

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15420

研究課題名(和文) CD30によるROS-DSBを介したゲノム不安定性とATL病態進展機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of genomic instability through ROS-DSB by CD30 signaling in ATL progression

研究代表者

中島 誠 (Nakashima, Makoto)

聖マリアンナ医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：30733232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：成人T細胞白血病リンパ腫(ATL)は、ヒト白血病ウイルス1型(HTLV-1)感染を原因とし、感染者のうち3-5%が発症するT細胞性腫瘍である。研究代表者は、ATLに対して治療標的となり得る分子としてCD30に注目し、ATL病態進展機構の解明を目指した。本研究では臨床検体を用いた解析を実施し、CD30陽性ATL細胞に対してCD30Lで刺激すると、細胞内活性酸素種およびDNA二本鎖切断を亢進すること、さらに染色体構造変異数を増加させることが示された。これらの結果から、CD30シグナルは染色体の不安定性を誘導することで、新たなクローン進化を獲得した腫瘍細胞の発生に寄与する可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CD30シグナルのオンコシグナルとしての実証は、CD30を標的としたATLの早期治療介入および再発を含むATL治療を支持するエビデンスになると考えられる。本研究により得られた結果は、再発ATLに対して寛解実績のある抗CD30抗体薬物複合体(ブレンツキシマブ・ベドチン)の適切な投薬時期の検討およびCD30のモニタリングを基盤にした革新的診療体制の構築に資するものとなる。CD30シグナルはゲノム変異を惹起する起点シグナルであると考えられ、病態を悪化させるバイオマーカーとして早期に排除すべき細胞であるというコンセプトが示された。

研究成果の概要(英文)：Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) is a poor prognosis T-cell neoplasm caused by human leukemia virus type I (HTLV-1) infection, which occurs in 3-5% of HTLV-1-infected individuals. I focused on the CD30 molecule, a promising therapeutic target against ATL, to investigate the mechanism of disease progression of ATL. In this study, using clinical samples from patients with ATL, I showed that CD30+ ATL cells stimulated with CD30L induce elevated intracellular ROS, DNA double-strand breaks, and increased chromosomal structural alterations. These results suggest that CD30 signaling induces genomic instability and contributes to the generation of tumor cells with clonal evolution.

研究分野：分子生物学、ウイルス学、血液腫瘍学、神経免疫疾患

キーワード：CD30 CD30L ATL HTLV-1 Genomic instability

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

成人T細胞白血病リンパ腫 (ATL)は、ヒト白血病ウイルス1型 (HTLV-1)感染を原因とし、感染者のうち3~5%が発症するT細胞性腫瘍である。我が国は世界のHTLV-1集積地域の1つであり、約100万人のキャリアが西南日本を中心に存在し、年間約1000人がATLを発症する。ATLは病態により、くすぶり型、慢性型、急性型、リンパ腫型に分けられ、くすぶり型、慢性型は比較的緩徐な病態進行を辿る。一方、急性型およびリンパ腫型は、新規治療薬を含めた大量化学療法および骨髄幹細胞移植等が実施されているが、早期の再発、難治性のため、もっとも予後の悪い造血器腫瘍性疾患であり、早期治療介入を含めた新規治療法の開発が急務である。研究代表者は、上記を最も重要な課題と捉え、HTLV-1感染者のATL病態進行機序の解明とそれに基づく新規治療法開発を目指した研究を実施した。一部のATL細胞は特徴的な花弁様核を示すが、無症候性の段階でも末梢血中に極少数ながら花弁様核の細胞は存在し、それらは病態の進行と共に増加する。この特徴的な細胞に発現する表面マーカーがCD30であることを研究代表者らは突き止めた。CD30は一部のリンパ系腫瘍でのみ発現が認められる特異性の高い抗原で、健常人の末梢血細胞には発現しない。一方で、HTLV-1キャリアの末梢血においては、病態の進行と共にCD30を発現する感染細胞数が増加する。機能的意義を検討したところ、これらの細胞は末梢血中にも関わらず細胞周期活性を表すKi-67陽性を示し、くすぶり型、慢性型の時点で染色体異常を含む集団であることが明らかとなった。またCD30リガンドを介したCD30シグナルは、感染細胞の増殖、花弁様核形態へのトランスフォーム、細胞分裂異常を介した染色体異常を誘発させることも明らかにした。さらに抗がん剤が付加された抗CD30抗体 (ブレンツキシマブ・ベドチン)はCD30+HTLV-1感染細胞を末梢血から除去できることをin vitroで示した (Nakashima M et al., Clin Cancer Res, 2018)。これらの研究からCD30シグナルが病態の進展に直接関与しうることが示唆された。しかしながら、CD30シグナルにより惹起されるゲノム変異の質とその誘導機序は不明である。

2. 研究の目的

予備的検討により、ATLの病態進展と共に増加するCD30+ATL細胞は、同症例中のCD30-ATL細胞に比べてコピー数変異箇所 (Gain/Loss)および遺伝子変異数が多いことから、ゲノム不安定性が高い集団であるという結果を得ている。またATL細胞株に対してCD30リガンドで刺激したところ、細胞内ROS (Reactive Oxygen Species)が増加し、さらにROSを介したDNA二本鎖切断 (DNA Double-strand breaks: DSBs)の亢進が確認された。DSBsの亢進は、DSB修復機構のエラーを伴うことで、ゲノム異常のリスクを増大させる。従って、CD30シグナルは、「ROSの増加 DSBsの亢進 ゲノム異常の誘導」というゲノム変異の起点となるオンコシグナルであると考えるに至った。

本研究ではATLの悪性化に關与するゲノム変異のトリガーが、CD30シグナルであることを実験的に検証する。研究代表者らのこれまでの研究からATL患者から分取したCD30+ATL細胞はCD30リガンド発現細胞との共培養系で刺激することにより細胞増殖し続けることを発見しており、この実験系により患者由来ATL細胞を使用したゲノム変異の変遷をex vivoの系で評価することが可能である (Nakashima M et al., Clin Cancer Res, 2018)。ゲノム変異を惹起する起点シグナルとしてCD30シグナルの機能を評価し、病態を悪化させるバイオマーカーとして早期に排除すべき細胞であるというPOC (Proof Of Concept)の取得を目指す。

3. 研究の方法

・ATL患者検体による細胞内ROS-DSB経路の解析

ATL患者より分取したCD30+ATL細胞にCD30シグナルを伝達し細胞増殖させる方法は、以前に論文で報告した (Nakashima M et al., Clin Cancer Res., 2018)。ATL患者由来末梢血単核球 (PBMC)からCD30+ATL細胞 (CD4+CD25+CADM1+CD30+)をセルソーターにより分取し、CD30Lを発現誘導させたTIG-1 (ヒト正常胎児肺由来線維芽細胞)と共培養する。増殖させたCD30+ATL細胞に対してさらにCD30シグナルを伝達し、24時間後に細胞内ROSの増加をCellRox (Thermo fisher Scientific)を用いてフローサイトメトリーにより評価した。比較実験として、mock遺伝子を発現誘導させたTIG-1とCD30+ATL細胞を共培養し、同様の手順で処理した。さらにDSBsが誘導されているかCD30Lによる刺激24時間後にComet assay (Trevigen)により評価した。断片化したDNAの評価法は、Comet Score analysis software (TriTek Corp.)を用いて、Comet tail moment = (tail length × tail % DNA/100)により各細胞においてDSBsが生じた量を数値化した。

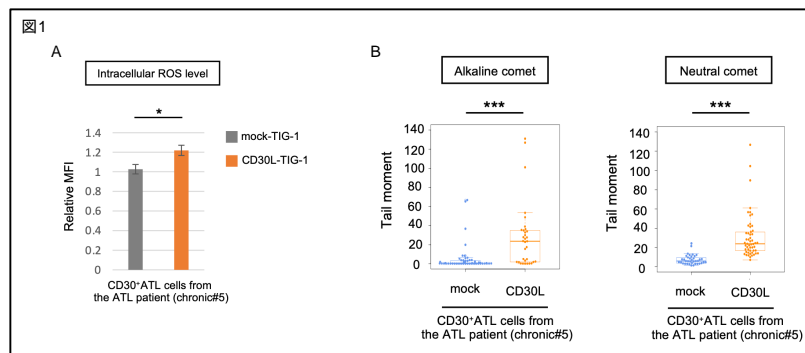
・染色体構造解析

ATL患者由来末梢血単核球 (PBMC)からCD30+ATL細胞 (CD4+CD25+CADM1+CD30+)をセルソーターにより分取し、CD30Lを発現誘導させたTIG-1 (ヒト正常胎児肺由来線維芽細胞)と共培養する。7日毎にフィーダー細胞であるCD30L発現TIG-1細胞を取り替え、慢性的にCD30シグナル

が誘導される状態を維持する。比較実験として、mock 遺伝子を発現誘導させた TIG-1 と CD30+ATL 細胞を共培養し、同様の手順で処理する。5 週後(35 日後)に CD30+ATL 細胞のみ回収し、ゲノム DNA を精製する。ATL 患者由来 PBMC からセルソーターにより同時に分取した同患者の正常ゲノム (CD25-CADM1-CD30-リンパ球)と比較することで、CD30 シグナルにより変化したゲノム領域および塩基配列を検出する。ATL 患者検体は、くすぶり型や慢性型など早期癌を対象にし、3 症例で比較した。全ゲノム領域を含む CGH 解析を実施しプラットフォームは SurePrint G3 Human CGH+SNP マイクロアレイを使用し、DNA マイクロアレイスキャナシステム(G2505C)および解析ソフトウェアである Agilent CytoGenomics(全て Agilent Technologies 社)により解析した。

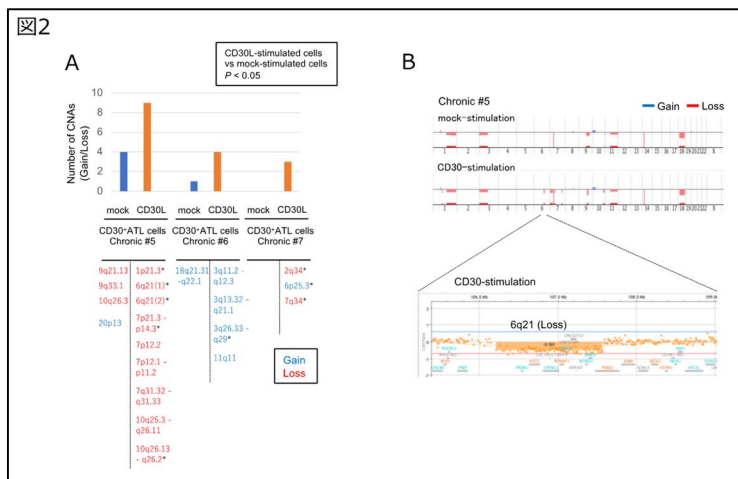
4. 研究成果

患者検体由来の CD30+ATL 細胞に対して CD30L 発現誘導 TIG-1 により CD30L で刺激すると、mock 刺激群と比較して統計的有意差を持って細胞内 ROS レベルの上昇が認められた(図 1A)。さらに DSBs が生じているか Comet assay により評価した。アルカリ泳動条件および中性泳動条件共に CD30L 刺激群で Comet tail moment の上昇が認められた(図 1B)。したがって、ATL 患者由来 CD30+ATL 細胞に CD30L 刺激を加えると、細胞内 ROS が増加し、DSBs が続いて惹起されることが示唆された。ATL 細胞株を用いた実験では、細胞内 ROS の阻害剤により DSBs の誘導が抑制されることから、患者検体においても同様の機序で DSBs が惹起されていると考えられる。



慢性型 ATL 患者 3 症例から CD30+ATL 細胞をそれぞれセルソーターにより分取し、CD30L 発現誘導 TIG-1 と mockTIG-1 と 35 日間共培養した。増幅した CD30 陽性 ATL 細胞のみをそれぞれ回収

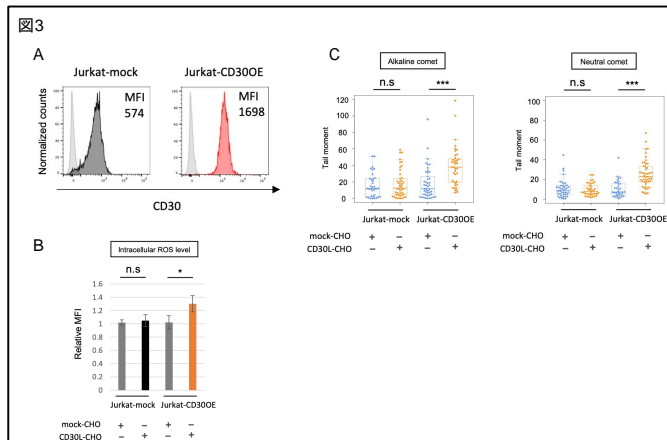
し、ゲノム構造を解析した。その結果、CD30L で刺激した集団は、非刺激群に比べて染色体構造変異数が増加することを示された(図 2A)。特に、CD30 シグナル刺激により生じた染色体構造変異は、実際の ATL で高頻度に確認される変異と同じ遺伝子座を含む傾向が認められた(図 1*マークが付いている遺伝子座)。代表例を図 2B に示す。6q21 の欠失が生じており、そこに含まれる PRDM1 は ATL において高頻度に欠失を示す遺伝子である。



さらに CD30 シグナルによる発現量と細胞内 ROS および DSBs の影響を評価した。CD30 弱陽性 T 細胞株である Jurkat 細胞に CD30L で刺激したところ、有意差を持った細胞内 ROS の上昇および Comet tail moment の上昇は認められなかった。一方、レンチウイルスベクターにより CD30 を過剰発現させた CD30 発現量を増加させた Jurkat 細胞においては、CD30L の刺激により細胞内 ROS の上昇および Comet tail moment の上昇が確認された(図 3 A, B, C)。

5. まとめ

本研究より、CD30 シグナルは発現量依存的に細胞内 ROS の増加を介して DSB を惹起し、染色体不安定性を誘導することが臨床検体を用いた CD30+ATL 細胞により示された。したがって、CD30 シグナルは増殖シグナルであると同時に染色体不安定性を惹起することで、増殖アドバンテージを持つ腫瘍細胞集団を生み出すことで、さらに悪性の高い腫瘍細胞を生じさせるオン



コシグナルである可能性が示唆される。このような細胞をコントロールすることが、早期治療に重要となると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamagishi Makoto, Kuze Yuta, Kobayashi Seiichiro, Nakashima Makoto, Morishima Satoko, Kawamata Toyotaka, Makiyama Junya, Suzuki Kako, Seki Masahide, Abe Kazumi, Imamura Kiyomi, Watanabe Eri, Tsuchiya Kazumi, Yasumatsu Isao, et al. (24人中1番目)	4. 巻 627
2. 論文標題 Mechanisms of action and resistance in histone methylation-targeted therapy	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 221 ~ 228
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-024-07103-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Itabashi Kazuo, Miyazawa Tokuo, Nakashima Makoto, Makiyama Junya, Uchimaru Kaoru	4. 巻 Online First
2. 論文標題 Transmission of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 From Mother to Child and Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Comprehensive Hematology and Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 Online First
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/B978-0-443-15717-2.00051-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Mariko, Hatsuse Hiromi, Nagao Kazuaki, Nakashima Makoto, Uchimaru Kaoru, Otsu Makoto, Miyazaki Koji, Horie Ryouichi	4. 巻 114
2. 論文標題 <scp>CD30</scp> induces <scp>Reed Sternberg</scp> cell like morphology and chromosomal instability in classic Hodgkin lymphoma cell lines	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3433 ~ 3445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15874	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakashima Makoto, Uchimaru Kaoru	4. 巻 24
2. 論文標題 CD30 Expression and Its Functions during the Disease Progression of Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8731 ~ 8731
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24108731	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakashima Makoto, Utsunomiya Atae, Watanabe Toshiki, Horie Ryouichi, Uchimaru Kaoru	4. 巻 114
2. 論文標題 The oncogenic driving force of <sc>CD30</sc> signaling induced chromosomal instability in adult T cell leukemia/lymphoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1556 ~ 1568
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15706	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wada Yusaku, Sato Tomoo, Hasegawa Hiroo, Matsudaira Takahiro, Nao Naganori, Coler-Reilly Ariella L. G., Tasaka Tomohiko, Yamauchi Shunsuke, Okagawa Tomohiro, Momose Haruka, etc.	4. 巻 5
2. 論文標題 RAISING is a high-performance method for identifying random transgene integration sites	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03467-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 鷹尾直誠, 永井香帆, 中島誠, 新谷奈津美, 久世裕太, 鈴木稜, 内丸薫, 山岸誠, 山野嘉久.
2. 発表標題 オミックス解析によるHTLV-1関連脊髄症に対する新規原因候補遺伝子の探索とMEK阻害剤の有用性に関する非臨床データ
3. 学会等名 第27回日本神経感染症学会総会・学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤賢文, 菅田謙治, ベンジー タン ジェック ヤン, 中島誠, 佐藤知雄, 山野嘉久.
2. 発表標題 HAM患者脳脊髄液のシングルセル解析
3. 学会等名 第27回日本神経感染症学会総会・学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 新谷奈津美, 山岸誠, 清原和裕, 浅原尚美, 中島誠, 荒谷聡子, 八木下尚子, 内丸薫, 佐藤知雄, 山野嘉久.
2. 発表標題 HTLV-1関連脊髄症におけるウイルス感染細胞に起因した神経障害機構の解析
3. 学会等名 第27回日本神経感染症学会総会・学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中島誠, 永井香帆, 鷹尾直誠, 新谷奈津美, 久世裕太, 鈴木穰, 内丸薫, 山岸誠, 山野嘉久.
2. 発表標題 統合オミックス解析による HTLV-1 関連脊髄症の新規炎症誘導因子の探索
3. 学会等名 第9回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鷹尾直誠, 永井香帆, 中島誠, 新谷奈津美, 久世裕太, 鈴木穰, 内丸薫, 山岸誠, 山野嘉久.
2. 発表標題 HTLV-1 関連脊髄症に対する MEK 阻害剤の有用性に関する非臨床データ
3. 学会等名 第9回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 新谷奈津美, 山岸誠, 清原和裕, 浅原尚美, 中島誠, 荒谷聡子, 八木下尚子, 内丸薫, 佐藤知雄, 山野嘉久.
2. 発表標題 HTLV-1感染細胞に起因したHAMの神経障害機構
3. 学会等名 第9回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菅田謙治, ジェックヤン タン, 高鳥光徳, ベラル ホサイン, サムイル ラジブ, オムニア レダ, 徳永雅仁, 野村隼也, 増田曜章, 中島誠, 佐藤知雄, 植田光晴, 宇都宮 與, 山野 嘉久, 佐藤賢文.
2. 発表標題 HLA-A24 拘束性の異なる Tax エピトープを認識する特異的 TCR の解析
3. 学会等名 第9回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Makoto Nakashima, Atae Utsunomiya, Toshiki Watanabe, Ryouichi Horie, Kaoru Uchimaru
2. 発表標題 The oncogenic driving force of CD30 signaling-induced chromosomal instability in disease progression of adult T-cell leukemia/lymphoma
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池辺 詠美, 松岡 佐保子, 中島 誠, 村岡 弘美, 吉村 千穂子, 山岸 誠, 内丸 薫, 伊波 英克, 浜口 功
2. 発表標題 NEDD8 activating enzyme is a novel therapeutic target for HTLV-1-related diseases
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中島 誠, 川俣 豊隆, 南谷 泰仁, 宇都宮 與, 渡邊 俊樹, 内丸 薫
2. 発表標題 Membrane CD30とSoluble CD30の二重解析によるCD30発現評価法の検討
3. 学会等名 第8回日本HTLV-1学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 瀬賀 亜里沙、中島 誠、山岸 誠、水池 潤、宇都宮 與、渡邊 俊樹、内丸 薫
2. 発表標題 ATL における CD30 発現機構の解析
3. 学会等名 第8回日本HTLV-1学会学術総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------