

201220062A

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  
(H24-3次がん—一般-004)

miRNAを用いた  
ATLがん幹細胞特異的新規治療法の開発

平成24年度  
総括・分担研究報告書

研究代表者 渡邊 俊樹

東京大学大学院新領域創成科学研究科

平成25(2013)年5月

厚生労働科学研究費補助金  
第3次がん総合戦略研究事業  
(H24-3次がん一般-004)

miRNA を用いた  
ATL がん幹細胞特異的新規治療法の開発

平成24年度総括・分担研究報告書

研究代表者  
渡邊 俊樹

平成25(2013)年5月

## 目 次

### I. 総括研究報告

- miRNA を用いた ATL がん幹細胞特異的新規治療法の開発 .....7  
渡邊 俊樹

### II. 分担研究報告

1. miRNA 細胞内輸送担体としての単鎖抗体作製 .....25  
津本 浩平
2. ヒトの ATL 患者検体を用いたがん幹細胞の同定に関する研究 .....28  
中内 啓光、矢持 淑子、矢持 忠徳
3. 網羅的解析を基盤とした新規分子標的の探索 .....33  
内丸 薫、山岸 誠
4. 網羅的解析を基盤とした新規分子標的の探索 .....42  
中内 啓光
5. 網羅的解析を基盤とした新規分子標的の探索 .....46  
小川 誠司
6. 網羅的解析を基盤とした新規分子標的の探索 .....48  
今井 浩三

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....51

### IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....55

# I. 総括研究報告書

## miRNAを用いたATLがん幹細胞特異的新規治療法の開発 (H24-3次がん一般-004)

研究代表者 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：

成人T細胞白血病(ATL)は予後不良の末梢性T細胞腫瘍で、未だに有効な治療法はない。本研究事業は、研究代表者らがこれまでに構築したATL患者のゲノム異常や分子病態の情報ソースを基盤として明らかにした、ATL細胞におけるmiR-31の特異的発現欠損による恒常的NF- $\kappa$ B経路の活性化とATL癌幹細胞の同定を基盤として、単鎖抗体-miRNA複合体による新規治療法開発を目指す研究計画である。miRNA、癌幹細胞、単鎖抗体という3つの新規な観点を統合して、1)単鎖抗体を用いたmiR-31導入法の開発、2)ATL癌幹細胞の特性解析、3)新規治療標的探索のための分子病態解析、に関して研究計画を進め、以下の様な知見を得た。

1)miRNA結合部位(カチオン性ペプチド)を付加したペプチド融合scFvは、大腸菌発現システムより発現、リフォールディング、精製に成功した。表面プラズモン共鳴(SPR)の解析から、ペプチド融合scFvは抗体の特性である高い親和性と遅い解離速度を保持していることが確認された。2)想定されるATL癌幹細胞集団が、免疫不全マウス生着後に継代移植能を獲得する過程で、表面マーカーの変遷が生ずる事を明らかにした。この治験に基づきTumor initiating cellとしての性質に関わるマーカーの解析を継続中である。3)キャリア末梢血中の感染T細胞をCD7/TSLC1の発現パターンで細胞を分取する新たな系の構築に成功した。この系を用いて各集団における遺伝子発現レベルを検討し、感染不死化細胞の段階で遺伝子発現の異常が認められ、miR-31の発現も激減していることを見いだした。シグナル伝達系の解析では、p38経路のNF- $\kappa$ B経路の活性化への関与、EZH2の発現誘導へのNF- $\kappa$ B経路の関与、Heliosの発現異常とその機能的役割を明らかにした。更に、ATL腫瘍化に関与するTET2の体細胞性変異などの多岐にわたるゲノム異常を同定した。

### 研究分担者：

津本浩平 東京大学医科学研究所・教授  
中内浩光 東京大学医科学研究所・教授  
内丸 薫 東京大学医科学研究所・准教授  
今井浩三 東京大学医科学研究所・特任教授

小川誠司 東京大学医学部附属病院・  
特任准教授  
矢持淑子 昭和大学医学部・准教授  
矢持忠徳 東京大学大学院・特任研究員  
山岸 誠 東京大学大学院・特任研究員

## A. 研究目的

成人 T 細胞白血病(ATL)に有効な治療法が存在しない理由は、(1)腫瘍とその環境の分子レベルの理解不足、(2)治療抵抗性の基盤となる分子細胞レベルの機構が不明であること、(3)リンパ節や浸潤臓器内の標的細胞への有効な薬剤デリバリー法の開発遅れ、等が挙げられる。我々は NF- $\kappa$ B 経路が有効な治療標的であることを示したが、恒常的活性化の原因は不明であり、また NF- $\kappa$ B が生理的にも必須であるため治療法開発は滞っている。癌研究においては治療標的としての癌幹細胞の概念が注目されているが、ATL ではがん幹細胞の存在証明はなされていなかった。

我々は全国的な HTLV-1 疫学調査および検体バンク組織 JSPFAD の全面的協力を得て、以下の成果を上げた。(1)ATL 細胞のゲノム変化とそれにともなう遺伝子発現の異常を明らかにするため、ATL 患者 168 例のゲノムのコピーナンバー解析、52 例の mRNA 解析、40 例の miRNA 解析を大規模且つ統合的にを行い、新規治療法開発に必須となるデータベースを確立した。これらを基盤として、miRNA 発現異常と NF- $\kappa$ B 経路の活性化機構の解明を行い、Cancer Cell 誌に報告した。本データベースは、今後すべての ATL 研究の基盤となるであろう。(2)ATL 細胞の NOJ マウスを用いたに連続継代移植系を用い、ATL の幹細胞の存在とその表面マーカーと特徴を明らかにした (投稿準備中)。また作成したモデルは治療研究を行う上で極めて有用である。

特に重要なのは、ATL は非常に特徴的な miRNA 発現様式であり、腫瘍細胞特異的な新規薬剤として有用性が高いこと、更に、ATL についても癌幹細胞を標的にすることが薬剤耐性の観点からも治癒を目指す治療に必須であることである。

本申請研究は、具体的な治療標的分子及び細胞を明らかにした背景を踏まえ、現実的となった治療法開発を目指す。特異性、低分子性、製造の簡便性を考慮し、単鎖抗体の利用を計画する。初年度はグループごとに専門性の高い研究を進め ATL に特化した治療の基盤を作成し、次年度は各グループの有機的な交流により、よ

り現実的な治療、すなわち単鎖抗体による ATL 癌幹細胞への miRNA のデリバリー法の開発と評価を行う。

## B. 研究方法

治療を目指した抗体開発を軸に 3 つの柱にわけ、各専門家によって構成する。各グループは独立せず各々の成果を踏まえ、統合的に目的達成に向けて研究を行った。

1) ATL 標的単鎖抗体開発・DDS グループ(津本、今井、渡邊、矢持(忠))

### 1. 可変領域の配列決定と発現ベクターの作成

単鎖抗体(scFv)作成に必要な重鎖(VH)と軽鎖(VL)の可変領域の配列は 5'RACE 法を用いてハイブリドーマよりクローニングを行った。標的表面抗原は OX40 (CD134)、CD5、TSLC 1 を選択した。ペプチド融合 scFv の簡便かつ大量製造のため、大腸菌発現系によるリコンビナント scFv から開始した。融合カチオン性ペプチド候補は、アルギニンやリジン残基を多く含み RNA 結合能が知られているペプチド(9 mer Arg、Protamine)を採用した。発現ベクターは、N 末端よりシグナルペプチド配列(PelB)、VH、リンカー、VL、miRNA 結合ペプチド、ヒスチジンタグの順に設計した。

### 2. 抗原分子の塩基配列決定と発現ベクター作成

抗体との相互作用解析に用いる細胞表面抗原の塩基配列を正常ヒト末梢血単核球と T 細胞株、ATL 感染細胞、ATL 由来細胞株の total RNA を用いた RT-PCR 法で cDNA を増幅し配列を決定した。決定した細胞外ドメインの配列を N 末端からヒスチジンタグ、TEV プロテアーゼ認識配列、抗原の順に配置し発現ベクターを作成した。

### 3. 大腸菌発現システムを用いた発現と精製

発現したペプチド融合 scFv は、可溶性画分からの精製が可能なものは Ni アフィニティーカラムクロマトグラフィー精製、サイズ排除カラムクロマトグラフィーにより最終精製を行った。可溶性画分からの最終精製でモノマー体での精製が困難であったものは、変性剤(グアニジン塩酸塩)を用いて可溶化し、Ni アフィニティ

ーカラムクロマトグラフィー精製、巻き戻し操作を経て、サイズ排除カラムクロマトグラフィーにより最終精製を行った。

抗原も同様に発現確認を行い、可溶性画分での精製が可能であったため、上記の方法で最終精製を行った。

#### 4. 融合単鎖抗体の物性機能解析

得られた scFv の抗体機能を確認するために、表面プラズモン共鳴 SPR(Biacore)による抗原との結合解析を施行した。抗原をアミンカップリング法にてセンサーチップに固定化し、比較対照として intact IgG、非融合 scFv、ペプチド融合 scFv を用いて評価を行った。

##### 2) ATL 癌幹細胞同定・解析グループ(中内、矢持(淑)、矢持(忠))

##### 1. フローサイトメーターによる ATL 患者細胞ならびに健常人細胞における細胞表面抗原の網羅的解析

患者および健常人末梢血検体から、Ficoll-Paque 法で単核細胞分画を分離した。Ice-cold PBS (Sigma)で細胞を洗浄後、抗ヒト CD3 抗体(APC-Cy7 標識 / BD Pharmingen)、抗ヒト CD4 抗体(Pacific Blue 標識/ BioLegend)、抗ヒト CD7 抗体(APC 標識/ eBioScience)あるいは抗ヒト CD7 抗体(PE 標識/ BD Pharmingen)、抗ヒト CD14 抗体(Pacific Orange 標識/ CALTAG)を用いて染色した。これらの他に、細胞系マーカー (lineage marker)・活性化 T 細胞マーカー・ケモカインレセプター・細胞接着因子など 103 の抗原 (FITC 標識、PerCP-Cy5.5 標識、PE-Cy7 標識、PE 標識) を各々加えて染色した。APC あるいは標識の抗ヒト CD7 抗体を用いた。4°C 20 分インキュベート後、Ice-cold PBS にて細胞を 1 回染色し、propidium iodide(PI)を添加した PBS に細胞を懸濁し、マルチカラーフローサイトメーター FACS Aria II (Beckton Dickinson 社)にて測定し、解析用ソフトウェア FlowJo(Tree Star 社)を用いて解析した。各評価抗原に対しては、適切なアインタイプコントロールを別途用意し、陰性コントロールとした。

##### 2. ATL 腫瘍細胞に限局して解析する方法

我々は東京大学医科学研究所附属病院・血液腫瘍内科と共同研究の先行研究から、CD7N 分画が ATL 細胞に対応することを示した。この知見に基づいて、ATL 腫瘍細胞に限局して細胞

表面抗原の解析を行った。具体的には、所定の前処置後、CD4/CD3 展開にて CD4 陽性細胞を選択、CD7/CD3 にて展開し、CD3dim/CD7negative の領域を選択し、CD7N 細胞と定義した。この CD7N 細胞における評価対象抗原をヒストグラム展開し、その陽性発現率を患者検体ならびに健常人検体で評価し、比較した。なお、健常人においては、CD7N 細胞は極めて少ない。

##### 3. NOD/SCID/Jak3Ko(NOJ)マウス連続移植継代細胞の解析

連続移植継代細胞を各段階で分取し、表面抗原の変化および Inverse-PCR により HTLV-1 プロウイルスの組み込み部位の検討を行った。

更に病理染色および免疫組織化学法を用いて、連続継代移植マウスにおける腫瘍細胞の分布及び臓器浸潤を解析した。

##### 3) 標的分子解析グループ(渡邊、山岸、内丸、小川)

##### 1. ATL の網羅的解析データの集約、mRNA の詳細な解析、及び pathway 解析

ATL 検体は JSPFAD のマテリアルバンクから供与された。miR-31 の発現レベルは Applied Biosystems 社の TaqMan real-time PCR によって定量を行った。遺伝子発現解析は、発現アレイのデータ解析及び real-time PCR により検討を行った。Helios mRNA の発現パターン解析は、全長の mRNA を検出する PCR により検討を行った。発現アレイデータを用いた pathway 解析は、NCI の Pathway Interaction Database を用いた。

##### 2. miR-31 の標的遺伝子予測と実験的検討

miR-31 の標的遺伝子の検索は、TargetScan program を用いた。上位の標的候補遺伝子に特異的なプライマーを作成し、定量実験を行った。miR-31 の過剰発現細胞はレンチウイルスベクターを用いて作成した。また miR-31 を阻害した細胞は miR-31 の antisense RNA を用いた。更に shRNA を用いて Dicer のノックダウンを行い、上昇する mRNA の検索も行った。

##### 3. EZH2 の発現制御機構の解析

正常休止期 T 細胞は末梢血単核球から磁気ビーズを用いて分取した。T 細胞の活性化は抗 CD3/CD28 抗体、PHA、及び PMA+Ionomycin を用いた。EZH2 の発現レベルは real-time PCR 及び Western blot によって定量を行った。また

EZH2 のプロモーター活性は EZH2 のプロモーター配列を搭載した luciferase レポーターを用いた。

#### 4. ATL 細胞におけるシグナル伝達経路と表現型の解析

p38 MAPK の阻害剤は SB203580 及び SB239063 を用いた。また GLI の阻害剤は GANT61 を用いた。ATL の細胞株は TL-Oml、MT1 を用いた。また HTLV-1 感染細胞として MT-2 及び HUT102 を用いた。ノックダウンアッセイは、標的遺伝子に特異的な shRNA を設計し、理化学研究所バイオリソースセンター三好浩之教授が開発したレンチウイルスベクターを用いて恒常的に shRNA を発現する細胞を作成し、検討を行った。細胞の生存能、増殖能は WST-8 アッセイで評価を行った。またアポトーシス細胞の検出は Annexin V の染色によって行った。

NF- $\kappa$ B 経路の活性化レベルは、Western blot 及び EMSA によって評価した。

#### 5. レンチウイルスベクターを用いた Tax 導入 PBMC の解析

Tax cDNA を上記の Venus を搭載したレンチウイルスベクターに挿入し、VSV-G を用いて高濃度のレンチウイルス液を調製した。Tax の変異体についても同様のウイルスを調製した。末梢血単核球を PHA で活性化させたのち、Tax 発現レンチウイルスを感染させ、IL-2 存在化で 1 年間培養を継続した。Tax 発現細胞の割合は Venus をフローサイトメーターで検出することで行った。経時的にサンプルを保存し、遺伝子発現レベル、及びヒストンメチル化の解析を行った。

#### 6. ゲノム異常の解析

(1)腫瘍特異的な変異を同定するためには患者固有の多型を除外する必要がある、ATL 患者 1 例について腫瘍検体と同一患者からの正常検体を Agilent 社の Sureselect を用いて全エクソン領域を濃縮し、次世代シーケンサー HiSeq (Illumina 社) を用いて網羅的な遺伝子変異解析を行った。

(2)全エクソン解析で体細胞性変異が同定された興味深い遺伝子は、高速シーケンス技術を併用したプールドターゲットシーケンスを用いることにより、大規模なコホートにおいて

変異頻度が調査された。得られた変異データは予後や病型などの臨床情報との関連について統計学的な解析が行われた。また、認められた変異については深い読み取り深度で、正確なアレルの測定を行った。

#### C. 研究結果

1) ATL 標的単鎖抗体開発・DDS グループ(津本、今井、渡邊、矢持(忠))

##### 1. 可変領域の配列決定と発現ベクターの作成

可変領域の配列決定は、5' RACE 法により、OX40 と CD5 のクローニングと発現ベクター作成が終了した。融合ペプチドとして、9 mer Arg (9R)と protamine を選択し、発現ベクターはペプチド融合 scFv と非融合 scFv の作成が終了した。

##### 2. 抗原分子のクローニングとベクター作成

OX40 の配列決定と発現ベクター作成が完了し、CD5 は現在クローニングを行っている。

##### 3. 大腸菌発現システムを用いた発現と精製

anti-OX40 scFv と anti OX40 scFv 9R について大腸菌での可溶性・不溶性画分の発現確認を行い、非融合 scFv は可溶性画分から精製が可能であり、融合ペプチド(9R)については不溶性画分から変性剤を用いて可溶化させ精製を行い、最終的にモノマー体で高純度の抗体を調製することができた。また OD 値、温度、回収時間等の培養条件の検討により、温度と適切な回収時間での発現量増加を得ることができた。anti-CD5 scFv については現在発現確認を行っている。

発現量と比較した最終精製量を考慮した場合に収量が期待された量を下回り、何らかの因子が精製を阻害している可能性が考えられた。Ni アフィニティーカラムクロマトグラフィー精製後の吸光度測定で、A260/A280 が高値を示したことから、miRNA との結合のために付加したカチオン性ペプチドは、大腸菌由来の DNA や RNA と結合し、カチオン性ペプチド-ヒスチジンタグまでの荷電残基に核酸が大量に存在していることが、Ni アフィニティーカラムクロマトグラフィー精製やモノマー体での存在を阻害している因子と考えられた。

抗原は発現確認で、可溶性画分の発現を得られたため、Ni アフィニティーカラムクロマトグ



ラフィー精製、サイズ排除カラムクロマトグラフィーにより最終精製を行い、モノマー体で得ることができた。

#### 4. 融合単鎖抗体の物性機能解析

anti-OX40 IgG、scFv、scFv 9R について SPR を用いた相互作用解析を行った。抗原結合解析の結果、IgG は非常に強力な親和性と遅い解離速度を有していることが確認され、同様に scFv とペプチド融合 scFv も抗体の特性である高い親和性と遅い解離速度を有していることが確認された。

### 2) ATL 癌幹細胞同定・解析グループ(中内、矢持(淑)、矢持(忠))

#### 1. フローサイトメーターによる ATL 患者細胞ならびに健常人細胞における細胞表面抗原の網羅的解析

今回、ATL 細胞における細胞表面抗原の発現レベルを評価した 102 の抗原は、以下の 6 通りに分類された (CCR4 は技術的理由から解析対象に含めていない)。

- ①健常人の CD7N 細胞ではほとんど発現していないが、ATL 細胞で高率に発現している抗原 (6 抗原:CCR4 を除いて)
- ②ATL 細胞における発現レベルに、陽性～陰性と幅広く分布があり、多様性をもって発現している抗原 (2 2 抗原)
- ③健常人の CD7N 細胞ではほぼ高率に発現しているが、ATL 細胞で高率に発現が低下している抗原 (9 抗原)
- ④ATL 細胞でも健常人の CD7N 細胞でも高率に発現しているもの (8 抗原)
- ⑤健常人の CD7N 細胞では少数が発現しているが、ATL 細胞では全く発現していない抗原 (8 抗原)
- ⑥ATL 細胞でも健常人の CD7N 細胞でも発現していないもの (4 9 抗原)

#### 2. NOD/SCID/Jak3Ko(NOJ)マウス連続移植継代細胞の解析

我々は、NOD/SCID/Jak3Ko(NOJ)マウス連続移植継代の系を用いて、ATL 末梢血の CD4+CCR4+ の細胞集団が連続移植継代可能である事を示した。今回、連続移植継代の 3 代目以降の細胞集団の表現型が CD4+ CCR4- となって 9 代目まで連続移植継代可能となる事が明

らかになった。類似の知見として、連続移植継代 4 代目では脾臓単核球の CD5+ 分画に生着能が認められたが、その後 5 代目の細胞集団を用いると CD5+ も CD5- もほぼ同様に生着能を示した。これらの現象は連続移植継代に伴い、Cell Heterogeneity が減少する可能性を示すものである。次に、CD3 発現強度分画し、CD3HI と CD3LO 細胞集団の移植実験を行ったところ、ATL 細胞が存在すると思われる CD3Lo の分画より CD3HI の分画において、先に 5 代以上の連続移植が可能であることが示された。さらにその生着した細胞集団は連続移植継代の 2 代目以降では CD3Lo へ移行している事が明らかになった。

病理形態学的解析では以下の結果を得た。CD4+/CCR4+ がん幹細胞画分を移植し、30 日経過した ATL マウスにおける終末病態の解析を行った。HE 染色およびヒト vimentin の免疫組織化学的染色標本の形態観察を行った。その結果、腫瘍細胞が肝臓、脾臓、膵臓、腎臓 (および腎周囲被膜)、肺、骨髄、リンパ節を含む全身臓器の血管周囲を中心に、結節状～びまん性に浸潤している事が明らかになり、マウスの死因に関しては、腫瘍死と結論付けることができた。肺に関しては腫瘍細胞浸潤が顕著で既存の肺胞構築を破壊しており、呼吸不全を来したと推測出来た。

また、多数の検体に共通する主な腫瘍浸潤部位として、肝臓、肺、脾臓、骨髄の 4 ヶ所を同定した。いずれの組織も血管周囲を中心とした腫瘍細胞の増殖が顕著であった。

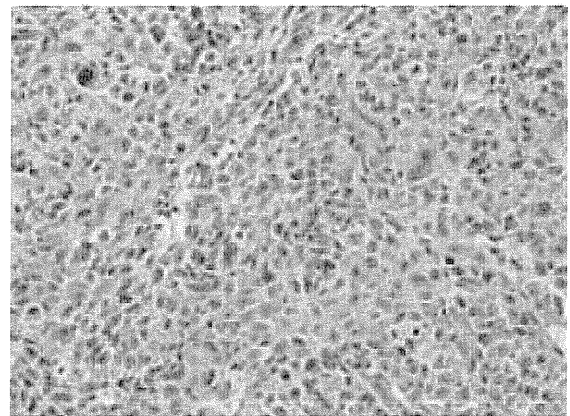


図 1. CD4+CCR4+ 由来 6 代目の肝臓  
腫瘍細胞は類円形～多形性の強い細胞である (x40)。

### 3) 標的分子解析グループ(渡邊、山岸、内丸、小川)

#### 1. miR-31 の発現レベルの再検証と病態との関連について

まず本研究課題の中心となる miR-31 の発現レベルについて、ATL と正常細胞、また他の細胞種について検討を行った。miR-31 は休止期 T 細胞で発現が高く、抗原刺激やマイトジェンによる活性化により発現が若干低下した。また、NIK の発現が高い B 細胞では miR-31 の発現は比較的 low、B 細胞リンパ腫では miR-31 の発現が減少していた。

ATL 各病型の検体について比較検討したところ、急性型では多くの検体が検出限界以下まで発現が低下し、慢性型は急性型よりも低下の度合いが小さいが、正常 T 細胞に比べて 1/100 以下の発現量であった。くすぶり型や HTLV-1 キャリアでは末梢血中に正常細胞の混入のため評価が困難であった。次に、内丸らが開発した multi-color FACS (HAS 法) を用いて、個体内の感染細胞集団を分画して解析を行った。この CD7/TSLC1(CADM1)の第2世代 HAS 法では、HTLV-1 感染細胞 /ATL 細胞は TSLC1(-)/CD7(+)(=P)、TSLC1(+)/CD7(dim)(=D)、TSLC1(+)/CD7(-)(=N)の 3 つの集団に分画される。この系を用いて HTLV-1 無症候性キャリア 10 例、くすぶり型、慢性型、急性型 ATL 各 5 例の解析を行った。健常人コントロールでは TSLC1 強陽性の細胞はほとんど認められないが、キャリア、ATL 患者では TSLC1(+)の細胞集団が出現し、これらの細胞は CD7 の発現が dim~negative に低下している (D、N)。くすぶり型から慢性型、急性型と病態が進行するに連れてこれら TSLC1(+)の集団が増加するとともにその中での D と N の比率が変化し、病態の進行とともに N が増加、急性型では多くの症例でほとんどが N の集団であった。これら D、N の集団を inverse PCR で解析すると major clone band が認められ、この集団の主体をなすのは clonal に増殖している感染細胞と考えられた。さらにキャリアのうち末梢血中プロウイルス量が多く、異常リンパ球が増加している症例でもこの D、N 分画は増加しており、FACS 上はくすぶり型と区別がつかない症例が見られた。これら各病型の P、D、N をソーティングし、

miR-31 の発現量を検討したところ、いずれの ATL 及びキャリアにおいても TSLC1 陽性の D 及び N の集団で、すでに大幅に減少していることを見いだした。

更にこれらの分画について発現アレイ解析を行った結果、キャリアを含めて病型に関わらず D と N は同じクラスターに分類されたことから、HTLV-1 無症候性キャリアのうち、末梢血中プロウイルス量が高い発症ハイリスク症例の中には一部すでに ATL の腫瘍化過程を進行しているクローンが存在すること、またこれらの集団においてすでに miR-31 の発現の高度の抑制が見られることから、本研究による miR-31 の delivery による治療薬はハイリスクキャリアの一部の症例に投与することにより early intervention としての発症予防に使用できる可能性を示唆し、本研究の成果が ATL の治療のみでなく発症予防に有益である可能性を示した。また興味深いことに、miR-31 が減少している感染不死化細胞では miR-31 の発現減少に寄与する EZH2 の発現がすでに上昇していることも明らかになった。このことは、腫瘍化以前の感染細胞集団においてもエピジェネティックな異常の蓄積があることを示唆している。

#### 2. miR-31 の新規標的遺伝子の同定

miR-31 の標的遺伝子は、我々が同定した MAP3K14 (NIK)の他に、RhoA や E2F ファミリーなどの様々な遺伝子が同定されている。miRNA は遺伝子発現のブレーキとして機能するため、重要な標的 mRNA は細胞種によって異なると考えられ、ATL 細胞における miR-31 の発現減少が招く遺伝子発現異常の実態は実験的に検証する必要がある。

そこで、先ず Targetscan を用いて miR-31 の標的候補の絞り込みを行った。次に予測の上位に位置する遺伝子群について、miR-31 の導入、もしくは miR-31 の阻害によって変動する遺伝子を real-time PCR で決定した。その結果、NIK の他に PKCε という遺伝子が ATL 細胞において miR-31 の標的となることが分かった。PKCε の発現は Dicer のノックダウンによっても上昇することから、miRNA の制御されていることが示唆される。ATL 細胞では miR-31 の発現が減少することにより、PKCε の発現が上昇し、細胞に影響を与えることが考えられる。現在 ATL

細胞における PKC $\epsilon$  の役割について検討を進めている。

### 3. miR-31 の発現を抑制する EZH2 の過剰発現の分子メカニズム

miR-31 の発現を負に制御する EZH2 は多くのがん細胞で過剰に発現しており、細胞の増殖、生存、転移、悪性化に関わる。一方で正常細胞の分化や幹細胞性維持においても中心的な役割を果たす重要な因子である。腫瘍細胞における過剰発現の分子機構を明らかにするため、EZH2 の発現制御機構の検討を行った。

まず、健康人末梢血中の休止期 T 細胞を、抗 CD3/CD28 抗体、PHA、PMA+Ionomycin を用いて活性化し、遺伝子発現レベルを検討した。その結果、EZH2 の発現は T 細胞受容体からの活性化シグナルで強く誘導されること、NF- $\kappa$ B 及び Ca<sup>+</sup>シグナルが EZH2 の誘導に重要であることが示唆された。一方、NF- $\kappa$ B 経路のみの活性化では発現誘導が見られなかった。従って、EZH2 の発現には複雑なシグナル活性化を前提として、NF- $\kappa$ B シグナルがそれを増強していると考えられた。

次に、NF- $\kappa$ B が恒常的に活性化している ATL 細胞株では阻害剤による NF- $\kappa$ B 抑制で、EZH2 の発現レベルが抑制された。従って ATL 細胞では NF- $\kappa$ B の活性化が EZH2 の過剰発現に寄与していることが示唆された。現在 ATL 検体を用いた検討と、詳細な分子メカニズムの検討を進めている。

### 4. Pathway 解析を用いた ATL 細胞の新たな分子異常の解明-ATL 細胞の生存シグナルに与える p38 経路の役割の検討-

ATL 検体の大規模発現アレイデータを利用して NCI database を用いて Pathway 解析を行い、細胞の生存や増殖に関わる様々なシグナル伝達系の異常の存在を明らかにした。中でも p38 MAPK 経路の異常が著明であった。p38 経路は固形癌ではがん抑制因子として機能するが、リンパ球細胞での機能は十分明らかになっていない。今回、ATL 細胞における p38 経路の機能的意義を検証するために、p38 リン酸化阻害剤を用いて検証した。その結果、p38 経路の阻害により ATL 由来細胞株及び ATL 患者由来細胞の生存率が著しく低下し、ATL 細胞に強力なアポトーシスが誘導された。シグナル伝達経路の

解析から p38 阻害によって NF- $\kappa$ B 活性が強く抑制されることが示された。これらの結果は、ATL 細胞においては、様々な遺伝子発現異常によって誘導される p38 のリン酸化が NF- $\kappa$ B 経路の活性化を誘導し、アポトーシス抵抗性の獲得に寄与していることが示唆された。

### 5. ATL 細胞における EVC 遺伝子の過剰発現とシグナル伝達系への影響の解析

ATL 検体の網羅的発現解析から、著しい過剰発現を示す複数の新規遺伝子が明らかになった。中でも EVC1 及び EVC2 は正常 T 細胞に比べて 10~100 倍過剰に発現していること、その発現が Tax によって誘導されることがわかった。EVC は Hedgehog 経路の活性化に関与するが、その分子機構は十分明らかになっておらず、通常 EVC の発現が低い T 細胞ではその機能も不明であった。今回 shRNA を用いて ATL 細胞で EVC1 及び EVC2 をノックダウンする事で、Hedgehog 経路下流の遺伝子発現低下とアポトーシス誘導が認められた。更に Hedgehog 経路の転写因子 GLI 阻害剤処理で ATL 患者由来細胞のアポトーシスが誘導された。これらの知見から、ATL 細胞における EVC の過剰発現が、Hedgehog 経路の活性化を介して腫瘍細胞の生存に寄与していることが示唆された。EVC の発現量は ATL において非常に高く、現在腫瘍細胞マーカーとしての利用可能性を検討している。

### 6. ATL 細胞における Helios のスプライシング異常と細胞へ影響の解析

腫瘍細胞における遺伝子発現は、発現レベルだけでなく、スプライシング異常による mRNA 構造の異常が散見される。我々は ATL 検体 168 例のコピーナンバー解析から明らかになった Helios 遺伝子欠損の意義を検討する過程で、ATL 細胞において Helios mRNA のスプライシング制御が高頻度に異常を示すことを明らかにした。これは各病型を含む 37 症例中 32 例 (86.4%) と非常に高頻度に認められ、ヘテロな ATL 細胞に共通する重要な分子背景の一つであると考えられた。またゲノムの欠損は急性型及びリンパ腫型でのみ検出されており、progression に重要なゲノム異常だと考えられた。実験的に検証を行った結果、ATL で観察される異常アイソフォームは DNA 結合ドメインを大

大きく欠損しており、転写因子として機能しないことがわかった。更に二量体化能を有しているために正常の Helios や Ikaros に対してもドミナントネガティブとして働き、ATL 細胞では Helios による正常な遺伝子制御が損なわれていることを明らかにした(Cancer Sci, 2013 in press)。

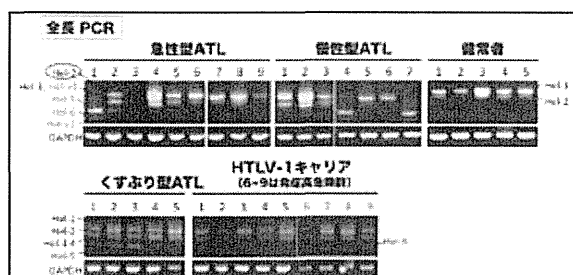


図2. ATL細胞における Helios mRNA の発現異常 全長 RT-PCR 解析の結果。Hel-5, Hel-6, Hel-v1, Hel-v2 が ATL に特異的なスプライスバリエント (ATL 特異的 Helios variant) である。

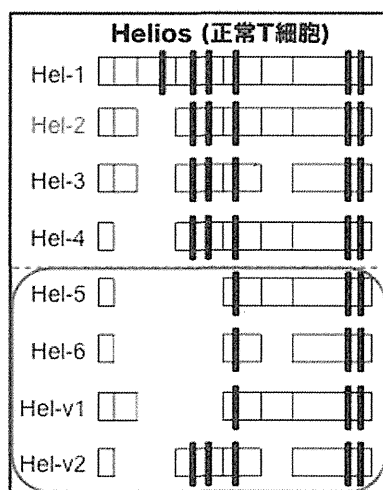


図3. Helios mRNA の exon 構造とスプライスバリエント。縦の黒バーは Zinc finger ドメインを示す。赤枠内の4種のバリエントが ATL 特異的なバリエントである。N 端寄りの4個の Zinc finger ドメインの欠損が特徴である。

Helios ファミリーは Ikaros 転写因子などと共に血球細胞の増殖や分化の制御に重要な因子であり、マウスを使った解析から Notch pathway の抑制因子として働くことが報告されている。Helios が抑制する遺伝子には Hes1 などの T 細胞の増殖に関わる遺伝子が多く含まれており、Helios の機能異常は細胞増殖に影響を与えると

考えられた。そこで Helios のノックダウンもしくは ATL 型 Helios の過剰発現を Jurkat 細胞に誘導すると、細胞増殖能が上昇することがわかった。さらにこれらの細胞の遺伝子発現を網羅的に解析し、Helios の下流で制御される遺伝子の同定に成功した。Pathway の結果から、T 細胞の増殖やホーミングに重要な SIP pathway の活性化に関わっていることがわかった。

## 7. 宿主エピゲノムに与える HTLV-1 Tax の影響の解析

我々がこれまでに行った ATL 検体の解析から、ATL 細胞の分子異常の背景にはエピジェネティックな異常の蓄積が強く示唆される。特に Polycomb ファミリーによる遺伝子発現異常は miR-31 を含む重要な遺伝子群の発現抑制を介して細胞に重大な影響を与えていると考えられる。また上記のように、HTLV-1 感染不死化細胞においても miR-31 の発現が減少している事実は、感染細胞の段階で既に Polycomb 依存的なエピジェネティックな異常の蓄積が始まっていることが示唆している。

我々はこれまでに HTLV-1 Tax が宿主エピジェネティック因子群と相互作用し、影響を与える事を明らかにしてきた。Polycomb ファミリーの活性中心である EZH2 についても SET ドメインを介して Tax と結合することを観察している。しかし自立増殖する細胞株を用いた実験系ではエピジェネティックへ与える影響の解析が困難であった。そこで、Tax の恒常的な発現を誘導するレンチウイルスベクターを構築し、健康者 PBMC 及び CD4+T 細胞への導入実験を行った。Tax 導入後、ベクターにコードされた Venus タンパク質を FACS で検出することにより Tax 発現細胞をモニターした。更に NF- $\kappa$ B や CREB を活性化できない変異体 Tax を発現するベクターの同時に作成し、比較検討を行った。その結果、野生型 Tax のみが効率よく PBMC を不死化したことから、Tax が宿主に与える初期のイベントには NF- $\kappa$ B と CREB 経路の活性化が必須であることが分かった。

Tax 導入から継時的にサンプリングを行い、1年以上培養した結果、最終的に得られた不死化細胞では、H3K27 トリメチル化で抑制されることが知られている p21 の発現が正常 T 細胞に比べて著しく減少していることが分かった。更に

miR-31 の発現抑制も培養後期に観察され、エピジェネティックな異常が蓄積していることが示唆された。またこの細胞は EZH2 の阻害剤である DZNep 処理によってアポトーシスを起こすことから、Polycomb 依存的な生存が獲得されていることが明らかになった。

#### D. 考察

ペプチド融合 scFv は、大腸菌発現系より巻き戻し操作を駆使することにより作製可能であることから、異種のカチオン性ペプチド融合 scFv の発現・調製も可能であることが期待された。また精製した scFv はモノマー体にて調製できたことより、変性剤による可溶化と巻き戻し操作が、修飾を加えた scFv 作製の有効な手法であることが示された。miRNA 結合のために付加したカチオン性ペプチドの特徴として、強い細胞膜透過性の他に、静電相互作用により核酸に結合することが知られており、このことがヒスチジンタグによるアフィニティー精製と構造の維持やモノマー体での存在を阻害している可能性が示唆された。発現量の増加は培養条件の検討で改善を得ることができたが、今後の収量増加については塩濃度や nuclease 処理などの条件検討を更に行う必要がある。

更にペプチド融合 scFv の抗原結合能は、単鎖抗体として十分な結合親和性を保持していることが示唆された。従って、今後 scFv と miRNA との結合を確認し細胞内への miRNA 輸送効果と細胞障害性について詳細な検討を行う予定である。

生体内の ATL 細胞を同定しその表現型の特徴を明らかにする試みは、継続されて来たが、今回は、より精度の高いゲーティングを用いて、更に評価抗原数を大きく増やして解析した。

ATL 細胞に限局して詳細に解析した結果から、急性型 ATL 細胞は細胞表面抗原の発現様態からは、heterogeneous な集団であることが示された。特にグループ②や③に示した抗原においては、発現レベルが陽性～陰性と広く分布しており、ATL における CSC マーカーである可能性も示唆される。今後発現レベルの差異によってフローサイトメトリー等によるソーティングにて細胞を分離し、in vitro/in vivo における増殖能を評価することを検討している。

免疫不全マウスを用いた ATL「癌幹細胞」の解析の結果は、従来の概念から期待される結果とは異なる情報が得られている。

検体 ATL 細胞を CCR4 や CD3 等の表面抗原の発現を指標に分画した細胞の生着様式からは、従来考えられている ATL 細胞の特徴とは異なる集団で生着する例が認められた。これは、前段で記載した様に、ATL 細胞の表面抗原発現は heterogeneous であるとの知見に合致している。更に、連続継代移植を行う事で、表面抗原の発現に変化が認められた事である。つまり、CCR4 陽性細胞分画を移植して生着した腫瘍を継代培養する事で、CCR4 陰性細胞が主体となり、これらの細胞集団が継代移植能を示す、等の知見である。

これらの知見は、「癌幹細胞」特異的なマーカー探索と言う観点からは不都合な知見であるが、がん細胞中に存在する“tumor initiating cells”の生物学的特徴を検討する上では貴重な情報であると考えられる。特に、ATL 細胞は分化した末梢型 T リンパ球の腫瘍であると理解されている事から、分化したリンパ球の腫瘍に存在する“tumor initiating cells”の解析に重要な情報をもたらす可能性があると考えている。

がん研究において、miRNA の発現異常とその機能的意義が次々と報告されている。miR-31 についても、乳がんや ATL を含む様々な腫瘍細胞での発現減少が報告され、現在では miR-31 はがん抑制性 miRNA として認識され始めている。また我々が ATL で明らかにした Polycomb によるエピジェネティックな miR-31 抑制メカニズムが、乳がん、前立腺がん、メラノーマなどで保存されていることが次々と報告されており、我々が提案した Polycomb-miR-31- NF- $\kappa$ B という新しい概念が広く適用されることも示唆されている。

本年度の大きな成果として、マルチカラー FACS による感染細胞集団の同定法の開発により、感染者個体内での感染細胞の様々な腫瘍化段階での細胞の特性を解析出来るようになった事が挙げられる。その結果、HTLV-1 感染不死化細胞（前癌病変）の段階で miR-31 の発現減少が確認出来た。これまでの多数例の検討においても miR-31 の発現減少は例外がなく、分子レベルでの ATL 細胞の絶対的な特徴として位

置づけられる。このことは、本申請研究の課題である miR-31 のデリバリーを考える上で、有効な対象として急性型 ATL だけでなくくすり型や HTLV-1 キャリア中に存在する感染細胞も miR-31 によって選択的に標的化する事が期待される。また miR-31 の発現減少は多くのがんの共通する特徴であるため、より拡大した適用も可能性がある。

ATL において発現異常を示す重要な遺伝子として EZH2 が挙げられる。Polycomb による H3K27 のトリメチル化酵素として必須であり、治療標的として古くから注目されているが、その過剰発現の分子機構は、十分理解出来ていない。本年度我々は、リンパ球特異的受容体からの活性化刺激により EZH2 の転写レベルが亢進すること、NF- $\kappa$ B 経路が発現増強に関与することを明らかにした。また、NF- $\kappa$ B の阻害によって効果的に EZH2 の発現を抑制することができることがわかった。このことは、①EZH2 による miR-31 の発現抑制、②miR-31 の減少による NIK の発現亢進と NF- $\kappa$ B の活性化、③NF- $\kappa$ B の活性化による EZH2 の発現誘導、という Feed-forward loop の存在を示唆する。更にこれらの要素はそれぞれが独立した重要な働きを持っており、ATL 細胞におけるこれらの異常の恒常性が細胞の生存、増殖、浸潤能に寄与していると考えられる。中心要素である miR-31 を導入することにより、NF- $\kappa$ B を抑制するだけでなく、この Feed-forward loop による悪循環を阻止する事が可能になるかもしれない。

Tax によるエピジェネティックな異常の誘導は、HTLV-1 感染と ATL 腫瘍細胞の特徴をつなぐ重要な発見であった。エピジェネティックな異常の実態は細胞株を用いた検討だけでは明らかにするのが困難であり、明らかにされていなかった。Tax 導入によって維持されるエピジェネティックな異常蓄積のモデルは、感染細胞の progression を検討する上で有用であると考えられる。miR-31 の発現減少の誘導メカニズムだけでなく、Tax による NF- $\kappa$ B 活性化を介した EZH2 の過剰発現誘導についても新たな情報を得る事ができると考えられる。ウイルスという外来性因子が宿主のエピジェネティックに影響を与える実験事実は学術的にも重要な発見であった。

本年度は miR-31 関連だけでなく、ATL の網羅的な統合解析から、p38 経路の活性化とその下流のイベントが見いだされ、更に EVC と Helios という病態に関与する重要な遺伝子の発現異常が明らかになった。実験的検証の結果、EVC の過剰発現は Hedgehog 経路を活性化し、Helios は Notch pathway や S1P pathway の活性化に関わり、どちらも細胞増殖や生存に関与することが示唆された。いずれの経路も ATL 研究においてはこれまでに報告がなく、新たな治療標的として有用であると考えられる。NF- $\kappa$ B 経路の活性化との関連も含めて、今後更に検討する必要がある。

## E. 結論

- 1) 単鎖抗体を用いた miR-31 導入法の開発は順調に進展し、近々、細胞および xenograft レベルでの効果の検証が可能になると考えられる。
- 2) ATL 癌幹細胞の特性解析から、新たな知見が得られて来ており、分子標的としての表面抗原マーカーの発現様式の更なる知見を積み重ねつつある。
- 3) 新規治療標的探索のための分子病態解析から、幾つかの新規シグナル伝達経路の関与が明らかになりつつある。

## F. 健康危険情報

該当せず

## G. 研究発表

研究代表者：渡邊俊樹

研究分担者：矢持忠徳、山岸 誠

### 1. 論文発表

- 1) Asanuma S, Yamagishi M, Kawanami K, Nakano K, Sato-Otsubo A, Muto S, Sanada M, Yamochi T, Kobayashi S, Utsunomiya A, Iwanaga M, Yamaguchi K, Uchimaru K, Ogawa S, Watanabe T. Adult T-cell leukemia cells are characterized by abnormalities of Helios expression that promotes T-cell growth. *Cancer Sci.* 2013, in press (doi: 10.1111/cas.12181)
- 2) D'Agostino DM, Zanolello P, Watanabe T, Ciminale V. The microRNA regulatory network in normal- and HTLV-1-transformed T cells. *Adv Cancer Res.* 2012;113:45-83. (doi: 10.1016/B978-0-12-394280-7.00002-6)

- 3) Yamagishi M, Watanabe T. New Paradigm of T cell Signaling: Learning from Malignancies (Review Article). *J Clin Cell Immunol.* S12:007, 15pp, 2012.
- 4) Yamagishi M, Watanabe T. Molecular Hallmarks of Adult T Cell Leukemia (Review Article). *Front Microbiol.* 3: 334. 2012.
- 5) Iwanaga M, Watanabe T, Yamaguchi K. Adult T-cell leukemia: a review of epidemiological evidence. *Front Microbiol* 3: 322. Sep. 2012 (doi: 10.3389/fmicb.2012.00322) Epub

(総説)

- 1) 山岸誠、渡邊俊樹、特集/血液疾患におけるエピゲノム異常と治療「ATL発症におけるエピゲノム解析の進歩 (The State of the Art in Epigenomics of Adult T Cell Leukemia)」、*血液内科*、66(2)、2013年2月
- 2) 山岸誠、Person 人と研究「成人T細胞白血病の分子レベルの全体像と、Polycomb-miR-31-NF-κB経路の異常」、*Trends in Hematological Malignancies*、4(3) : 16-19、Dec. 2012.
- 3) 山岸誠、渡邊俊樹、特集：microRNAの発現制御の異常と疾患「成人T細胞白血病(ATL)におけるmicroRNAの発現異常」、*細胞*、44(10) : 15-22、2012年9月
- 4) 山岸誠、渡邊俊樹、特集：ATLの基礎と臨床「ATL細胞のゲノム エピゲノム異常と発現異常」、*細胞*、44(8) : 18-22、2012年7月
- 5) 山岸誠、渡邊俊樹、総説「2.HTLV-1感染症とmiRNA」、*ウイルス*、62(1) : 9-18、2012年6月

## 2. 学会発表

(国際学会)

- 1) Watanabe T, “Polycomb—miRNA—NF-κB linkage in ATL cells”, The 5<sup>th</sup> Annual Meeting & Symposium of The Association for HTLV and Related Diseases, IMSUT, Tokyo, 8.25-8.26, 2012 (Invited)
- 2) Watanabe T, “The role of microRNAs in Adult T-Cell Leukemia”, Viruses, Genes and Cancer workshop, Venice, Italy, Oct. 25-27, 2012 (Invited)  
(国内学会)

- 1) Firouzi Sanaz、青木桜、鈴木穰、矢持忠徳、中野和民、中井謙太、菅野純夫、渡邊俊樹、”Development of a new high-throughput method to investigate T-cell-clonality and integration site preference among HTLV-1 infected individuals”, 平成24年度東京大学医科学研究所研究成果発表会、東京大学医科学研究所、2012年5月31日-6月1日 (ポスター発表)
- 2) 山岸誠、中野和民、宇都宮與、山口一成、内丸薫、小川誠司、渡邊俊樹、「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：Polycomb-miR-31-NF-κB経路の異常とがん」、平成24年度東京大学医科学研究所研究成果発表会、東京大学医科学研究所、2012年5月31日-6月1日 (ポスター発表)
- 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・シンポジウム、東京大学医科学研究所、2012年8月26日 (2012年8月25日-8月26日) (口演発表)
- 4) 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・シンポジウム、東京大学医科学研究所、2012年8月26日 (2012年8月25日-8月26日) (ポスター発表)
- 5) 藤川大、山岸誠、黒川直也、副島あい、石田尚臣、中野和民、渡邊俊樹、「HTLV-1タンパク質TaxとPolycombタンパク質との新規相互作用がT細胞に与える影響の解析」、第5回HTLV-1研究会・シンポジウム、東京大学医科学研究所、2012年8月26日 (2012年8月25日-8月26日) (ポスター発表)
- 6) 矢持忠徳、守田陽平、矢持淑子、サナズ フィルジ、佐々木陽介、渡辺信和、内丸 薫、宇都宮與、渡邊俊樹、太田 力、「成人性T細胞性白血病におけるがん幹細胞の同定への試み」、第71回日本癌学会学術総会、札幌、2012年9月20日 (2012年9月19日-9月21日) (ポスター発表)
- 7) 山岸誠、渡邊俊樹、「多機能性分子miR-31の発現低下とがん関連シグナル伝達」、第71回

日本癌学会学術総会、札幌、2012年9月20日  
(2012年9月19日—9月21日) (口演発表)

- 8) Yamagishi M, Takahashi R, Nakano K, Asanuma S, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimarui K, Ogawa S, Watanabe T, “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、京都国際会議場、2012年10月19日 (2012年10月19日—10月21日) (口演発表)
- 9) Yamagishi M, Katano H, Nakano K, Ota Y, Hishima T, Okada S, Watanabe T, “miRNA signature and its functional involvement in aggressiveness of diffuse large B cell lymphoma”, 第74回日本血液学会学術集会、京都国際会議場、2012年10月20日 (2012年10月19日—10月21日) (口演発表)
- 10) Asanuma S, Nakano K, Yamagishi M, Ogawa S, Yamaguchi K, Utsunomiya A, Watanabe T, “Aberrantly spliced Helios variants in ATL cells induce T cell proliferation”, 第74回日本血液学会学術集会、京都国際会議場、2012年10月20日 (2012年10月19日—10月21日) (ポスター発表)
- 11) 藤川大、山岸誠、黒川直也、副島あい、石田尚臣、中野和民、渡邊俊樹、「HTLV-1タンパク質TaxはPolycombタンパク質EZH2との相互作用を介してエピジェネティクスの脱制御を誘導する」、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪国際会議場、2012年11月14日 (2012年11月13日—11月15日) (口演発表)
- 12) Firouzi S, Yamochi T, Lopez Y, Aoki S, Suzuki Y, Nakano K, Nakai K, Sugano S, Watanabe T, “Development of a New High-throughout Method to Investigate T-cell-clonality and Integration Site Preference among HTLV-1-infected Individuals”, 第35回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場、2012年12月14日 (2012年12月11日—12月14日) (ポスター発表)

(その他)

- 1) 渡邊俊樹、「HTLV-1によるATL発症機構の解明を目指して」、文部科学省特別研究経費研

究推進「ATL 対策宮崎モデルの確立に向けて」特別講演会、宮崎大学医学部、宮崎、2012年5月9日(招待講演)

- 2) 渡邊俊樹、「HTLV-1によるATL発症機構の解明を目指して—新規治療法開発への可能性」、平成24年度熊本大学名医に学ぶセミナー、熊本大学医学部、熊本、2012年5月30日(招待講演)
- 3) 渡邊俊樹、「日本におけるHTLV-1/ATL研究、対策の歴史、現状」、第6回北里血液学セミナー、北里大学病院、相模原、2012年6月6日(招待講演)
- 4) 渡邊俊樹、「ATL細胞におけるPolycomb-miRNA-NF- $\kappa$ Bリンケージ—新規治療法開発への新たな視点」、文部科学省新学術領域研究生命科学系3分野支援活動(がん、ゲノム、脳)合同シンポジウム、東京ステーションコンファレンス、2012年7月6日
- 5) 渡邊俊樹、「HTLV-1によるATL発症機構の解明の現状—新規治療法開発への試み」、第15回北海道ウイルス感染症セミナーの会、北海道大学学術交流会館、札幌、2012年9月1日(招待講演)
- 6) 渡邊俊樹、「成人T細胞白血病(ATL)におけるmicroRNA発現異常とその意義」、平成24年度遺伝子病制御研究所研究集会、北海道大学医学部学友会館フラテ、札幌、2012年9月18日(招待講演)

研究分担者：津本浩平

1. 論文発表
- 1) Yumura K, Ui M, Doi H, Hamakubo T, Kodama T, Tsumoto K, Sugiyama A. Mutations for decreasing the immunogenicity and maintaining the function of core streptavidin (Article). *Protein Sci.* 22(2), 213-221, 2013
- 2) Kudo S, Caaveiro JM, Miyafusa T, Goda S, Ishii K, Matsuura T, Sudou Y, Kodama T, Hamakubo T, Tsumoto K. Structural and thermodynamic characterization of the self-adhesive properties of human P-cadherin (Article). *Mol. Biosyst.* 8(8), 2050-2053, 2012

2. 学会発表  
(国際学会)  
該当なし



(国内学会)

- 1) 工藤 翔太, 岩成 宏子, 浜窪 隆雄, 児玉 龍彦, 松浦 正, 須藤 幸夫, 津本 浩平, “2種の異なる homo - dimer を形成する P - cadherin の物性, 構造, 機能解析”, 第 12 回日本蛋白質科学会年会、名古屋国際会議場、2012 年 6 月 20 日
- 2) 湯村 恭平, 宇井 美穂子, 岡本 未央, 土井 洋文, 杉山 暁, 浜窪 隆雄, 児玉 龍彦, 津本 浩平, “低免疫原性ストレプトアビジンを用いた融合抗体の構築”, 第 12 回日本蛋白質科学会年会、名古屋国際会議場、2012 年 6 月 20-21 日
- 3) 木吉 真人, 岡本 未央, 中木戸 誠, Jose M. M. Caaveiro, 曾我 真司, 白井 宏樹, 河畑 茂樹, 中村 春木, 津本 浩平, “抗原抗体相互作用における親和性創出機構の精密解析”, 第 12 回日本蛋白質科学会年会、名古屋国際会議場、2012 年 6 月 20-21 日
- 4) 木吉 真人, 岡本 未央, 中木戸 誠, 曾我 真司, 白井 宏樹, 河畑 茂樹, 中村 春木, 津本 浩平, “抗原抗体相互作用における親和性創出機構の精密解析”, 第 6 回バイオ関連化学シンポジウム、北海道大学、2012 年 9 月 6-8 日
- 5) 湯村 恭平, 宇井 美穂子, 岡本 未央, 土井 洋文, 杉山 暁, 浜窪 隆雄, 児玉 龍彦, 津本 浩平, “低免疫原性ストレプトアビジン変異体の機能検討”, 第 6 回バイオ関連化学シンポジウム、北海道大学、2012 年 9 月 6-8 日
- 6) 木吉 真人, 三浦 恵梨, 岡本 未央, 中木戸 誠, Jose M. M. Caaveiro, 曾我 真司, 白井 宏樹, 河畑 茂樹, 中村 春木, 津本 浩平, “抗原抗体相互作用における親和性創出機構の精密解析”, 第 85 回日本生化学会大会、福岡国際会議場、2012 年 12 月 14-16 日

研究分担者：中内啓光

#### 1. 論文発表

- 1) Nishimura T, Kaneko S, Kawana-Tachikawa A, Tajima Y, Goto H, Zhu D, Nakayama-Hosoya K, Iriguchi S, Uemura Y, Shimizu T, Takayama N, Yamada D, Nishimura K, Ohtaka M, Watanabe N, Takahashi S, Iwamoto A, Koseki H, Nakanishi M, Eto K, Nakauchi H. Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by pluripotency reprogramming and

dedifferentiation. *Cell Stem Cell*. 12: 114-126m 2013

- 2) Nakajima-Takagi Y, Osawa M, Oshima M, Takagi H, Miyagi S, Endoh M, Endo TA, Takayama N, Eto K, Toyoda T, Koseki H, Nakauchi H, Iwama A. Role of SOX17 in hematopoietic development from human embryonic stem cells. *Blood*. 2012 Nov 20.
- 3) Kamiya A, Nakauchi H. Enrichment and clonal culture of hepatic stem/progenitor cells during mouse liver development. *Methods Mol Biol*. 2013;945:273-86. doi: 10.1007/978-1-62703-125-7\_16.
- 4) Yamaguchi T, Hamanaka S, Kamiya A, Okabe M, Kawarai M, Wakiyama Y, Umino A, Hayama T, Sato H, Lee YS, Kato-Itoh M, Masaki H, Kobayashi T, Yamazaki S, Nakauchi H. Development of an All-in-One Inducible Lentiviral Vector for Gene Specific Analysis of Reprogramming. *PLoS One*. 2012;7(7):e41007. Epub 2012 Jul 18.
- 5) Nakamura S, Oshima M, Yuan J, Saraya A, Miyagi S, Konuma T, Yamazaki S, Osawa M, Nakauchi H, Koseki H, Iwama A. Bmi1 confers resistance to oxidative stress on hematopoietic stem cells. *PLoS One*. 2012;7(5):e36209. Epub 2012 May 11.
- 6) Nishida C, Kusubata K, Tashiro Y, Gritli I, Sato A, Ohki-Koizumi M, Morita Y, Nagano M, Sakamoto T, Koshikawa N, Kuchimaru T, Kizaka-Kondoh S, Seiki M, Nakauchi H, Heissig B, Hattori K. MT1-MMP plays a critical role in hematopoiesis by regulating HIF-mediated chemokine/cytokine gene transcription within niche cells. *Blood*. 2012 Jun 7;119(23):5405-16. Epub 2012 Apr 27.

#### 2. 学会発表

(国際学会)

- 1) Nakauchi H, “Stem Cell Niche and TGF-beta signaling”, EMBL Conference, Stem Cells in Cancer and Regenerative Medicine, I Heidelberg, Germany, Aug 31.

(国内学会)

学会発表準備中につき、特になし

研究分担者：小川誠司

#### 1. 論文発表

- 1) Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, Yamochoi T, Kagami Y, Tsutsumi A, Matsuda Y, Sato-Otsubo A, Muto S, Utsunomiya A,

- Yamaguchi K, Uchimaru K, Ogawa S, Watanabe T. Polycomb-Mediated Loss of miR-31 Activates NIK-Dependent NF-κB Pathway in Adult T Cell Leukemia and Other Cancers. *Cancer Cell*. 2012;21:121-35
- 2) Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, Wang R, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kitoh T, Goi K, Kudo K, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Blood*. 2012 Jan 18

2. 学会発表  
(国際学会)

- 1) Nagata Y, Sato A, Kon A, Okuno Y, Chiba K, Tanaka H, Shiraiishi Y, Yoshida K, Sanada M, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Oshima K, Miyawaki S, Kitanaka A, Miyano S, Watanabe T, Ogawa S "TET2 Mutations Revealed by Whole Genome Sequencing in Adult T-Cell Leukemia" The 54th annual meeting of American Society of Hematology. 2012, Atlanta, USA, 12.8-12.11

(国内学会)

- 1) Nagata Y, Sato A, Kon A, Okuno Y, Chiba K, Tanaka H, Shiraiishi Y, Yoshida K, Sanada M, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Oshima K, Miyawaki S, Kitanaka A, Miyano S, Watanabe T, Ogawa S "TET2 mutations revealed by whole exome sequencing in adult T-cell leukemia" 第71回日本癌学会学術集会、ロイトン札幌、2012年9月20日
- 2) Nagata Y, Sato A, Kon A, Okuno Y, Chiba K, Tanaka H, Shiraiishi Y, Yoshida K, Sanada M, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Oshima K, Miyawaki S, Kitanaka A, Miyano S, Watanabe T, Ogawa S "TET2 mutations revealed by whole exome sequencing in adult T-cell leukemia" 第74回日本血液学会学術集会、京都国際会議場、2012年10月19日
- 3) Asanuma S, Nakano K, Yamagishi M, Ogawa S, Yamaguchi K, Utsunomiya A, Watanabe T, "Aberrantly spliced Helios variants in ATL cells induce T cell proliferation", 第74回日本血液学会学術集会、京都国際会議場、2012年10月20日

研究分担者：内丸 薫

1. 論文発表

- 1) Asanuma S, Yamagishi M, Kawanami K, Nakano K, Sato-Otsubo A, Muto S, Sanada M, Yamochi T, Kobayashi S, Utsunomiya A, Iwanaga M, Yamaguchi K, Uchimaru K, Ogawa S, Watanabe T. Adult T-cell leukemia cells are characterized by abnormalities of Helios expression that promotes T-cell growth. *Cancer Sci*. 2013, in press (doi: 10.1111/cas.12181)
- 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
- 3) Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, Yamochi T, Kagami Y, Tsutsumi A, Matsuda Y, Sato-Otsubo A, Muto S, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru K, Ogawa S, Watanabe T. Polycomb-Mediated Loss of miR-31 Activates NIK-Dependent NF-κB Pathway in Adult T Cell Leukemia and Other Cancers. *Cancer Cell*. 21:121-35, 2012

(総説)

- 1) 内丸 薫 成人T細胞白血病・リンパ腫 成人病と生活習慣病 42: 743-747, 2012

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 2012
- 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 2012 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、宇都宮典、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 2012 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) Yamagishi M, Takahashi R, Nakano K, Asanuma S, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru K, Ogawa S, Watanabe T, “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、京都国際会議場、2012年10月19日(2012年10月19日—10月21日)
- 7) Kobayashi S, Watanabe E, Ishigaki T, Ohno N, Yuji K, Tsukada Y, Ohmoto A, Shimada N, Watanabe N, Tojo A, and Uchimaru K. 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 京都国際会議場、2012年10月19日
- 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(-)分画のフローサイテ解析第74回日本血液学会学術集会 2012 京都

研究分担者：矢持淑子

1. 論文発表

- 1) 塩沢英輔, 本間まゆみ, 矢持淑子, 瀧本雅文, 太田秀一、「悪性リンパ腫組織アトラス 菌状息肉症(図説)」、*昭和医学会雑誌*、72(1) : 94-95、2012
- 2) 塩沢英輔, 本間まゆみ, 矢持淑子, 瀧本雅文, 太田秀一、「悪性リンパ腫組織アトラス 原発性皮膚 CD30 陽性 T 細胞増殖性疾患(図説)」、*昭和医学会雑誌*、72(1) : 98-99、2012
- 3) 梅村宜弘, 本間まゆみ, 塩沢英輔, 矢持淑子, 瀧本雅文, 太田秀一、「Diffuse large B-cell lymphoma における細胞周期関連タンパク質発現の免疫組織化学的検討」、*昭和医学*

*会雑誌*、72(1) : 108-117、2012

- 4) 塩沢英輔, 本間まゆみ, 矢持淑子, 瀧本雅文, 太田秀一、「悪性リンパ腫組織アトラス 血管内大細胞型 B 細胞リンパ腫(図説)」、*昭和医学会雑誌*、72(2) : 209-211、2012
- 5) 塩沢英輔, 本間まゆみ, 矢持淑子, 瀧本雅文, 太田秀一、「悪性リンパ腫組織アトラス 中枢神経系原発びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (図説)」、*昭和医学会雑誌*、72(2) : 213-215、2012
- 6) 猿田祐輔、矢持淑子、野呂瀬朋子、九島巳樹、瀧本雅文、太田秀一、本間まゆみ、塩沢英輔、「炎症性皮膚疾患と鑑別を要する皮膚 T 細胞性リンパ腫の免疫組織化学および分子生物学的解析」、*昭和医学会雑誌*、72(2) : 246-258、2012
- 7) 塩沢英輔, 本間まゆみ, 矢持淑子, 瀧本雅文, 太田秀一、「悪性リンパ腫組織アトラス 高齢者 EBV 陽性びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫(図説)」、*昭和医学会雑誌*、72(3) : 319-322、2012
- 8) 塩沢英輔, 本間まゆみ, 矢持淑子, 瀧本雅文, 太田秀一、「悪性リンパ腫組織アトラス 芽球形質細胞様樹状細胞腫瘍(図説)」、*昭和医学会雑誌*、72(3) : 323-325、2012
- 9) 塩沢英輔, 本間まゆみ, 矢持淑子, 瀧本雅文, 太田秀一、「悪性リンパ腫組織アトラス 原発性滲出リンパ腫 (図説)」、*昭和医学会雑誌*、72(4) in press
- 10) 塩沢英輔, 本間まゆみ, 矢持淑子, 瀧本雅文, 太田秀一、「悪性リンパ腫組織アトラス 組織球肉腫 (図説)」、*昭和医学会雑誌*、72(4) in press
- 11) 塩沢英輔, 本間まゆみ, 矢持淑子, 瀧本雅文, 太田秀一、「悪性リンパ腫組織アトラス ヘアリー細胞白血病 (図説)」、*昭和医学会雑誌*、72(4) in press
- 12) 猿田祐輔, 宇野裕和, 中田土起丈, 秋山正基, 飯島正文, 塩沢英輔, 矢持淑子、「両下肢に色素斑、紫斑を呈し、慢性色素性紫斑を疑った CD8 陽性皮膚 T 細胞リンパ腫の 1 例」、*臨床皮膚科*、66(10) : 801-805、2012
- 13) Nakamaki T, Fukuchi K, Nakashima H, Ariizumi H, Maeda T, Saito B, Yanagisawa K, Tomoyasu S, Homma M, Shiozawa E, Yamochi-Onizuka T, Ota H. CD20 gene deletion causes a CD20-negative relapse in diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J*

*Haematol* 89(4): 350-355, 2012

- 14) 石原里美、本間まゆみ、佐々木陽介、塩沢英輔、野呂瀬朋子、矢持淑子、瀧本雅文、「濾胞性リンパ腫におけるユビキチンリガーゼ Skp2 の発現に関する免疫組織化学的検討」、*昭和医学会雑誌*、72(5) in press

## 2. 学会発表

- 1) 長村蔵人、濱田和俊、秋山正基、飯島正文、中牧剛、矢持淑子。慢性リンパ性白血病/小細胞性リンパ腫(CLL/SLL)に合併した毛包性ムチン沈着症の1例。第75回日本皮膚科学会東京支部学術大会、京王プラザホテル、2012年2月18-19日
- 2) 本間まゆみ、塩沢英輔、矢持淑子、瀧本雅文、太田秀一。B細胞性リンパ腫におけるSkp2、p27の発現に関する免疫組織化学的検討。第101回日本病理学会総会、京王プラザホテル、2012年4月26-28日
- 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・シンポジウム、東京大学医学研究所、2012年8月26日
- 4) 矢持忠徳、守田陽平、矢持淑子、サナズ フィルジ、佐々木陽介、渡辺信和、内丸 薫、宇都宮與、渡邊俊樹、太田 力。成人性T細胞性白血病におけるがん幹細胞の同定への試み。第71回日本癌学会学術総会、札幌、2012年9月20日
- 5) 佐々木陽介、岸本浩次、北村隆司、本間まゆみ、野呂瀬朋子、塩沢英輔、矢持淑子、九島巳樹、光谷俊幸、瀧本雅文。新たな時代を担う若手技師企画による診断困難症例の検討ボジキンリンパ腫再発との鑑別を要した濾胞性リンパ腫の一例。第51回日本臨床細胞学会秋期大会、朱鷺メッセ他、2012年11月9日

研究分担者：今井浩三

## 1. 論文発表

- 1) Aoki Y, Nojima M, Suzuki H, Yasui H,

Maruyama R, Yamamoto E, Itagaki M, Asaoku H, Asida M, Ikeda H, Hayashi T, Imai K, Mori M, Tokino T, Ishida T, Toyota M, Shinomura Y. Genomic vulnerability to global hypomethylation is a potential determinant of the clinicogenetic features of multiple myeloma. *Genome Biol*, in press, 2012.

- 2) Sawada T, Yamamoto E, Suzuki H, Nojima M, Maruyama R, Shioi Y, Akasaka R, Kamimae S, Harada T, Ashida M, Kai M, Adachi Y, Yamamoto H, Imai K, Toyota M, Itoh F, Sugai T. Association between genomic alterations and metastatic behavior of colorectal cancer identified by array-based comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, Epub ahead of print, 2012.
- 3) Maruyama R, Suzuki H, Yamamoto E, Imai K, Shinomura Y. Emerging links between epigenetic alterations and dysregulation of noncoding RNAs in cancer. *Tumor Biol*, 33(2):277-285, 2012.
- 4) Yasui H, Ishida T, Maruyama R, Nojima M, Ikeda H, Suzuki H, Hayashi T, Shinomura Y, Imai K. Model of translational cancer research in multiple myeloma. *Cancer Sci*, 103: 1907-1212, 2012.
- 5) Niinuma T, Suzuki H, Nojima M, Noshio K, Yamamoto H, Takamaru H, Yamamoto E, Maruyama R, Nobuoka T, Miyazaki Y, Nishida T, Bamba T, Kanda T, Ajioka Y, Taguchi T, Okahara S, Takahashi H, Nishida Y, Hosokawa M, Hasegawa T, Tokino T, Hirata K, Imai K, Toyota M, Shinomura Y. Upregulation of miR-196a and HOTAIR drive malignant character in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res*, 2012, 72(5): 1126-1136, 2012.

## 2. 学会発表

- (国際学会) なし  
(国内学会) なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし