

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamada Y, Tomaru U, Ishizu A, Kiuchi T, Kasahara M, Matsuno Y. Expression of thymoproteasome subunit $\beta 5t$ in type AB thymoma. *J Clin Pathol*. doi:10.1136/jclinpath-2013-201930, 2013
- 2) Masuda S, Iwasaki S, Tomaru U, Baba T, Katsumata K, Ishizu A. Possible implication of Fc γ receptor-mediated trogocytosis in susceptibility to systemic autoimmune disease. *Clin Dev Immunol*. 2013 2013:345745
- 3) Ando H, Sato T, Tomaru U, Yoshida M, Utsunomiya A, Yamauchi J, Araya N, Yagishita N, Coler-Reilly A, Shimizu Y, Yudoh K, Hasegawa Y, Nishioka K, Nakajima T, Jacobson S, Yamano Y. Positive feedback loop via astrocytes causes chronic inflammation in virus-associated myelopathy. *Brain*. 136(Pt 9):2876-87, 2013
- 4) Takeuchi S, Kimura S, Soma Y, Waki M, Yamaguchi M, Nakazawa D, Tomaru U, Ishizu A, Kawakami T. Lysosomal-associated membrane protein-2 plays an important role in the pathogenesis of primary cutaneous vasculitis. *Rheumatology (Oxford)*. 52(9):1592-8, 2013
- 5) Ishizu A, Tomaru U, Murai T, Yamamoto T, Atsumi T, Yoshiki T, Yumura W, Yamagata K, Yamada H, Kumagai S, Kurokawa MS, Suka M, Makino H, Ozaki S; JMAAV. Prediction of response to treatment by gene expression profiling of peripheral blood in patients with microscopic polyangiitis. *PLoS One*. 17;8(5):e63182, 2013
- 6) Michimata R, Watari H, Tomaru U, Sakuragi N, Ishizu A. Human papillomavirus 16-positive uterine cervical squamous cell carcinoma with coinfection with human papillomavirus 34 has a lower incidence in lymph node metastasis than that without coinfection with human papillomavirus 34. *Pathobiology*. 80(5):259-64, 2013
- 7) Tomaru U, Kasahara M. Thymoproteasome: role in thymic selection and clinical significance as a diagnostic marker for thymic epithelial tumors. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 61(5):357-65, 2013
- 8) Miyatake Y, Oliveira AL, Jarbouli MA, Ota S, Tomaru U, Teshima T, Hall WW, Kasahara M. Protective roles of epithelial cells in the survival of adult T-cell leukemia/lymphoma cells. *Am J Pathol*. 182(5):1832-42, 2013
- 9) Sato T, Yamano Y, Tomaru U, Shimizu Y, Ando H, Okazaki T, Nagafuchi H, Shimizu J, Ozaki S, Miyazawa T, Yudoh K, Oka H, Suzuki N. Serum level of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 as a biomarker of disease activity in relapsing polychondritis. *Mod Rheumatol*. 24(1):129-36, 2014
- 10) Ströbel P, Hartmann E, Rosenwald A, Kalla J, Ott G, Friedel G, Schalke B, Kasahara M, Tomaru U, Marx A. Corticomedullary differentiation and maturational arrest in thymomas. *Histopathology*. 64(4):557-66, 2014
- 11) Hamano R, Baba T, Sasaki S, Tomaru U, Ishizu A, Kawano M, Yamagishi M, Mukaida N. Ag and IL-2 immune complexes efficiently expand Ag-specific Treg cells that migrate in response to chemokines and reduce localized immune responses. *Eur J Immunol*. 2014, 44(4):1005-15.

- 12) Nakazawa D, Shida H, Tomaru U, Yoshida M, Nishio S, Atsumi T, Ishizu A. Enhanced Formation and Disordered Regulation of NETs in Myeloperoxidase-ANCA-Associated Microscopic Polyangiitis. *J Am Soc Nephrol*. 2014, 25(5):990-7.
- 13) Imamoto T, Nakazawa D, Shida H, Suzuki A, Otsuka N, Tomaru U, Ishizu A. Possible linkage between microscopic polyangiitis and thrombosis via neutrophil extracellular traps. *Clin Exp Rheumatol*. 32(1):149-150, 2014
- 14) Matsui Y, Tomaru U, Miyoshi A, Ito T, Fukaya S, Miyoshi H, Atsumi T, Ishizu A. Overexpression of TNF- α converting enzyme promotes adipose tissue inflammation and fibrosis induced by high fat diet. *Exp Mol Pathol*. 2014, 97(3):354-8.
- 15) Ando R, Noda K, Tomaru U, Kamoshita M, Ozawa Y, Notomi S, Hisatomi T, Noda M, Kanda A, Ishibashi T, Kasahara M, Ishida S. Decreased proteasomal activity causes photoreceptor degeneration in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014 3;55(7):4682-90.
- 16) Araya N, Sato T, Ando H, Tomaru U, Yoshida M, Coler-Reilly A, Yagishita N, Yamauchi J, Hasegawa A, Kannagi M, Hasegawa Y, Takahashi K, Kunitomo Y, Tanaka Y, Nakajima T, Nishioka K, Utsunomiya A, Jacobson S, Yamano Y. HTLV-1 induces a Th1-like state in CD4+CCR4+ T cells. *J Clin Invest*. 2014 124(8):3431-42.
- 17) Jinuma C, Waki M, Kawakami A, Yamaguchi M, Tomaru U, Sasaki N, Masuda S, Matsui Y, Iwasaki S, Baba T, Kasahara M, Yoshiki T, Paletta D, Herrmann T, Ishizu A. Establishment of a vascular endothelial cell-reactive type II NKT cell clone from a rat model of autoimmune vasculitis. *Int Immunol*. 2014, 27(2):105-14.
- 18) Tomaru U, Tsuji T, Kiuchi S, Ishizu A, Suzuki A, Otsuka N, Ito T, Ikeda H, Fukasawa Y, Kasahara M. Decreased expression of a thymus-specific proteasome subunit b5t in Down syndrome patients. *Histopathology*. 2015, in press.
- 19) Tsuchisaka A, Kaneko S, Imaoka K, Ota M, Kishimoto K, Tomaru U, Kasahara M, Ohata C, Furumura M, Takamori S, Morita E, Hashimoto T. Presence of autoimmune regulator and absence of desmoglein 1 in thymoma associated with a pemphigus foliaceus patient. *Br J Dermatology* 2015, in press.
- 20) Honma R, Kinoshita I, Miyoshi E, Tomaru U, Matsuno Y, Shimizu Y, Takeuchi S, Kobayashi Y, Kaga K, Taniguchi N, Dosaka-Akita H. Expression of Fucosyltransferase 8 Is Associated with an Unfavorable Clinical Outcome in Non-Small Cell Lung Cancers. *Oncology*. 2015, in press.
2. 学会等での講演、発表
国際会議
- 1) Miyatake, Y., André L.A. Oliveira., Mohamed Ali Jarbouli., Ota, S., Tomaru, U., Teshima, T., William W. Hall and Kasahara, M., : Epithelial cells protect survival of adult T-cell leukemia/lymphoma cells. 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses HTLV 2013, Montreal, Quebec, Canada, June 26 to 30, 2013

国内会議

- 1) 外丸詩野：プロテアソームの機能異常と病態 第102回日本病理学会総会 札幌、2013
- 2) 中沢大悟、外丸詩野、西尾妙織、渥美達也、笠原正典、石津明洋：好中球細胞外トラップ（NETs）の異常とMPO-ANCA 関連血管炎の発症 第102回日本病理学会総会 札幌、2013
- 3) 川上 愛、飯沼千景、脇 雅、山口まどか、外丸詩野、笠原正典、吉木敬、石津明洋：自己血管内皮細胞反応性NKT 細胞による血管炎発症モデル 第102回日本病理学会総会 札幌、2013
- 4) 宮武由甲子、Oliveira Andre L.A.、Jarboui Mohamed Ali、太田秀一、外丸詩野、豊嶋崇徳、Hall William W.、笠原正典：成人T 細胞白血病/ リンパ腫（ATLL）の病態における正常上皮細胞の役割 第102回日本病理学会総会 札幌、2013
- 5) 池下隼司、宮武由甲子、大塚紀幸、外丸詩野、笠原正典：アテローム性動脈硬化症とヒト NKG2D リガンドMICA/B との関わりについての検討 第102回日本病理学会総会 札幌、2013
- 6) 紺野沙織、外丸詩野、岸本葉奈、石津明洋、笠原正典：プロテアソームの発現異常における免疫応答の変化 第102回日本病理学会総会 札幌、2013
- 7) 今本鉄平、中沢大悟、大塚紀幸、外丸詩野、笠原正典、石津明洋：顕微鏡的多発血管炎と血栓症はMPO-ANCA と好中球細胞外トラップを介して関連する 第102回日本病理学会総会 札幌、2013
- 8) 山本 岳、藤井真理子、大塚紀幸、光部兼六郎、櫻井宏治、外丸詩野、石津明洋、笠原正典：HELLP 症候群に合併した hepatic rupture の一剖検例 第102回日本病理学会総会 札幌、2013
- 9) 味藤 静、外丸詩野、大塚紀幸、石津明洋、笠原正典：リツキシマブ投与後に日和見感染症を併発した顕微鏡的多発血管炎の一剖検例 第102回日本病理学会総会 札幌、2013
- 10) 紺野沙織、外丸詩野、石津明洋、笠原正典：プロテアソームの発現異常による免疫応答の変化 第46回北海道病理談話会（病理分科会） 札幌、2013
- 11) 外丸詩野：プロテアソームの機能異常と病理作用 第59回日本病理学会秋季特別総会、甲府、2013
- 12) Konno S, Tomaru U, Ishizu A, Kasahara M : Aberrant proteasomal expression affects T cell differentiation and functions. 第42回日本免疫学会学術集会 千葉、2013
- 13) Kawakami A, Iinura C, Waki M, Yamaguchi M, Tomaru U, Kasahara M, Yoshiki T, Ishizu A : Establishment of invariant NKT cell clone from vasculitis-prone rats, which recognizes autoantigen but not α -galactosylceramide presented by CD1d. 第42回日本免疫学会学術集会 千葉、2013
- 14) 岩崎沙理、藤澤孝志、桑原博昭、外丸

- 詩野、笠原正典、石津明洋、鈴木 昭：
鑑別に苦慮した胸腺腫瘍の一例：Type
A thyma から胸腺癌へのスペクトラム
は存在するか？ 第 33 回日本胸腺研
究会 東京、2014
- 15) 木内静香、外丸詩野、紺野沙織、石津
明洋、宮島祥太、平川彩香、
笠原正典：胸腺におけるプロテアソ
ームキモトリプシン様活性サブユニット
の発現と T 細胞選択 第 103 回日本病
理学会総会、2014
- 16) 伊藤智樹、外丸詩野、大村優、石津明
洋、笠原正典：プロテアソーム機能異
常と脳機能の低下 第 103 回日本病理
学会総会 広島国際会議場・ANA クラ
ウンプラザ（広島）、2014
- 17) 竹中淳規、大塚紀幸、藤田裕美、中馬
誠、外丸詩野、石津明洋、笠原正典：
高齢男性でみられた EBV 陽性肝脾 γ
 δ T 細胞リンパ腫の一例 第 103 回日
本病理学会総会 広島国際会議場・
ANA クラウンプラザ（広島）、2014
- 18) 三次有奈、山田真衣、舘山ゆう、楠由
宏、志田玄貴、中沢大悟、外丸詩野、
三好秀明、渥美達也、石津明洋：高血
糖による好中球細胞トラップ
(neutrophil extracellular traps : NETs)
の形成亢進 第 47 回北海道病理談話
会（病理分科会）、2014
- 19) 志田玄貴、中沢大悟、舘山ゆう、山田
真衣、楠由宏、三次有奈、外丸詩野、
渥美達也、石津明洋：抗ラクトフェリ
ン抗体の病原性 第 47 回北海道病理
談話会（病理分科会）、2014
- 20) 伊藤智樹、外丸詩野、大村優、戸松留
花、石津明洋、笠原正典：プロテアソ
ーム機能低下モデルマウスにおける脳
機能障害の解析 第 47 回北海道病理
談話会（病理分科会）、2014
- 21) Shizuka Kiuchi, Utano Tomaru, Saori
Konno, Shota Miyajima, Akihiro Ishizu,
Masanori Kasahara : Aberrant expression
of proteasomal $\beta 5$ subunit affects T
cell repertoires in the thymus. 第 43 回
日本免疫学会総会・学術集会、2014
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)
該当なし

HTLV-1 感染性末梢血 T 細胞に対する膜プロテオーム解析を用いた
HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) 新規治療標的分子の探索

研究分担者 氏名 : 植田 幸嗣
所属機関 : 東京大学大学院 新領域創成科学研究科
職名 : 特任准教授

研究協力者 氏名 : 石原 誠人
所属機関 : 東京大学大学院 新領域創成科学研究科
役職 : 客員共同研究員

研究要旨：HAM は HTLV-1 感染によって引き起こされる炎症性疾患であり、感染者の 0.5% が HAM を発症する。現在までに HAM に対する根治療法は存在せず、新規治療法の開発は急務となっている。我々は HAM を含めた HTLV-1 関連疾患に対する新規治療標的分子の探索を目的として、HTLV-1 感染細胞が濃縮されている末梢血 CD4 陽性 T 細胞に対する膜表面プロテオーム解析を行った。健常者、無症候性感染者、成人 T 細胞性白血病患者、HAM 患者由来の CD4 陽性 T 細胞を単離し、細胞膜プロテオームに焦点を絞る目的で糖ペプチド濃縮を行った後、LC-MS/MS 解析を行った。その結果、HAM 患者の CD4 陽性 T 細胞で発現が上昇している Adhesion molecule A を新規治療標的候補分子として同定した。これらの発見は HAM に対する新規治療法開発に応用されることが期待される。

A. 研究目的

現在までに HAM の根治療法は存在せず、治療は IFN α やプレドニゾロンによる対処療法に限定されている。しかし、治療中断後に HAM が再燃、病態が進行する事が多く、新規治療法の開発が必須である。HAM は HTLV-1 の末梢血 CD4 陽性 T 細胞への感染から誘発される疾患であり、末梢血中の感染細胞数は病態と密接に相関することからも感染細胞が

HAM 発症・進行の原因である可能性が極めて高い。この事から HAM 患者における感染細胞を標的にした治療法の開発は HAM 治療において極めて有効であると予測される。本研究では HAM 分子標的治療薬の開発を最終的な目標ととらえ、新規治療標的分子として HAM 患者における HTLV-1 感染細胞に特異的に発現している膜表面タンパク質を同定する事を目して研究を行った。

B. 研究方法

健常者(ND, n = 14)、無症候キャリア(AC, n = 21)、ATL 患者(ATL, n = 13)、HAM 患者(HAM, n = 21)末梢血単核球より Flow cytometry を用いて CD4 陽性 T 細胞を単離し、PBS にて 2 回 wash した後、回収したペレットを解析に供するまで -80°C で保存した。回収された 69 検体に対して膜プロテオーム解析を行うにあたり、以下に記述する前処理が施された (図 1)。検体を解凍後、8M 尿素を用いて変性処理を行い、還元アルキル化処理の後にトリプシン消化を行った。消化物は Oasis HLB 96-well μ Elution Plate (Waters) を用いた逆相精製によって脱塩され、CL4B ビーズ (Sigma-Aldrich) を用いた親水性相互作用クロマトグラフィによって糖ペプチドを粗精製し、凍結乾燥を行った。さらに 0.1 mM CaCl_2 , 0.1 mM MnCl_2 , 5% アセトニトリル及び 50 mM ammonium bicarbonate を含む Buffer に再懸濁後、ConA レクチンビーズ (J-オイルミルズ) に糖ペプチドを結合させ、非糖ペプチドを wash により洗い流した後に PNGase (Roche) によって N 型糖鎖の根元を切断し、溶出物を回収する事で糖鎖修飾を受けていたコアペプチドのみを回収した (図 2)。この際 N 型糖鎖が結合していたアミノ酸は加水分解によりアスパラギンからアスパラギン酸に変換される。この変化は質量分析では 0.9840 Da の質量変化 (IGEL') として検出され、後に記述する MASCOT 検索で糖ペプチドを検出する際の特徴として用いられる。回収した溶出物は乾燥後、2% アセトニトリル、0.1% TFA 溶液に懸濁され、高感度質量分析計である LTQ-Orbitrap Velos 及び Nano-HPLC である Ultimate3000 (Thermo Scientific) を用いた LC-MS/MS 解析に供された。解析は C18 逆相カラム (日京テクノス) を用いて行われ、サンプルを流速 250 nL/min、120 分間で分離しながらシームレスに 2kV の電圧の元

イオン化し、質量分析計による解析を行った。

解析結果は大規模データの高速処理が可能な Expressionist Proteome Server Platform (Genedata) に転送され、RefinerMS モジュール上でペプチドの定量情報を抽出するためのデータ処理が行われた。全 69 サンプルに対応する Raw ファイルのデータはそれぞれ質量電荷比 (m/z) 及び使用したカラムへの保持時間 (RT) によって 2 次元展開 (2D 定量クロマトグラム) された。次にノイズサブトラクトを行いケミカルノイズを除去した後、サンプル間で RT アライメントを行い、独立な測定間で生じる RT の誤差を補正した。この上で全 2D 定量クロマトグラムを重ね合わせ、検出されたピークの m/z 及び RT をリスト化した。この中から単一分子由来のピークをクラスター化する目的でアイソトピック・クラスタリングを行い、クラスター化された 1 価以上の分子に関する m/z、RT、価数及び定量情報を Analyst モジュールに転送した。これらのデータは標準化を行った後にエクセルファイルに抽出された。

続いて全データの中からペプチド由来の分子が含まれる 2 価以上のデータを抜き出し、Welch 検定を行った。本解析では ND 対 AC 及び HAM の解析を行った。この結果有意 ($p < 0.05$) に差異があり、2 倍以上の増加が AC 及び HAM で検出されたペプチドを治療標的候補として抽出し、続く同定解析に供した。

HTLV-1 感染細胞である ATL 細胞株よりトリプシン消化の後、回収した糖ペプチド精製物に対する 2D-LC/MS/MS 解析を以下のように行った。まず 3 種類の ATL 細胞株 (S04, KK1, KOB) よりスクリーニングに使用した手法を用いて糖ペプチドを精製した。精製品は 1 次元目の分離として Stage tips を用いた強陰イオン交換による分画を施され、続く 2 次元

目にはスクリーニングと同様逆相分離を採用し、直接 LTQ-Orbitrap Velos で質量分析を行った。取得されたデータは MASCOT 検索による同定検索に供された。MASCOT 検索には以下のパラメータを使用した。Taxonomy = Homo Sapiens, Enzyme = semiTrypsin, Miss cleavage = 2, Database = SwissProt_2015_01 (547, 357 sequences), Fixed modifications = Carbamidomethyl (C), Variable modifications = Oxidation (M)+ IYEL' (N), MS tolerance = 3 ppm MS/MS tolerance = 0.8 Da, Instrument = ESI-TRAP。さらに Peptide Validator アルゴリズムを使用し、False Discovery Rate < 0.01 を同定信頼性の基準とした。

得られた同定情報を m/z 及び RT に関連付けさせ、治療標的候補分子の同定を行った。ペプチド同定は m/z 方向に ±3 ppm、RT 方向に ±5 分の範囲を許容する基準で行った。

同定された治療標的候補のバリデーションには Flow cytometry を用いた。採取後に Cell Banker を用いて凍結保存していた独立な末梢血検体 (ND (n = 4), AC (n = 6), HAM (n = 6)) を解凍し、PBS で 2 回洗浄した後に α -Adhesion molecule A Alexa647 (Biolegend) を用いて染色後、FACS Aria (BD) を用いて解析した。取得されたデータの解析は FlowJo (Tree Star Inc.) を用いて実施した。

(倫理面への配慮)

血球試料の収集に関しては、患者本人からプロジェクトの趣旨や内容に十分な理解を得た上でインフォームドコンセントを取得し、採血の手続きを行った。採血され、血球を分離、凍結したサンプルは匿名化が行われ、個人情報 (氏名、住所、生年月日) は聖マリアンナ医科大学病院外には一切漏出しないよう管理されている。匿名化された試料は、

臨床情報 (疾患の状況、治療歴、各種バイオマーカーの値など) のみ付加されて研究担者の所属する研究室へと移動、保管した。これら血球試料の提供、本研究への使用に関しては、聖マリアンナ医科大学病院、東京大学双方の倫理審査委員会による承認を得た上で実施した。

C. 研究結果

69 サンプルの解析の結果、74, 048 クラスターを 1 価以上のイオン性ピークとして検出し、うちペプチド由来のピークとして 56, 705 クラスターを統計解析に供した (図 3)。Welch 検定を用いた ND 対 AC 及び HAM の解析では感染した CD4 陽性 T 細胞において発現が上昇する膜タンパク質が抽出され、その結果 1, 307 ペプチドを同定対象とする標的治療候補分子として以降の同定作業に供した。2D-LC/MS/MS を用いた同定データセットの作成では 915 糖タンパク質由来 6, 791 糖ペプチドの同定に至り、uniprot データベースの subcellular localization におけるタームを基に解析を行った結果、69.5% が膜表面タンパク質であることが明らかとなった (図 4)。このデータセットを用いて未同定の標的治療候補分子を同定した結果、27 ペプチドを同定した。ここから膜表面タンパク質である事、非 HLA 分子である事を条件に候補ペプチドを絞り込んだところ 3 ペプチドの抽出に至った。この内 2 ペプチドはこれまでに HAM 患者末梢血での発現上昇が報告されている β 1-integrin 由来のペプチド断片であった (図 5)。また、現在までに HAM 病態において未報告の新規治療標的候補膜タンパク質として Adhesion molecule A を同定した (図 5)。

Adhesion molecule A に対する Flow cytometry を用いた定量的バリデーションを行うにあたってサンプルサイズを決定する必要があり、少数末梢血サンプル (ND (n = 4),

AC (n = 6), HAM (n = 6))を用いて蛍光強度の標準偏差及び平均値を算出し、その結果より検出力 0.8 に設定した時の必要なサンプルサイズの算出を行った。その結果バリデーションに必要な最低サンプル数が 20 サンプルであることが明らかとなり、現在引き続きサンプルの収集にあたっている。なおこのデータからはスクリーニング時に得られた定量結果と同様、HAM における発現の増加傾向が観察されており(図 6)、Adhesion molecule A が HAM における感染細胞で発現が増加している可能性が高い。

D. 考案

HTLV-1 感染細胞を対象とした膜プロテオーム解析を行う事により、HAM 病態で CD4 陽性 T 細胞における発現が上昇するタンパク質を 2 タンパク質同定する事に成功した。うち 1 タンパク質に関しては HAM 患者 CD4 陽性 T 細胞において発現が上昇している事がすでに報告されており、本研究における膜プロテオーム解析が目的に則して正しく機能していたことを示している。今後 Adhesion molecule A に関する定量バリデーション及び機能解析を進めることにより、HAM 病態における新規発症機序の解明や Adhesion molecule A を標的とした治療法の開発につなげていく予定である。

Adhesion molecule A は T 細胞活性化において T 細胞受容体を介したシグナル経路に関与する事が報告されている。HAM 病態においては、病態進行時に血中のプロウイルス量が増加することが知られており、HAM において感染細胞の増殖・活性化などに Adhesion molecule A が関与している可能性が考えられる。

近年 HTLV-1 関連疾患である ATL 病態では

HAS-flow 法に代表されるように Flow cytometry を用いた病態分類の実用化に向けた研究が進んでおり、本研究の発見は HAM 病態において同様の診断アルゴリズムの作成に応用できる可能性が期待される。Adhesion molecule A は治療標的としてだけでなく客観的な HAM 病態の診断が難しい現状を打開できる新規の診断法の開発に応用できる可能性があり、本研究成果は治療、診断の両面から HAM 治療に貢献できる可能性が高い。

E. 結論

高感度質量分析を用いた膜プロテオーム解析は病態に依存的に変化し、治療標的となり得る膜タンパク質の同定において強力な手段である。今後 Adhesion molecule A の HAM 病態での役割を解明し、HAM の新規治療法の確立に結び付けていく。

F. 健康危惧情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) A plasma diagnostic model of human T cell leukemia virus-1 associated myelopathy.

Ishihara M, Araya N, Sato T, Saichi N, Fujii R, Yamano Y, and Ueda K.

Annals of Clinical and Translational Neurology, in press, 2014.

2) Antibody-coupled monolithic silica microtips for highthroughput molecular profiling of circulating exosomes.

Ueda K, Ishikawa N, Tatsuguchi A, Saichi

- N, Fujii R, and Nakagawa H. Scientific reports, 4, 6232, 2014.
- 3) Critical role of lysine 134 methylation on histone H2AX for gamma-H2AX production and DNA repair. Sone K, Piao L, Nakakido M, Ueda K, Jenuwein T, Nakamura Y, and Hamamoto R. Nature communications, 5, 5691, 2014.
- 4) SMYD2-dependent HSP90 methylation promotes cancer cell proliferation by regulating the chaperone complex formation. Hamamoto R, Toyokawa G, Nakakido M, Ueda K, and Nakamura Y. Cancer letters, 351 (1), 126-133, 2014.
- 5) Identification of a nuclear protein, LRRC42, involved in lung carcinogenesis. Fujitomo T, Daigo Y, Matsuda K, Ueda K, and Nakamura Y. International journal of oncology, 45 (1), 147-156, 2014
- 6) Lysyl 5-Hydroxylation, a Novel Histone Modification, by Jumonji Domain Containing 6 (JMJD6). Unoki M, Masuda A, Dohmae N, Arita K, Yoshimatsu M, Iwai Y, Fukui Y, Ueda K, Hamamoto R, Shirakawa M, Sasaki H, and Nakamura Y. The Journal of biological chemistry, 288 (9), 6053-6062, 2013.
- 7) Plasma low-molecular-weight proteome profiling identified neuropeptide-Y as a prostate cancer biomarker polypeptide. Ueda K, Tatsuguchi A, Saichi N, Toyama A, Tamura, K, Furihata, M, Takata, R, Akamatsu S, Igarashi M, Nakayama M, Sato T, A Ogawa, O Fujioka, T Shuin, T Nakamura, Y, and Nakagawa H. Journal of proteome research, 12 (10), 4497-4506, 2013.
- Glycoproteomic strategies: from discovery to clinical application of cancer carbohydrate biomarkers. Ueda K. Proteomics Clin Appl, 7 (9-10), 607-617, 2013.
- 8) The oncogenic polycomb histone methyltransferase EZH2 methylates lysine 120 on histone H2B and competes ubiquitination. Kogure M, Takawa M, Saloura V, Sone K, Piao L, Ueda K, Ibrahim R, Tsunoda T, Sugiyama M, Atomi Y, Nakamura Y, and Hamamoto R. Neoplasia, 15 (11), 1251-1261, 2013.
- 9) Preapoptotic protease calpain-2 is frequently suppressed in adult T-cell leukemia. Ishihara M, Araya N, Sato T, Tatsuguchi A, Saichi N, Utsunomiya A, Nakamura Y, Nakagawa H, Yamano Y and Ueda K. Blood, 121 (21), 4340-4347, 2013.
2. 学会発表
- 1) Membrane proteome analysis to discover therapeutic targets for adult T-cell leukemia (ATL). Ishihara M, Araya N, Sato T, Saichi N, Fujii R, Tatsuguchi A, Utsunomiya A, Yamano Y, Sugano S, and Ueda K. 第76回日本血液学会学術集会 口頭

2014年11月1日

2) Comprehensive membrane-proteomic analysis for discovery of novel therapeutic targets against adult T-cell leukemia.

Ishihara M, Araya N, Sato T, Saichi N, Fujii R, Tatsuguchi A, Utsunomiya A, Yamano Y, Sugano S, and Ueda K.

第73回日本癌学会学術総会 口頭

2014年9月27日

3) Quantitative membrane proteome profiling to discover therapeutic targets for HTLV-I associated diseases.

Ishihara M, Araya N, Sato T, Saichi N, Fujii R, Tatsuguchi A, Yamano Y, and Ueda K.

13th Annual World Congress of the Human Proteome Organization. Oral Presentation
2014年10月8日

4) CD4陽性T細胞を用いた膜プロテオーム解析によるHTLV-1関連脊髄症に対する新規治療標的分子の探索

石原 誠人、新谷 奈津美、佐藤 知雄、藤井 理沙、最知 直美、宇都宮 與、山野 嘉久、菅野 純夫、植田 幸嗣

第1回日本HTLV-1学会学術集会 口頭

2014年8月24日

5) 膜プロテオーム解析によるヒトT細胞白血病ウイルス-I型 (HTLV-1) 関連疾患に対する新規治療標的分子の探索

石原 誠人、新谷 奈津美、佐藤 知雄、龍口 文子、最知直美、宇都宮與、山野 嘉久、菅野 純夫、植田 幸嗣

日本プロテオーム学会2014年会 ポスター
2014年7月17日

6) Quantitative membrane proteome profiling to discover therapeutic targets for adult T-cell leukemia (ATL).

Ishihara M, Araya N, Sato T, Saichi N, Fujii R, Tatsuguchi A, Utsunomiya A, Nakagawa H, Yamano Y and Ueda K.

第72回日本癌学会学術総会 口頭

2013年10月5日

7) Label free quantitative proteome analysis on cerebrospinal fluid to discover severity grade markers for Human T-cell leukemia virus type 1 associated myelopathy/tropic spastic paraparesis (HAM/TSP)

Ishihara M, Araya N, Sato T, Saichi N, Fujii R, Tatsuguchi A, Nakagawa H, Yamano Y and Ueda K.

12th Annual World Congress of the Human Proteome Organization. Oral presentation.
2013年9月17日

8) 脳脊髄液プロテオーム解析によるヒトTリンパ好性ウイルス関連脊髄症(HAM/TSP)に対する重症度診断アルゴリズムの構築

石原誠人、新谷奈津美、佐藤知雄、宇都宮與、山野嘉久、中川英刀、植田幸嗣

第6回HTLV-1研究会 口頭

2013年8月25日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

ヒトTリンパ好性ウイルス-1 (HTLV-1)関連脊髄症(HAM/TSP)の検査方法、及び検査用キット

日本出願番号: 特願 2014-226719

日本出願日: 2014年11月7日

発明者: 植田幸嗣、石原誠人、山野嘉久

出願国: 日本

2. 実用新案登録

該当なし

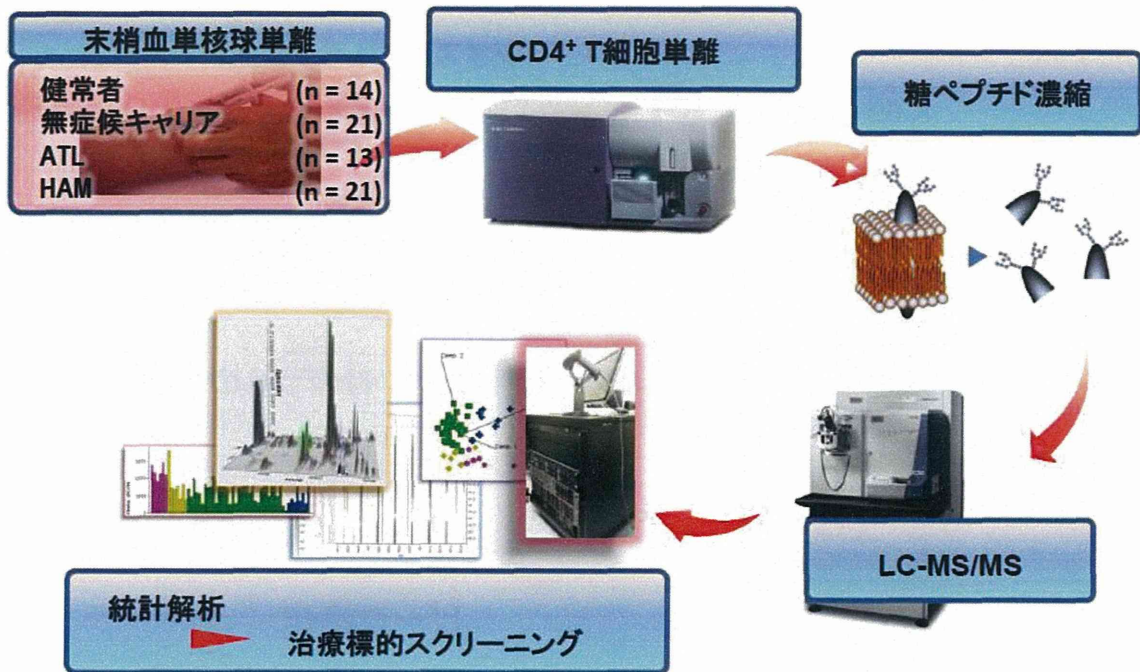


図1 治療標的スクリーニングの概略

健康者、無症候キャリア、ATL、HAM患者より末梢血単核球を採取し、Flow cytometryを用いてCD4陽性T細胞を単離した。回収したCD4陽性T細胞はトリプシン消化の後、膜タンパク質由来のペプチドを濃縮する目的で糖ペプチド精製を施された。この結果回収された糖ペプチドをLC-MS/MSで解析し、定量情報を基に治療標的のスクリーニングを行った。

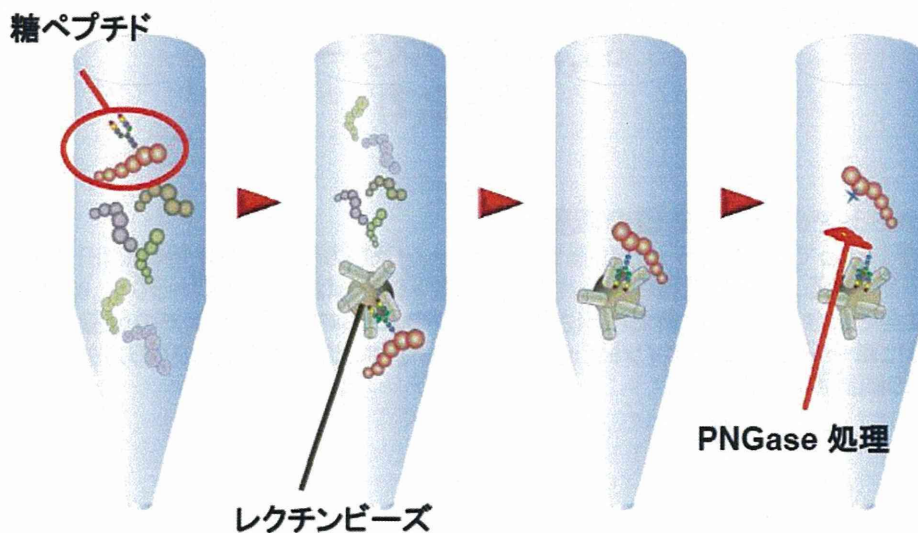


図2 レクチンビーズを用いた糖ペプチドの精製

細胞由来のトリプシン消化物は糖ペプチドと非糖ペプチドが混在している。ConAレクチンビーズはN型糖鎖が持っている基幹構造を認識し、結合する性質があるため、トリプシン消化物とインキュベートする事により糖ペプチドのみを回収する事が可能である。PNGaseはN型糖鎖の根元を切断する酵素であり、この切断によりN型糖鎖が結合するアスパラギンは全てアスパラギン酸に置換される。LC-MS/MSではこの変化を0.9840 Daの質量変化として検出し、各ペプチドの糖鎖修飾の有無を決定する。

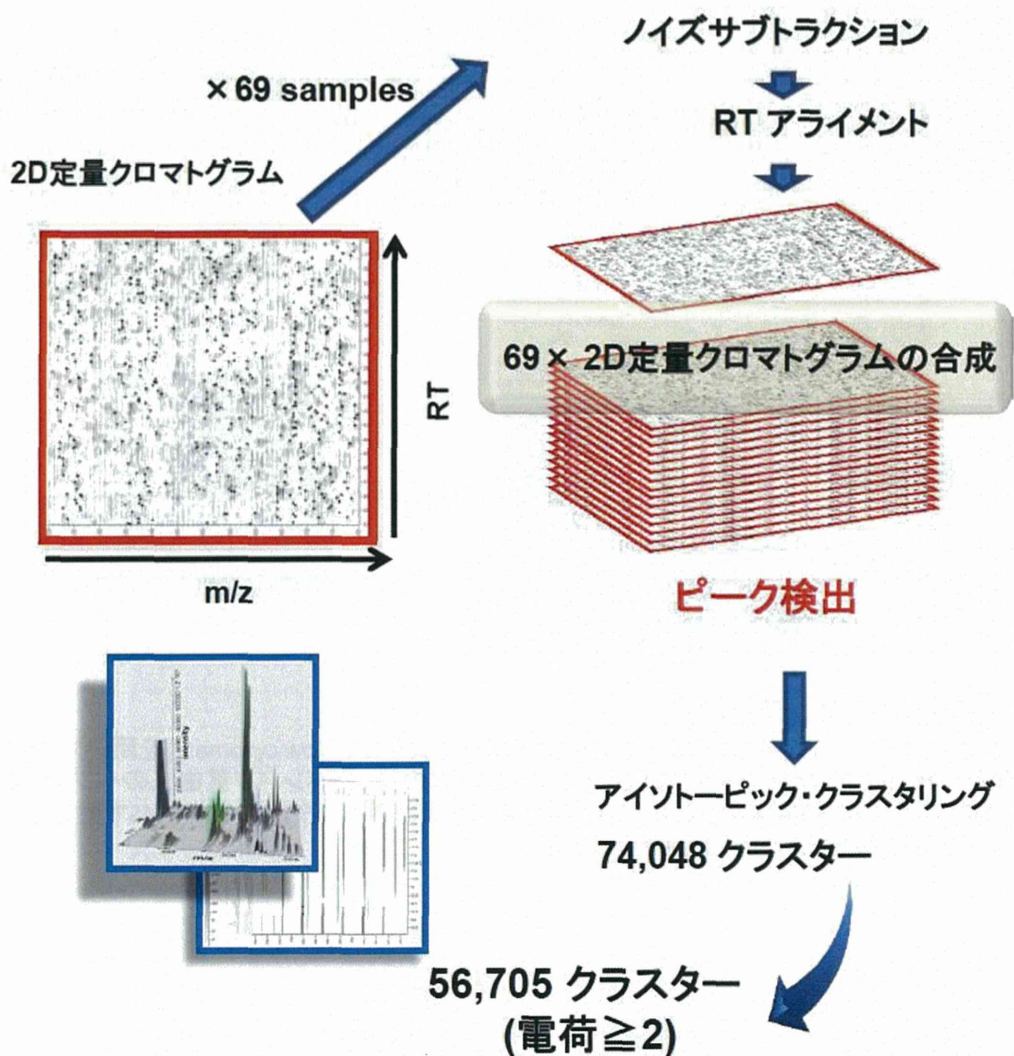


図3 RefinerMS上でのデータ処理の概要

LC-MS/MS解析によって得られたデータは質量電荷比(m/z)及びカラムへの保持時間(RT)を用いて2次元展開する事ができる。この結果得られた2D定量クロマトグラムはノイズサブトラクト、RTアライメントの後に、69枚全て結合され、全解析で検出されたピークの2Dクロマトグラム上での位置をリスト化する。この情報を基に単一分子由来のアイソトピック・クラスタを抽出し、2価以上のクラスタをペプチド由来として以降の統計解析に供した。

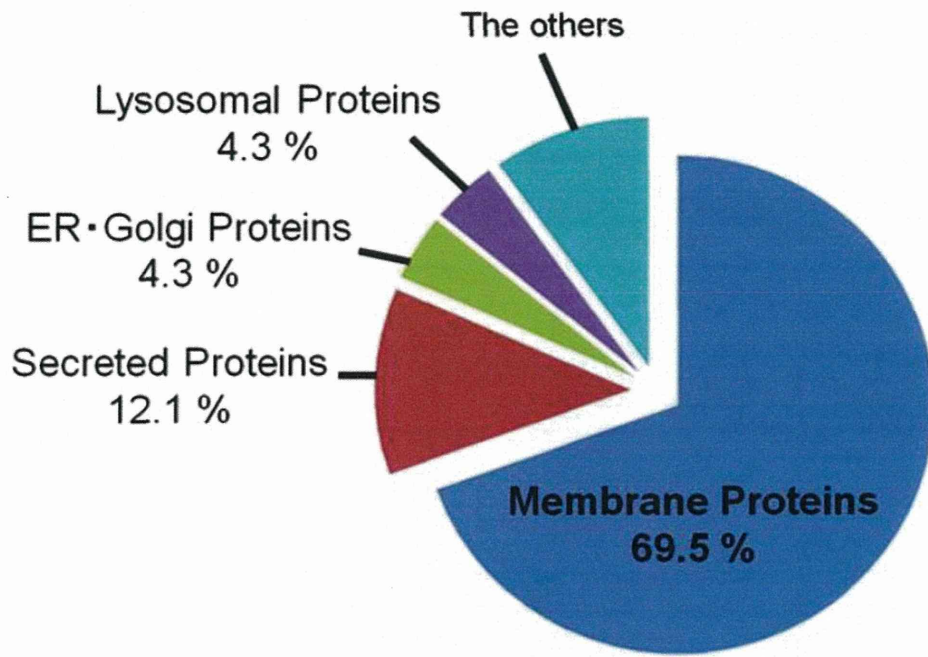


図4 2D-LC/MS/MSで同定された細胞ライセート由来糖ペプチドの内訳
 同定された915糖タンパク質に関してUniprotデータベースのSubcellular localizationを基に局在を解析した所、同定された糖ペプチドの70%近くが膜タンパク質であることが分かった。

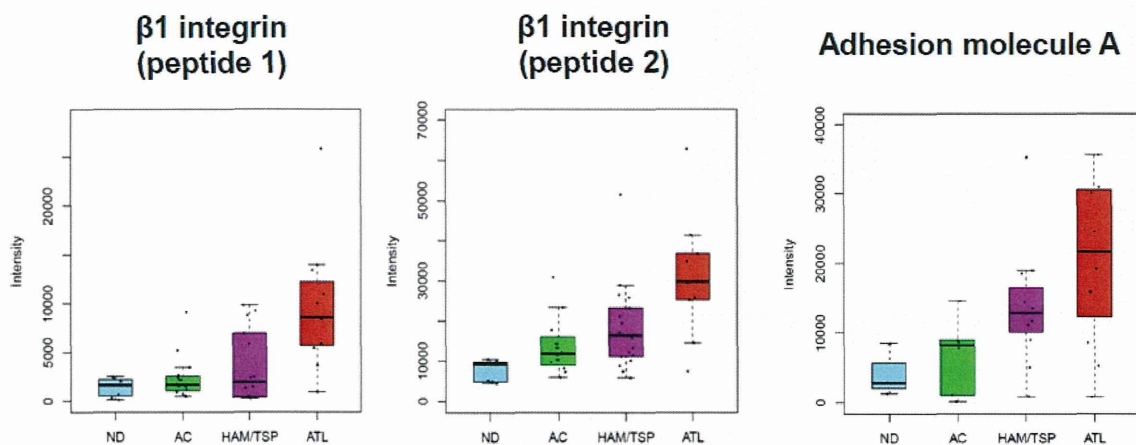
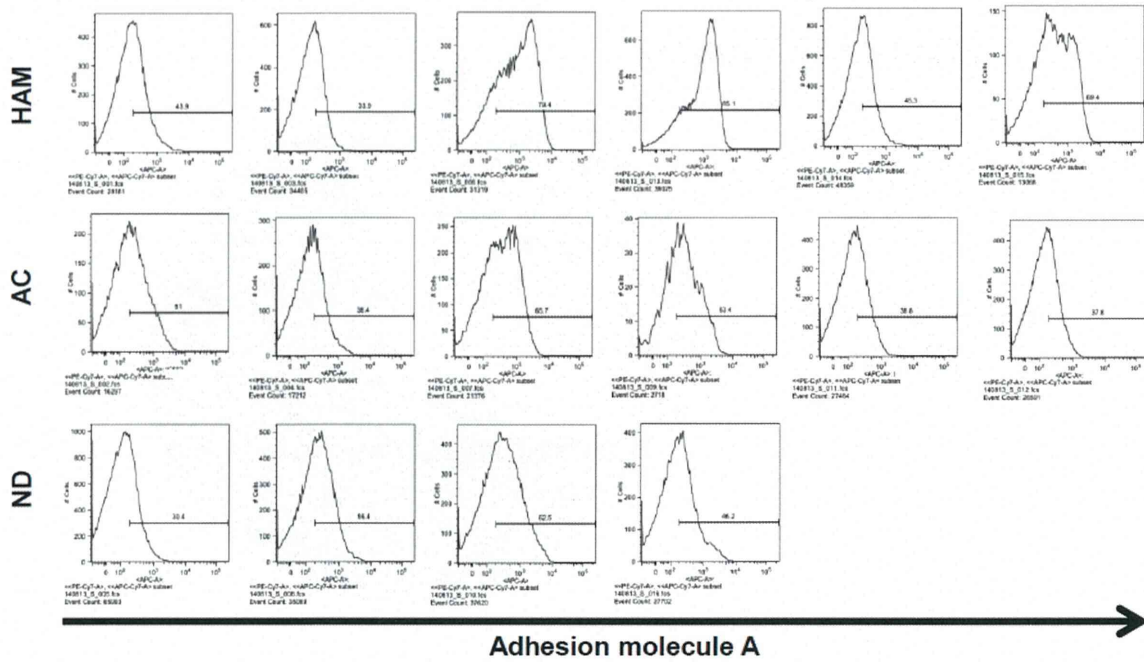


図5 HAM治療標的候補分子の定量ボックスプロット
 $\beta 1$ -Integrin 及び Adhesion molecule A のLC-MS/MS解析での検出強度はHAM, ATLで上昇している事が明らかとなった。

(A)

CD3⁺CD4⁺T-cells (HAM (6), AC (6) and ND (4))



(B)

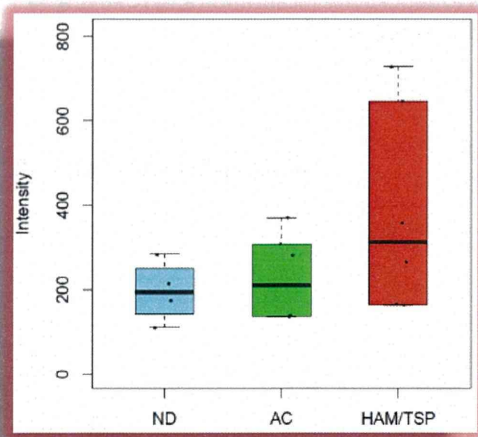


図6 Adhesion molecule Aの臨床検体における発現

(A) Adhesion molecule Aに対するAlexa647標識抗体を用いてFACSaria (BD)による発現解析を行った。その結果HAM患者末梢血CD4陽性T細胞でAdhesion molecule Aの発現の増加傾向が観察された。
(B) FACSariaによる解析結果におけるAdhesion molecule Aのピーク平均値のボックスプロット。

HTLV-1 感染細胞クローンの解析

研究分担者 氏名 : 松岡雅雄
所属機関 : 京都大学ウイルス研究所
職名 : 教授

研究要旨：ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) は生体内では新規感染ではなく、感染細胞の増殖によって、自身のコピー数を増加させる。これは HTLV-1 が感染細胞を介してのみ感染できるため合目的な戦略であると考えられている。HTLV-1 プロウイルスの組み込み部位を網羅的に解析することによって感染細胞クローンを同定、定量化できる。抗 CCR4 抗体投与前後の感染細胞クローンを解析して、その動態を検討した。

A. 研究目的

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) は感染細胞を介してのみ感染できるため、感染後、生体内で感染細胞を増やすという戦略を取っている。HTLV-1 はプロウイルスとして宿主ゲノムに組み込まれており、細胞分裂により増加する。このため、プロウイルスの組み込み部位を同定することにより、感染細胞クローンを定量することが可能である。本研究では、プロウイルス組み込み部位を次世代シーケンサーにより網羅的に解析して、HTLV-1 感染細胞クローンの動態を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

プロウイルス組み込み部位の解析は、DNA を抽出の後、超音波にて DNA の断片化を行ってリンカーを断片化 DNA へ連結した。その後、ウイルスの 3' 側の配列と、リンカーの配列を使用して PCR 反応を行い、ウイルスの組み込み部位を特異的に増幅する。さらに次世代シーケンサー特異的な配列をもつリンカーを連結させ、シーケンス解析を行う。この際に各サンプル毎に Tag 配列を使用するこ

とで、同時に解析を行うことが可能である。得られたデータを Tag 配列によってわけ、ウイルスの組み込み部位から断片端までの配列で clone を計算することが可能である。同じ断片端をもつものは PCR による増幅として計算し、異なる断片端の同じ組み込み部位をもつものは姉妹細胞として計算した。

(倫理面への配慮)

HAM 患者検体の次世代シーケンサーでのゲノム解析に関して、京都大学大学院医学研究科、医の倫理委員会にて承認が得られている (承認番号 : G204)。

C. 研究結果

1. HTLV-1 組み込み部位の網羅的解析による HTLV-1 感染細胞クローンの同定 : 末梢血単核球から分離したゲノム DNA を使い、HTLV-1 プロウイルス組み込み部位を網羅的に同定した。次に組み込み部位の塩基配列に基づき、HTLV-1 感染クローンの同定を行った。
2. 抗 CCR4 抗体前後でのクローンの変化 : 抗 CCR4 抗体使用前後でのクローンの動態を

解析して、前後で異なるクローンが認められた。また、治療前に存在したクローンが検出できなくなり、逆に存在しなかったクローンが出現することが認められた。

D. 考案

次世代シーケンサーによる HTLV-1 感染クローンの同定は有効な解析方法であり、これまで HTLV-1 感染症に関して新たな結果が得られている。例えば HAM 患者ではプロウイルス量が高いことから、大きな感染細胞クローンが増加していると予想されていたが、実は感染細胞クローン数が多いことが明らかになった。我々はサル T 細胞白血病ウイルス 1 型 (STLV-1) 感染ニホンザルが HTLV-1 感染のモデルとして有用であることを報告し、抗 CCR4 抗体投与によって感染細胞数が強く抑制されることを報告してきた。抗 CCR4 抗体投与前後で解析すると STLV-1 感染クローンの中で、投与前にあったクローンが投与後に回復するものとしめないものが観察され、抗 CCR4 抗体が HTLV-1 感染細胞を一様に抑制するのではなく、その反応には多様性が認められることが示唆された。HAM 患者でも同様の傾向が認められた。

E. 結論

次世代シーケンサーを使った解析により HTLV-1 感染クローンの詳細な解析が可能となった。

F. 健康危惧情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ma G, Yasunaga J-I, Akari H, and Matsuoka M. TCF1 and LEF1 act as T-cell intrinsic HTLV-1 antagonists by targeting Tax. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, (in press).
2. Takachi T, Takahashi M, Takahashi-Yoshita

M, Higuchi M, Obata M, Mishima Y, Okuda S, Tanaka Y, Matsuoka M, Saitoh A, Green P, Fujii M. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein represses the expression of the BCL11B tumor suppressor in T-cells. **Cancer Sci**, (in press).

3. Kinpara S, Ito S, Takahata T, Saitoh Y, Hasegawa A, Kijiyama M, Utsunomiya A, Masuda M, Miyazaki Y, Matsuoka M, Nakamura M, Yamaoka S, Masuda T, Kannagi M. Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase and anti-sense viral RNA in the constitutive NF κ B activation in adult T-cell leukemia/lymphoma cells. **Leukemia** (in press).
4. Suehiro Y, Atsuhiko Hasegawa A, Tadafumi Iino T, Amane Sasada A, Nobukazu Watanabe N, Masao Matsuoka M, Ayako Takamori A, Ryuji Tanosaki R, Atae Utsunomiya A, Ilseung Choi I, Tetsuya Fukuda T, Osamu Miura O, Shigeo Takaishi S, Takanori Teshima T, Koichi Akashi K, Mari Kannagi M, Naokuni Uike N, Jun Okamura J. Clinical outcomes of a novel therapeutic vaccine with Tax peptide-pulsed dendritic cells for adult T-cell leukemia/lymphoma in a pilot study. **Br J Haematol** (in press).
5. Niederer HA, Laydon DJ, Melamed A, Elemans M, Asquith B, Matsuoka M, Bangham CR. HTLV-1 proviral integration sites differ between asymptomatic carriers and patients with HAM/TSP. **Virology J**. 11: 172, 2014.
6. Lavorgna A, Matsuoka M, Harhaj EW. A critical role for IL-17RB signaling in HTLV-1 Tax-induced NF- κ B activation and T-cell transformation. **PLoS Pathogens** (in press).
7. Cook LB, Melamed A, Niederer H, Valganon M, Laydon D, Foroni L, Taylor GP, Matsuoka M, Bangham CR. The role of HTLV-1 clonality, proviral structure and genomic integration site in adult T cell leukemia/lymphoma. **Blood**, 123: 3925-3931, 2014.
8. Furuta RA, Ma G, Matsuoka M, Otani S, Matsukura H, Hirayama F. Re-evaluation of screening of plasma positive for human T-cell leukemia virus type 1 using a luciferase immunoprecipitation system in blood donors. **Transfusion**, (in press).
9. Zhao, T, Satou Y and Matsuoka M.

- Development of T cell lymphoma in HTLV-1 bZIP factor and Tax double transgenic mice. Arch Virol, 159: 1849-1856, 2014.
10. Azuma Y, Kükenshöner T, Ma G, Yasunaga JI, Imanishi M, Arndt KM, Matsuoka M, and Futaki S. Controlling leucine-zipper partner recognition in cells through modifications of a-g interactions. Chem. Commun. 50: 6364-6367, 2014.
 11. Tanaka-Nakanishi A, Yasunaga J-I, Takai K and Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor suppresses apoptosis by attenuating the function of FoxO3a and altering its localization. Cancer Res, 74:188-200, 2014.
2. 学会発表
1. Masao Matsuoka. How Human T-cell Leukemia Virus Type 1 Causes Diseases: The 4th International Symposium on Carcinogenic Spiral Infection, Immunity, and Cancer, Keio Plaza Hotel Sapporo, Japan, February 10-11, 2014.
 2. 松岡雅雄: HTLV-1 感染が仕掛ける巧妙な罠: HBZ タンパク質: 成人 T 細胞白血病 (ATL) と原因ウイルス (HTLV-1) 「ATL 細胞の培養から始まった HTLV-1 研究: ATL シンポジウム、高新文化ホール(高知)、2014年5月24日
 3. Masao Matsuoka. Mechanism of leukemogenesis by human T-cell leukemia virus type I: The 12th Annual Meeting of Japanese Society of Medical Oncology. Fukuoka Sunpalace, Japan, July 17-19, 2014.
 4. 安永純一郎、園直希、馬広勇、萩谷啓太、松岡雅雄: 宿主 F-box タンパク質 FBXL11 は Tax と HBZ のユビキチン化を誘導し機能を活性化する: 第1回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京大学医科学研究所 1号館講堂 (東京)、2014年8月22日-24日
 5. 栗林和華子、水上拓郎、滝澤和也、倉光球、浅田善久、岩間厚志、松岡雅雄、濱口功: HTLV-1 モデルマウスである HBZ-Tg マウスにおける癌幹細胞の同定と機能解析: 第1回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京大学医科学研究所 1号館講堂 (東京)、2014年8月22日-24日
 6. 三田上侑生、安永純一郎、大島孝一、松岡雅雄: HTLV-1 bZIP factor が惹起する炎症には IFN γ が重要な役割を果たす: 第1回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京大学医科学研究所 1号館講堂 (東京)、2014年8月22日-24日
 7. Guangyong Ma, Jun-ichiro Yasunaga, Masao Matsuoka. TCF1/LEF1 are T-cell natural HTLV-1 Tax antagonists that restrict viral expansion in thymus. The 1st Annual Meeting of the Japanese Society of HTLV-1 and Associated Diseases. The Institute of Medical Science, Tokyo University, Japan, August 22th-24th, 2014.
 8. 松岡雅雄: HTLV-1 による発がん機構: 第73回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜 (神奈川)、2014年9月25日-27日
 9. 川月章弘、安永純一郎、松岡雅雄: HTLV-1 bZIP factor (HBZ) は Rb タンパクと相互作用し、E2F-1/Rb 経路を改変する: 第73回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜 (神奈川)、2014年9月25日-27日
 10. 安永純一郎、松岡雅雄: 転写因子 TCF1、LEF1 は HTLV-1 Tax を阻害し末梢 T リンパ球への感染指向性に関与する: 第73回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜 (神奈川)、2014年9月25日-27日
 11. 三田上侑生、安永純一郎、大島孝一、松岡雅雄: HTLV-1 bZIP factor が惹起する炎症における IFN γ の役割: 第62回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜 (神奈川)、2014年11月10日-11月12日
 12. 菅田謙治、安永純一郎、三浦未知、明里宏文、小柳義夫、小原道法、松岡雅雄: Anti-CCR4 抗体は Treg と感染細胞を同時に標的にする事で、STLV-1 自然感染ニホンザルでのウイルス特異的免疫反応を活性化させる: 第62回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜 (神奈川)、2014年11月10日-11月12日
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他

末梢血中 ATL 前駆細胞の解析

研究分担者 氏名 : 内丸 薫
所属機関 : 東京大学医科学研究所附属病院
職名 : 准教授

研究要旨：HTLV-1 感染細胞の腫瘍化過程を解析する HAS-2G 法を用いて HTLV-1 キャリア、indolent ATL 患者 60 例の CD7/CADM1 の発現の解析を行った。HAS-2G 法による解析は HTLV-1 感染者末梢血の病態を非常によく反映していると考えられ、末梢血中の ATL 前駆細胞の状態を評価することが可能であった。本治験で抗 CCR4 抗体の投与を受けた HAM 患者の末梢血を HAS-2G で解析することにより HTLV-1 キャリアに抗 CCR4 抗体を投与した時の末血中 ATL 前駆細胞への影響を評価することが可能であり、HTLV-1 ハイリスクキャリアへの ATL 発症予防のための抗 CCR4 抗体投与の可能性を検討できると考えられる。

A. 研究目的

我々の開発した HTLV-1 感染者末梢血 CD4 陽性細胞における CD7/CADM1 の発現を検討する multi-color FACS system (HAS-2G 法)によって、HTLV-1 キャリア、ATL 患者末梢血において CD7⁺/CADM1^(P)、CD7^{dim}/CADM1^(D)、CD7⁺/CADM1^(N)の3つの集団が検出され、これらはこの順に ATL へ向けての腫瘍化過程が進行した細胞集団であることを我々は報告してきた。本研究では多数例の HTLV-1 キャリアと indolent ATL を HAS-2G を用いて解析し、HAS-2G の解析パターンと病態との関連をより詳細に明らかにするとともに、本研究において抗 CCR4 抗体が投与された患者の末梢血への影響の評価の可能性を検討する。

B. 研究方法

東大医科研血液腫瘍内科を受診した HTLV-1 キャリア 41 例、くすぶり型 ATL9

例、慢性型 ATL10 例の合計 60 例を解析対象とした。末梢血単核球を分離後、既報のとおり HAS-2G 法により、CD14 陽性単球を gate out した後、CD3/4 陽性 T 細胞に gate をかけ、CD7/CADM1 の発現を解析した。これらの集団の clonality について inverse PCR で解析を行った。対象症例の末梢血異常リンパ球数などの臨床情報、プロウイルス量などのデータと HAS-2G パターンとの関連について解析を行った。また、各集団の CCR4 の発現について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は臨床研究に関する倫理指針に則り東京大学医科学研究所ヒトゲノム倫理委員会の審査承認（承認番号 24-34-1004）のもとに被験者から文書による説明と同意を得て遂行された。

C. 研究結果

末梢血中プロウイルス量 (PVL) >4%は

ATL 発症のリスクファクターであることが報告されているが、HAS-2G による解析により PVL<4% の症例はほぼ全例 D+N<10%、PVL>4%の症例は同様に D+N>10%と明瞭に分離された (図 1)。

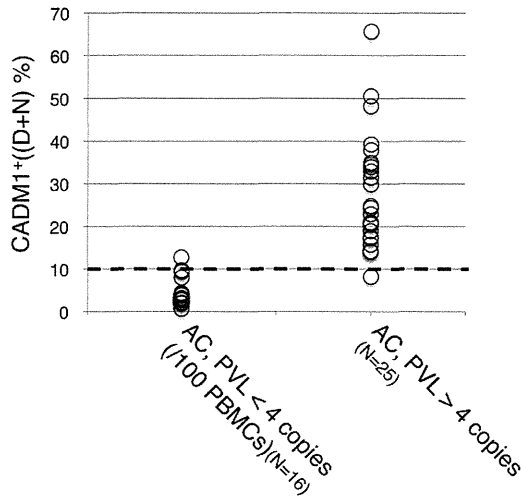


図 1 D+N(%)と PVL の関係

D+N の%により、解析した全 60 例のキャリア、indolent ATL をプロットした結果を図 2 に示す。各症例の clonality を inverse PCR で解析した結果 (図 3)、PVL<4%である D+N<10% の症例では全例 HTLV-1 感染細胞は polyclonal であり、10%~25% ではほとんどの症例が oligoclonal、ないし major clone の増殖を認める症例であったが、下山分類上はキャリアであった。D+N 25%~50% の症例では全例で oligoclonal band ないし

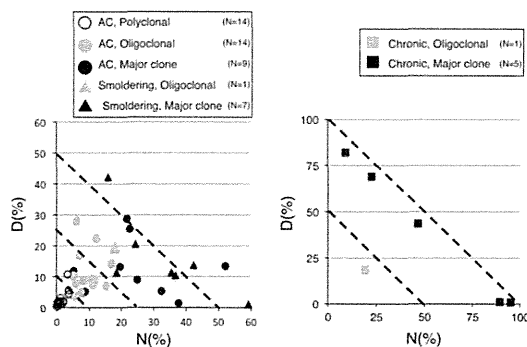


図 2 D+N(%)による 4 集団への分画

major clone を認め、くすぶり型 ATL とキャリアが混在していた。慢性型症例は全例 D+N>50%であった。

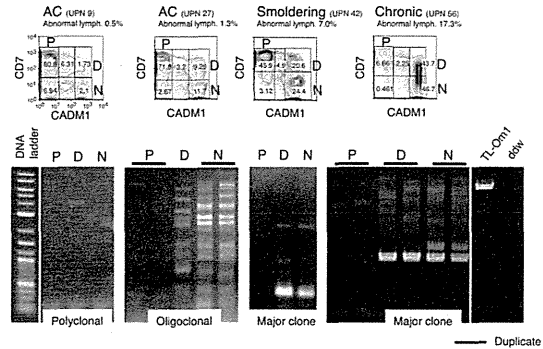


図 3 各分画の clonality 解析

これら D+N 0~10%、10~25%、25~50%、50%<の 4 つの集団における末梢血中異常リンパ球数を図 4 に示す。

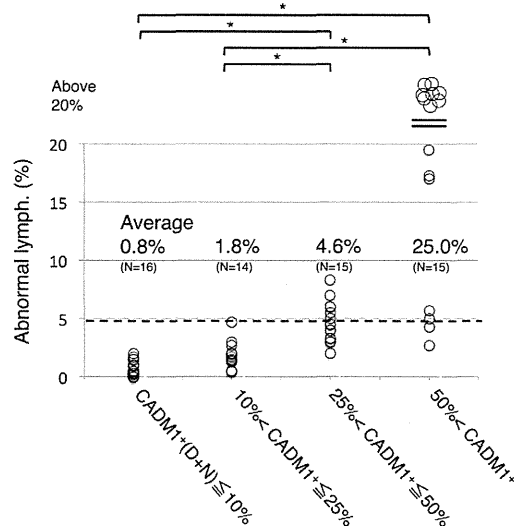


図 4 4 集団の末梢血異常リンパ球数

D+N<10% では全例末梢血中異常リンパ球は 1%前後ないしそれ以下であった。10%~25% ではほとんどの症例が異常リンパ球は 2~3%程度で全例診断はキャリアであった。25%~50% では異常リンパ球は 5%前後で、継時的に 5%前後で推移しており、診断はくすぶり型 ATL とキャリアが混在していた。これらのくすぶり型 ATL とキャリア