

厚生労働科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

マイクロアレイ技術を用いた ATL のゲノムワイドな解析による
新規治療標的分子の探索

平成18年度 総括・分担研究報告書
主任研究者 渡邊 俊樹
平成19年(2007年)4月

目次

I. 総括研究報告書

マイクロアレイ技術を用いた ATL のゲノムワイドな解析による新規治療標的分子の探索 渡邊 俊樹	2
---	---

II. 分担研究報告

「高密度 SNP アレイを用いた ATL における網羅的ゲノム変異の探策」 渡邊 俊樹	6
--	---

「JSPFAD コホートによるデータベース/バイオマテリアルバンクの維持解析」 山口 一成	10
--	----

「ATL モデルマウスを用いたケモカイン及びそのレセプターの解析に関する研究」 長谷川 秀樹	13
---	----

「ATL において不活化される新規標的遺伝子 Blimp1 に関する研究」 小川 誠司	17
--	----

「ATL モデルマウスの腫瘍細胞の microarray を用いた解析に関する研究」 澤 洋文	20
--	----

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	24
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷り	26
------------------------	----

マイクロアレイ技術を用いた ATL のゲノムワイドな解析による 新規治療標的分子の探索

主任研究者 渡邊 俊樹 新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻 教授

研究要旨

成人 T 細胞白血病(ATL)に対する新規分子標的薬剤・診断技術開発のためのターゲット分子を探索する目的で、JSPFAD および関連施設により集積された ATL 試料のうち 75 試料について、25 万個の SNP 特異的なオリゴヌクレオチドプローブがアレイ化された Affymetrix® GeneChip® 250K NspI アレイを用いた網羅的なゲノムコピー数異常/アレル不均衡の網羅的な探索を行い、ATL で特徴的に認められる多数のコピー数/アレル組成の異常を同定した。このうち、6q に見いだされた標的遺伝子の一つ Blimp-1 は、ATL において腫瘍特異的な変異が認められた。Blimp-1 の機能解析より、同分子が Rb 依存性に細胞周期の G1 停止を、また、p53 依存性に G2 停止を誘導すること、G1 停止は CDK 阻害因子 p21 および p57 の発現誘導を介していることが示された。また、Blimp1 の条件的欠失マウスの作成に成功した。ATL のモデルマウスに生ずる ATL 様の腫瘍についてサイトカインの発現検討からは、腫瘍細胞が多様なサイトカインを発現しており、これが ATL の病態の形成に関与している可能性が示唆された。

分担研究者

山口一成 国立感染症研究所 部長
長谷川秀樹 国立感染症研究所 室長
小川誠司 東京大学 特任助教授
澤 洋文 北海道大学 教授

A. 研究目的

ATL は、本邦を流行国の一つとし、HTLV-1 の感染後数十年を経て発症する極めて悪性度の高い末梢性 T 細胞腫瘍である。今後 120 万人のキャリアから約 5 万から 10 万人の ATL の発症が推定されるにも関わらず、現時点では有効な治療手段・発症予防法が全く知られていないことから、本疾患の克服は我が国の医療・行政上の極めて重要な課題である。ATL は、HTLV-1 に感染して不死化した末梢性 T 細胞に、種々のゲノムの変異が蓄積することによって発症する。従来の研究から、T 細胞の不死化については、HTLV-1 のコードする Tax 蛋白が本質的な役割を担っていることが示されているものの、これらの HTLV-1 感染 T 細胞が最終的に腫瘍化に至るまでに蓄積されるゲノム異常の実態と、それに基づく腫瘍化のメカニズムについては未だに不明である。本分担研究では、近年のゲノム科学の進歩を背景として、最先端のマイクロアレイ技術を駆使した大規模ゲノミクスにより、ATL の発症に関わるゲノム変異を網羅的に探索し、同定された変異の生物学的・機能的な解析による ATL 発症の分子メカニズムの解明を通じて、本疾患に対する新規分子標的薬剤・診断技術の開発のための基盤を構築する。

B. 研究方法

(1)検体整備事業 (山口・渡邊)

本研究事業の基盤となる、前方視的検体集積事業については、山口および渡邊を中心として、全国規模の HTLV-1 感染コホート研究組織 (JSPFAD)において、HTLV-1 キャリアの抹消血および ATL 腫瘍検体および臨床データを新たに登録・集積した。

(2) GeneChip®250K アレイを用いた ATL の molecular allelokaryotyping (渡邊・小川)

JSPFAD および関連組織による検体リソースバンクから抽出された 75 例の ATL 患者検体よりゲノム DNA を抽出し、Affymetrix® GeneChip® 250K NspI アレイにより解析し、分担研究者の小川らが開発した CNAG/AsCNAR プログラムによりアレル特異的なゲノムコピー数の定量を行った (molecular allelokaryotyping)。

(3)ATL 発症における Blimp1 の機能解析(小川)

(2)の解析で、ATL において共通にホモ欠失が認められた 6q21 領域について、PCR 法およびサザン解析による詳細な欠失領域のマッピングを行い、標的遺伝子の同定を行った。同定された標的遺伝子の候補 Blimp-1 について直接塩基配列決定法により、腫瘍特異的な変異のスクリーニングを行った。また、Blimp-1 を Hela 細胞に強制発現させることにより、細胞周期に及ぼす影響を検討するとともに、Blimp-1 により誘導される遺伝子群についてマイクロアレイを用いて検討した。

(4)ATL マウスモデルにおけるケモカイン発現の解析(長谷川)

分担研究者の長谷川らは tax を transgene として導入して作成したマウスで認められる ATL 様細胞について、種々のサイトカイン遺伝子の発現を定量 PCR 法により検討した。

(5)ATL モデルマウスの腫瘍細胞の microarray を用いた解析に関する研究(澤)

分担研究者の澤らは、ATL モデルマウスの腫瘍細胞の Mouse NF- κ B signaling pathway Microarray を用いた検索を行い、CD40, Caspase 1, IL-10, Cx43 が腫瘍細胞で発現の増加を認めており、逆に IFN- γ , IKK- α , FasL, NIK, pit1, Stat1, Jun, IKK- β , Myd88, p38, IKK- γ , CBP 等の因子の発現の減少が確認された。

(倫理面への配慮)

検討に用いた検体は、当該患者からインフォームドコンセントを得たのちに連結可能匿名化を施して検討に用いた。本研究は東京大学および国立感染症研究所の設置する倫理委員会の承認済みである。

C. 結果

(1)検体集積事業については、本年度新たにのべ 830 例の検体が集積された。内訳は HTLV-I キャリアー 597 検体、ATL 148 検体、HAM 9 検体、ぶどう膜炎 80 検体である。さらに、鹿児島大学によるコホート研究で集積された、HAM 患者末梢血 DNA がゲノム解析用資料として、共同研究ベースで提供され、キャリア検体とあわせて解析試料の準備がとえられてきた。

(2)Affymetrix® GeneChip®を用いた 75 例の ATL ゲノムについての網羅的なゲノムコピー数異常・アレル不均衡の解析では、ATL で特徴的に認められるゲノム異常として、1q, 3p, 3q, 7q, 9q, 14q, 16p, 18q, 19p におけるコピー数の増加、2q, 4p, 5q, 6q, 7q, 9q, 10p, 13q, 18p におけるコピー数減少が同定された。これらの多くは、染色体バンドレベルの比較的大きな異常であるが、これらの他に、非常に小さな領域に集中して高頻度に認められる異常も多数検出された。こうした領域では、通常 1 ないし 2 個の遺伝子がコードされているのみで、これらは重要な ATL の標的遺伝子であると考えられた。また、ATL ゲノムではしばしばゲノムコピー数の変化を伴うことなく、アレルの不均衡を生ずるゲノム領域が認められることが明らかとなった。

(3)上記の検討から同定された 6q21 の共通欠失領域について、詳細なホモ接合性欠失領域のマッピングを行った結果、6q21 の最小欠失領域に含まれる唯一の構造遺伝子として Blimp-1 を同定した。変異解析の結果、ATL 症例の一部にお

いて腫瘍特異的な Blimp-1 の変異が確認された。

Hela 細胞における強制発現系を用いた Blimp-1 の細胞周期制御における機能の検討では、Blimp-1 が G1 および G2 停止を強く誘導すること、G1 停止は Rb に、また G2 停止は p53 に依存していること、さらに G1 停止には p21 および p57 の発現を介していることを明らかにした。

(4)tax 遺伝子を transgene として導入することにより作成した ATL モデルマウスに生じた ATL 様腫瘍細胞について種々のサイトカインの発現を定量 PCR 法を用いて検討した。TARC, LARK, RANTES, SDF-1 α , CTACK, FRACTINE, CCR5, CCR7, CCR10, CXCR4 については発現の上昇が、また CCR4, CCR6 については発現の低下が認められた。

(5)上記の ATL モデルマウスの ATL 様腫瘍細胞について Mouse NF- κ B signaling pathway Microarray を用いた検索を行い、CD40, Caspase 1, IL-10, Cx43 の発現増加と、IFN- γ , IKK- α , FasL, NIK, pit1, Stat1, Jun, IKK- β , Myd88, p38, IKK- γ , CBP 等の発現減少が確認された。

D. 考察

GeneChip 250K アレイでは、平均プローブ間隔が 12kb 程度となっており、ATL ゲノムに生ずるコピー数の異常を非常に高い解像度で解析することが可能であった。ATL におけるゲノム異常は、他の造血器腫瘍・固形腫瘍と比べ、集積する傾向が高く(data not shown)、同腫瘍が比較的均一な遺伝学的特性を有していることが推察される。

同定された領域の多くは、染色体バンドレベルのサイズの異常であるが、共通する異常が非常に小さな領域にマップされる異常領域も多数同定された。高密度 SNP アレイの使用によって、こうした領域の範囲は非常に正確に決定することが可能で、このことから、殆どの場合で標的となっている可能性のある候補遺伝子をユニークに同定することが可能であった。興味深いことに、こうした遺伝子は欠失・増幅のいずれの場合においても、成熟 T 細胞ないしリンパ球で特異的発現する遺伝子の頻度が高かった。このことは、こうした遺伝子の異常が実際に ATL の発症に関わっている可能性を示唆していると考えられる。

同定されたゲノム異常のうち、6q21 に認められる共通の欠失領域からは Blimp-1 遺伝子が見いだされた。本遺伝子は従来 B 細胞の終末分化に重要な役割を担う分子として見いだされたが、本遺伝子が ATL の一部でホモ接合性欠失や点突然変異により不活化されることから、ATL の発症に関与する標的遺伝子の候補の一つと考えられた。実際、Blimp-1 は細胞周期の制御に関与しており、Hela 細胞において強力に G1 および G2

停止を誘導すること、また G1 停止は p21 および p57 を介して Rb 依存性に誘導されること、さらに G2 停止は p53 遺伝子に依存していることから、Blimp-1 の不活化により細胞周期の負の制御に異常が生ずる結果、T 細胞の腫瘍化が促進される可能性が示唆された。

ATL のモデルマウスに生ずる ATL 様腫瘍におけるサイトカイン発現の検討では、種々のサイトカインの発現が腫瘍細胞で亢進していることが明らかとなった。このことから、ATL の病態形成にサイトカインの過剰発現が関与している可能性が示唆された。

E. 結論

(1)75 例の ATL 症例の高密度 SNP アレイを用いたゲノム網羅的なコピー数変化・アレール不均衡の探索により ATL ゲノムの特徴となるゲノムプロファイルを解析し、複数の症例で共通に異常を示す領域を正確に同定することにより、その異常が ATL の発症に関わる可能性のある多数の候補遺伝子を同定することに成功した。

(2)ATL の 6q21 における共通欠失の標的遺伝子 Blimp-1 を同定し、その ATL 発症に関わるメカニズムとして細胞周期制御の異常を明らかにした。

(3)ATL モデルマウスにおけるサイトカインの発現を検討し、サイトカイン産生の異常が ATL の病態に関わっている可能性を示した。

F. 研究発表

1.論文発表

Uchihara JN, Matsuda T, Okudaira T, Ishikawa C, Masuda M, Horie R, Watanabe T, Ohta T, Takasu N, Mori N.

Transactivation of the ICAM-1 gene by CD30 in Hodgkin's Lymphoma.

Int J Cancer 118:1098-107, 2006

Kamoi K, Yamamoto K, Misawa A, Miyake A, Ishida T, Tanaka Y, Mochizuki M, Watanabe T. SUV39H1 interacts with HTLV-1 Tax and abrogates Tax transactivation of HTLV-1LTR.

Retrovirology, 3,5, 2006 (epub)

Horie R, Watanabe M, Okamura T, Taira M, Higashihara M, Watanabe T, Umezawa K

DHMEQ, a new NF- κ B inhibitor induces apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells and enhances effect of fludarabine.

Leukemia 20, 800-806, 2006

Miyake A, Ibuki K, Enose Y, Suzuki H, Horiuchi R, Motohara M, Saito N, Nakanose T, Honda M, Watanabe T, Miura T, Hayami M.

Rapid dissemination of a pathogenic simian/human immunodeficiency virus to systemic organs and active replication in lymphoid tissues following intrarectal infection.

J Gen Virol 87(Pt 5):1311-20, 2006

Sugita S, Takase H, Yoshida T, Sugamoto Y, Watanabe T, Mochizuki M.

Intraocular soluble IL-2 receptor alpha in a patient with adult T-cell Leukemia with intraocular invasion

Br J Ophthalmol 90(9):1204-6, 2006

Ishida T, Hamano A, Koiwa T, Watanabe T

5' long terminal repeat (LTR)-selective methylation of latently infected HIV-1 provirus that is demethylated by reactivation signals

Retrovirology 3:69 (e-pub), 2006

Horie R, Watanabe T, Umezawa K.

Blocking NF- κ B as a potential strategy to treat adult T-cell leukemia/lymphoma.

Drug News Perspect 19(4):201-209, 2006.

Watanabe M, Dewan Md. Z, Taira M, Shoda M, Honda M, Sata T, Higashihara M, Kadin ME, Watanabe T, Yamamoto N, Umezawa K, Horie R

I κ B α independent induction of NF- κ B and its inhibition by DHMEQ in Hodgkin-Reed-Sternberg cells.

Lab Invest 87, 372-382, 2007

Horie R, Ishida T, Maruyama-Nagai M, Ito K, Watanabe M, Yoneyama A, Higashihara M, Kimura S, Watanabe T

TRAF activation of C/EBP β (NF-IL6) via p38 MAPK induces HIV-1 gene expression in monocytes/macrophages.

Microbes and Infection, in press

Hamaguchi I, Imai J, Momose H, Kawamura M, Mizukami T, Kato H, Naito S, Maeyama J, Masumi A, Kuramitsu M, Takizawa K, Mochizuki M, Ochiai M, Yamamoto A, Horiuchi Y, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K.:

Agp and Hpx are useful for pertussis vaccine safety control as vaccine toxicity-related genes. Vaccine, in press

Masumi A, Fukazawa H, Shimazu T, Toshida M, Ozato K, Komuro K, Yamaguchi K. Nucleolin is involved in interferon regulatory factor-2-dependent transcriptional activation. Oncogene 25:5113-5124, 2006

Mizuochi T, Okada Y, Umemori K, Mizusawa S, Yamaguchi K.:

Evaluation of 10 commercial diagnostic kits for in vitro expressed hepatitis B virus (HBV) surface antigens encoded by HBV of genotypes A to H.

J Virological Methods 136,254-256,2006

Hamaguchi I, Morisada T, Azuma M, Murakami K, Kuramitsu M, Mizukami T, Ohbo K, Yamaguchi K, Oike Y, Dumont DJ, Suda T. Loss of Tie2 receptor compromises embryonic stem cell-d

erived endothelial but not hematopoietic cell survival. Blood 107:1207-1213, 2006

Ohsugi T, Kumasaka T, Ishida A, Ishida T, Hori e R, Watanabe T, Umezawa K, Yamaguchi K.: In vitro and in vivo antitumor activity of the NF-kB inhibitor DHMEQ in the human T-cell leukemia virus type I transformed cell line, HUT-102. Leuk Res30:90-97,2006

Sanada M, Uike N, Ohyashiki K, Ozawa K, Lili W, Hangaishi A, Kanda Y, Chiba S, Kurokawa M, Omine M, Mitani K, and Ogawa S. Unbalanced translocation der(1;7)(q10;p10) defines a unique clinicopathological subgroup of myeloid neoplasms. Leukemia, in press

Jacobs S, Thompson ER, Nannya Y, Yamamoto G, Pillai R, Ogawa S, Bailey DK, Campbell IG. Genome-wide, high-resolution detection of copy number, loss of heterozygosity, and genotypes from formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue using microarrays. Cancer Res. 67:2544-2551, 2007

Hosoya N, Sanada M, Nannya Y, Nakazaki K, Wang L, Hangaishi A, Kurokawa M, Chiba S, Ogawa S Genomewide screening of DNA copy number changes in chronic myelogenous leukemia with the use of high-resolution array-based comparative genomic hybridization. Genes Chromosomes Cancer.;45:482-94, 2006

Hasegawa H, Sawa H, Lewis MJ, Orba Y, Shery N, Yamamoto Y, Ichinohe T, Tsunetsugu-Yokota Y, Katano H, Takahashi H, Matsuda J, Sata T, Kurata T, Nagashima, K, Hall,WW. Development of Thymus-Derived T-cell Leukemia /Lymphoma in Mice Transgenic for the Tax gene of Human T-Lymphotropic Virus Type-I (HTLV-I). Nat Med. 2006 12: 466-472

Maeda M, Sawa H, Tobiume M, Tokunaga K, Hasegawa H, Ichinohe T, Sata T, Moriyama M, Hall WW, Kurata T, Takahashi H. Tristetraprolin inhibits HIV-1 production by binding to genomic RNA. Microbes and Infection. 2006 8:2647-56

Sunden Y, Suzuki T, Orba Y, Umemura T, Asamoto M, Nagashima K, Tanaka S, Sawa H. Characterization and application of polyclonal antibodies that specifically recognize JC virus large T antigen. Acta Neuropathol.2006 111: 379-387

2.学会発表

1. 三沢 彩、鴨居功樹、山本啓裕、三宅在子、石田尚臣、田中勇悦、望月學、渡邊 俊樹

「Tax-SUV39H1 相互作用による HTLV-1 プロモーター活性抑制機構の解析」

日本ウイルス学会第54回学術集会

平成18年11月19日-21日

名古屋

2. 魚田 慎、渡邊 俊樹、山本直樹、山岡昇司

「転写因子 NF-kB 新規阻害剤 IMD-0354 は ATL 細胞の増殖を抑制し、細胞死を誘導する」

日本ウイルス学会第54回学術集会

平成18年11月19日-21日

名古屋

3. 山本啓裕、石田尚臣、古川洋一、田中勇悦、中村祐輔、渡邊 俊樹

「HTLV-1 Tax とヒストン H3K4 メチル化酵素 SMYD3 の相互作用の解析」

日本ウイルス学会第54回学術集会

平成18年11月19日-21日

名古屋

4. 堀江 良一、渡邊 俊樹

合同シンポジウム 悪性リンパ腫の分子病態と分子標的療法

「Molecular basis and strategies for treating Hodgkin lymphoma and anaplastic large cell lymphoma with NF-kB inhibitor」

第68回日本血液学会総会

平成18年10月6日 福岡

5. 三沢彩、鴨居功樹、山本啓裕、三宅在子、石田尚臣、田中勇悦、望月學、渡邊 俊樹

ワークショップ 成人 T 細胞白血病・リンパ腫の分子病態

「Tax-SUV39H1 相互作用による HTLV-1 プロモーター活性抑制機構の解析」

第68回日本血液学会総会

平成18年10月6日 福岡

6. 渡邊 俊樹

ワークショップ 先端医学 感染 炎症と腫瘍

「レトロウイルスの多段階発癌のモデルとしての ATL 発祥機構」

第96回日本病理学会総会

平成19年3月13日-15日

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

高密度 SNP アレイを用いた ATL における網羅的ゲノム変異の探策

主任研究者 渡邊 俊樹 東京大学大学院新領域メディカルゲノム専攻 教授

研究要旨

成人 T 細胞白血病(ATL)に対する新規分子標的薬剤・診断技術開発のためのターゲット分子を探索する目的で、25 万個の SNP 特異的なオリゴヌクレオチドプローブがアレイ化された Affymetrix® GeneChip® 250K NspI アレイを用いて、75 例の ATL 検体を解析し、ATL で特徴的に認められるゲノムコピー数の変異の網羅的な探索を行った。東京大学の小川らにより開発された CNAG/AsCNAR プログラムを用いてアレル特異的なシグナルを解析することにより、アレル特異的なゲノムコピー数の定量が可能となり、単なるコピー数のみならず、ゲノムに生じたアレル不均衡についても鋭敏に検出することが可能であった。75 例の解析からは、ATL に特徴的なゲノムの変化が多数同定された。また、アレイの高い解像度により共通に異常を示す微小な領域が正確に同定されたため、多くの領域で増幅・欠失の標的となる遺伝子の候補をユニークに同定することが可能であった。今後、このような遺伝子変異に関する変異解析、および機能的・生物学的解析を通じて、ATL の病態の解明が期待される。

A. 研究目的

ATL は、本邦を流行国の一つと HTLV-1 の感染後数十年を経て発症する極めて悪性度の高い末梢性 T 細胞腫瘍である。今後 120 万人のキャリアから約 5 万から 10 万人の ATL の発症が推定されるにも関わらず、現時点では有効な治療手段・発症予防法が全く知られていないことから、本疾患の克服は我が国の医療・行政上の極めて重要な課題である。ATL は、HTLV-1 に感染して不死化した末梢性 T 細胞に、種々のゲノムの変異が蓄積することによって発症する。従来からの研究から、T 細胞の不死化については、HTLV-1 のコードする Tax 蛋白が本質的な役割を担っていることが示されているものの、これらの HTLV-1 感染 T 細胞が最終的に腫瘍化に至るまでに蓄積されるゲノム異常の実態と、それに基づく腫瘍化のメカニズムについては未だに不明である。本分担研究では、近年のゲノム科学の進歩を背景として、最先端のマイクロアレイ技術を駆使した大規模ゲノミクスにより、ATL の発症に関わるゲノム変異を網羅的に探索し、同定された変異の生物学的・機能的な解析による ATL 発症の分子メカニズムの解明を通じて、本疾患に対する新規分子標的薬剤・診断技術の開発のための基盤を構築する。

B. 研究方法

(1)ATL 腫瘍検体

解析に用いた検体は、全国規模の HTLV-1 感染コホート研究組織(JSPFAD)および関連組織による大規模な検体リソースバンクから抽出された 75 例の ATL 患者検体である。保存試料より常法に従って抽出されたゲノム DNA をマイクロアレイ解析に用いた。

(2)GeneChip®250K アレイを用いた ATL の molecular allelokaryotyping

ゲノム DNA を制限酵素 NspI で消化した後、アダプター-PCR により 2kb 以下の短い制限酵素断片を特異的に増幅する(Whole genome selection assay)。増幅した DNA を、断片化し biotin ラベルを施した上で、GeneChip 上で、16 時間 48 度でハイブリダイゼーションを行い、プローブに結合した標的 DNA 断片を avidine-PE を用いて染色したのち、専用スキャナーで特異的なシグナルを検出した。分担研究者の小川らにより開発されたコピー数解析プログラム CNAG/AsCNAR を用いて SNP アレイデータを解析することにより、ATL におけるゲノムコピー数異常とアレル不均衡の高解像度・網羅的解析を行った(molecular allelo-karyotyping)。

(倫理面への配慮)

検討に用いた検体は、当該患者からインフォームドコンセントを得たのちに連結可能匿名化を施して検討に用いた。東京大学[^]の設置する倫理委員会の承認済みである

C. 結果

同定された領域の多くは、染色体バンドレベル

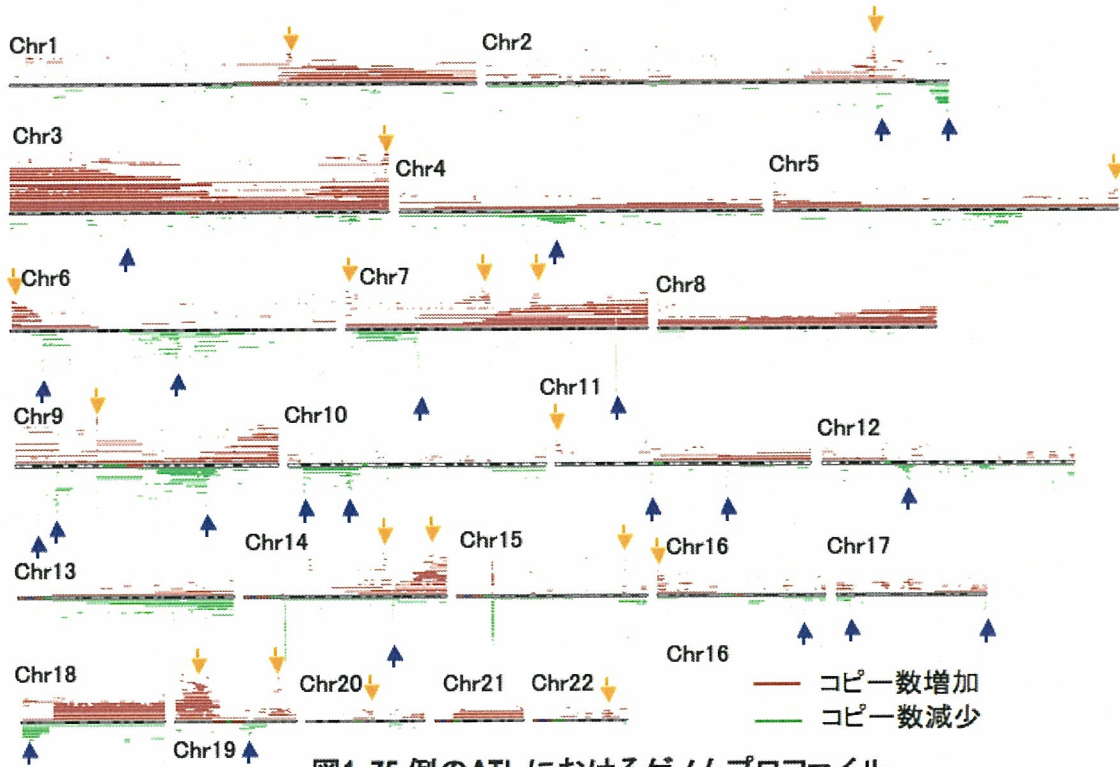


図1. 75例のATLにおけるゲノムプロファイル

75例のATLのSNPアレイ解析で認められたゲノムコピー数異常の集積図を図1に示した。ATLで特徴的に認められるゲノム異常としては、1q, 3p, 3q, 7q, 9q, 14q, 16p, 18q, 19pにおけるコピー数の増加, 2q, 4p, 5q, 6q, 7q, 9q, 10p, 13q, 18pにおけるコピー数減少があげられる。これらの多くは、染色体バンドレベルの比較的大きな異常であるが、これらの他に、非常に小さな領域に集中して高頻度に認められる異常も多数検出された(矢印)。こうした領域では、通常1ないし2個の遺伝子がコードされているのみで、これらは重要なATLの標的遺伝子であると考えられた。一方、ATLゲノムではしばしばゲノムコピー数の変化を伴うことなく、アレルの不均衡を生ずるゲノム領域が認められることが明らかとなった。殆どの症例でこのようなアレル不均衡を示す領域が生じているが、これらの領域は、3番、4番、6番、及び9番染色体に集積する傾向が認められた。

D. 考察

GeneChip 250Kアレイでは、平均プローブ間隔が12kb程度となっており、ATLゲノムに生ずるコピー数の異常を非常に高い解像度で解析することが可能であった。ATLにおけるゲノム異常は、他の造血器腫瘍・固形腫瘍と比べて、限局した染色体領域に集積する傾向が高く(data not shown)、同腫瘍が比較的均一な遺伝学的特性を有していることを示唆していると思われる。

のサイズの異常であるが、共通する異常が非常に小さな領域にマップされる異常領域も多数同定された(図1矢印)。高密度SNPアレイの使用によって、こうした領域の範囲は非常に正確に決定することが可能で、このことから、殆どの場合で標的となっている可能性のある候補遺伝子をユニークに同定することが可能であった。興味深いことに、こうした遺伝子は欠失・増幅のいずれの場合においても、成熟T細胞ないしリンパ球で特異的発現する遺伝子の頻度が高かった。このことは、こうした遺伝子の異常が実際にATLの発症に関わっている可能性を示唆していると考えられる。

一方、これら一連の候補となる遺伝子については、腫瘍特異的な変異の探索、siRNAその他のシステムを用いた異常分子の機能的・生物学的解析を進めることにより、そのATLの病態への関与を確認する必要がある、これらは次年度の重要な課題である。

E. 結論

75例のATL症例の高密度SNPアレイを用いたゲノム網羅的なコピー数変化・アレル不均衡の探索によりATLゲノムの特徴となるゲノムプロファイルを明らかにした。また、複数の症例で共通に異常を示す領域を正確に同定することにより、その異常がATLの発症に関わる可能性のある多数の候補遺伝子を同定することに成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Uchihara JN, Matsuda T, Okudaira T, Ishikawa C, Masuda M, Horie R, Watanabe T, Ohta T, Takasu N, Mori N.

Transactivation of the ICAM-1 gene by CD30 in Hodgkin's Lymphoma.

Int J Cancer 118:1098-107, 2006

2. Kamoi K, Yamamoto K, Misawa A, Miyake A, Ishida T, Tanaka Y, Mochizuki M, Watanabe T
SUV39H1 interacts with HTLV-1 Tax and abrogates Tax transactivation of HTLV-1 LTR

Retrovirology, 3,5, 2006 (epub)

3. Horie R, Watanabe M, Okamura T, Taira M, Higashihara M, Watanabe T, Umezawa K
DHMEQ, a new NF- κ B inhibitor induces apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells and enhances effect of fludarabine

Leukemia 20, 800–806, 2006

4. Miyake A, Ibuki K, Enose Y, Suzuki H, Horiuchi R, Motohara M, Saito N, Nakanose T, Honda M, Watanabe T, Miura T, Hayami M.

Rapid dissemination of a psthogenic siman/human immunodeficiency virus to systemic organs and active replication in lymphoid tissues following intrarectal infection.

J Gen Virol 87(Pt 5):1311-20, 2006

5. Sugita S, Takase H, Yoshida T, Sugamoto Y, Watanabe T, Mochizuki M.

Intraocular soluble IL-2 receptor alpha in a patient with adult T-cell Leukemia with intraocular invasion

Br J Ophthalmol 90(9):1204-6, 2006

6. Ishida T, Hamano A, Koiwa T, Watanabe T

5' long terminal repeat (LTR)-selective methylation of latently infected HIV-1 provirus that is demethylated by reactivation signals

Retrovirology 3:69 (e-pub), 2006

7. Horie R, Watanabe T, Umezawa K.

Blocking NF- κ B as a potential strategy to treat adult T-cell leukemia/lymphoma.

Drug News Perspect 19(4):201-209, 2006.

8. Watanabe M, Dewan Md. Z, Taira M, Shoda M, Honda M, Sata T, Higashihara M, Kadin ME, Watanabe T, Yamamoto N, Umezawa K, Horie R
I κ B α independent induction of NF- κ B and its inhibition by DHMEQ in Hodgkin-Reed-Sternberg cells.

Lab Invest 87, 372–382, 2007

9. Horie R, Ishida T, Maruyama-Nagai M, Ito K, Watanabe M, Yoneyama A, Higashihara M, Kimura S, Watanabe T

TRAF activation of C/EBP β (NF-IL6) via p38 MAPK induces HIV-1 gene expression in monocytes/macrophages.

Microbes and Infection, in press

2. 学会発表

1. 三沢 彩、鴨居功樹、山本啓裕、三宅在子、石田尚臣、田中勇悦、望月學、渡邊 俊樹
「Tax-SUV39H1 相互作用による HTLV-1 プロモーター活性抑制機構の解析」
日本ウイルス学会第54回学術集会
平成18年11月19日–21日
名古屋

2. 魚田 慎、渡邊 俊樹、山本直樹、山岡昇司
「転写因子 NF- κ B 新規阻害剤 IMD-0354 は ATL 細胞の増殖を抑制し、細胞死を誘導する」
日本ウイルス学会第54回学術集会
平成18年11月19日–21日
名古屋

3. 山本啓裕、石田尚臣、古川洋一、田中勇悦、中村祐輔、渡邊 俊樹
「HTLV-1 Tax とヒストン H3K4 メチル化酵素 SMYD3 の相互作用の解析」
日本ウイルス学会第54回学術集会
平成18年11月19日–21日
名古屋

4. 堀江 良一、渡邊 俊樹
合同シンポジウム 悪性リンパ腫の分子病態と分子標的療法
「Molecular basis and strategies for treating Hodgkin lymphoma and anaplastic large cell lymphoma with NF- κ B inhibitor」
第68回日本血液学会総会
平成18年10月6-日 福岡

5. 三沢彩、鴨居功樹、山本啓裕、三宅在子、石田尚臣、田中勇悦、望月學、渡邊 俊樹
ワークショップ 成人 T 細胞白血病・リンパ腫

の分子病態

「Tax-SUV39H1 相互作用による HTLV-1 プロモーター活性抑制機構の解析」

第 68 回日本血液学会総会

平成 18 年 10 月 6 日 福岡

6. 渡邊 俊樹

ワークショップ 先端医学 感染 炎症と腫瘍

「レトロウイルスの多段階発癌のモデルとしての ATL 発祥機構」

第 96 回日本病理学会総会

平成 19 年 3 月 13 日—15 日

大阪

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

平成 18 年度分担研究報告書

「マイクロアレイ技術を用いた ATL のゲノムワイドな解析による 新規治療標的分子の探索」

「JSPFAD コホートによるデータベース/バイオマテリアルバンクの維持解析」

分担研究者：山口 一成（国立感染症研究所、血液安全性研究部）

研究要旨

我々の研究室では、本研究計画の基盤となる HTLV-1 感染者および関連疾患患者の末梢血を収集して単核球を分離し、血漿とともに保存している。血漿の一部を用いて可溶性 IL-2Ra を測定し、単核球より抽出した染色体 DNA を用いてプロウイルスコピー数を定量している。本コホート研究では、平成 18 年度末までにのべ 2300 検体を超えるサンプルを集積した。このバイオマテリアルバンクの中から、ゲノム解析用に ATL 細胞数=プロウイルスコピー数 > 50 / 100 細胞の ATL 検体 108 を、GeneChip® 250K アレイを用いた Molecular allelotyping により、ATL で特徴的に認められるゲノムの高度増幅、欠失、およびアレル不均衡解析に供した。この解析から明らかになったいくつかの遺伝子異常に関するデータの確認作業や発現解析へも検体を提供している。さらに、次年度以降の解析に供する検体を種々の条件を検討して選別し準備態勢を整えている。

A. 研究目的

全国コホート研究班 JSPFAD を通じて、HTLV-1 感染者の末梢血検体を集積し、本研究計画に使用する検体を確保し、目的に応じて調整して解析に供することを目的とする。

血液センターの分担研究者の責任のもとに、それぞれの施設における HTLV-1 キャリアを対象とし、研究承諾者（研究参加者）の末梢血の採血を行う。各施設の倫理規定の遵守については、分担研究者が責任を持つ。

検体保存および DNA 抽出施設

B. 研究方法

研究の対象及び実施場所等

研究対象検体の採取に関して

長崎大学医学部、大分大学医学部、宮崎大学医学部、東京大学医科学研究所、大阪府立大学医学部、鹿児島大学医学部及び福岡日赤

検体採取機関において個人識別情報管理者（分担研究者が担当）による匿名化の後、国立感染症研究所において参加者臨床情報を保管し、検体は福岡日赤血液センターで保存する。検体からの DNA 抽出も同センターが責任を持って行い、DNA を保管する。

遺伝子情報解析

東京大学において行う。

Multiplex Real Time PCR 法によるプロウイルス定量

検出系として TagMan 法を採用し、反応チューブ内の DNA の定量と標的のウイルス遺伝子の増幅を 1 チューブ内で行う multiplex PCR 法で解析する事とした。DNA 定量用には ABI 社が用意しているハプロイドあたり 1 コピーの遺伝子である RNaseP のプライマー/プローブを使用した。また、最適なウイルス遺伝子の増幅標的領域を決めるため pol と pX 領域にそれぞれにプライマーを設定して増幅効率を比較検討し、最終的に我々が設計した pX 領域のプライマーを用いる事で定量系を確立した。

サザンプロット法によるクローナリティ解析
プロウイルス量の定量の結果 20%以上の値が得られた検体については、HTLV-1DNA をプローブとしたサザンプロットティングを行い、クローナリティの解析をこなった。

結果

1、平成 18 年度解析検体数

平成 18 年度に集積されて検体数は述べ 830 検体あった。臨床情報の収集は一部遅れるため正確な数字は確定できないが、その内訳は、
無症候性キャリア：597 検体、
ATL：148 検体、

HAM：9 検体、

ぶどう膜炎：80 検体

であった。

2、ゲノム解析用検体の提供

上記の今年度集積検体のみならず、過去の分をあわせた約 2300 検体より、個人番号の明確なものををもとに重複を避けて解析用検体とした。

ATL に関しては、108 検体を提供し、今年度の解析にはそのうち 75 件体分のデータを取りまとめた。

HAM および HU の検体も解析に向けて準備をととのえており、平成 19 年度に解析の予定である。

D. 考察

JAPFAD のバイオマテリアルバンク形成自体は順調に進んでいる。臨床情報の集約が遅れていることが、適切な検体の選択を行う上での障害となっていることが明らかとなった。この反省から、JSPFAD としては、検体送付時に添付する調査票、および臨床情報の収集法を平成 18 年 11 月より改訂した。検体への添付伝票に個人番号と臨床診断名を明記することにしたため、検体の区分が著しく改善された。また、臨床情報の収集に関しても、Excel file に入力する形式にしたため、省力および時間差の解消がもたらされた。

E. 結論

JSPFAD によるバイオマテリアルバンクの検体供給により ATL 細胞の allelokaryotyping

が可能になった。検体情報の組織化が図られたため、来年度以降の解析をより効率的に行うための基盤が整備された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1) Hamaguchi I, Imai J, Momose H, Kawamura M, Mizukami T, Kato H, Naito S, Maeyama J, Masumi A, Kuramitsu M, Takizawa K, Mochizuki M, Ochiai M, Yamamoto A, Horiuchi Y, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K.: Agp and Hpx are useful for pertussis vaccine safety control as vaccine toxicity-related genes. Vaccine in press

2) Masumi A, Fukazawa H, Shimazu T, Toshida M, Ozato K, Komuro K, Yamaguchi K.: Nucleolin is involved in interferon regulatory factor-2-dependent transcriptional activation. Oncogene 25:5113-5124,2006

3) Mizuochi T, Okada Y, Umemori K, Mizusawa S, Yamaguchi K.: Evaluation of 10 commercial diagnostic kits for in vitro expressed hepatitis B virus (HBV) surface antigens encoded by HBV of genotypes A to H. J Virological methods 136,254-256,2006

4) Hamaguchi I, Morisada T, Azuma M, Murakami K, Kuramitsu M,

Mizukami T, Ohbo K, Yamaguchi K, Oike Y, Dumont DJ, Suda T.: Loss of Tie2 receptor compromises embryonic stem cell-derived endothelial but not hematopoietic cell survival. Blood 107:1207-1213, 2006

5) Ohsugi T, Kumasaka T, Ishida A, Ishida T, Horie R, Watanabe T, Umezawa K, Yamaguchi K.: In vitro and in vivo antitumor activity of the NF-kB inhibitor DHMEQ in the human T-cell leukemia virus type I transformed cell line, HUT-102. Leuk Res,30:90-97,2006

学会発表

1. 長谷川秀樹、澤洋文、大場靖子、片野晴隆、佐多徹太郎、倉田毅、長嶋和郎 成人 T 細胞白血病(ATL)モデルマウスの解析 第 95 回日本病理学会学術集会 平成 18 年 4 月 30 日-5 月 2 日 東京
2. 川口晶、一戸猛史、澤洋文、岡田義昭、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、William W.Hall、長谷川 秀樹成人 T 細胞白血病リンパ腫(ATLL)モデルマウスにおけるケモカインの発現とその機能解析 第 54 回日本ウイルス学会学術集会 平成 18 年 11 月 19 日-21 日 名古屋

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

平成 18 年度分担研究報告書

「マイクロアレイ技術を用いた ATL のゲノムワイドな解析による 新規治療標的分子の探索」

「ATL モデルマウスを用いたケモカイン及びそのレセプターの解析に関する研究」

分担研究者：長谷川秀樹（国立感染症研究所、感染病理部）

研究要旨

我々の研究室では近年 HTLV-I の調節遺伝子である Tax を lck proximal promoter を用いて発達段階にある胸腺細胞にのみに発現させたトランスジェニックマウスを完成させた。本マウスは白血病を発症し、ヒトの ATLL に特徴的である血管周囲性の著しい浸潤を多くの組織において示した。また腫瘍化した細胞は CD4-CD8-のダブルネガティブな pre-T cell 由来の細胞であった。本研究では、このマウスを用いた白血病細胞の多臓器への浸潤のメカニズムの解明を試みた。マウスにおけるケモカイン、及びケモカインレセプターの発現を腫瘍の浸潤状態と比較した。

A. 研究目的

ATL マウスモデルを用いてその増殖浸潤におけるケモカイン及びそのレセプターとその情報伝達系の関与を明らかにすることにより新規治療ターゲットとしてのケモカイン及びそのレセプター、またそれらの情報伝達分子の効果を in vivo で調べる事を目的とする。

B. 研究方法

材料と方法：

動物実験

すべての動物実験は国立感染症研究所実験動物委員会の承認の元に行われた。C57BL/6 マウス（オリエンタル酵母）を用いてトランス

ジェニックマウスを作製した。

・プラスミドとトランスジェニックマウスの作製

トランスジェニックマウスは C57BL/6 を用い標準の方法に従い作製した。挿入遺伝子である p_{lck}-Tax は HTLV-I Tax の配列を PCR 法により増幅し lck 近位プロモーターにより挿入遺伝子を発現するベクター p1017 の制限酵素 BamHI サイトに挿入した。p_{lck}-Tax プラスミドを Not I で直鎖化し 6.3 kb の遺伝子断片を挿入した。遺伝子挿入の前には Qiaex gel extraction kit (Qiagen, CA) を用いて精製した。生まれたマウスの尻尾よりゲノム DNA を採

材しサザンブロット法にて遺伝子挿入を確認した。

定量的 RT-PCR

ATL モデルマウスの細胞及び組織から total RNA を Trizol(GIBCO BRL)にて抽出した。1 μ g の RNA に対し DNase Amplification Grade1 を用いて DNase 処理を行い、Oligo(dT)primer、RNase inhibitor(Promega)、RT Omniscript RT Kit(Qiagen)を用いて cDNA を作成した。

PCR は Quantitative PCR Probe (QIAGEN) を用いて行なった。スタンダードにはそれぞれの遺伝子の cDNA を含んだプラスミドを段階希釈した物を用いた。 β -actin をインタナルコントロールとし、mRNA の定量的な評価は β -actin のコピー数との比較により行った。

ABI Prism 7000 を使い、サイクル条件は 50°C 2 min, 95°C 15 min, (94°C 15 sec, 60°C 1 min) \times 45 cycle で行なった。

病理組織学的解析と免疫組織染色

遺伝子挿入が確認されたマウスを経時的に病理組織学的に解析した。検体は緩衝ホルマリンで固定後パラフィンで包埋し薄切後、H&E 染色及グルコット染色を行った。また、抗 CD3 抗体を用いて免疫組織染色を行った。末梢血の塗沫標本はギムザ染色を行った。

結果

1、HTLV-1 tax 遺伝子トランスジェニックマウス

HTLV-1Tax 遺伝子を発達中の胸腺細胞及び

T 細胞で発現させる目的で lck 近位プロモーターにより発現する発現ベクター p1017 を用いた。得られた tax トランスジェニックマウスは生後 10 ヶ月～23 ヶ月経過した後に肝脾腫、リンパ節腫脹、腸間膜腫瘍を発症し、更には白血病を発症した。組織学的には盛んな分裂像を伴う diffuse large-cell lymphoma の像を呈し腫瘍細胞は肝臓、脾臓、肺、腎臓、皮膚への浸潤がみられた。白血化した個体の末梢血中に見られる白血病細胞は核に深い切り込みのくびれを持つ ATLL に特徴的ないわゆる "flower cell" 様の細胞であった。

2、マウス ATL 細胞でのケモカイン、ケモカインレセプターの発現

HTLV-1 tax トランスジェニックマウスのうち白血病を発症した個体での腫瘍細胞でのケモカイン、およびそのレセプターの発現を定量的 RT-PCR 法を用いて正常マウス T 細胞での発現を比較した。調べたケモカインは TARC, LARK, RANTES, SDF-1 α , CTACK, Fractalkine、でケモカインレセプターは CCR5, CCR7, CCR10, CXCR4, CCR4, CCR6, CXCR1 を調べた。結果を図 1、及び図 2 に示す。マウス ATL 細胞においてはこれら調べた全てのケモカインの発現の上昇が認められた。またケモカインレセプターは CCR5, CCR7, CCR10, CXCR4 の発現は亢進していたが、CCR4, CCR6, CXCR1 の発現は低下していた。

正常マウスでのケモカインの発現が ATL 発症時の浸潤状態に影響を与えると考えられる

ので、マウスの各臓器における SDF-1 α の発現を比較した。脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、小腸から RNA を作成し RT-quantitative PCR を行ったところ脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓で高い発現が認められた。中でも肺、肝臓、脾臓。腎臓は ATL の著しい浸潤が認められる組織であるこれら臓器での腫瘍細胞の浸潤に SDF-1 α の発現とその走化誘導能が関与している可能性が考えられる。

D. 考察

ケモカインは炎症時に細胞の移動を制御することで組織から組織への細胞の移動に役割を果たすと考えられている。いくつかのガンや ATL、HAM/TSP での腫瘍浸潤においてもケモカインとの関係に関する報告がされている。例えば ATL 腫瘍細胞上の CCR4 が皮膚への浸潤や予後の悪さに関与するという報告がある。表面上の CCR7 は CCL21/SLC や CCL19/ELC に応答して二次リンパ組織への浸潤と相関するとされる。抹消血やリンパ組織での一部の HTLV-1 感染細胞において CCL5/RANTES の著しい上昇が認められる。肺での組織病理学的変化と CCL5/RANTES の間に相関がある事が知れることから、HTLV-1 のキャリアーにおける肺での炎症には CCL5/RANTES による T リンパ球の集積が関与することも考えられている。本マウスにおいても肺で CCL5/RANTES の高発現し(data not shown)、肺において炎症も見られるため、*in vivo* において何らかの役割を果たしている可能性はある。更に HTLV-1 感染細胞で CCL2/MCP-1 mRNA の発現上昇がみられる他

HAM/TSP の患者において血管周囲性の浸潤細胞で CCL2/MCP-1 の発現上昇が見られることから HTLV-1 関連疾患での CCL2/MCP-1 の関係も示唆されている。CXCL12/SDF-1 α に対しては *in vitro* においても *in vivo* においてもリンパ球や単球が高い走化性を示す。特にリンパ球に対しては CXCL12/SDF-1 α が最も高い走化誘導能を示す事が知られている。HAM/TSP においては Tax によって誘導される CXCL12/SDF-1 α が組織へのリンパ球の浸潤に関わっているとされている。我々は ATL マウスモデルを用い、腫瘍の増殖と浸潤に関与するケモカインを同定する為に定量的 RT-PCR を行い関連が示唆される多くのケモカインの発現と、レセプターの発現亢進、減少と組織への浸潤を比較し、腫瘍細胞の浸潤に SDF-1 α の関与が強く示唆された。今後 SDF-1 α 自身やそのレセプターである CXCR4 及びその情報伝達分子を治療ターゲット分子とした治療法をモデルマウスを用いて行っていく必要がある。

E. 結論

ATL モデルマウスを用い、腫瘍細胞でのケモカイン及びそのレセプターの発現と腫瘍浸潤を比較検討した。マウスでの ATL 病態形成にケモカインが強く関与していることが示唆された。本モデルマウスを用いた病態解析はモデル動物として悪性腫瘍発症時の増殖浸潤の予防法開発のためモデル動物となると考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

日-21日 名古屋

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Saijo M., Ami Y., Suzaki Y., Nagata N., Iwata N., Hasegawa H., Ogata M., Fukushi S., Mizutani T., Sata T., Kurata T., Kurane I., Morikawa S. Monkeypox Highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, that lacks expression of *B5R* membrane protein protects monkeys from monkeypox **J.Virol** 2006 Jun;80(11):5179-88.
2. Maeda M, Sawa H, Tobiume M, Tokunaga K, Hasegawa H, Ichinohe T, Sata T, Moriyama M, Hall WW, Kurata T, Takahashi H. Tristetraprolin inhibits HIV-1 production by binding to genomic RNA. **Microbes and Infection**. 2006 Sep;8(11):2647-56.

学会発表

3. 長谷川秀樹、澤洋文、大場靖子、片野晴隆、佐多徹太郎、倉田毅、長嶋和郎 成人 T 細胞白血病(ATL)モデルマウスの解析 第 95 回日本病理学会学術集会 平成 18 年 4 月 30 日-5 月 2 日 東京
4. 川口晶、一戸猛史、澤洋文、岡田義昭、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、William W.Hall、長谷川 秀樹成人 T 細胞白血病リンパ腫(ATLL)モデルマウスにおけるケモカインの発現とその機能解析 第 54 回日本ウイルス学会学術集会 平成 18 年 11 月 19

ATL において不活化される新規標的遺伝子 Blimp1 に関する研究

分担研究者 小川 誠司 東京大学大学院医学系研究科 21 世紀 COE プログラム特任助教授

研究要旨

本分担研究では、ATL の新規治療標的分子を発見するために、ATL を対象に高密度マイクロアレイを用いた Molecular allelokaryotyping により共通にホモ欠失を認めた領域から、標的遺伝子の同定を行った。その結果 6 番染色体長腕において複数の ATL 細胞株で共通にホモ欠失を認める領域を見出した。サザン解析による詳細な欠失領域解析の結果、共通ホモ欠失領域内に存在する唯一の遺伝子は Blimp-1 であった。Blimp-1 は成熟 B 細胞の終末分化に関与する転写因子であるが、昨年びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫で高率に変異が認められることが報告され注目されている。また最近 Blimp-1 欠失マウスの解析の結果、T 細胞分化・増殖抑制にも関与することが報告されている。そこで Blimp-1 の不活化が ATL の発症に関与することが示唆されたため、Blimp-1 の機能解析を行った。Blimp-1 を腫瘍細胞株に過剰発現させると、細胞周期制御に関与する遺伝子の発現が誘導され、細胞周期は停止し細胞増殖は抑制された。以上より Blimp-1 は ATL の発症に関与する標的遺伝子の一つであることが示唆された。現在さらに生体内での Blimp-1 の抗腫瘍効果を明らかにするため、Blimp-1 変異マウスを作製し解析中である。

A. 研究目的

ATL に対しては、現在、造血幹細胞移植以外には根治的治療法がなく、今後、副作用の少ない有効な治療法を確立するためには、本疾患の原因分子の同定とこれを標的とした分子標的薬の開発が重要である。ATL は HTLV-1 感染 T 細胞におけるゲノム異常の蓄積によって発症すると考えられるが、p16 など一部の例外を除いて、未だこうしたゲノム異常の標的となっている遺伝子に関する知見は限られている。本分担研究では、ATL 治療薬開発のための新規治療標的分子を同定することを目的とし、高密度マイクロアレイによるゲノム解析技術を用いて、ATL の発症に関わるゲノム変異を網羅的に探索することにより、異常が集積する領域より標的遺伝子候補を同定した。さらに候補遺伝子の異常が腫瘍化に関与するかどうかを明らかにするために候補遺伝子の機能解析を行った。

B. 研究方法

(1) 高密度マイクロアレイによる ATL 症例の Molecular allelokaryotyping

ATL 患者検体 102 例を対象に GeneChip 250K アレイを用いた Molecular allelokaryotyping を行ない、高度に増幅している領域、欠失領域、アレル不均衡領域を同定した。

(2) ATL 症例におけるホモ欠失領域の解析

高密度マイクロアレイ解析の結果 ATL において共通にホモ欠失が認められた 6q21 領域について、

PCR 法およびサザン解析による詳細な欠失領域のマッピングを行い、標的遺伝子の同定を行った。標的遺伝子候補について直接塩基配列決定法により、腫瘍特異的な変異のスクリーニングを行った。

(3) Blimp-1 の機能解析

共通ホモ欠失より同定された Blimp-1 の機能を解析するため、腫瘍細胞株に Blimp-1 を導入し細胞増殖、細胞周期の変化を解析した。Blimp-1 による細胞周期の停止が認められたため、cDNA アレイ、RT-PCR およびウエスタン法を用いて Blimp-1 の発現に伴う細胞周期の制御に関与する各種因子の発現量の変化を解析した。Blimp-1 の細胞周期制御に関与することが予想された蛋白質については siRNA を用いたノックダウン実験を行い、細胞周期の変化の有無を解析した。

(4) Blimp-1 の変異マウスの作成

すでに作成した Blimp-1 ホモ欠失マウスは胎生致死であった。そこで誘導的に Blimp-1 を欠失させるため Mx1-Cre マウスを用いて、Blimp-1 flox/+, Mx1-CreTg のコンディショナルノックアウトマウスを作製した。

(倫理面への配慮)

検討に用いた検体は、当該患者からインフォームドコンセントを得たのちに連結可能匿名化を施して検討に用いた。東京大学医学部の設置する倫理委員会の承認済みである。

C. 結果

102 例の ATL 患者検体について GeneChip 250K アレイを用いた Molecular allelokaryotyping により、ATL で特徴的に認められるゲノムの高度増幅、欠失、およびアレル不均衡を同定した。このうち 6q16-21 に認められたホモ欠失領域を対象として、サザン法を用いた詳細な欠失領域の解析の結果、この領域に存在する唯一の遺伝子として Blimp-1 を同定した。

ATL における Blimp-1 の変異解析の結果、Blimp-1 の欠失以外に点突然変異も認めた。現在症例数を増やして解析中である。

また Blimp-1 の腫瘍抑制機能を解析するため腫瘍細胞株に Blimp-1 を発現させたところ、細胞増殖は抑制された。Blimp-1 誘導細胞における細胞周期を詳細に解析したところ、G1 および G2 で細胞周期は停止していた。細胞周期の制御に関与する各種因子の発現を RNA レベルおよび蛋白質レベルで解析したところ、Blimp-1 により p21、p57 の発現が誘導されることが明らかになった。さらに各制御因子に対する siRNA を用いたノックダウン解析の結果、Blimp-1 による細胞周期の停止は Rb および p53 に依存していた。

生体内での Blimp-1 の機能を明らかにするために Blimp-1 コンディショナルノックアウトマウスを作成し、現在観察中にある。今後造腫瘍性などの解析を行う。

D. 考察

ATL を対象とした高密度マイクロアレイを用いた網羅的ゲノム解析の結果、共通にホモ欠失を認めた領域より Blimp-1 を同定した。また Blimp-1 の変異をもつ症例を見出した。

Blimp-1 は B 細胞の分化を制御する転写因子とし発見され、B 細胞における機能については既に世界中で研究されてきた。一方昨年 2 つのグループよりびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫の活性型 B 細胞型に特異的かつ高率に遺伝子変異があることが報告され、癌抑制遺伝子の候補として注目されている。ただし、どのような機序により Blimp-1 の不活化が腫瘍化に関与するかについては現在のところ証明されていない。また Blimp-1 は B 細胞以外にも骨髄球系細胞や筋細胞の分化や、生殖細胞系列の決定にも重要な因子であることが報告されている。さらに昨年 Blimp-1 を欠失したマウスでは T 細胞の一部の分画が増加することが示され、T 細胞の分化・増殖の制御にも関与することが示唆されている。以上の結果を踏まえて、我々は Blimp-1 の腫瘍抑制における機能を解析した。現在までの細胞株を用いた解析では、Blimp-1 は p21、p57 の発現誘導を介し、Rb および p53 依存性に細胞周期を制御していることが示唆された。ATL では p15、p16 のメチル化やホモ欠失による不活化が高率に認められているが、これら細胞周期を負に制

御する因子の不活化が ATL の発症において重要であることが示唆される。今後細胞周期の制御因子を標的とした治療法の開発により腫瘍抑制効果が期待される。

生体内における Blimp-1 の不活化の腫瘍化への関与については、今後 Blimp-1 コンディショナルノックアウトマウスを用いてさらに詳細に解析を行う。

E. 結論

我々が独自に開発した高密度マイクロアレイを用いた Molecular allelokaryotyping の手法を用いて、ATL の標的遺伝子候補として Blimp-1 を見出した。Blimp-1 は細胞周期を抑制することで抗腫瘍効果を発揮することより癌抑制遺伝子として機能することが示唆された。今後 Blimp-1 変異マウスを用いて生体内における機能につき詳細に解析を行う。また Blimp-1 以外の標的遺伝子候補についても、引き続き機能解析を行う。

F. 研究発表

1. 論文発表

Sanada M, Uike N, Ohyashiki K, Ozawa K, Lili W, Hangaishi A, Kanda Y, Chiba S, Kurokawa M, Omine M, Mitani K, and Ogawa S. Unbalanced translocation der(1;7)(q10;p10) defines a unique clinicopathological subgroup of myeloid neoplasms. Leukemia, in press

Nakagawa M, Ichikawa M, Kumano K, Goyama S, Kawazu M, Asai T, Ogawa S, Kurokawa M, Chiba S. AML1/Runx1 rescues Notch1-Null mutation-induced deficiency of para-aortic splanchnopleural hematopoiesis. Blood 108:3329-34, 2006.

Jacobs S, Thompson ER, Nannya Y, Yamamoto G, Pillai R, Ogawa S, Bailey DK, Campbell IG. Genome-wide, high-resolution detection of copy number, loss of heterozygosity, and genotypes from formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue using microarrays. Cancer Res. 67:2544-2551, 2007

Hosoya N, Sanada M, Nannya Y, Nakazaki K, Wang L, Hangaishi A, Kurokawa M, Chiba S, Ogawa S. Genomewide screening of DNA copy number changes in chronic myelogenous leukemia with the use of high-resolution array-based comparative genomic hybridization.

Genes Chromosomes Cancer.;45:482-94, 2006

2. 学会発表

山本 豪、南谷 泰仁、真田 昌、中崎 久美、王 莉莉、半下石 明、細谷 紀子、千葉 滋、黒川 峰夫、小川 誠司 高密度オリゴアレイを用いた成人白血病における UPD の網羅的解析 一般口演 O-718 (第 64 回日本癌学会総会)

真田 昌、山本 豪、南谷 泰仁、中崎 久美、

王 莉莉、加藤 元博、細谷 紀子、半下石 明、千葉 滋、黒川 峰夫、小川 誠司 高密度 SNP アレイを用いた骨髄異形成症候群・骨髄増殖性疾患の網羅的なアレル不均衡/LOH の解析 一般口演 O-717 (第 64 回日本癌学会総会)

南谷 泰仁、真田 昌、中崎 久美、山本 豪、王 莉莉、細谷 紀子、半下石 明、千葉 滋、黒川 峰夫、小川 誠司 小児急性リンパ性白血病の網羅的ゲノム解析 一般口演 O-714 (第 64 回日本癌学会総会)

Seishi Ogawa, 学会シンポジウム Profiling of MDS genomes using high-density SNP genotyping microarrays (第 68 回日本血液学会・第 48 回日本臨床血液学会)

中崎 久美、南谷 泰仁、山本 豪、真田 昌、細谷 紀子、王 莉莉、中村文彦、加藤元博、半下石 明、黒川 峰夫、千葉 滋、小川 誠司 高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いた骨髄増殖性疾患の網羅的なゲノム解析演 (第 68 回日本血液学会・第 48 回日本臨床血液学会)

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特になし