

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012 年度

課題番号：23659485

研究課題名（和文）核分葉と遺伝子発現調節の関係：好中球および ATL 細胞を利用した研究

研究課題名（英文）Analysis of relationship between nuclear segmentation and gene expression using neutrophils and ATL cells

研究代表者

北村 俊雄（KITAMURA TOSHIO）

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：20282527

研究成果の概要（和文）：HTLV-1 感染細胞が成人 T 細胞白血病・リンパ腫の腫瘍細胞へ多段階のステップを経て進展して行く過程を細胞表面の CD7、および癌抑制遺伝子産物である CADM1 の発現量の変化で解析できることを明らかにし、遺伝子のメチル化の網羅的解析の結果、この過程の変化は遺伝子のメチル化によって制御されていることが示唆された。腫瘍化の中間段階の細胞は無症候性キャリアの段階からすでに出現していた。

研究成果の概要（英文）：Multi-step oncogenesis of HTLV-1 infected cells to Adult T-cell leukemia well reflected on the cell surface expression of CD7 and CADM1, tumor suppressor gene originally detected in lung cancer. It is suggested that alteration of gene expression in this process is regulated by methylation of the gene. We can detect intermediate cells of oncogenesis even in the peripheral blood of asymptomatic carriers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：好中球・ATL・エピジェネティクス・メチル化・遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

ゲノムは細胞内で核に収納されている。この核のなかには DNA が巻き付いているヒストンという蛋白質が沢山存在し、全長にすると 1メートルにもおよぶ DNA をうまく折り畳み効率良くまた整然と核に収納している。遺伝子の発現は DNA のメチル化やヒストンの修飾によってエピジェネティックな調節を受けていることが明らかになってきた。正常の細胞において行なわれているエピジェネティックな調節が破綻することによって癌や白血病の発症につながることも知られている。

2. 研究の目的

白血病のなかで成人 T 細胞性白血病（ATL）はリンパ球性の白血病であるが、白血病細胞の核の形が花弁状をしており特徴的である。

この核の形態異常は好中球の分葉ともやや異なるが、DNA メチル化などエピジェネティクスの異常を表しているのではないかと考えた。ATL は HTLV-I というレトロウイルス感染後に 10 年以上という長い期間を経て発症する白血病であるが、感染のキャリアの状態、くすぶり期を経て急性期へと移行する難治性の疾患である。このキャリアからくすぶり期を経て急性白血病へと進展する際、多段階発癌をされると考えられているが、病気に従って DNA のメチル化の変化を調べ、遺伝子発現の異常と対応させることによってエピジェネティクス異常と ATL 発症の関係を明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

東京大学医科学研究所附属病院を受診ある

いは入院した HTLV-1 無症候性キャリア、くすぶり型、慢性型、急性型各病型の成人 T 細胞白血病患者 140 名および健常人コントロール 6 名を対象に末梢血単核球を分離して解析に用いた。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倫理委員会の審査承認（承認番号 22-3-0518、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。末梢血単核球を APC-CD7、APC-Cy7-CD3、パシフィックブルー-CD4、パシフィックオレンジ CD14、および抗 CADM1 トリ IgY をビオチン化した抗体で染色した。洗浄後 PE-ストレプトアビジンを加え、BD FACS Aria で解析およびソーティングを行った。

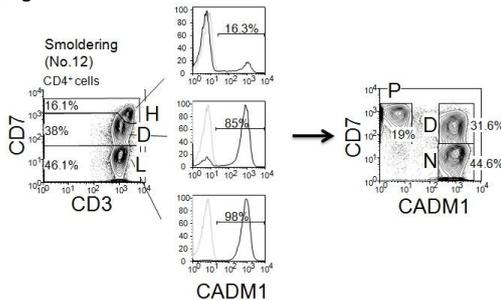
FACS でソーティングされた細胞から genomic DNA を抽出、Inverse PCR を行った。Eco RI、Pst I で切断後 T4 ligase で self-ligation し、Eco RI cut したサンプルのみ Mlu I で HTLV-1 provirus を切断した。HTLV-1 組み込み部位の flanking region を増幅する形にプライマーを設定して PCR を行った。また、各 fraction の DNA を用いてメチル化アレイ解析を行った。

各 fraction から total RNA を抽出し遺伝子発現アレイ解析を行った。Agilent 社の 44K whole human genome マイクロアレイを用いて、One-Way ANOVA で選択した 10,278 遺伝子についてクラスター解析を行った。

4. 研究成果

これまで我々が報告して来た CD3/CD7 発現レベルを用いた急性型 ATL 細胞の解析に ATL 細胞で ectopic に高発現することが報告されている癌抑制遺伝子 CADM1 の発現解析をこれまでの解析系に加えた。抗 CADM1 抗体に適切なものがなかったためトリ IgY 抗 CADM1 抗体をビオチン化し、ストレプトアビジン PE で発色する方法を取った。その結果 HTLV-1 陽性細胞は CADM1 陽性画分に高度に濃縮され、また CD7 high の集団と CD7dim の集団が非常に効率よく分離されることが明らかになった (Fig. 1)。この系においては CD3/CD7 の系において検討したのと同様に病態の進行とともに Fig. 1 の D、N の集団が増

Fig. 1



加することが確認され、また CD3/CD7 による解析の時と同様にこの解析系においても D、N の集団には major な clonal band が検出され (Fig. 2)、D、N の集団は HTLV-1 感染細胞が腫瘍化して行く過程にある細胞集団であると考えられた (Kobayashi K, Uchimaru K manuscript in preparation)。

本研究ではこれらの HTLV-1 感染細胞が腫瘍化して行く過程への DNA メチル化の寄与について検討するためにメチル化アレイ解析を行った。3 例の検体および 1 例の健常人コントロール検体で検討を行った。対象となった症例の TSLC1 (CADM1)/CD7 発現解析の結果を Fig. 3 に示す。AO は慢性型 ATL、MN は異常リンパ球が 5% 前後、末梢血プロウイルス量 20% 台の high risk キャリア、SK は健常人コントロールである。それぞれの P、D、N

Fig. 2

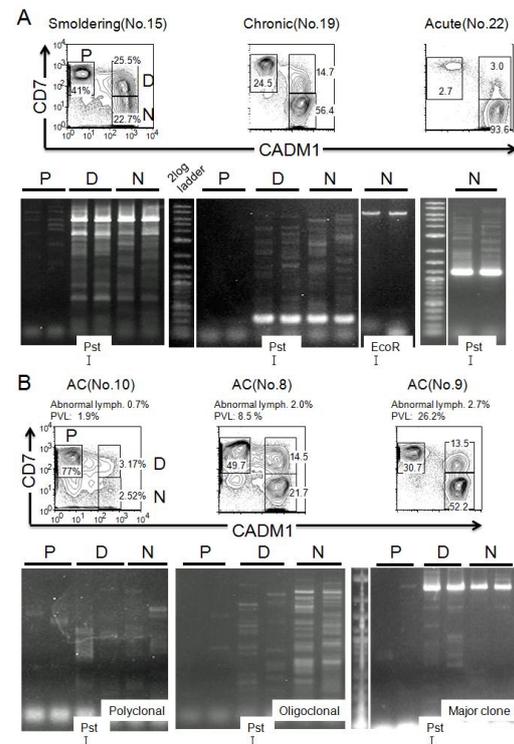
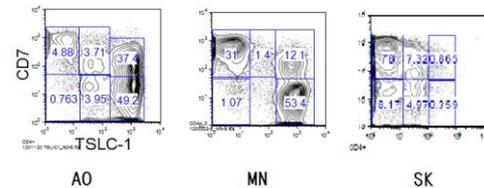
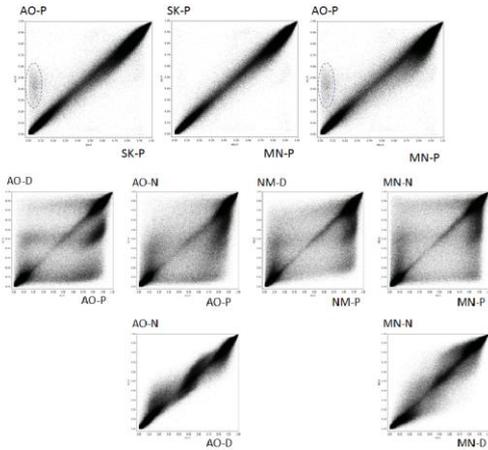


Fig. 3



の fraction をソートして解析を行ったが Fig. 4 に示すように、P fraction は健常人コントロール、キャリア、慢性型 ATL ともメチル化のパターンはほとんど同じであるのに対し、D、N の fraction は P の fraction と大きく異なり、一方 D、N の fraction は実質的

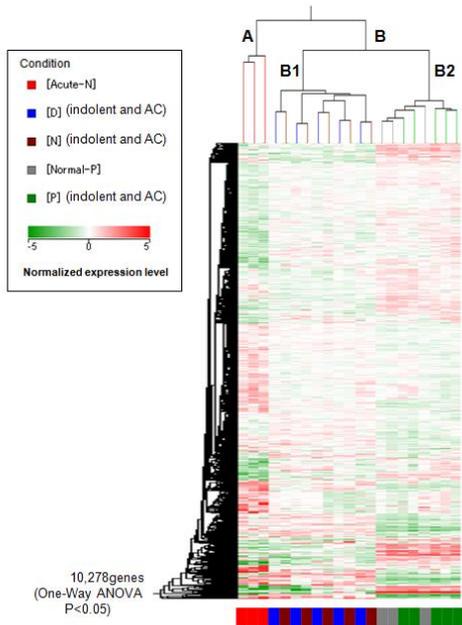
Fig. 4



にほとんど変化がなかった (Fig. 4)。この結果は末梢血プロウイルス量が高い一部キャリアの症例から増加しはじめ、くすぶり型 ATL へ向けて病態の進行とともに増加して行く D の集団は ATL の腫瘍細胞としての基本的性格を既に持っていることを強く示唆する。

そこで各集団の遺伝子発現についてアレイ解析による検討を行った。無症候性キャリア 2 例、くすぶり型 ATL 症例 2 例、慢性型 ATL 症例 1 例、急性型 ATL 症例 3 例および健康人コントロール 3 例の末梢血を TSLC1 (CADM1) /CD7 による multi-color FACS により P、D、N の 3 分画にソーティングして発現アレイ解析を行った (Fig. 5)。クラスター解析を行っ

Fig. 5

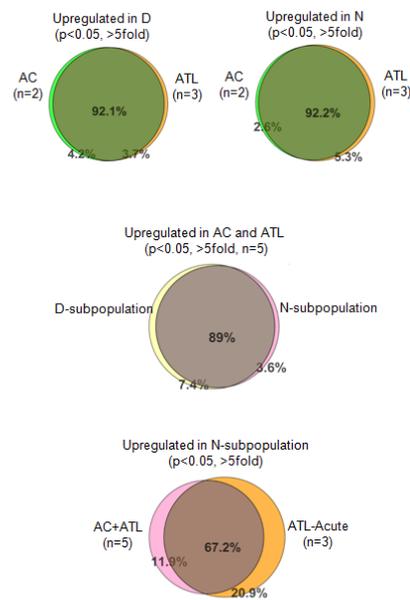


たところ、急性型の N からなる A とそれ以外の B に分かれ、B はさらに各タイプの P からなる B1 および無症候性キャリアおよびくすぶり、慢性型 (indolent) ATL の D、N からなる B2 にクラスターされた。この結果はメチル化アレイ解析から示唆された通り D、N の

集団は非常に似た集団で、D の段階で既に ATL としての基本的性格ができていたことを改めて示すとともに、キャリア、indolent ATL に関わらず D、N が同じクラスターにクラスタリングされることからキャリアの段階から末梢血中プロウイルスの増加、異常リンパ球の増加と平行して増加してくる D、N の集団はくすぶり型にみられる D、N の集団と同じ細胞でこれが増加したものがくすぶり型 ATL と考えられた。これらキャリアの段階から病態の進行に伴って出現、増加する D、N の集団は HTLV-1 感染細胞の初期悪性化過程の途中にある細胞集団と考えられる。メチル化アレイ解析の結果と併せて考えると、これらの結果は HTLV-1 感染細胞は腫瘍化の進行に伴ってメチル化によって遺伝子発現が制御されていることを強く示唆する。

Fig. 6 に各集団で upregulate している遺伝子の関係をベン図で示す。上段に示すように D、N ともキャリア、indolent ATL で遺伝子発現は非常に似ており、中段に示す通り D、N の集団の遺伝子発現を比較してみても非常に近似していることが分かる。一方、下段に示すように acute type ATL の N と indolent type ATL の N では一定の遺伝子発現に明らかな相違がみられ、indolent ATL から aggressive ATL への進展にさらに遺伝子的な変化が加わる必要があることを示唆していた。

Fig. 6



以上、本研究によって HTLV-1 感染細胞の ATL への多段階発癌の中間段階の細胞集団を同定、純化することが可能になり、腫瘍化の過

程において DNA メチル化に遺伝子発現制御が重要な役割を果たし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 6 件)

1. Asanuma S, Yamagishi M, Kawanami Ka, Nakano K, Sato-Otsubo A, Muto S, Sanada M, Yamochi T, Kobayashi S, Utsunomiya A, Iwanaga M, Yamaguchi K, UchimarK, Ogawa S and Watanabe T. Adult T-cell leukemia cells are characterized by abnormalities of Helios expression that promote T-cell growth. Cancer Sci. in press.

2. Kobayashi S, Tian Y, Ohno N, Yuji K, Ishigaki T, Isobe M, Ohfuchi-Tsuda M, Oyaizu N, Watanabe E, Watanabe N, Tani K, Tojo A and UchimarK. The CD3 versus CD7 plot in multicolor flow cytometry reflects progression of disease stage in patients infected with HTLV-I. PLoS One 8: e53728, DOI:10.1371/journal.pone.0053728, 2013

3. Makoto Yamagishi, Kazumi Nakano, Ariko Miyake, Tadanori Yamochi, Yayoi Kagami, Akihisa, Tsutsumi, Yuka Matsuda, Aiko Sato-Otsubo, Satsuki Muto, Atae Utsunomiya, Kazunari Yamaguchi, Kaoru UchimarK, Seishi Ogawa, and Toshiki Watanabe. Polycomb-Mediated Loss of miR-31 Activates NIK-dependent NF-kappa B Pathway in Adult T-cell Leukemia and Other Cancers. Cancer cell. 21(1):121-135, 2012

4. Tian Y, Kobayashi S, Ohno N, Isobe M, Tsuda M, Tani K, Zaïke Y, Watanabe N, Tojo A and UchimarK. Leukemic T cells are specifically enriched in a unique CD3^{dim}CD7^{low} subpopulation of CD4⁺ T cells in acute-type adult T cell leukemia. Cancer Sci. 102(3) :569-577, 2011.

[学会発表] (計 16 件)

1. 小林誠一郎、中野和民、渡辺恵理、石垣知寛、大野伸広、渡辺信和、東條有伸、内丸 薫 : 患者検体を用いた CD7 と TSLC1/CADMI の FACS 解析は ATL の多段階発癌を反映する 第 1 回 ATL シンポジウム 東京 2012

2. 石垣知寛、小林誠一郎、大野伸広、渡辺恵理、田野崎隆二、渡辺信和、東條有伸、内丸 薫 : TSLC1/CD7 を用いた造血細胞移植後

の ATL 細胞のモニタリング 第 5 回 HTLV-1 研究会 2012 東京

3. 大野伸広、田野崎隆二、小林誠一郎、石垣知寛、渡辺信和、内丸 薫 : 同種造血幹細胞移植を見据えた ATL の治療戦略: その後方視的解析 第 5 回 HTLV-1 研究会 2012 東京

4. Makoto Yamagishi, Ryutarō Takahashi, Kazumi Nakano, Satomi Asanuma, Atae Utsunomiya, Kazunari Yamaguchi, Kaoru UchimarK, Seishi Ogawa, and Toshiki Watanabe :Molecular Hallmarks of Adult T cell Leukemia: miRNA, Epigenetics, and Emerging Signaling Abnormalities 第 74 回日本血液学会学術集会 2012 京都

5. Seiichiro Kobayashi, Eri Watanabe, Tomohiro Ishigaki, Nobuhiro Ohno, Koichiro Yuji, Yukio Tsukada, Akihiro Ohmoto, Naoki Shimada, Nobukazu Watanabe, Arinobu Tojo and Kaoru UchimarK: CD7 vs CADMI in FACS reflects multi-step oncogenesis of ATL and discriminates HTLV-1 infected cells. 第 74 回日本血液学会学術集会 2012 京都

6. 大野伸広、小林誠一郎、渡辺信和、石垣知寛、湯地晃一郎、東條有伸、内丸 薫 : CD3 と CD7 の展開による急性型 ATL 細胞の同定 : 治療後の CD3dimCD7(-) 分画のフローサイトメトリ解析 第 74 回日本血液学会学術集会 2012 京都

7. Kobayashi S, Tian Y, Ohno N, Isobe M, Tsuda M, Zaïke Y, Watanabe N, Tani K, Tojo A UchimarK. CD3 vs CD7 plot in multi-colour FACS reflects progression of disease stage of HTLV-1 infected patients. 第 73 回日本血液学会総会 名古屋 2011

8. 石垣知寛、在家裕司、小林誠一郎、大野伸広、内丸 薫、渡辺信和、小柳津直樹、東條有伸、中内啓光. フローサイトメトリーによるフェノタイプ解析を用いた、急性型 ATL の末梢血腫瘍細胞数の評価 第 4 回 HTLV-1 研究会 東京 2011

9. 小林誠一郎、田 亜敏、大野伸広、湯地晃一郎、石垣知寛、磯部優理、津田真由子、在家 裕司、渡辺恵理、渡辺信和、谷憲三朗、東條 有伸、内丸 薫. マルチカラー FACS における CD3 と CD7 の展開は HTLV-1 感染患者の病期の進行を反映する 第 4 回 HTLV-1 研究会 東京 2011

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

特許出願番号 特願 2013-034326

名称：患者検体を用いた HTLV-1 キャリア、
成人 T 細胞白血病の発癌過程進行度又
は悪性度の評価法

発明者：内丸 薫、小林誠一郎、渡辺信和

権利者：東京大学

種類：

番号：特願 2013-034326

出願年月日：

国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北村俊雄 (TOSHIO KITAMURA)

東京大学医科学研究所・教授

研究者番号：20282527

(2) 研究分担者

内丸 薫 (UCHIMARU KAORU)

東京大学医科学研究所・准教授

研究者番号：60251203