

201313045A

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25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26(2014)年3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25年度総括・分担研究報告書

研究代表者
渡邊 俊樹

平成26(2014)年3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	6
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	24
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	36
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	44
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	48
小川 誠司	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	53
IV. 研究成果の刊行物・別刷	57

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：本研究は、研究代表者らの実績である ATL 細胞のゲノム異常や分子病態の情報データベース、ATL 細胞における miR-31 の特異的発現欠損の知見に加え、がんの抗体療法開発の実績、および ATL がん幹細胞の研究成果を背景にして、「単鎖抗体を利用した ATL がん幹細胞への miRNA 導入による ATL 治癒を目指す革新的治療開発」を可能にする基盤形成を目指すものである。前年度と同様に、治療を目指した単鎖抗体開発を軸に3つの柱にわけ、研究を進めた。具体的には、1) miRNA 導入法の開発と *in vitro*, *in vivo* における検証、2) がん幹細胞の解析とマーカー探索、3) 網羅的解析を基盤とした新規分子標的の探索、である。本年度は、以下の様な知見を得た。1) miRNA 導入法の開発と *in vitro*, *in vivo* における検証：miRNA 結合用ペプチドを融合した scFV の精製は核酸の非特異的結合のため、著しく困難であることが判明した。そこで、C-末端に Cysteine 残基を付加した Cysteine-tag-scFV を作成し *in vitro* conjugation を行うことにした。作製した抗体の活性を確認後、化学合成 miRNA 結合ペプチドを chemical conjugation を試み、miRNA chemical conjugate-scFV の作成に成功した。抗原との結合活性を確認し、更に、細胞との結合活性 FACS を用いて検証して、培養細胞を用いて生物学的活性の検証を進めている。2) “tumor initiating cell(TIC)”の定義を満たす継代可能腫瘍細胞集団のマーカー解析では、マーカーの発現が変遷することから TIC を規定するものは同定出来ていない。従って ATL における TIC の集団は、浅い hierarchy を示す腫瘍の一例である事が想定された。また、移植マウス個体内での腫瘍細胞の分布の解析を進め、共通の腫瘍細胞浸潤部位を明らかにし、がん幹細胞の niche の候補を明らかにした。3) ATL 細胞におけるエピジェネティック異常を検討し、EZH2 の過剰発現機構、p38 シグナル活性化機構等に新規の知見を得た。更に、高速シーケンス技術を用いた全エクソン解析による網羅的な遺伝子変異解析により RHOA 変異を同定し解析中である。

研究分担者：

津本浩平 東京大学工学系研究科・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 京都大学大学院・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-kB 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-kB 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- κ 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。本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へ向けて更に研究を進めるとともに、新規治療標的探索の作業を継続した。

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.システイン付加単鎖抗体(scFvC)の作成

前年度の研究で、ペプチドを融合させていない単鎖抗体(scFv-WT)は除核酸が可能であり、

比較的安定した純度の良好な精製が可能であることを確認できていた。そこで scFv-WT 精製後にカチオン性ペプチドを付加する化学修飾を試みた。方法は scFv とペプチドのシステイン残基のジスルフィド結合を介した化学修飾法を選択した。

scFv-WT の C 末端にシステインを付加した scFvC を作製した。大腸菌発現システムを用いて発現を確認、6M グアニジン塩酸塩変性下での Ni アフィニティークロマトグラフィー、段階透析法による refolding、サイズ排除クロマトグラフィーにより最終精製を行った。

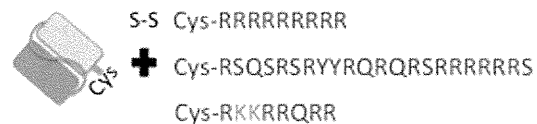
図 1. システイン付加単鎖抗体(scFvC)のデザイン



2. scFvC に対するシステイン付加カチオン性ペプチドの化学修飾と最終精製

精製した scFvC に N 末端にシステインを付加したカチオン性ペプチド(C9R、CPRM、CTAT)を混合し、Buffer、pH、反応時間、ペプチドと scFvC の混合比(モル比)を検討し、空気中の酸素下で穏やかに反応させた。カチオン性ペプチドの化学修飾により、scFvC は反応前後で等電点に変化するため、イオン交換クロマトグラフィーを用いて未反応物の除去を行い、カチオン性ペプチド融合単鎖抗体(scFv-C9R、scFv-CPRM、scFv-CTAT)の最終精製を行った。

図 2. scFvC に対する合成カチオン性ペプチドの化学修飾



3. 化学修飾で得られたカチオン性ペプチド融合 scFv の抗原への物性機能解析

抗原に対する結合活性について SPR を用いて評価し、HTLV-1 感染細胞への結合活性については FACS を用いて評価した。

2) ATL 癌幹細胞同定・解析グループ(中内、矢持(淑)、矢持(忠))

1. 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、multicolor FACSにより、詳細に表面抗原発現パターンを検討した。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。

2. NOJ マウス連続移植継代腫瘍の組織分布の解析：

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の解析には、病理染色および免疫組織化学法を用いた。

3) ATL 細胞表面抗原の解析 (中内)

1. ATL 腫瘍細胞に限局して解析する方法

ATL 細胞はその全てが CADM1 を細胞表面抗原に発現していることが分かり、当研究室で新規に蛍光色素あるいはビオチン標識した抗 CADM1 抗体を作製し、マルチカラーフローサイトメトリーに用いることにより、より高度に CD4 陽性分画の中の ATL 腫瘍細胞を濃縮することが可能となった。TCR V β レパトアや inverse PCR 等を用いたクローナリティー解析や HTLV-1 プロウイルス量の測定から、急性型 ATL において HTLV-1 感染細胞や ATL 腫瘍細胞は CD4+CADM1+ の分画に高度に濃縮されることを見つけ、報告した。昨年度の研究では CD4+CD7N (HAS-FLOW 1G ゲーティング) を用いたが、本年度の研究ではより高精度な CD4+CADM1+ ゲーティング (HAS-FLOW 2G ゲーティング) を用いることとした (図 3)。

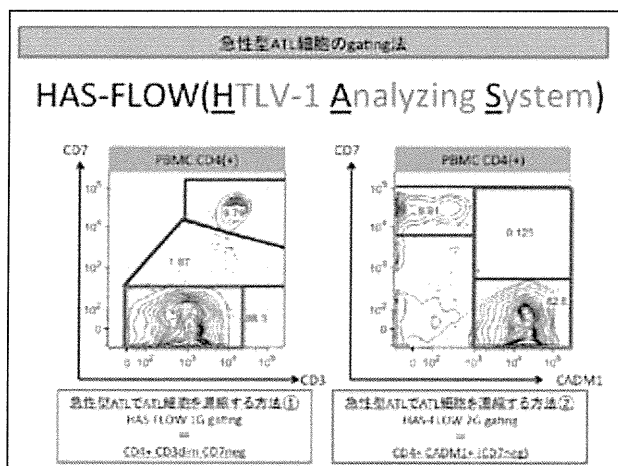


図 3. 急性型 ATL 細胞の gating system

2. フローサイトメーターによる ATL 細胞に

おける細胞表面抗原の解析と細胞分離

患者検体から単核細胞分画を分離し、抗ヒト CD3 抗体、抗ヒト CD4 抗体、抗ヒト CD7 抗体、抗ヒト CD14 抗体、抗ヒト CADM1 抗体(ビオチン標識)を用いて染色した。これらの他に、昨年度の細胞表面抗原解析で抽出したマーカーを各々加えて染色した。マルチカラーフローサイトメトリー FACS Aria II SORP(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、適切なアイソ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。ATL 細胞が各マーカーの陽性分画と陰性分画に分かれる場合、各分画を FACS SORTING にて抽出した。

3. ATL 腫瘍細胞の細胞増殖活性の評価

急性型 ATL 由来の腫瘍細胞は、MS-5 (マウス骨髄間葉系細胞) との共培養において一部の細胞が Cobble Stone (敷石) 様の形態をとりながら増殖する (Int J Hematol, 2008;88:551-564)。その増殖する細胞が、ATL 癌幹細胞 (以下 ATL CSC)、あるいはそれに近い性質を持った細胞と考えている。ATL 腫瘍細胞を、マルチカラーフローサイトメトリーを用いて細胞表面抗原の発現レベルの違いにより分離・ソーティングして、MS-5 との共培養を行うことにより、ATL CSC が高度に濃縮される分画の同定を進めた。

4) 網羅的解析を基盤とした新規分子標的の探索(渡邊、山岸、内丸)

1. EZH2 の発現制御機構と遺伝子変異の解析

ATL 細胞株及び患者由来腫瘍細胞に対して各種阻害剤処理条件下で培養し、その後の遺伝子発現を real-time PCR 及びウエスタンブロットによって定量を行った。また EZH2 のプロモーター活性の評価はプロモーター配列を搭載した luciferase レポーターを用いた。EZH2 プロモーター配列に対する RelA、RelB のリクルートは ChIP assay によって検証した。JSPFAD バンドの ATL 患者由来ゲノム DNA を用いた。EZH2 遺伝子の 641 番目のアミノ酸をコードする領域を含む DNA を PCR で増幅、精製した後、ダイレクトシーケンス法により配列の解析を行った。変異解析のポジティブコントロールには、既に変異が報告されている B 細胞リンパ腫細胞株を用いた。

2. ATL に対する EZH2 の阻害効果

ATL 細胞株に対して GSK126 を作用させて培養したのち、細胞内遺伝子発現をウエスタンブロットによって検討した。また ATL 患者由来腫瘍細胞に対して GSK126 を各濃度で処理し、48~72 時間培養した後、アポトーシス細胞の検出を行った。アポトーシス細胞は CD4 陽性細胞集団中の Annexin V 陽性細胞として検出した。

3. ATL 細胞におけるエピジェネティック異常の全体像の解析

Tax cDNA を Venus 搭載レンチウイルスベクターを用いて健常人 PBMC もしくは CD4+T 細胞に導入し、長期培養によって Tax 発現不活化細胞を樹立した。この Tax 発現不活化細胞と ATL 患者由来腫瘍細胞、及び健常人 CD4+T 細胞について ChIP-on-chip (アジレントテクノロジー)を用いて H3K27me3 の網羅的解析を行った。データは GeneSpring を用いて解析した。

4. ATL 細胞における発現異常とシグナル伝達経路の解析

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- κ B 経路の活性化レベルは、ウエスタンブロット及び EMSA によって評価した。

5) ゲノム異常の解析 (小川)

本分担研究では、ATL 患者中の腫瘍細胞やがん幹細胞の特性をゲノムの視点から明らかにするために、マイクロアレイ技術・高速シーケンス技術を用いたゲノム異常の解析を行う。(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 3 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) 全エクソン解析より得られた複数の遺伝子異常の中から、すでに末梢性 T 細胞性腫瘍で高頻度に変異が認められる 5 つの遺伝子 (RHOA, TET2, DNMT3A, IDH1/2) に着目し、205 症例の異なるコホートにおいて標的ディープシーケンス法を用いて高感度に変異解析を行った。(3) 同定された RHOA 変異に着目し、変異体が入ったベクターを構築し、3T3 などの細胞株への導入実験を行った。

(倫理面への配慮)

HTLV-1 キャリアーと ATL 患者検体 (JSPFAD の検体バンク) を用いた臨床研究計画 (遺伝子解析を含む患者検体を用いた基礎研究) は、平成 14 年度、平成 19 年度、平成 23 年度に東京大学における研究倫理委員会に承認され、実施されている。(平成 14 年 12 月 16 日付け東京大学医学部研究所倫理審査委員会承認 受付番号 14-5、および平成 19 年度東京大学大学院新領域創成科学研究科研究倫理審査委員会承認 承認番号 07-07、平成 23 年度 2 月 14 日付け東京大学大学院新領域創成科学研究科研究倫理審査委員会承認 審査番号 10-50)

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. システイン付加単鎖抗体(scFvC)の作成

scFv とペプチドのシステイン残基のジスルフィド結合を介した化学修飾のため、scFv-WT の C 末端にシステインを付加した scFvC を作製した。大腸菌発現システムで、不溶性画分に良好な発現を認め、6M グアニジン塩酸塩変性下での Ni アフィニティークロマトグラフィー、段階透析法による refolding、サイズ排除クロマトグラフィーにより行い、単量体での最終精製に成功した。以上のような工程にて Anti OX40 scFvC の精製に成功した。

2. scFvC に対するシステイン付加カチオン性ペプチドの化学修飾と最終精製

化学修飾するカチオン性ペプチドには、9R、PRM、TAT の 3 種類を選択し、N 末端にシステインを付加したカチオン性ペプチド(C9R、CPRM、CTAT)を人工合成した。

精製した anti OX40 scFvC とカチオン性ペプチド(C9R、CPRM、CTAT)を混合し、室温、空

気酸化で穏やかに反応させた。反応前後の等電点変化を利用して、未反応物除去を陽イオン交換クロマトグラフィーにて行い、C9R、CTATの二種類の融合カチオン性ペプチド融合単鎖抗体(anti OX40 scFv-C9R、scFv-CTAT)の最終精製に成功した。CPRM 融合単鎖抗体(anti OX40 scFv-CPRM)はイオン交換クロマトグラフィーでの精製までは可能であったが、最終のサンプル濃縮時に凝集が観察されたため、解析に用いることができなかった。

3. カチオン性ペプチド融合 scFv の抗原への物性機能解析

anti OX40 scFvC、scFv-C9R、scFv-CTAT の抗原に対する結合活性を SPR にて評価した。いずれも、抗原に対する高い親和性と結合安定性を保持していた。また、HTLV-1 感染細胞への結合活性について FACS 解析で評価したところ、いずれも OX40 陽性細胞株である HUT102 と MT 2 への結合を確認し、OX40 陰性 ATL 細胞株 Tlom-1、OX40 陰性細胞株 Jurkat、molt4 への結合は観察されなかった。

2) ATL 癌幹細胞同定・解析グループ(中内、矢持(淑)、矢持(忠))

昨年度の研究にてリストアップした 37 抗原(平成 24 年度報告書/研究結果/グループ①-③)を、急性型 ATL の末梢血にて評価した。大部分の細胞表面抗原は、陽性分画も陰性分画も細胞増殖活性に有意差を生じなかった。一部の細胞表面抗原においては、その発現レベルにて ATL 細胞(CD4+CADM1+細胞)の細胞増殖活性に有意差を認めた。その中で、複数症例において再現性が確認されたのは CD62L であった。代表例を図 4 に示す。

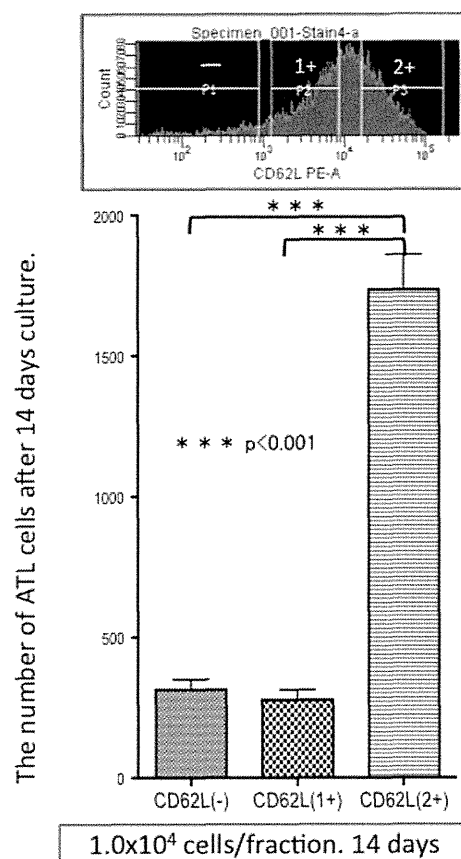
CD62L 陽性と陰性分画に大きく分かれる症例では、CD62L 陽性分画の細胞増殖活性が高かった。また、ATL 細胞の大部分が CD62L を発現している症例もあったが、そのような症例では CD62L 強陽性分画が特に MS-5 上での増殖が高かった。CD62L 強陽性分画に ATL 幹細胞が高度に濃縮される可能性が示唆された。

また、共培養系において CD62L が細胞接着に有利に機能している可能性を考慮し、患者由来のプライマリーATL 細胞と MS5 との共培養に、細胞表面の CD62L をブロックすることが知られている抗 CD62L 抗体(DREG-56 monoclonal antibody)を加え、CD62L を阻害したが ATL 細胞

の増殖は抑制/阻害されなかった。

さらに、免疫不全マウスへの移植モデルを用いて、CD4+CADM1+CD62L 強陽性分画の IN VIVO における細胞増殖活性を、他の CD4+CADM1+分画と比較する形で評価をこころみていたが、患者検体のため採血量が限られ、移植細胞数が少なく、有意差を認めなかった。

図 4. 急性 ATL 細胞の増殖活性と表面抗原の発現との相関



我々は昨年 ATL 患者末梢血由来の CD4+CCR4+の細胞集団から 連続移植継代を成功させた。このモデルより生着能を持つ Tumor initiating Cell に当たる細胞集団はマーカーそのものが変化する可能性が強く示唆された。このことは ATL の Tumor Initiating Cells は、浅い hierarchy を持つものであることが示唆された。CCR4 をほとんど発現しない新たな検体を用い、CD3 に着目して発現の強弱で Sorting を行ってみた。3X10⁷ の PBMC を sorting して移植したところ、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、生着した細

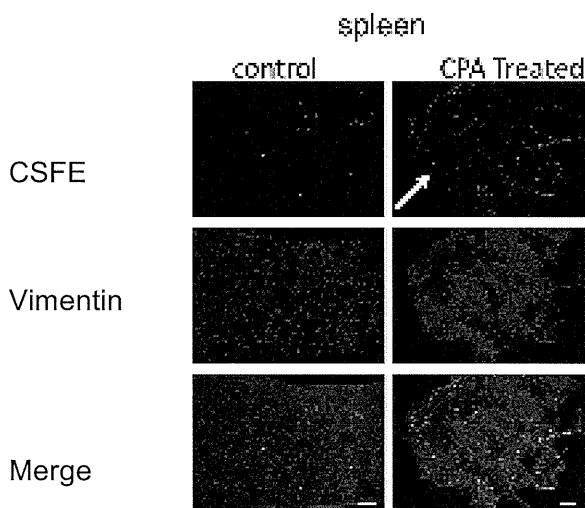
胞集団は連続移植継代の2代目以降は CD3Lo へ移行していた。このことは少なくとも CD3HI の細胞集団が CD3Lo へ移行することを示しており、その移行後も連続移植継代可能であることを示している。実際、 3×10^5 (PBMC 3×10^7 相当) では CD3Hi より生着日数は明らかに時間を要するが、CD3Lo 細胞の生着が確認はできた。またこの生着した5代目の Phenotype において CD3HI は CCR4- であったが CD3Lo 分画の細胞集団は CCR4+ を示した。さらに Proviral load において CD3Hi は 369%、CD3Lo は 100% であった。この生着した CD3Lo 由来の5代目の細胞集団は CD5+, CD25+, CD3dim, CD4+, CCR4+ でほぼ ATL Phenotype を持ち得た細胞集団であった。またウイルスロードも 100% を示した (図1)。この連続移植継代株は患者の Major Integration site と同一であった。CCR4 の発現は当初陰性で、連続移植継代中に要請に変化した。一方で CD3Hi の細胞集団の方が早く生着し患者との HTLV1 Integration site は同一であった。この細胞集団の Phenotype は CD5+, CD25+, CD3dim, CD4+, CCR4- を示し典型的な ATL の Phenotype を示さなかつ、にウイルスロードは 369% であった。これらの結果は、たとえ同じ Integration site を持つ細胞集団の性質が多彩であることを示唆する。

ATL モデルマウスを用いたがん幹細胞ニッチの病理形態学的な解析から、以下の様な知見を得た。FACS で sort した CD4⁺/CCR4⁺ あるいは CD4⁺/CD3Lo ががん幹細胞画分を移植し、それぞれ30日あるいは60日経過した ATL マウスにおける終末病態の解明を行った。その結果、現在までに死因と主たる腫瘍浸潤部位が決定された。具体的には、マウス各組織のパラフィン包埋切片を作製し HE 染色とともに human vimentin に対する免疫組織化学的染色を実施し、病理形態学的解析を行った。その結果、マウスの死因に関しては、いずれの場合も、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〜びまん性に浸潤したことによる腫瘍死と結論した。食道、胃、腸管等の消化管への腫瘍細胞浸潤は少ない。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、呼吸不全を起こしていたと

推察する。次に、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。

次に、移植細胞の CFSE Labeling 法を用いて細胞分裂に関して解析した。その結果、CCR4 は CFSE Labeling 細胞を3日、7日では確認できたが、14日では全身で探索を行ったが同定することができなかった。一方、CD3Lo 由来の連続移植継代株においては同条件で45日まで脾臓において確認することが出来た。次に CD3Lo マウスにおいて CFSE 陽性細胞集団に Cyclophosphamide (CPA) を加えても細胞集団が生存するか検証を行ったところ、このデータは Preliminary ではあるが、CPA 処理に対して明らかに生存する CFSE 陽性の細胞集団が確認できた (図5)。

図5. 薬剤投与後の生存細胞は脾臓に局在した



3) 標的分子解析グループ(渡邊、山岸、内丸) 1. ATL 細胞におけるエピジェネティック異常の原因となる EZH2 の過剰発現の分子メカニズムと遺伝子変異の検討

ATL 細胞で過剰発現している EZH2 の発現レベルを制御するメカニズムは非常に複雑であり、また T 細胞における詳細な解析は行われていなかった。我々は昨年までに、ATL 細胞において恒常的に活性化している NF- κ B 経路が

EZH2 の発現誘導を担っていることを明らかにした。そこでまず *EZH2* 遺伝子のプロモーター配列を搭載したレポーターを用いて、*EZH2* の転写制御を分子レベルで解析を行った。その結果、*EZH2* の転写開始点上流-1000bp が大幅な転写誘導を起こす事、またそのなかでも複数の NF- κ B 結合配列が重要であることが変異体を用いた解析から明らかになった。次に ChIP assay によって、*EZH2* プロモーター領域における NF- κ B 因子の結合を確認した結果、定型的経路の RelA、及び非定型的経路の RelB の両者が恒常的にリクルートされていることがわかった。これらの結果より、ATL 細胞においては、強力に活性化した NF- κ B シグナルが *EZH2* の過剰発現を誘導、維持していることが強く示唆された。

上記の知見について、ATL 患者由来腫瘍細胞を用いて検証を行った。複数の患者末梢血から腫瘍細胞を採取し、NF- κ B 阻害剤を処理したのち、ウエスタンブロットにより解析した結果、*EZH2* の発現が著しく低下することがわかった。また同時に他の PRC2 因子についても検出したところ、ATL 細胞で同様に過剰発現している SUZ12 についても大幅な発現減少が確認された。以上より、ATL 細胞においてエピジェネティック異常を引き起こす polycomb family の発現異常は NF- κ B 経路の活性化が原因であることが明らかになった。

がんにおける polycomb の機能変化は、*EZH2* の発現レベルの変化だけでなく、遺伝子変異が複数のがんで報告されている。そこで B 細胞リンパ腫において高頻度に変異が認められる 641 番目のアミノ酸領域について、JSPFAD で管理する ATL 由来ゲノム DNA を用いて検討を行った。ATL 検体はプロウイルス率が 30%以上の症例を用いた。これまでのところ、ATL50 症例 (急性型 27 症例、慢性型 13 症例、くすぶり型 4 症例、病型不明 6 症例)において、*EZH2* の 641 番目のアミノ酸変異は検出されなかった。

2. ATL 細胞に対する *EZH2* 阻害の効果

次世代の *EZH2* 阻害剤 GSK126 に注目し、ATL 細胞に対する有効性を検証した。その結果、GSK126 を 72 時処理した ATL 細胞株においてにおいて p52 及び *EZH2* の発現量の低下が確認された。また ATL 細胞における *EZH2* と表現型の関係を明らかにする為に、ATL 患者検体に GSK126 を処理して CD4+T 細胞中における アポトーシス細胞の検出を行った。その結果、GSK126 を処理した際にコン

トロール群と比較して約 3 倍から 5 倍のアポトーシスを誘導した。以上より、ATL 細胞において過剰に発現する *EZH2* は NF- κ B シグナルの活性化によって引き起こされており、また分子標的として有力であることが示唆された。

3. ATL 細胞におけるエピジェネティック異常の全体像の解析

本年度は、正常 T 細胞、Tax 発現不死化細胞、及び急性型 ATL 患者由来細胞における H3K27me3 の全体像を明らかにするため、ChIP-on-chip を用いて網羅的な解析を行った。その結果、ATL 細胞及び Tax 発現不死化細胞において、H3K27me3 が導入されたクロマチンの全体量が増加していること、また全体的なパターンが変化していることを明らかにした。ATL 細胞は全体的には活性化 T 細胞で見られるメチル化パターンと近接したが、一方腫瘍細胞特異的、もしくは腫瘍細胞と Tax 発現細胞に共通する異常の同定に成功した。その中にはこれまでに我々が報告した *miR-31* 領域における異常なメチル化の蓄積も含まれていた。この事から Tax によって長期的に誘導されたエピジェネティック異常により *miR-31* の発現も抑制されることが示唆された。現在このような網羅的解析のプラットフォームの構築を完了し、今後解析検体や調べるメチル化の種類を増やすことにより、ATL 細胞におけるエピジェネティック異常の全体像と分子標的を明らかにする予定である。

4. ATL 細胞における EVC の過剰発現と Hedgehog シグナル伝達系の解析

昨年までに ATL 細胞における EVC family の過剰発現と Hedgehog 経路への影響を明らかにしたが、EVC の過剰発現の分子メカニズム及び ATL 細胞に対する Hedgehog 経路阻害の有効性については不明であった。

EVC 遺伝子領域は EVC1 と EVC2 が逆向きにコードされる bi-directional プロモーターであり、その間隙には非常に強力な CpG アイランドがあることがわかった。しかしバイサルファイトシークエンス法を用いて解析したところ、ATL 細胞及び正常 T 細胞において DNA メチル化は認められなかった。一方で EVC の発現が抑制されている Jurkat 細胞に対して HDAC 阻害剤を処理したところ EVC の発現を回復させることがわかった。そこで遺伝子発現の活性化に関わるヒストン修飾に注目し ChIP assay を用いて細胞株パネル及び ATL 患者由来細胞における EVC 領域のヒストン修飾の定量を行った。その

結果、ATL細胞においてH3K4のトリメチル化、及びH3のアセチル化が異常に蓄積していることが明らかになった。また同時に抑制的な修飾であるH3K27me3はATL細胞で減少していた。興味深い事に、Taxを発現させたJurkat細胞ではEVCの発現が誘導され、また上記のようなエピジェネティックな変化が認められた。以上の結果から、ATL細胞において遺伝子発現の活性化に関わるエピジェネティック異常が存在すること、またその異常が遺伝子発現を介してシグナル伝達系に影響していることが強く示唆された。

一方、ATL細胞におけるEVC及びHedgehog経路の重要性を検討するために、EVC及びHedgehogシグナルの転写因子であるGLI1,2のノックダウン実験を行った結果、これらのノックダウンはHedgehogシグナルの活性レベルを低下させること、またATL細胞の生存率に影響を及ぼすことがわかった。昨年までの結果と総合すると、ATL細胞においてはHedgehog経路がEVC依存的に活性化しており、GANT61等のHedgehog経路の阻害剤がATLに対して有効である可能性が示された。

5. ATL細胞におけるp38MAPKシグナル伝達系の解析

昨年までに知見をもとに、本年度はp38と下流のシグナル経路の関連と、活性化の原因について以下の検討を行った。

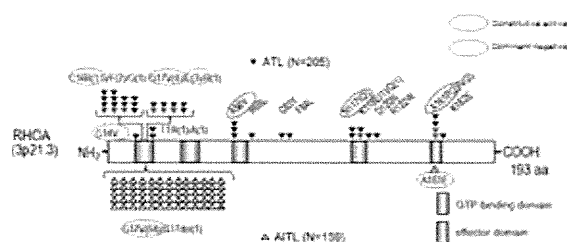
ATLに対して阻害剤もしくは特異的shRNAを用いてp38を阻害すると、NF-κB因子の核移行を阻害され、ATL細胞にアポトーシスを誘導した。同時にp38の下流因子であるMK2及びMSK1のリン酸化レベルも低下した。従って、ATL細胞におけるp38の活性化はNF-κB経路や他のシグナル伝達経路に対して広く影響していることが示唆された。また同様のノックダウン実験をp38の上流因子であるMKK3及びMKK6に対して行ったところ、強烈な細胞死が誘導された。従って、p38の上流因子がp38を介してATL細胞の生存を制御している可能性が示唆された。

4) ゲノム異常の解析 (小川)

(1) 急性型、リンパ腫型、慢性型それぞれ1例ずつ計3症例について解析を行った。ペアの正常検体と比較することで最終的に検証された329個の腫瘍特異的な変異が同定された。非常に興味深いことに他の末梢性Tリンパ系腫瘍で高頻度に変異しているRHOAの体細胞性変異

が複数症例で同定された。

(2) 標的遺伝子の全コーディング領域をPCR増幅し次世代シーケンサーで解析したところ平均の読み取り深度は18,346回であった。全205症例で変異解析したところ、RHOAは42個、38症例(18.5%)に変異が認められた。そのほとんどはG17がVに変わる変異であったのと比較し、ATLでの変異の分布は非常に特徴的であり、複数のGTP結合部位にわたっていた。AITLで認められるG17Vの変異は稀であり、C16Rが最多であった。



(3) DOX誘導系の3T3細胞において、G17V、G17E、A161Eは既知のDominantNegativeであるT19Nと同様の細胞形態(細胞が小さく丸くなる)であり、アクチン染色ではアクチンファイバーの形成が阻害されており、RhotekinアッセイでもGTPの結合が低下していることから、AITLで高頻度のG17V同様、G17EやA161Eはdominant negativeに働くことが示された。一方、ATLで特に高頻度であったC16RやN117I、A161Pは、野生型と同様の細胞形態であり、アクチン染色ではアクチンファイバーの形成は阻害されず、RhotekinアッセイでもGTPの結合低下は認められなかった。すなわちこれらの変異はdominantnegativeとは異なるメカニズムで腫瘍化に関わっていることが示唆された。

D. 考察

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. システイン残基を介したscFvに対するカチオン性ペプチドの化学修飾

前年度の研究成果から、厳密な核酸除去がカチオン性ペプチド融合単鎖抗体の精製に重要と思われたが、多量に存在する大腸菌由来の核酸を完全に除去することは困難と判断し、精製後の

scFv-WTへ化学修飾によってカチオン性ペプチドを付加する方法へと方針を変更した。このため単鎖抗体のC末端、ペプチドのN末端にシステイン残基を導入し、ジスルフィド結合を介した化学修飾法を選択した。この新たな戦略が基本的に実施可能であるとも知見を得ているが、更に条件検討を進めて反応効率の改善と最終精製物の収量増加を目指した検討が必要と考えられた。

2. カチオン性ペプチド融合単鎖抗体の物性機能評価と生物学的活性

anti OX40 scFv-C、scFv-C9R、scFv-CTATはいずれも SPR での結合活性を認め、FACS でも OX40 発現細胞へと特異的な結合を認めたため、精製したペプチド融合 scFv の細胞への内在化の評価、ペプチド融合 scFv と RNA の相互作用解析、細胞への RNA 輸送能と生物学的活性について評価中である。また、ペプチドと RNA の相互作用解析の結果と RNA の細胞内輸送による生物学的活性とを評価し、単鎖抗体と組み合わせる最適なペプチドを検討していく予定である。

2) ATL 癌幹細胞同定・解析グループ(中内、矢持(淑)、矢持(忠))

これまでに得られている知見を、まとめると、

1. 免疫不全マウスに連続移植継代の系で造腫瘍性を示す一部の細胞集団が存在する。
2. 造腫瘍性を示す一部の細胞集団の細胞表面マーカーは変遷する。
3. 移植マウスは腫瘍死する。
4. 抗がん剤耐性細胞集団は脾臓に多く認められる。

これらの結果は、ある意味、予想外であり、生物学的判定基準では TIC の存在が支持されるが、その細胞集団を特定出来ないと言うジレンマがある。この原因に関しては、更に検討を進める必要が有るが、Dick の AML Stem cell のモデルとは明らかに異なった正確を持つ細胞集団が存在すると考えられる。最近の研究では、Melanoma においては一部の細胞集団だけが癌幹細胞ではなく、25%の細胞集団において生着能を有するなどの報告も存在する。また、hierarchy の程度によっていわゆる TIC 集団のサイズを議論する立場もある。ATL の場合は、どのような機構によるのかに関しては、これまで

の実験系による詳細な解析と、クローン組成に関する情報として、HTLV-1 プロウイルス退く見込み部位解析、および、継代細胞のゲノム変異解析等による新たなクローナリティの指標に関する情報を含めて検討する必要が有ると考える。

3) 標的分子解析グループ(渡邊、山岸、内丸)

本年度は、昨年度までに蓄積した ATL における分子基盤のデータをもとに、本研究課題の主題である miRNA の上流と下流に位置するエピジェネティック及びシグナル伝達の ATL 特異的な異常に注目し、複数の研究課題を設定して取り組んだ。得られたデータから、H3K27me3 のパターンの変化が ATL 細胞における遺伝子発現パターン及び表現型にとって重要であると判断された。この制御が NF- κ B 依存的な EZH2 の過剰発現であったこと、またすでに他のリンパ腫で同定されている遺伝子の活性化変異は認められなかったことは興味深い。この事は、polycomb family のダイナミックな量の変化がエピジェネティックな異常の導入及び維持に関わることを示唆している。複数の要素によって構成される feed-forward loop によって ATL 細胞の特徴が規定されていることが強く示唆されており、これらの詳細な分子メカニズム及びそれに対する介入が今後の課題である。また Tax によるエピジェネティックな変化は注目すべき発見であった。感染から腫瘍化への変遷を考える上で、今後の大きな研究課題であると言える。

本研究で同時に検討を進めたのが、ATL 細胞の発現異常から捉えるシグナル伝達異常であった。これまでに ATL 研究で検討されてこなかった p38 経路及び Hedgehog 経路について検討し、ATL 細胞の生存能は NF- κ B 経路のみならず、複数のシグナル伝達経路で複雑に制御されている事が示唆された。さらに本研究における重要な発見として、エピジェネティックな異常による EVC の過剰発現がある。これは、polycomb family とは異なる、遺伝子活性化に関わる別のエピジェネティック変化であった。実際に、細胞の機能や恒常性に関わるほぼすべての遺伝子は H3K4me3 と H3K27me3 のバランスによって制御されている。その両者が異常をきたし、発現パターンが破綻しているのが ATL 細胞の背景であると考えられる。エピジェネティック異常とシグナル伝達系とのクロストー

クも含め、さらなる詳細な分子メカニズムの検討が、新たな分子標的を同定、利用する上で重要であると考えられる。

4) ゲノム異常の解析 (小川)

ATL においては RHOA 変異が約 20%に認められたが、AITL で顕著な G17V は 4 例(1.9%)と稀であり、C16 が最も高頻度であった。(11 例;5.4%)

他の変異も GTP 結合部位に分布しており、これらの結果から RHOA 変異は ATL の腫瘍化に直接関わっているが、AITL や PTCL-NOS といった他の T 細胞性腫瘍とは異なるメカニズムが示唆された。G17V 変異例とそれ以外の変異例で病型、予後などの臨床情報との相関について解析を行ったが有意な差は認められなかった。AITL/PTCL-NOS では RHOA 変異は TET2 変異と共存する相関が認められ、ATL では TET2 変異が約 10%存在していたものの RHOA 変異との相関は認められなかった。

E. 結論

DDS として、miRNA 結合部位を組み込んだ scFv による miRNA の細胞内導入と言うコンセプトは、抗体精製が困難であることが判明し、chemical conjugation へ方針変更した。基礎データが得られつつあり、期待される。

ATL のがん幹細胞同定の研究は、生物学的には、細胞集団中にそのような分画が存在することが確認出来たが、AML モデルとは異なり、他の固形癌で見られる様な複雑な分子機構の存在が伺われた。更に解析を進め、血液幹細胞由来の腫瘍とは異なる TIC の本体理解につながる知見を得ることを目指す。

ATL 細胞はエピジェネティックな異常とシグナル伝達系の異常がお互いにリンクしており、ATL の分子レベルの背景となっていることが明らかになった。また、原因ウイルスの遺伝子産物 Tax との関連も明らかにされつつあり、今後の検討課題である。

ATL 含めた末梢 T 細胞性腫瘍の病態において RHOA 変異は非常にユニークな役割を担っていることを同定した。ATL においても他の T 細胞性腫瘍のように高頻度に RHOA 変異が認められるが、その分布や機能は AITL で特徴的な G17V とは異なることが示唆された。今後は正常リンパ球や腫瘍化した T 細胞における RHOA

の正確な役割を解析することで、腫瘍化にどのように関わるのか解明することが期待される。

F. 健康危険情報

該当せず

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, 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 (DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3169)
- 2) 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** 104(8):1097-1106, 2013 (doi: 10.1111/cas.12181)
- 3) Kiyoshi M, Caaveiro JM, Miura E, Nagatoishi S, Nakakido M, Soga S, Shirai H, Kawabata S, Tsumoto K. Affinity improvement of a therapeutic antibody by structure-based computational design: generation of electrostatic interactions in the transition state stabilizes the antibody-antigen complex. **PLoS One**. 9(1), e87099, 2014 (doi: 10.1371/journal.pone.0087099)
- 4) Ito T, Tsumoto K. Effects of subclass change on the structural stability of chimeric, humanized, and human antibodies under thermal stress. **Protein Sci**. 22, 1542-1551, 2013 (doi: 10.1002/pro.2340)
- 5) Fukunaga A, Tsumoto K. Improving the affinity of an antibody for its antigen via long-range electrostatic interactions. **Protein Eng Des Sel**. 26, 773-780, 2013 (doi: 10.1093/protein/gzt053)
- 6) Tokunaga M, Mizukami M, Yamasaki K, Tokunaga H, Onishi H, Hanagata H, Ishibashi M, Miyauchi A, Tsumoto K, Arakawa T. Secretory production of single-chain antibody (scFv) in *Brevibacillus choshinensis* using novel fusion partner. **Appl Microbiol Biotechnol**. 97, 8569-8580, 2013 (doi: 10.1007/s00253-013-4695-2)
- 7) Ohno N, Kobayashi S, Ishigaki T, Yuji K,

- Kobayashi M, Sato K, Watanabe N, Tojo A, Uchimaru K. Loss of CCR4 antigen expression after mogamulizumab therapy in a case of adult T-cell leukaemia-lymphoma. **British J. Hematol.** 163(5):683-5, 2013.
- 8) Ishigaki T, Isobe M, Kobayashi S, Yuji K, Ohno N, Watanabe N, Tojo A, Uchimaru K. Development of peripheral T-cell lymphoma not otherwise specified in an HTLV-1 carrier. **Int. J. Hematol.** 97(5): 667-672, 2013.
- 9) Shiraishi Y, Sato Y, Chiba K, Okuno Y, Nagata Y, Yoshida K, Shiba N, Hayashi Y, Kume H, Homma Y, Sanada M, Ogawa S, Miyano S. An empirical Bayesian framework for somatic mutation detection from cancer genome sequencing data. **Nucleic Acids Res.** 2013 Apr;41(7):e89.
- 10) Yoshida K, Toki T, Okuno Y, Kanezaki R, Shiraishi Y, Sato-Otsubo A, Sanada M, Park MJ, Terui K, Suzuki H, Kon A, Nagata Y, Sato Y, Wang R, Shiba N, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Muramatsu H, Hasegawa D, Nakamura K, Kanegane H, Tsukamoto K, Adachi S, Kawakami K, Kato K, Nishimura R, Izraeli S, Hayashi Y, Miyano S, Kojima S, Ito E, Ogawa S. The landscape of somatic mutations in Down syndrome-related myeloid disorders. **Nat Genet.** 2013 Nov;45(11):1293-9.
- 11) Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Yoshida K, Shiraishi Y, Ishii R, Miyake Y, Muto H, Tsuyama N, Sato-Otsubo A, Okuno Y, Sakata S, Kamada Y, Nakamoto-Matsubara R, Tran NB, Izutsu K, Sato Y, Ohta Y, Furuta J, Shimizu S, Komeno T, Sato Y, Ito T, Noguchi M, Noguchi E, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Suzukawa K, Nanmoku T, Hasegawa Y, Nureki O, Miyano S, Nakamura N, Takeuchi K, Ogawa S, Chiba S. Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. **Nat Genet.** 2014 Feb;46(2):171-5.
- 12) Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Ebihara Y, Mochizuki S, Yuji K, Ohno N, Kawamata T, Jo N, Yokoyama K, Uchimaru K, Tojo A, Takahashi S. Impact of sex incompatibility on the outcome of single-unit cord blood transplantation for adult patients with hematological malignancies. **Bone Marrow Transplant.** 2014 in press.
- 13) Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Ebihara Y, Mochizuki S, Yuji K, Ohno N, Kawamata T, Jo N, Yokoyama K, Uchimaru K, Tojo A, Takahashi S. Effect of ABO Blood Group Incompatibility on the Outcome of Single-Unit Cord Blood Transplantation after Myeloablative Conditioning. **Biol Blood Marrow Transplant.** 2013, pii: S1083-8791(13)01153-1. (doi: 10.1016/j.bbmt.2013.12.563).
- 14) Ohno N, Kobayashi S, Ishigaki T, Yuji K, Kobayashi M, Sato K, Watanabe N, Tojo A, 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).
- 15) Ishigaki T, Isobe M, Kobayashi S, Yuji K, Ohno N, Watanabe N, Tojo A, Uchimaru K. Development of peripheral T-cell lymphoma not otherwise specified in a HTLV-1 carrier. **Int J hematol.** 2013 97(5): 667-672 (DOI: 10.1007/s12185-013-1314-z).
- 16) Norose T, Yamochi-Onizuka T, Takimoto M. A case of Degos disease: demonstration of C5b-9-mediated vascular injury. **Mod Rheumatol.** 2014
- (総説)
- 1) 渡邊俊樹、特集 ATL/HTLV-1 研究の最近の進展「miRNA を用いた成人 T 細胞白血病 (ATL) がん幹細胞を標的とした新規治療法開発研究の現状」、**血液内科**、68(1) : 65-70、2014 年 1 月
- 2) 渡邊俊樹、特集：リンパ系腫瘍—最新の病態解析と治療—「成人 T 細胞白血病／リンパ腫の分子病態解析と治療の進歩」、**最新医学**、68(10) : 40-47、2013 年 10 月
- 3) 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(3)、2013 年 3 月
- (著書)
- 1) 渡邊俊樹 (分担執筆)、「IV.リンパ球系 3. 成人T細胞白血病/リンパ腫におけるNF-kB経路の活性化」、**Annual Review 2014 血液** (240頁)、147-152、中外医学社、2014年1月
2. 学会発表 (国際学会)
- 1) Yamagishi M, Watanabe T, “EPIGENETIC Deregulation of miRNA in Malignant Lymphomas”, **18th Congress of EHA**, Stockholm, Sweden, June 16(June 12-June 16), 2013 (Oral)
- 2) Yamagishi M, Fujikawa D, Kurokawa N, Soejima A, Takahashi R, Sakai N, Nakagawa S,

- Nakano K, Kobayashi S, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru K, Ogawa S, Watanabe T, “Molecular hallmarks of adult T cell leukemia: miRNA, pigenetics, and emerging signaling abnormalities”, **16th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses**, Montreal, Canada, June 29(June 26-30), 2013 **HTLV 2013 Young Investigator Travel Award**
- 3) Nakano K, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru K, Watanabe T, “Disorders of the cMyb proto-oncogene expression and its significance in the course of ATL development”, **16th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses**, Montreal, Canada, June 26-30, 2013(Poster)
 - 4) Fujikawa D, Yamagishi M, Kurokawa N, Soejima A, Ishida T, Tanaka Y, Nakano K, Watanabe T, “HTLV-1 Tax disrupts the host epigenome by interacting with a Polycomb group protein EZH2”, **16th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses**, Montreal, Canada, June 29(June 26-June 30), 2013 **Top10 posters**
 - 5) Nagata Y, Sato A, Kon A, Okuno Y, Chiba K, Tanaka H, Shiraishi Y, Yoshida K, Sanada M, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Oshima K, Miyawaki S, Kitanaka A, Miyano S, Watanabe T, Ogawa S, ” Whole exome analysis reveals spectrum of gene mutations in adult T-cell leukemia/lymphoma” 2013 **AACR Annual Meeting**, Washington, DC, 2013.4.8
 - 6) Nagata Y, Sato A, Kon A, Okuno Y, Chiba K, Tanaka H, Shiraishi Y, Yoshida K, Sanada M, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Oshima K, Miyawaki S, Kitanaka A, Miyano S, Watanabe T, Ogawa S, “WHOLE EXOME ANALYSIS REVEALS MUTATIONS OF TET2 IN ADULT T-CELL LEUKEMIA/LYMPHOMA”, **The 18th Congress of the European Hematology Association**, Stockholm, 2013.6.14
- (国内学会)
- 1) 酒井直規、山岸誠、藤川大、中野和民、宇都宮與、内丸薫、渡邊俊樹、「成人T細胞白血病における p38 シグナル伝達系の異常とその意義」、第36回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、2013年12月4日 (2013年12月3日-12月6日)
 - 2) 中川翔太、山岸誠、藤川大、中野和民、宇都宮與、内丸薫、渡邊俊樹、「成人T細胞白血病におけるポリコームファミリーの過剰発現機構の解析」、第36回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、2013年12月5日 (2013年12月3日-12月6日)
 - 3) 藤川大、山岸誠、中川翔太、黒川直也、副島あい、中野和民、宇都宮與、内丸薫、石田尚臣、田中勇悦、渡邊俊樹、「HTLV-1 タンパク質 Tax と Polycomb タンパク質 EZH2 との相互作用を介して宿主細胞のエピゲノムを攪乱し、腫瘍化の進行に寄与する」、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、神戸、2013年11月12日 (2013年11月10日-11月12日)
 - 4) 佐藤均、Sanaz Firouzi、渡邊俊樹、矢持忠徳、「免疫不全マウスに連続継代移植されたヒト腫瘍細胞の継代5代目における染色体解析」、染色体学会第64回年会、富山大学五福キャンパス、富山、2013年11月8日-11月10日
 - 5) Yamagishi M, Fujikawa D, Kurokawa N, Soejima A, Nakagawa S, Nakano K, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru K, 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、ロイトン札幌、札幌、2013年10月13日 (2013年10月11日-10月13日)
 - 6) Yamagishi M, Katano H, Nakano K, Ota Y, Hishima T, Okada S, Watanabe T, “Coordinated epigenetic regulation of mRNAs activates simultaneous signaling in malignant lymphoma”, 第75回日本血液学会学術集会、ロイトン札幌、札幌、2013年10月11日 (2013年10月11日-10月13日) (口演発表)
 - 7) Kobayashi S, Watanabe E, Ishigaki T, Ohno N, Yuji K, Nakano K, Yamochi T, Watanabe T, Watanabe N, Tojo A, 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、ロイトン札幌、札幌、2013年10月11日
 - 8) 矢持忠徳、守田陽平、矢持淑子、Sanaz Firoouzi、佐々木陽介、若林翼、渡辺信和、内丸薫、宇都宮與、渡邊俊樹、「Putative ATL tumor initiating cells の解析」、第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、横浜、2013年10月3日 (2013年10月3日-10月5日)
 - 9) 中川翔太、山岸誠、藤川大、中野和民、宇都宮與、内丸薫、渡邊俊樹、「ATLにおける EZH2過剰発現の分子メカニズム」、第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、横

- 浜、2013年10月3日（2013年10月3日-10月5日）（ポスター発表）
- 10) 山岸誠、片野晴隆、中川翔太、中野和民、太田泰徳、比島恒和、岡田誠治、渡邊俊樹、「リンパ腫におけるエピジェネティック依存的なmiRNAの発現異常とシグナル伝達系の活性化」、腫瘍別シンポジウム、第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、横浜、2013年10月4日（2013年10月3日-10月5日）（口演発表）
 - 11) 藤川大、山岸誠、黒川直也、副島あい、石田尚臣、田中勇悦、中野和民、渡邊俊樹、「HTLV-1タンパク質Taxはポリコムタンパク質EZH2との相互作用を介してエピゲノムを攪乱する」第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、横浜、2013年10月4日（2013年10月3日-10月5日）（ポスター発表）
 - 12) 中野和民、宇都宮與、山口一成、内丸薫、渡邊俊樹、「スプライシングとmRNA品質管理機構の二重不全によるATL細胞でのPTC含有異常転写産物の高発現とその影響」第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、横浜、2013年10月5日（2013年10月3日-10月5日）（ポスター発表）
 - 13) Sanaz Firouzi、矢持忠徳、Lopez Yosvany、鈴木穰、中井謙太、菅野純夫、渡邊俊樹、「Development and validation of a new high-throughput method to investigate T-cell-clonality and integration site preference among HTLV-1-infected individuals」、第6回HTLV-1研究会・シンポジウム、東京大学医科学研究所、2013年8月25日（2013年8月23日-8月25日）
 - 14) 中野和民、安東友美、山岸誠、横山弘一、唐澤伸明、橋爪大明、高橋隆太郎、高橋碧、石田尚臣、大杉剛生、田中勇悦、David W. Brighty、渡邊俊樹、「ウイルス複製を有利にするHTLV-1 Rexの新たな機能の可能性と宿主細胞への影響」、第2回ATLシンポジウム、第6回HTLV-1研究会・シンポジウム、東京大学医科学研究所、2013年8月24日（2012年8月23日-8月25日）（シンポジウム発表）
 - 15) 小林誠一郎、渡辺恵理、石垣知寛、中野和民、矢持忠徳、山岸誠、浅沼里実、大野伸広、湯地晃一郎、渡辺信和、東條有伸、渡邊俊樹、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・シンポジウム、東京大学医科学研究所、2013年8月25日（2013年8月23日-8月25日）
 - 16) 若林翼、矢持忠徳、矢持淑子、佐々木陽介、Sanaz Firouzi、瀧本雅文、渡邊俊樹、「成人T細胞白血病(ATL)における、がん幹細胞微小環境の組織病理学的同定の試み」、第6回HTLV-1研究会・シンポジウム、東京大学医科学研究所、2013年8月23日-8月25日
 - 17) 中川翔太、山岸誠、藤川大、中野和民、宇都宮與、内丸薫、渡邊俊樹、「成人T細胞白血病細胞におけるポリコムタンパク質の過剰発現機構の解析」、第6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24日-8月25日
 - 18) 酒井直規、山岸誠、藤川大、中野和民、宇都宮與、内丸薫、渡邊俊樹、「ATL細胞におけるp38シグナル伝達系の異常とNF- κ B経路への影響」、第6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24日-8月25日（ポスター発表）
 - 19) 若林翼、矢持忠徳、矢持淑子、佐々木陽介、Sanaz Firouzi、瀧本雅文、渡邊俊樹、「成人T細胞白血病/リンパ腫(ATLL)における、がん幹細胞微小環境の組織病理学的同定の試み」、第102回日本病理学会総会、ロイトン札幌、札幌、2013年6月6日-6月8日（ポスター発表）
 - 20) Fujikawa D, Yamagishi M, Kurokawa N, Soejima A, Ishida T, Tanaka Y, Nakano K, Watanabe T, “HTLV-1 Tax disrupts the host epigenome by interacting with a Polycomb group protein EZH2”, 平成25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、2013年5月30日-31日 **ポスター賞**
 - 21) 木吉真人、三浦恵理、長門石曉、Jose M. M. Caaveiro M.M、中木戸誠、曾我真司、白井宏樹、河畑茂樹、中村春木、津本浩平. 親和性向上を目指した抗インターフェロングレセプター抗体の合理的改変. 第86回日本生化学会大会 神奈川県横浜市2013.9/13
 - 22) 長門石曉、津本浩平. 生命分子相互作用解析：ITC と SPR 日本薬学会第134年会 熊本県熊本市2014.3/30
 - 23) 石垣知寛、小林誠一郎、大野伸広、中野伸亮、宇都宮與、渡辺信和、内丸薫、東條有伸、中内啓光、“Comprehensive analysis of surface antigens on ATL cells and search for ATL-initiating cell markers”、第75回日本血液学会学術集会、北海道、2013年10月13日
 - 24) 石垣知寛、小林誠一郎、大野伸広、内丸薫、

- 東條有伸、中内啓光、渡辺信和、“フローサイトメトリーを用いた成人T細胞白血病(ATL)の新規臨床検査法HAS-Flowの確立”、第60回日本臨床検査医学会学術集会、神戸、2013年11月3日
- 25) 石垣知寛、小林誠一郎、渡辺恵理、佐藤奈津子、大野伸広、渡辺信和、内丸薫、東條有伸、中内啓光、“ATLにおけるHAS-Flow法の臨床応用～12カラーの病態解析から4カラーの臨床検査まで～”、第23回日本サイトメトリー学会学術集会、東京、2013年6月22日、口演
- 26) 石垣知寛、小林誠一郎、渡辺恵理、中野和民、佐藤奈津子、大野伸広、渡辺信和、内丸薫、渡邊俊樹、東條有伸、中内啓光、“Establishment of a novel flow cytometric method for evaluation of adult T-cell leukemia.”、第13回東京大学生命科学シンポジウム、東京、2013年6月8日、ポスター
- 27) 石垣知寛、小林誠一郎、渡辺恵理、佐藤奈津子、在家裕司、大野伸広、東條有伸、中内啓光、内丸薫、渡辺信和、“HAS-Flow法で広がるATLにおけるフローサイトメトリーの臨床応用”、第1回病態解析研究会、東京、2013年3月15日、口演
- 28) 大野伸広、田野崎隆二、福田隆浩、井上明威、藤重夫、伊藤歩、小林真之、佐藤広太、城憲秀、川俣 豊隆、湯地晃一郎、石垣智寛、小林誠一郎、渡辺信和、内丸薫、東條有伸。「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、札幌、2013年10月
- 29) 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、札幌、2013年10月
- 30) Eri Watanabe, Nobukazu Watanabe, Seiichiro Kobayashi, Kaoru Uchimaru, Youko Suehiro, Ilseung Choi, Naokuni Uike. “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、札幌、2013年10月
- 31) 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ムマブの使用経験」、第75回日本血液学会学術集会、札幌、2013年10月。
- 32) Kobayashi S, Watanabe E, Ishigaki T, Ohno N, Yuji K, Nakano K, Yamochi T, Watanabe T, Watanabe N, Tojo A, 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、ロイトン札幌、札幌、2013年10月11日 (2013年10月11日-10月13日)
- 33) Yamagishi M, Fujikawa D, Kurokawa N, Soejima A, Nakagawa S, Nakano K, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru K, 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、ロイトン札幌、札幌、2013年10月13日 (2013年10月11日-10月13日)
- 34) 中川翔太、山岸誠、藤川大、中野和民、宇都宮與、内丸薫、渡邊俊樹、「ATLにおけるEZ2過剰発現の分子メカニズム」、第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、横浜、2013年10月3日 (2013年10月3日-10月5日)
- 35) 小林誠一郎、渡辺恵理、石垣知寛、中野和民、矢持忠徳、山岸誠、浅沼里実、大野伸広、湯地晃一郎、渡辺信和、東條有伸、渡邊俊樹、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・シンポジウム、東京大学医科学研究所、2013年8月25日 (2012年8月23日-8月25日)
- 36) 中川翔太、山岸誠、藤川大、中野和民、宇都宮與、内丸薫、渡邊俊樹、「成人T細胞白血病細胞におけるポリコムタンパク質の過剰発現機構の解析」、第6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24日-8月25日
- 37) 酒井直規、山岸誠、藤川大、中野和民、宇都宮與、内丸薫、渡邊俊樹、「ATL細胞におけるp38シグナル伝達系の異常とNF-κB経路への影響」、第6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24日-8月25日
- 38) 川俣豊隆、大野伸広、佐藤広太、東條有伸、内丸薫、田野崎隆二、山野嘉久「リンパ腫型ATLに対する造血幹細胞移植術後に生じ、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・シンポジウム、東京大学医科学研究所、2013年8月
- 39) 石垣知寛、小林誠一郎、渡辺恵理、佐藤奈津子、大野伸広、渡辺信和、内丸薫、東條有伸、中内啓光「ATLにおけるHAS-Flow法の臨床応用-12カラーの病態解析から4カラーの臨

- 床検査まで」、第23回日本サイトメトリー学会学術集会、東京、2013年6月
- 40) 佐藤均、Sanaz Firouzi、渡邊俊樹、矢持忠徳、
「免疫不全マウスに連続継代移植されたヒト腫瘍細胞の継代5代目における染色体解析」、染色体学会第64回年会、富山大学五福キャンパス、富山、2013年11月8日—11月10日
- 41) 矢持忠徳、守田陽平、矢持淑子、Sanaz Firouzi、佐々木陽介、若林翼、渡辺信和、内丸薫、宇都宮與、渡邊俊樹、「Putative ATL tumor initiating cells の解析」、第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、横浜、2013年10月3日（2013年10月3日—10月5日）
- 42) 宇野裕和、今泉牧子、渡辺秀晃、秋山正基、末木博彦、矢持淑子、瀧本雅文、「指尖に生じ生検後自然消退した皮膚原発未分化大細胞リンパ腫の1例」（第850回日本皮膚科学会東京地方会例会 2013.9）
- 43) Sanaz Firouzi、矢持忠徳、Lopez Yosvany、鈴木穰、中井謙太、菅野純夫、渡邊俊樹、「Development and validation of a new high-throughput method to investigate T-cell-clonality and integration site preference among HTLV-1-infected individuals」、第6回HTLV-1研究会・シンポジウム、東京大学医科学研究所、2013年8月25日（2013年8月23日—8月25日）
- 44) 小林誠一郎、渡辺恵理、石垣知寛、中野和民、矢持忠徳、山岸誠、浅沼里実、大野伸広、湯地晃一郎、渡辺信和、東條有伸、渡邊俊樹、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・シンポジウム、東京大学医科学研究所、2013年8月25日（2013年8月23日—8月25日）
- 45) 若林翼、矢持忠徳、矢持淑子、佐々木陽介、Sanaz Firouzi、瀧本雅文、渡邊俊樹、「成人T細胞白血病(ATL)における、がん幹細胞微小環境の組織病理学的同定の試み」、第6回HTLV-1研究会・シンポジウム、東京大学医科学研究所、2013年8月23日—8月25日
- 46) 若林翼、矢持忠徳、矢持淑子、佐々木陽介、Sanaz Firouzi、瀧本雅文、渡邊俊樹、「成人T細胞白血病/リンパ腫(ATLL)における、がん幹細胞微小環境の組織病理学的同定の試み」、第102回日本病理学会総会、ロイトン札幌、札幌、2013年6月6日—6月8日
- 47) 塩沢英輔、矢持淑子、本間まゆみ、佐々木陽介、野呂瀬朋子、瀧本雅文、「B細胞性リンパ腫におけるTransferrin Receptor 1(CD71)の発現」（第102回日本病理学会総会 2013.6）
- 48) 佐々木陽介、塩沢英輔、本間まゆみ、野呂瀬朋子、矢持淑子、有泉裕嗣、前田崇、齋藤文護、中牧剛、瀧本雅文、「Double-hit lymphomaの1剖検例」（第102回日本病理学会総会 2013.6）
- 49) 鈴木琢、向井秀樹、雨宮志門、矢持淑子、「顔面に生じた Merkel細胞癌の1例 ～止む得ず長期観察した例～」（第29回日本臨床皮膚科医会 2013.4）
- 50) 佐々木陽介、岸本浩次、北村隆司、塩沢英輔、本間まゆみ、野呂瀬朋子、矢持淑子、中牧剛、光谷俊幸、瀧本雅文、「Double-hit lymphomaの1例」（第54回日本臨床細胞学会総会 2013.5）
- 51) Yasunobu Nagata, Akira Kitanaka, Masashi Sanada, Aiko Sato-Otsu, Yusuke Okuno, Yuichi Shiraishi, Kenichi Chiba, Hiroko Tanaka, Ayana Kon, Kenichi Yoshida, Ken Ishiyama, Shuichi Miyawaki, Satoru Miyano, Toshiki Watanabe, Kazuya Shimoda, Seishi Ogawa “Genetic basis of adult T-cell leukemia/lymphoma”, 第72回日本癌学会学術集会、パシフィコ横浜、2013年10月3日
- (その他)
- 1) 渡邊俊樹、「ATL 発症と病態の分子基盤解明の試み」、第11回東海リンパ腫フォーラム学術講演会、ホテルキャッスルプラザ、名古屋、2013年4月20日(招待講演)
- 2) 渡邊俊樹、「ATL 多段階発癌の分子機構解明へのアプローチ」、第1回 ATL 疾患検討会、東京コンファレンスセンター・有明、東京、2013年7月13日(招待講演)
- 3) 渡邊俊樹、「診断と治療法開発につながるATL の分子病態解明の試み」、長崎県産婦人科学会地方会、島原、長崎、2013年8月11日(招待講演)
- 4) 渡邊俊樹、「HTLV-1 総合対策3年目の現状」、長崎県 ATL ウイルス母子感染防止に関する講習会、長崎県医師会館、長崎、2013年12月18日(招待講演)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

産業財産権の名称: 患者検体を用いた HTLV-1 キャリア、成人 T 細胞白血病の発癌過程進行

度又は悪性度の評価法

知財部管理番号：25B132002-1

発明者：渡辺信和、内丸薫、小林誠一郎

出願人：国立大学法人 東京大学

出願番号：特願 2013-034326

出願年月日：2013年2月25日（国内出願）

2. 実用新案登録

なし