

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、この経路の阻害による浸潤、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 経路を阻害し 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 経路の阻害による 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、細胞伸長の阻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 α -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 3rd 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 19th 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 2nd 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 18th 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 9th 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 19th 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 19th 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 19th 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 19th 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 6th 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 6th 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 6th 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

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)、CD7 negative/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 Uchimar, 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 Uchimar: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ィ解析第 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

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

研究分担者 後藤 明輝 秋田大学大学院教授

研究要旨：

ATL で異所性発現を示す細胞接着分子 TSLC1/CADM1 に注目した医薬品の開発が妥当であるか、ATL 症例の病理検体を用いた実証的検討をめざし、秋田県内 ATL 症例の収集、TSLC1/CADM1 の免疫組織化学的検討を行った。

E. 研究目的

本研究の目的は、ATL の浸潤、増殖能を抑制する新規治療法の開発である。ターゲットとする分子あるいは経路が実際の ATL 症例で機能しているかを ATL 症例の病理検体を用いて検証する必要がある。とくに、本研究で着目する TSLC1/CADM1 系については、西南日本 ATL 症例ではすでにその異常が T 細胞癌化に関与することが示されているが、日本海側東北地方のような、他の ATL 好発地域での症例でどうなのか、現在までのところ知見が得られていない。そこで、研究分担者（後藤）は、秋田県内の ATL 症例を病理学的に検討するとともに、TSLC1/CADM1 異常がみられるかを検討し、本研究で提案される新規治療法が広く ATL 症例に有効であると予想されるか否かを検証することを目的として研究を行

う。

また、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を総括研究者（村上）と協力して行った。

F. 研究方法

1. 秋田県 ATL 症例の病理学的検討：

秋田県内主要病院での 1990 年より 2010 年にかけての 20 年にわたる解剖例を参照し、その臨床病歴より ATL 病型を分類するとともに、各種の臨床病理学的因子を検索し、その特徴を明らかとする。また、病理解剖結果をもとに、ATL 進展の特徴を明らかとする。

2. 秋田県 ATL 症例での TSLC1/CADM1 異常の検討：

1. で同定された ATL 症例につき、病理ブロックより切片を作成し、TSLC1/CADM1 および関連する諸分子の免疫組織化学的検討

を行い、その発現状態と異常を明らかとする。また、3.で同定されるマイクロRNAの測定を病理ブロックより行う。

3. 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：総括研究者と協力し、CADM1の発現を抑制するmiRNA候補分子は、2種のアプローチ（TargetScan、PicTar）を用いて同定した。候補miRNAがCADM1 mRNAの3'UTR配列を直接標的とすることは、ルシフェラーゼ・レポータープラスミドとmiRNA mimicを細胞に導入し、ルシフェラーゼの発現を抑制することで検証した。

G. 研究結果

1. 秋田県でのATL症例の臨床病理学的解析：

昨年度に施行した2病院（秋田大学医学部附属病院および由利組合総合病院）に引き続き、解剖例の参照を新たに市立秋田総合病院、秋田組合総合病院、山本組合総合病院の3病院で行い、新たに10例のATL症例を見出した（総計19例）。昨年度に確認した9例に同様、ATL病型の分布は全国調査とほぼ類似の傾向を示した。

2. 秋田県ATL症例でTSLC1/CADM1異常の検討：

昨年度の予備的検討として、秋田大学医学部附属病院および由利組合総合病院解剖例パラフィンブロックでは保存状態のマーカーとなるタンパクに対する免疫組織化学の結果が良好であった。したがって免疫組織化学で信頼しうる結果が

得られるものと考えられ、CADM1免疫組織化学を施行した。検討した9例のうち8例ではATL細胞にCADM1の強発現を見たが（図1）、1例（84歳男性、急性型）（図2）ではCADM1発現は陰性ないし弱陽性程度にとどまった。

図1：TSLC1/CADM1強発現ATL症例

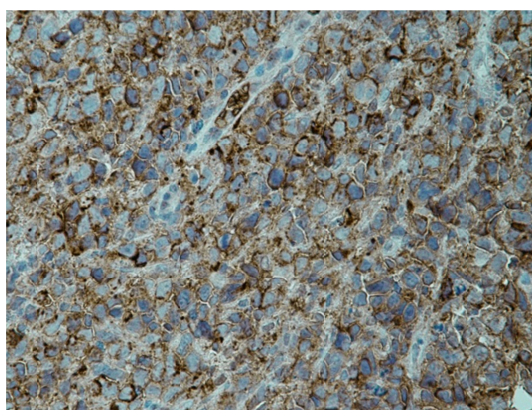
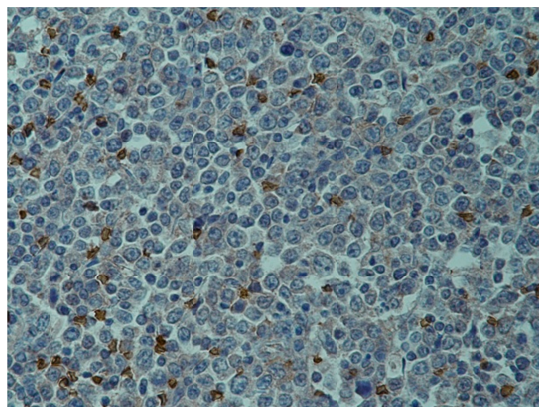


図2：TSLC1/CAD1陰性-弱陽性ATL症例



以降のマイクロRNA解析の予備的検討として、これらの各症例の病理ブロックよりRNAを抽出し、その収量および品質を評価した。半定量的PCRを用いてのマイクロRNA測定を行うには十分な収量であり、品質もA260/A280（吸光度比）が1.74から2.00と適当であった。

3. 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：総括研究者と協力し、CADM1 3'UTR 配列と直接結合し、その発現を抑制する miRNA 候補として、miR-214/199a-5p と miR-375 を同定した。

D . 考察

CADM1については、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されている (Masuda *et al*, *JBC*, 2010)。ATL発症は九州を中心とする西南日本で多いことはよく知られており、CADM1に関する知見を含め、現在までの臨床的あるいは生物学的検討の成果の多くは西南日本の症例を基礎にしたものである。一方、東日本でも、日本海沿岸で散在性にATL発症の多い地域が存在する。にもかかわらず、こうした地域と西南日本例でのATLの異同はいまだ明らかではない。したがって、本研究で提案されているTSLC1/CADM1に注目した治療法が西南日本同様、東日本の日本海沿岸地域で行うことが妥当かどうかを判断するための生物学的根拠が十分であるとはいえない。そこで本分担研究は、TSLC1/CADM1 とその関連分子、あるいは TSLC1/CADM1 抑制性 miRNA が東日本の日本海沿岸 (秋田県)で発生する ATL においても同様の異常

あるいは傾向を示すかを実証するべく、行われている。まず、秋田県内各病院の病理解剖例の参照により、昨年度 2 病院で 9 例、今年度 3 病院で 10 例 ATL 症例が同定された。この症例規模は上記の治療法の妥当性検討や病理学的研究一般のために十分な症例数が達成されたと考える。

病理解剖例を用いた分子病理学的解析として、TSLC1/CADM1 免疫組織化学を 9 例につき行った。1 例を除き、ATL 細胞に TSLC1/CADM1 の強い発現がみられた (8 例/9 例=88.9%)。この結果は、従来の臨床材料および細胞株を用いた検討の結果を裏付ける。同時に TSLC1/CADM1 系については、西南日本 ATL 症例も日本海側東北地方の ATL 症例も同様の傾向であり、TSLC1/CADM1 系に着目した治療戦略が ATL に対して一般性を有することがわかる。病理解剖例ブロックより、予備的に RNA を抽出し、その収量品質を検討した結果、miRNA 測定が安定して行えることが判明した。このことにより、ATL 症例における TSLC1/CADM1 高発現の背景解明など、分子病理学的理解が進展するものと期待される。

E . 結論

秋田県内病院の ATL 解剖例につき、本研究目的を達成するに十分な症例の収集を終える (19 例) とともに、免疫組織化学的に TSLC1/CADM1 高発現が検討症例中の 88.9% と極めて高率に見られることが示された。

F . 健康危険情報

特になし。

G . 研究発表

1. 論文発表

12. Shoji K, Murayama T, Mimura I, Wada T, Kume H, Goto A, Ohse T, Tanaka T, Inagi R, van der Hoorn FA, Manabe I, Homma Y, Fukayama M, Sakurai T, Hasegawa T, Aburatani H, Kodama T, Nangaku M. Sperm-Associated Antigen 4, a Novel Hypoxia-Inducible Factor 1 Target, Regulates Cytokinesis, and Its Expression Correlates with the Prognosis of Renal Cell Carcinoma. ***Am J Pathol***. (In press)
13. Morita S, Yoshida A, Goto A, Ota S, Tsuta K, Yokozawa K, Asamura H, Nakajima J, Takai D, Mori M, Oka T, Tamaru J, Itoyama S, Furuta K, Fukayama M, Tsuda H. High-grade Lung Adenocarcinoma With Fetal Lung-like Morphology: Clinicopathologic, Immunohistochemical, and Molecular Analyses of 17 Cases. ***Am J Surg Pathol***. 37(6):924-32, 2013
14. Watanabe K, Emoto N, Hamano E, Sunohara M, Kawakami M, Kage H, Kitano K, Nakajima J, Goto A, Fukayama M, Nagase T, Yatomi Y, Ohishi N, Takai D. Genome structure-based screening identified epigenetically silenced microRNA associated with invasiveness in non-small-cell lung cancer. ***Int J Cancer***. 130:2580-2590, 2012
15. Kitagawa H, Watanabe K, Kage H, Inoh S, Goto A, Fukayama M, Nagase T, Ohishi N, Takai D. Pulmonary Venous Invasion, Determined by Chest Computed Tomographic Scan, as a Potential Early Indicator of Zygomycosis Infection: A Case Series. ***J Thorac Imaging***. 27: W97-99, 2012
16. Ota, S., Ishikawa, S., Takazawa, Y., Goto, A., Fujii, T., Ohashi, K., Fukayama, M. Quantitative analysis of viral load per haploid genome revealed the different biological features of merkel cell polyomavirus infection in skin tumor. ***PLOS ONE***. 7, e39954. 2012
17. Sohn J, Schetter A, Yfantis H, Ridnour L, Horikawa I, Khan M, Robles A, Hussain S, Goto, A., Bowman E, Hofseth L, Bartkova J, Bartek J, Wogan G, Wink D, Harris CC. Macrophages, nitric oxide and microRNAs are associated with DNA damage response pathway and

- senescence in inflammatory bowel disease. **PLOS ONE**, 7, e44156. 2012
18. 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.
 19. 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.
 20. Ishimura, M., Sakurai-Yageta, M., Maruyama, T., Ando, T., Fukayama,, M., Goto, A., Murakami, Y. Involvement of miR-214 and miR-375 in malignant features of non-small-cell lung cancer by down-regulating CADM1. **Journal of Cancer Therapy**, 3, 379-387.2012
2. 学会発表
 1. 高橋正人, 増田弘毅, 吉田 誠, 南條 博, 川村公一, 杉山達朗, 後藤明輝, 正常動脈壁における内皮細胞と平滑筋細胞の Mib5(Ki-67)陽性 8 個細胞クラスターの発見. 第 101 回日本病理学会総会, 東京、4 月 27 日
 2. 南條 博, 小林実貴夫, 吉成由樹, 廣嶋優子, 高橋正人, 川村公一, 吉田 誠, 後藤明輝, 増田弘毅, Mobilization of endothelial cells and vascular dendritic cells of bone marrow origin in the organ. 第 101 回日本病理学会総会, 東京、4 月 27 日
 3. 増田弘毅, 高橋正人, 吉田 誠, 川村公一, 南條 博, 杉山達朗, 後藤明輝, 血流負荷家兎総頸動脈の内弾性板ギャップの発生機構は増殖平滑筋細胞クラスターによる改築である. 第 101 回日本病理学会総会, 東京、4 月 27 日
 4. 根元 晃, 長谷川 樹, 高橋正人, 廣嶋優子, 吉田 誠, 川村公一, 南條 博, 後藤明輝, 長期生存自然経過単心室症の一例. 第 101 回日本病理学会総会, 東京、4 月 28 日
 5. 後藤明輝, 肺癌の発生・進展とマイクロ RNA, 第 75 回日本病理学会東北支部学術集会、秋田、7 月 21 日
 6. 村上 善則, 桜井美佳, 伊東 剛, 桑野秀規, 松原大祐, 後藤明輝, 分子病理学的解析が示す細胞接着分子 CADM1 のヒト肺癌における抑制、促進両面の役割. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌、9 月 21 日
 7. 伊東 剛, 永田政義, 川合剛人, 丸山智子, 櫻井-八下田 美佳, 伊藤彰彦, 後藤明輝, 松原大祐, 村上 善則. 遺伝子欠損マウスを用いた CADM1 の肺腫瘍

- 抑制における役割の解明. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌、9月20日
8. 桑野秀規, 岩井美和子, 川合剛人, 伊東剛, 桜井(八下田)美佳, 後藤明輝, 小泉史明, 中島 淳, 田村研治, 村上 善則, 肺腺がんの EGFR-TK 阻害剤に対する耐制獲得における細胞接着分子 CADM1 の役割. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌、9月21日
9. 熊谷友紀, 伊東 剛, 永田政義, 川合剛人, 丸山智子, 桜井(八下田)美佳, 後藤明輝, 村上 善則, 肺腺がん細胞株の実験的肺転移における遺伝子発現変動
- を指標として抽出される転移関連因子の探索. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌、9月21日
- 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
 3. その他：なし

