

対象研究テーマ：ケモカインを分子標的とした治療法の開発

研究期間：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：細胞外マトリックス分子/ケモカインを標的とした成人T細胞白血病  
制御法の開発

研究代表者：北海道大学遺伝子病制御研究所 助教 前田直良

研究成果の概要：

成人T細胞白血病(adult T-cell leukemia[ATL])患者血漿中ではオステオポンチン(osteopontin[OPN])産生量が増加しており、病態や予後との相関性が示唆されている。本研究では、ATL病態形成における宿主OPNの生理学的意義を明らかにするとともに、OPNを分子標的とした新規ATL発症予防法や、進展制御法の可能性について検討する。腫瘍細胞由来OPNと、宿主間質細胞由来OPNを識別するために、免疫不全マウス(NOD/Shi-*scid*, *IL2Rg<sup>null</sup>*[NOG])の皮下にATL由来細胞株を接種することにより、腫瘍増殖・血中浸潤にともない、血漿中のOPN産生量が増加すること、また生存率と逆相関することを見出した。すなわち、ATL患者で観察される現象を、本モデルを用いて再現することができた。また、ATL細胞株とマウス線維芽細胞との共接種により、OPN産生増加、およびATL細胞の腫瘍増殖/臓器転移の促進が観察されたことから、ATL病態形成における線維芽細胞の重要性が明らかとなった。さらに、抗OPN抗体投与による腫瘍形成、および腫瘍細胞の浸潤・転移の抑制効果を見出した。

研究分野：ウイルス腫瘍学

キーワード：成人T細胞白血病、オステオポンチン、細胞外マトリックス

#### 1. 研究開始当初の背景

ATLは、ヒトT細胞白血病ウイルスI型(human T-cell leukemia virus type I[HTLV-I])感染に起因する予後不良な末梢性T細胞腫瘍であることから、新たな治療方法の開発や標的分子の同定が急務とされている。ATLでは、腫瘍細胞のモノクローナルな異常増殖と同時に、臓器浸潤が顕著であることから、腫瘍細胞の増殖を抑制する(Maeda *et al.*, *Cancer Sci.* 2010;101:224-230)と同時に、臓器浸潤・転移を抑制することも重要な治療戦略の1つになると考えられる。

近年、癌微小環境構築における細胞外マトリックスの関与が注目されている。この細胞外マトリックスを構成する上で重要な因子であるマトリセルラータンパク質の一つOPNは、様々な炎症性疾患や癌転移において発現が上昇することから、病態形成において重要な因子であることが示唆されている(Uede, *Pathol Int.* 2011;61:265-280)。産生されたOPNは、インテグリン(インテグリンファミリーは18種類の $\alpha$ -サブユニットと8種類の $\beta$ -サブユニットで構成されており、 $\alpha\beta$ のヘテロ二量体を形成して機能する)のうち、

$\alpha V\beta 3$ 、 $\alpha 4\beta 1$ 、 $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha 9\beta 1$ インテグリンなどを受容体として利用し、細胞間の接着や遊走に関与することで、乳癌、前立腺癌等の浸潤・転移に深く関与している。ATL患者血漿中でもOPN産生量が増加しており、病態や予後との相関性が指摘されている(Chagan-Yasutan *et al.*, *Leuk Res.* 2011;35:1484-1490)。興味深いことに、ATL細胞株が培養上清中に分泌するOPN産生量は、微量、もしくは検出感度以下であること、またATL患者のCD68陽性マクロファージや血管内皮細胞でOPNが検出されることから、間質細胞由来OPNの病態への関与が強く示唆されている。しかしながら、宿主OPNの産生誘導機序、あるいはATL病態形成におけるOPN-インテグリン相互作用の生理学的意義については不明である。

#### 2. 研究の目的

本研究では、ATL腫瘍細胞由来OPNと、宿主間質細胞由来OPNを識別するために、移植マウスモデル系を用いて、ATL病態形成における宿主OPNと、腫瘍細胞が発現するインテグリンとの相互作用の生理学的意義を明らかにする。また、得られた結

果をもとに、OPN-インテグリン相互作用を分子標的とした新規ATL発症予防法や、進展制御法の可能性について検討する。

### 3. 研究の方法

- (1) ATL細胞株をNOGマウスに皮下接種後、原発巣形成を確認する。また、定期的に血漿を回収し、ヒトOPN、およびマウスOPN産生量をELISA法により定量化する。
- (2) 皮下接種したATL細胞株の血管浸潤は、末梢血リンパ球を分離後、HTLV-I *tax* 遺伝子を検出する定量性PCR法により確認する。
- (3) 定期的に各臓器(肺、肝臓、腎臓など)を摘出し、ヒトCD4陽性T細胞染色により転移を観察するとともに、マウスOPNとヒトOPNをそれぞれに特異的なモノクローナル抗体で染色し、H&E染色とともにマウスOPN産生細胞を同定する。
- (4) 野生型BALB/cマウス、およびOPN遺伝子欠損マウスから胎児線維芽細胞を単離後、ATL細胞株とともにNOGマウスの皮下に共接種することにより、腫瘍増殖や浸潤・転移におけるOPNの機能を検討する。
- (5) ATL細胞株を皮下接種し生着確認後、抗OPN抗体を定期的に腹腔内投与し、生存率、あるいは腫瘍形成/臓器浸潤・転移に対する抑制効果を検討する。

### 4. 研究成果

NOGマウスにATL由来細胞株を皮下接種することにより、腫瘍増殖・血中浸潤にともない、血漿中のOPN産生量が増加すること、また生存率と逆相関することを見出した。すなわち、ATL患者で観察されるATL病態進行に伴いOPN産生が増加するという現象を、本モデルを用いて再現することができた。また、ATL細胞株とマウス線維芽細胞との共接種により、OPN産生増加、およびATL細胞の血中浸潤・臓器転移促進が観察され、またOPN遺伝子欠損マウス由来線維芽細胞との共接種群では、その頻度が減少したことから、間質細胞由来OPNはATL病態形成を促進することが明らかとなった。さらに、抗OPN抗体による腫瘍形成、および腫瘍細胞の浸潤・転移の抑制効果を見出した。これらの結果は、新規ATL制御法開発において、OPN-インテグリン相互作用が有効な標的分子となりうる可能性を示唆するものである。

### 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0件)

[学会発表] (計6件)

- (1) 前田直良  
jaagsiekte sheep retrovirusによるヒツジ肺上皮細胞腫瘍化のメカニズム  
第155回日本獣医学会学術集会 春シンポジウム教育講演「動物レトロウイルス感染症を知る」  
平成25年3月28日(東京)
- (2) 前田直良  
細胞外マトリックス分子による成人T細胞白血病の病態発現制御とその臨床応用  
金沢大学がん進展制御研究所・北海道大学遺伝子病制御研究所ジョイントシンポジウム「がんの悪性進展過程とその微小環境」  
平成24年11月5日(札幌)
- (3) Naoyoshi Maeda, Takashi Ohashi, Haorile Chagan-Yasutan, Toshio Hattori, Yayoi Takahashi, Hideo Harigae, Hiroo Hasegawa, Masahiro Fujii, Katsumi Maenaka, Toshimitsu Uede  
Osteopontin-integrin interaction as a molecular target for antibody-mediated immunotherapy in adult T-cell leukemia  
第71回日本癌学会学術総会  
平成24年9月19日(札幌)
- (4) Daichi Ota, Naoyoshi Maeda, Toshimitsu Uede  
Alpha9beta1 integrin regulates growth and lymphatic metastasis of human breast cancer cells  
第71回日本癌学会学術総会  
平成24年9月19日(札幌)
- (5) Naoyoshi Maeda, Toshimitsu Uede  
Osteopontin as a novel molecular target for antibody-mediated immunotherapy in adult T-cell leukemia  
2012 FASEB Science Research Conference on Osteopontin Biology  
平成24年8月5-10日(Vermont, USA)
- (6) 前田直良、大橋貴、Haorile Chagan-Yasutan、服部俊夫、高橋弥生、張替秀郎、長谷川寛雄、藤井雅寛、前仲勝実、上出利光  
オステオポンチン-インテグリン相互作用を標的とした新規成人T細胞白血病治療法の開発  
第23回日本生体防御学会学術総会  
平成24年7月11日(東京)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北海道大学遺伝子病制御研究所・助教  
前田直良

### (2) 研究分担者

北海道大学遺伝子病制御研究所・教授  
上出利光  
東北大学災害科学国際研究所・教授  
服部俊夫  
北海道大学薬学研究院・教授  
前仲勝実  
北海道大学遺伝子病制御研究所・准教授  
大橋 貴

### (3) 本研究所担当者

分子生体応答・教授 向田直史