

201313040A

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
(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25年度 総括研究報告書

研究代表者 村上 善則
平成26(2014)年3月

目 次

I. 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・・・・・・・・・・ 1

村上 善則

II. 分担研究報告

1. 臨床的解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1 3

内丸 薫

2. 病理学的解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1 9

後藤 明輝

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・ 2 5

IV. 研究成果の刊行物・印刷・・・・・・・・・・・・・・・・ 3 3

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

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 で高発現する細胞接着分子 TSLC1/CADM1 に注目し、CADM1 の機能阻害による ATL 細胞の浸潤、増殖抑制医薬品の開発を目指す基礎研究を行った。本年度は、PI3K が CADM1 下流で機能する知見に基づき、ATL 細胞の増殖が PI3K 阻害剤により抑制されることを見出した。また、ATL 細胞での CADM1 の N-型、O-型糖鎖構造を解析し、CADM1 機能を阻害する単クローン抗体の作成を進めた。さらに、ATL 細胞にレンチウイルスを用いて CADM1shRNA を導入する実験系を確立した。

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の解析：前年度までに開発した、固相化 CADM1 細胞外ドメインに CADM1 発現 MDCK 細胞、または ATL 細胞を重層し、細胞接着、細胞伸長を指標とする検定法を用いて、既知の低分子阻害化合物の CADM1 経路阻害効果の阻害の有無を検討した。

2. 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て行った。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。

3. CADM1 に対する中和抗体の作成:

CADM1 の細胞外ドメインに対する高親和性抗体を、遺伝子改変マウスに免疫して、単クローン抗体を作成した。CADM1 を介した細胞接着、細胞伸長活性を中和する活性をもつ抗体は作成後に選択する方針とした。

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:

CADM1 の発現を抑制する shRNA、並びに GFP をレンチウイルスにクローニングした。shRNA は 2 種類の別個の塩基配列を用いて 2 種類作成した。レンチウイルスに細胞への感染効率は、GFP 陽性細胞の肉眼的観察、GFP を測定する FACS 解析により評価した。

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解析:

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、細胞の接着活性、伸長活性の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 (2 種)、AKT 阻害剤、RAC1 阻害剤の添加により、CADM1 経路の活性化による細胞接着、細胞伸長が抑制される

ことが示された。また、本年度は MDCK 細胞ではなく数種の ATL 細胞をこの細胞接着・伸長アッセイに加えて同様の検討を行い、PI3K 阻害剤に細胞接着抑制活性があることを確認した。そこで本年度は、PI3K 阻害剤である LY290004, Wortmannin を ATL 細胞を含む様々ながん細胞に添加して、その効果を検討した。その結果、ATL 細胞である ATN1、HTLV-1 感染 T 細胞である MT2 では、他のがん細胞と比較して強い感受性を示し、10-100 μ M の濃度で増殖が強く抑制された。また、他のがん細胞との比較では、CADM1 の発現量が最も高い Caco-2 細胞が最も PI3K 阻害剤に対する感受性が高く、一方、CADM1 を発現しない SBC5 細胞では最も感受性が低かった。

次に、ATL 症例における PI3K のアルファ (PI3KCA)、ベータ (PI3KCB)、ガンマ (PI3KCG)、デルタ (PI3KCD) の 4 種の触媒サブユニット、並びに制御サブユニット (PI3KR) の発現を検討した。この結果、PI3KG の発現は ATL では全く認められなかった。一方、PI3KCA, PI3KR は正常リンパ球と比較して、ATL 細胞で高発現する傾向が示された。

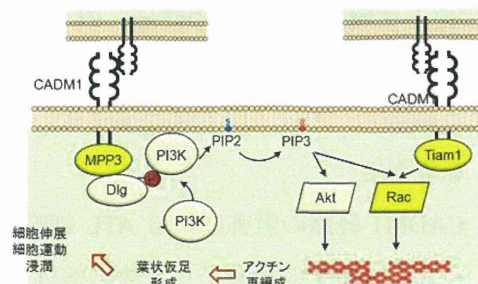


図 1. CADM1 と PI3K を含む分子経路

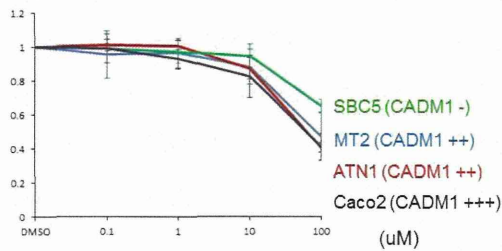


図2. ATL細胞等のPI3K阻害剤による増殖抑制

2. ATL細胞で発現するCADM1のN、O-糖鎖修飾の実態解明：

前年度まで解析により、ヒト胎児腎由来HEK293細胞に発現させた分泌型CADM1タンパク質では、N-型糖鎖として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い、ATL細胞では、上記4分岐構造のN-型糖鎖は主たる成分ではなく、別個のN-型糖鎖構造を特徴的に認めた。一方、O-型糖鎖の解析では、CADM1のエクソン8に相当するスレオニンに富む領域のO-型糖鎖の構造を、質量分析によって解析した。その結果、ATLで発現するCADM1のO型糖鎖のコア構造を決定するとともに、各スレオニン残基を修飾するO型糖鎖の繰り返し構造は大きくないことが明らかになった。

3. CADM1に対する中和抗体の作成：

CADM1の細胞外ドメインに対する高親和性抗体の作成を目指した。前者を作成する目的では、CADM1細胞外ドメインを免疫

グロブリンFc断片と融合させたプラスミドをHEK293細胞の導入、発現させ、培養上清に分泌、精製した抗原を、*Cadm1*遺伝子欠損マウスに免疫し、ハイブリドーマを作成した。期間内に中和活性を示す高特異性抗体、高親和性抗体を得ることはできなかったが、現在順調に作成中である。

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：CADM1の発現を強く抑制するsiRNA, shRNAを2種ずつ同定した。予備的にATL細胞にCADM1 siRNAを導入したところ、ATL細胞の繊維芽細胞への接着能や細胞伸展能が強く抑制された。次にこれらshRNAをU6発現カセットとしてレンチウイルスベクターに組み込み、shCADM1、GFPを発現するレンチウイルスを作成した。これを種々のATL細胞に導入し、CADM1の発現の低下した細胞群を得た。CADM1の発現低下はFACSにて確認した。そこでこれらの細胞に対して、固相化CADM1を用いた細胞接着・伸展アッセイを行ったところ、細胞接着能が有意に抑制された。

D. 考察

ATLで特異的に発現し、細胞浸潤を促進する免疫グロブリン・スーパーファミリー細胞接着分子CADM1を標的として、ATLの新規治療薬を開発する目的で、1. 下流分子経路を阻害する低分子化合物、2. 中和抗体、3. CADM1の発現を抑制するshRNA, miRNAを同定し、実用化につなげる基礎

研究を行った。固相化 CADM1 上に CADM1 発現細胞を重層する細胞アッセイは、細胞の接着や伸展を半定量化して示すことが可能であり、貴重な手法である。

本研究ではこのアッセイを用いて、CADM1 の下流に PI3K が作用することを見出し、前年度までの研究により、CADM1 – MPP3 – DLG – PI3Kp85 – AKT or RAC1 の分子経路を見出した。ATL では CADM1 が特異的に高発現を示すが、MPP3 も正常 T 細胞と比較して顕著に発現が増加する 20 個の遺伝子の中に入っており、この経路が ATL 細胞でも機能していることが示唆される。本年度の実験で、PI3K 阻害剤として LY290004, Wortmannin を ATL 細胞 ATN1 や、CADM1 を高発現する HTLV-1 感染細胞 MT2、その他種々の腫瘍細胞に添加したところ、ATN1, MT2 では 10-100 μ M の濃度で強い増殖抑制が認められ、他の腫瘍細胞と比較して、PI3K 阻害剤に対する感受性が高いと判断された。また、11 種の腫瘍細胞の中で、PI3K 阻害剤に対して最も感受性の高いのは CADM1 を最も高発現する Caco-2 細胞であり、最も抵抗性を示したのは CADM1 の発現を欠如した SBC5 細胞であったことから、PI3K 阻害剤の感受性が、少なくとも一部は CADM1 の発現量と関連する可能性が示唆された。最近 PI3K 阻害剤は、4 種類の PI3K 触媒サブユニットである PI3KCA, PI3KCB, PI3KCD, PI3KCG に各々特異的な阻害作用を示す薬剤が開発されて再評価され、臨床応用が進んでいる。ATL では結果の項で示したように、PI3KCA の

発現が、正常 T 細胞と比較して増加する傾向を示し、一方で PI3KCG の発現は全く認められなかった。今後は、CADM1 の下流で機能するサブユニット特異的な PI3K の解析と、各個別阻害剤の効果を検証する必要がある。

本研究では第 2 の目的として、CADM1 を標的とする診断、治療薬の開発のための基礎研究を掲げた。まず、CADM1 が N-型、O-型糖鎖修飾を受ける膜タンパク質であること、糖鎖修飾に組織、癌種に依存してある程度の特徴的修飾が認められ得ること、組織特異的なスプライシング・バリエントが O-型糖鎖修飾付加部位であるエクソン 8 の領域に認められることなどから、まず糖鎖構造の解析を質量分析により行った。前年度までの基礎的検討を受けて、今年度は、実際の ATL 細胞の N-型、O-型糖鎖構造を解析し、N-型糖鎖としては、上皮と異なる糖鎖修飾を特徴的に認めた。一方、O-型糖鎖については、ATL で発現する CADM1 の O 型糖鎖のコア構造を決定するとともに、抗体作成に関してより重要な事実として、各スレオニン残基を修飾する O 型糖鎖の繰り返し構造が大きいことを明らかにした。このことから、エクソン 8 に相当する断片のペプチド配列は、抗原性を保持している可能性が高いことが示唆された。

そこで、次に ATL に発現する CADM1 に特異性の高い単クローン性抗体の作成を試みた。抗 CADM1 抗体を用いた FACS による ATL 細胞の血液での診断法は、分担研

究者の内丸が示したように、ほぼ実用化している。ここでは ATL の治療を目指して、中和抗体の作成を、CADM1 細胞外ドメイン全体を抗原とする方法を採用した。CADM1 分子は種間の相同性が高く、これまでにウサギでは有効な抗体が作成できず、現在使われている単クローン抗体はトリで作成したものである。本研究では、前年度までに *Cadm1* の遺伝子欠損マウスを、C57BL6 の系統から Balb/c の系統に2年をかけて10回戻し交配を行い、Balb/c の *Cadm1* 遺伝子欠損マウスを作成してきた。*Cadm1* 遺伝子欠損マウスは内在性の CADM1 タンパク質を発現しないことから、CADM1 タンパク質を生体の異物と認識するはずである。そこで、CADM1 細胞外ドメインに免疫グロブリン Fc 断片を融合したタンパク質を HEK293 細胞に導入、発現、分泌させて、培養上清から CADM1 v8-Fc を精製して抗原とし、*Cadm1* 遺伝子欠損マウスを免疫した。現在、ハイブリドーマを作成中であり、CADM1 に対する親和性、中和活性の高い抗体を選別する予定である。

第3のプロジェクトは核酸医薬を用いて、ATL 細胞の CADM1 の発現を抑制し、細胞接着能、細胞伸長能の抑制を *in vitro* の活性、ヌードマウスでの腫瘍形成能、転移能を *in vivo* の活性として評価する研究である。前年度までに CADM1, Tiam1 の発現を抑制する siRNA を各々2種同定し、これをトランスフェクションにて ATL 細胞 ATL-3I に導入することにより、*in vitro* のヒト正常繊維芽細胞上に重層させた細胞

の接着性、細胞伸展性が顕著に抑制されることを示してきた。しかし、ATL-3I 細胞はマウスでの腫瘍原性が強くなく、ヌードマウスには腫瘍を形成せず、SKID マウスでもほとんど腫瘍を形成しないことから、*in vivo* の実験は、より適合する細胞系の樹立が必要である。本年度は、CADM1 shRNA を発現するレンチウイルスを作成した。細胞への導入の指標として、GFP 発現カセットも同じレンチウイルスに組み込ませた。これを ATL 細胞に導入し一過性の GFP 発現、並びに CADM1 発現を FACS を用いて解析したところ、GFP を発現し、かつ CADM1 の発現が顕著に低下した一群の細胞を分離することができた。同時に CADM1 の発現が低下し、細胞死を起こす細胞も一定量認められた。CADM1 発現が低下し、細胞死を示さない細胞群の増殖能は、野生型 ATL 細胞と比較して著変はなく、継代可能な状態である。今後、これらの細胞の接着性、伸長性、SKID マウスでの腫瘍原性や転移性を評価する予定である。

E. 結論

ATL の浸潤抑制の標的分子として CADM1 下流で機能する PI3K を同定し、Pi3K 阻害剤が ATL 細胞の増殖を抑制することを示した。また CADM1 に特徴的な糖鎖構造を見出し、CADM1 の中和抗体の作成を試みた。さらに CADM1 の発現を抑制する shRNA を組み込んだレンチウイルスを作成し、ATL 細胞に導入可能であることを示した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ebihara Y, Iwai M, Akashi K, Ito T, Omura G, Saito Y, Yoshida M, Ando M, Asakage T, Yamasoba T, Murakami Y. High incidence of null-type mutations of the TP53 gene in Japanese patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Cancer Therapy*, in press.
2. Wang F, Akashi K, Murakami Y, Inoue Y, Furuta T, Yamada H, Ohtomo K, Kiryu S. Detection of lung tumors in mice using a 1-Tesla compact magnetic resonance imaging system. *PLoS One*, in press.
3. Ibrahim R, Matsubara D, Osman W, Morikawa T, Goto A, Morita S, Ishikawa S, Aburatani H, Takai D, Nakajima J, Fukayama M, Niki T, Murakami Y. Expression of PRMT5 in lung adenocarcinoma and its significance in epithelial-mesenchymal transition. *Human Pathology*, in press.
4. Cortez VS, Cervantes-Barragan L, Song C, Gilfillan S, McDonald KG, Edelson BT, Murakami Y, Newberry RD, Sibley LD, Colonna M. CRTAM controls residency of gut CD4+CD8+T cells in the steady state and maintenance of gut CD4 TH17 during parasitic infection. *J Exp. Med.*, in press.
5. Mimae T, Hagiyaama M, Inoue T, Yoneshige A, Kato T, Okada M, Murakami Y, Ito A. Increased ectodomain shedding of lung-epithelial cell adhesion molecule 1 as a cause of increased alveolar cell apoptosis in emphysema. *Thorax*, in press.
6. Murakami S, Sakurai-Yageta M, Maruyama T, Murakami Y. Intercellular adhesion of CADM1 activates PI3K by forming a complex with MAGuK-family proteins MPP3 and Dlg. *PLoS One*, 9:e82894, 2014. (doi: 10.1371/journal.pone.0082894.)
7. Ito A, Ichianagi 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. 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)

9. Murakami Y, Yamamoto M. International collaboration to control cholangiocarcinoma. *J Hepato-Biliary and Pancreatic Science*, in press.
10. Ito T, Sakurai M, Goto A, Pairojkul C, Yongvanit P, Murakami Y. Genomic and transcriptional alterations of cholangiocarcinoma. *J Hepato-Biliary and Pancreatic Science*, in press.

2. 2. 学会発表

1. Kogai H, Sakurai-Yageta M, Delloye-Bourgeois C, Tauszig-Delamasure S, Mehlen P, Murakami Y. A cell adhesion molecule, CADM1, as a new type of dependence receptor. The 5th Dependence Receptor Meeting. Les Menuires, France, Jan. 16, 2013.
2. Murakami Y. Genomic and transcriptional alterations of cholangiocarcinoma. LFCRC Forum at Khon Kaen University. Khon Kaen, Thailand, Dec. 1, 2013.
3. 村上善則、斎藤光江、江見充。Copy Number Variation (CNV)の網羅的検索による癌のゲノム異常の解析。第58回日本人類遺伝学会年会、シンポジウム、仙台市、2013年11月20日。
4. Ito T, Sakurai M, Matsubara D, Murakami Y. Dual roles of a cell adhesion molecule, CADM1, in human

oncogenesis. Pathogenesis, Gene Regulation and Signal Transduction. The 9th China-Japan Joint Laboratory Workshop. Beijing, China, Nov. 1, 2013.

5. 小粥浩之、桜井美佳、村上善則。CADM1は新しいタイプの dependence receptor として、がん細胞の転移を抑制する。第72回日本癌学会総会、横浜市、2013年10月5日。
6. Murakami Y. Roles of a cell adhesion molecule CADM1 in epithelial integrity, invasion and metastasis. Symposium 9 “Research on Tumor Invasion and Metastasis toward Clinical Application. The 72th Annual Meeting of Japanese Cancer Association. Yokohama, Oct. 4, 2013.
7. 平郁、高橋由佳、齊藤光江、金谷淳志、明石健、伊東剛、村上 善則。乳がんにおけるコピー数多型(CNV)異常の解析。第72回日本癌学会学術総会、2013年、横浜、10月4日。
8. Ibrahim RA, Matsubara D, Osman W, Morikawa T, Morita S, Ishikawa S, Aburatani H, Fukayama M, Niki T, Murakami Y.. Expression of PRMT5 in lung adenocarcinoma: correlation with pathological features and prognosis. 第72回日本癌学会総会、横浜市、2013年10月4日。
9. 許淑真、桜井美佳、坪井裕見、村上善則。細胞接着分子 CADM1 による EGF 受容

- 体の分解制御機構の解明。第 72 回日本癌学会総会、横浜市、2013 年 10 月 3 日。
10. 坪井裕見、尾山大明、秦裕子、伊藤彰彦、村上善則。がん抑制遺伝子 CADM1 による Cbp を介した Src 経路抑制機構の解明。第 72 回日本癌学会総会、横浜市、2013 年 10 月 3 日。
 11. 花岡有紀、坪井裕見、松原大祐、村上善則。潰瘍性大腸炎の上皮再生機構における細胞接着分子 CADM1 の意義の解明。第 72 回日本癌学会総会、横浜市、2013 年 10 月 3 日。
 12. 平郁、高橋由佳、齋藤光江、金谷淳志、明石健、伊東剛、村上善則。High incidence of copy number alterations in breast cancer.第 11 回日本臨床腫瘍学会学術集会、仙台市、2013 年 8 月 30 日。
 13. 平郁、高橋由佳、齋藤光江、村上善則。乳癌における DNA コピー数多型の解析。第 21 回乳癌学会総会、浜松市、2013 年 6 月 27-29 日。
 14. Sakurai-Yageta M, Maruyama T, Kaneshiro K, Sekiya S, Iwamoto S, Tanaka K, Murakami Y. MALDI MS analysis of N-glycan structures of a cell adhesion molecule, CADM1, in various cancer cells. Annual Meeting of the American Society of Mass Spectrometry. June 9-13, 2013, Minneapolis, MN, USA.
 15. 花岡有紀、松原大祐、村上善則。潰瘍性大腸炎における細胞接着分子 CADM1 による上皮再生機構の解明。第 102 回日本病理学会総会、仙台市、2013 年 4 月 29 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

II. 分担研究報告書

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 ATL 患者において末梢血 CD4 陽性細胞の CD7/CADM1 発現の解析を行い、CD7dim/CADM1positive(D)、CD7negative /CADM1positive(N)の集団として検出される ATL としての基本的な性格を持つ細胞集団の割合を定量、 $25\% < D+N < 50\%$ の症例は無症候性キャリアとくすぶり型 ATL の中間段階の症例と考えられ、一群の病態として一つの entity と捉えられるべきであることを明らかにした。これらの症例の予後、臨床的位置づけなどを今後明確にして行く必要があるとともに、これらの集団に対する CADM1 阻害剤の効果の検討も今後の課題として重要である。

A. 研究目的

昨年度までに我々はATL患者末梢血CD4陽性T細胞におけるCD7、CADM1の発現をflow cytometryにより解析することにより（HAS-Flow2G）、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、本解析により検出されるCD7 positive/CADM1 negative(P)、CD7dim/CADM1positive(D)、CD7negative/CADM1positive(N)の3つの集団が無症候性キャリア(AC)からindolentATL、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、キャリアのD、Nとindolent ATLのD、Nは発現アレイ解析で同じクラスターに分画され、これらのD、N集団においてaggressive ATL細胞で発現の低下が報告されているmiR31の発現が2logレベルの低下を示すこと、およびHeliosのmRNA解析の結果、aggressive ATL細胞同様splicing variantのHel-2が主に発現していることなどを明らかにし、HTLV-1キャリアの段階からこれらD、Nの集団がATLとしての基本的な性格を持つことを明らかにしてきた。今年度はこれらの知見をもとにHTLV-1キャリアの中のハイ

リスクグループについて検討することを目的に以下の検討を行った。

B. 研究方法

当科に通院、入院中の HTLV-1 キャリア 30 例、ATL くすぶり型 6 例、慢性型 8 例合わせて 44 例を対象に末梢血単核球を分離後、real-time PCR により末梢血中プロウイルス量 (PVL) を定量した。またこれらの単核球を 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 (HAS-Flow 2G)。これにより検出される P、D、N の集団の割合を定量するとともに sorting し DNA を抽出、Pst I 切断により pX 領域に primer をおいて inverse PCR により clonality の検討を行った。

(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

キャリア 30 例のうち D または/および N の細胞集団に inverse PCR で major なバンドが 1 本明瞭に認められる major clone

pattern が 7 例、複数の明瞭なバンドが認められる oligoclonal pattern が 10 例、その他の polyclonal pattern が 13 例であった。

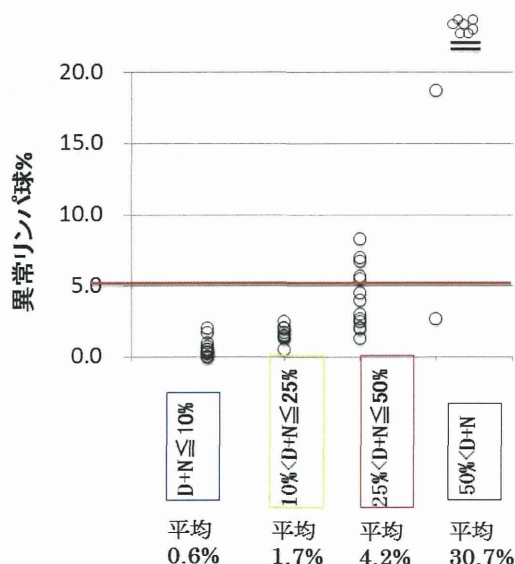


図 1. CD7/TSLC1 プロットに基づく分類と異常リンパ球の割合。

X 軸に D(%), Y 軸に N(%)を取ってプロットすると、そのうち PVL<4%の末血中プロウイルス量が低いケースは全例 D+N<10%の領域に分布した。これらを含め inverse PCR で polyclonal pattern のキャリアは 1 例を除いて全例 D+N<10%の領域に分布した。一方、oligoconal の 10 例は主に 10%~25%の領域に分布、major clone pattern の 7 例は 1 例を除いてほぼ 25%以上の領域に分布した。くすぶり型、慢性型の indolent ATL 症例は D+N<25%の症例はなく、oligoconal pattern のくすぶり型 2 例は 25%~50%の領域に分布、major clone 型の 4 例は 50% 前後の領域に分布

した。慢性型の8例は全例 major clone 型であり1例を除いて全例 $D+N>50\%$ であった。これらの症例の末梢血中異常リンパ球数を検討すると、 $D+N<10\%$ 、 $10\sim25\%$ 、 $25\sim50\%$ 、 50% と増加するにつれて増加し、 $D+N<25\%$ までは異常リンパ球の割合は全例 $<5\%$ であったが、 $25\%<D+N<50\%$ の症例は平均4.2%で5%ラインを挟んで上下に分布した(図1)。

D. 考察

昨年度までの検討で明らかにしてきたようにキャリアの段階から一部の症例で増加し始めるD、Nの集団はすでにclonalな増殖が始まっており、miR31の発現の低下、Heliosのsplicing 異常などaggressive ATLの腫瘍細胞と共通のcharacterを有しており、HTLV-1感染細胞の多段階発癌を考慮すると、これらD、Nの集団が増加したキャリアは indolent ATLとの中間段階と考えられる。今後のHTLV-1キャリアまでを想定した早期interventionを考慮すると、この中間段階にあるhigh risk groupの同定は重要である。今回我々はHTLV-1キャリア/indolent ATL患者を対象に末血中のCD4陽性細胞をHAS-Flow 2Gを用いて解析を行った。その結果、キャリアのうち $D+N<10\%$ の症例はほぼpolyclonalであるが、10%を超えるケースではほとんどがoligoclonal ~major cloneの増殖が見られる。一方、indolent ATLでは全例が $D+N>25\%$ であった。

$D+N$ の%ごとに末血中の異常リンパ球の%を検討してみると、図に示すごとく25%

$<D+N<50\%$ の集団が異常リンパ球5%前後の所に分布し、下山分類上5%以下のものは無症候性キャリア、5%を超えるものはくすぶり型ATLと診断される。しかし、この領域に分布するキャリアとくすぶり型ATL症例はD、Nの比率のみではなく、inverse PCRによるclonality解析でも区別はできない。実際このグループの症例を継時的にHAS-Flow 2Gで解析すると異常リンパ球が5%前後で推移し、下山分類上ある時は無症候性キャリア、ある時はくすぶり型ATLと診断されるという不合理が生じる(data not shown)。少なくともこれらの $25\%<D+N<50\%$ に分布するキャリア、くすぶり型ATLは一つの集団として新たなentityと考えるべきと考えられる。今後これらの症例の予後など、臨床的特徴を明確にしていく必要があるとともに、新規化合物による治療を考えるとときにこれらの集団を対象とすべきかどうかの検討も必要と考えられる。

E. 結論

HTLV-1 キャリア、indolent ATL をHAS-Flow 2G で解析した結果、一部のHTLV-1 キャリアはくすぶり型ATLと区別ができず、新たな entity として一群としてとらえるべきと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

1. Kobayashi S, Nakano K, Watanabe E, Ishigaki T, Ohno N, Yuji K, Oyaizu N, Asanuma S, Yamagishi M, Yamochi T, Watanabe N, Tojo A, Watanabe T and Uchimaru K. CADM1 expression and stepwise downregulation of CD7 are closely associated with clonal expansion of HTLV-1-infected cells in adult T-cell leukemia/lymphoma. Clin Cancer Res. 2014 in press.
 2. Ohno N, Kobayashi S, Ishigaki T, Yuji K, Kobayashi M, Sato K, Watanabe N, Tojo A, and Uchimaru K. Loss of CCR4 antigen expression after mogamulizumab therapy in a case of adult T-cell leukaemia-lymphoma. Ohno N, Br J Haematol. 2013 163(5):683-5. doi: 10.1111/bjh.12555.
 3. 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 and Watanabe T. Adult T-cell leukemia cells are characterized by abnormalities of Helios expression that promote T cell growth. Cancer Sci. 2013 Aug;104:1097-106. doi: 10.1111/cas.12181.
- 2.学会発表
1. 川俣豊隆、大野伸広、佐藤広太、小林真之、湯地晃一郎、田野崎隆二、山野嘉久、内丸薫、東條有伸. リンパ腫型 ATL に対する造血幹細胞移植後に生じ、中枢神経再発との鑑別を要した HAM 様脊髄炎の一例. 第 6 回 HTLV-1 研究会 2013 東京.
 2. 小林誠一郎、渡辺恵理、石垣知寛、大野伸広、渡辺信和、東條有伸、内丸薫. HAS-Flow 法を用いた HTLV-1 キャリア / くすぶり型 ATL 境界の検討. 第 6 回 HTLV-1 研究会 2013 東京.
 3. 城憲秀、大野伸広、小林真之、佐藤広太、川俣豊隆、石垣智寛、小林誠一郎、湯地晃一郎、内丸薫、東條有伸. 当科におけるモガムリズマブの使用経験. 第 75 回日本血液学会学術集会 2013 札幌.
 4. Kobayashi S, Watanabe E, Ishigaki T, Ohno N, Yuji K, Nakano K, Yamochi T, Watanabe T, Watanabe N, Tojo A and Uchimaru K. The CD7 vs CADM1 plot in FACS is useful for selection of advanced HTLV-1 carriers. 第 75 回日本血液学会学術集会 2013 札幌.
 5. 大野伸広、小林真之、佐藤広太、城憲秀、川俣豊隆、石垣智寛、小林誠一郎、渡辺信和、内丸薫、東條有伸、田野崎隆二. Aggressive ATL 患者の治療選択における同種造血幹細胞移植の意義の検討. 第 75 回日本血液学会学術集会 2013 札幌.
 6. Yamagishi M, Fujikawa D, Kurokawa

- N, Soejima A, Nakagawa S, Nakano K, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru K, and Watanabe T. Diverse ways of modulating Polycomb group function and host epigenome in adult T cell leukemia. 第 75 回日本血液学会学術集会 2013 札幌.
7. Watanabe E, Watanabe N, Kobayashi S, Uchimaru K, Suehiro Y, Choi I, Uike N. Analysis of ATL cells, Treg cells, NK cells and CCR4 expression using 12-color flow cytometry. 第 75 回日本血液学会学術集会 2013 札幌.
8. 佐藤奈津子、渡辺恵理、石垣知寛、小林誠一郎、大野伸広、崔日承、末廣陽子、鵜池直邦、内丸薫、渡辺信和. フローサイトメトリーによる ATL 細胞の解析法とその臨床検査への応用. 第 75 回日本血液学会学術集会 2013 札幌.
- 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
 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 症例につき、TSLC1/CADM1 の免疫組織化学的検討や関連する microRNA の検討を行った。

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。

同時に、総括研究者（村上）と協力して同

定した TSLC1/CADM1 抑制性 microRNA である miR-214/199a-5p と miR-375 の発現を ATL 病変において検討する。

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 2013 年にかけての 23 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、その特徴を明らかにする。また、病理解剖結果をもとに、ATL 進展の特徴を明らかにする。

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にする。

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 として過年度の研究で同定された miR-214/199a-5p と miR-375 につき、1.で得られた各症例のATL病変につきその発現を半定量的 PCR 法により測定し、CADM1 発現状態との相関を調査する。

G. 研究結果

1,秋田県での ATL 症例の臨床病理学的解析：

過年度に施行した5病院（秋田大学医学部附属病院および由利組合総合病院、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1990年より2010年度の病理解剖例の検索で、総計19例のATL症例を見出した。さらに、2010年度より2013年度の各病院の解剖例を新たに検索し、1例のATL症例を見出した。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：1の各症例（20症例68病変）につき、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いてTSLC1/CADM1免疫組織化学を施行した。TSLC1/CADM1発現を(-):0-30%のATL細胞に陽性、(+):30-70%のATL細胞に陽性、(++)：70%以上のATL細胞に陽性、と分類すると(-);0病変、(+);8病変(11.8%),(++);60病変(88.2%)であった。

(+)の8病変は2症例（84歳男性、急性型および74歳男性、くすぶり型）由来であった。検討した各症例の中でTSLC1/CADM1発現が(+)と(++)の病変が

混在することはなかった。

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、CADM13'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 を過年度の研究で同定した。2.でTSLC1/CADM1発現を検討した68病変のうち、TSLC1/CADM1発現(+)の8病変、(++)の18病変につき、ホルマリン固定パラフィン包埋切片よりRNAを採取し、半定量的PCR法(TaqMan microRNA assays)を用いてmiR-214/199a-5p と miR-375の発現量を測定、比較した。TSLC1/CADM1発現(+)および(++)の病変の間で、これらのマイクロRNA発現量に有意な差はみられなかった。

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