

## 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。

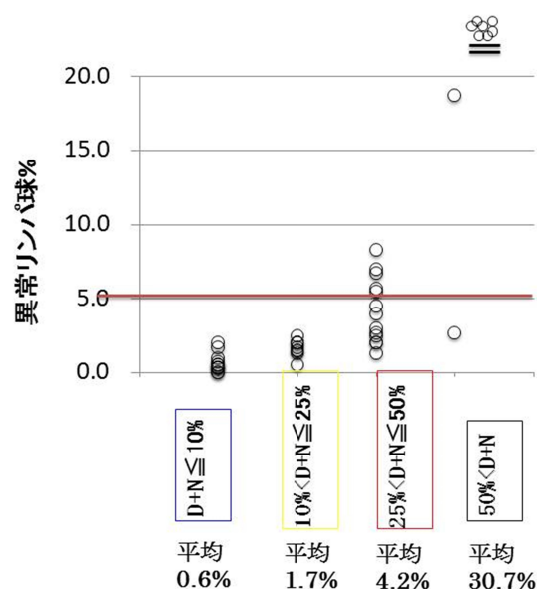


図1 . CD7/TSLC1 プロットに基づく分類と異常リンパ球の割合。

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.
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

## 2.学会発表

- 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。

#### A. 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。

#### B. 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。

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。

### C. 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、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

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、過年度19例、本年度1例の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20症例68病変に行い、88.2%の病変でTSLC1/CADM1 の強発現を確認した。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。また、2例8病変でTSLC1/CADM1 の発現が中等度陽性にとどまる。これらの症例に関しては、化学療法施行前生検検体でのATL細胞のTSLC1/CADM1 発現を検討することによって、TSLC1/CADM1 が疾病の経過中に減弱したのか、あるいはこの2症例の病理解剖

例のパラフィンブロックの状態が不良であったのか、検証を要すると考える。

CADM1 の発現を抑制する miR-214/199a-5p と miR-375 に関し、TSLC1/CADM1 発現(+) および(++)の病変の間で、発現量に有意な差はみられなかった。病理検体を用いた検討では、ATL 細胞以外の反応性リンパ球や各種細胞の混入が避けられないため、ATL 細胞に限定した microRNA 測定が困難であった可能性がある。

#### E . 結論

秋田県内病院の20例のATL病理解剖例につき、免疫組織化学的にTSLC1/CADM1 高発現が検討病変中の88.2%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

1. Tanino M, Sasajima T, Nanjo H, Akesaka S, Kagaya M, Kimura T, Ishida Y, Oda M, Takahashi M, Sugawara T, Yoshioka T, Nishihara H, Akagami Y, Goto A, Minamiya Y, Tanaka S; R-IHC Study Group. Rapid immunohistochemistry based on alternating current electric field for intraoperative diagnosis of brain tumors. *Tumor Pathol.* (In press)

2. 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. *Hum Pathol*. (In press)
  3. Ragin C, Obikoya-Malomo M, Kim S, Chen Z, Flores-Obando R, Gibbs D, Koriyama C, Aguayo F, Koshiol J, Caporaso NE, Carpagnano GE, Ciotti M, Dosaka-Akita H, Fukayama M, Goto A, Spandidos DA, Gorgoulis V, Heideman DA, van Boerdonk RA, Hiroshima K, Iwakawa R, Kastrinakis NG, Kinoshita I, Akiba S, Landi MT, Eugene Liu H, Wang JL, Mehra R, Khuri FR, Lim WT, Owonikoko TK, Ramalingam S, Sarchianaki E, Syrjanen K, Tsao MS, Sykes J, Hee SW, Yokota J, Zaravinos A, Taioli E. HPV-associated lung cancers: an international pooled analysis. *Carcinogenesis*. (In press)
  4. Dobashi Y, Goto A, Endo T, Ooi A. Genetic aberrations as the targets of oncology research: Involvement of paraffin-embedded tissues. *Histol Histopathol*. 29(2):191-205, 2014
  5. 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*. 182(6):2191-203. 2013
  6. 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
  7. Minamiya Y, Goto A, Nanjo H, Saito H, Motoyama S, Sato Y, Kudo S, Takashima S, Kawaharada Y, Kurihara N, Orino K, Ogawa J, Imai K, Bronchioloalveolar invasion in non-small cell lung cancer is associated with expression of transforming growth factor- $\beta$ 1. *World J Surg Oncol*. 25;11:113, 2013
2. 学会発表
    1. 吉田 誠 ,南條 博 ,吉岡年明 ,渡辺 剛 ,山本雄造 ,高橋正人 ,柴原純二 ,後藤明輝 , 多彩な組織を呈した原発性肝腫瘍の一例. 第 102 回日本病理学会総会 , 札幌、6 月 8 日
    2. 伊藤行信 ,吉田 誠 ,高橋正人 ,南條 博 ,

- 川村公一, 後藤明輝, 静脈への動脈パッチ移植することにより発生した新生血管の研究. 第 102 回日本病理学会総会, 札幌、6月7日
3. 南條 博, 吉岡年明, 高橋正人, 吉田 誠, 廣島優子, 笹嶋寿郎, 南谷佳弘, 赤上陽一, 後藤明輝, 秋田で開発した迅速免疫染色技術を用いた術中迅速病理診断の有用性. 第 102 回日本病理学会総会, 札幌、6月8日
4. 廣島優子, 南條 博, 高橋正人, 吉田 誠, 藤本俊郎, 後藤明輝, 子宮原発 PNET/Ewing's sarcoma の一例. 第 102 回日本病理学会総会, 札幌、6月6日
5. 吉岡年明, 山本洋平, 大森泰文, 南條博, 後藤明輝, 榎本克彦. インテグリン  $\beta 4$  による ErbB2 や c-Met シグナリングの増幅は, 前立腺癌細胞の腫瘍発生を促進する 第 102 回日本病理学会総会, 札幌、6月8日
6. 増田弘毅, 吉田 誠, 高橋正人, 伊藤行信, 川村公一, 後藤明輝, 動脈リモデリングの解析-血流負荷家兔総頸動脈における内弾性板ギャップの発生メカニズム. 第 102 回日本病理学会総会, 札幌、6月7日
7. 高橋正人, 吉田 誠, 伊藤行信, 川村公一, 南條 博, 増田弘毅, 後藤明輝, 動静脈吻合後の静脈狭窄に関する実験病理学的検討. 第 102 回日本病理学会総会, 札幌、6月7日
8. 盛田茂樹, 国田朱子, 後藤明輝, 佐久間 慶, 山村はるみ, 深山正久. 肺腺癌の腫瘍間質における miR-21 の発現に関する検討. 第 102 回日本病理学会総会, 札幌、6月8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

