

II. 分担研究報告書

miRNA 細胞内輸送担体としての単鎖抗体作製

研究分担者 津本 浩平 東京大学工学系研究科バイオエンジニアリング専攻
東京大学医科学研究所疾患プロテオミクスラボラトリー

研究協力者 長門石 暁 東京大学工学系研究科バイオエンジニアリング専攻
東京大学医科学研究所疾患プロテオミクスラボラトリー

西田 亜季 東京大学大学院新領域創成科学研究科
メディカルゲノム専攻病態医療科学分野

研究要旨：

成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (Adult T-cell leukemia/lymphoma:ATLL, 以下 ATL) における網羅的 miRNA の解析により、発現異常プロファイルと著しい miR-31 の低下が明らかとなり、レンチウイルスベクターによる miR-31 の ATL 患者由来の腫瘍細胞への導入はアポトーシスを誘導し、miRNA が ATL において新規治療標的となりうる可能性が示された(Yamagishi *et al.*, *Cancer Cell* 21(1):121, 2012)。今回我々は、ATL における miRNA を治療標的とした新規治療薬の基礎研究にあたり、単鎖抗体(scFv)による ATL 細胞特異的 miRNA の細胞内輸送に着目した。標的細胞表面抗原として ATL と HTLV-1 感染細胞株で発現が報告されている OX40 と CD5 を、miRNA のキャリアーとしてカチオン性ペプチドを選択した。Sequential なペプチド融合単鎖抗体は発現を得られたが、大腸菌に由来する核酸の除去が困難であるため精製に難航した。不溶性画分の巻き戻しで抗原との結合活性を有するペプチド融合 scFv を精製できたが、収量が少なく、また安定に再現性良く最終精製物を得ることが難しいなどの課題が残された(平成24年度まで)。そこで、精製後の scFv へカチオン性ペプチドを付加する化学修飾法へと方針を移行した。カチオン性ペプチドと単鎖抗体のシステイン残基を介したジスルフィド結合により、ペプチド融合単鎖抗体の安定した最終精製に成功した。表面プラズモン共鳴(SPR)でペプチド融合 scFv は抗原への高い親和性と結合安定性を保持していることが明らかとなり、また FACS 解析で HTLV-1 感染細胞株に対する結合活性を確認した。現在、ペプチド融合 scFv の、ATL 感染細胞への miRNA 細胞内輸送効果と miRNA 導入による ATL 細胞への生物学的効果を評価中である(平成25年度)。

A. 研究目的

成人 T 細胞白血病/リンパ腫(Adult T-cell leukemia/lymphoma:ATLL, 以下 ATL)は、HTLV-1(ヒト T 細胞白血病ウイルス)感染を原因とする末梢性 T 細胞腫瘍である。本邦に 120 万人の HTLV-1 キャリアーが存在すると推定され、2.5-5.0%程が生涯に ATL を発症するとされている(Iwanaga *et al.*, *Blood*.2010 Aug 26;116(8):1211-9).

ATL はくすぶり型、慢性型、リンパ腫型、急性型に分類され、HTLV-1関連疾患としてはHTLV-1関連脊髄症 (HAM/TSP) やHTLV-1ぶどう膜炎 (HU) などが知られている。ATLの全病型の生存期間中央値は9ヶ月であり、特に急性型の生存期間の中央値は6.2ヶ月とその生命予後は極めて不良である(Shimoyama *et al.*, *Br J Haematol*.1991 Nov;79(3):428-37.). ATLや関連疾患の発症予防や

予後は疾患の発見以後劇的な改善を得られていない実状があり、有効な治療薬開発が望まれている。そこで今回我々は、ATLとHTLV-1感染細胞に対する新規の治療標的としてmiRNAに着目した。当研究室における先行研究室で、ATLにおける患者検体を用いた大規模な網羅的miRNAの解析を行い、miRNAの発現異常プロファイルを明らかにした。その中でも特にmiR-31は正常T細胞と比較して著しい低下を認め、PRC2を介したエピジェネティックな制御を受けmiR-31の発現低下が誘導されることを示し、miR-31の標的遺伝子としてNIKを新たに同定した。これらの結果からPolycombファミリーによるエピジェネティックな制御がmiRNAを介してNF- κ B非定型経路のシグナル活性化に寄与することを示した。ATLにおいてNIKを介したNF- κ B非定型経路の活性化は、細胞の増殖や抗アポトーシスに寄与する極めて重要なシグナルであり、ATL患者検体へのレンチウイルスベクターを用いたmiR-31導入によりアポトーシスが誘導され、正常T細胞での影響は軽微であったことからmiRNAがATLにおける新たな治療標的となりうる可能性が示唆された(Yamagishi et al., *Cancer Cell*. 2012 Jan 17;21(1):121-35.)。

これまでにmiRNAの発現異常は様々な悪性腫瘍において報告され、新規の治療標的として注目されているが、安定性、特異性、体内動態、安全性等の様々な観点からDrug Delivery system(DDS)の開発がその大きな課題となっている。輸送担体としては、nano particle、liposome、cell penetrating peptide、アプタマー、抗体等が知られているが、各担体における利点を有効に利用し、効率的、特異的で安全性に考慮したDDSの開発が重要となる。今回我々は、miRNAの輸送担体としてATL細胞特異的な輸送と組織移行性の観点から、単鎖抗体(scFv)に注目し、scFv-miRNA複合体によるATL細胞特異的miRNA輸送に着手した。

単鎖抗体と融合させるmiRNAをキャリアーする構造として、protamine、TATをはじめとする核酸結合蛋白質の部分配列や、9 mer Arginine(9R)等、核酸との結合能と細胞膜透過性機能を有し核酸の輸送担体として報告されているカチオン性ペプチドを選択した。また単鎖抗体が標的とする細胞表面抗原はATL細胞やHTLV-1感染細胞での発現が報告されているOX40とCD5を選択した。

平成24年度までは、単鎖抗体作製にあたり可変領域のクローニングと大腸菌発現系を用いたカチオン性ペプチド融合単鎖抗体の発現と精製、その物性機能解析を中心に行ってきた。カチオン性ペプチド融合単鎖抗体は、カチオン性ペプチドに大腸菌由来のDNAやRNAが結合することにより精製が困難であることが明らかとなり、厳密な核酸除去が精製に重要である事が示唆された。精製条件を検討し、6Mグアニジン変性下のNiアフィニティークロマトグラフィー、段階透析法による巻き戻し(refolding)、サイズ排除クロマトグラフィーにより、単量体での精製に成功した。精製した9R融合単鎖抗体(anti OX40 scFv-9R)は抗原への高い親和性と結合安定性を保持していることを確認した。しかし平成24年度の研究成果では、抗原とペプチド融合単鎖抗体の結合活性を確認できたが、十分な収量を得られず、また安定に再現性良く最終精製物を得ることが困難であるという課題が残された。

そこで平成 25 年度は、純度と精製効率の改善を主眼においたカチオン性ペプチド融合抗体の発現と精製法の確立と標的細胞への生物学的な活性評価を中心に研究を行った。

B. 研究方法

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。

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が変わるため、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。

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。

(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、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を用いて発現を確認し、不溶性画分に良好な発現を認めた。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 2 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 MT2 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。

D. 考察

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考えられた。またカチオン性ペプチドを融合させていない scFv-WT は、核酸除去が可能で純度良く精製が可能であることから、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移行した。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。システイン残基を単鎖抗体に導入することで、発現パターンが大きく変化し不溶性画分への発現となったが、refolding により核酸を除いた高純度な scFvC を得る事ができた。システイン残基のジスルフィド結合を効率良く反応させるために、Buffer、pH、温度、反応時間等を検討したが、現時点では最大で 10% 前後の反応効率となっている。この方法では sequential な発現・精製法と比較して安定に最終精製物を得

る事ができ、核酸除去も良好で純度良く精製が可能であるため、今後は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

最終精製が可能であった、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。現在、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、今回 3 種類のカチオン性ペプチドを選択したが、それぞれのペプチドと RNA との詳細な相互作用解析について等温滴定型カロリメーターを用いて行っている。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。

E. 結論

化学修飾法によりカチオン性ペプチド融合単鎖抗体の最終精製に成功した。精製で得られたペプチド融合単鎖抗体はいずれも抗原への高い親和性と結合安定性を保持し、また標的細胞特異的に結合できることが明らかとなった。今後は RNA の細胞内輸送効率や生物学的活性評価を行い、ペプチドと RNA との相互作用解析を通じて最適なカチオン性ペプチドを選択し、効率のよい RNA の細胞内輸送システムの確立を目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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)

- 2) Yumura K, Ui M, Doi H, Hamakubo T, Kodama T, Tsumoto K, Sugiyama A. Mutations for decreasing the immunogenicity and maintaining the function of core streptavidin (Article). **Protein Sci.** 22(2), 213-221, 2013
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)

2. 学会発表

(国際学会)

該当なし

(国内学会)

- 1) 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
- 2) 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

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

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

分担研究者：中内啓光 東京大学医科学研究所・教授
分担研究者：内丸 薫 東京大学医科学研究所附属病院・准教授
分担研究者：矢持淑子 昭和大学医学部・准教授
分担研究者：矢持忠徳 東京大学大学院新領域創成科学研究科・特任研究員

研究要旨：

本分担研究の目的は、ATL患者の検体を用いてATLのがん幹細胞（ATL-CSCs）を同定することである。Cancer Stem cellsはしばしばTumor Initiating Cellsという言葉に置き換えられる。このTumor initiating Cellsを同定するために戦略としては生着能を持つ細胞集団には必ずTumor Initiating Cellsが存在するといった概念を元に検討を行ってきた。我々は昨年CD3HI CD4+においても連続移植継代が可能であることを報告しているが、これにおいても連続移植継代中にCD3HIの細胞集団がCD3Loへと変化し、そのまま継代が可能になった。このことはCD3HIの細胞集団がCD3Loへ移行できることを意味し、その後、生着能を獲得するのでは無いかと予想した。そのような背景から患者由来のCD3Loの細胞集団からも生着能をもつ細胞集団が存在するのではないかと着目したところ、明らかにCD3HIに比べて生着日数は要するが、CD3Loにおいても生着することが確認できた。このことは患者検体の中にも明らかに異なる細胞集団が生着能を持つことを示している。またCD3Lo分画で生着した細胞集団はウイルスロード100%でCD4+, CCR4+, CD5+, CD25+, CD3Loを示し、現在までに発表されたXenograftの報告において示されたPhenotypeのなかでも最もATLに近いものが得られたと考えている。これらの両分画はどちらも同じインテグレーションサイトを有し、それが患者のメジャーインテグレーションサイトとも同一であった。我々はこのCD3Lo分画こそがCD3Hiの癌幹細胞分画から派生した後に移行し、生着能を持ち得た集団であると考えている。次に矢持淑子班にこれらの連続移植継代マウスの腫瘍細胞移植後の浸潤臓器の特定を検討した。腫瘍細胞は主に多形性で核形不整の強いTリンパ球であるが、ほぼ全身、脾臓、肝臓、肺、骨髄、胃、腎臓、膵臓、腸管、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付けることができた浸潤を起こしていた。

以上は内丸班、中内班、矢持班との共同研究による成果である。

A. 研究目的

ATLは、我が国に108万人存在するHTLV-1の無症候性キャリアーから毎年1,000人ほど発症する極めて悪性度の高いT細胞腫瘍である。急性骨髄性白血病などと異なり、ATLの多剤併

用化学療法は薬剤耐性の出現などの理由で未だに予後は極めて不良であり、早急な診断・発症予防・革新的治療法の開発が急務である。ところで、急性骨髄性白血病の一部では、がん幹細胞と思われる分画が同定され（CD34⁺CD38⁻）、

この分画が免疫不全マウスに腫瘍死をもたらすことが示されている (Bonnet D. and Dick J.E. Nat. Med. 3: 730-737, 1997)。がん幹細胞は治療に抵抗性であることが示唆されており、この分画をターゲットとした薬剤の開発が進められている。この癌幹細胞の定義は幹細胞ががん化したものではなく、いわゆる Tumor initiating cell を指しており、免疫不全マウスに腫瘍として生着能を有するものを示している。

現在までに、ATL に関する免疫不全マウスの移植系は数多くの研究グループが報告している。最近では CD34 陽性の Hematopoietic Stem cell を NOD/SCID に移植し CD4 陽性の lymphoma like cells にまで誘導が可能となったことを Feuer グループ (Blood 115 2640) が報告している。一方、CD4 陽性の T 細胞由来で連続移植継代を可能としたのは高折先生のグループのみである (JJCR 87, 887)。彼らは 14 代まで連続移植継代を行っている。しかしながら 1996 年当時は癌幹細胞という発想が無く、それに関する報告はない。

ATL の発症に関する報告としては 20 年間の Follow up study で HTLV 1 キャリアの 2% においてサザンブロット法を用いると HTLV1 を検出することが可能であるが、そのうち 40% 以上が ATL を発症することが報告されている (Blood 105, 903)。また ATL 患者末梢血から発症時と同じインテグレーションサイトを有する感染細胞が 8 年前から末梢血に見られることが報告されている (Int J Cancer 110 621)。以上を簡単にまとめると CD34HPC が HTLV1 感染により T 細胞まで分化する可能性があるが、その移行した T 細胞はキャリアの時から確認され、それが 8 年後に腫瘍白血病細胞になった事例が存在する。我々は JSPFAD に深く関わっており、キャリアのフォローアップの観点からもまず患者末梢血中の T 細胞に腫瘍化能があるのか、またその中に Tumor Initiating Cell の存在の有無を検討してきた。その結果、患者末梢血中の T 細胞分画より癌幹細胞活性を有する細胞集団が存在する事を強く示唆する結果を有した。これは今後の患者に対する治療方針に大きく影響する。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

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 Tumor Initiating Cells そのものが変化しても生着能を持ち続ける細胞集団であり、これにより多くの遺伝子異常の蓄積が可能となりうる。従ってこのことが ATL の多段階発がん説を強くサポートする現象ではないかと考えている。その現象に関して新たなヒントをもたらすモデルをさらに作成することに成功した。この患者は ATL Acute type の患者でマウスに移植するために Sorting を行ったところ、すでに CCR4 はほとんど発現が認められなかった。そこで CD3 に着目した。その理由は ATL 細胞において CD3 は減弱が認められる事が報告されている。そこで CD3 強弱の発現の差で Sorting を行ってみた。3X10⁷ の PBMC を sorting したところ CD3HI の分画と CD3LO の分画はそれぞれ 5.7X10⁶ と 3.7X10⁵ の細胞が Sort できた。従って本来は PBMC に存在する細胞数を目処にして比較検討していく必要があるので PBMC 3X10⁷ あたり CD3HI 3X10⁶ (本来は 5.7 X10⁶)、CD3LO 3X10⁵ (本来は 3.7 X10⁵) が存在するとみなして Injection した。そしてこれらをマウスへ移植した結果、ATL 細胞が存在すると思われる CD3Lo の分画より CD3HI の分画において先に 5 代以上の連続移植

が可能であることが示された。さらにその生着した細胞集団は連続移植継代の2代目以降はCD3Hiと思われる細胞集団はほとんど認められず、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。

そこでこのようにCD3Lo移行後にも生着能が示される細胞集団がヒト患者内にも存在するのではないかと着目したところ、CD3Loの3X104 (PBMC3X10⁶相当)では5代目までの連続移植は確認できないが、3X10⁵ (PBMC3X10⁷相当)ではCD3Hiより生着日数は明らかに時間を要するが確認できた。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分面の細胞集団は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)。従ってこの細胞集団はこの移植系において初めてATL Like Phenotypeの細胞集団まで誘導した事例となる。またこの連続移植継代株は患者のMajor Integration siteと同一であった。よってCD3Loの細胞集団にはATLの元となる細胞集団がいるはずである。またこの細胞集団もはじめはCCR4⁻を示していたにもかかわらず、連続移植継代中にCCR4⁺を示したのは生着能を持つ細胞集団のマーカーが変化することをこの事例もサポートしている。一方でCD3HiはATL分画ではなく、正常なT細胞が存在する可能性があると考えてSortingを行ったところ、この細胞集団の方が早く生着した。しかもその細胞集団においても患者とのHTLV1 Integration siteは同一であった。しかしながらこの細胞集団のPhenotypeはCD5⁺、CD25⁺、CD3dim、CD4⁺、CCR4⁻を示し典型的なATLのPhenotypeを示さなかった。さらにウイルスロードは369%であった(図1)。これらのデータはいわゆる一般的なATLとは異なる性状を示す。しかしながらCD3LoとCD3Hiは同じIntegration

siteを有しながら連続移植の結果は大きく異なる、これはATL分画とそうでない分面の細胞集団は、たとえ同じIntegration siteであってもそこに存在する細胞集団の性質は大きく異なることを示唆する。さらに先ほどからくり返し述べていることであるが、細胞表面マーカーが変化しても生着能を保持することがATL Tumor Initiating Cellの特徴である。T cellのLineage markerであるCD3Hiを持つ集団とATLの一つの特徴であるそのCD3の発現が低下するCD3Loの細胞集団のどちらでも生着したこと、またこの2つの細胞集団は同じIntegration siteを有する事からマウスの体内だけではなく患者由来の細胞集団においても細胞表面マーカーが3Hiから3Loへ変化しても生着能を保持しうることを示唆していると考えている。我々はこのCD3HiからCD3Loへの変化が免疫不全マウスで見られた現象が患者内でも起こりうることを示す極めて重要な症例と考えている。このために今回の患者PBMCを用いてその可能性に関して現在検討を行っている。

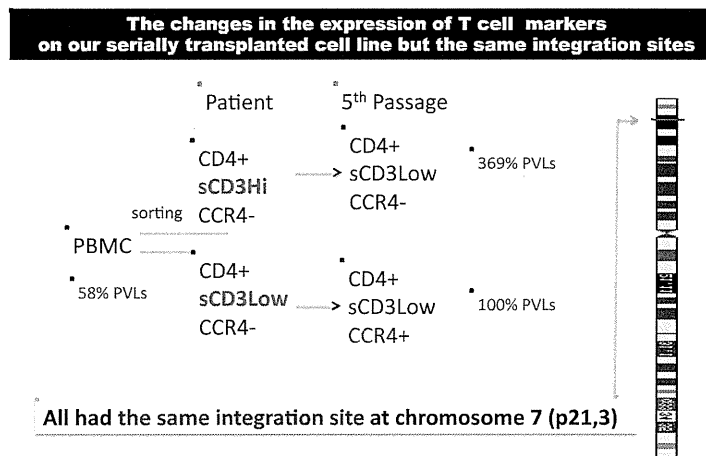


図1 Cell surface markers of the major population of transplanted spleen mononuclear cells were changed over the serial transplantation from a CD4⁺ CD3Hi or CD4⁺ CD3Lo phenotype of the sorted patient cells to the above-mentioned phenotype of the 5th passage. However, the same integration sites were isolated from The original patient sample and the serially transplanted cell lines.

次に、我々は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解析を行なってい

る。ニッチの候補を探索するため、FACS で Sort した CD4⁺/CCR4⁺ が幹細胞画分を移植し、30 日経過した ATL マウスにおける終末病態の解明を行った結果、現在までに死因と主たる腫瘍浸潤部位が決定された。

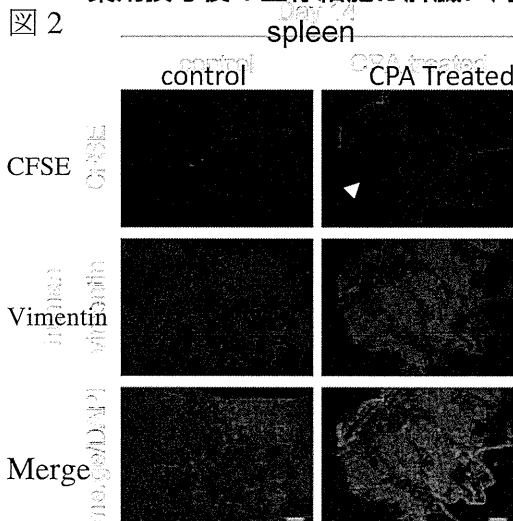
当該腫瘍細胞の形態学的特徴として、核小体を有し紡錘形または類円形、多形性の核形不整の強い T リンパ球であることが挙げられ、多核の細胞も認められる。この細胞のマウス組織における浸潤を評価するため、パラフィン包埋切片を作製し HE 染色とともに human vimentin に対する免疫組織化学的染色を実施し、形態観察を行った。

その結果、マウスの死因に関しては、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付けることができた。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、呼吸不全を起していたと推察する。次に、多くの検体に共通する主な腫瘍浸潤部位として、肝臓、肺、脾臓、骨髄の 4 ヶ所を同定した。いずれの組織も血管周囲を中心とした腫瘍細胞の増殖が顕著であった。

次に、同様の方法で FACS で Sort した CD4⁺/CD3Lo が幹細胞画分を移植し 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。その結果、マウスの死因に関しては、腫瘍細胞が、脾臓、肝臓、肺、骨髄、胃、腎臓、膵臓、腸管、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付けることができた。次に、始めに癌幹細胞の存在が提唱された AML stem cell の薬剤耐性モデルにはその細胞集団が Nich に存在し、その際に増殖も抑制状態にあることが報告されている。またその増殖が静止期に入っていることが薬剤耐性の大きな原因であることも九州大学の中山敬一先生らが次第に明らかにされている。そこで ATL の連続移植継

代株においてもそのような細胞集団が存在するか検討を行った。方法としては CFSE Labeling 法を用いた。これは緑色の蛍光物質で細胞に直接ラベリングすることが出来る。ラベリングされた細胞集団は長期的に安定を示すが細胞分裂と共にその明るさは減少していく。従って長期的に細胞が分裂しない場合 CFSE は明るさを初期と同等に保つことが出来る。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できた。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 2)。

薬剤投与後の生存細胞は脾臓に局在した



CD3Lo Cells を CFSE Label して Injection した後に Day11 に CPA を Injection した。Control は Day11 で Non treatment とした。このマウスを Day 14 で解剖を行い病理解析を行った。上記の写真は脾臓における蛍光免疫染色で緑は CFSE、赤は抗ヒトビメンチンの発現パターンを示す。最下段は緑と赤さらに DAPI による核染色を青色とした 3 色の Merge 画像を示している

D. 考察

ATL は HTLV1 ウイルスが感染して発症する腫瘍疾患であるが、その発症年齢はほぼ 60 才以降である。このことより ATL は少なくとも 5 個以上の遺伝子変異の蓄積が必要であり、これらの原因から多段階仮説が提唱されてきた。しかしながら最近では癌幹細胞や Clonal Evolution 仮説と言った新たな概念が加わることで癌の Oncogenesis もより詳細に明らかになりつつある。

現在までに Dick が発表した癌幹細胞仮説は多くの研究者により指示された。Dick の AML Stem cell 以降、腫瘍細胞の中の一部の細胞集団に癌幹細胞が存在する事が明らかになった。しかしながら 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。これら癌幹細胞の中心的な研究方法は免疫不全マウスに移植し、移植前の細胞と移植後の細胞を比較することより、生着能を持つ細胞集団を考察していくことである。この移植により癌幹細胞を考察するにあたり、非常に多くの生着能力を持つ細胞集団が解析されてきた。そしてその細胞集団が腫瘍において極めて複雑な性質を示す事も明らかになってきている。我々は1昨年より連続移植継代を試みるにあたり、まず ATL そのものに生着能を有する細胞集団がいるのか、あるいはそれ以外の細胞集団に存在するのかを検証してきた。まず CD4 陽性細胞集団中の CD3HI の分画において長期間連続移植が可能な細胞が存在する事を示唆した。一方対照群として CD4 陽性 CD3Lo とでは生着においての日数に明らかに差が見られた。とくに CD3HI を移植した免疫不全マウスにおいては、元々 ATL 細胞が存在する事が強く示唆されている分画、CD3LO の細胞集団より早く生着が確認できた。このことは明らかに ATL 細胞集団の中に Cell Heterogeneity を示す現象だと考えている。またその CD3Lo の分画にも患者由来の Major integration site と同じ Integration site を持ち、ウイルスロード 100%でしかも ATL マーカーの発現、CD3Lo CCR4+ CD4+ CD5+ CD25+を満した細胞集団が得られた。このように同じ Integration

site を持ち異なる細胞分画からそれぞれの連続移植継代株が得られたのは世界でも初めてである。また CD3Lo で得られた細胞集団は現在まで報告されている移植継代マウスの中でも最も ATL Like Phenotype を満たしている細胞集団と言える。このことは ATL 分画を移植して最も ATL Phenotype を持つ潜在能力のある細胞集団はこの ATL 分画こそが最大の候補であることを示唆している。また HTLV1 インテグレーションサイトは CD3Hi CD3Lo 共に患者のメジャーインテグレーションサイトと同一であった。

このような細胞集団が CD4 陽性中の CD3HI の細胞集団が 5 代以上連続移植できることが示されたことについては癌幹細胞の存在を強く示唆するものであった。しかし今回の結果より少なくとも何点か Leukemia stem cell とは異なる形であることが示唆された。

まず移植実験で CD4 陽性細胞中の CD3Hi の連続移植継代中に生着している細胞集団が CD3 も Lo となっている。(このことは移植した初期の時点の生着能をもつ細胞集団が消失することを意味し、この点は明らかに Leukemia 癌幹細胞とは異なる現象である。またこれらの発現が変化したマーカーである CD3 は ATL の Lineage マーカーと言っていいほど大事なマーカーに当たる。

また数多くの報告によると免疫不全マウスを用いた幹細胞および癌幹細胞の実験で示された細胞表面の Phenotype の変化や分化は極めてヒトと類似した結果をもたらしている。

以上のことからこのモデルの連続移植継代中の生着した細胞集団の Phenotype がヒトにも類似した細胞集団が存在するのではないかと予想した。

従ってこのことは CD4 陽性細胞のうち CD3HI の連続移植継代中の生着した細胞集団は前述のように CD3Lo に移行することが予想される。しかも同一インテグレーションサイトの CD3Hi および CD3Lo 両分画において連続移植継代が可能となった事で患者内でも CD3Hi と CD3Lo それぞれの分画が生着能力を有することになる。今後はこの細胞集団が 3Hi から CD3Lo へ移行する

ことを同定すれば患者内でもマーカーが変化し、生着能力が保持されることを示す事ができる。

またこのことは移植前とその細胞表面マーカーが変化するにもかかわらず、生着能を保持し続ける点も Leukemia Stem cell と明らかに異なる。しかしこのことが Tumor Initiating Cells そのものが変化しても生着能を持ち続ける細胞集団を意味して、これにより多くの遺伝子異常の蓄積が可能となりうる。したがってこのことが ATL の多段階発がん説を強くサポートする現象ではないかと考えている。

E. 結論

連続移植継代系を用いて、ATL 細胞の中に tumor initiating cell (TIC) としての能力を持つ細胞集団の存在を確認したが、膜抗原マーカーが変遷することから、これによる TIC 集団の同定はできていない。ゲノム及びプロウイルス組み込み部位等の情報を加えて、細胞集団の定義を試みる必要がある。

移植マウスは腫瘍死すること、薬剤抵抗性で細胞分裂活性の低い細胞集団が脾臓に局在する事が明らかになり、niche の同定が期待できる。

F. 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) Umemura M, Miwa Y, Yanai R, Isojima S, Tokunaga T, Tsukamoto H, Takahashi R, Yajima N, Kasama T, Takahashi N, Sueki H, Yamaguchi S, Arai K, Takeuchi Y, Ohike N, Norose T, Yamochi-Onizuka T, Takimoto M. A case of Degos disease: demonstration of

C5b-9-mediated vascular injury. **Mod Rheumatol**. 2014

- 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, 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)

2. 学会発表

(国際学会)

- 1) 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

(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) 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
 - 7) 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)
 - 8) 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)
 - 9) 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)
 - 10) 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)
 - 11) 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
 - 12) 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
 - 13) 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)
 - 14) 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)
 - 15) 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)
 - 16) 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)

G. 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

網羅的解析を基盤とした新規分子標的の探索

研究分担者 内丸 薫 東京大学医科学研究所附属病院 血液腫瘍内科・准教授
山岸 誠 東京大学大学院新領域創成科学研究科・特任研究員

研究協力者 小林誠一郎 東京大学医科学研究所・助教
中野 和民 東京大学大学院新領域創成科学研究科・助教

研究要旨：

ATL に対する新たな分子標的を創出する上で、ATL 検体を用いた分子レベルの詳細な解析が必須である。本年度は、昨年度までの成果を踏まえ、エピジェネティック制御系及びシグナル伝達系の異常に注目し、ATL 細胞の新たな分子病態の理解を進めることを目的とした。

ATL 細胞のエピジェネティック異常の原因である EZH2 の過剰発現は NF- κ B 経路の恒常的な活性化が原因であった。また他のリンパ腫で見られる活性化変異はこれまでのところ全く見つかっておらず、制御因子のダイナミックな量の変化によってエピジェネティック異常が引き起こされていると考えられた。また ATL サンプルを用いてメチル化ヒストンの網羅的解析を行い、ATL 細胞のエピジェネティックな異常の全体像を明らかにした。ATL 細胞は EZH2 の阻害剤によって強烈的なアポトーシスを示した。

シグナル伝達の解析では、ATL 細胞における p38 経路および Hedgehog 経路の活性化とその原因を明らかにし、さらに両者に対する特異的阻害剤の有効性についても明らかにした。

A. 研究目的

成人 T 細胞白血病(adult T cell leukemia, ATL)は human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)の感染によって引き起こされる T 細胞性白血病/リンパ腫である。50～60 年という長い潜伏期間に HTLV-1 感染末梢血 T 細胞に複数の遺伝子異常が蓄積し腫瘍化が引き起こされる。現在日本では約 120 万人の感染者が存在し毎年約 1000 人を超える感染者が ATL を発症するが、予後は極めて不良であり、有効な治療法は未だに存在しない。

これまでの多くの研究成果から、ATL の発症には、HTLV-1 感染から長期間に渡りゲノム異常が蓄積する多段階発がんモデルが当てはまると考えられているが、実際の急性型の腫瘍細胞には非常に多彩なゲノム異常があり、他のがんで散見されるような、腫瘍細胞を特徴づけるような定義的なゲノム異常は見つかっていない。一方でこれまでの多くの研究から、ATL 細胞の特徴

として非常に多くの遺伝子の発現異常が報告されている。その原因にはサイトカインなどによる細胞微小環境、エピジェネティックな異常、microRNA の発現欠失、スプライシング異常などが報告されているが、それらの異常を増幅し細胞の性質に直接影響しているのは、多くのシグナル伝達異常である。これまでに ATL 細胞における NF- κ B 経路や JAK-STAT 経路など数多くのシグナル伝達系の異常が報告されているが、正常細胞の機能や分化などにおいて重要な他のシグナル伝達系の ATL における役割については不明な点が多く残されている。また各シグナル伝達経路のクロストークはシグナル伝達研究をより深く正確に理解する上で重要な研究課題である。

本年度は、さらなる ATL 細胞における新規分子標的の探索を目的とし、これまでに研究を進めてきたエピジェネティック、特に polycomb family 依存的な異常の詳細な解析に加え、大規

模解析を基盤とした ATL 細胞における新たなシグナル伝達異常に注目し、研究を行った。

B. 研究方法

1. EZH2 の発現制御機構の解析

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。

2. EZH2 の遺伝子変異解析

ATL サンプルは JSPFAD で管理される 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シング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。

3. 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。

4. 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。

5. 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-Om1、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。

(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 日付け東京大学医科学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 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の検討

我々のこれまでの研究成果より、ATL 細胞の発現異常、シグナル伝達異常の背景には polycomb family 依存的なエピジェネティック異常が存在することが強く示唆されている。実際に ATL 細胞で過剰発現している EZH2 をノックダウンすると、ATL 細胞株及び患者由来腫瘍細胞に対してアポトーシスを誘導できる。この polycomb family の活性は活性中心である EZH2 の発現レベル及び活性レベルで規定されることが分かっているが、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、EZH2 の発現が T 細胞の活性化と非常に強く相関すること、また TCR からの複雑なシグナル伝達系が EZH2 の誘導に関わることを明らかにした。さらに、複数の ATL 細胞株に対して阻害剤パネルを検討し、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、ATL 細胞中の 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。さらに上記について、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、ウェ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。

2. ATL における EZH2 遺伝子変異の解析

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。特に一部の B 細胞リンパ腫においては活性化変異が同定されており、腫瘍化、悪性化の原因であるとして研究が精力的に進められている。そこで ATL における polycomb の活性化と遺伝子変異の関係を調べるために、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。

3. ATL 細胞に対する EZH2 阻害の効果

上述のように EZH2 の分子異常は多くのがんで共通する特徴であり、分子標的として注目されている。従来はこのようなヒストンメチル化酵素に対しては非特異的な阻害剤しか存在しなかったが、近年になり特異的な阻害剤の開発が進み、EZH2 遺伝子変異を持つリンパ腫に対する有効性が報告され始めている。そこで次世代の 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することがわかった。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。

4. 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

我々はこれまでに HTLV-1 Tax が宿主エピジェネティック因子群と相互作用し、影響を与える事を明らかにしてきた。さらに昨年、Tax の恒常的な発現を誘導するレンチウイルスベクターを構築し、Tax が健常者 PBMC 及び CD4+T 細胞に対してエピジェネティックな異常を蓄積させることを明らかにした。

そこで本年度は、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。このことから 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。

5. 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。そこでバイサルファイトシーケンス法を用いて一連のサンプルについて解析を行ったところ、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、レンチウイルスを用いて 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。

本研究ではさらに 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。その結果、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。

6. ATL 細胞における p38MAPK シグナル伝達系の解析

昨年までに ATL 細胞における p38 経路の活性化と ATL 細胞の生存能との関連について検討を進めた。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- κ B 因子の核移行を阻害され、ATL 細胞にアポトーシスを誘導することがわかった。また同時に p38 の下流因子である MK2 及び MSK1 のリン酸化レベルも低下することが確認された。従って、ATL 細胞における p38 の活性化は NF- κ B 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。

D. 考察

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。

エピジェネティックの異常については、

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った。興味深いことにこの制御が 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である。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 経路は、いずれも T 細胞の制御や機能、分化と密接に関わっている。ATL において、両者ともに活性化を阻害することで強力なアポトーシスを誘導できたことから、ATL 細胞の生存能は NF- κ B 経路だけでなく、複数のシグナル伝達経路によって複雑に制御されていると考えられた。さらに本研究における重要な発見として、EVC の過剰発現がエピジェネティックな異常によって誘導されていたことである。さらに ATL 患者からの直接的な証拠により、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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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. (doi: 10.1038/bmt.2014.10)
- 2) 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.** 2014 in press. (doi: 10.1016/j.bbmt.2013.12.563).
- 3) 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, Asano S, Tojo A, Takahashi S. Single-Unit Cord Blood Transplantation after Granulocyte Colony-Stimulating Factor-Combined Myeloablative Conditioning for Myeloid Malignancies Not in Remission. **Biol Blood Marrow Transplant.** 20(3):396-401, 2013 (doi: 10.1016/j.bbmt.2013.12.555).
- 4) 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).
- 5) 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.** 2013 97(5): 667-672 (DOI: 10.1007/s12185-013-1314-z).

- 6) 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)
- 7) Ly BT, Chi HT, Yamagishi M, Kano Y, Hara Y, Nakano K, Sato Y, Watanabe T. Inhibition of FLT3 expression by green tea catechins in FLT3 mutated-AML cells. **PLoS One** 8(6):e66378, 2013 (doi: 10.1371/journal.pone.0066378)

(総説)

- 1) 内丸薫 わが国におけるHTLV-1キャリアとATL患者に対する相談機能と知識の普及、血液内科、2014 in press.
- 2) 内丸薫 成人T細胞白血病・リンパ腫の多彩な肺病変 血液内科 66(5); 582-587, 2013
- 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): 308-315、2013年3月

2. 学会発表
(国際学会)

- 1) Ly BTK, Chi HT, Yamagishi M, Kano Y, Hara Y, Nakano K, Sato Y, Watanabe T, “Inhibition of FLT3 expression by EGCG in FLT3 mutated-AML cells”, The 5th International Conference on O-CHA (Tea) Culture and Science(第5回国際 O-CHA 学術会議), Shizuoka Convention & Arts Center, Shizuoka, November. 8(November 6- November 8), 2013 (Poster) **Outstanding Poster Award**
- 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, epigenetics, and emerging signaling abnormalities”, 16th International

Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, Montreal, Canada, June 29(June 26-30), 2013(Oral) **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(Poster) **Top10 posters**
- 5) 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)

(国内学会)

- 1) 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)(ポスター発表)
- 2) 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)(ポスター発表)
- 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）（一般口演）
- 4) 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
 - 5) 佐藤奈津子, 渡辺恵理, 石垣知寛, 小林誠一郎, 大野信広, 崔日承, 末廣陽子, 鶴池直邦, 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
 - 6) 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
 - 7) 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.
 - 8) 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）
 - 9) 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）（ポスター発表）
 - 10) Ly BTK, Chi HT, Yamagishi M, Kano Y, Hara Y, Nakano K, Sato Y, Watanabe T, “Inhibition of FLT3 expression by green tea catechins in FLT3 mutated-AML cells”, 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12日（2013年10月11日-10月13日）（ポスター発表）
 - 11) 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）（口演発表）
 - 12) 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）
 - 13) 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）
 - 14) 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はポリコームタンパク質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）
 - 15) 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）
 - 16) 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