

201220051A

厚生労働省科学研究費補助金  
第3次対がん総合戦略研究事業  
(H23-3 次がん一般-010)

細胞接着・運動性経路を標的とした  
ATL 細胞の浸潤・増殖抑制医薬品開発  
のための基礎研究

平成24年度 **総括研究** 報告書

研究代表者 村上 善則

平成25 (2013) 年3月

厚生労働省科学研究費補助金  
第3次対がん総合戦略研究事業  
(H23-3 次がん一般-010)

細胞接着・運動性経路を標的とした  
ATL 細胞の浸潤・増殖抑制医薬品開発  
のための基礎研究

平成24年度 研究総括報告書

研究代表者 村上 善則

平成25（2013）年3月

## 目 次

I.	研究組織	4
II.	総括研究報告 細胞接着・運動性経路を標的とした ATL 細胞の浸潤、 増殖抑制医薬品開発のための基礎研究	5
	村上 善則	
III.	分担研究報告	
1.	臨床的解析	17
	内丸 薫	
2.	病理学的解析	24
	後藤 明輝	
IV.	研究成果の刊行に関する一覧表	31
V.	研究成果の刊行物・印刷	37

## 研究組織

研究代表者：

村上善則

東京大学医科学研究所 人癌病因遺伝子分野

研究分担者：

内丸 薫

東京大学医科学研究所附属病院 血液腫瘍科

後藤明輝

秋田大学大学院医学系研究科 器官病態学講座

研究協力者：

渡邊俊樹

東京大学大学院新領域創成科学研究科

病態医療科学分野

I. 総括研究報告書

村上 善則

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

（総括・分担）研究報告書

細胞接着・運動性経路を標的とした ATL 細胞の浸潤、増殖抑制医薬品開発のための  
基礎研究

研究代表者 村上 善則 東京大学教授

研究要旨

ATL で特徴的な発現を示す細胞接着分子 TSLC1/CADM1 に注目し、ATL 特異的分子経路の同定と、この経路の障害による浸潤、増殖抑制医薬品の開発を目指して基礎研究を行った。本年度は前年度に CADM1 の下流で見出した PI3K 経路をさらに解析し、AKT, RAC1 が CADM1 の下流で活性化すること、AKT, RAC1 阻害剤が CADM1 を介した細胞運動、伸長を相乗的に抑制することを見出し、CADM1-PI3K 経路が ATL の浸潤、増殖抑制の標的分子経路となる可能性を示した。

A. 研究目的

ATL で異所性発現を示す細胞接着分子 TSLC1/CADM1 に注目し、ATL の特異的分子経路の異常の同定と、これを標的として ATL の浸潤、増殖能を抑制する新規治療法の開発を目的とし、1) ATL における CADM1 経路の解明と新規分子標的の同定、2) CADM1 経路を障害し ATL の浸潤能を抑制する低分子化合物の同定と評価、3) CADM1, Tiam1 等の発現を抑制する miRNA の同定と核酸医薬としての評価、の3課題を行う。

B. 研究方法

1. CADM1 経路の障害による ATL 細胞の浸潤、増殖抑制低分子化合物：

固相化 CADM1 細胞外ドメインに CADM1

発現 MDCK 細胞を重層し、細胞伸長を指標とする検定法を用い、これに既知の低分子阻害化合物を加えることにより、細胞伸長の障害の有無を検討した。

2. ATL 特異的な CADM1 下流分子経路、並びに糖鎖修飾の解析：

CADM1 の下流分子経路は 1. の阻害剤の活性に基づき同定した。また ATL 細胞における CADM1 の新規結合タンパク質の検索は、細胞内に存在する PDZ 結合モチーフに注目した候補分子法、酵母 2 ハイブリッド法、CADM1 発現細胞の抽出物の抗 CADM1 抗体による免疫沈降物の質量分析により行った。

3. ATL で発現する CADM1 の N, O-糖鎖

修飾の実態解明：

CADM1 に特徴的な糖鎖構造は、CADM1 を過剰発現する ATL 細胞の抽出物から抗体を用いた免疫沈降により濃縮した CADM1 タンパク質、または免疫グロブリン Fc ドメインと融合させ分泌型に改変した CADM1 細胞外ドメインを当該細胞に発現させ、培養上清をカラムにて精製したタンパク質を用いた行った。即ち、タンパク質をトリプシンで消化し、島津製作所と共同研究により、質量分析法により構造を決定した。

#### 4. CADM1 経路分子の発現を抑制する

RNA の核酸医薬としての評価：

前年度までに得られた CADM1 の発現を抑制する miR-214, miR-375 の生物学的機能は、CADM1 を発現するがん細胞への導入による壁非付着性増殖能、CADM1 をほとんど発現しないがん細胞への miRNA inhibitor の導入による *in vitro* での創傷治癒能を検証することにより、確認した。

### C. 研究結果

#### 1. CADM1 経路の阻害による ATL 細胞の

浸潤、増殖抑制低分子化合物の同定：

固相化 CADM1 細胞外断片上に、CADM1 発現 MDCK 細胞を重層し、その伸長性を指標として CADM1 経路の活性を評価し、この系に低分子化合物を添加することにより、その伸長反応を阻害の有無を検討した。この結果、前年度までに 2 種の PI3K 阻害剤の添加により、それぞれ、CADM1 経路

の活性化による細胞伸長が抑制されることが示された。そこで本年度は、さらに PI3K の下流を同法により検索し、AKT 阻害剤、RAC1 阻害剤がそれぞれ部分的に CADM1 を介する細胞伸長反応を阻害し、両者を同時に加えると、PI3K 阻害剤と同等の完全な伸長反応抑制効果を示すことを見出した。

#### 2. ATL 特異的な CADM1 下流分子経路の解析：

前年度までの研究により、CADM1 の新規下流分子候補として PI3K を同定し、その細胞内領域の結合タンパク質として、MPP3、DLG を同定した。そこで、本年はこの CADM1-MPP3-DLG 複合体が PI3K p85 ユニットと結合することを免疫沈降・ウェスタンブロット法にて検討し、少なくとも PI3K p85 と DLG, MPP3 とが同一のタンパク質複合体を形成することを見出した。この CADM1-MPP3-DLG-PI3K p85 のタンパク複合体は、固相化 CADM1 細胞外ドメイン上に重層した CADM1 強制発現 MDCK 細胞の、細胞辺縁の伸長部位で特に認められる。本年度はさらに、PI3K の下流に AKT、並びに RAC1 が存在して活性化を受けることを示した（論文投稿中）。

一方、細胞抽出液の抗 CADM1 抗体による免疫沈降物の質量分析からは、新規 CADM1 結合タンパク質候補として、Csk binding protein (Cbp) を同定し、細胞の脂質ラフ分画に、CADM1, Cbp, SRC が存在することを示した。

3. ATLで発現する CADM1 の N, O-糖鎖修飾の実態解明 :

前年度は、ヒト胎児腎由来 HEK293 細胞に発現させた分泌型 CADM1 タンパク質における N-型糖鎖修飾を質量分析法にて解析し、N-型糖鎖としては4分岐構造をもつ糖鎖が主な構成要素であることを見出した。今年度は、培養 ATL 細胞の抽出物の免疫沈降物に含まれる CADM1 タンパク質について質量分析を行った。この結果、ATL 細胞では、上記4分岐構造の N-型糖鎖は多くは認められず、他の N-型糖鎖構造が認められた。

4. CADM1 経路分子の発現を抑制する RNA の同定と核酸医薬としての評価 : さらに、miR-214, miR-375 をがん培養細胞に導入すると、CADM1 タンパク質の発現が低下した。そこで、miR-214 をがん細胞に導入すると、軟寒天培地中コロニー形成能が亢進した。一方、CADM1 の発現を示すがん細胞に miR-214, miR-375 の inhibitor を導入すると、*in vitro* での創傷治癒活性が低下した (論文発表 1)。

D. 考察

CADM1 は大部分の上皮では、上皮様細胞形態の形成、維持に関わり、がん抑制遺伝子として機能する一方、ATL では CADM1 が異所性に発現し (Sasaki *et al*, Blood, 2005)、細胞内で、Tiam1 分子と結合し、低分子量 G タンパク質 RAC を活性化し、

ATL 細胞の *in vitro* での運動性、浸潤性、血管内皮細胞や間質細胞への接着性を亢進することを報告してきた (Masuda *et al*, JBC, 2010)。そこで本研究では、ATL における CADM1 の機能を抑制し、ATL に特徴的な臓器浸潤を抑制する医薬品開発の基礎とすることを目的として、CADM1 の機能を阻害する低分子化合物の同定、下流分子経路の解析、糖鎖修飾、CADM1 の発現を抑制する siRNA, miRNA について、各々分子標的としての意義を明らかにする基礎的検討を行った。

CADM1 分子経路に関しては、先行研究により、CADM1 の細胞外領域と免疫グロブリン Fc 領域の融合タンパク質を発現、精製し、培養プレート上に固相化した上に、CADM1 発現細胞を重層し、細胞の接着と形態変化を指標として、CADM1 分子経路の活性を測定するアッセイ系を確立している。この系を用いて初年度は、102 種類の阻害作用既知の低分子化合物を検索することにより、2 種の PI3 キナーゼの阻害剤が、CADM1 により細胞伸展反応を阻害すること、CADM1、MPP3、DLG、p85 (PI3K) の分子経路を新たに見出した。そこで、本年度は PI3 キナーゼのさらに下流経路を検索し、既知の PI3K 分子経路上にある AKT, RAC1 の阻害剤が、それぞれ細胞伸長活性を部分的に抑制すること、また両者の同時投与により PI3K と同程度に細胞伸長活性を抑制することを示した。従って、今後は PI3K, AKT, RAC1 の阻害剤を組み合わせることによる治療効果や、各分子の siRNA,



miRNA による治療の可能性を探る必要があると考えられる。

CADM1糖鎖解析に関しては、初年度の研究で、上皮細胞HEK293細胞に発現するCADM1について、4分岐型N-型糖鎖修飾が特徴的であることを見出したが、本年度はATL細胞から免疫沈降法にて濃縮したCADM1タンパク質を用いて同様の解析を行い、ATL細胞では上皮細胞とは異なる糖鎖修飾を見出した。これらの糖鎖を標的とした、ATLに対するヒト化抗体の治療を検討する必要があると思われる。

CADM1の発現を抑制するmiRNAについても初年度に見出した候補miRNAであるmiR-214, miR-375に、CADM1の発現抑制と、それを介したがん細胞の増殖、運動性抑制機能が見出されたことから、これらのmiRNAやsiRNAをCADM1の発現抑制によるATL細胞治療の核酸医薬の候補分子として捉えて、解析を進める予定である。

#### E. 結論

ATLの浸潤抑制の標的分子としてCADM1下流のPI3K、AKT、RAC1を同定した。またCADM1に特徴的な糖鎖構造を見出した。さらにCADM1の発現を抑制するmiRNAとしてmiR-214、miR-375に細胞の運動性や増殖性を修飾する機能を見出した。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Ishimura M, Sakurai-Yageta M, Maruyama T, Ando T, Fukayama M, Goto A, Murakami Y. Involvement of miR-214 and miR-375 in malign. ant features of non-small-cell lung cancer by down-regulating CADM1. *J Cancer Therapy*, 3:379-387, 2012. (DOI: 10.4236/jct.2012.324050)
2. Matsubara D, Kishaba Y, Ishikawa S, Sakatani T, Oguni S, Tamura T, Hoshino H, Sugiyama Y, Endo S, Murakami Y, Aburatani H, Fukayama M and Niki T. Lung cancer with loss of BRG1/BRM, shows epithelial mesenchymal transition phenotype and distinct histologic and genetic features. *Cancer Sci*, 104: 266-273, 2013. (DOI: 10.1111/cas.12065)
3. Matsubara D, Kanai Y, Ishikawa S, Ohara S, Yoshimoto T, Sakatani T, Oguni S, Tamura T, Kataoka H, Endo S, Murakami Y, Aburatani H, Fukayama M. and Niki T. Identification of CCDC6-RET fusion in the human lung adenocarcinoma cell line, LC-2/ad. *J Thorac Oncol*, 7: 1872-1876, 2012. (DOI:

- 10.1097/JTO.0b013e3182721ed1)
4. Ito A, Mimae T, Yamamoto Y-S-Z, Hagiyaama M, Nakanishi J, Ito M, Hosokawa Y, Okada M, Murakami Y, and Kondo T. Novel application for pseudopodia proteomics using excimer laser ablation and two-dimensional difference gel electrophoresis. *Lab Invest*, 92:1374-1385, 2012. (DOI: 10.1038/labinvest.2012.98.)
  5. Nakata H, Wakayama T, Adthapanyawanich K, Nishiuchi T, Murakami Y, Takai Y, Iseki S. Compensatory upregulation of myelin protein zero-like 2 expression in spermatogenic cells in cell adhesion molecule-1-deficient mice. *Acta Histochem Cytochem* 45:47-56. 2012. (DOI: 10.1267/ahc.11057)
  6. Kikuchi S, Iwai M, Sakurai-Yageta M, Tsuboi Y, Ito T, Masuda T, Tsuda H, Kanai Y, Onizuka M, Sato Y, and Murakami Y. Expression of a splicing variant of the CADM1 specific to small cell lung cancer. *Cancer Science*, 103, 1051-1057, 2012. (DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.02277.x.)
  7. Ito A, Ichiyanagi N, Ikeda Y, Hagiyaama M, Inoue T, Kimura KB, Sakurai MA, Hamaguchi K, Murakami Y. Adhesion molecule CADM1 contributes to gap junctional communication among pancreatic islet  $\alpha$ -cells and prevents their excessive secretion of glucagon. *Islets*, in press.
  8. Mimae T, Okada M, Hagiyaama M, Miyata Y, Tsutani Y, Inoue T, Murakami Y, Ito A. Notch2 and Six1 are up-regulated during progression of early-stage lung adenocarcinoma and define its unfavorable subset at advanced stages. *Clinical Cancer Research*, 18, 945-948, 2012. (DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1946)
  9. Nagara Y, Hagiyaama M, Hatano, N, Futai, E, Suo S, Takaoka Y, Murakami Y, Ishiura S, and Ito A. Tumor suppressor cell adhesion molecule 1 (CADM1) is cleaved by A disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) and subsequently cleaved by gamma-secretase complex. *Biochem Biophys Res Commun*, 417:462-467, 2012. (DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.11.140.)
  10. Takahashi Y, Iwai M, Kawai T, Arakawa A, Ito T, Sakurai-Yageta M, Ito A, Goto A, Saito M, Kasumi F, and Murakami Y. Aberrant expression of tumor suppressors, CADM1 and 4.1B, in invasive lesions of primary breast cancer. *Breast Cancer*, 19:242-252, 2012. (DOI: 10.1007/s12282-011-0272-7.)

11. Nagata M, Sakurai-Yageta M, Yamada D, Goto A, Ito A, Fukuhara H, Kume H, Morikawa T, Fukayama M, Homma Y, and Murakami Y. Aberrations of a cell adhesion molecule CADM4 in renal clear cell carcinoma. *Int J Cancer*, 130:1329-1337, 2012. (DOI: 10.1002/ijc.26160.)
2. 学会発表
1. Yoshinori Murakami. Roles of a cell adhesion molecule CADM1 in malignant progression of non-small cell lung cancer. The 3<sup>rd</sup> Joint Symposium of the Max-Planck Society and University of Tokyo Graduate School of Medicine. 2013年3月8日、東京、日本。
  2. Takeshi Ito, Hideki Kuwano, Mika Sakurai-Yageta, Yumi Tsuboi, Daisuke Matsubara and Yoshinori Murakami. Roles of a cell adhesion molecule CADM1 in malignant progression of non-small cell lung cancer. The 19<sup>th</sup> International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research. 2013年2月14日、鹿児島市、日本。
  3. Yoshinori Murakami, Masanao Miwa, Hideo Tanaka, Masakazu Yamamoto and Puangrat Yongvanit. Towards the control of cholangiocarcinoma by international collaboration between Thailand and Japan. The International Symposium on Cholangiocarcinoma, Tokyo, 2013. 2013年2月8日、東京都、日本。
  4. Yoshinori Murakami. Roles of a cell adhesion molecule CADM1 in malignant progression of non-small cell lung cancer. The 2<sup>nd</sup> France-Japan Cancer Workshop, 2012年11月30日、鳴門市、日本。
  5. Yoshinori Murakami. Dual roles of a cell adhesion molecule, CADM1, in human oncogenesis. The 18<sup>th</sup> International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research. 2012年6月29日、ウルム市、ドイツ。
  6. Takeshi Ito, Masayoshi Nagata, Taketo Kawai, Tomoko Maruyama, Hiromi Ichihara, Mika Sakurai-Yageta, Akihiko Ito, Akiteru Goto, and Yoshinori Murakami. *Cadm1* suppresses the progression of lung adenocarcinoma initiated by *K-ras* mutation. International Student Research Forum 2012. 2012年8月15日、オマハ市、ネブラスカ州、米国。
  7. Hiroki Nakaoka, Yumi Tsuboi, Mika Sakurai-Yageta, Yoshinori Murakami. Analysis of a mechanism to stabilize tumor suppressor protein CADM1. International Student Research Forum 2012. 2012年8月15日、オマ

- ハ市、ネブラスカ州、米国。
8. Yoshinori Murakami, Mika Sakurai, Takeshi Ito, Hideki Kuwano, Daisuke Matsubara, Akiteru Goto. Dual roles of a cell adhesion molecule, CADM1, in human lung oncogenesis based on the molecular pathological analyses. The 9<sup>th</sup> AACR-JCR Joint Conference of Cancer Research. マウイ市、米国ハワイ州、2013年2月24日。
  9. Mika Sakurai-Yageta and Yoshinori Murakami. The oncogenic role of a cell adhesion molecule, CADM1, in adult T-cell leukemia and small cell lung cancer. The 19<sup>th</sup> International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research. 2013年2月14日、鹿児島市、日本。
  10. Yumi Tsuboi, Masaaki Oyama, Hiroko Kozuka-Hata, Akihiko Ito, Yoshinori Murakami. Analysis of cell adhesion molecule 1 (CADM1)-mediated inactivation of c-Src pathway. The 19<sup>th</sup> International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research. 2013年2月14日、鹿児島市、日本。
  11. Takeshi Ito, Masayoshi Nagata, Taketo Kawai, Tomoko Maruyama, Hiromi Ichihara, Mika Sakurai-Yageta, Akihiko Ito, Akiteru Goto and Yoshinori Murakami. Analysis of the role of CADM1 in suppression of lung cancer using *Cadm1*-deficient mice. The 19<sup>th</sup> International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research. 2013年2月14日、鹿児島市、日本。
  12. Mika Sakurai-Yageta, Tomoko Maruyama, Megumi Ishimura, Mari Masuda, Yoshinori Murakami. Analysis of CADM1 molecule and its cascade as a potential target for diagnosis and treatment of adult T-cell leukemia. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections. 2013年1月24日、東京都、日本。
  13. Hiroyuki Kogai, Mika Sakurai-Yageta, Yoshinori Murakami. The role of CADM1 in suppression of cancer cell metastasis as a new type of dependence receptor (DR). Annual Meeting of American Society of Cell Biology. 2012年12月15日、サンフランシスコ市、米国カリフォルニア州。
  14. Mika Sakurai-Yageta, Tomoko Maruyama, Kaoru Kaneshiro, Sadanori Sekiya, Shinichi Iwamoto, Koichi Tanaka and Yoshinori Murakami. The 19<sup>th</sup> International Mass Spectrometry Conference. 2012年9月18日、京都市、日本。
  15. 桑野秀規、中島淳、村上善則、ヒト肺腺がんのゲフィチニブ耐性機構におけ

- る細胞接着分子 CADM1 の意義、第 9 回東京呼吸器リサーチフォーラム、2012 年 11 月 14 日、東京都
16. Hideki Kuwano and Yoshinori Murakami. A cross talk between a cell adhesion molecule, CADM1, and signaling pathways of a growth factor receptor. The 6<sup>th</sup> Retreat Meeting of the IMSUT & RCAST Global COE in OIST. 2012 年 11 月 5 日、沖縄
17. Yuki Hanaoka-Ikeda and Yoshinori Murakami. The role of CADM1 on inflammatory epithelial cells in large intestine of ulcerative colitis. The 6<sup>th</sup> Retreat Meeting of the IMSUT & RCAST Global COE in OIST. 2012 年 11 月 5 日、沖縄
18. Hiroyuki Kogai, Mika Sakurai-Yageta and Yoshinori Murakami. The role of CADM1 in suppression of cancer cell metastasis as a new type of dependence receptor, The 6<sup>th</sup> Retreat Meeting of the IMSUT & RCAST Global COE in OIST. 2012 年 11 月 5 日、沖縄
19. Yoshinori Murakami, Mika Sakurai, Takeshi Ito, Hideki Kuwano, Daisuke Matsubara, and Akiteru Goto. Dual roles of a cell adhesion molecule, CADM1, in human lung oncogenesis based on the molecular pathological analyses. 第 71 回日本癌学会学術総会、シンポジウム、2012 年 9 月 21 日、札幌市
20. Mika Sakurai-Yageta, Tomoko Maruyama, Megumi Ishimura and Yoshinori Murakami. Analysis of the structures and functions of *N*-glycans on a cell adhesion molecule, CADM1, in various cancer cells. 第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 21 日、札幌市、日本
21. Hideki Kuwano, Miwako Iwai, Taketo Kawai, Takeshi Ito, Mika Sakurai-Yageta, Akiteru Goto, Jun Nakajima, Kenji Tamura and Yoshinori Murakami. Possible involvement of a cell adhesion molecule, CADM1 in acquired resistance of lung adenocarcinoma to EGFR-TKIs. 第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 21 日、札幌市
22. Takeshi Ito, Masayoshi Nagata, Taketo Kawai, Tomoko Maruyama, Hiromi Ichihara, Mika Sakurai-Yageta, Akihiko Ito, Akiteru Goto, and Yoshinori Murakami. Analysis of the role of *CADM1* in suppression of lung cancer development using *Cadm1*-deficient mice. 第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 21 日、札幌市、日本
23. Hiroyuki Kogai, Mika Sakurai-Yageta and Yoshinori Murakami. The role of CADM1 in suppression of cancer cell metastasis

as a new type of dependence receptor.

第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 21 日、札幌市、日本

24. 村上善則。がんの浸潤、転移と上皮間葉転換。第 101 回日本病理学会、シンポジウム。2012 年 4 月 27 日、東京都

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得：なし。
2. 実用新案登録：なし

## II. 分担研究報告書

内丸 薫

後藤 明輝

厚生労働省科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略事業）

分担研究報告書

細胞接着・運動性経路を標的とした ATL 細胞の浸潤、増殖抑制医薬品開発のための基礎研究

分担研究者 内丸 薫 所属 東京大学医科学研究所附属病院血液内科 准教授  
研究協力者 小林誠一郎 東京大学医科学研究所附属先端医療研究センター助教  
中野和美 東京大学大学院新領域創成科学研究科 助教  
渡邊俊樹 東京大学大学院新領域創成科学研究科 教授

研究要旨

HTLV-1 キャリア、indolent～aggressive ATL 患者において末梢血 CD4 陽性細胞の CD7/CADM1 発現を解析することにより HTLV-1 キャリアの段階から CD7dim/CADM1positive、CD7negative/CADM1positive の集団としてすでに ATL としての基本的な性格を持つ細胞集団が出現、増加することを明らかにした。CADM1 発現の HTLV-1 感染細胞腫瘍化における意義、またこれらの集団に対する CADM1 阻害剤の効果の検討が今後の課題として重要である。

A. 研究目的

昨年度我々は CD7、CADM1 の発現を flow cytometry により解析することにより、CD7negative/CADM1positive の細胞集団として非常に高純度に ATL 細胞が純化できる可能性を示すとともに、本解析（第2世代 HAS）により検出される CD7 positive/CADM1negative (P)、CD7dim/CADM1positive (D)、CD7negative/CADM1 positive (N) の3つの集団が無症候性キャリア (AC) から indolent ATL、aggressive ATL と病態が進行するにつれその比率が変化し、次第に D、N が増加してくること、これ

らの D、N は monoclonal に増殖している集団と考えられることなどを明らかにしてきた。今年度はこれらの集団の解析を進めてその character を明らかにするとともに、HTLV-1 感染細胞の腫瘍化過程の解明、CADM1 を target とする治療の可能性などを検討することを目的とした。

B. 研究方法

当科に通院、入院中の HTLV-1 キャリア、ATL くすぶり型、慢性型、急性型合わせて 59 例を対象に末梢血単核球を分離後、APC-CD7、APC-Cy7-CD3、Pacific Blue-CD4、Pacific Orange-CD14 に biotin



化抗 TSLC1 抗体を加え PE-storeptavidin で染色し FACS Aria で解析した。CD14 で単球をゲートアウトした後、CD3/4 で CD4 陽性 T 細胞にゲートをかけ、CD7/TSLC1 でプロットした。これにより検出される P、D、N の集団を sorting し、各集団を対象に HTLV-1 プロウイルス量を real time PCR で定量し、また 1 例において HTLV-1 FISH によって各集団の HTLV-1 感染細胞の純度を検討した。また、キャリア 2 例、くすぶり型 2 例、慢性型 1 例、急性型 3 例および健康人コントロール 3 例の末梢血サンプルを用いて CD7/TSLC1 発現により CD7(+)/TSLC1(-)(=P)、CD7dim/TSLC1(+)(=D)、CD7(-)/TSLC1(+)(=N) の 3 群をソーティングし RNA を抽出、Agilent 社の 44K Whole Human Genome Oligonucleotide Microarray を用いて発現解析を行いクラスター解析を行うことでこれらの集団の遺伝子発現プロファイリングを行った。また sorting した P、D、N の各集団において miR31 の発現を micro RNA assay により行い、Helios mRNA の splicing pattern を RT-PCR により解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は臨床研究に関する倫理指針に則り東京大学医科学研究所倫理委員会の審査承認(承認番号 22-3-0518、24-34-1004)のもとに被験者から文書による説明と同意を得て遂行された。

## C. 研究結果

Real time PCR の結果 P の集団の HTLV-1 感染細胞は数%程度であるのに対して D、N の集団は 80%以上、多くの症例ではほぼ 100%と考えられ、また HTLV-1 provirus 全長を probe とする FISH でも D、N は陽性細胞が 91.4%、83.3% で sorting に伴う技術的限界を考えるとほとんどの細胞が HTLV-1 感染細胞と考えられた。D、N の比率が増加し、末梢血中 HTLV-1 プロウイルス量が多い high risk と考えられるキャリア、indolent ATL、aggressive ATL の P、D、N の集団を sorting してマイクロアレイにより遺伝子発現クラスター解析を行ったところ A) 急性型 ATL の N、B1) indolent ATL、キャリアの D と N、B2) 健康人コントロール、キャリア、indolent ATL の P の 3 つのクラスターに分画された。またこれらの各集団において miR31 の発現を定量したところ D の集団は P に比べて 2 log ほど発現レベルが低下しており、N でさらに低下するのが認められた。また Helios mRNA の発現の解析の結果 D、N の集団では主に splicing variant である Hel-2 が発現していた。

## D. 考察

Flow cytometry による CD7/CADM1 の解析により、無症候性キャリアのうち末梢血中プロウイルス量が高く、異常リンパ球比率が高めの症例で増加してくる CD7 dim/CADM1 positive(D)、CD7 negative/CADM1 positive(N) の集団はほとんどが HTLV-1 感染細胞で高純度に感染細胞が濃縮

された集団であった。これまでの検討で明らかにして来たようにこれらの集団ではclonalな増殖が始まっているが、遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイで解析した結果

indolent ATLのD、Nと同一クラスターに分類された。最近aggressive ATLの腫瘍細胞においてmiR31の発現が著明に低下していること、Ikaros family 遺伝子群にsplicing異常がみられ、variant mRNAが発現していることが報告され、これらはATL発症のhallmarkになり得る新規のマーカーであるが、キャリアのD、N集団においてもmiR31の発現は著明な低下を示し、variant型のHeliosの発現が主となっていた。これらの知見は一部のキャリアで増加しているD、Nの集団は既にATLとしての基本的な性格を持っていることを示唆し、これがCADM1の発現と同時に現れることから、CADM1そのものがHTLV-1感染細胞の腫瘍化に深い関わりを持つ可能性を示唆する。また、これらの集団はCADM1陽性の集団であり、CADM1をターゲットにした治療によりこれらの細胞がよりaggressiveなphenotypeに進展するのを防ぐことが可能であれば、D、N集団が増加しているhigh riskと考えられるキャリアに対してearly interventionを行うことによりaggressive ATLへの進展を防ぐことができる可能性がある。Aggressive ATLの治療が困難を極めることを考慮すると重要なアプローチとなる。

今後、D、N集団へのCADM1のshRNA

導入による影響、CADM1の低分子阻害剤のこれらの集団への効果などの検討が課題になってくると考えられる。

#### E. 結論

HTLV-1 感染 CD4 陽性細胞におけるCD7/TSLC1 発現の解析により一部の症例でキャリアの段階から増加が認められる CD7dim/CADM1positive(D)、CD7negative/CADM1positive(N)の集団は遺伝子発現プロファイル上 indolent ATL とほとんど区別できないものであり、これらの集団を解析することにより CADM1 のHTLV-1 感染細胞の腫瘍化過程への関与、CADM1 低分子阻害剤の aggressive ATL 発症予防効果の検討につながると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1.論文発表

1. Ishigaki T, Isobe M, Kobayashi S, Yuji K, Ohno N, Watanabe N, Tojo A and Uchimaru K. Development of peripheral T-cell lymphoma not otherwise specified in a HTLV-1 carrier. Int J Hematol. in press DOI 10.1007/s12185-013-1314-z

2. Kobayashi S, Tian Y, Ohno N, Yuji K, Ishigaki T, Isobe M, Ohfuchi-Tsuda M, Oyaizu N, Watanabe E, Watanabe N, Tani K, Tojo A and Uchimaru K. The CD3

versus CD7 plot in multicolor flow cytometry reflects progression of disease stage in patients infected with HTLV-I. PLoS One 8: e53728, doi:10.1371/journal.pone.0053728, 2013

## 2.学会発表

1. 小林誠一郎、中野和民、渡辺恵理、石垣知寛、大野伸広、渡辺信和、東條有伸、内丸 薫 : 患者検体を用いた CD7 と TSLC1/CADM1 の FACS 解析は ATL の多段階発癌を反映する 第 1 回 ATL シンポジウム 東京 2011

2. 石垣知寛、小林誠一郎、大野伸広、渡辺恵理、田野崎隆二、渡辺信和、東條有伸、内丸 薫 : TSLC1/CD7 を用いた造血細胞移植後の ATL 細胞のモニタリング 第 5 回 HTLV-1 研究会 2011 東京

3. 矢持忠徳、守田洋平、矢持淑子、佐々木陽介、渡辺信和、Sanaz Firouzi、内丸 薫、宇都宮與、渡邊俊樹 : 成人 T 細胞白血病における tumor initiating cell の探索の試み 第 5 回 HTLV-1 研究会 2012 東京

4. 大野伸広、田野崎隆二、小林誠一郎、石垣知寛、渡辺信和、内丸 薫 : 同種造血幹細胞移植を見据えた ATL の治療戦略:その後方視的解析 第 5 回 HTLV-1 研究会 2011 東京

5. 笹島悟史、中野和民、内丸 薫、渡邊俊

樹 : 成人 T 細胞白血病(ATL)における新規 TIAM2 変異体の同定と遺伝子発現の解析 第 5 回 HTLV-1 研究会 2012 東京

6. Makoto Yamagishi, Ryutaro Takahashi, Kazumi Nakano, Satomi Asanuma, Atae Utsunomiya, Kazunari Yamaguchi, Kaoru Uchimaru, Seishi Ogawa, and Toshiki Watanabe :Molecular Hallmarks of Adult T cell Leukemia: miRNA, Epigenetics, and Emerging Signaling Abnormalities 第 74 回日本血液学会学術集会 2012 京都

7. Seiichiro Kobayashi, Eri Watanabe, Tomohiro Ishigaki, Nobuhiro Ohno, Koichiro Yuji, Yukio Tsukada, Akihiro Ohmoto, Naoki Shimada, Nobukazu Watanabe, Arinobu Tojo and Kaoru Uchimaru:CD7 vs CADM1 in FACS reflects multi-step oncogenesis of ATL and discriminates HTLV-1 infected cells. 第 74 回日本血液学会学術集会 2012 京都

8. 石垣 知寛、小林誠一郎 (、大野伸広、田野崎隆二、渡辺信和、内丸薫、東條有伸、中内啓光 : Monitoring ATL cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with CADM1 and CD7. 第 74 回日本血液学会学術集会 2012 京都

9. 大野伸広、小林誠一郎、渡辺信和、石垣知寛、湯地晃一郎、東條有伸、内丸薫: CD3

と CD7 の展開による急性型 ATL 細胞の同定：治療後の CD3dimCD7(-)分画のフローナリテイ解析第 74 回日本血液学会学術集会 2012 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許出願番号 特願 2013-034326

名称 患者検体を用いた HTLV-1 キャ

リア、成人 T 細胞白血病の発癌過程進行度又は悪性度の評価法

発明者 内丸 薫、小林誠一郎、渡辺 信和

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし