

2013/3045B

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24-25年度
総合研究報告書

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24-25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	5
渡邊 俊樹	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	27
III. 研究成果の刊行物・別刷	31

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。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 を作製し *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 の作製に成功した。抗原との結合活性を確認し、更に、細胞との結合活性を FACS 等で検証して、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

小川誠司 京都大学大学院・教授

中内浩光 東京大学医科学研究所・教授

矢持淑子 昭和大学医学部・准教授

内丸 薫 東京大学医科学研究所・准教授

矢持忠徳 東京大学大学院・特任研究員

今井浩三 東京大学医科学研究所・特任教授

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- κ B 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- κ B 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い。

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)。また作製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。初年度はグループごとに専門性の高い研究を進め、ATL に特化した治療の基盤を作製し、次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と評価を目指した。

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))

a. カチオン性ペプチド融合抗体の発現精製法の確立と活性の確認

1. 可変領域の配列決定と発現ベクターの作製

単鎖抗体(scFv)作成に必要な、重鎖(VH)と軽鎖(VL)の可変領域の配列を 5'RACE 法を用いてハイブリドーマよりクローニングした。標的とする表面抗原は OX40 (CD134)と CD5 を選択し、それらの total RNA から Oligo-Cap 法を用いて RT-PCR 法にて cDNA を合成し、シーケンス解析(サンガー法)にて配列を決定した。ペプチド融合 scFv は、簡便かつ大量精製を目指すために、大腸菌発現系によるリコンビナント scFv から作製を開始した。融合させるカチオン性ペプチドは、アルギニンやリジン残基を比較的多く持つ核酸結合能が知られているペプチド(9 mer Arg : 9R、Protamine、TAT)を採用した。発現ベクターは、N 末端よりシグナルペプチド配列(PelB)、VH、リンカー、VL、miRNA 結合ペプチド、ヒスチジンタグの順に設計した。

2. 抗原分子の塩基配列決定と発現ベクター作製

抗体との相互作用解析に用いる標的細胞表面抗原の塩基配列を正常ヒト末梢血単核球と T 細胞株、ATL 感染細胞、ATL 由来細胞株から RT-PCR 法にて cDNA 合成を行い、塩基配列を決定した。決定した細胞外ドメインの配列を N 末端からヒスチジンタグ、TEV プロテアーゼ認識配列、抗原の順に配置し発現ベクターを作製した。

3. 大腸菌発現システムを用いた発現と精製

大腸菌発現システムにて scFv の発現を確認した。ペプチド非融合 scFv (scFv-WT)は可溶性画分から精製が可能なものは Ni アフィニティークロマトグラフィー精製、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。peptide 融合単鎖抗体は変性剤(6M グアニジン塩酸塩)

を用いて可溶化し、Ni アフィニティークロマトグラフィー精製、段階透析法を用いた巻き戻し(refolding)を行い、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。

抗原も同様に発現確認を行い、可溶性画分での精製が可能であったため、Ni アフィニティークロマトグラフィー精製、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。

4. 融合単鎖抗体の物性機能解析

得られたペプチド融合 scFv の抗原に対する結合活性を、表面プラズモン共鳴(SPR)を用いて解析した。発現・精製した抗原をアミンカップリング法にてセンサーチップに固定化し、アナライズとして intact IgG、scFV-WT、ペプチド融合 scFv を用いて評価を行った。

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難しいという課題が残された。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. 純度と精製効率の高い、カチオン性ペプチド融合抗体の発現と精製法の確立

1. システイン付加単鎖抗体(scFvC)の作製

前年度の研究では、カチオン性ペプチド融合 scFv は精製が困難であったため、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

穏やかに酸化反応させた。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。

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 腫瘍細胞に局限して解析する方法

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出し、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。

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。

3) 標的分子解析グループ(渡邊、山岸、内丸、小川)

1. ATL の網羅的解析データの集約、mRNA の詳細な解析、及び pathway 解析

ATL 検体は JSPFAD のマテリアルバンクから供与された。miR-31 の発現レベルは Applied Biosystems 社の TaqMan real-time PCR によって定量を行った。遺伝子発現解析は、発現アレイのデータ解析及び real-time PCR により検討を行った。Helios mRNA の発現パターン解析は、全長の mRNA を検出する PCR により検討を行った。発現アレイデータを用いた pathway 解析は、NCI の Pathway Interaction Database を用いた。

2. miR-31 の標的遺伝子予測と実験的検討

miR-31 の標的遺伝子の検索は、TargetScan program を用いた。上位の標的候補遺伝子に特異的なプライマーを作製し、定量実験を行った。miR-31 の過剰発現細胞はレンチウイルスベク

ターを用いて作製した。また miR-31 を阻害した細胞は miR-31 の antisense RNA を用いた。更に shRNA を用いて Dicer のノックダウンを行い、上昇する mRNA の検索も行った。

3. 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 バンクの 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。

4. 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。

5. 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 発現不死化細胞を樹立した。この Tax 発現不死化細胞と 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。

6. 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。

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ため、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) また、本研究は京都大学の京都大学医の倫理委

員会で承認を得ている (承認番号: 第 G608 号)。本分担研究で用いた検体はインフォームドコンセントを得た後に連結可能匿名化を施して検討に用いた。

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))
(平成 24 年度)

1. 可変領域の配列決定と発現ベクターの作製

可変領域の配列決定は、5'RACE 法により OX40 と CD5 のクローニングと発現ベクター作製が終了した。9 mer Arg (9R)、protamine、TAT を単鎖抗体に融合させるカチオン性ペプチドとして選択し、ペプチド融合 scFv と非融合 scFv の発現ベクター作製が終了した。

2. 抗原分子のクローニングとベクター作製

OX40 と CD5 の細胞外ドメインの配列決定と、大腸菌発現ベクター作製が終了した。

3. 大腸菌発現システムを用いた発現と精製

anti-OX40 scFv-WT と 9R 融合単鎖抗体 (anti OX40 scFv-9R)、PRM 融合単鎖抗体 (anti OX40 scFv-PRM) について大腸菌での可溶性・不溶性画分の発現を確認した。scFv-WT は可溶性画分から精製が可能であったが、カチオン性ペプチド融合単鎖抗体は大腸菌由来の核酸除去に苦慮し、可溶性画分からの精製が困難であった。anti OX40 scFv-9R は不溶性画分から変性剤を用いて可溶化し、refolding 後のサイズ排除クロマトグラフィーで最終精製が可能であった。anti OX40 scFv-PRM は発現を認め、同様に条件を検討し精製を試みたが、可溶性画分からの精製は困難であった。また不溶性画分の refolding を同様に試みたが、サイズ排除クロマトグラフィーでは単量体の最終精製物を得られなかった。anti-CD5 scFv-WT と anti-CD5 scFv-9R は発現を確認した。巻き戻し (refolding) によって得られた抗体は精製条件を検討したが、再現性良く安定した一定の収量を得る事が難しい点が課題として残された。

標的抗原については、OX40 細胞外ドメインは大腸菌での発現にて可溶性画分の発現を得られたため、Ni アフィニティーカラムクロマトグラフィー精製、サイズ排除カラムクロマトグラフィーにより最終精製が可能であった。CD5 は

発現確認を行ったが、発現を認めなかった。

4. 融合単鎖抗体の物性機能解析

anti-OX40 IgG、scFv-WT、scFv-9R について SPR を用いた相互作用解析では、抗原結合解析の結果、IgG は非常に強力な親和性と高い結合安定性を保持していることが確認された ($KD=1.27 \times 10^{-11}$)。scFv-WT ($KD=7.5 \times 10^{-10}$) と scFv-9R (5.8×10^{-9}) についても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った。

〈平成 25 年度〉

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))

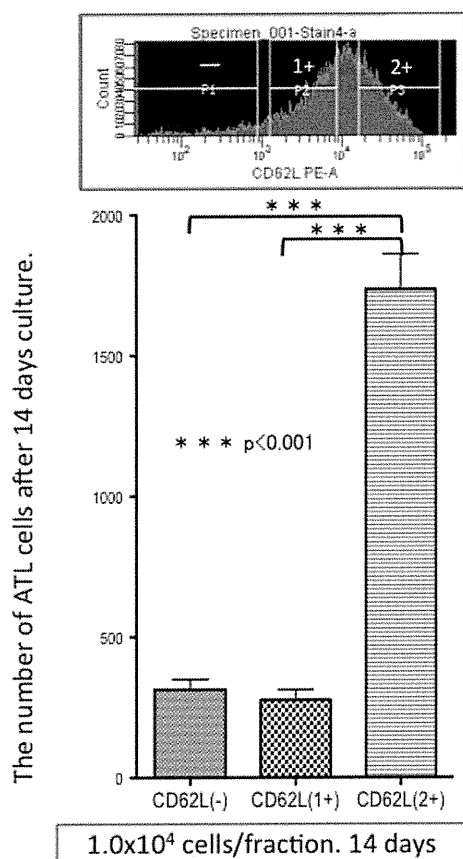
リストアップした 37 抗原を、急性型 ATL の末梢血にて評価した。大部分の細胞表面抗原は、陽性分画も陰性分画も細胞増殖活性に有意差を生じなかった。一部の細胞表面抗原においては、その発現レベルにて ATL 細胞 (CD4+CADM1+細胞)の細胞増殖活性に有意差を認めた。その中で、複数症例において再現性が確認されたのは CD62L であった。代表例を図 4 に示す。

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試みていたが、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24年度に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、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、CD3Lo細胞の

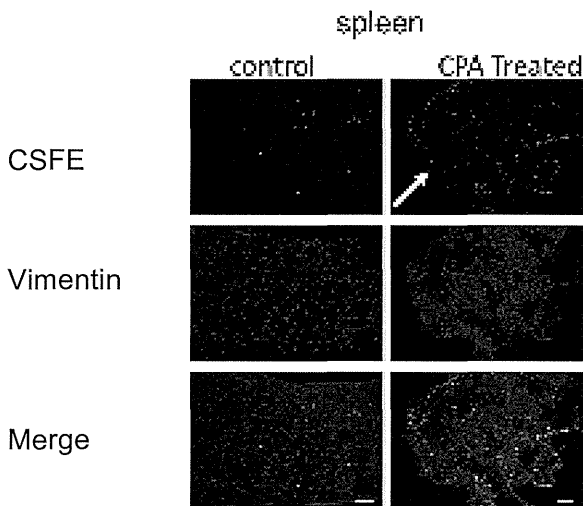
生着が確認できた。また、この生着した5代目のPhenotypeにおいてCD3HiはCCR4-であったが、CD3Lo分画の細胞集団はCCR4+を示した。さらにProviral loadにおいてCD3Hiは369%、CD3Loは100%であった。この生着したCD3Lo由来の5代目の細胞集団はCD5+、CD25+、CD3dim、CD4+、CCR4+でほぼATL Phenotypeを持ち得た細胞集団であった。またウイルスロードも100%を示した。この連続移植継代株は患者のMajor Integration siteと同一であった。CCR4の発現は当初陰性で、連続移植継代中に要請に変化した。一方でCD3Hi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を示さなかったが、ウイルスロードは369%であった。これらの結果は、同一のIntegration siteを持つ細胞の集団であっても、性質には多様性が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. miR-31 の発現レベルの再検証と病態との関連について

まず本研究課題の中心となる miR-31 の発現レベルについて、ATL と正常細胞、また他の細胞種について検討を行った。miR-31 は休止期 T 細胞で発現が高く、抗原刺激やマイトジェンによる活性化により発現が若干低下した。また、NIK の発現が高い B 細胞では miR-31 の発現は比較的 low、B 細胞リンパ腫では miR-31 の発現が減少していた。

次に、内丸らが開発した multi-color FACS (HAS 法) を用いて、個体内の感染細胞集団を分画して解析を行った。この CD7/TSLC1(CADM1)の第 2 世代 HAS 法では、HTLV-1 感染細胞 /ATL 細胞は TSLC1(-)/CD7(+)(=P)、TSLC1(+)/CD7(dim)(=D)、

TSLC1(+)/CD7(-)(=N)の 3 つの集団に分画される。これら各病型の P、D、N をソーティングし、miR-31 の発現量を検討したところ、いずれの ATL 及びキャリアにおいても TSLC1 陽性の D 及び N の集団で、すでに大幅に減少していることを見いだした。

これらの分画について発現アレイ解析を行った結果、キャリアを含めて病型に関わらず D と N は同じクラスターに分類されたことから、HTLV-1 無症候性キャリアのうち、末血中プロウイルス量が高い発症ハイリスク症例の中には一部すでに ATL の腫瘍化過程を進行しているクローンが存在すること、またこれらの集団において、すでに miR-31 の発現の高度の抑制が見られることから、本研究による miR-31 の delivery による治療薬はハイリスクキャリアの一部の症例に投与することにより、early intervention としての発症予防に使用できる可能性を示唆し、本研究の成果が ATL の治療のみでなく発症予防に有益である可能性を示した。

2. 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

我々は ATL 細胞において恒常的に活性化している NF-κB 経路が EZH2 の発現誘導を担っていることを示した。EZH2 の転写制御を分子レベルで解析を行ったところ、EZH2 の転写開始点上流-1000bp に存在する複数の NF-κB 結合配列が重要であることを示した。次に ChIP assay によって、EZH2 プロモーター領域における NF-κB 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た。従って、ATL 細胞においては、強力に活性化した NF-κB 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。複数の患者末梢血腫瘍細胞で検討した所、NF-κB 阻害剤を処理すると、EZH2 と SUZ12 の発現が著しく低下することがわかった。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-κB 経路の活性化が原因であることが明らかになった。

EZH2 は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。

3. 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、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。

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

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。

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

24 年度までに 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。25 年度は、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検討した。

EVC 遺伝子領域には非常に強力な CpG アイランドがあるが、バイサルファイトシークエンス法で解析したところ、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、Jurkat 細胞に対して HDAC 阻害剤を処理したところ EVC の発現を回復させた。そこでヒストン修飾について ChIP assay を用いて検討した。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示された。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。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。

6. ATL 細胞における p38MAPK シグナル伝達系の解析

昨年までの知見をもとに、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- 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- 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、強烈的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。

7. ATL 細胞における Helios のスプライシング異常と細胞へ影響の解析

腫瘍細胞における遺伝子発現は、発現レベルだけでなく、スプライシング異常による mRNA 構造の異常が散見される。我々は ATL 検体 168 例のコピーナンバー解析から明らかになった Helios 遺伝子欠損の意義を検討する過程で、ATL 細胞において Helios mRNA のスプライシング制御が高頻度に異常を示すことを明らかにした。これは各病型を含む 37 症例中 32 例 (86.4%) と非常に高頻度に認められ、ヘテロな ATL 細胞に共通する重要な分子背景の一つであると考えられた。またゲノムの欠損は急性型及びリンパ腫型でのみ検出されており、progression に重要なゲノム異常だと考えられた。実験的に検証を行った結果、ATL で観察される異常アイソフォームは DNA 結合ドメインを大きく欠損しており、転写因子として機能しないことがわかった。更に二量体化能を有しているために正常の Helios や Ikaros に対してもドミナントネガティブとして働き、ATL 細胞では Helios による正常な遺伝子制御が損なわれていることを明らかにした。Helios のノックダウンもしくは ATL 型 Helios の過剰発現を Jurkat 細胞に誘導すると、細胞増殖能が上昇することがわかった。さらにこれらの細胞の遺伝子発現を網羅的に解析し、Helios の下流で制御される遺伝子の同定に成功した。Pathway の結果から、T 細胞の増殖やホーミングに重要な S1P pathway の活性化に関わっていることがわかった。

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の知見を得ているが、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))

1. これまでに得られている知見を、まとめると、免疫不全マウスに連続移植継代の系で造腫瘍性を示す。
2. 一部の細胞集団が存在する。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 プロウイルス組み込み部位解析、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あると考える。

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) 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, Feb 7. [Epub ahead of print]
- 3) 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**. 46(2):171-5, 2014
- 4) 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)
- 5) 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
- 6) 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.
- 7) Kobayashi S, Tian Y, Ohno N, Yuji K, Ishigaki T, Isobe M, Tsuda M, Oyaizu N, Watanabe E, Watanabe N, Tani K, Tojo A, 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(1):e53728, 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) Nishimura T, Kaneko S, Kawana-Tachikawa A, Tajima Y, Goto H, Zhu D, Nakayama-Hosoya K, Iriguchi S, Uemura Y, Shimizu T, Takayama N, Yamada D, Nishimura K, Ohtaka M, Watanabe N, Takahashi S, Iwamoto A, Koseki H, Nakanishi M, Eto K, Nakauchi H. Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by pluripotency reprogramming and dedifferentiation. **Cell Stem Cell**. 12: 114-126m 2013
- 10) Kamiya A, Nakauchi H. Enrichment and clonal culture of hepatic stem/progenitor cells during mouse liver development. **Methods Mol Biol**. 945:273-286, 2013. doi: 10.1007/978-1-62703-125-7_16.
- 11) 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**. 41(7):e89, 2013

- 12) 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.** 45(11):1293-9, 2013
- 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, 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.** 2013, pii: S1083-8791(13)01126-9. (doi: 10.1016/j.bbmt.2013.12.555).
- 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) 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
- 16) 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)
- 17) Kudo S, Caaveiro JM, Miyafusa T, Goda S, Ishii K, Matsuura T, Sudou Y, Kodama T, Hamakubo T, Tsumoto K. Structural and thermodynamic characterization of the self-adhesive properties of human P-cadherin (Article). **Mol. Biosyst.** 8(8), 2050-2053, 2012
- 18) Nakajima-Takagi Y, Osawa M, Oshima M, Takagi H, Miyagi S, Endoh M, Endo TA, Takayama N, Eto K, Toyoda T, Koseki H, Nakauchi H, Iwama A. Role of SOX17 in hematopoietic development from human embryonic stem cells. **Blood.** 2012 Nov 20.
- 19) Yamaguchi T, Hamanaka S, Kamiya A, Okabe M, Kawarai M, Wakiyama Y, Umino A, Hayama T, Sato H, Lee YS, Kato-Itoh M, Masaki H, Kobayashi T, Yamazaki S, Nakauchi H. Development of an All-in-One Inducible Lentiviral Vector for Gene Specific Analysis of Reprogramming. **PLoS One.** 2012;7(7):e41007. Epub 2012 Jul 18.
- 20) Nakamura S, Oshima M, Yuan J, Saraya A, Miyagi S, Konuma T, Yamazaki S, Osawa M, Nakauchi H, Koseki H, Iwama A. Bmi1 confers resistance to oxidative stress on hematopoietic stem cells. **PLoS One.** 2012;7(5):e36209. Epub 2012 May 11.
- 21) Nishida C, Kusubata K, Tashiro Y, Gritli I, Sato A, Ohki-Koizumi M, Morita Y, Nagano M, Sakamoto T, Koshikawa N, Kuchimaru T, Kizaka-Kondoh S, Seiki M, Nakauchi H, Heissig B, Hattori K. MT1-MMP plays a critical role in hematopoiesis by regulating HIF-mediated chemokine/cytokine gene transcription within niche cells. **Blood.** 2012 Jun 7;119(23):5405-16. Epub 2012 Apr 27.
- 22) D'Agostino DM, Zanollo P, Watanabe T, Ciminale V. The microRNA regulatory network in normal- and HTLV-1-transformed T cells. **Adv Cancer Res.** 113:45-83, 2012 (doi: 10.1016/B978-0-12-394280-7.00002-6)
- 23) Yamagishi M, Watanabe T. New Paradigm of T cell Signaling: Learning from Malignancies (Review Article). **J Clin Cell Immunol.** S12:007, 15pp, 2012.
- 24) Yamagishi M, Watanabe T. Molecular Hallmarks of Adult T Cell Leukemia (Review Article). **Front Microbiol.** 3: 334. 2012.
- 25) Iwanaga M, Watanabe T, Yamaguchi K. Adult T-cell leukemia: a review of epidemiological evidence. **Front Microbiol** 3: 322. 2012 (doi: 10.3389/fmicb.2012.00322) Epub
- 26) 塩沢英輔, 本間まゆみ, 矢持淑子, 瀧本雅文, 太田秀一、「悪性リンパ腫組織アトラス 菌状息肉症(図説)」、昭和医学会雑誌、72(1) : 94-95、2012
- 27) 塩沢英輔, 本間まゆみ, 矢持淑子, 瀧本雅文, 太田秀一、「悪性リンパ腫組織アトラス 原発性皮膚 CD30 陽性 T 細胞増殖性疾患(図説)」、昭和医学会雑誌、72(1) : 98-99、2012
- 28) 梅村宜弘, 本間まゆみ, 塩沢英輔, 矢持淑子, 瀧本雅文, 太田秀一、「Diffuse large B-cell lymphoma における細胞周期関連タンパク質発現の免疫組織化学的検討」、昭和医学会雑誌、72(1) : 108-117、2012

- 29) 塩沢英輔, 本間まゆみ, 矢持淑子, 瀧本雅文, 太田秀一, 「悪性リンパ腫組織アトラス 血管内大細胞型 B 細胞リンパ腫(図説)」, **昭和医学会雑誌**, 72(2): 209-211, 2012
- 30) 塩沢英輔, 本間まゆみ, 矢持淑子, 瀧本雅文, 太田秀一, 「悪性リンパ腫組織アトラス 中枢神経系原発びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (図説)」, **昭和医学会雑誌**, 72(2): 213-215, 2012
- 31) 猿田祐輔, 矢持淑子, 野呂瀬朋子, 九島巳樹, 瀧本雅文, 太田秀一, 本間まゆみ, 塩沢英輔, 「炎症性皮膚疾患と鑑別を要する皮膚 T 細胞性リンパ腫の免疫組織化学および分子生物学的解析」, **昭和医学会雑誌**, 72(2): 246-258, 2012
- 32) 塩沢英輔, 本間まゆみ, 矢持淑子, 瀧本雅文, 太田秀一, 「悪性リンパ腫組織アトラス 高齢者 EBV 陽性びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫(図説)」, **昭和医学会雑誌**, 72(3): 319-322, 2012
- 33) 塩沢英輔, 本間まゆみ, 矢持淑子, 瀧本雅文, 太田秀一, 「悪性リンパ腫組織アトラス 芽球形質細胞様樹状細胞腫瘍(図説)」, **昭和医学会雑誌**, 72(3): 323-325, 2012
- 34) 猿田祐輔, 宇野裕和, 中田土起丈, 秋山正基, 飯島正文, 塩沢英輔, 矢持淑子, 「両下肢に色素斑, 紫斑を呈し, 慢性色素性紫斑を疑った CD8 陽性皮膚 T 細胞リンパ腫の 1 例」, **臨床皮膚科**, 66(10): 801-805, 2012
- 35) Nakamaki T, Fukuchi K, Nakashima H, Ariizumi H, Maeda T, Saito B, Yanagisawa K, Tomoyasu S, Homma M, Shiozawa E, Yamochi-Onizuka T, Ota H. CD20 gene deletion causes a CD20-negative relapse in diffuse large B-cell lymphoma. **Eur J Haematol** 89(4): 350-355, 2012
- 36) Aoki Y, Nojima M, Suzuki H, Yasui H, Maruyama R, Yamamoto E, Itagaki M, Asaoku H, Asida M, Ikeda H, Hayashi T, Imai K, Mori M, Tokino T, Ishida T, Toyota M, Shinomura Y. Genomic vulnerability to global hypomethylation is a potential determinant of the clinicogenetic features of multiple myeloma. **Genome Biol**, in press, 2012.
- 37) Maruyama R, Suzuki H, Yamamoto E, Imai K, Shinomura Y. Emerging links between epigenetic alterations and dysregulation of noncoding RNAs in cancer. **Tumor Biol**, 33(2):277-285, 2012.
- 38) Yasui H, Ishida T, Maruyama R, Nojima M, Ikeda H, Suzuki H, Hayashi T, Shinomura Y, Imai K. Model of translational cancer research in multiple myeloma. **Cancer Sci**, 103: 1907-1212, 2012.
- 39) Niinuma T, Suzuki H, Nojima M, Noshio K, Yamamoto H, Takamaru H, Yamamoto E, Maruyama R, Nobuoka T, Miyazaki Y, Nishida T, Bamba T, Kanda T, Ajioka Y, Taguchi T, Okahara S, Takahashi H, Nishida Y, Hosokawa M, Hasegawa T, Tokino T, Hirata K, Imai K, Toyota M, Shinomura Y. Upregulation of miR-196a and HOTAIR drive malignant character in gastrointestinal stromal tumors. **Cancer Res**, 2012, 72(5): 1126-1136, 2012.
- (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(2), 2013 年 2 月
- 4) 山岸誠, Person 人と研究「成人 T 細胞白血病の分子レベルの全体像と、Polycomb-miR-31-NF-κB 経路の異常」, **Trends in Hematological Malignancies**, 4(3): 16-19, Dec. 2012.
- 5) 山岸誠, 渡邊俊樹, 特集: microRNA の発現制御の異常と疾患「成人 T 細胞白血病(ATL)における microRNA の発現異常」, **細胞**, 44(10): 15-22, 2012 年 9 月
- 6) 山岸誠, 渡邊俊樹, 特集: ATL の基礎と臨床「ATL 細胞のゲノム エピゲノム異常と発現異常」, **細胞**, 44(8): 18-22, 2012 年 7 月
- 7) 山岸誠, 渡邊俊樹, 総説「2. HTLV-1 感染症と miRNA」, **ウイルス**, 62(1): 9-18, 2012 年 6 月
- 8) 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.
- 9) 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
10) 内丸 薫 成人T細胞白血病・リンパ腫 成人病と生活習慣病 42: 743-747, 2012

(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-κB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) 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 **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, 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) 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)
- 4) 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)
- 5) 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**

- 6) Watanabe T, “Polycomb—miRNA—NF-κB linkage in ATL cells”, The 5th Annual Meeting & Symposium of The Association for HTLV and Related Diseases, IMSUT, Tokyo, 8.25-8.26, 2012 (Invited)
- 7) Watanabe T, “The role of microRNAs in Adult T-Cell Leukemia”, Viruses, Genes and Cancer workshop, Venice, Italy, Oct. 25-27, 2012 (Invited)
- 8) Nakauchi H, “Stem Cell Niche and TGF-beta signaling”, EMBL Conference, Stem Cells in Cancer and Regenerative Medicine, I Heidelberg, Germany, Aug 31.
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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 “TET2 Mutations Revealed by Whole Genome Sequencing in Adult T-Cell Leukemia” The 54th annual meeting of American Society of Hematology. 2012, Atlanta, USA, 12.8-12.11

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