

令和元年6月11日現在

機関番号：17201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06956

研究課題名(和文)ATLにおけるDNA脱メチル化剤を用いた新規治療法開発の基盤研究

研究課題名(英文)DNA demethylation therapy in ATL

研究代表者

渡邊 達郎(Watanabe, Tatsuro)

佐賀大学・医学部・寄附講座准教授

研究者番号：20595714

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：成人T細胞白血病/リンパ腫(ATL)のDNAメチル化亢進異常を標的としたDNA脱メチル化療法の可能性を探るため、HTLV-1感染細胞・ATL細胞に対して、デシタピンがDNAの脱メチル化を伴い、強く細胞の増殖を抑制することをin vitro及びマウスを用いたin vivoの解析で示した。また、T細胞の増殖・生存に重要ないくつかの遺伝子がHTLV-1感染細胞・ATL細胞において異常にDNAメチル化されており、DNA脱メチル化剤がもたらす抗腫瘍効果の標的となり得ることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAのメチル化異常がHTLV-1感染細胞の増殖や生存に機能的に寄与していることが示され、DNAのメチル化異常を標的にしたATLの新規治療法、予防法の開発の可能性が見いだされた。今回同定したいくつかの遺伝子のメチル化異常をさらに多検体で検証することで、HTLV-1感染者の中でATLを発症する5%の感染者を早期に抽出する新しい指標に応用し、患者毎の発症リスクに応じた経過観察スケジュールの作成にやDNA脱メチル化剤の適応患者の選別に役立つと考える。

研究成果の概要(英文)：Adult T-cell leukaemia-lymphoma (ATL) is an aggressive haematological malignancy of CD4+ T-cells transformed by human T-cell lymphotropic virus-1 (HTLV-1). We have identified common differentially hypermethylated positions (hyper methylated DMPs) specific to HTLV-1-infected T-cells by comprehensive DNA methylation analysis. Since accumulation of DNA methylation at these sites correlated with ATL development and progression, we investigated the efficacy of DNA demethylating agents. Treatment with decitabine (DAC) inhibited cell growth accompanied by global DNA hypomethylation in HTLV-1-infected cell lines. We found 22 genes, including THEMIS and LAIR1 as negative regulators of TCR signaling, and FHIT as a tumor suppressor, whose expression was down-regulated concomitant with promoter hypermethylation and rescued by DAC treatment. Our results demonstrate that DNA demethylation therapy is a new and effective approach to prevent disease development and progression in ATL.

研究分野：造血器腫瘍のエピジェネティクス

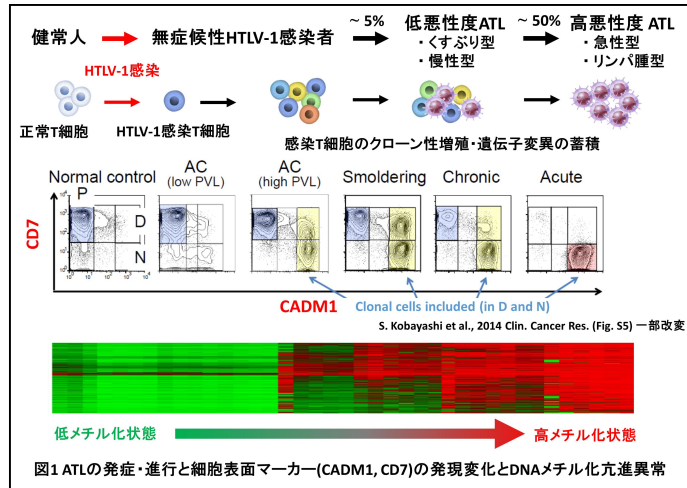
キーワード：ATL DNAメチル化 がん予防 診断 分子標的薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 成人 T 細胞性白血病・リンパ腫(ATL)はヒト T 細胞白血病ウイルス I 型(HTLV-1)の T 細胞への感染を起因とする血液腫瘍である。ATL はその病態の違いから、比較的悪性度の低いくすぶり型 ATL や慢性型 ATL、あるいは治療の必要を有する悪性度の高い急性型 ATL やリンパ腫型 ATL に大別され、HTLV-1 ウイルス感染から数十年を経ておよそ 5%の感染者が発症する。また、低悪性度 ATL のおよそ半数が高悪性度 ATL へと病態が進行することが知られており、効果的な治療法や発症予防法の開発が望まれている。

(2) 我々は健常人、無症候性 HTLV-1 感染者、及び ATL 患者(くすぶり型、慢性型、急性型)由来の末梢血単核球より、HTLV-1 非感染細胞と HTLV-1 感染細胞を HAS-Flow 法により分離し、網羅的な DNA メチル化解析を実施した。HAS-Flow 法は CADM1 と CD7 の発現パターンから、正常 T 細胞画分(P 画分)と HTLV-1 感染 T 細胞画分(D, N 画分)を識別する方法である。本分析法については 2014 年の Kobayashi 等の論文に詳細な解説があるが、ATL の病態の進行と良く相関するように、T 細胞表面の CADM1 と CD7 の発現が変化していくことを利用している。それぞれの細胞から DNA を抽出し、網羅的 DNA メチル化解析を行い、得られたメチル化プロファイルを用いて、HTLV-1 感染細胞で特異的に認められる DNA メチル化異常領域について、階層的クラスタ解析を行い、病態の進行をよく反映する DNA メチル化異常亢進領域を抽出した(図 1)。そこで本研究では病態の進行に関わる DNA メチル化亢進異常を抑制(解除)することで、HTLV-1 感染細胞・ATL 細胞の増殖を抑制できるか検討した。また、HTLV-1 感染細胞・ATL 細胞の生存・増殖に機能的に寄与する DNA メチル化異常領域(遺伝子)の同定を試みた。



### 2. 研究の目的

(1) 我々は HTLV-1 感染細胞が ATL 細胞に至る過程において、特徴的な DNA のメチル化亢進異常が蓄積し、その結果病態の進展・ATL 細胞の増殖に寄与することを示唆する結果を得ている。そこで、DNA 脱メチル化剤の HTLV-1 感染細胞・ATL 細胞に対する抗腫瘍効果を比較検討するとともに、その作用機構を明らかにすることを目的とした。

(2) さらに、抗腫瘍効果と相関してメチル化が変化する DNA 領域を明らかにし、ATL の生存や病態の進行に機能的に関わる異常 DNA メチル化領域・遺伝子を明らかにする。

(3) これらの結果から、HTLV-1 感染細胞・ATL 細胞に対する DNA 脱メチル化剤の有効性と抗腫瘍効果を予測可能な DNA メチル化領域を明らかにすることで、ATL の新しい治療法・予防法の可能性を探り、ATL における DNA 脱メチル化剤を用いた新規治療法を開発するための基盤構築を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) DNA 脱メチル化剤の抗腫瘍活性評価 (in vitro)

HTLV-1 感染細胞・ATL 細胞株(MT-1, MT-2, MT-4, TL-Mor, ATN-1, ILT-Mat, MJ, TL-Om1)及び、ATL 患者由来末梢血単核球に DNA 脱メチル化剤として、アザシチジン(AZA)あるいはデシタピン(DAC)を処理し、細胞増殖については CCK-8 (DOJINDO)により評価した。また、Annexin V 染色によるアポトーシス解析、PI 染色等による細胞周期の解析を行った。DNA のメチル化状態については、LINE-1 領域の CpG アイランドに含まれる 3 カ所の CpG について、バイサルファイト-パイロシークエンス法により定量した (LINE-1 assay)。LINE-1 はヒトのゲノムのおよそ 1/6 を占めており、この領域のメチル化レベルはゲノム全体の指標とされている。DNMT1 のタンパク質量については western blot 法により評価した。遺伝子発現については TaqMan assay により定量した。

#### (2) DNA 脱メチル化剤の抗腫瘍活性評価 (in vivo)

T, B, NK 細胞を欠損した高度免疫不全マウス(BALB/c Rag2<sup>null</sup>/Jak3<sup>null</sup>(BRJ))に HTLV-1 感染細胞株である MT-2 を 5 x 10<sup>6</sup> 個 皮下に移植した。移植後、外表よりノギスで長径・短径を測定し、腫瘍サイズおよび体重を記録した。およそ移植 10 日後、腫瘍サイズが 100 mm<sup>3</sup> に達した時点でデシタピン(1.25 mg/kg)、あるいは溶媒(10% シクロデキストリン溶液)の腹腔内投与を開始し、週二投で 3 週間投与した。移植 22 日後に全頭解剖し、皮下の腫瘍組織を単

離し、DNA を抽出し、LINE-1 assay により DNA のメチル化レベルを測定した。

#### 4. 研究成果

(1) HTLV-1 感染細胞・ATL 細胞株に AZA あるいは DAC を 4 日間処理し、CCK-8 法で解析したところ、DAC でより強い増殖抑制効果が見られた(図 2 A)。IC50 値は MT-1 細胞以外では実臨床で用いられる際の血中濃度以下であった。また、MT-1 細胞についても処理期間の延長により強い細胞増殖抑制効果が表れた。Annexin V, PI 染色により DAC 処理濃度・時間依存的なアポトーシスの誘導も確認された(図 2 B)。また、いくつかの株において、処理 2 日後に G2/M 細胞周期停止が認められた。DNA のメチル化状態について LINE-1 における CpG メチル化状態で評価したところ、AZA に比べて DAC が低濃度で DNA の脱メチル化を誘導することが明らかとなった(図 2 C)。DNA に取り込まれたデシタピンはメチル基転移酵素である DNMT1 をトラップし、分解へと導くことが知られているが、実際に DAC の処理により DNMT1 のタンパク質量が減少した(図 2D)。LINE-1 の脱メチル化、及び DNMT1 の減少については、どちらも AZA に比べて DAC でより強く誘導された。この結果は、細胞内に取り込まれた AZA の 80%ほどは RNA に取り込まれるため、DNA の脱メチル化については DAC に比べて高用量必要となるためと考えられる。

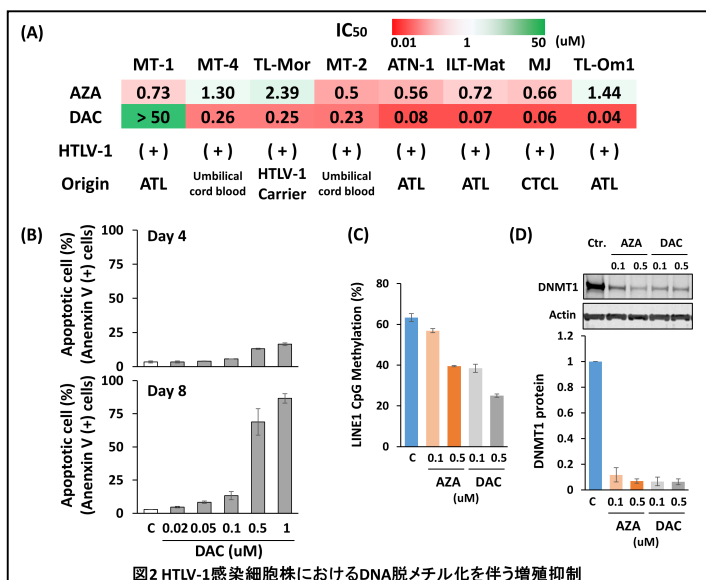


図2 HTLV-1感染細胞株におけるDNA脱メチル化を伴う増殖抑制

(2) in vitro の解析から、DAC による DNA の脱メチル化を伴う、抗 ATL 効果が認められたため、続いて xenograft マウスモデルを用いた in vivo の解析を行った。免疫不全マウスである BRJ マウスの皮下に MT-2 株を移植すると、10 日間ほどで腫瘍サイズがおおよそ 100 mm<sup>3</sup> になる。その時点からデシタピンを 1.25 mg/kg で週 2 投 腹腔内投与すると、投与 1 週間後から腫瘍の増殖は完全に停止した(図 3 A)。移植 22 日後に解剖し、腫瘍組織から DNA を抽出し、LINE-1 の CpG メチル化を測定したところ、DAC 投与により優位にメチル化が減少していた(図 3B)。また、慢性型 ATL 患者由来の PBMC を腹腔内に移植する別のモデルにおいても DNA 脱メチル化剤による抗腫瘍効果が認められた。これら(1)、(2)の結果より、DNA 脱メチル化剤は DNA の脱メチル化を伴い、HTLV-1 感染細胞・ATL 細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。

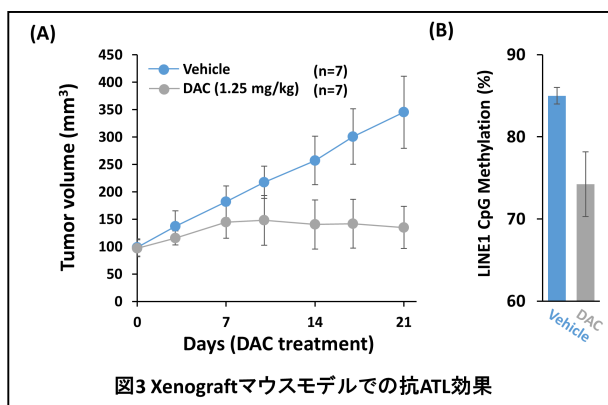
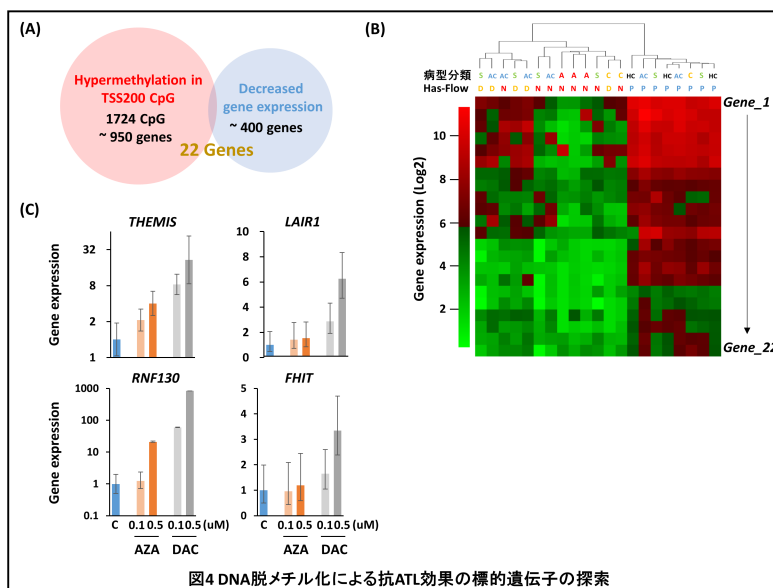


図3 Xenograftマウスモデルでの抗ATL効果

(3) 脱メチル化剤が抗腫瘍効果を示す際に DNA メチル化状態が変化(正常化)する DNA 領域に含まれる遺伝子の中で、実際に遺伝子発現量が変化し、機能的に抗 ATL 効果に寄与する遺伝子を明らかにするため、HTLV-1 感染細胞を単離し、遺伝子発現解析したデータ(GSE55851)を NCBI の GEO データベースよりダウンロードし、正常 T 細胞では発現しており、HTLV-1 感染細胞で発現が抑制されているおよそ 400 の遺伝子を抽出した。HTLV-1 特異的 DNA メチル化異常亢進領域に含まれるおよそ 900 の遺伝子と比べ、共通の 22 遺伝子を同定した(図 4 A)。選び出された 22 遺伝子の発現プロファイルを用いて階層的クラスタリング解析を行うと DNA メチル化状態と同様に病態を反映する(図 4 B)ことから、これらの遺伝子群は DNA のメチル化亢進により発現が抑制され、それにより HTLV-1 感染細胞の増殖、つまりは ATL の発症・病態の進行に寄与していると考えられる。実際に 22 遺伝子の中には、T 細胞の増殖を促す T cell receptor シグナル経路(TCR 経路)を抑制する因子(THEMIS, LAIR1, RNF130)や腫瘍抑制因子として報告されている C2orf40 や FHIT が含まれている。THEMIS や LAIR1 は臨床検体(HTLV-1 感染細胞)においてタンパク質量が減少しており、DNA 脱メチル化剤により遺伝子発現が回復することを細胞株を用いて確認した(図 4 C)。

(4) 以上の結果より、HTLV-1 感染細胞が増殖し、ATL を発症する際には特徴的な DNA メチル化異常が TCR 抑制因子 (THEMIS, LAIR1, RNF130) や腫瘍抑制因子 (C2orf40 や FHIT) に蓄積することで、growth advantage を獲得すると考えられる。また、それらのメチル化亢進異常を標的にした DNA 脱メチル化剤は DNA の脱メチル化、遺伝子発現のリプログラミングを介して抗腫瘍効果を発揮すると予想される。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

**渡邊達郎**、木村晋也 (2019) 成人 T 細胞白血病・リンパ腫におけるエピジェネティック異常を標的にした創薬: 血液内科 78: 117-121

<http://www.kahyo.com/item/KS201901-781>

Sueoka E, **Watanabe T**, Mashima T, Shirakami Y, Komori A, Matsuo K, Yoshikawa HY, Cho KA, Park TJ, Seimiya H, Kim EG, Suganuma M, Chung J. Meeting report of the 14th Japan-Korea joint symposium on cancer and aging research: current status of translational research and approaches to precision medicine. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2019 doi: 10.1007/s00432-019-02887-2.

〔学会発表〕(計 7 件)

**Watanabe T**, Ureshino H., Kurahashi Y., Fukuda-Kurahashi Y., Yamashita S., Ushijima U., Okada S., Sueoka E., Kimura S.; Aberrant Regional DNA Hypermethylation as a Preventive and Therapeutic Target for Adult T-cell Leukemia-Lymphoma (60th ASH) 2018 年

**Watanabe T**, Ureshino H., Kurahashi Y., Yamashita S., Ushijima T., Sueoka E., Kimura S.; Abnormal DNA Methylation Patterns in Adult T-cell Leukemia-Lymphoma Reflected Disease Status as a Therapeutic Target (The 9th JSH International Symposium) 2018 年

**渡邊達郎**、嬉野博志、倉橋祐樹、末岡榮三朗、木村晋也；成人 T 細胞白血病/リンパ腫における DNA メチル化異常と脱メチル化剤による抗腫瘍効果 (第 23 回日本がん分子標的治療学会学術集会) 2018 年

**渡邊達郎**、嬉野博志、山下聡、牛島俊和、末岡榮三朗、木村晋也；成人 T 細胞白血病/リンパ腫における転写開始点近傍の異常な DNA メチル化亢進は治療標的になり得る (第 77 回日本癌学会学術総会) 2018 年

**渡邊達郎**、嬉野博志、倉橋祐樹、山下聡、牛島俊和、末岡榮三朗、木村晋也；DNA メチル化異常を標的とした成人 T 細胞白血病/リンパ腫の新規治療法の可能性 (第 80 回日本血液学会学術集会) 2018 年

Nakamura H., **Watanabe T**, Sato A., Yamashita S., Ushijima T., Sueoka E.: Epigenetic Regulation of the Genes in Indolent Types of Adult T-cell leukemia/Lymphoma Analyzed by Comprehensive DNA Methylation Array (The 18th International Conference on Human Retrovirology) 2017 年

中村秀明, 佐藤明美, **渡邊達郎**, 板村英和, 末岡榮三朗；HTLV-1 感染者の臨床経過モニタリングにおける HAS-Flow 法の有用性の検討 (第 4 回日本 HTLV-1 学会学術集会) 2017 年

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称：成人 T 細胞白血病/リンパ腫の検出方法

発明者：**渡邊達郎**、末岡榮三朗、木村晋也、嬉野博志

権利者：国立大学法人佐賀大学

種類：特許

番号：特願 2019-037246

出願年：2019

国内外の別：国内

名称：DNMT 阻害剤の用途

発明者：酒向孫市、杉山晋平、倉橋祐樹、脇田弘臣、木村晋也、渡邊達郎、嬉野博志

権利者：大原薬品工業株式会社、国立大学法人佐賀大学

種類：特許

番号：特願 2018-027324

出願年：2018

国内外の別：国内

## 6 . 研究組織

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：木村 晋也、末岡 榮三朗

ローマ字氏名：(KIMURA, shinya)、(SUEOKA, eisaburo)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。