

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 5月 15日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390328

研究課題名（和文）皮膚T細胞性リンパ腫のAID関連microRNAによるモニタリングシステムの構築

研究課題名（英文）Establishment of monitoring system with AID-associated microRNA-155 for cutaneous T-cell lymphoma and its application for therapy

研究代表者

戸倉 新樹 (TOKURA YOSHIKI)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：00172156

研究成果の概要（和文）：ウイルス性発癌における AID の役割が報告されている。さらに、microRNA-155 が AID の発現を負に発現していることが明らかとなった。皮膚リンパ腫患者（成人 T 細胞白血病／リンパ腫(ATLL)を含む）ではこれまで p53 などさまざまな癌抑制遺伝子の点突然変異が報告されている。ATLL、菌状息肉症、セザリ－症候群の患者から末梢血及び皮膚腫瘍リンパ球を分離した後、mRNA、microRNA を抽出し、AID mRNA、microRNA-155 の発現量を real-time PCR 法により測定し、コントロールである健常人リンパ球における発現量と比較した。その結果、AID 発現は皮膚 T 細胞リンパ腫の組織、末梢血で高く、とりわけ ATLL において高値であることが明らかとなった。さらに、患者リンパ球を MACS 法により CD4 陰性、CD4 陽性 CD25 陰性、CD4 陽性 CD25 陽性細胞に分離し、それぞれの分画の AID mRNA、microRNA-155 の発現量を測定した。生検時に得られた患者皮膚、リンパ節検体の一部の AID mRNA、microRNA-155 の発現量も測定し、AID 発現が microRNA-155 の低発現を伴って高い値を示すことが特に ATLL で明らかとなった。本研究により、皮膚リンパ腫において AID が腫瘍化に関連し、とくにウイルス性腫瘍化機構に深く関わっていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：It has been reported that AID is involved in the development of virus-associated neoplasms. Moreover, microRNA-155 downregulates the expression of AID. On the other hand, point mutations of p53 have been reported in the patients with cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) including ATLL. By real-time PCR analysis, we investigated the expression of AID and microRNA-155 in the peripheral blood of patients with mycosis fungoides, Sézary syndrome, and ATLL in a comparison with normal healthy subjects. We found that AID expression was higher in the peripheral blood lymphocytes and tumor-infiltrating cells in CTCL, especially ATLL. We isolated circulating CD4-, CD4+CD25-, and CD4+CD25+ cells by MACS and examined the mRNA expression of AID and microRNA-155 in each fraction. In addition, skin specimens and lymph nodes from the patients were also tested. We found that AID expression was elevated with decreased expression of microRNA-155, particularly in ATLL, suggesting that AID and its regulatory microRNA are involved in the development of this virus-associated lymphoma.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2009年度 | 4,200,000 | 1,260,000 | 5,460,000 |
| 2010年度 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |
| 2011年度 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 11,200,000 | 3,360,000 | 14,560,000 |

研究分野：皮膚科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、皮膚科学

キーワード：皮膚 T 細胞リンパ腫、AID、成人 T 細胞白血病／リンパ腫、マイクロ RNA、菌状息肉症、セザリー症候群

1. 研究開始当初の背景

菌状息肉症や Sézary 症候群を始めとする皮膚 T 細胞性リンパ腫は、長い経過で紅斑性病変から腫瘍性病変あるいは紅皮症に進展する疾患である。また、成人 T 細胞白血病／リンパ腫 (ATLL) は母子感染などで human T lymphotropic virus type-I のキャリアとなり、成人になって全症例の半数で皮膚に浸潤するために生じる特異疹、すなわち腫瘍、結節、紫斑、紅斑などを呈するようになる。これらの皮膚リンパ腫の発病、進展、増悪の病態生理については未だ十分には解明されてこなかった。

一方では、近年こうした T 細胞性リンパ腫の免疫学的研究は、T 細胞の normal counterpart を探る方向に大きく進展している。例えば Sézary 症候群の腫瘍細胞は、Th2 細胞との数々の報告をみた後、制御性 T 細胞 (regulatory T 細胞、Treg) であることが報告された。しかし Treg としての性格は ATLL の方がより明らかであり、Treg と同じフェノタイプの CD4+CD25+ であり、さらに Treg の表面マーカーである CTLA-4 とマスター遺伝子 Foxp3 を持ち、さらに Treg 機能を持つという報告が相次いだ。しかし、すべての患者、cell line で Treg の機能がある訳ではなく、多くても 30% 程度で認められるにすぎない。我々も末梢血腫瘍細胞、皮膚浸潤腫瘍細胞で CTLA-4 を高発現する症例を認めたが、CD8+ T 細胞に対する Treg 機能は認められなかった (Shimauchi T et al. Cancer Sci)。従って、HTLV-I の CD4+ T 細胞への感染が直接的に Treg への誘導へとつながる可能性は高くないと推論している。その理由の一つとして、ATLL 腫瘍細胞が programmed death-1 (PD-1, CD279) を発現していることが重要である。その ligand は PD-L1, 2 で、主に抗原提示細胞に発現され、CTLA-4 と同様に negative signal を伝達する。我々は ATLL が PD-1 も PD-L1 も発現しており、exhausted な状態にあることを見出している。また限られた症例ではあるが Sézary 症候群でも PD-1 を発現していることも観察している。

2. 研究の目的

こうした exhausted な Treg としての性格を獲得しつつ、ATLL はキャリアから腫瘍へと

進展していく。これに関して我々は AID (activation-induced cytidine deaminase) 蛋白に注目した。AID は、当初、B リンパ球の抗体遺伝子可変領域の点突然変異と抗体のクラススイッチに関与するたんぱく質として同定された。ところが、最近、AID は癌化した胃癌や肝臓癌の細胞に高発現し、in vitro で細胞に AID を高発現させると p53 などの遺伝子に点突然変異が誘導されることが分かり、発癌にも大きく関与していることが提唱された。また、ピロリ菌や肝炎ウイルスの感染により、AID の発現が上昇することから、ピロリ菌や肝炎ウイルスの感染からの胃癌や肝臓癌の発症における AID の役割が注目されている。すなわち、ウイルス関連の癌において、AID が重要な役割を演じている可能性がある。microRNA はゲノムから転写された後に、複数の酵素類の作用により、短い完成型になる。ターゲットとなる mRNA と結合することにより、mRNA 分解や蛋白質翻訳阻害に関与することが示唆されている。最近の研究では、microRNA-155 が AID mRNA の非翻訳領域に結合し、AID の発現を負に制御していることが明らかとなっている。そこで本研究では、AID とその制御 microRNA-155 の皮膚 T 細胞リンパ腫発症への関与を研究した。

3. 研究の方法

ATLL、菌状息肉症、セザリー症候群の患者から同意を得た後、採血し、フィコール法により、リンパ球を分離した後、mRNA、microRNA を抽出し、AID mRNA、microRNA-155 の発現量を real-time PCR 法により測定し、コントロールである健常人リンパ球における発現量と比較した。さらに、患者リンパ球を MACS 法により CD4⁻、CD4+CD25⁻、CD4+CD25⁺細胞に分離し、それぞれの分画の AID mRNA、microRNA-155 の発現量を測定した。生検時に得られた患者皮膚、リンパ節検体の一部の AID mRNA、microRNA-155 の発現量も測定する。これらデータは、Foxp3 発現・CTLA-4 発現・PD-1 発現と関連させて解析した。

PBMC から直接、あるいは MACS 法により、CD4⁻、CD4+CD25⁻、CD4+CD25⁺細胞に分けた分画、または凍結皮膚腫瘍組織から RNA extraction KIT を用いて total RNA を抽出した。cDNA synthesis kit を用いて total RNA

から cDNA を合成した。GAPDH 遺伝子発現量をコントロールとして、AID の mRNA 発現量を real-time PCR 法にて測定した。

PBMC から直接、あるいは MACS 法により、CD4⁻、CD4⁺CD25⁻、CD4⁺CD25⁺細胞に分けた分画から microRNA extraction KIT を用いて microRNA を抽出する。Specific looped RT primer と microRNA reverse transcription kit を用いて microRNA 逆転写のアニーリングと伸張反応を行った。恒常的に発現する microRNA-16 の発現量をコントロールとして、microRNA-155 発現量を real-time PCR 法にて測定した。

4. 研究成果

皮膚リンパ腫患者（成人 T 細胞白血病／リンパ腫 (ATLL) を含む）ではこれまで p53 などさまざまな癌抑制遺伝子の点突然変異が報告されている。ATLL、菌状息肉症、セザリー症候群の患者から同意を得た後、採血し、リンパ球を分離した後、mRNA、microRNA を抽出し、AID mRNA、microRNA-155 の発現量を real-time PCR 法により測定し、コントロールである健常人リンパ球における発現量と比較した。その結果、AID 発現は皮膚 T 細胞リンパ腫の組織、末梢血で高く、とりわけ ATLL において高値であることが明らかとなった。さらに、患者リンパ球を MACS 法により CD4 陰性、CD4 陽性 CD25 陰性、CD4 陽性 CD25 陽性細胞に分離し、それぞれの分画の AID mRNA、microRNA-155 の発現量を測定した。生検時に得られた患者皮膚、リンパ節検体の一部の AID mRNA、microRNA-155 の発現量も測定し、AID 発現が microRNA-155 の低発現を伴って高い値を示すことが明らかとなった。本研究により、皮膚リンパ腫において AID が腫瘍化に関連し、とくにウイルス性腫瘍化寄稿に深く関わっていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 24 件)

1. Sugita K, Shimauchi T, Kabashima R, Nakashima D, Hino R, Kabashima K, Nakamura M, Tokura Y: Loss of tumor cell CCR4 expression upon leukemic change in adult T-cell leukemia/lymphoma. *J Am Acad Dermatol*, 査読有, 61: 163-164, 2009
2. Yoshiki R, Kabashima K, Sugita K, Atarashi K, Shimauchi T, Tokura Y: IL-10-Producing Langerhans Cells and Regulator

y T Cells Are Responsible for Depressed Contact Hypersensitivity in Grafted Skin. *J Invest Dermatol*, 査読有, 129: 705-713, 2009

3. Shimauchi T, Nishio D, Isoda H, Sugita K, Kabashima K, Tokura Y: Leukaemic mycosis fungoides in an atomic bomb survivor with lung and renal cancers. *Clin Exp Dermatol*, 査読有, 34: 322-324, 2009
4. Fukamachi S*, Kimura T, Kobayashi M, Hino R, Nakamura M, Tokura Y: Palm ar pseudolymphoma associated with herpes simplex infection. *J Cutan Pathol*, 査読有, 37: 808-811, 2010
5. Shimauchi T, Sugita K, Nakamura M, Tokura Y: Leukemic cutaneous T-cell lymphoma manifesting papuloerythroderma with CD3⁻ CD4⁺ phenotype. *Acta Derm Venereol*, 査読有, 90, 2010, 68-72
6. Haruyama S*, Sugita K, Kawakami C, Nakamura M, Tokura Y: Development of a Prominent Granulomatous Eruption after Interferon-gamma Therapy in a Patient with Mycosis Fungoides. *Acta Derm Venereol*, 査読有, 90, 2010, 190-191
7. Sawada Y, Sugita K, Kabashima R, Hino R, Nakamura M, Koga C, Tokura Y: CD8⁺ CD56⁺ Mycosis Fungoides with an Indolent Clinical Behaviour: Case Report and Literature Review. *Acta Derm Venereol*, 査読有, 90, 2010, 525-526
8. Sawada Y, Hino R, Hama K, Ohmori S, Fueki H, Yamada S, Fukamachi S, Tajiri M, Kumo R, Yoshioka M, Nakashima D, Sugita K, Yoshiki R, Shimauchi T, Mori T, Izu K, Kobayashi M, Nakamura M, Tokura Y: The type of skin eruptions is an independent prognostic indicator for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*, 査読有, 117, 2011, 3961-3967
9. Sugita K*, Kabashima K, Yoshiki R, Ikenouchi-Sugita A, Tsutsui M, Nakamura J, Yanagihara N, Tokura Y: Inducible Nitric Oxide Synthase Downmodulates Contact Hypersensitivity by Suppressing Dendritic Cell Migration and Survival. *J Invest Dermatol*, 査読有, 130: 464-471, 2010

10. Hino R, Kabashima K, Kato Y, Yagi H, Nakamura M, Honjo T, Okazaki T, Tokura Y: Tumor cell expression of programmed cell death 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer*, 査読有, 116: 1757-1766, 2010
11. Kabashima K, Sakabe J-I, Yoshiki R, Tabata Y, Kohno K, Tokura Y: Involvement of Wnt signaling in dermal fibroblasts. *Am J Pathol*, 査読有, 176: 721-732, 2010
12. Yoshiki R, Kabashima K, Sakabe J-I, Sugita K, Bito T, Nakamura M, Malissen B, Tokura Y: The mandatory role of IL-10-producing and OX40L-expressing mature Langerhans cells in local UVB-induced immunosuppression. *J Immunol*, 査読有, 84: 5670-5677, 2010
13. Tomura M, Honda T, Tanizaki H, Otsuka A, Egawa G, Tokura Y, Waldmann H, Hori S, Cyster JG, Watanabe T, Miyachi Y, Kanagawa O, Kabashima K: Activated regulatory T cells are the major T cell type emigrating from the skin during a cutaneous immune response in mice. *J Clin Invest*, 査読有, 120: 883-893, 2010
14. Sugita K, Tohyama M, Watanabe M, Otsuka A, Nakajima S, Iijima M, Hashimoto K, Tokura Y, Miyachi Y, Kabashima K: Fluctuation of blood and skin plasma cytoid dendritic cells in drug-induced hypersensitivity syndrome. *J Allergy Clin Immunol*, 査読有, 126: 408-410, 2010
15. Sawada Y, Nakamura M, Bito T, Fukamachi S, Kabashima R, Sugita K, Hino R, Tokura Y: Cholinergic urticaria: Studies on the muscarinic cholinergic receptor M3 in the anhidrotic and hypohidrotic skin. *J Invest Dermatol*, 査読有, 130: 2683-2686, 2010
16. Sugita K, Kabashima K, Sakabe J-I, Yoshiki R, Tanizaki H, Tokura Y: FTY720 regulates bone marrow egress of eosinophils and modulates late phase skin reaction in mice. *Am J Pathol*, 査読有, 177: 1881-1887, 2010
17. Kasuya A, Fujiyama T, Shirahama S, Hashizume H, Tokura Y: Decreased expression of homeostatic chemokine receptors in intravascular large B-cell lymphoma: A study of three cases. *Eur J Dermatol*, 査読有, in press
18. Fukamachi S, Mori T, Sakabe J-I, Shirahama N, Kuroda E, Kobayashi M, Bito T, Kabashima K, Nakamura M, Tokura Y: Topical Cholecystokinin Suppresses Itch-Associated Scratching Behavior in Mice. *J Invest Dermatol*, 査読有, 131: 956-961, 2011
19. Nakamura M, Sugita K, Sawada Y, Yoshiki R, Hino R, Tokura Y: High levels of activation-induced cytidine deaminase expression in adult T-cell leukaemia/lymphoma. *Br J Dermatol*, 査読有, 165, 2011, 437-439
20. Nakamura M, Iwata S, Kimura H, Tokura Y: Elevated expression of activation-induced cytidine deaminase in T and NK cells from patients with chronic active Epstein-Barr virus infection. *Eur J Dermatol*, 査読有, 21, 2011, 780-782
21. Kito Y, Hashizume H, Tokura Y: Rosacea-like demodicosis mimicking cutaneous lymphoma. *Acta Derm Venereol*, 査読有, in press
22. Kasuya A, Fujiyama T, Hashizume H, Inuzuka M, Tokura Y: Histiocytoid Sweet's syndrome associated with t(9;22)(q34;q11)-positive chronic myelogenous leukemia: Immature granulocytic origin of histiocytic cells. *Int J Dermatol*, 査読有, in press
23. Fukamachi S, Sugita K, Nakamura M, Tokura Y: Cutaneous pseudolymphoma due to benidipine hydrochloride with massive infiltration of eosinophils. *J Dermatol*, 査読有, 38, 2011, 935-936
24. Sawada Y, Mori T, Yamada S, Nakamura M, Tokura Y: Keloid exacerbation associated with adult T-cell leukemia/lymphoma cell infiltration. *Eur J Dermatol*, 査読有, 21, 2011, 646-647

[学会発表] (計 9 件)

1. Sawada Y, Hino R, Hama K, Nakamura M, Tokura Y: Classification of skin manifestations of adult T-cell leukemia/lymphoma useful for staging and predictive for prognosis. The 70th Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology, 2010年5月5～8日, Hilton Atlanta Hotel, Atlanta, Georgia
2. Nakamura M, Kimura H, Tokura Y: Increased expression of activation-induced cytidine deaminase in chronic active Epstein-Barr virus infection leads to neoplastic development, The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2010年12月3日～5日, Wakayama Prefectural Cultural Hall, Wakayama
3. Sawada Y, Hino R, Hama K, Nakamura M, Tokura Y: Classification of skin manifestations of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) useful for staging and predictive for prognosis. The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2010年12月3日～5日, Wakayama Prefectural Cultural Hall, Wakayama
4. 戸倉新樹 : やさしいリンフォーマ. 第26回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会. 2010.6.5. 京王プラザホテル (東京)
5. Tokura Y: The type of skin eruptions is an independent prognostic indicator for adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL). 5th International Symposium on the Biology and Immunology of Cutaneous Lymphomas 2011.1.15. Berlin, Germany.
6. Tokura Y: Immunosuppression and Complications in the Disordered Axis of TNF- α and Th17 Cells. 22nd World Congress of Dermatology 2011.5.25. Seoul, Korea.
7. Tokura Y: Adult T-cell leukemia / lymphoma and HTLV-1. Cutaneous Lymphomas of Viral Origin. 22nd World Congress of Dermatology 2011.5.27. Seoul, Korea
8. Tokura Y: Adult T-cell leukemia/lymphoma: Treg neoplasm with affinity to the skin. International Immunodermatology Symposium (Post-ESDR 2011) 2011.9.12.

Heidelberg, Germany.

9. 戸倉新樹, 澤田雄宇 : 成人T細胞性白血病／リンパ腫の皮疹型と予後の解析. 第27回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会 (招待講演) 2011.6.4. 東京都

[図書] (計3件)

1. 戸倉新樹 : 金原出版、皮膚悪性腫瘍取扱い規約 第2版、2010、139-144
2. Tokura Y, MEDRANG, Hypersensitivity to mosquito bites and EBV, 2011, 6 (423-428)
3. 戸倉新樹、南江堂、皮膚疾患最新の治療 2011-2012、2011、1 (117)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸倉 新樹 (TOKURA YOSHIKI)
 浜松医科大学・医学部・教授
 研究者番号 : 00172156

(2) 研究分担者

中村 元信 (NAKAMURA MOTONOBU)
 産業医科大学・医学部・准教授
 研究者番号 : 30303837

島内 隆寿 (SHIMAUCHI TAKATOSHI)
 浜松医科大学・医学部・講師
 研究者番号 : 90399204

(3) 連携研究者

なし