

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19183

研究課題名(和文)成人T細胞白血病における腫瘍由来エクソソームの機能解析と臨床応用

研究課題名(英文)Functional analysis and clinical application of tumor-derived exosomes in adult T-cell Leukemia

研究代表者

佐々木 大介(SASAKI, Daisuke)

長崎大学・病院(医学系)・技術職員

研究者番号：90624784

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):本研究ではATL細胞より分泌されたエクソソームに含まれるmiRNAを介した細胞間クロストークがATL発症や進展に及ぼす役割を調べることを目的とした。HTLV-1キャリアおよび未治療ATL患者血漿よりエクソソームを回収しマイクロアレイを用いたmiRNA発現の網羅的解析を行った。ATL細胞中miRNAプロファイルとエクソソーム中miRNAプロファイルは大きく異なり、また健康人血漿由来エクソソーム中とHTLV-1キャリアおよびATL患者血漿由来エクソソーム中のmiRNAプロファイルにも若干の違いがあることが明らかとなりこの違いが様々な細胞に影響を及ぼす可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文):In this study, we aimed to investigate the role of intercellular crosstalk mediated by miRNA contained in exosome secreted from ATL cells on ATL onset and progression. Exosomes were derived from plasma of HTLV-1 carrier and untreated ATL patient, comprehensive expression analysis of miRNA using microarray was performed. The miRNA profiles in ATL cells and miRNA profiles in exosomes were significantly different and it became clear that the miRNA profiles in exosomes derived from healthy human, HTLV-1 carrier and ATL patient plasma also had slight differences. This slight differences were thought that there is a possibility that it affects various cells.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：exosome HTLV-1 ATL

1. 研究開始当初の背景

内在性低分子 RNA である miRNA は主に mRNA からタンパクへの翻訳阻害と mRNA 分解という2つのプロセスで標的となる複数の遺伝子を制御していることが知られており、発生や細胞増殖、ウイルス感染などに関与すると考えられている。研究代表者は成人 T 細胞白血病(ATL)細胞において一部の miRNA 発現にはエピジェネティック制御機構が関与しており、クロマチン修飾による遺伝子発現制御に重要な Polycomb repressive complex2 (PRC2) を構成する分子 Enhancer of zeste homolog2 (EZH2) の阻害剤である DZNep は ATL 細胞の増殖を抑制するが、その現象は tumor suppressor miRNA である miR-181a を再誘導し、標的遺伝子である BCL2 を抑制することで起きていることを見出した(未発表データ)。また ATL 細胞では miRNA 発現が全体的に健常者と比べ低下していること、患者血清中にも miRNA が存在し病態の進展や予後に関わることを報告した。血漿などの体液中に存在する miRNA は多くの細胞タンパク質などと共に細胞から分泌された脂質二重膜で形成された微小な小胞であるエクソソーム中に存在することが明らかとなっており、さらにそれらが細胞間で伝搬すること、これら細胞から分泌された miRNA がエクソソームを介して受け手の細胞に取り込まれ、受け手の細胞内で機能していることなど証明されている。発現異常を起こした miRNA が細胞内で ATL 細胞の増殖や抗アポトーシスに働きかけていることはこれまでの研究で明らかであるが、ATL 細胞および HTLV-1 感染細胞より分泌されたエクソソームに含まれる miRNA が他の ATL 細胞や HTLV-1 感染細胞および HTLV-1 非感染の免疫担当細胞などに対しどのような影響を及ぼしているかについての研究は殆どなされていない。

2. 研究の目的

ATL 細胞より分泌されたエクソソームに含まれる miRNA を介した細胞間クロストークが ATL 発症や進展に影響を及ぼすかを検討する。

3. 研究の方法

ATL 患者血漿よりエクソソームを回収した後、miRNA を抽出しマイクロアレイにてエクソソーム中の miRNA の網羅的に発現解析を行った。さらに ATL 患者由来 exosome を蛍光色素 PKH67 で染色し樹状細胞株 CAL-1 への transfection 実験を行った。

4. 研究成果

HTLV-1 キャリアおよび ATL 患者の血漿よりエクソソームを回収、RNA 抽出後 miRNA マイクロアレイを行った。細胞中 miRNA プロファイルとエクソソーム含有 miRNA プロファイルは大きく異なり細胞中に多く含まれている miR-142-3p, miR-21, miR-150 などはエク

ソソーム中には微量しか含まれていなかった。また HTLV-1 キャリアもしくは ATL 患者に特徴的なエクソソーム含有 miRNA があるかを調べたところ、ほとんどの miRNA は同程度の発現を示していたが、miR-5100(MIMAT0022259), miR-6126(MIMAT0024599), miR-663a(MIMAT0003326), miR-451a(MIMAT0001631)などは HTLV-1 キャリアもしくは ATL 患者由来血漿エクソソーム中に豊富に含まれる傾向が認められた。miR-5100 は膀胱癌細胞株の増殖や浸潤の抑制に係るとの報告がある一方で、肺がん細胞株では腫瘍細胞の増殖に促進的に働くとの報告もある。今回見出された現象について HTLV-1 感染や ATL との関連は今のところ明らかにはなっていない。また病期の進展(くすぶり型 慢性型 急性型)に伴い幾つかの miRNA はエクソソーム中の含量が増加していた。また病期の進行により含量が減少する miRNA も認められた。本結果よりエクソソーム含有 miRNA が細胞中 miRNA と同様に病期の進行により増減することが示された。次に ATL 由来エクソソームが他の細胞種にどのような影響を及ぼすか確認するために、回収したエクソソームを PKH67 にて蛍光染色を行い、樹状細胞株である CAL-1 へのエクソソーム取り込みを検討したが、樹状細胞株 CAL-1 へのエクソソームの取り込みは研究期間内には確認できなかった。

以上よりこの研究では ATL 細胞中 miRNA プロファイルとエクソソーム中 miRNA プロファイルは大きく異なり、また健常人血漿由来エクソソーム中と HTLV-1 キャリアおよび ATL 患者血漿由来エクソソーム中の miRNA プロファイルにも若干の違いがあることが明らかとなりこの違いが様々な細胞に影響を及ぼす可能性があると考えられた。

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8件)

Nakamura H, Hasegawa H, Sasaki D, Takatani A, Shimizu T, Kurushima S, Horai Y, Nakashima Y, Nakamura T, Fukuoka J, Kawakami A. Detection of human T lymphotropic virus type-1 bZIP factor and tax in the salivary glands of Sjögren's syndrome patients. Clin Exp Rheumatol. 2018 Mar 20. 査読あり

Murata M, Kosai K, Yamauchi S, Sasaki D, Kaku N, Uno N, Morinaga Y, Hasegawa H, Miyazaki T, Izumikawa K, Mukae H, Yanagihara K. In Vitro Activity of Lascufloxacin against Streptococcus pneumoniae with Mutations in the Quinolone Resistance-Determining Regions. Antimicrob Agents Chemother.

2018 Mar 27;62(4). pii: e01971-17. 査読あり

Fuchi N, Miura K, Tsukiyama T, Sasaki D, Ishihara K, Tsuruda K, Hasegawa H, Miura S, Yanagihara K, Masuzaki H. Natural Course of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Proviral DNA Levels in Carriers During Pregnancy. *J Infect Dis.* 2018 Apr 11;217(9):1383-1389. 査読あり

Okada Y, Uno N, Sato S, Mori S, Sasaki D, Kaku N, Kosai K, Morinaga Y, Hasegawa H, Yanagihara K. Strong influence of human leukocyte antigen-DP variants on response to hepatitis B vaccine in a Japanese population. *Vaccine.* 2017 Oct 9;35(42):5662-5665. 査読あり

Kuramitsu M, Sekizuka T, Yamochi T, Firouzi S, Sato T, Umeki K, Sasaki D, Hasegawa H, Kubota R, Sobata R, Matsumoto C, Kaneko N, Momose H, Araki K, Saito M, Nosaka K, Utsunomiya A, Koh KR, Ogata M, Uchimar K, Iwanaga M, Sagara Y, Yamano Y, Okayama A, Miura K, Satake M, Saito S, Itabashi K, Yamaguchi K, Kuroda M, Watanabe T, Okuma K, Hamaguchi I. Proviral Features of Human T Cell Leukemia Virus Type 1 in Carriers with Indeterminate Western Blot Analysis Results. *J Clin Microbiol.* 2017 Sep;55(9):2838-2849. 査読あり

Matsumoto N, Mori S, Hasegawa H, Sasaki D, Mori H, Tsuruda K, Imanishi D, Imaizumi Y, Hata T, Kaku N, Kosai K, Uno N, Miyazaki Y, Yanagihara K. Simultaneous screening for JAK2 and calreticulin gene mutations in myeloproliferative neoplasms with high resolution melting. *Clin Chim Acta.* 2016 Nov 1;462:166-173. 査読あり

Hasegawa H, Bissonnette RP, Gillings M, Sasaki D, Taniguchi H, Kitanosono H, Tsuruda K, Kosai K, Uno N, Morinaga Y, Imaizumi Y, Miyazaki Y, Yanagihara K. Induction of apoptosis by HBI-8000 in adult T-cell leukemia/lymphoma is associated with activation of Bim and NLRP3. *Cancer Sci.* 2016 Aug;107(8):1124-33. 査読あり

Kuramitsu M, Okuma K, Yamochi T, Sato T, Sasaki D, Hasegawa H, Umeki K,

Kubota R, Sobata R, Matsumoto C, Kaneko N, Naruse I, Yamagishi M, Nakashima M, Momose H, Araki K, Mizukami T, Mizusawa S, Okada Y, Ochiai M, Utsunomiya A, Koh KR, Ogata M, Nosaka K, Uchimar K, Iwanaga M, Sagara Y, Yamano Y, Satake M, Okayama A, Mochizuki M, Izumo S, Saito S, Itabashi K, Kamihira S, Yamaguchi K, Watanabe T, Hamaguchi I. Standardization of Quantitative PCR for Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 in Japan: a Collaborative Study. *J Clin Microbiol.* 2015 Nov;53(11):3485-91. 査読あり

[学会発表](計5件)

佐々木大介、長谷川寛雄、淵直樹、三浦清徳、上野友郁、吉田彩香、松本成良、山内俊輔、山川壽美、山川智弘、宇野直輝、小佐井康介、賀来敬仁、増崎英明、柳原克紀、床検体の HTLV-1 定量検査におけるデジタル PCR 法とリアルタイム PCR 法の比較、第 4 回日本 HTLV-1 学会学術集会、2017 年 8 月 19 日、関西医科大学(大阪府枚方市)

Daisuke Sasaki, Hiroo Hasegawa, Shunsuke Yamauchi, Yuji Kobayashi, Mai Fuchigami, Kazuto Tsuruda, Yoshitaka Imaizumi, Yasushi Miyazaki, Katsunori Yanagihara, Analysis of CCR4 mutation status in adult T-cell leukemia/lymphoma, 18th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, Mar.8 2017 Tokyo (Japan)

佐々木大介、長谷川寛雄、山内俊輔、鶴田一人、淵上麻衣、松本成良、上野友郁、賀来敬仁、小佐井康介、宇野直輝、今泉芳孝、宮崎泰司、柳原克紀、成人 T 細胞白血病・リンパ腫(ATL)における CCR4 遺伝子変異と病態・予後との関連、第 3 回日本 HTLV-1 学会学術集会、2016 年 8 月 27 日、鹿児島県鹿児島市町村自治会館(鹿児島県鹿児島市)

Sayaka Mori, Hiroo Hasegawa, Daisuke Sasaki, Kazuto Tsuruda, Yasushi Miyazaki, Katsunori Yanagihara. ABL1-BCR MRNA EXPRESSION IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA AND PHILADELPHIA POSITIVE ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA, XXIX International Symposium on Technical Innovations in Laboratory Hematology, May12, 2016 Milano(Italy)

佐々木大介、上野友郁、長谷川寛雄、鶴田一人、森沙耶香、松本成良、森勇人、山内俊輔、今泉芳孝、宮崎泰司、柳原克紀、成人 T 細胞白血病 (ATL) における STAT3 変異解析、第 2 回日本 HTLV-1 学会 学術集会、2015 年 8 月 22 日、東京大学 医科学研究所 (東京都品川区)

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

なし

取得状況 (計 0 件)

なし

〔その他〕

特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 大介 (SASAKI, Daisuke)

長崎大学・病院 (医学系)・技術職員

研究者番号: 90624784