

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5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23701090

研究課題名（和文） 成人T細胞性白血病新規発症予測マーカーおよび新規治療標的分子の探索

研究課題名（英文） Quantitative proteome profiling to identify biomarkers and therapeutic targets for adult T-cell leukemia (ATL).

研究代表者

石原 誠人 (ISHIHARA MAKOTO)

独立行政法人理化学研究所・バイオマーカー探索・開発チーム・特別研究員

研究者番号：60581189

研究成果の概要（和文）：

成人T細胞性白血病 (ATL) はヒトリンパ球向性ウイルス1型 (HTLV-1) 感染によって引き起こされ、予後不良であるにもかかわらず効果的な診断戦略及び治療法は十分でない。本研究課題では HTLV-1 ウイルスが濃縮される CD4⁺CD25⁺CCR4⁺T 細胞サブセットを 29 血液検体より単離し、フォーカスド・プロテオミクスを展開した。検出された 14,064 ペプチドに対し 2 段階の統計解析を行った結果、交差検定において 92.2% の正答率で疾患判別が可能な 91 ペプチドを抽出し、診断マーカー及び治療標的の開発に結び付く 17 タンパク質の同定に至った。

研究成果の概要（英文）：

ATL is one of the most aggressive hematologic malignancies caused by human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infection. The prognosis of ATL is extremely poor; however, effective strategies for diagnosis and treatment have not been established. 2-step statistical analysis for 14,064 peptides detected through focused proteomic profiling of the HTLV-1 enriched CD4⁺CD25⁺CCR4⁺ T-cell subpopulation on 29 clinical cases were performed. 91 peptide determinants that statistically classified 4 clinical groups with an accuracy rate of 92.2% by cross-validation test were extracted, resulting in the identification of 17 classifier proteins which were potential diagnostic biomarkers and an attractive resource of therapeutic targets for ATL.

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	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：プロテオミクス、質量分析、ATL、HTLV-1、機械学習、

1. 研究開始当初の背景

HTLV-1はRNAレトロウイルスの一種でありヒトT細胞に主に感染する。主な感染経路は母乳を介した母子感染及び性交渉であり、近年本邦、特に大都市圏において感染が拡大している。HTLV-1感染者（キャリア）は全世界で1000～2000万人、本邦では約110万人と推定され、そのうち一定の割合の集団がATLやHTLV-1-associated myelopathy (HAM)といった疾患を発症する。ATLの生涯発症頻度は男性で6.6%、女性で2.2%であり、年間に約800人がATLを発症する。また、ATLは急性型、慢性型、リンパ腫型、くすぶり型に分けられ、特に急性型とリンパ腫型は4年生存率が約5%と極めて予後不良である（J Clin Exp Hematopathol, 2010, 50(1), 9）。現在ATLの診断には①臨床状態（多臓器浸潤など）、②検査所見（LDH高値、高カルシウム血症など）、③抗HTLV-1抗体陽性、④CD4⁺T細胞の増加、⑤サイトスピン像などの情報が用いられるが、いずれもATL特異的な診断基準ではなく、必ずしもATLの早期発見、予防に繋がる所見ではない。また、ATLの治療に関しては基本的に急性型、リンパ腫型、および予後不良因子を含む慢性型が対象となり、多剤併用化学療法あるいは骨髄移植が選択肢となる。しかし現行の多剤併用治療法では平均生存期間が概ね1年以下であり、生存期間の延長が報告されている骨髄移植に関しても、ATL発症平均が60歳を超えており、適応外になることが多い。これに対し近年新規ATL治療薬として注目される抗CCR4抗体による治療はPhase1試験において奏効率31.6%（J Clin Oncol, 2010, 28(9), 1591）を記録しており、亜硫酸ジドブジン/IFN- α による抗ウイルス療法との併用治療によって慢性ATLにおいては100%の奏効率が報告されるなど治癒率の改善が期待される新規治療法も増えてきていた（第49回米国血液学会）。しかしいずれもATL、特に急性型、リンパ腫型ATLの克服という観点においては不完全であり、依然抜本的な治療法が確立されていなかった。以上の背景から、HTLV-1キャリアに対するATL発症リスク診断が可能なバイオマーカーや新規治療標的分子の同定は急務であり、本邦においても2010年9月、首相官邸においてHTLV-1特命チームが発足し、HTLV-1感染予防や、関連疾患に対する診断法、治療法の開発が加速された。

2. 研究の目的

本研究では、最新鋭の質量分析器を使ったラベルフリー定量解析と、定量プロテオームサーバープラットフォームExpressionistを組み合わせ、ATL患者由来T細胞からATLの発症予測バイオマーカー、さらに新規治療標的分子となり得るタンパク質を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

29症例（非感染健常者6例、無症候HTLV-1キャリア5例、ATL患者及びHTLV-1関連脊髄症（HAM/TSP）患者各9例）の末梢血単核球より単離されたCD4⁺CD25⁺CCR4⁺T細胞サンプルに対しトリプシン消化を施し、QSTAR-Elite ESI-Qq-TOF質量分析計にてラベルフリー定量解析を行った。得られた質量分析データを大容量・高速解析が可能であるExpressionistプロテオームサーバーに直接ロードし、各サンプル1枚の2D peptide mapに変換した。次にExpressionist RefinerMSモジュールを用いて、ノイズサブトラクション、29症例の2D peptide mapのアライメントなどのプロセッシングを行い、相対定量を行った。定量結果はシームレスにExpressionist Analystモジュールに移行され、サンプル間の総シグナル強度標準化を行った後、2段階の統計解析を行った。この内同定された診断マーカー及び治療標的と目される候補タンパク質に対し、ATL細胞株を使い機能解析を行った。

4. 研究成果

ラベルフリー定量解析後にRefinerMSモジュールで行ったデータ処理の結果、14,064ペプチドを2D peptide map上にて検出した。各ペプチドには全症例における定量情報が付加されており、この定量値に対しAnalystモジュール上で一段階目の統計解析として非感染健常者群、無症候HTLV-1キャリア群、ATL患者群、HAM/TSP患者群の4群に対するKruskal-Wallis検定（ $p < 0.01$ ）を行い、1,107ペプチドを選出した。さらに2段階目にSupport Vector Machine-Recursive Feature Elimination (SVM-RFE)において正答率を基にランキングを行った結果、上位91ペプチドを選出した際のleave-one-out cross validationにおける正答率が92.2%であり、最も正答率が高かった。これよりOverall

Ranking 上位 91 ペプチドを最も疾患特異的に変動するペプチド群として定義し同定作業を行った所、17 タンパク質の同定に至った。

17 候補タンパク質には細胞死に関連した酵素・基質の対である Calpain-2 (CAN2) 及び α -II spectrin (SPTA2) が含まれており、患者検体における発現は負の相関にあった。

ATL 細胞株 (SO-4, KK1, KOB) において CAN2 を過剰発現したところ対照群と比較し SPTA2 の発現が低下すると同時に有意に細胞死が誘導された。また代謝に携わる酵素である GLYM を siRNA によって発現抑制すると ATL 細胞株の増殖が対照群と比較して有意に抑制された。これらのことから細胞死関連酵素である CAN2 の発現抑制及び代謝酵素 GLYM の発現増加が ATL の発症及び悪性化と関連している可能性が示唆された。

疾患を含めた生命現象の多くは最終的にタンパク質によって制御されており、タンパク質の量的変動に対する網羅的解析は病態解析において重要であると言える。プロテオミクスの手法は現在までに飛躍的な発展を遂げてきたが、感度とスループットに関して依然課題を抱えている。特に個体差の大きい臨床検体を用いた診断マーカー及び治療標的の探索は多検体処理が前提となるため、従来のシステムでは特にスループットの観点から解析が困難であった。本研究において我々は質量分析によって得られた大容量のデータを高速に処理することが可能な情報処理システムを導入することで後者の困難を克服することに成功した。またその結果、本研究で解析の結果得られた 17 タンパク質に関する知見は ATL 発症及び悪性化のメカニズム解明に結び付くだけでなく、診断マーカー及び新規治療標的の開発に寄与するものであると考えられる。

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 1 件)

① Preapoptotic protease calpain-2 is frequently suppressed in adult T-cell leukemia

Makoto Ishihara, Natsumi Araya, Tomoo Sato, Ayako Tatsuguchi, Naomi Saichi, Atae Utsunomiya, Yusuke Nakamura, Hidewaki Nakagawa, Yoshihisa Yamano, and Koji Ueda

Blood May 23, 2013 vol. 121 no. 21 4340-4347 (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

① Makoto Ishihara

Quantitative proteome profiling to identify biomarkers for Human T-lymphotropic virus type-1 associated disease.

第 71 回日本癌学会学術総会

2012 年 09 月 19 日～2012 年 09 月 21 日

ロイトン札幌 (北海道札幌市)

② Makoto Ishihara

Quantitative proteome profiling of cerebrospinal fluid to identify potential diagnostic markers for human T-cell leukemia virus type 1 associated myelopathy.

HUPO 11th Annual World Congress

2012 年 09 月 09 日～2012 年 09 月 13 日

Hynes Convention Center (Boston, Massachusetts, USA)

③ Makoto Ishihara

Quantitative proteome profiling of CD4⁺CD25⁺CCR4⁺ T-cells to identify potential therapeutic targets for adult T-cell leukemia (ATL) and Human T-lymphotropic virus type-1 associated myelopathy (HAM).

AACR 2012 Annual Meeting

2012 年 04 月 01 日～2012 年 04 月 05 日

McCormick Place (Chicago, Illinois, USA)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ヒト T リンパ球向性ウイルス I 型関連疾患検出用のポリペプチド、およびその利用

発明者: 植田幸嗣、石原誠人、山野嘉久

権利者: 植田幸嗣、石原誠人、山野嘉久

種類: 特許

番号: 2012-189318

出願年月日: 2012 年 08 月 29 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

石原 誠人 (ISHIHARA MAKOTO)
独立行政法人理化学研究所・バイオマーカー
探索・開発チーム・特別研究員
研究者番号：60581189

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし