

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）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：基盤研究（C）
 研究期間：2010 年度～2012 年度
 課題番号：22591028
 研究課題名（和文） マルチカラー FACS による成人 T 細胞白血病細胞の解析とハイリスク
 キャリアの同定
 研究課題名（英文） Analysis of adult T-cell leukemia cells using multi-color flow
 cytometry can detect high risk asymptomatic HTLV-1 carriers to
 progress into adult T-cell leukemia.
 研究代表者 内丸 薫 (Kaoru Uchimaru)
 東京大学・医科学研究所・准教授
 研究者番号：60251203

研究成果の概要（和文）：本研究は成人 T 細胞白血病細胞が CADM1+/CD7⁻の集団として同定され、治療経過のモニターで有用であること、HTLV-1 感染細胞は腫瘍化の過程で CADM1⁻/CD7⁺、CADM1+/CD7dim、CADM1+/CD7⁻と変化し、これらの発現パターンにより中間段階の細胞を純化できること、ハイリスクキャリアではこれら中間段階の細胞が増加していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：ATL cells can be detected as CADM1+/CD7⁻ cells using multi-color flow cytometry and this analysis is helpful for monitoring therapeutic effect for ATL. This technique can purify the cells in intermediate state of oncogenesis of HTLV-1 infected cells to ATL as CADM1+/CD7dim cells. These CADM1+/CD7dim cells is detected in the peripheral blood of a part of asymptomatic carriers at high risk to develop ATL.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：血液内科学

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：HTLV-1, ATL, FACS, TSLC1, CADM1, CD7

1. 研究開始当初の背景

我々は研究開始までに multi-color FACS を用いて急性型成人 T 細胞白血病（以下 ATL）の腫瘍細胞を CD4 陽性細胞中の CD3^{dim}/CD7^{low} 細胞集団として検出できることを見だしていたが、そこで見られる少数の CD3^{dim}/CD7^{dim} の集団が HTLV-1 感染細胞が腫瘍化する途中過程の細胞である可能性を想定した。予備的検討でくすぶり型、慢性型などの indolent ATL の解析を行ったとこ

ろ、CD3^{pos}/CD7^{pos} から CD3^{dim}/CD7^{dim}、CD3^{dim}/CD7^{neg} へと連続的に分布し、キャリアから Indolent ATL、aggressive ATL への進行を反映することが期待され、これらの解析が形態的に時に診断の難しいくすぶり型の診断、さらにはくすぶり型に近い high risk キャリアの同定に有用であることが期待され、またこれらの細胞集団の解析は HTLV-1 感染細胞の多段階発癌の過程における変化の解析に極めて有用である可能性が期待さ

れた。

2. 研究の目的

CD3/CD7 の発現を指標とする multi-color FACS の系を用いて、HTLV-1 キャリアの中からハイリスクグループを簡便にスクリーニングする系を確立することを目的とする。合わせてこの系による ATL 各病型の発現パターンを確立し、くすぶり型に特異的に見られると考えられる CD3^{dim}/CD7^{dim} 分画の ATL 発症における意義を明らかにする。また、この系による急性型 ATL の治療経過の評価を確立する。

3. 研究の方法

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。

1) HTLV-1 キャリア、ATL 患者末梢血の FACS 解析：東大医科学研究所附属病院外来、入院患者のうち HTLV-1 キャリア、ATL 患者計 140 名、健康人ボランティア 6 名から末梢血単核球を分離、各種抗体で染色した上で FACSaria で解析、ソーティングを行った。

2) clonality 解析：ソーティングした各細胞集団から DNA を抽出、inverse PCR により clonality の解析を行った。

3) 発現アレイ解析：ソーティングした細胞から 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) microRNA31 の定量：ソーティングした細胞集団から RNA を抽出し、MicroRNA assays により miR31 の定量を行い RNU48 で補正、比較した。

4. 研究成果

1) CD3/CD7 の発現に基づく HTLV-1 感染細胞、ATL 細胞の解析

① 急性型 ATL 細胞の解析

Multi-color FACS により急性型 ATL 患者末梢血 CD4⁺細胞の CD3/7 の発現を検討した。Fig. 1 に示すように CD3/CD7 の発現により 3 つの集団に分けられ、各集団をソーティングして形態を観察すると CD3^{dim}/CD7⁻分画に flower cell

が高度に集積し、inverse PCR の解析の結果 Fig. 2 に示す通り、この集団は monoclonal な集団が major と考えられた。この結果は TCR レパトア解析によっても確認された (Fig. 3)。

CD3/7 multi-color FACS の治療効果モニターにおける有用性について検討した。Fig. 4 に示す通り、治療有効例では Fig. 4 に示す通り、末梢血中 ATL 細胞の変化を客観的に評価することが可能であった。

Fig. 1

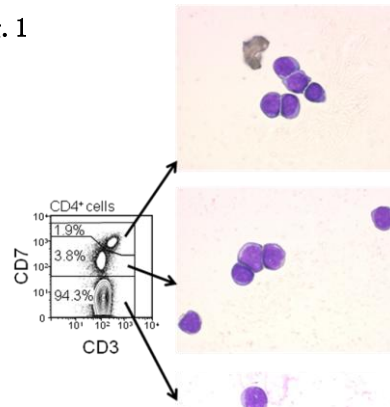


Fig. 2

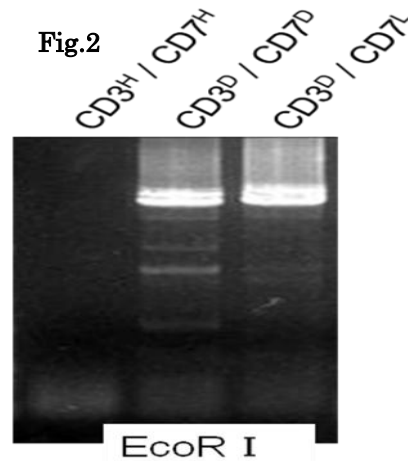


Fig. 3

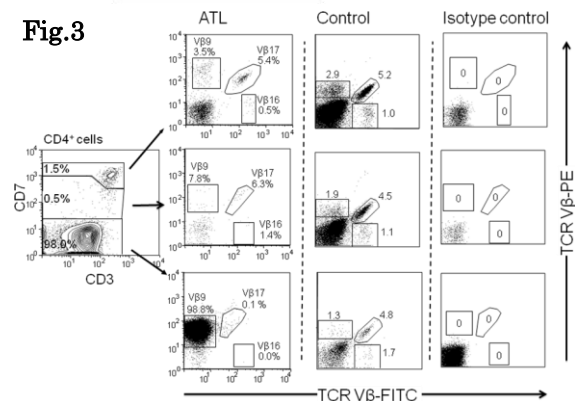
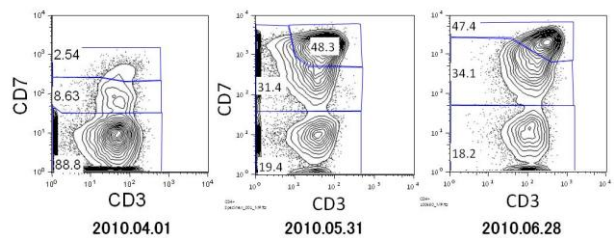
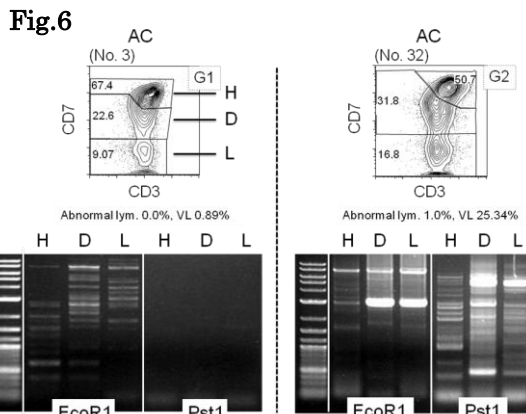
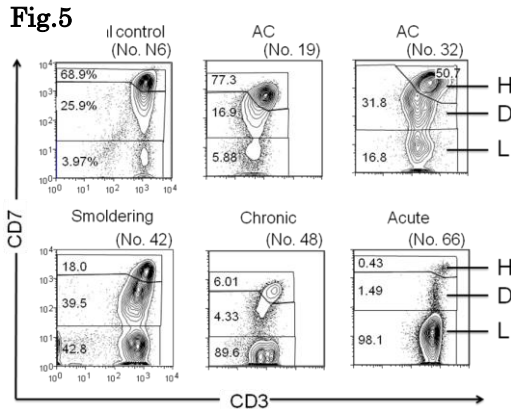


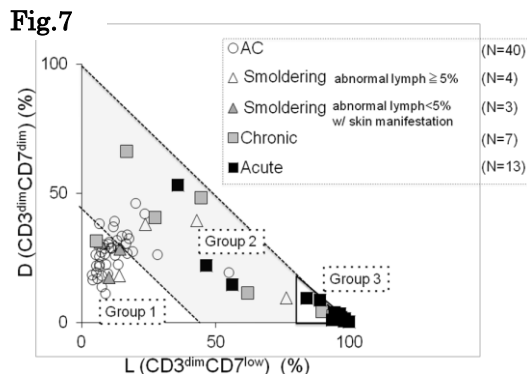
Fig. 4 Case 1 74Y F-1



②indolent ATL、HTLV-1 キャリアの解析
 Fig.1 に示す通り急性型症例の末梢血に CD3dim/CD7dim の集団が見られ、この集団も monoclonal な細胞が major な集団と考えられ、かつ CD3dim/CD7- と同一のクローンと考えられた (Fig. 2)。この結果は HTLV-1 感染細胞が CD3dim/CD7dim の段階を経て CD3dim/CD7- に clonal evolution して行くことを示唆する。そこで HTLV-1 キャリア、indolent ATL の解析を行った (Fig. 5)。



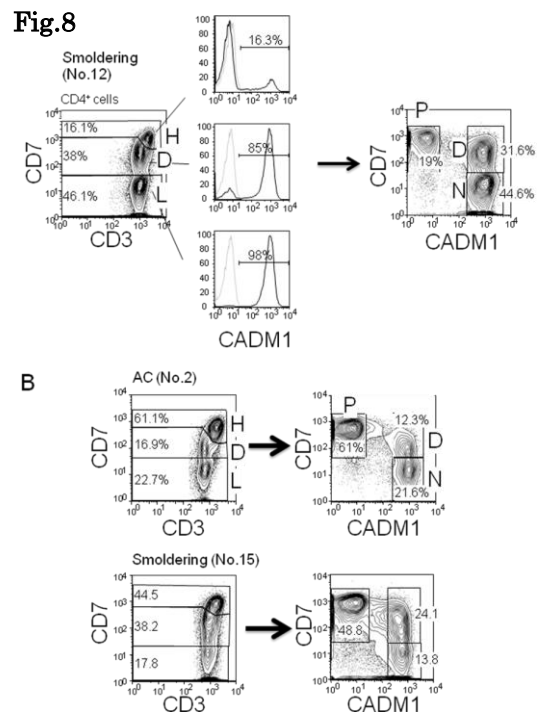
キャリアにおいても CD3dim/CD7dim、CD3dim/CD7- の集団が増加している症例が見られ、これらの症例では、inverse PCR による解析でこの集団が主に monoclonal に増殖している細胞が major な集団であることが示され (Fig. 6)、末梢血中プロウイルス量 (PVL) も高かった。Indolent ATL 症例の解析結果も含めて CD3dim/CD7dim、CD3dim/CD7- 集団の比率を 2 次元プロットで展開すると (Fig. 7)、こ



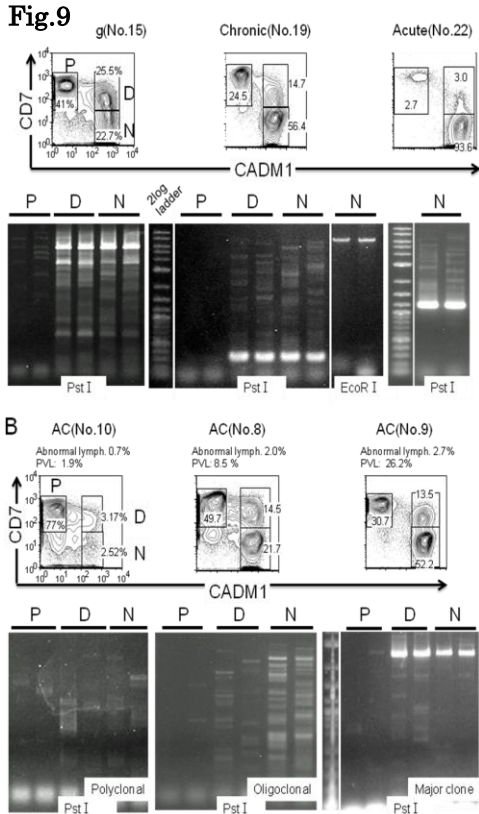
のプロット上において、キャリアの段階から病態の進行に伴って右上にシフトし、さらに aggressive type に進行するにつれ右下にシフトする変化をすることが明らかになった。このグラフにおいて indolent ATL の領域 (Group 2) にプロットされるキャリアは monoclonal に増殖している HTLV-1 感染細胞集団が存在し、PVL も高いハイリスクのキャリアであると考えられた。

2) TSLC1/CADM1 の導入

CD3/CD7 プロットの一つの問題点は、必ずしも ATL に特異的なマーカーではないため、正常 CD4 陽性 T 細胞でも一部 CD7 の発現が低下した細胞が存在して加齢とともに増加していき、また、HIV などのウイルス感染症や自己免疫疾患でも下がることあるためこれらの細胞の混入があることである。そこで ATL 細胞で ectopic に高発現していることが報告されている TSLC1/CADM1 を multi-color FACS の系に組み入れた。CADM1 は肺癌で見いだされた癌抑制遺伝子である。Fig. 8 に示す通り、CADM1 の発現はほぼ CD3dim/CD7dim、CD3dim/CD7- の集団に局限し、CD7、CADM1

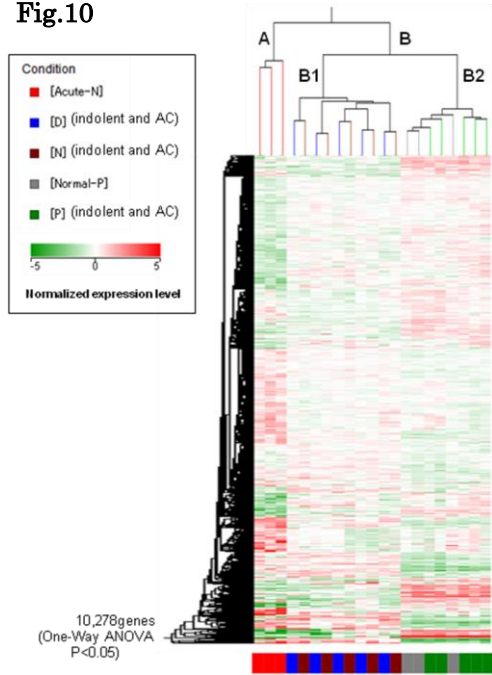


でプロットすると CD3/CD7 プロットでは症例によっては分離が不十分であった CD3+/CD7+ と CD3dim/CD7dim の分離が明瞭となった。Fig. 8 の D、N の集団をソーティングして real time PCR でプロウイルス量の定量を行い、また HTLV-1 プロウイルス全長をプローブとする FISH を行って解析した結果、これらの集団には非常に高純度に HTLV-1 感染細胞が純化されていた。CADM1/CD7 により HTLV-1 キャリア、indolent ATL、aggressive ATL 症例を分析した結果を Fig. 9 に示す。CADM1/CD7 プ



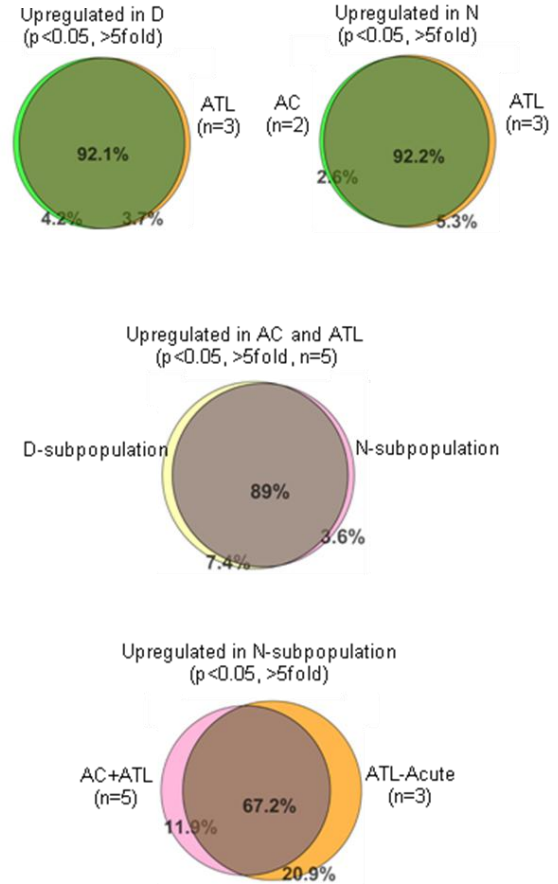
ロットは異常リンパ球の少ない安定したキャリアから異常リンパ球の増加したハイリスクキャリア、indolent ATL、aggressive ATLへの病態の進行を非常によく反映することが明らかになった。HTLV-1 キャリアの段階から病態の進行とともに増加してくる D、N の集団の意義を明らかにするため各タイプの P、

Fig.10



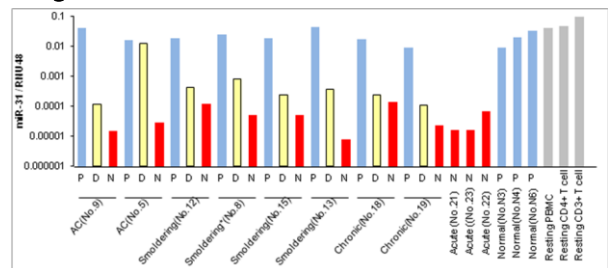
D、N の集団をソーティングし遺伝子発現アレイ解析を行った (Fig.10)。クラスター解析の結果、急性型の N で構成される A とその他の B に分かれ、B はさらにキャリアと indolent ATL の D、N からなる B1 とすべてのタイプおよび正常コントロールの P からなる B2 にクラスターされた。Fig.11 に示す通

Fig.11



り、キャリアの D、N と indolent ATL の D、N の遺伝子発現プロファイルは酷似し、D、N のプロファイルも同様であった。一方、急性型の N と indolent ATL の N には明瞭な違いが認められた。さらに ATL で高度に発現が低下

Fig.12

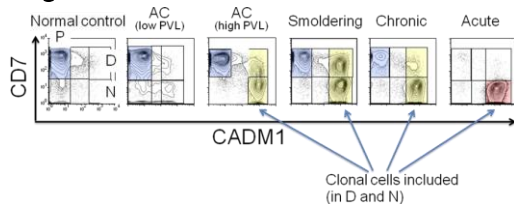


していることが報告されている miR31 の発現を検討して見ると D の集団ですでに P に比べて 2log 程度の低下がみられ、これらの結果からキャリアの段階から病態の進行とともに増加する CDM1+/CD7dim、および

CADM1+/CD7-の集団は HTLV-1 感染細胞が ATL へと腫瘍化して行く過程の中間段階の細胞と考えられ、CADM1/CD7 による HTLV-1 感染細胞の解析は HTLV-1 感染細胞の多段階発癌の過程の細胞の研究に非常に有用なツールとなり得ることが明らかになった。

今回の研究の結果明らかになった HTLV-1 感染細胞の多段階発癌過程を模式図にすると Fig. 13 のようにまとめることができる。

Fig.13



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, Uchimaruru K, 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. 査読あり
2. Ishigaki T, Isobe M, Kobayashi S, Yuji K, Ohno N, Watanabe N, Tojo A and Uchimaruru K. Development of peripheral T-cell lymphoma not otherwise specified in an HTLV-1 carrier. *Int J Hematol.* prepublished online 2013 DOI:10.1007/s12185-013-1314-z 査読あり
3. 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 Uchimaruru K. The CD3 versus CD7 plot in multicolor flow cytometry reflects progression of disease stage in patients infected with HTLV-1. *PLoS One* 8: e53728, DOI:10.1371/journal.pone.0053728, 2013 査読あり
4. Yamin Tian, Seiichiro Kobayashi, Nobuhiro Ohno, Masamichi Isobe, Mayuko Tsuda, Yuji Zaike, Nobukazu Watanabe, Kenzaburo Tani, Arinobu Tojo and Kaoru Uchimaruru 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.* 2011 102(3) :569-577. 査読あり

5. Makoto Yamagishi, Kazumi Nakano, Ariko Miyake, Tadanori Yamochi, Yayoi Kagami, Akihisa, Tsutsumi, Yuka Matsuda, Aiko Sato-Otsubo, Satsuki Muto, Atae Utsunomiya, Kazunari Yamaguchi, Kaoru Uchimaruru, Seishi Ogawa, and Toshiki Watanabe. Polycomb-Mediated Loss of miR-31 Activates NIK-dependent NF-κ B Pathway in Adult T-cell Leukemia and Other Cancers. *Cancer cell.* 2011 21(1):121-135 査読あり
6. Masako Iwanaga, Toshiki Watanabe, Atae Utsunomiya, Akihiko Okayama, Kaoru Uchimaruru, Ki-Ryang Koh, Masao Ogata, Hiroshi Kikuchi, Yasuko Sagara, Kimiharu Uozumi, Manabu Mochizuki, Kunihiro Tsukasaki, Yoshio Saburi, Masaomi Yamamura, Junji Tanaka, Yukiyoichi Moriuchi, Shigeo Hino, Shimeru Kamihira, and Kazunari Yamaguchi. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) proviral load and disease progression in asymptomatic HTLV-1 carriers: a nationwide prospective study in Japan. *Blood.* 2010 Aug 26;116(8):1211-9. 査読あり

[学会発表] (計 4 件)

1. Seiichiro Kobayashi et al. CD7 vs CADM1 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 京都 2012.10.19
2. 小林誠一郎ほか 患者検体を用いた CD7 と TSLC1/CADM1 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 2012.8.25
3. 小林誠一郎ほか、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 2011.9.18
4. Tian Y et al. 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. *ASH annual meeting.* 2010.12.6. Orland, USA

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

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：2013 年 2 月 25 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

内丸 薫 (Kaoru Uchimaru)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：60251203

(2) 研究分担者

渡辺 信和 (Nobukazu Watanabe)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：10334278

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

小林 誠一郎 (Kobayashi Seiichiro)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：70376622

渡邊 俊樹 (Toshiki Watanabe)

東京大学・新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：30182934

中野 和民 (Kazumi Nakano)

東京大学・新領域創成科学研究科・助教

研究者番号：60549591

山岸 誠 (Makoto Yamagishi)

東京大学・新領域創成科学研究科・

特任研究員

研究者番号：90625261