 HTLV-1の感染と成人T細胞白血病のモデル

成人T細胞白血病はHTLV-1感染者（キャリア）の約5%に発症する。成人T細胞白血病細胞はウイルス遺伝子の発現が低く、さまざまな遺伝子異常の蓄積によりシグナル伝達系の攪乱が起こっている。miR-31は成人T細胞白血病の全例において低下しており、腫瘍細胞の悪性化に寄与する。

[Download] <http://first.lifesciencedb.jp/wordpress/wp-content/uploads/2012/02/Watanabe-Cancer-Cell-12.1.17-Fig.1.jpg>

成人T細胞白血病細胞およびHTLV-1感染細胞の生物学的な特徴として恒常的なNF-κBシグナルの活性化があり、これにより細胞の異常な増殖および生存が確保されている<sup>2)</sup>。HTLV-1感染細胞ではウイルスの遺伝子産物であるTaxがNF-κBの定型的（canonical）経路および非定型的（noncanonical）経路を劇的に活性化するが、通常はTaxの発現が認められない成人T細胞白血病細胞におけるNF-κBシグナルの活性化の機構には不明な点が多かった。そのうち、遺伝子発現の解析によりNIK（NF-κB-inducing kinase）をコードするmRNAの過剰な発現が恒常的なNF-κBシグナルの活性化に寄与していることが明らかになっているが<sup>3)</sup>、NIKの異常発現の機構は明らかになっていなかった。NF-κBシグナルの異常な活性化とそれにとまう腫瘍細胞の生存能の獲得および悪性化は、成人T細胞白血病だけでなく多くの固形がんや悪性リンパ腫、白血病において共通してみられるがん細胞の特徴のひとつである。そのなかでも、NIKの高発現による異常な活性化は重要な位置をしめているが、正常を逸脱するその機構は不明でありがん研究の全体における課題であった。

筆者らは、成人T細胞白血病患者のマイクロRNAの解析、mRNAの発現解析、および、ゲノム異常の解析を統合してその分子病態の全貌にアプローチした。その結果として明らかになった成人T細胞白血病における分子異常はその臨床的な特徴をよく反映しており、分子マーカーや治療標的としてさまざまな情報を提示した。さらに、明らかにされた新たな分子機構はがん研究の全体に新たな概念を提唱した。

## 1. 成人T細胞白血病の臨床検体を用いた大規模な統合解析からみる分子病態

これまでの成人T細胞白血病の研究の多くは細胞株か少数の患者に由来する細胞から得られた情報を基盤としたものであり、実際の成人T細胞白血病細胞を分子レベルで正確に理解することが成人T細胞白血病の研究において重要な課題であった。いまだ有効な治療法のない成人T細胞白血病に対し根本的な情報を得る



ため、筆者らはまず、全国的なHTLV-1疫学調査および検体バンク組織であるHTLV-1感染者コホート共同研究班 (JSPFAD, URL : <http://htlv1.org/>) の全面的な協力を得て、成人T細胞白血病の臨床検体を用いたマイクロRNAおよびmRNAの大規模な解析に着手した。米国Agilent Technologies社のマイクロRNAマイクロアレイを用い、成人T細胞白血病細胞40例、正常なCD4陽性T細胞22例について解析を行った結果、非常に厳しい検定をクリアした61個のマイクロRNAにおける発現異常を同定した。ほかのがん細胞における報告と同様に、成人T細胞白血病細胞では発現の異常を示すマイクロRNAのほとんどは発現の低下を示した。成人T細胞白血病細胞におけるマイクロRNAの発現パターンはユニークで、マイクロRNAの発現をもって正常なT細胞と区別できることもわかった。この61個のマイクロRNAのなかでもっとも差が大きかったmiR-31は、正常なT細胞では比較的発現量が高く、一方で、成人T細胞白血病細胞では非常に発現が低いもしくは検出限界以下にまで発現が低下していた。miR-31は乳がん細胞の転移能をはじめさまざまな細胞機能にかかわる重要なマイクロRNAで<sup>4)</sup>、その発現の低下が細胞の運命に重要な意味を包含するものと考えられた。

## 2. miR-31の発現低下とその生物学的な意義

マイクロRNAのおもな生物学的な機能は標的遺伝子の3'側非翻訳領域に結合することによりその発現を負に制御することである。外来の合成siRNAとは異なり、マイクロRNAによる配列の認識はゆらぎが特徴的であり、ひとつのマイクロRNAが複数個の遺伝子を制御することができる。細胞の運命に重大な影響をあたえるような標的遺伝子の探索には、物理的な抑制効果と同時に標的遺伝子の側の機能や挙動も重要な指標となり、したがって、多角的な実験的検証が必須になる。筆者らは、成人T細胞白血病の全例で発現が低下していたmiR-31のT細胞における生物学的な意義を明らかにするため、以下の検討を行った。1) miR-31の標的遺伝子を4つのアルゴリズムにより予測、2) 成人T細胞白血病細胞のmRNAの大規模な解析データとのすりあわせによる検証、3) 変異を導入したレポーターアッセイ、4) miR-31の増減に対する候補となる標的遺伝子の定量、5) miR-31と標的遺伝子との関係の保存性の確認。以上により、NIKをコードする遺伝子がmiR-31の新規の標的遺伝子であることが明らかになった。NIKはNF- $\kappa$ Bの非定型的経路の活性化に必須のリン酸化酵素であり、その発現量がNF- $\kappa$ Bシグナルの恒常的な活性化に直接的に寄与することが複数のがんにおいて報告されている。成人T細胞白血病ではNIKをコードするmRNAの量が増加していることがわかってきたが<sup>3)</sup>、過剰な発現の原因は明らかにされていなかった。成人T細胞白血病患者に由来する細胞から樹立された細胞株にmiR-31を過剰に発現させるとNIKのmRNA量およびタンパク質量が低下し、NF- $\kappa$ Bシグナルが低下することがわかった。これらの細胞では増殖能の低下、抗アポトーシス遺伝子の発現の低下、アポトーシス感受性の向上がみられた。さらに、miR-31を発現誘導するレンチウイルスベクターは成人T細胞白血病患者から直接取り出した腫瘍細胞のアポトーシスを誘導することがわかった。以上より、miR-31の発現の低下は成人T細胞白血病細胞の生存にとって重要であり、その分子機構はNIKの過剰な発現の誘導であることが示された。NF- $\kappa$ Bシグナルは非常に複雑な制御機構を備えているが、miR-31が新たなNF- $\kappa$ Bシグナルの抑制因子として同定された。

## 3. ゲノムおよびエピゲノムの異常とmiR-31の発現制御

細胞内での成熟したマイクロRNAのダイナミズムは、転写制御および転写後の成熟過程の制御により規定されている。成人T細胞白血病の全例で発現の低下のみられたmiR-31は転移性乳がんや前立腺がんなどでも発現が低下しており、がん細胞における一般性と重要性が示唆されたが、細胞内においてmiR-31の量がどのように制御されているかについては不明であった。miR-31遺伝子は多くのがん細胞でゲノムの欠失が頻発する9p21.3のCDKN2A/B領域に隣接しており、成人T細胞白血病においてもゲノムの不安定性が予測された。成人T細胞白血病168症例での大規模なDNAコピー数の解析の結果、12.5%の症例でmiR-31遺伝子のホモもしくはヘテロの欠損のあることがわかった。一方で、同時に行ったマイクロRNAの発現解析では、ゲノムの欠損のない症例でも正常なT細胞に比べmiR-31の量が大きく減少していることがわかった。そこで、発現解析データとアルゴリズムからmiR-31遺伝子の転写構造を予測したところ、miR-31

はLOC554202遺伝子のイントロン領域にコードされ、独立した転写が起こっていることがわかった。また興味深いことに、YY1という転写因子の認識配列がmiR-31遺伝子の転写開始点の上流に蓄積していた。このYY1はPolycombファミリーに属するDNA結合タンパク質で、ヒストンH3の27番目のリジン残基のメチル化酵素であるEZH2をはじめとするPRC2 (Polycomb repressive complex 2) のリクルーターとしての機能が注目されている<sup>9)</sup>。そこで、YY1のノックダウン実験を行ったところ、miR-31遺伝子領域へのYY1の蓄積が減少し、それに付随してEZH2のリクルートが減少することがわかった。

では、成人T細胞白血病細胞をはじめとする高悪性度の腫瘍において、なぜmiR-31の発現が激減するのか？ 成人T細胞白血病におけるmRNAの発現解析の結果、ヒストンH3の27番目のリジン残基のトリメチル化を誘導するPolycombファミリーに属するEZH2およびSUZ12をコードする遺伝子の発現が正常なT細胞に比べ高いことがわかった。成人T細胞白血病細胞株においてこれらPolycombファミリーをノックダウンすると、miR-31遺伝子領域へのPRC2のリクルートが減少し、その結果、ヒストンH3の27番目のリジン残基および9番目のリジン残基のメチル化レベルが低下した。さらに、ヒストンの脱アセチル化を介して転写抑制にはたらくHDAC1の結合量も減少し、その結果、miR-31の発現が回復することがわかった。以上の実験データから、Polycombファミリーの発現異常がmiR-31の発現低下を誘導するという新たな分子機構が明らかになった。この事実は、成人T細胞白血病患者に由来する腫瘍細胞をクロマチン免疫沈降アッセイにより直接的に調べた結果、miR-31遺伝子領域に異常な抑制的メチル化をもつヒストンが検出され、また、EZH2のノックダウンが直接に細胞死を誘導したこと、さらに、同様の分子機構が好転移性乳がん細胞やB細胞株においても保存されていたことからサポートされた。

以上より、細胞内における成熟miR-31の発現量は、ゲノムの安定性と、YY1とPRC2によるエピジェネティックな制御の2つの側面により規定されていることが示された。

## 4. PolycombファミリーによるmiR-31制御を介したNF-κB経路への影響

miR-31はNIKのほかRhoA, Radixin, インテグリンα5, FoxP3, FIH, E2F2などさまざまなタンパク質をコードする遺伝子を負に制御し細胞の運命に強く影響する。一方で、miR-31を制御するPolycombファミリーは多くの悪性リンパ腫、白血病、固形がんの増殖、生存、転移能に重要であるが、どの標的遺伝子が細胞の表現型に直接に影響するかについては不明な点が多かった。そこで、この研究で明らかになったmiR-31によるNIKを介したNF-κB経路の制御とPolycombファミリーによるmiR-31の発現制御とをあわせ、Polycombファミリーによるエピジェネティックな制御がNIKに依存的なNF-κB経路の制御にかかわるという仮説をたてた。これまで、PolycombファミリーとNF-κB経路との関係は不明であった。

成人T細胞白血病細胞株においてEZH2もしくはSUZ12をノックダウンすると、さきに述べたようにmiR-31の発現が誘導され、このとき、NIKの量が減少することにより下流へのシグナルが停止しNF-κBシグナルが低下した。さらに、これらの細胞では細胞の増殖および細胞死への抵抗性が低下した。Polycombファミリー、miR-31、NIKはそれぞれの経路の上流に位置し、細胞に対するアウトプットはさまざまに拡散すると考えられるが、以下の実験事実によりこの分子機構は非常に重要であると考えられた。1) Polycombファミリーのノックダウンにより低下したNF-κBシグナルはmiR-31の阻害剤を共存させることにより回復することから、PolycombファミリーによるNF-κBの制御にはmiR-31の仲介が重要である、2) Polycombファミリーのノックダウンにより誘導される成人T細胞白血病細胞の強制的なアポトーシスは3'側非翻訳領域を削除したNIKによりレスキューされる、つまり、Polycombファミリーにより獲得された異常な生存能の一部はNIKにより具現化されている。3) miR-31の過剰な発現やPolycombファミリーのノックダウンはB細胞におけるBAFFやCD40LからのNF-κBの非定型的経路の活性化を阻害することから、がん細胞のシグナルだけでなく正常細胞のシグナルの制御にも重要である。4) miR-31の発現およびPolycombファミリーのノックダウンにより成人T細胞白血病細胞のMDC (CCR4リガンド) に対する走化性が低下し、NIK以外のmiR-31の標的遺伝子による表現型はPolycombファミリーによっても影響をうける。

## 5. 新規の治療法の開発へ

Polycombファミリーの過剰な発現, miR-31の発現の低下, NIK量の増加とNF- $\kappa$ Bシグナルの恒常的な活性化は, いずれも成人T細胞白血病の臨床検体から明らかになった. この研究の総括として, この腫瘍細胞の分子レベルでの特徴が細胞の生存にどのように影響するかを検討した. miR-31の強制発現, また, EZH2もしくはNIKのノックダウンを行うレンチウイルスベクターを作製し, 患者に由来する腫瘍細胞に直接に導入することにより*ex vivo*での評価を行った. その結果, ある程度の個人差をもっていずれのレンチウイルスも複数の成人T細胞白血病の症例で強烈なアポトーシスを誘導することがわかった. 同様の処理は正常の末梢血の単核球もしくはT細胞に対しては効果が微弱であり, それぞれの因子の存在量のバランスの異常が成人T細胞白血病細胞の生存に重要であることが示された. これらの結果は, miR-31が成人T細胞白血病細胞に特異的な細胞障害性をもつことを示しており, この細胞に特異的な導入法を開発することにより成人T細胞白血病の新規の治療法につながる可能性をもつと考えられた.

## おわりに

この研究は, 成人T細胞白血病における新たな分子標的とNF- $\kappa$ Bシグナルの活性化の機序を明らかにするとともに, Polycombファミリーによるエピジェネティックな制御, マイクロRNAによる細胞運命の決定, NF- $\kappa$ B経路による免疫細胞および腫瘍細胞の分子基盤, という3つのコンテキストに新たな生物学的なリンクを見出した (図2). また, この研究で得られた知見は以下の点で重要であった.

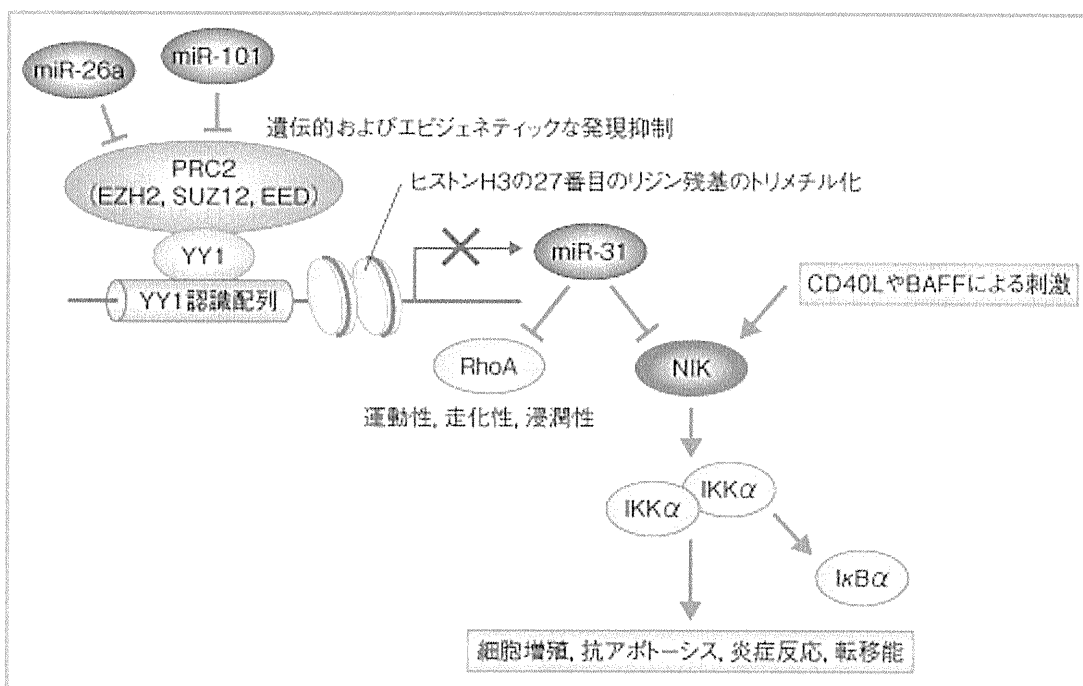


図2 Polycombファミリーに依存的なmiR-31の発現低下はNIKなどの標的遺伝子を介して細胞の表現型に影響する

これらの因子のあいだの関係はさまざまな細胞で保存されており, それぞれの因子の存在量のバランスにより均衡が保たれている. バランスをくずした細胞は悪性化をたどるものと考えられる.

[Download] <http://first.lifesciencedb.jp/wordpress/wp-content/uploads/2012/02/Watanabe-Cancer-Cell-12.1.17-Fig.2.jpg>

1つ目は, NIKの新たな制御機構を明らかにしたことである. NIKは成人T細胞白血病以外にも, 多発性骨髄腫, 悪性リンパ腫, 乳がんなどにおけるNF- $\kappa$ Bシグナルの異常な活性化の原因タンパク質である. また, NIKは免疫担当細胞をはじめとする種々の細胞の正常機能に必須であり, NIKをめぐる基礎研究は注目をあつめている. NF- $\kappa$ B経路の複雑な制御系にmiR-31が組み込まれていること, さらに, Polycombファミリーに依存的なエピジェネティックな制御がマイクロRNAを介してNF- $\kappa$ Bシグナルの制御に寄与するとい

う発見は、今後のシグナル伝達の研究に対し大きく貢献するものと考えられる。

2つ目は、PolycombファミリーはマイクロRNAの発現を制御することにより、より多くの遺伝子の発現につき転写および翻訳の段階において影響力をもつ可能性のあることである。また、Polycombファミリー自体も複数のマイクロRNAにより制御されていることがわかっている。現に、成人T細胞白血病においてはEZH2を抑制するマイクロRNAが減少していた。

3つ目は、Polycombファミリーによる標的配列の認識機構の一端を明らかにしたことである。PRC2による標的配列の認識はYY1だけでは説明できないことは複数の研究により示されているが、miR-31のようにYY1結合配列の蓄積という特殊なケースが細胞に対する影響力の大きい可能性がある。

4つ目は、シグナルのクロストークと細胞の正常機能についてである。この研究で得られた知見はそれぞれの鍵となる因子の異常な挙動を指標として明らかになったが、それぞれの因子は元来、細胞の恒常性や正常機能に重要であると考えられる。がん研究から得られた知見がより基礎的および臨床的な理解に貢献することを期待したい。

最後に、miR-31の成人T細胞白血病に対する分子標的薬としての応用の可能性が示されたといえる。今後の研究により実用化が可能となれば、成人T細胞白血病のみならず同様の分子病態を示すがんの新たな治療法の開発の先例となる可能性がある。

## 文献

1. Iwanaga, M., Watanabe, T., Utsunomiya, A. et al.: **Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) proviral load and disease progression in asymptomatic HTLV-1 carriers: a nationwide prospective study in Japan.** Blood, 116, 1211-1219 (2010)[PubMed <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20448111>]
2. Watanabe, M., Ohsugi, T., Shoda, M. et al.: **Dual targeting of transformed and untransformed HTLV-1-infected T cells by DHMEQ, a potent and selective inhibitor of NF- $\kappa$ B, as a strategy for chemoprevention and therapy of adult T-cell leukemia.** Blood, 106, 2462-2471 (2005)[PubMed <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15956280>]
3. Saitoh, Y., Yamamoto, N., Dewan, M. Z. et al.: **Overexpressed NF- $\kappa$ B-inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells.** Blood, 111, 5118-5129 (2008) [PubMed <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18305221>]
4. Valastyan, S., Reinhardt, F., Benaich, N. et al.: **A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis.** Cell, 137, 1032-1046 (2009)[PubMed <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19524507>]
5. Simon, J. A. & Kingston, R. E.: **Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns.** Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 10, 697-708 (2009)[PubMed <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19738629>]

## 著者プロフィール

山岸 誠 (Makoto Yamagishi)

略歴：2009年 東京大学大学院新領域創成科学研究科 修了，同年 エイズ予防財団 リサーチレジデントを経て，2011年より東京大学大学院新領域創成科学研究科 特任研究員。

研究テーマ：白血病およびリンパ腫における分子病態，とくに，エピジェネティクス，マイクロRNA，シグナル伝達，HIVの潜伏化の分子機構。

関心事：腫瘍細胞および正常細胞におけるエピジェネティクス，マイクロRNA，シグナル伝達系のクロストーク。基礎研究から発信する情報を臨床ヘフィードバックすることをめざしたい。

## 渡邊 俊樹 (Toshiki Watanabe)

東京大学大学院新領域創成科学研究科 教授

研究室URL：<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/lcbb-mgs/>

