

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830126

研究課題名(和文)細胞膜プロテオーム解析を用いた成人T細胞性白血病新規治療標的分子の探索

研究課題名(英文) Quantitative membrane-proteome analysis to discover novel therapeutic targets for adult T-cell leukemia (ATL)

研究代表者

石原 誠人 (Ishihara, Makoto)

東京大学・新領域創成科学研究科・客員共同研究員

研究者番号：60581189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトT細胞性白血病ウイルス1型(HTLV-1)は末梢血CD4陽性T細胞に感染するレトロウイルスで、HTLV-1感染は予後不良な成人T細胞性白血病を誘発する。本課題ではATLに対する新規治療標的の探索を目的として質量分析を用いたCD4陽性T細胞に対する定量膜プロテオーム解析を行った。健康者14例、無症候キャリア21例、ATL13例、HTLV-1関連脊髄症21例の末梢血より単離したCD4陽性T細胞に対する定量膜プロテオーム解析の結果、growth-regulatory adhesion molecule (GRAM)を治療標的分子として同定するに至った。

研究成果の概要(英文)：Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) is a retrovirus which infects CD4+ T-cells and induce Adult T-cell leukemia (ATL). To develop novel targeted therapies for ATL, we conducted mass spectrometry-based membrane proteome analysis on CD4+ T-cells, isolated from normal donors (n = 14), asymptomatic carriers (n = 21), ATL (n = 13), and HTLV-1 associated myelopathy patients (n = 21). To focus on membrane proteome, glycopeptides were enriched from tryptic digests of CD4+ T-cells with ConA-affinity chromatography. LC-MS/MS analysis of 69 samples allowed identification of 946 N-glycoproteins (FDR < 0.01). As a consequence of Welch's t-test, growth-regulatory adhesion molecule (GRAM) was identified as one of upregulated proteins in ATL. Real-time PCR revealed CD4+GRAM+ subpopulation was enriched with infected cells, indicating GRAM is a promising target for ATL. These results showed our comprehensive membrane-proteome analysis is suited for screening of novel therapeutic targets.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：プロテオミクス HTLV-1

1. 研究開始当初の背景

HTLV-1は末梢血CD4陽性T細胞に感染するレトロウイルスであり、主に母乳や性交渉によって近年本邦、特に大都市圏において感染が拡大している病原性ウイルスである。HTLV-1感染者(キャリア)は全世界で1000~2000万人、本邦では約110万人いると推定され、そのうち2~5%がATLやHTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP)等の重篤な疾患を発症する。ATLの生涯発症頻度は男性で6.6%、女性で2.2%であり、年間に約1000人がATLを発症する。

ATLは急性型、慢性型、リンパ腫型、くすぶり型に分けられ、特に急性型とリンパ腫型は4年生存率が約5%と極めて予後不良である(J Clin Exp Hematopathol, 2010, 50(1), 9)。ATLの治療に関しては基本的に急性型、リンパ腫型、および予後不良因子を含む慢性型が治療対象となり、多剤併用化学療法、骨髄移植が選択肢となっている。また再発症例に対しては近年抗CCR4抗体がPhase2試験でも58%の奏効率を示したことを受け、抗CCR4抗体を用いた治療法が再発ATLに対して承認された。しかし現行の多剤併用治療法では平均生存期間が概ね1年以下であり、生存期間の延長が報告されている骨髄移植に関しても、移植前に寛解に持ち込めることが必要である上にATL発症平均が60歳を超えているため、適応外になることが多い。また抗CCR4抗体の国内臨床試験においては、安全性評価対象43例中、全例(100%)に対して副作用が確認されており(Interview Form for POTEFIGE0® Injection, 2012)、いずれもATL、特に急性型、リンパ腫型ATLの克服という観点においては依然現行の治療法では不十分または改善の必要がある。以上の背景から、ATLに対する新規治療法の開発は必須な課題であり、また本邦においては2010年9月、首相官邸においてHTLV-1特命チームが発足し、HTLV-1感染予防や、関連疾患に対する診断法、治療法の開発が加速されている。

2. 研究の目的

本研究では、ATL患者由来T細胞の細胞膜タンパク質に焦点を絞った定量プロテオーム解析を用いて、新規ATL治療標的タンパク質の同定を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

膜表面タンパク質は、その大部分が糖鎖修飾を受けており、糖ペプチドに対する定量解析を行う事で、膜タンパク質に照準を絞った比較定量解析を行う事が可能となる。これに加えHTLV-1が末梢血CD4陽性T細胞に感染する特性を加味し、CD4陽性T細胞より抽出される糖ペプチドの比較定量解析を行う事

で、効率的にATLに対する治療標的候補を探索できるものと考え実験を開始した。

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にて保存した。続いて回収された69検体に対して膜プロテオーム解析を行うにあたって必要な前処理が実施された。検体は解凍後、8M尿素にて変性処理を施し、還元アルキル化処理の後にトリプシン消化を施した。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ConAレクチンビーズ(J-オイルミルズ)を用いて糖ペプチドを精製し、PNGase(Roche)によってN型糖鎖の根元を切断することで、糖ペプチドのコアペプチド部分のみを溶出・回収した。この手法により非糖ペプチドの混入を最小限に抑えることができる。この際N型糖鎖が結合していたアミノ酸はアスパラギンからアスパラギン酸になる。この変化は質量分析では0.984016 Daの質量変化として検出され、後に記述するMASCOT検索でN型糖鎖修飾の有無を検出する際に用いられた。回収した溶出物は乾燥後2%アセトニトリル、0.1%TFA溶液に再溶解され、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)を用いて行われ流速250 nL/min、120分間で分離を行いながらシームレスに質量分析計による解析が行われた。

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モジュール上で質量分析で得られたRawファイルから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。まず全69サンプルに対応するRawファイルのデータを質量電荷比(m/z)及び使用したカラムへの保持時間(RT)によって2次元展開し、2Dマップの形式に変換した。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、測定サンプル間で生じるRTの補正を行った。この上で全2Dマップを重ね合わせ、検出された全てのピークの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ープクラスタリングを行い、クラスター化された1個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、標準化を行った後に全データをエクセルファイルに抽出した。

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、AC及びATL群間での解析を行った。この結果有意($p < 0.05$)に差異のあり、2倍以上の増加がAC及びATLないしATL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。

逆相クロマトグラフィーにおけるペプチドのRTは独立な解析間でも再現性が極めて高く、未同定のペプチドを異なる同定データセットと照合する事によって同定を行う事が可能である。この同定データセットを作成するためATL細胞株を用いた糖ペプチド精製物に対する2D-LC/MS/MS解析を行った。3種類のATL細胞株(SO4, KK1, KOB)からの糖ペプチド精製はスクリーニングに用いた手法を踏襲した。精製品はStage tipsを用いた強陰イオン交換を用いた分画を1次元目に行い、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、質量分析を行った。取得されたデータはMASCOT検索により同定検索を行った。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)+ IGL ' (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 分の誤差を許容する基準で同定を行った。

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 = 7), ATL(n = 8))を凍結し、PBSで2回洗浄した後、growth-regulatory adhesion molecule (GRAM) Alexa647 (Biolegend)を用いて染色後、FACSaria (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。

4. 研究成果

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。Welch検定を用いたND対AC及びATLの解析では感染したCD4細胞において発現が上昇する膜タンパク質を抽出され、その結果206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。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、14タンパク質を同定した。この内、膜表面タンパク質であり現在までにATL病態に関連した報告の無い分子としてGRAMおよびEcto-nucleotidase 1を新規治療標的候補膜タンパク質として同定し、以降の定量バリデーション解析に供した。

少数末梢血サンプル(ND(n = 7), ATL(n = 8))を用いてGRAMに対するFlow cytometryを用いた定量的バリデーションを行った結果、特に急性型、慢性型のATL検体においてGRAMおよびEcto-nucleotidase 1の発現上昇が確認された。また、GRAM強陽性を示すHTLV1感染者の末梢血CD4陽性T細胞から、GRAM陽性及び陰性細胞を単離し、各サブpopulationに含まれるウイルス量を検証した。その結果、GRAM⁺CD4⁺T細胞と比較してGRAM⁺CD4⁺T細胞でウイルス量が顕著に高いことが確認された。これらのことからGRAMが感染細胞特異的に発現しており、ATLの有望な治療標的になり得るものと考えられる。

HTLV-1感染細胞を対象とした膜プロテオーム解析を行った結果、ATL病態でCD4T細胞における発現が上昇する有望な治療標的分子としてGRAMを同定する事に成功した。今後GRAMに関する定量バリデーション及び機能解析が進めることにより、ATL病態における新規発症機序の解明やGRAMを標的とした治療法の開発につながっていくと考えられる。

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 1件)

Makoto Ishihara, Natsumi Araya, Tomoo Sato, Naomi Saichi, Risa Fujii, Yoshihisa Yamano, and Koji Ueda
A plasma diagnostic model of human T-cell leukemia virus-1 associated myelopathy. *Annals of clinical and translational neurology*, 2015, 2(3), 231-240

[学会発表](計 7件)

[国内]

Makoto Ishihara, Natsumi Araya, Tomoo Sato, Ayako Tatsuguchi, Naomi Saichi, Yoshihisa Yamano, Sumio Sugano, Koji Ueda
Membrane proteome analysis to discover therapeutic targets for adult T-cell leukemia (ATL)

第76回日本血液学会学術集会, 2014年11月1日, 大阪国際会議場(大阪府 北区)

Makoto Ishihara, Natsumi Araya, Tomoo Sato, Risa Fujii, Ayako Tatsuguchi, Naomi Saichi, Atae Utsunomiya, Yoshihisa Yamano, Sumio Sugano, Koji Ueda
Comprehensive membrane-proteomic analysis for discovery of novel therapeutic targets against adult T-cell leukemia

第73回日本癌学会学術総会, 2014年9月27日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

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

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

第1回日本HTLV-1学会学術集会, 2014年8月24日, 東京大学医科学研究所 (東京都港区)

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

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

日本プロテオーム学会2014年会, 2014年7月17日, つくば国際会議場 (茨城県つくば市)

石原 誠人, 新谷 奈津美, 佐藤 知雄, 中川 英刀, 山野 嘉久, 植田 幸嗣

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

第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月5日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

[海外]

Makoto Ishihara, Natsumi Araya, Tomoo Sato, Ayako Tatsuguchi, Naomi Saichi, Yoshihisa Yamano, Koji Ueda

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

13th Annual World Congress of the Human Proteome Organization, 2014年10月8日, Madrid (Spain)

Makoto Ishihara, Natsumi Araya, Tomoo Sato, Risa Fujii, Ayako Tatsuguchi, Naomi Saichi, Hidewaki Nakagawa, Yoshihisa Yamano, Koji Ueda

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)

12th Annual World Congress of the Human Proteome Organization, 2013年9月17日, Yokohama (Japan)

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: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

発明者:植田幸嗣、石原誠人、山野嘉久

権利者:植田幸嗣、石原誠人、山野嘉久

種類:特許

番号:特願 2014-226719

出願年月日:2014年11月7日

国内外の別:国内

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

石原誠人 (ISHIHARA, Makoto)

東京大学大学院 新領域創成科学研究科

客員共同研究員

研究者番号:60581189

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: