

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：37604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461426

研究課題名(和文)エクソソーム分泌タンパク質群(TSLC1/CAV1)を用いたATL病態解析

研究課題名(英文)The pathological analysis of ATL with a focus on exosomal secreting protein superfamily (CADM1/CAV1)

研究代表者

西片 一郎(Nishikata, Ichiro)

九州保健福祉大学・その他部局等・教授

研究者番号：50253844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：CAV1遺伝子は、成人T細胞白血病(ATL)に関する一連の検討から、網羅的遺伝子発現解析上、CADM1(TSLC1)と共に、特異的な高発現を示し、免疫学的手法においても、細胞ばかりでなく、これに由来する分泌粒子・Exosomeにも存在することが明らかとなった。最近、ATLと同様、高齢者に頻発する前立腺癌で、血中へのCAV1分泌が指摘されていたが、ATLで得た結果と同様、Exosome形態で存在することを示す結果を得た。一方、CADM1特異的転写因子・NF-kBをlysosome分解に誘導するp47がATL特異的に発現抑制された結果、CADM1高発現に繋がることを示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：CAV1 was proved to overexpress like CADM1 (also known as TSLC1) in comprehensive gene expression analysis from a series of studies on adult T cell leukemia (ATL). CAV1 was found to exist not only in the cell but also in the secreted particle "Exosome" from the results of immunological analysis (e.g. ELISA or WB). Recently, it was pointed out that CAV1 is secreted into the patient blood of prostate cancer frequently occurring in elderly men. Surprisingly it was revealed that CAV1 exists in Exosome particle like our knowledge obtained in the research of ATL. On the other hand, CADM1 was suggested that is possible to overexpress for the reason that not only NF-kB was a specific transcription activator of CADM1 but also p47 that leads NF-kB to protein degradation by lysosome was constitutively down-regulated in ATL cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：Exosome ATL CADM1 HTLV-1 Tax NF-kB p47 CAV1 prostate cancer

## 1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞白血病 (ATL) は HTLV-1 母子感染により、感染後数十年を経て発症する極めて予後が悪い白血病である。HTLV-1 キャリアは、南九州に多く存在し、日本国内では近年の統計で 108 万人の存在が確認され、20 年前の約 120 万人との報告と比べても横ばいであった。HTLV-1 キャリアからの ATL 発症の過程を明らかにすることを旨とし、ATL の新規 Marker を探索するため、網羅的遺伝子発現解析を行い、ATL 特異的に高発現を示す表面抗原として、CADM1 (Cell adhesion molecule 1) 及び CAV1 (Caveolin-1) を同定した (Sasaki H et al, 2005)。(1) CADM1 は TSLC1 (Tumor suppressor lung cancer 1) 及び IgSF4 (Immunoglobulin superfamily member4) と呼ばれ、1 回膜貫通型免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子であり、上皮細胞間接着に関与することが知られている。ATL では臓器及び皮膚浸潤、腫瘍形成といった特有の病態に積極的に関与することにより、腫瘍化促進に働くことを同定している (Sasaki H et al, 2005; Dewan MZ et al, 2003)。可溶性 CADM1 の存在も知られているが、可溶性 CADM1 そのものの機能や同定法は確立していない。CADM1 について、これまでの研究において、次のような点を明らかにしている。① Phage display 法等を用いてヒト CADM1 に対する抗体を多種類作製し、可溶性 CADM1 抗体の同定、リンパ腫型 ATL の病理組織診断法の確立、FACS (フローサイト) 解析による ATL 細胞の同定など、ATL 臨床診断の確立を図った (Nakahata et al, 2012)。② 可溶性 CADM1 は Western blotting (WB) 法により急性型 ATL 患者血清中に高率に同定可能であり、末梢血中の可溶性 IL2R の発現レベル及び末梢血中 ATL 細胞数と相関していた (Nakahata et al, 2012)。③ HTLV-1 関連遺伝子 Tax の導入により不死化したリンパ球細胞株において CADM1 発現が見られるため、HTLV-1 感染により直接又は間接的に CADM1 発現が誘導される可能性が高い (未発表)。④ ATL 細胞株を用いて CADM1 高発現に関わるプロモーター領域を同定しており、その結合配列から一部 NF-κB の関与が示唆される結果を得た (未発表)。

(2) CAV1 は細胞膜での物質導入に関わる Caveolae を構築する膜蛋白質の一つで、各種癌細胞等での高発現及び細胞外組織外への分泌が報告されている (Hatanaka M et al, 1998)。細胞間接触により CAV1 高発現細胞が自身や周辺の細胞増殖刺激をすること、また分泌型 CAV1 の存在が明らかとなり、血流を介して離れた組織の増殖を刺激するといった報告もある (Sawada S et al, 2005)。しかしながら、腫瘍化の進展における CAV1 の役割は現在も殆ど明らかになっていない。

CAV1 では、これまでの研究において、次のような点を明らかにしている。

① CAV1 は ATL において mRNA 高発現を同定し、

抗 CAV1 monoclonal 抗体を作製し、WB 法により急性型 ATL 細胞において 23 及び 21kDa の CAV1 タンパク質の発現を確認した。② 急性型 ATL 患者血清中において、23kDa 分泌型 CAV1 タンパク質を同定した。更に、分泌型 CAV1 は Ser 80 のリン酸化が知られているため、CAV1-Ser 80 リン酸化特異抗体を作製した。その結果、血清中の CAV1 は高度にリン酸化されていることを確認した (未発表)。③ Exosome は生体内および培養液中の殆どの細胞から分泌される 40-100nm の膜小胞のことで、血液、尿、羊水、悪性腹水等の体液や組織培養液中に存在しており、超遠心法による沈殿回収が可能であることが知られている。ATL 細胞は Exosome を多量に分泌しており、診断系構築の目的で Exosome 沈殿回収試薬又は超遠心分離法にて Exosome 分画を単離し、WB 法で確認したところ、ATL 患者 Exosome 分画中には新規に CAV1 を同定した (未発表)。④ ATL に対して網羅的メチル化アレイ解析を行い、CD4 陽性リンパ球と比べて ATL 特異的に DNA 脱メチル化が充進した CpG 領域を同定したところ、CAV1 がその ATL 低メチル化遺伝子群の一つとして同定された。したがって、CAV1 が ATL での高発現はメチル化異常に依存している可能性がある (未発表)。

以上の結果から、ATL 白血病細胞より細胞外に Exosome として分泌される、CAV1 の存在が示唆された。近年一部の固形癌において、Exosome 分泌による癌の進展機構が明らかになりつつあり、血中の可溶性 (分泌型) CADM1 や CAV1 を含む ATL 特異的 Exosome の構成タンパク質群及び内在 miRNA を網羅的に同定できれば、ATL の新たな病態解明に繋がる。更に、CADM1 及び CAV1 発現は HTLV-1 感染やメチル化異常に依存しており、その遺伝子発現様式の同定やメチル化異常の分子機構解明は、HTLV-1 感染から ATL 発症への発症転換の糸口をつかむ可能性を有している。これまで語られることがなかった、Exosome と ATL の病態との関係を明らかにすることで、将来的に ATL での Exosome 分泌を標的とした新しい診断治療法の開発、なかでも、ATL 発症予測に繋がる重要な研究課題である。

## 2. 研究の目的

CADM1 や CAV1 の分泌が ATL への進展にどのように関わるのか。少なくとも、ATL 患者末梢血中に ATL 細胞から Exosome が多量に分泌されていることを強く示唆する我々の知見は、新たな Biomarker 資源とされる Exosome の解明と ATL の病態との関係を明らかにできる重要な鍵となっている。ATL 特異的 Exosome の構造解析、並びに病態解析を中心に ATL 特異的遺伝子発現様式を明らかにすることで、将来的に新しい ATL 診断法の確立、並びに病態に基づく新規治療法開発に繋げる。

### 3. 研究の方法

CADM1 では、主に2項目の解析を行った。(1)CADM1 発現制御の解析: ①Luciferase (Luc)-reporter assay: ATL 細胞において、CADM1 発現に關与する転写活性化領域を特定するため、転写開始点上流域3kb付近までの鎖長の異なる Reporter を作製し、ATL 細胞株に導入後、Luc 活性を測定、結果に基づき比較評価した。②Electrophoretic mobility shift assay (EMSA): 転写開始点上流-680 から-729 塩基の領域に、複数の  $^{32}\text{P}$  標識 probe (hot) を設計、ATL 細胞株の核抽出物と反応後、Native PAGE を行い、バンドパターンを解析した。一部は種々の未標識 probe を用いた結合阻害試験も行った。③ChIP-PCR assay: ATL 細胞株の核抽出物を転写活性化因子候補 NF- $\kappa$ B 特異抗体により免疫沈降させ、得られた産物に CADM1 発現に關与する転写活性化領域 (CADM1 転写開始点上流-680 から-729 塩基) が含有されているか、PCR 増幅法により検討した。更に HTLV-1 Tax 抗体でも、同様に確認した。④HTLV-1 Tax 発現誘導、並びに発現抑制試験:  $\text{Zn}^{2+}$  処理した Tax 発現誘導株 JAX9、並びに Tax 発現抑制 plasmid を導入した CADM1 高発現細胞株 MT2 について、Tax 及び CADM1 抗体の他、一部、NF- $\kappa$ B 情報伝達系上の因子に対する抗体を用いた WB 法により発現解析を行った。⑤情報伝達系に係る因子に対する WB 解析: 最近、NF- $\kappa$ B 活性を負に制御する因子 p47 (NSF1C) (Sibata Y et al, 2012) のタンパク質レベルでの低下が ATL 特異的と報告されたことから、改めて ATL 細胞株群に対して、Tax 非依存及び依存的な古典的 NF- $\kappa$ B 情報伝達系に關与する因子群の発現レベルを WB 法で検討した。(2)CADM1 過剰発現に係る情報伝達機構の解析: p47 に着目した検討を行った。①脱メチル化解析: Tax 無及び低発現 ATL 細胞での CADM1 高発現では、p47 遺伝子で認めた promoter 領域の完全メチル化を主な要因とする、p47 の発現低下が寄与すること、p47 強制発現試験: ②p47 強制発現試験: 供された p47 発現 plasmid (Sibata Y et al, 2012) を CADM1 高発現細胞株に導入、WB 解析により発現量の変化を調べた。③JAX9 細胞を用いた Tax 誘導試験:  $\text{Zn}^{2+}$  処理又は未処理の Tax 発現誘導株 JAX9 について、RT-PCR 法及び NF- $\kappa$ B 応答配列搭載 Reporter を用いた Luc reporter assay を行い、CADM1 及び p47 遺伝子発現レベルの変化を調べた。④Proteasome 阻害剤添加試験: ATL 細胞における p47 発現抑制が Proteasome 分解系への誘導によるか、Tax 高発現細胞株に Proteasome 阻害剤 MG132 を添加、p47 タンパク質レベルの変化を調べた。⑤免疫沈降法による相互作用解析: MG132 の有無を踏まえ、Flag-p47 及び Myc-Tax を強制発現させた HEK293T 細胞で、分子間相互作用の有無を調べるため、Tag 抗体を用いた免疫沈降法で解析した。⑥p47-Promoter 領域におけるメチル化 CpG 島の解析 [A]: DNA メチル化阻害剤

5-Aza-dC (AZA) または HDAC 阻害剤 TSA で処理した ATL 細胞株から Zymo Research 社製 EZ DNA methylation-Lighting Kit で回収した産物について、RT-PCR 法にて ATL 細胞における p47 遺伝子の発現レベルの変化を観察した。⑦p47-promoter 領域におけるメチル化 CpG 島の解析 [B]: BS (Bisulfite Conversion)-SEQ 法を行った。即ち、ATL 細胞株から Zymo Research 社製 EZ DNA methylation-Lighting Kit で回収した産物について、p47 の発現抑制を表す Promoter 領域のメチル化状態をみるため、DNA-Sequencing 法により、Bisulfite 処理前後での p47-promoter 領域の塩基配列を調べた。⑧Real Time RT-PCR 法による CADM1 遺伝子発現解析: ATL における p47 発現抑制との関係をみるため、ATL 患者細胞群の CADM1 発現レベルを調べた。

CAV1 では、主に4項目の解析を行った。(1) Exosome の単離精製: 検討に供した細胞株は、Exosome 回収時のみ、SBI 社製ウシ Exosome 除去済 FBS を含む RPMI1640-F12 混合培養液 [50:50] を用いたこと以外、常法通り培養した。低速心 [1,500xg, 10min, 4°C] にて培養上清を回収、膜 [ $\phi$  0.22 $\mu\text{m}$ ] 濾過を行ったのち、超速心 [100,000xg, 70min, 4°C] にて回収、PBS(-) で複数回洗浄処理した。最終産物は、供した培養上清液の 1/1000 量の PBS(-) に再浮遊した後、BCA 法を用いた蛋白質定量を行った結果、何れも 0.5 mg/mL 前後であった。(2) Exosome の WB 解析: 特異抗体を用いた WB 法解析を行った。即ち、4種類の特異抗体 (Exosome 分子 Marker と反応する抗 CD63 [Abcam 社製] 及び抗 CD9 [CST 社製] の他、抗 CAV1 [CST 社製]、抗 PSMA [CST 社製]、 $\beta$ -actin 抗体 [CST 社製]) を用い、細胞成分 [cell lysate] に關する WB 法解析の場合と同様、 $\beta$ -actin 抗体の反応度で測定に供する試料濃度を標準化した後、比較した。尚、CAV1 解析の指標として、一部、前立腺癌細胞株 [PNT2, LNCaP, PC3] を用いた。(3) Exosome の粒径・粒度分布解析: Nano 粒子解析 system, NanoSight を用いた粒径・粒度分布測定を行った。即ち、PBS(-) を用いて 10,000 倍希釈した超速心回収標品を NanoSightNS300 に供与、Nanoparticle Tracking Analysis [NTA] 可視化解析を5回行い、粒径の算出と粒度分布を決定した (入江ら・日本カンタス・デザイン・委託)。尚、CAV1 解析の指標として、一部、前立腺癌細胞株 [PNT2, LNCaP, PC3] を用いた。(4) Exosome の免疫電顕観察: CD63 抗体 [clone 8A12] を用いた TEM-免疫電顕観察は Lässer C.らの方法 (Lässer C. et al, 2012) に従った。即ち、供する超速心回収標品の濃度を分散-ネガティブ染色観察にて、50 倍希釈に決定、更に一次抗体・CosmoBio 社製 CD63 抗体を 500 倍希釈、二次抗体・BBI 社製金コロイド標識 Protein A を 50 倍希釈で用いた免疫染色後、TEM で観察した (川本ら・電子顕微鏡技術研

究所・委託) . 尚, CAV1 解析の指標として, 一部, 前立腺癌細胞株 [PNT2, LNCaP, PC3] を用いた.

#### 4. 研究成果

##### (1) CADM1 発現制御の解析

① ATLL 細胞において, CADM1 発現に関与する転写活性化領域を特定する為, 転写開始点上流域 3kb 付近までの鎖長の異なるレポーターを作製した. ATL 細胞株 ED に導入後, Luc 活性を測定した結果, ATL 細胞では転写開始点上流-680 から-729 塩基の領域が活性化に必須であることが判明した (図 1. a).

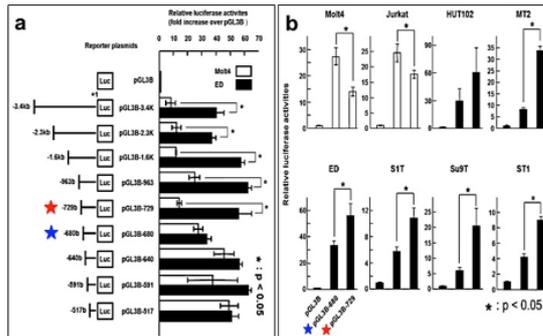


図1 ルシフェラーゼ レポーター アッセイによる CADM1 遺伝子転写活性化領域の同定  
a: 用いたレポーターとこれに対応する ED, ATLL 細胞株での Luc 活性. Motif4 は対照. 非 ATLL 細胞株.  
b: HTLV-1 感染および非感染白血病細胞で見た特定領域での Luc 活性の比較. Motif4 と Jurkat 以外, すべて ATLL.

更に, 6 種の ATLL 関連細胞株 (HUT102, MT2, ED, S1T, Su9T, S1T1) において, 転写開始点上流-680 から-720 塩基の領域が CADM1 の発現活性化に重要であることが明らかとなった. 従って, ATLL 細胞全般で共通した転写活性化機構の関与が強く示唆された (図 1. b).

② 解析ソフト「TF Serach」を用い, CADM1 発現活性化に重要な領域 [転写開始点上流-680 から-720 塩基の領域] について, 転写因子 Motif 配列が存在するかを調べた結果, この領域に GATA 結合部位を含む複数の転写因子結合配列が存在することが判明した. そこで, 領域に対応する 3 種の Probe (a, b, c) を作製, ATLL 細胞株 (KK1, KOB, S1T, Su9T, SO4, ED) を用いて, EMSA で解析した結果, 対照細胞株 MolT4 とは異なり, ATLL 細胞株では, 何れにおいても Probe (a, b) にシフトしたバンドを認めた. 更に EMSA を用いた結合・阻害試験により, CADM1 転写開始点上流-680 から-720 塩基の領域には, 2 つのコア配列 (A, B) が存在しており, 少なくとも, コア配列 (A) には, NF- $\kappa$ B が結合することが示唆された. また 2 つのコア配列 (A, B) に変異を導入した Probe を新たに作製し, HTLV-1 感染細胞株 HUT102 及び ATLL 細胞株 KK1 について, EMSA を用いた結合試験を行った結果, コア配列 (B) に変異を導入しても, シフトしたバンドは認められたが, コア配列 (A) に変異を導入した場合, バンドは消失した. 一方, HEK293T 細胞株に古典的 NF- $\kappa$ B 伝達系に属する, p65 及び p50 を強制発現させ, EMSA を行った結果, p50 単独及び p65/p50 併用の場合, シフトしたバンドが認められ, CADM1 転写開始点上流-680 から-720 塩基の領域には

NF- $\kappa$ B が結合することが示唆された.

③ ATLL 細胞 (MT2, MT4, SLB1, KOB, HUT102, ED) において, CADM1 発現に関与する転写活性化因子を特定する為, NF- $\kappa$ B 情報伝達系に関係深い, 2 つのコア配列 (A, B) を含む, 転写開始点上流-680 から-720 塩基の領域について, NF- $\kappa$ B 関連因子 (p65, p50, p68, p52) 抗体又は Tax 抗体を用いた ChIP-PCR Assay (図 2. a) において, HTLV-1 感染細胞株では古典的 (p65/p50) 及び非古典的 (p68/p52) NF- $\kappa$ B 情報伝達系に, ATLL 細胞株では, 主に古典的 NF- $\kappa$ B 情報伝達系による転写活性化が見られた (図 2. b).

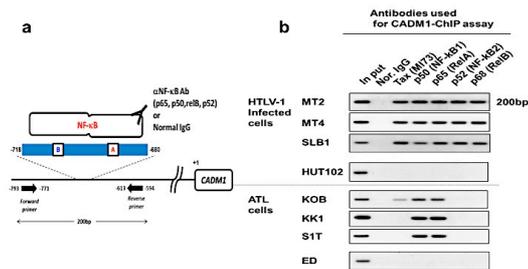


図2 NF- $\kappa$ B および Tax 抗体を用いた ChIP-PCR アッセイによる CADM1 遺伝子転写活性化応答配列の分析  
a: NF- $\kappa$ B 抗体を用いた ChIP-PCR 法による CADM1 転写活性化応答配列の解析. 免疫沈降後, 回収産物にコア配列が含まれるか, PCR 増幅して確認した. b: CADM1 発現細胞株 (MT2, MT4, SLB1, KOB, KK1, S1T) での ChIP-PCR の結果. 同時に, Tax 抗体での結果も示した. HUT102 と ED は対照.

特に, CADM1 を発現している Tax 発現細胞株 (MT2, MT4, SLB1, KOB) では, NF- $\kappa$ B 転写活性化複合体に Tax が含まれることが示唆された (図 2. b). 尚, 検討に供した ATLL 細胞のうち, HUT102 及び ED は対照として用いた.

④ ATLL 細胞における CADM1 発現に HTLV-1 Tax が関与するかを特定する為, Zn<sup>2+</sup> 処理による Tax 発現誘導を行った JAX9 細胞株を用いて CADM1 発現を検討した結果, Tax 発現依存的に CADM1 の発現亢進が見られた. 逆に CADM1 高発現細胞株・MT2 において shTax 発現抑制 plasmid を導入することにより, Tax 発現を低下させたところ, CADM1 発現低下が見られました. 尚, Zn<sup>2+</sup> 処理による発現誘導による Tax タンパク質の出現は WB 解析により確認された. 更に, Tax 発現誘導の結果, NF- $\kappa$ B 応答配列搭載 Reporter への応答が得られ, Tax 発現に伴う NF- $\kappa$ B 情報伝達系の活性化が認められた.

⑤ 細胞分裂後に起こる Golgi 装置の再構築で必須の因子といわれた p47 が, 最近, NF- $\kappa$ B の情報伝達制御, 特に, ユビキチン (Ub) 化 NEMO の Lysosome 分解に関与する新たな因子として再発見された. 更に, GEO (Gene Expression Omnibus) のデータ解析から, 急性及び慢性の ATLL で, 著明な発現低下を示すことも報告された (Shibata y et al, 2012). CADM1 発現に関与する転写活性化因子特定を目指して, NF- $\kappa$ B 情報伝達系に沿い, 関連する代表的な因子について, メッセージとタンパク質を見た. 即ち, A20 及び CYLD は, HTLV-1 Tax 発現依存性にその転写とタンパク質量が変動していた. しかしながら, p47 は mRNA レベルでは ATLL 細胞のみ (図 3. a), タンパク質レベルでは HTLV-1 感染細胞を含む ATLL

細胞株全例において、低下していた(図 3. b)。

その結果、検討に供した ATL 細胞全てにおいて、NEMO は、Lysosome 分解を免れ、高レベルで存在していることが判明した。更に、その下流にあたる、IKBA のリン酸化とタンパク質分解が促進していた(図 3. b)。

⑥ p47 の mRNA レベルでの検討から、ATL 細胞でのみ、p47 が発現低下していた理由を特定する為、HDAC 阻害剤・TSA 又は DNA メチル化阻害剤・AZA で処理した ATLL 細胞で p47 の発現回復が起こるかみた。その結果、ATLL 細胞株

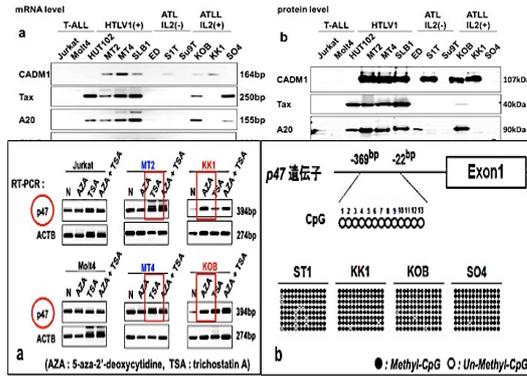


図4 ATLL細胞株におけるp47のプロモーター領域のメチル化  
a: ATLL細胞株 (MT2, MT4, KK1, KOB) でのDNAメチル化阻害剤AZA-dC処理またはHDAC阻害剤TSAによるp47発現レベルの回復。Molt4およびJurtkatは対照としたATLL細胞。b: BS-SEQ法を用いたATLL細胞株におけるp47のプロモーター領域内CpG7アイランドのメチル化状態。P47プロモーター上のCpGの位置とメチル化の有無を示した。

株、KK1 および KOB では、AZA で処理した場合、p47 の発現回復が認められ、p47-Promoter 領域がメチル化されていることが示唆された(図 4. a)。

改めて、p47 の promoter 領域に存在する被メチル化部位 13 個からなる CpG-inlands について、メチル化の状態を BS-SEQ 法で解析した結果、検討に供した ATLL 細胞株全て (ST1, KK1, KOB, SO4) で、著しく高メチル化状態にあることが示唆された(図 4. b)。

⑦ p47 のタンパク質レベルの検討から、HTLV-1 感染細胞を含む ATL 細胞株全例において、低下していた理由を特定する為、JPX9 細胞で Tax を誘導した。

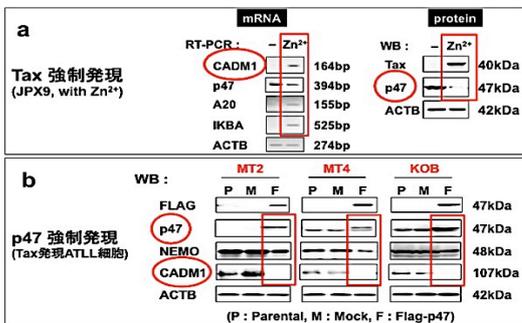


図5 CADM1発現に対するTaxおよびp47強制発現の効果  
a: JPX9細胞をZn<sup>2+</sup>処理でTax発現誘導後、CADM1, p47, A20, IKBAのmRNAレベルを、またTax, p47については、タンパク質レベルを見た。b: Tax発現細胞株 (MT2, MT4, KOB) でp47を強制発現したのち、p47, NEMO, CADM1のタンパク質レベルを見た。

その結果、mRNA レベルは p47 のみが低下、他は全て発現上昇を示し、Tax タンパク質の出現と共に p47 タンパク質は消失した(図 5. a)。一方、CADM1 及び Tax が高発現する

ATLL 細胞株で、Flag-p47 を強制発現したところ、供した ATLL 細胞株全てで、下流の NEMO のタンパク質レベルが低下、CADM1 が消失した(図 5. b)。Tax の存在が p47 タンパク質の安定性に影響していることが示唆された。

⑧ HTLV-1 Tax には、ポリユビキチン (polyUb) 化した Rb タンパク質を Proteasome 分解へ誘導することが報告されている (Kehn K et al, 2005)。そこで、ATLL 細胞における p47 のタンパク質レベルの低さに関係があるかどうか Proteasome 阻害剤・MG132 添加に伴う p47 タンパク質レベルを見た。HEK293T 細胞にて、Flag-p47 及び Myc-Tax を強制発現させ、相互に、Tag 抗体で免疫沈降、並びに検出確認を行った結果、高分子領域に検出された PolyUb-p47 は Tax の新規の結合タンパク質であることが示唆された。

以上の知見から、ATL 細胞における CADM1 高発現に必須な NF-κB 活性化には、新規制御因子 p47 の発現低下が関係することが示唆され、新たな治療ターゲットとなることが期待される。

## (2) CAV1 存在様式の解析

① 常法に従い、Exosome に関する検討に供する細胞株より得られた培養上清を超遠心回収法にて得られた標品を NanoSight 粒径・粒度分布計測装置を用いて解析したところ、対照とした前立腺癌関連細胞株 (PNT2, LNCaP, PC3) 由来 Exosome は、概ね 100nm 程度の粒径(それぞれ 85.1, 85.3, 93.9nm)であった。一方、ATLL 細胞株・HUT102 由来 Exosome の粒径は、108.8nm とやや大型ではあったが、概ね、一般的に知られている Exosome の大きさと同等と判断された(表 1)。

表1 粒径・粒度分布計測装置・NanoSight での測定結果に基づいた前立腺がん関連細胞由来Exosome間での粒径比較

Exosome	Mean (nm)	Mode (nm)	Concentration (particles/mL)
PNT2由来	130.9±1.6	85.1±1.1	11.2±0.32x10 <sup>12</sup>
LNCaP由来	108.9±1.2	85.2±4.1	1.03±0.064x10 <sup>12</sup>
PC3由来	116.2±1.7	93.9±4.0	1.62±0.124x10 <sup>12</sup>
HUT102由来	141.7±1.2	108.8±4.6	0.57±0.012x10 <sup>12</sup>

## ② CD63 抗体を用いた免疫電顕観察を行った。

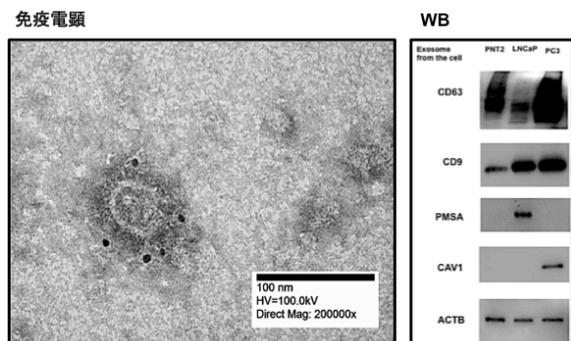


図5 対照としたPC3前立腺癌細胞株培養上清から回収した超遠心分画に関するCD63抗体を用いた免疫電顕観察。合わせて、WB法も実施した。

CAV1 含有 Exosome の代表例であり、一連の検討の対照例として、PC3 由来 Exosome に対して、Exosome Marker CD63 に対する抗体を用いた免疫電顕観察を行った。直径 100nm 程度の環状物の周囲に CD63 に相当するドットを複数個確認しうる撮影画像が数多く得られた(図 5)。

③8 種類の ATLL 細胞株及びその培養上清由来 Exosome について、CD63 及び CAV1 抗体を用いた WB 法を行った結果、細胞本体、Exosome とも、S04 を除き、検討に供した全ての細胞株で CAV1 が検出された(図 5. a, 図 5. b)。ただし、CAV1 産生量が多い MT2 であったが、Exosome 含量は極めて低かった。Exosome 分泌機構の違いが示唆され、詳細な機構解明が望まれる。

一方、血中 CAV1 を検出できるか、健常者 4 例、並びに ATLL 患者血清 3 例について、WB 法解析を行ったところ、一部、背景で記した通り、複数の自家製抗体で、ATLL 検体特異的に CAV1 を検出することができた(図 5. c)。尚、非特異反応が出にくいクローン B21-4 は、有用な抗体であった。

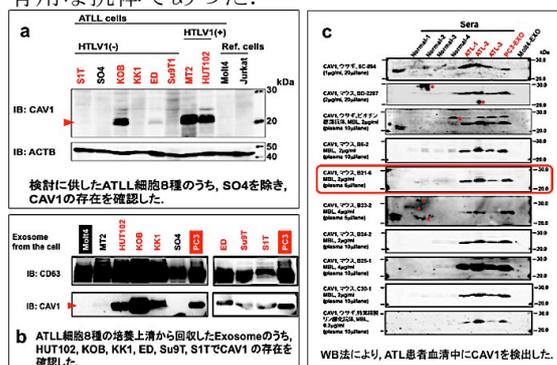


図5 対照としたPC3前立腺癌細胞株培養上清から回収した超遠心分画に関するCD63抗体を用いた免疫電顕観察。合わせて、WB法も実施した。

④CAV1 特異的 monoclonal 抗体〔クローン B21-4〕を用いて、群別 ATLL 患者血清(又は血漿)検体群(急性型 15 例、慢性型 11 例、くすぶり型 12 例、リンパ種型 6 例、HTLV-1 キヤリア 4 例、健常者 21 例、前立腺癌 6 例)での WB 法による CAV1 検出を試みた。

その結果を図 6 に示した。既に、血中 CAV1 の存在が知られる前立腺癌患者検体と同様

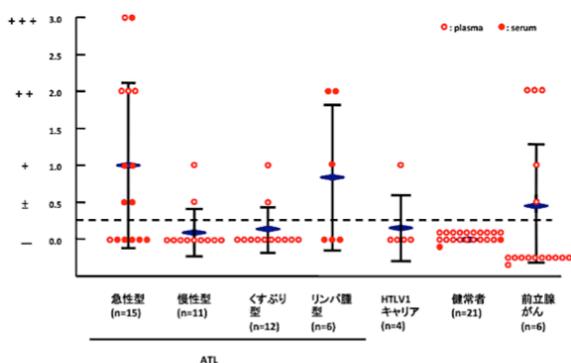


図6 カテゴリー別ATLL患者検体で見た血中CAV1の存在: CAV1特異抗体・B21-6 mAb を用いたWB解析

に、急性型及びリンパ腫型 ATLL 検体群に高値例が多く認められた。若干、検出感度の改善が必要と思われるが、CAV1 検出は有用な検査項目となりうる事が示唆された。

ATLL の発症前検査、もしくは治療後モニタリング法として、血中 CADM1 検出系ばかりでなく、血中 CAV1 検出系にも有用性が見込まれることが示唆された。CAV1 測定系を実用化するためには、WB 法より汎用性の高い手法への転用が望まれる。今後、ELISA 法、もしくは新たな測定技術と期待される、Luminescent oxygen channeling immunoassay (LOCI)法の実用形態、「AlphaLISA」(Yoshioka Y et al, 2014)への応用展開を検討する予定である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Sugie S., Mukai S., Tsukino H., Toda Y., Yamaguchi T., Nishikata I., Kuroda Y., Morishita K., KAMOTO, T. Increased plasma caveolin-1 levels are associated with progression of prostate cancer among Japanese men. *Anticancer Res.* 33(5): 1893-1898, 2013. 査読有 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23645736>.

[学会発表] (計 5 件)

①西片 一朗: ATL 細胞における CADM1 高発現は HTLV-1 Tax を含む NF- $\kappa$ B 活性化に依存する。第 6 回 HTLV1 研究会, 2013. 8. 22, 東京都港区。

②西片 一朗: ATL 細胞における CADM1 高発現に必須な NF- $\kappa$ B 活性化には新規制御因子 p47 の発現低下が関係する。第 1 回日本 HTLV-1 学会, 2014. 8. 24, 東京都港区。

③森下 和広: ATL 細胞における CADM1 高発現は p47 発現抑制に働く HTLV1 Tax とプロモーターメチル化に依存する。第 74 回日本癌学会, 2015. 10. 10, 愛知県名古屋市。

④西片 一朗: カベオリン 1 含有エクソソームは前立腺がんの新規腫瘍マーカー候補である。第 63 回日本臨床検査医学会, 2016. 9. 4, 兵庫県神戸市。

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

西片 一朗 (NISHIKATA, Ichiro)  
九州保健福祉大学・生命医科学部  
生命医科学科・教授  
研究者番号: 5 0 2 5 3 8 4 4

(3) 連携研究者

森下 和広 (MORISHITA, Kazuhiro)  
宮崎大学・医学部腫瘍生化学分野・教授  
研究者番号: 8 0 2 6 0 3 2 1