

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16580

研究課題名(和文) CD30陽性HTLV-1感染細胞のゲノム異常によるATL発症バイオマーカーの同定

研究課題名(英文) Analysis of ATL progression by CD30 signaling and its biomarkers

研究代表者

中島 誠 (Nakashima, Makoto)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任研究員

研究者番号：30733232

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)：CD30シグナルによるATLの病態進展の寄与についてゲノムレベルで検討した。CD30シグナルは細胞内の活性酸素種(ROS)を増加させ、DNA二本鎖切断を亢進させた。さらにCD30シグナルは染色体構造変異を高頻度に誘導することが確認された。つまりCD30シグナルは染色体不安定性を高めることを示している。ATL患者体内のCD30+ATL細胞も染色体不安定性が高いという結果を同時に得ていることから、CD30シグナルにより生じる結果と一致する。これらの一連の結果は、CD30シグナルがATLの病態進展にゲノムレベルで寄与し得ることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、CD30シグナルがATLの病態進展にゲノムレベルで寄与し得ることを示した。したがってCD30は急性型リンパ腫型などのアグレッシブタイプだけでなく、くすぶり型、慢性型を含む早期癌の段階においても治療標的になり得ることが示唆された。抗CD30抗体医薬であるブレンツキシマブ・ベドチンの有効な投与方法開発に資する研究成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that a biological link between the expression of CD30, which serves as a marker for ATL progression, and the actively proliferating fraction of HTLV-1-infected cells. To further pursue this finding, we examined whether genomic aberrations are caused by CD30 signaling.

In this study, we found that CD30 signaling induced DNA double-strand breaks (DSBs) via an increase of intracellular reactive oxygen species (ROS) and an accumulation of chromosomal aberrations.

Furthermore, CGH analysis revealed that CD30+ATL cells accumulated chromosomal aberrations, focal gains and losses, compared with CD30-ATL cells in ATL individuals.

Taken together these results, accumulation of chromosomal aberrations in patient derived CD30+ATL cells indicates high chromosomal instability, suggesting that CD30 signaling triggers it.

研究分野：がん、細胞生物学、分子生物学、腫瘍生物学

キーワード：CD30 CD30シグナル ATL 染色体不安定性 HTLV-1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞白血病リンパ腫(ATL)は、ヒト白血病ウイルス 1 型(HTLV-1)が主に母乳感染により T 細胞へ感染し、約 50 年を経て約 3~5%の感染者が発症する T 細胞性腫瘍である。我が国は世界の HTLV-1 集積地域の 1 つであり、約 100 万人のキャリアが西南日本を中心に存在し、年間約 1000 人が ATL を発症する。HTLV-1 感染者の大部分は無症候性であるが、約 3~5%の感染者が ATL を発症する。ATL は病態により、くすぶり型、慢性型、急性型、リンパ腫に分けられ、早期癌のくすぶり型、慢性型は比較的緩徐な病態進行を辿る。一方、急性型およびリンパ腫はひとたび発症すると予後不良の疾患であり、大量化学療法および造血幹細胞移植等が実施されているが、早期の再発、難治性のため最も予後の悪い造血器腫瘍性疾患となっている。したがって ATL に対する新たな治療法の開発は、本研究分野において最も重要な課題と言える。新たな治療法開発のために解決すべき課題は、病態進行や ATL 発症リスクに関わるバイオマーカーの同定、感染者の中の高リスク者の判定、特異性の高い効果的な治療法の開発であり、それを検討するためには未だ不明である HTLV-1 感染者の病態進行メカニズムの解明が重要である。

これまでの我々の研究から、CD30 という活性化型細胞膜分子が ATL の病型の進展に関与し得ることを突き止めた。CD30 は一部のリンパ系腫瘍でのみ発現が認められる特異性の高い抗原で、健常人の末梢血細胞には発現しない。一方で、HTLV-1 キャリアの末梢血においては、病態の進行と共に CD30 を発現する感染細胞数が増加する。機能的意義を検討したところ、これらの細胞は末梢血中にも関わらず細胞周期活性を表す Ki-67 陽性を示し、慢性型の時点で染色体異常を含む集団であることが明らかとなった。また CD30 リガンドを介した CD30 刺激は、感染細胞の増殖、花弁様細胞へのトランスフォーム、細胞分裂異常を介した染色体異常を誘発させることも明らかにした。さらに抗がん剤が付加された抗 CD30 抗体医薬(プレントキシマブ・ベドチン)は CD30 陽性感染細胞を末梢血から除去できることを *in vitro* で示した(Nakashima M et al., Clin Cancer Res. 2018)。これらの研究から CD30 陽性 HTLV-1 感染細胞が病態の進展に直接関与しうることが示唆された。しかしながら、これらの細胞の染色体構造および遺伝子レベルの変異の有無については不明である。

2. 研究の目的

CD30 陽性 HTLV-1 感染細胞の全ゲノムにわたる染色体構造とエキソーム領域の遺伝子配列を解析し、この細胞集団のゲノム異常の特徴を明らかにする。さらに CD30 リガンドを介した CD30 シグナルが、どのような機構によりゲノム異常を促進するか明らかにする。すなわち、CD30 シグナルが ATL 発症のオンコシグナルとしてゲノムレベルで関与し得るか解析する。得られた知見から CD30 が ATL の治療標的となり得ること、さらに実臨床で使用されている CD30 抗体医薬(プレントキシマブ・ベドチン)の有効性について考察する。

3. 研究の方法

(1) CD30 陽性 HTLV-1 感染細胞の CGH (比較ゲノムハイブリダイゼーション)解析とエキソーム解析 (Whole exome sequencing)

[CGH 解析]

慢性型、急性型の ATL 患者からフローサイトメトリーにより分画した CD30 陽性 HTLV-1 感染細胞のゲノムを抽出する。HTLV-1 感染マーカーとして抗 CADM1 抗体を使用し、CD30 陽性 HTLV-1 感染細胞は、CD4+CADM1+CD25+CD30+細胞とする。比較用サンプルとして CD30 陰性 HTLV-1 感染細胞 (CD4+CADM1+CD25+CD30-細胞)、HTLV-1 非感染リンパ球 (CD4+CADM1-CD25-CD30-細胞)を同時に分取する。CGH 解析には SurePrint G3 Human CGH+SNP マイクロアレイ、DNA マイクロアレイスキャナシステム (G2505C)および解析ソフトウェアである Agilent Genomic Workbench (全て Agilent Technologies 社)を使用する。検体数は各病型につき 4 例使用した。染色体構造変異の集積領域の同定と同時に、統計学的解析により CD30 陽性細胞と CD30 陰性細胞の染色体構造変異数を比較検討する。

[エキソーム解析]

上記の ATL 患者からフローサイトメトリーにより分画した CD30 陽性 HTLV-1 感染細胞を抽出し、SureSelect Kit (Agilent technologies 社)によりエキソーム領域のゲノム DNA を分画する。NovaSeq6000 によりエキソームシーケンシングを行い、アライメント解析後、比較用サンプルを用いて遺伝子変異の同定を行う。比較用サンプルとして CD30 陰性 HTLV-1 感染細胞、HTLV-1 非感染リンパ球を並行して処理する。検体数は 4 症例を解析し、CD30 陽性 HTLV-1 感染細胞の変異の同定および統計学的解析による CD30 陽性細胞と CD30 陰性細胞の遺伝子変異数を比較検討し、CD30 陽性 HTLV-1 感染細胞の変異の蓄積を検討する。

(2) CD30 リガンドを介した CD30 シグナルの機能解析

[Intracellular ROS (Reactive oxygen species) の測定]

ATL 細胞株に対して CD30 リガンドで刺激した際の Intracellular ROS の変動を、ROS インジケ

ーター (CellRox) を利用し評価した。ポジティブコントロールとして、過酸化水素を用い、実験系が適切に機能するか検討した。

[Comet assay]

CD30 リガンドによる刺激により、DNA double strand breaks (DSBs) が惹起されるか細胞単位で DNA 損傷度を測定するため、Alkaline/Neutral Comet assay を実施した。ATL 細胞株に対して CD30 リガンドで刺激し、DNA 損傷度を表す Comet tail によりその影響を比較検討した。ポジティブコントロールとして、過酸化水素を用い、実験系が適切に機能するか検討した。

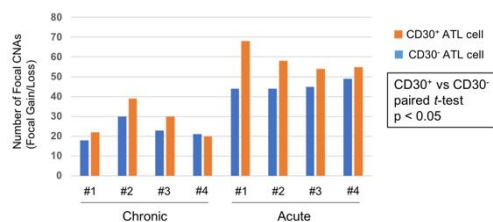
[CD30 刺激による染色体構造変異解析]

ATL 細胞株へ CD30L により慢性的な CD30 刺激を 72 時間与え、十分に DSBs を惹起する。その後 Growth advantage を考慮に入れて 17 日間培養維持し、出来上がった ATL 細胞株集団のゲノムを抽出する。刺激前のサンプルをリファレンスとして CGH 解析を行い、CD30 刺激群と mock 群の染色体構造変異数を統計学的解析により比較検討した。

4. 研究成果

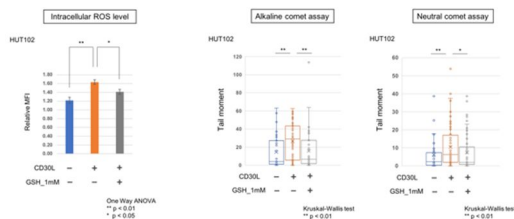
ATL 患者由来末梢血単核球 (PBMC) 8 症例 (急性型 4 症例、慢性型 4 症例) を準備し、CD30+ATL 細胞、CD30-ATL 細胞および正常リンパ球をセルソーターにより分画し、染色体構造解析 (CGH) および遺伝子変異解析 (Whole exome sequencing) を実施した。CGH の結果から、CD30+ATL 細胞は、CD30-ATL 細胞と比べて、有意に染色体構造変異 (Gain/Loss) を蓄積していることが明らかとなった (図 1)。したがって CD30+ATL 細胞は染色体不安定性が高いと考えられる。また CD30 発現で分けたそれぞれの ATL 細胞集団は、共通の変異を多数保有していることから、同じ由来の腫瘍細胞であることが確認された。エクソーム解析による遺伝子変異数の比較では、CD30+ATL 細胞で生じている変異に増加傾向がみられたが、より顕著な差を認めた染色体構造変異に注目してさらに検討を進めた。

図1. CD30+ATL細胞とCD30-ATL細胞の染色体構造変異数(Gain/Loss)



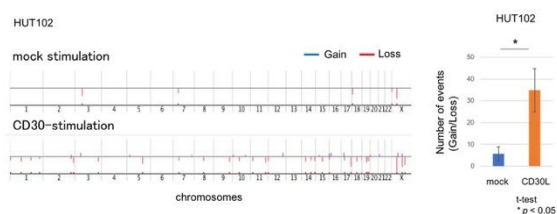
染色体構造変異を生じさせる分子メカニズムを明らかにするために、CD30 シグナルによる染色体への影響について検証した。ゲノムに影響を与え、変異源となりえる内在性因子は活性酸素種に限定される。そこで CD30 シグナルによる ROS の発生を起点とした染色体構造変異の誘導という仮説を立て、検証実験を実施した。ATL 細胞株に対して CD30 刺激を加えたところ、細胞内 ROS インジケータの蛍光強度が増加し、ROS スカベンジャーである GSH を同時に添加することで、それらをキャンセルすることが可能であった。この条件で、Alkaline/Neutral comet assay を行ったところ、CD30 刺激により Comet tail が増加し、GSH により Comet tail の増加がキャンセルされた。従って、CD30 シグナルは ATL 細胞株において内在性 ROS の増加を誘導し、さらに ROS を介して、DSBs を亢進することが明らかとなった (図 2)。CD30 を発現していないリンパ腫細胞株をネガティブコントロールとし、CD30L により ROS の上昇および DSBs の亢進が起こらないことを確認している。

図2. CD30シグナルによるROSの誘導とDSBsの亢進



DSBs の亢進は染色体不安定性の原因となり得る。そこで染色体構造解析 (CGH) を応用して、CD30 シグナルによる染色体構造への影響を検証した。ATL 細胞株に対して 72 時間慢性的な CD30 刺激を与え、十分に DSBs を惹起する。その後 Growth advantage を考慮に入れて 17 日間培養維持し、出来上がった ATL 細胞株集団のゲノムを抽出した。刺激前のサンプルをリファレンスとして CGH 解析を行った結果、CD30 シグナルは染色体構造変異 (Gain and Loss) を高頻度に誘導することが確認された (図 3)。この結果は、CD30 シグナルにより染色体不安定性が高まることを示している。上記の結果は、ATL 患者体内で生じている CD30+ATL 細胞の染色体不安定性とリンクする。

図3. CD30シグナルによる染色体構造変異の誘導



5. まとめ

これまでの研究から、CD30 シグナルは ATL 細胞の増殖シグナルであることを示している。本研究結果から、CD30 シグナルは増殖シグナルであると同時に、ROS を介して DSBs を増加させ、染色体不安定性を高めることを明らかにした。これらの一連の結果は CD30 シグナルが ATL の病態の進展にゲノムレベルで寄与し得ることを示している。したがって、CD30 発現 ATL 細胞は早期癌であるくすぶり型、慢性型においても速やかに排除する必要がある治療標的であり、CD30 発現 ATL 細胞に効果を示すプレントキシマブ・ベドチンは ATL の治療において有効であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nakashima Makoto, Watanabe Mariko, Nakano Kazumi, Uchimaru Kaoru, Horie Ryouichi	4. 巻 112
2. 論文標題 Differentiation of Hodgkin lymphoma cells by reactive oxygen species and regulation by heme oxygenase 1 through HIF 1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14890	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Okuma Kazu, Kuramitsu Madoka, Niwa Toshihiro, Taniguchi Tomokuni, Masaki Yumiko, Ueda Gohzoh, Matsumoto Chieko, Sobata Rieko, Sagara Yasuko, Nakamura Hitomi, Satake Masahiro, Miura Kiyonori, Fuchi Naoki, Masuzaki Hideaki, Okayama Akihiko, Umeki Kazumi, Yamano Yoshihisa, Sato Tomo et al.	4. 巻 17
2. 論文標題 Establishment of a novel diagnostic test algorithm for human T-cell leukemia virus type 1 infection with line immunoassay replacement of western blotting: a collaborative study for performance evaluation of diagnostic assays in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Retrovirology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12977-020-00534-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Saito Masumichi, Hasegawa Hiroo, Yamauchi Shunsuke, Nakagawa So, Sasaki Daisuke, Nao Naganori, Tanio Michikazu, Wada Yusaku, Matsudaira Takahiro, Momose Haruka, Kuramitsu Madoka, Yamagishi Makoto, Nakashima Makoto, Nakahata Shingo, Iha Hidekatsu, Ogata Masao, Imaizumi Yoshitaka, Uchimaru Kaoru, et al.	4. 巻 112
2. 論文標題 A high-throughput detection method for the clonality of Human T-cell leukemia virus type-1-infected cells in vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 300 ~ 306
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-020-02935-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikebe Emi, Matsuoka Sahoko, Tezuka Kenta, Kuramitsu Madoka, Okuma Kazu, Nakashima Makoto, Kobayashi Seiichiro, Makiyama Junya, Yamagishi Makoto, Oyadomari Seiichi, Uchimar Kaoru, Hamaguchi Isao	4. 巻 4
2. 論文標題 Activation of PERK-ATF4-CHOP pathway as a novel therapeutic approach for efficient elimination of HTLV-1?infected cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 1845 ~ 1858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2019001139	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hijikata Yasuki, Yokoyama Kazuaki, Yokoyama Nozomi, Matsubara Yasuo, Shimizu Eigo, Nakashima Makoto, Yamagishi Makoto, Ota Yasunori, Lim Lay Ahyoung, Yamaguchi Rui, Ito Mika, Tanaka Yukihisa, Denda Tamami, Tani Kenzaburo, Yotsuyanagi Hiroshi, Imoto Seiya, Miyano Satoru, Uchimar Kaoru, Tojo Arinobu	4. 巻 4
2. 論文標題 Successful Clinical Sequencing by Molecular Tumor Board in an Elderly Patient With Refractory S?zary Syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JCO Precision Oncology	6. 最初と最後の頁 534 ~ 560
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1200/P0.19.00254	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamagishi Makoto, Hori Makoto, Fujikawa Dai, Ohsugi Takeo, Honma Daisuke, Adachi Nobuaki, Katano Harutaka, Hishima Tsunekazu, Kobayashi Seiichiro, Nakano Kazumi, Nakashima Makoto, Iwanaga Masako, Utsunomiya Atae, Tanaka Yuetsu, Okada Seiji, Tsukasaki Kunihiro, Tobinai Kensei, Araki Kazushi, et al.	4. 巻 29
2. 論文標題 Targeting Excessive EZH1 and EZH2 Activities for Abnormal Histone Methylation and Transcription Network in Malignant Lymphomas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 2321 ~ 2337.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.10.083	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Makiyama Junya, Kobayashi Seiichiro, Watanabe Eri, Ishigaki Tomohiro, Kawamata Toyotaka, Nakashima Makoto, Yamagishi Makoto, Nakano Kazumi, Tojo Arinobu, Watanabe Toshiki, Uchimar Kaoru	4. 巻 110
2. 論文標題 CD4 + CADM1 + cell percentage predicts disease progression in HTLV 1 carriers and indolent adult T cell leukemia/lymphoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3746 ~ 3753
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14219	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中島 誠
2. 発表標題 CD30シグナルによるATL病態進展機序の解析
3. 学会等名 コホート・生体試料支援プラットフォーム(CoBiA) 令和2年度若手支援研究成果発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島 誠
2. 発表標題 Differentiation of HL cells by ROS and its regulation by heme oxygenase-1 through HIF-1
3. 学会等名 第82回 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中島 誠
2. 発表標題 Differentiation of HL cells by ROS and its regulation by heme oxygenase-1 through HIF-1
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島 誠
2. 発表標題 CD30シグナルによるATL病態進展機序の解析
3. 学会等名 新学術領域研究「学術研究支援基盤形成」コホート・生体試料支援プラットフォーム 令和元年度 若手支援研究成果発表会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------