

201313040B

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23-25年度 総合研究報告書

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

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 3 3

III. 研究成果の刊行物・印刷 4 7

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. 総合研究報告書

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）

（総合）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 を分子標的として、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、並びに診断医薬確立を目指す基礎研究を行った。まず ATL 症例における CADM1 発現の実態を解明し、治療標的としては、CADM1 分子経路阻害剤の探索系を開発して下流分子 PI3K を同定し、Pi3K 阻害剤が有望な ATL 治療薬候補であることを見出した。また、中和抗体の作成を試み、さらに shRNA 発現レンチウイルスを作成し、ATL 浸潤抑制核酸医薬の基礎的知見を得た。診断標的に関しては、分担研究者内丸らが TSLC1/CADM1 特異抗体を用いた FACS 系を樹立、実用化し、CD7 と TSLC1/CADM1 を指標として ATL の病型が分類可能なこと、無症候性キャリアとくすぶり型が連続集団として把握できることを示した。

研究分担者

内丸 薫・東京大学・准教授

後藤 明輝・秋田大学・教授

A. 研究目的

ATL で高発現する細胞接着分子 TSLC1/CADM1 を分子標的として、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、並びに診断医薬確立を目指す基礎研究を行うことを目的とする。まず、分担研究者の東京大学内丸博士は内科学的に、秋田大学の後藤博士は病理学的に、ATL 症例における CADM1 発現の実態解明を目指す。次に、研究代表者の東京大学村

上博士は、CADM1 を ATL の治療標的として確立することを目指して、1) ATL における CADM1 下流分子経路の解明による CADM1 機能阻害新規低分子化合物の同定、2) CADM1 機能を阻害する中和抗体の作成、3) CADM1, Tiam1 等の発現を抑制する核酸医薬の開発を行う。さらに、CADM1 を ATL の診断標的として確立する研究においては、分担研究者の内丸博士が、CD7 と CADM1 を指標とする FACS 解析により、患者末梢血を用いた ATL 細胞の診断、分画法の確立を目指す。

B. 研究方法

1. 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。次に、このようにして同定された 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。さらに、本研究に寄り CADM1 の発現を抑制する miRNA として同定した miR-214/199a-5p と miR-375 について、上記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した。

2. 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：

CADM1 のホモ二量体同志の細胞間接着シグナルを模倣する目的で、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の発現ベクターを作成し、HEK293 細胞に導入、発現させ、培養上清に分泌される CADM1-Fc断片をカラムにて精製し、カバーガラス上に固相化した。この上に、CADM1 導入 MDCK 細胞を重層して培養し、40 分—75 分後の接着細胞の割合、また接着細胞中の伸長細胞の割合を検討した。固相化 CADM1-Fc 上に CADM1 非導入（ベクター単独）MDCK 細胞を重層する実

験、また固相化 IgG 上に CADM1 導入、非 MDCK 細胞を重層する実験を対照群として用い、100 細胞以上を計測して定量会した。この細胞接着・伸長アッセイを用いると CADM1 発現 MDCK 細胞の伸長能は、対照群と比較して約 200%に増加する。一方、アクチン合成阻害剤であるサイトカラシン D や CADM1 のトリ中和抗体である 9D2 を添加すると、この伸長能は用量依存性に阻害される。さらに、CADM1 の細胞内ドメインを欠失させたプラスミドを発現した MDCK 細胞でも伸長反応は完全に阻害される。そこで、このアッセイに機能既知の 92 種類の低分子阻害剤（がん特定研究班より供与）を 10 μ M の濃度で添加し、細胞接着、細胞伸長の抑制の有無を検討した。この解析で同定された CADM1 経路の下流因子 PI3K については、文献上やモチーフ解析により結合タンパク質を検索し、免疫沈降・ウェスタンブロット法、GST プルダウン法により確認した。Pi3K 阻害剤としては、LY290004、Wartmannin を用いた。

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、上皮細胞については、HEK293 細胞に発現させた CADM1-Fc断片を培養上清からカラムにて精製したタンパク質（ヒト胎児性腎細胞での糖鎖修飾）を用い、一方、ATL 細胞での糖鎖修飾は、培養 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 タンパク質を用いて行った。これら

の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 に対する中和抗体の作成:

CADM1 に対する抗体治療薬の開発を目指して、CADM1 の細胞外ドメインに対する高親和性抗体の作成を試みた。現在、CADM1 の中和抗体としてはトリ単クローン抗体が広く用いられているが、その親和性が高くなく、またトリ由来であるので、抗体医薬としては使えない。また、これまでウサギ、マウスを用いた抗体作成を繰り返したが、CADM1 構造の種間での保存度の高さなどから、有効な抗体が得られていない。そこで、今回は *Cadm1* 遺伝子欠損マウスに CADM1 細胞外ドメインを免疫することにより、宿主マウスにとって異物と認識される CADM1 タンパク質に対する抗体の産生を期待した。まず、最初の2年間をかけて、C56BL6/Sv125 系統で作成された *Cadm1* 遺伝子欠損ヘテロマウスを、抗体産生に有利な Balb/c 系統のマウスに10回戻し交配を行い、系統特異的マーカーで検証することにより、Balb/c 系統の *Cadm1* 遺伝子欠損マウスを作成した。このマウスに、HEK293 細胞から精製した CADM1-Fc 断片を免疫し、抗体作成を試みた。得られた抗体の特異性は、内在性 CADM を発現しない MDCK 細胞に CADM1 全長、並びに種々の CADM1 欠失変異体、スプライシング・バリエーションを発現させた細胞に対する反応性で検証し、中和活性は固相化

CADM1 を用いた細胞接着・伸長活性で評価した。

5. 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 siRNA, shRNA, miRNA をデータベース検索によって予測し、実際の CADM1 タンパク質発現によって確認した。各々2分子種ずつ作成した。また CADM1 発現抑制による生物学的機能は、細胞接着・伸長アッセイや、細胞増殖、細胞死などを指標として検討した。また、レンチウイルスへのクローニングは定法に従って行ったが、GFP 遺伝子を同時に組み込んだ。レンチウイルスの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。

6. CADM1 を表面抗原とする ATL 細胞診断法開発の基礎実験:

HAS-Flow 1G に biotin 化抗 TSLC1 抗体を加え PE-storeptavidin で染色し FACS Aria で解析した。HTLV-1 キャリア 9 例、ATL くすぶり型 2 例、慢性型 5 例、急性型 5 例を対象とした。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)。

次に、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 HAS-Flow 2G を用いて CD7/TSLC1 でプロットした。CD7/TSLC1 発現により

CD7(+)/TSLC1(-)(=P)、CD7dim/TSLC1(+)(=D)、CD7(-)/TSLC1(+)(=N)の3群を sorting し、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。キャリア2例、くすぶり型2例、慢性型1例、急性型3例および健常人コントロール3例の末梢血サンプルを用いて各群の 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。

さらに当科に通院、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。これらの症例を HAS-Flow 2G で解析し、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)

1 に記載した ATL 病理解剖例の臨床病理学的検討、免疫組織化学及びマイクロ RNA 解析を含む研究に当たっては、病理解剖時にすでに研究目的で検体を解析することに

については承諾を得ているとともに、研究にあたっての秋田大学学内倫理委員会の承認を受ける。6 に記載した臨床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

1. ATL 症例の臨床病理学的解析 (分担研究者 後藤明輝博士)

秋田県内の 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 2013 年度の病理解剖例の検索で、総計 20 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。

そこで、秋田県 ATL 症例での TSLC1/CADM1 異常について検討した。まず、上記の通り見出された ATL 病理解剖例のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックのタンパク保存状態を確認するため、ビメンチンに対する免疫組織化学を施行した。その結果、各症例のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックが免疫組織化学を行うに足る良好な保存状態であることを確認した。そのうえで、TSLC1/CADM1 免疫組織化学を 20 症例 68 病変につき施行した。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 (図 1)、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、(++)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。

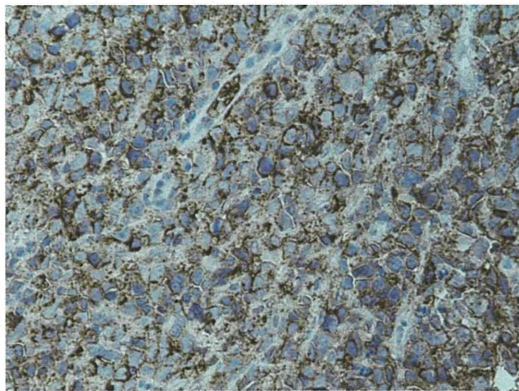


図1. CADM1を強発現するATL症例

次に、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を行った。即ち、研究代表者と協力し、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

った。

2. 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:

まず、固相化CADM1細胞外断片上に、CADM1発現MDCK細胞を重層し、その接着性、伸長性を指標としてCADM1経路の活性を半定量的に評価する細胞を用いたアッセイ系を樹立した。また、MDCK細胞の代わりにATL細胞を用いる系も開発し、浮遊状態にあるATL細胞を遠心して固相化CADM1上に重層することにより同様のアッセイが可能となった。次に、MDCK細胞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、92種の低分子化合物の中で、LY290004, Wortmanninの2種が強い伸長阻害活性を示し、その他に数種の比較的強い阻害作用を示す低分子化合物を同定した。LY290004, Wortmanninは、ともにPI3K阻害剤であることから、CADM1を介する細胞伸長反応のPI3Kが関わっていることが示唆された(図2)。

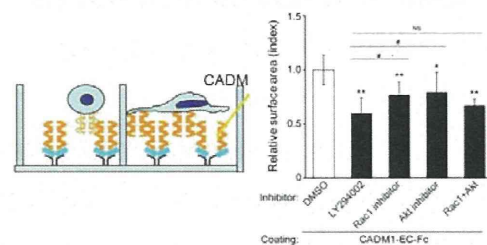


図2. PI3K, AKT, Rac1各阻害剤による細胞伸長の抑制

CADM1 は MPP3 と結合し、MPP3 が ATL 細胞で正常 CD4(+) T 細胞と比較して発現が増加していることは以前に報告している。そこで、文献上 MPP3 と結合し、PI3K p85 サブユニットとも結合することが知られている DLG1 に着目し、免疫沈降・ウェスタンブロット法、GST プルダウン法により、CADM1-MPP3-DLG-p85 の相互作用を示した (図 3)。また、PI3K の下流には、AKT, RAC1 が機能することが知られている。そこで、各々の阻害剤を細胞接着・伸展アッセイで評価したところ、AKT 阻害剤、RAC1 阻害剤単独投与では、各々 PI3K 阻害剤の効果の約半分にあたる 50% 程度の阻害効果を示したが、両者を共添加すると、ほぼ PI3K 阻害剤と同等の 100% 阻害効果を示した。従って、PI3K の下流に AKT, RAC1 が独立に位置することが示唆された (図 2)。

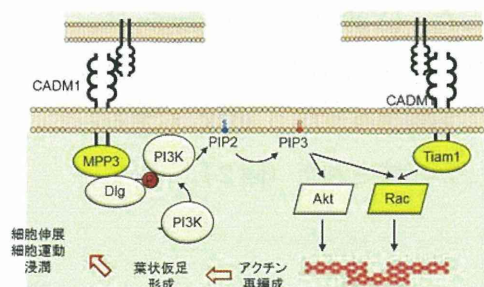


図 3. CADM1 と PI3K を含む分子経路。

そこで、PI3K 阻害剤である LY290004 を 11 種類の腫瘍細胞に投与して、細胞増殖抑制効果を検証した。この結果、ATL 細胞である AKT-3I と、HTLV-1 感染細胞である MT2 では、比較的強い増殖抑制効果が認められた。また、CADM1 の発現のない SBC5

細胞では、最も LY290004 の増殖阻害効果が弱く、一方、CADM1 を最も高発現する Caco2 細胞が最も増殖抑制効果が強かった。従って、CADM1 の発現量と LY290004 の感受性が少なくとも部分的には関連することが示唆された。

最後に、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、PI3K 阻害剤の発現は 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。

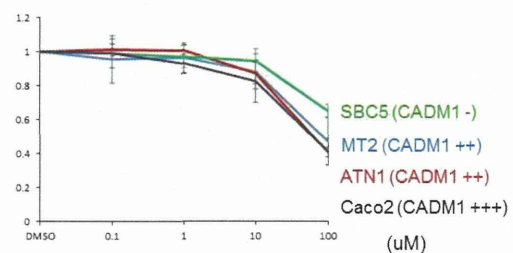


図 4. ATL 細胞等の PI3K 阻害剤による増殖抑制

3. ATL で発現する CADM1 の N, O-糖鎖修飾の実態解明:

ATL 細胞に発現する CADM1 タンパク質も、上皮のそれと同様に、N-グリコシダーゼ、O-グリコシダーゼ、シアルダーゼにより分子量が低下し、N-型、O-型糖鎖修飾を受けることが示された。そこで、まずヒト胎児腎由来 HEK293 細胞に発現させた分泌型

CADM1 タンパク質を精製してトリプシン消化し、その分解産物を質量分析により解析した。その結果、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。次に、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-型糖鎖構造が特徴的に認められることを見出した。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型糖鎖のコア構造が決定できた。さら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。

4. 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、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を得ることはできなかったが、現在順調に作成中である。

5. 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 siRNA, shRNA, miRNA 等によって抑制する核酸医薬の開発を目指

して、以前同定していた CADM1 の発現を抑制する siRNA に加えて、miRNA の同定を試み、miR-214, miR-375 を同定した。miR-214, miR-375 はともに、培養がん細胞に導入すると CADM1 タンパク質の発現が低下した。また、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、細胞接着能が抑制された。

6. CADM1 を表面抗原とする ATL 細胞診断法開発の基礎実験：

HAS-Flow 2G による解析により HTLV-1 感染細胞は腫瘍化の過程で CD7 の発現レベルが低下するとともに TSLC-1 が発現し、病期の進行とともに TSLC1(+)/CD7 dim~negative の集団が増加することが明らかになった。各分画を sorting して real-time PCR、および FISH により解析したところこれらの集団はほとんどが HTLV-1 感染細胞と考えられた。inverse long PCR で検討したところ CD7 dim, negative には共通の

major clone が出現しており、TSLC1(+)/CD7 dim→negative へと clonal evolution しているものと考えられた。HAS-Flow 2G は 1G に比較して明瞭に P、D、N の集団を分画することが可能であった。

そこで、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。

さらにキャリアおよび indolent ATL 症例を対象に HAS-Flow 2G による D、N 集団の割合、clonality および末梢血異常リンパ球比率などを比較したところ、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。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%~25%、25%~50%、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 5)。

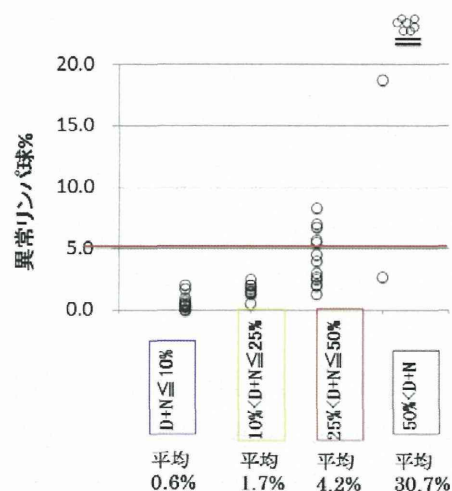


図 5. CD7/TSLC1 プロットに基づく分類

と異常リンパ球の割合。

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。一方、診断を目的とする研究では、分担研究者の内丸博士が、CD7, CADM1 を指標とする FACS 解析を ATL 患者末梢血を用いて行うことにより、非常に有益な診断法を開発した。さらに、分担研究者の後藤博士は、秋田県における ATL 症例について主として病理学的見地から、CADM1 遺伝子発現の実態解明を行った。

まず、CADM1 の分子経路の解明と低分子阻害化合物の同定に関しては、研究代表者の村上らが開発した固相化 CADM1 上に CADM1 発現細胞を重層する細胞アッセイが、細胞の接着や伸展を半定量化して示すことが可能であることから、貴重な手法となり、本研究に貢献した。

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、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。さらに、PI3K の下流経路を検索し、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、PI3K, AKT, RAC1 の阻害剤を組み合わせることによる治療効果を探る必要が生じた。

そこで、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 の発現量と相関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、治療開発に関する第2の目的として、細胞膜分子としての CADM1 を標的とする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・バリエーションが 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、CADM1 細胞外ドメインを免疫グロブリン Fc 断片に融合し、HEK293 細胞に導入、発現させて分泌、精製した高純度の CADM1 について、ヒト胎児腎細胞での糖鎖付加を反映する糖鎖構造の解析を質量分析により行った。次に、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くな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。

治療に関する第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* で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。

一方、分担研究者の内丸博士は、細胞表面抗原としてのCADM1を、ATLの診断マーカーとして確立する研究をおこなった。そして、HTLV-1 ウイルス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 異常などアグレッシブATLの腫瘍細胞と共通の性質を有しており、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介入を考慮すると、この中間段階にあるハイリスクグループ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+L<10%の症例は、ほぼポリクローナルであるが、10%を超える症例ではほとんどがオリゴクローナルからメジャークローンの増殖が見られる。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、インバースPCRによるクローナリティー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エンティティー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。

以上、CADM1/TSLC1を標的とするATL n 治療法、診断法の確立について考察した。その前提として、ATL症例におけるCADM1の発現異常の実態を広く検証する必要がある。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。従って、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。

そこで分担研究者である後藤博士は、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研究を進めた。まず、秋田県内各病院の病理解剖例の参照により、合計20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。

また、本調査の過程で、病理解剖を行わなかったATL症例のリンパ節、皮膚、骨髄生検検体も秋田県内の調査対象とした病院に多数存在することが確認された。これらの生検検体病理組織ブロックより組織マイクロアレイなどを作成すれば、本研究課題目的の検収、あるいはATL研究一般の重要なバイオリソースになるものと考えられる。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、検証を要すると考える。なお、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、今回
の研究で用いた手法(半定量的 PCR 法)では
ATL 細胞に限定した microRNA 測定が困難
な可能性がある。In situ hybridization 法によ
るマイクロRNAの評価など、別の手法で
の発現評価を行う必要があるものと考察さ
れた。

E. 結論

CADM1 を ATL の浸潤抑制に対する治療の
標的分子と捉え、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。一方、
膜上で発現する CADM1 を ATL の診断の標
的分子として捉えた研究では、CD7 と
TSLC1/CADM1 を指標とした FACS を用い
て、ATL 症例や HTLV-1 ウイルスの無症候
性キャリアーの末梢血中の ATL 細胞を同定
できることを明らかにし、臨床応用可能な
系を確立した。また秋田県における ATL に
おける CADM1 の発現異常の実態が、これ
までに報告されてきた西南日本のそれと変
わらないことを実証した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表：4 4 件

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. 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.
7. 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.)
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. 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)
10. 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. *J Cancer Therapy*, 3:379-387, 2012. (DOI: 10.4236/jct.2012.324050)
11. 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.)
12. 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)

13. 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.)
14. 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)
15. 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.)
16. 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.)
17. 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.)
18. Ito T, Williams-Nate Y, Iwai M, Tsuboi M, Hagiyaama M, Ito A, Sakurai-Yageta M, and Murakami Y. Transcriptional regulation of the *CADM1* gene by retinoic acid during the neural differentiation of murine embryonal carcinoma P19 cells. *Genes to Cells*, 16:791-802. 2011.
19. Hagiyaama M, Furuno T, Hosokawa Y, Iino T, Ito T, Inoue T, Kakanishi M, Murakami Y and Ito A. Enhanced Nerve-Mast Cell Interaction by a Neuronal Short Isoform of Cell Adhesion Molecule-1, CADM1. *J Immunology*, 186; 5983-5992, 2011.
20. Mimae T, Tsuta K, Takahashi F, Yoshida A, Kondo T, Murakami Y, Okada M, Takeuchi M, Asamura H, Tsuda H. Steroid Receptor Expression in Thymomas and Thymic Carcinomas. *Cancer*, 117:4396-4405, 2011.
21. Hosokawa Y, Hagiyaama M, Iino T, Murakami Y, Ito A. Non-contact estimation of intercellular breaking force using a femtosecond laser impulse quantified by atomic force microscopy.

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,
108:1777-1782, 2011.
22. 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.
 23. 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. *Br J Haematol*. 2013 163(5):683-5. doi: 10.1111/bjh.12555.
 24. 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.
 25. 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
 26. 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
 27. Makoto Yamagishi^{1,2}, Kazumi Nakano¹, Ariko Miyake¹, Tadanori Yamochi¹, Yayoi Kagami¹, Akihisa, Tsutsumi¹, Yuka Matsuda¹, Aiko Sato-Otsubo³, Satsuki Muto^{1,3}, Atae Utsunomiya⁴, Kazunari Yamaguchi⁵, Kaoru Uchimaru⁶, Seishi Ogawa³, and Toshiki Watanabe. Polycomb-Mediated Loss of miR-31 Activates NIK-dependent NF-κB Pathway in Adult T-cell Leukemia and Other Cancers. *Cancer Cell*. 2012 21(1):121-135.
 28. Tsuda M, Ebihara Y, Mochizuki S, Uchimaru K, Tojo A, Tsuji K. Reduced dose chemotherapy for acute promyelocytic leukemia with adult Down syndrome. *British Journal of Haematology*, 155, 122-132, 2011.
 29. Yamin Tian, Seiichiro Kobayashi, Nobuhiro Ohno, Masamichi Isobe, Mayuko Tsuda, Yuji Zaike, Nobukazu Watanabe,