

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業：ヒトゲノムテーラーメイド研究 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19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 渡邊 俊樹

平成20年（2008年）4月

## 目次

### I. 総括研究報告

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	1
---	---

### II. 分担研究報告

1. 「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	8
2. 「高密度発現アレイを用いた ATL の発現プロファイルの解析」 小川 誠司	13
3. 「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	17
4. 「ATL モデルマウスを用いた腫瘍浸潤とケモカインの解析」 長谷川秀樹	20
5. 「ATLL モデルマウスから単離された腫瘍細胞の浸潤機構」 澤 洋文	24

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	28
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	31
-----------------	----

総括研究報告

## 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、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、全国規模の HTLV-1 感染コホート研究組織 JSPFAD で集積した ATL/ATLL 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およびアレルの不均衡について網羅的な解析を行った。本年度は、昨年度に施行した 75 症例の解析に加えて、各病型を含む約 100 症例の解析を追加し、計 171 例についてアレイ解析を行った。アレイ解析の結果、ATL を特徴づけるゲノムプロファイルが確認され、さらに、増幅・欠失の標的となる遺伝子の候補が多数同定された。興味深いことに、これらの多くは成熟 T 細胞の機能に関与する遺伝子、あるいは成熟 T 細胞において高い発現をみとめ、T 細胞における機能的な重要性が示唆される遺伝子であった。一方、44,000 個の遺伝子に対するオリゴヌクレオチドプローブを搭載する cDNA アレイを用いて、ATL 検体 26 例について網羅的な発現プロファイルの解析を行い、正常末梢血 CD4+ T 細胞を対照として、ATL に特異的な遺伝子発現の異常を解析した。クラスタリング解析では、ATL 検体と正常 CD4 陽性細胞と明確に異なる遺伝子発現が確認され、ATL で特異的な発現異常を示す遺伝子が多数同定された。ATL におけるゲノムコピー数と遺伝子発現については、明確な相関が確認されたが、これは一方で、ゲノムコピー数変化にともなう非特異的な遺伝子発現の異常が ATL 特異的な発現として検出される可能性が示唆され、発現解析は ATL の遺伝子診断という観点では有用であるものの、発現解析のみに基づく分子標的の同定には一定の限界があることが示唆された。一方、ATL のモデルマウスを用いたがん細胞の多臓器への浸潤のメカニズムの検討から、ケモカイン CXCL12/SDF-1 $\alpha$  の経路に MEK-ERK 経路が働いている事が分かり、治療標的の一つとしての可能性が示された。

最終年度には、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 の分子診断技術の確立、ならびに、新規治療法の開発に向けた標的分子の同定が期待される。

### 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	特任准教授
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-I キャリアーの抹消血および 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および関連組織から提供された 100 検体のゲノム DNA を用いて、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)。本年度はリンパ腫型の検体を 43 検体加えて、各病型の試料を整備した。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、専用スクリーナーで特異的なシグナルを検出した。

### (3) 高密度発現アレイを用いた ATL の発現プロファイルの解析 (小川)

Agilent 社製高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いた発現プロファイルの解析を、ATL 患者検体で、SNP アレイによる網羅的なゲノムコピー数解析データが利用可能な検体 26 検体を解析の対象として行った。正常対照としては、年齢層を一致させた 21 人の健康人ボランティアから採取した末梢血 CD4 陽性 T 細胞を用いた。常法にもとづいて RNA を抽出し、T7 プライマーを用いた RNA 増幅を施した後、cDNA プローブを合成、Agilent 社の高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いて発現解析を行った。発現データは、アレイ解析ソフトウェア GeneSpring を用いて解析した。正常人末梢血 CD4 陽性細胞と ATL 試料の発現解析データに基づいて、クラスタリング解析を行い、また、二群間で発現量に関する t 検定を行うことにより、ATL 特異的に発現異常を示

す遺伝子群の同定を行った。

### (4) ATL モデルマウスを用いた腫瘍浸潤とケモカインの解析 (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 様細胞の多臓器への浸潤のメカニズムに関して検討した。実験に用いた細胞は Tax transgenic mice 由来のリンパ腫細胞を RPMI に懸濁し、 $1 \times 10^6$  個を SCID マウスの腹腔内に接種し、約 28 日後マウスが白血病を発症した時点で腹水及び脾臓を回収した。再びこれを SCID マウスに腹腔内接種で植え継ぎ、これを繰り返す事で腫瘍細胞のみの集団にした。更に lymphoprep (AYIS-SHIELD) を用いて腫瘍細胞を分離してこれを mATL cell として用いた。mATL cell を 100ng/ml の CXCL12/SDF-1  $\alpha$  で刺激を加え経時的に、シグナル経路、アポトーシス、走化性に関して検討した。

### (5) ATLL モデルマウスから単離された腫瘍細胞の浸潤機構に関する研究 (澤)

分担研究者の澤らは、ATLL モデルマウスから単離した腫瘍細胞 (mATLL cell) を用いて、ケモカインに対する腫瘍細胞の走化性に着眼し、種々の阻害剤を使用し、SDF-1 $\alpha$  レセプター CXCR4 からのシグナル伝達系と走化性について検討した。

#### (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。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、本年度分として、新たにのべ 630 例の検体が集積された。内訳は HTLV-I キャリアー 460 検体、ATL 128 検体、HAM 12 検体、ぶどう膜炎 30 検体である。本年度で、JSPFAD で集積された検体は総計 3,000 検体となっている。さらに、久留米大学病理大島博士より集積された、リンパ腫型 ATL のリンパ節 DNA 40 検体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とえられてきた。

(2) GeneChip®250K アレイを用いた ATL の molecular allelokaryotyping では、ATL で特徴的に認められるゲノム異常としては、1q, 3p, 3q, 6p, 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, 17p 18p におけるコピー数減少が認められ、これらによって ATL 特有のゲ

ノムプロファイルが形作られることが明らかとなった。一方、このような染色体バンドレベルの比較的大きな領域における異常に加えて、アレイの解像度が高いことと関連して、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。こうした領域には、通常1ないし2個の遺伝子がコードされているのみで、こうした領域からはATLの発症に関わる可能性のある標的遺伝子の候補が多数同定された。興味深いことに、ATLで増幅や欠失の標的となっていると考えられるこれらの遺伝子の多くは、成熟T細胞の機能における重要性が示されている遺伝子やT細胞において高い発現を示す遺伝子であった。

また、本年度は、急性型および慢性型の症例に加えて、リンパ腫型の症例40例の解析を行い、ATLの病型におけるゲノム異常の相違について解析した。本質的には、これらの病型によるゲノムプロファイルに大きな差異は認められなかったが、リンパ腫型においては、hyperploidの症例、および3番染色体の片親性2倍体を示す症例が多いこと、また、heliosを含む領域の欠失の頻度が高いこと、などの特徴が確認された。

(3) 高密度発現アレイを用いた ATL の発現プロファイルの解析

ATL 検体と健康人由来 CD4 陽性 T 細胞の発現データに基づくクラスタリング解析では、両者は明確に異なるクラスターに分類された。また、permutation テストによる多重比較の補正を考慮にいたした t 検定による遺伝子発現の比較においても、極めて小数の症例の解析にもかかわらず、ATL 細胞において、有意に正常 CD4 陽性細胞と異なる発現を示す遺伝子が多数同定された。

一方、特定のゲノムコピー数異常を有する症例と異常を示さない症例の二群についてゲノムコピー数異常と発現の関連について統計学的に検定を行った。すなわち、両群でゲノムコピー数変化のない領域については統計的に有意な遺伝子発現の異常は認められなかったが、コピー数の異なる領域については、多数の遺伝子に関する遺伝子発現の平均値は当該領域のゲノムコピー数変化のない群に比べて有意に高く、遺伝子発現とゲノムコピー変化の間には明確な相関が確認された。

(4) マウス ATL 細胞のケモカインによる走化性とシグナル伝達の解析：種々のケモカイン CCL17/TARC、CCL20/LARC、CCL5/RANTES、CCL21/SLC、CCL27/CTACK、CXCL12/SDF-1 $\alpha$  に対する *in vitro* での走化性を調べた結果、マウス ATL 細胞は SDF-1 $\alpha$  に対して濃度依存的に非常に強い応答を示した。マウス ATL 細胞で発現している SDF-1a レセプター CXCR4 下流のシグナル伝達を検討したところ、マウス ATL

細胞では恒常的に ERK1/2 の活性化が認められ、SDF-1 $\alpha$  (100ng/ml) 刺激によりリン酸化の著しい亢進が認められた。

次に、SDF-1 $\alpha$  による走化性に関して、MEK-ERK 経路及び NF- $\kappa$ B 経路への関与を、各種阻害剤によって検討した結果、SDF-1 $\alpha$  による ERK1/2 のリン酸化の上流には MEK が関与し、マウス ATL 細胞内においても MEK-ERK 経路が働いている事が示唆された。

#### D. 考察

昨年度に解析した 75 例の ATL 検体に加えて、約 100 例の新たな検体を解析し、計 171 例の ATL/ATLL ゲノムを高密度 SNP アレイで解析することにより、ATL ゲノムに認められるコピー数異常およびアレル不均衡の特徴が明らかとなった。ATL 全体としては、特定の染色体領域に異常を認める傾向が顕著であって、こうした異常は ATL の腫瘍化と密接に関連していることが示唆された。また、ゲノム異常による症例のクラスタリングからは、個々の腫瘍が互いに共通した異常により複数の亜型に分類しうる可能性が示された。ATL に特徴的に認められる異常に基づいたこのような亜分類が予後や治療反応性と関連するかどうかについての検討が今後の重要な課題である。

ATL のゲノムプロファイルの全体像は病型によらず、非常に類似したパターンが認められた。このことは ATL の各病型が、共通した発症の遺伝学的基盤を有していることを類推させるが、一方で、リンパ腫型に特徴的に認められるようなゲノム異常については、病型の相違を来している遺伝的な変化である可能性が示唆される。

微細な染色体領域の増加や欠失の集積領域から、ATL の発症に関わる可能性のある標的遺伝子の候補が多数同定された。この中には、CD2、CD28、CD58、CD3、Helios、ATXN1 など、成熟 T 細胞の機能の制御に関わる遺伝子、あるいは、T 細胞で高い発現を示す遺伝子多数ふくまれていた。この結果は、ATL が末梢 T 細胞の腫瘍であることから、合理的な結果であるとともに、単に偶発的な腫瘍ゲノムの不安定性の結果ではなく、腫瘍化の原因としてクローン選択に関わった可能性を強く示唆するものである。

また、ATL の病型に特徴的なゲノム変化が見いだされること、また、病理学的には一見同一に見える ATL がゲノム異常の観点からは幾つかのことなる亜型に分類されることから、今後 ATL の予後や治療反応性を予測するゲノム診断を構築できる可能性が示唆された。これらは本研究の最終年度の課題である。

遺伝子発現解析では、ATL 細胞は正常末梢血 CD4 陽性細胞とは明確に異なる遺伝子発現

様式を示すことが示唆された。しかし発現解析に関して、臨床病理学的な興味はむしろ、通常の形態学的な診断、表面マーカー解析による診断では一見同一に見える一群の腫瘍に、治療戦略上有用な heterogeneity が確認されるかどうかという問題であるが、今回の限られた症例数の解析においては、検討困難であった。今後多数の症例について予後データを含めた解析を行うことが是非とも必要である。一方、今回の解析を通じて、ATL 細胞では遺伝子発現量とゲノムコピー数との間には明確な相関が存在し、遺伝子発現量が大域的にはゲノムコピー数によって制御されている可能性が示唆された。ATL が特徴的なゲノムコピー数異常のパターンを示すことから、ATL と正常 CD4 細胞の遺伝子発現の相違の多くが、こうしたゲノムコピー数変化によって説明されうる可能性が示唆される。この観察結果は、ATL に特徴的な染色体変化は当該領域の遺伝子発現の異常を通じて ATL の発症に関わるという仮説を支持するものであるが、一方、同一染色体上にあるかぎり、直接的に ATL の発症とは関係のない遺伝子の多くが、発現プロファイルの解析で有意な発現変化を示す遺伝子として抽出される可能性をしめしており、発現解析のみからはコピー数の異常を示す染色体の大きなセグメントに含まれる多数の遺伝子のなかから、ATL の発症に関わる遺伝子を同定することが一般には困難であることが示唆される。際だった発現異常を示す遺伝子については、ATL 発症への関与は示唆されるものの、高度な増幅やホモ接合性欠失、ないし単一アレルの喪失による大きな発現低下を説明する他の原因がないかぎり、ゲノム構造の一時的な変化に帰着させることは難しいと思われる。

JSPFAD 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。今年度は名古屋市立大学病院が参加し、協力施設は全国で 42 施設となった。研究体制に整備と、臨床情報の整理・補足によって、解析対照となる検体数が飛躍的に増加している。これらの努力により、JSPFAD のコホート研究としての質が向上し、これまでの協力者の無症候性キャリアの中から、少なくとも 4 名が ATL を発症していることが明らかになった。これらの例の疫学的な検討を行うと共に、発症前と発症後の検体の解析を通じて、発症予測法の確立に貢献する情報解析が進められている。

マウス ATL 腫瘍細胞の解析では、ケモカイン CXCL12/SDF-1  $\alpha$  に対して強い走化性を示すことを示した。CXCR4 からのシグナル伝達解析から、恒常的な ERK1/2 のリン酸化の亢進と刺激に対する反応性亢進が確かめられた。また MEK の阻害剤を用いることで CXCL12/SDF-1

$\alpha$  による ERK1/2 活性化の上流因子として MEK が働いていることも確かめられた。このことから腫瘍細胞内で MEK-ERK 経路の恒常的な活性化が起きていることがわかった。これらの結果は、ATL の腫瘍細胞浸潤機構についての新たなメカニズム示すものである。今後それらの細胞内伝達シグナル系を抑制する薬剤の開発に資するものと考えられる。

## E. 結論

(1) 171 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解析し、ATL の腫瘍化と病態に関わる多数の候補遺伝子を同定することに成功した。

(2) ゲノム異常に基づくクラスター解析から、ゲノムに基づく ATL の分類の可能性が示された。

(3) ATL の遺伝子発現解析を行い、ゲノムコピー数異常との相関を検討したことにより、発現異常の、背景に関してコピー数異常の存在を明らかにした。発現解析データは有力な情報であるが、その解釈には問題があることを示した。

(3) ATL モデルマウスにおける腫瘍細胞の臓器浸潤に SDF-1  $\alpha$ -CXCR4 と MEK-ERK が重要であることを見出した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Saitoh Y, Yamamoto N, Dewan MDZ, Sugimoto H, Martinez VJ, Iwasaki Y, Matsu-bara K, Qi X, Saitoh T, Imoto I, Inazawa J, Utsunomiya A, Watanabe T, Masuda T, Yamamoto N, Yamaoka S. Overexpressed NF- $\kappa$ B inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells. **Blood** (published on-line Feb, 2008)

2. 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 $\kappa$ B $\alpha$ -independent induction of NF- $\kappa$ B and its inhibition by DHMEQ in Hodgkin-Reed-Sternberg cells. **Lab Invest** 87:372-382, 2007

3. Horie R, Ishida T, Maruyama-Nagai M, Ito K, Watanabe M, Yoneyama A, Higashi-hara M, Kimura S, Watanabe T. TRAF activation of C/EBP $\beta$  (NF-IL6) via p38MAPK induces HIV-1 gene expression in monocytes/macrophages. **Micobes Infect** 9:721-728, 2007

4. Ohsugi T, Kumasaka T, Okada S, Ishida T, Yamaguchi K, Horie R, Watanabe T, Umezawa K. Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) therapy reduces tumor formation in mice inoculated with Tax-deficient adult T-cell leukemia-derived cell lines. **Cancer Let.** 257: 206–215, 2007
5. Katano H, Sato Y, Hoshino S, Tachikawa N, Oka S, Morishita Y, Ishida T, Watanabe T, Rom WN, Mori S, Sata T, Weiden MD, Hoshino Y. Integration of HIV-1 caused STAT3-associated B cell lymphoma in an AIDS patient. **Microbes Infect** 9:1581-1589,2007
6. Franchina M, Woo AJ, Dods J, Karimi M, Ho D, Watanabe T, Spagnolo DV, Abraham LJ. The CD30 gene promoter microsatellite binds transcription factor Yin Yang 1 (YY1) and shows genetic instability in anaplastic large cell lymphoma. **J Pathol** 214: 65–74, 2008
7. Han MY, Kosako H, Watanabe T, Hattori S. ERK MAP kinase regulates actin organization 1 and cell motility 2 by phosphorylating the actin cross-linking protein EPLIN. **Mol Cell Biol** 27: 8190–820, 2007
8. Watanabe M, Ogawa Y, Itoh K, Koiwa T, Kadin ME, Watanabe T, Okayasu I, Higashihara M, Horie R. Hypomethylation of CD30 CpG islands with aberrant JunB expression drives CD30 induction in Hodgkin lymphoma and anaplastic large cell lymphoma. **Lab Invest** 88: 48–57, 2008
9. Matsuoka M, Watanabe T, Kannagi M, Bangham C, Grassmann R, Marriott SJ, Green P, Jeang K-T. Meeting report on the 13th International Conference on Human Retrovirology: Human T-cell leukemia virus research-30 years after Adult T-cell leukemia. **Cancer Res** 67:10638-10641,2007
10. Suzuki M, Kato M, Chen J, Takita J, Sanada M, Nannya Y, Yamamoto G, Takahashi A, Ikeda H, Kuwano K, Ogawa S, Hayashi Y. Whole-genome profiling of chromosomal aberrations in hepatoblastoma using high-density single-nucleotide polymorphism genotyping microarrays. **Cancer Sci** 99: 564 –570, 2008.
11. Lehmann S, Ogawa S, Raynaud SD, Sanada M, Nannya Y, Ticchioni M, Bastard C, Kawamata N, Koeffler HP. Molecular allelo-karyotyping of early-stage, untreated chronic lymphocytic leukemia. **Cancer** 112:1296–1305, 2008.
12. Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M, Kato M, Sanada M, Hemminki K, Yamamoto G, Nannya Y, Koehler R, Flohr T, Miller CW, Harbott J, Ludwig WD, Stanulla M, Schrappe M, Bartram CR, Koeffler HP. Molecular allelo-karyotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemias by high-resolution single nucleotide polymorphism oligonucleotide genomic microarray. **Blood** 111:776-784, 2008.
13. Yamamoto G, Nannya Y, Kato M, Sanada M, Levine RL, Kawamata N, Hangaishi A, Kurokawa M, Chiba S, Gilliland DG, Koeffler HP, Ogawa S. Highly sensitive method for genome-wide detection of allelic composition in nonpaired, primary tumor specimens by use of affymetrix single-nucleotide-polymorphism genotyping microarrays. **Am J Hum Genet** 81:114-126,2007.
14. Sanada M, Uike N, Ohyashiki K, Ozawa K, Lili W, Hangaishi A, Kanda Y, Chiba S, Kurokawa M, Omine M, Mitani K, Ogawa S. Unbalanced translocation der(1;7)(q10;p10) defines a unique clinicopathological subgroup of myeloid neoplasms. **Leukemia** 21:992-997, 2007.
15. Nannya Y, Taura K, Kurokawa M, Chiba S, Ogawa S. Evaluation of genome-wide power of genetic association studies based on empirical data from the HapMap project. **Hum Mol Genet** 16:3494-3505, 2007.
16. Lips EH, de Graaf EJ, Tollenaar RA, van Eijk R, Oosting J, Szuhai K, Karsten T, Nanya Y, Ogawa S, van de Velde CJ, Eilers PH, van Wezel T, Morreau H. Single nucleotide polymorphism array analysis of chromosomal instability patterns discriminates rectal adenomas from carcinomas. **J Pathol** 212: 269-277, 2007.
17. Kawazu M, Yamamoto G, Yoshimi M, Yamamoto K, Asai T, Ichikawa M, Seo S, Nakagawa M, Chiba S, Kurokawa M, Ogawa S. Expression profiling of immature thymocytes revealed a novel homeobox gene that regulates double-negative thymocyte development. **J Immunol** 179:5335-5345, 2007.
18. 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.

19. Mizukami T, Kuramitsu M, Takizawa K, Momose H, Masumi A, Naito S, Iwama A, Ogawa T, Noce T, Hamaguchi I, Yamaguchi K. Identification of transcripts commonly expressed in both hematopoietic and germ-line stem cells. **Stem Cells Dev** 17:67-80,2008.
20. Mizukami T, Imai J, Hamaguchi I, Kawamura M, Momose H, Naito S, Maeyama J, Masumi A, Kuramitsu M, Takizawa K, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K. Application of complementary DNA microarray technology to influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) vaccine safety. **Vaccine** 25:8762-8770, 2007
21. Tsukasaki K, Utsunomiya A, Fukuda H, Fukushima T, Takatsuka Y, Ikeda S, Masuda M, Nagashi H, Ueda R, Tamura K, Sano M, Momita S, Yamaguchi K, Kawano F, Hanada S, Tobinao K, Shimoyama M, Hotta T, Tomonaga M, and LSG Group: VCAP-AMP- VECF versus biweekly CHOP for adult T-cell leukemia-lymphoma: Japan Clinical Oncology Group Study, JCOG9801. **J Clin Oncol** 25: 5458-5464, 2007
22. Kuramitsu M, Hamaguchi I, Mizukami T, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mochizuki M, Naito S, Yamaguchi K. Deficient RPS19 protein production induces cell cycle arrest in erythroid progenitor cells. **Brit J Haematol** 140:348-359, 2008
23. Naito S, Maeyama J, Mizukami T, Takahashi M, Hamaguchi I, Yamaguchi K. Transcutaneous immunization by merely prolonging the duration of antigen presence on the skin of mice induces a potent antigen-specific antibody response even in the absence of an adjuvant. **Vaccine** 25:8762-8770, 2007
24. 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** 25:3355-3364, 2007
25. Ichinohe T, Nagata N, Strong P, Tamura SI, Takahashi H, Ninomiya A, Imai M, Odagiri T, Tashiro M, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H\*. Prophylactic effects of chitin microparticles (CMP) on highly pathogenic H5N1 influenza virus. **J Med Virol** 79:811-819, 2007
26. Ichinohe T, Kawaguchi A, Tamura S, Ninomiya A, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Chiba J, Sata T, Kurata T and Hasegawa H. Intranasal immunization with H5N1 vaccine plus Poly I:Poly C12U, a Toll-like receptor agonist, protects mice against homologous and heterologous virus challenge. **Microb Infect** 9:1333-1340, 2007.
27. Tsuji T, Sheehy N, Gautier VW, Hayakawa H, Sawa H, Hall WW. The nuclear import of the human T lymphotropic virus type I (HTLV-1) Tax protein is carrier and energy independent. **J Biol Chem** 282:13875-13883, 2007
2. 学会発表
1. 渡邊 俊樹「ヒトT細胞白血病ウイルスI型 (HTLV-1) の分子生物学」第6回日本血液学会第4回日本臨床血液学会教育講演
2. Toshiki Watanabe. "Searching for molecules for a targeted therapy based on molecular allelo-karyotyping of adult T-cell leukemia using high SNP genotyping microarrays" in **International Symposium on Advanced Diagnosis and Therapy of Refractory Diseases Caused by Viral Infection**. 平成20年3月27日
3. 三宅在子、石田尚臣、Dewan MdZ、梅澤一夫、山本直樹、堀江良一、渡邊 俊樹、「NF-κB阻害剤 DHMRQ を用いたエイズリンパ腫治療の基礎研究」第55回日本ウイルス学会学術集会、2007年10月21-23日、札幌
4. Dabaghmanesh N, Miyake A, Horie R, Dewan Md. Z, Yamamoto N, Watanabe T. "Transient inhibition of NF-κB by DHMEQ in primary effusion lymphoma destroys cancer cells without induction of viral replication" 第55回日本ウイルス学会学術集会、2007年10月21-23日、札幌
5. 堀江良一、渡邊真理子、Dewan MdZ, 平美也子、山本直樹、渡邊俊樹、東原正明、梅澤一夫、「NF-κB 阻害薬 DHMEQ による Hodgkin リンパ腫治療の基礎的研究」第11回がん分子標的治療研究会総会、2007年7月5-6日
6. 堀江良一、渡邊真理子、Dewan MdZ, 平美也子、山本直樹、渡邊俊樹、東原正明、梅澤一夫、「変異型 IkBa を有する H-RS 細胞での IkBb を介した NF-κB 誘導と DHMEQ による分子

標的療法」第69回日本血液学会、2007年10月11-13日、横浜

7. Watanabe T, Aizawa S, Yamamoto K, Aoki S, Maruyama-Nagai M, Yamaguchi K, Kamihira S, Okayama A, Utsunomiya A, Kikuchi H, collaborators of JSPFAD. "Nationwide cohort study of HTLV-1 carriers in Japan: Joint Study on Predisposing Factors of ATL Development (JSPFAD)". **13th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses 2007**. Hakone, May 22-25. 2007

8. Yamamoto K, Ishida T, Furukawa Y, Tanaka Y, Nakamura Y, Watanabe T. "Interaction between HTLV-1 Tax and histone H3K4 methyltransferase SMYD3" **13th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses 2007**. Hakone, May 22-25. 2007

9. Misawa A, Kamoi K, Tokunaga C, Yamamoto K, Ishida T, Watanabe T. "Repression of HTLV-1 LTR promoter activity by SUV39H1-Tax interaction" **13th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses 2007**. Hakone, May 22-25. 2007

10. Muto S, Yamamoto G, Nannya Y, Sanada M, Dabaghmanesh N, Ishida T, Utsunomiya A, Yamada Y, Yamaguchi K, Ogawa S, Watanabe T. "Molecular allelo-karyotyping of adult T-cell leukemia using high SNP genotyping microarrays" **13th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses 2007**. Hakone, May 22-25. 2007

11. Muto S, Yamamoto G, Nannya Y, Sanada M, Dabaghmanesh N, Ishida T, Utsunomiya A, Yamada Y, Kamihira S, Yamaguchi Y, Watanabe T, Ogawa S. "Molecular Allelo-Karyotyping of Adult T-Cell Leukemia Using High SNP Genotyping Microarray" **The American Society of Hematology 49th Annual Meeting and Exposition**.

12. 武藤早紀, 山本豪, 加藤元博, 真田昌, 南谷泰仁, 石田尚臣, 宇都宮與, 山田恭暉, 上平憲, 山口一成, 渡邊俊樹, 小川誠司.  
「高密度 SNP マイクロアレイを用いた成人 T 細胞白血病のアレル核型分析. 臨床血液」(0485-1439). Vol. 48; 2007:931.

13. 武藤早紀, 山本豪, 南谷泰仁, 真田昌, Dabaghmanesh N, 石田尚臣, 宇都宮與, 山田恭暉, 上平憲, 山口一成, 小川誠司, 渡邊俊

樹. 「高密度 SNP マイクロアレイを用いた成人 T 細胞白血病のアレル核型分析(Molecular allele-karyotyping of adult T-cell leukemia using high SNP genotyping microarrays)」. 日本癌学会総会記事(1347-9032). Vol. 66 回; 2007:233.

14. Nannya Y, Onizuka M, Kashiwase K, Sanada M, Akatsuka Y, Satake M, Chiba S, Kurokawa M, Yamamoto K, Saji H, Maruya E, Inoko H, Morishima Y, Kodera Y, Ogawa S. "Exploring genetic basis of GVHD by whole-genome association studies in a large series from the Japan Marrow Donation Program (JMMP)" **The American Society of Hematology 49th Annual Meeting and Exposition**.

15. Iha H, Taguchi S, Kawaguchi A, Kawashima T, Tanaka Y, Sawa H, Nishizono A, Sata T, Hall WW, Jeang, KT, Hasegawa H: "A water-soluble Hsp90 inhibitor 17-DMAG suppresses Tax-mediated oncogenic signaling both in vitro and in vivo" **The 13th International Conference on Human Retrovirology HTLV and related Viruses, 2007**, Hakone, May 22-25. 2007

16. Kawaguchi A, Orba Y, Sawa H, Sata T, Hall WW, Hasegawa H, "Adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL): Exploitation of transgenic mouse model to understand disease pathogenesis and for the development of rational therapeutics" **The 13th International Conference on Human Retrovirology HTLV and related Viruses, 2007** Hakone, May 22-25. 2007

17. 長谷川秀樹、一戸猛志、田村慎一、板村繁之、小田切孝人、田代真人、佐多徹太郎、倉田毅「2005/2006 シーズナルインフルエンザワクチンの経鼻接種による高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)感染の交叉防御効果の検討」第11回日本ワクチン学会学術集会(2007年11月横浜)

18. 伊波 英克、川口 晶、田口 慎也、川嶋太郎、廣瀬 仁志、池辺 詠美、村上 真弓、田中 勇悦、澤 洋文、佐多 徹太郎、後藤和代、西園 晃、Jeang Kuan-Teh, Hall William、長谷川 秀樹。「水溶性ゲルダマイシン 17-DMAGによる Tax 誘導性ガン化シグナルの遮断」第55回日本ウイルス学会学術集会 2007年、札幌

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創成科学研究科 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、全国規模の HTLV-1 感染コホート研究組織 JSPFAD で集積した ATL/ATLL 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およびアレルの不均衡について網羅的な解析を行った。本年度は、昨年度に施行した 75 症例の解析に加えて、約 100 症例の解析を追加し、計 171 例についてアレイ解析を行った。アレイ解析の結果、ATL を特徴づけるゲノムプロファイルが確認され、さらに、増幅・欠失の標的となる遺伝子の候補が多数同定された。興味深いことに、これらの多くは成熟 T 細胞の機能に関与する遺伝子、あるいは成熟 T 細胞において高い発現をみとめ、T 細胞における機能的な重要性が示唆される遺伝子であった。最終年度には、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 の分子診断技術の確立、ならびに、新規治療法の開発に向けた標的分子の同定が期待される。

### A. 研究目的

ATL は、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、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 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。本年度は、協力施設である久留米大学病理学大島博士より、リンパ腫型 ATL 検体 DNA を 40 例解析に加えた。

#### (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. 研究結果

171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, 6p, 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, 17p, 18pにおけるコピー数減少が認められ、これらによってATL特有のゲノムプロファイルが形作られることが明らかとなった。

一方、このような染色体バンドレベルの比較的大きな領域における異常に加えて、アレイの解像度が高いことと関連して、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(図1矢印)。こうした領域には、通常1ないし2個の遺伝子がコードされているのみで、こうした領域からはATLの発症に関わる可能性のある標的遺伝子の候補が多数同定された。表1にこれらの遺伝子の部分リストを示したが、興味深いことに、ATLで増幅や欠失の標的

となっていると考えられるこれらの遺伝子の多くは、成熟T細胞の機能における重要性が示されている遺伝子やT細胞において高い発現を示す遺伝子であった。

本年度は、急性型および慢性型の症例に加えて、リンパ腫型の症例40例の解析を行い、ATLの病型におけるゲノム異常の相違について解析した。本質的には、これらの病型によるゲノムプロファイルに大きな差異は認められなかったが、リンパ腫型においては、hyperploidの症例、および3番染色体の片親性2倍体を示す症例が多いこと、また、heliosを含む領域の欠失の頻度が高いこと、などの特徴が確認された。

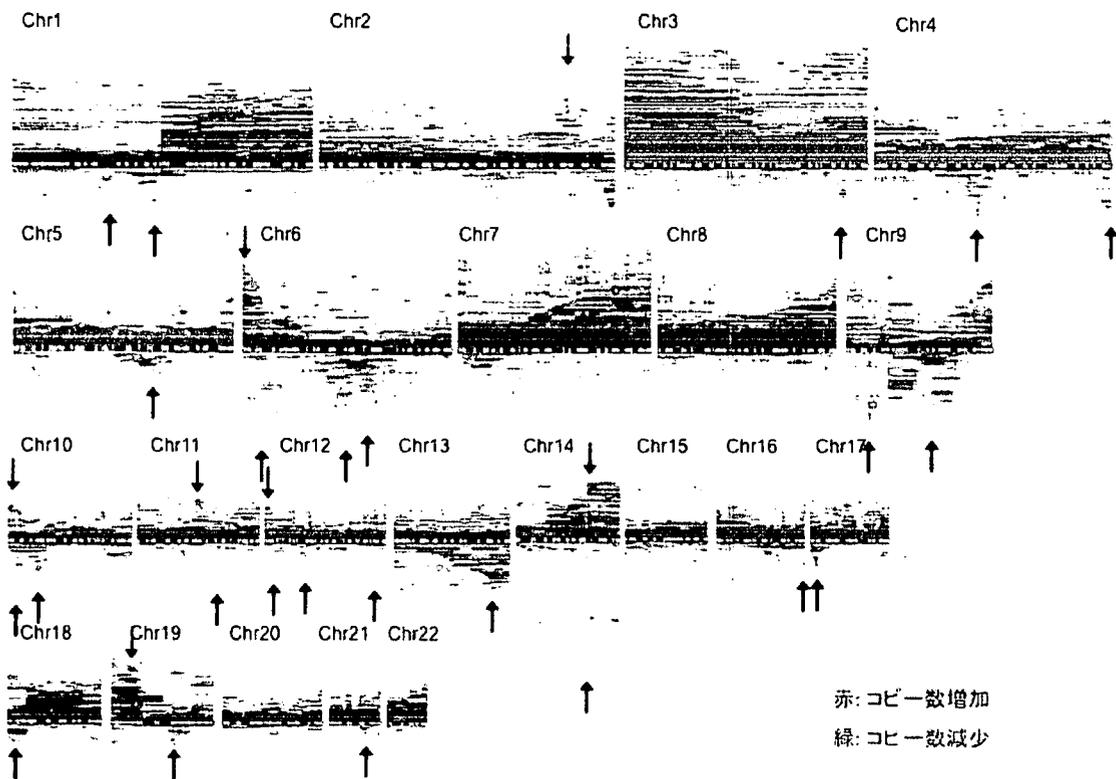


図1. 171例のATL/ATLLのゲノムプロファイル

Chromosome	Location	Region (kb)	Gene	Gain or Loss	cases/170	%	Expression in CD4+ T cells	Description
Chr1	p13.1	104	CD58	loss	20	11.8	high	Ligand of the T lymphocyte CD2 glycoprotein
			ICF3	loss	20	11.8	low-medium	Immunoglobulin superfamily member 3 isoform 1
	p13.1	778	CD2	loss	10	10.6	high	CD2 antigen
			PIGFHL	loss	18	10.6	low	Interleukin-7 receptor negative regulator
	q24.7	513	PDLIF1	gain	50	29.4	medium	PDZ domain, class 2, transcription factor 1
			DD32	gain	50	29.4	high	T cell receptor zeta chain
CHFG1			gain	50	29.4	low	Inhibitor suppressor of E1A-inducible genes	
MP2L1			gain	50	29.4	medium	Myelin protein zero-like 1 isoform a	
Chr2	q32.1	31	-	loss	15	8.8	-	-
			CD28	gain	39	22.9	high	CD28 antigen
	q33.2	89	CTLA4	gain	25	14.7	medium	Cytotoxic T lymphocyte associated protein 4
			ICOS	gain	25	14.7	high	Inducible T-cell co-stimulator
	q34	17	ICOS	loss	3	1.8	high	Inducible T-cell co-stimulator
			ZNF1A2	loss	11	6.5	medium	zinc finger protein, subfamily 1A 2 (Heuc2)
	q37.3	497	CAPN10	loss	21	12.4	high	Calpain 10 isoform c
			GPR35	loss	21	12.4	medium	G protein-coupled receptor 35
			AQP12	loss	21	12.4	N/A	Aquaporin 12
			KIF1A	loss	21	12.4	low-medium	Axonal transport of synaptic vesicles
Chr3	p14.2	159	AGAT	loss	21	12.4	low-medium	Alanine glyoxylate aminotransferase
			F11T	loss	18	10.6	high	Fragile histidine triad gene
			STAG1	loss	10	5.9	high	Stratum antigen 1
Chr4	q20.32	12	TDL1XR1	loss	13	7.6	high	Nuclear receptor co-repressor 1 (NCoR3 complex)
			SCD4	loss	21	12.4	high	Succinyl-CoA oxidase 4
	q11.22-23	878	SEC31L1	loss	21	12.4	medium	SEC31-like 1 isoform 1
			THAP9	loss	21	12.4	low-medium	THAP domain containing 9
			GOP9	loss	21	12.4	medium	GOP9 signalosome subunit 4
			CRIC17A7	loss	21	12.4	high	Chitinase-specific gene II protein (C-15 protein)
q31.21	55	INPP4B	loss	6	3.5	high	Inositol polyphosphate 4-phosphatase type II	
		ATXN1	loss	21	12.4	high	Ataxin 1	
Chr6	q14.3	275	SNX14	loss	27	15.9	high	Sorting nexin 14
			SYNCRIP	loss	27	15.9	high	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G
			NTSF	loss	27	15.9	high	Nucleoside diphosphate-kinase, beta
	q19	738	HTRAE	loss	24	14.1	medium/high	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1E
			CGA	loss	24	14.1	medium	Cytoplasmic harem, alpha polypeptide
Chr7	q22.31	139	-	loss	16	9.4	-	-
			IMMP2L	loss	19	11.2	N/A	Inner mitochondrial membrane peptidase 2, like
Chr7	q31.1	47	LHRN3	loss	10	11.2	high	Luteinizing hormone-releasing hormone 3

表1. ATL/ATLLで同定された標的遺伝子の候補(partial list)

#### D. 考察

昨年度に解析した75例のATL検体に加えて、約100例の新たな検体を解析し、計171例のATL/ATLLゲノムを高密度SNPアレイで解析することにより、ATLゲノムに認められるコピー数異常およびアレル不均衡の特徴が明らかとなった。他の腫瘍と同様、個々のATL検体におけるゲノム異常は症例によって大きくことなるものの、ATL全体としては、特定の染色体領域に異常を認める傾向が顕著であって、こうした異常はATLの腫瘍化と密接に関連していることが示唆された。ゲノム異常による症例のクラスタリングからは、個々の腫瘍が互いに共通した異常により複数の亜型に分類しうる可能性が示された。ATLに特徴的に認められる異常に基づいたこのような亜分類が予後や治療反応性と関連するかどうかについての検討が今後の重要な課題である。

ATLのゲノムプロファイルの全体像は病型によらず、非常に類似したパターンが認められた。このことはATLの各病型が、共通した発症の遺伝学的基盤を有していることを類推させるが、一方で、リンパ腫型に特徴的に認められるようなゲノム異常については、病型の相違を来している遺伝的な変化である可能性が示唆される。

解析症例数が増加したことに伴い、微細な染色体領域の増加や欠失の集積がより明確になり、こうした集積領域から、ATLの発症に関わる可能性のある標的遺伝子の候補が多数同定された。興味深いのは、このようにして同定された遺伝子には、CD2, CD28, CD58, CD3, Helios, ATXN1など、成熟T細胞の機能の制御に関わる遺伝子、あるいは、T細胞で高い発現を示す遺伝子多数ふくまれていた事である。この結果は、ATLが末梢T細胞の腫瘍であることを考えると、極めて合理的に説明されるとともに、本解析で見いだされた多数のゲノムの異常が、単に偶発的な腫瘍ゲノムの不安定性の結果生じたものではなく、腫瘍化の原因としてクローン選択に関わった可能性を強く示唆するものである。

本解析を通じて、ATLを特徴づけるゲノムの異常の網羅的な同定が可能となった。これらは、ATLの発症の分子機序を解明する上で、極めて重要な手がかりを与えるものである。また、ATLの病型に特徴的なゲノム変化が見いだされること、また、病理学的には一見同一にみえるATLがゲノム異常の観点からは幾つかのことなる亜型に分類されることから、今後ATLの予後や治療反応性を予測するゲノム診断を構築できる可能性が示唆された。これらは本研究の最終年度の課題である。

## E. 結論

171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変化を網羅的に解析・同定した。HTLV-1による末梢T細胞の不死化からATLの発症に至る過程においては、付加的に生ずるゲノム異常によって、T細胞の機能に関わる遺伝子が選択的に障害されることが重要である可能性が示唆された。今後同定されたゲノム異常に基づいたATLの新たなゲノム診断技術、さらに、これらの原因分子をターゲットとした分子標的薬剤の開発が期待される。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Saitoh Y, Yamamoto N, Dewan MDZ, Sugimoto H, Martinez VJ, Iwasaki Y, Matsubara K, Qi X, Saitoh T, Imoto I, Inazawa J, Utsunomiya A, Watanabe T, Masuda T, Yamamoto N, Yamaoka S.

Overexpressed NF- $\kappa$ B inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells  
**Blood** (published on-line Feb, 2008)

2. 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 $\kappa$ B $\alpha$ -independent induction of NF- $\kappa$ B and its inhibition by DHMEQ in Hodgkin-Reed-Sternberg cells.  
**Lab Invest** 87:372-382, 2007

3. Horie R, Ishida T, Maruyama-Nagai M, Ito K, Watanabe M, Yoneyama A, Higashihara M, Kimura S, Watanabe T. TRAF activation of C/EBP $\beta$ (NF-IL6) via p38MAPK induces HIV-1 gene expression in monocytes/macrophages  
**Micobes Infect** 9:721-728,2007

4. Ohsugi T, Kumasaka T, Okada S, Ishida T, Yamaguchi K, Horie R, Watanabe T, Umezawa K. Dehydroxymethylepoxyquinomicin(DHMEQ) therapy reduces tumor formation in mice inoculated with Tax-deficient adult T-cell leukemia-derived cell lines  
**Cancer Let.** 257:206-215, 2007

5. Katano H, Sato Y, Hoshino S, Tachikawa N, Oka S, Morishita Y, Ishida T, Watanabe T, Rom WN, Mori S, Sata T, Weiden MD, Hoshino Y. Integration of HIV-1 caused STA T3-associated B cell lymphoma in an AIDS

patient.

**Microbes Infect** 9:1581-1589,2007

6. Franchina M, Woo AJ, Dods J, Karimi M, Ho D, Watanabe T, Spagnolo DV, Abraham LJ. The CD30 Gene Promoter Microsatellite binds Transcription Factor Yin Yang 1(YY1) and shows Genetic Instability in Anaplastic Large Cell Lymphoma.  
**J Pathol** 214: 65-74, 2008

7. Han MY, Kosako H, Watanabe T, Hattori S. ERK MAP kinase regulates actin organization 1 and cell motility 2 by phosphorylating the actin cross-linking protein EPLIN.  
**Mol Cell Biol** 27:8190-820, 2007

8. Watanabe M, Ogawa Y, Itoh K, Koiwa T, Kadin ME, Watanabe T, Okayasu I, Higashihara M, Horie R. Hypomethylation of CD30 CpG islands with aberrant JunB expression drives CD30 induction in Hodgkin lymphoma and anaplastic large cell lymphoma  
**Lab Invest** 88: 48-57, 2008

9. Matsuoka M, Watanabe T, Kannagi M, Bingham C, Grassmann R, Marriott SJ, Green P, Jeang K-T.

Meeting report on the 13th International Conference on Human Retrovirology: Human T-cell leukemia virus research-30 years after Adult T-cell leukemia.

**Cancer Res** 67:10638-10641,2007

### 2. 学会発表

1. 渡邊 俊樹「ヒトT細胞白血病ウイルス1型(HTLV-1)の分子生物学」

第69回日本血液学会第49回日本臨床血液学会教育講演

2. Toshiki Watanabe. "Searching for molecules for a targeted therapy based on molecular allelo-karyotyping of adult T-cell leukemia using high SNP genotyping microarrays" in The International Symposium on Advanced Diagnosis and Therapy of Refractory Diseases Caused by Viral Infection. 平成20年3月27日

3. 三宅在子、石田尚臣、Md. Zahidunnabi Dewan、梅澤一夫、山本直樹、堀江良一、渡邊 俊樹、NF- $\kappa$ B阻害剤DHMRQを用いたエイズリンパ腫治療の基礎研究、第55回日本ウイルス学会学術集会、2007年10月21-23日、札幌

4. Dabaghmanesh N, Miyake A, Horie R, Dewan MdZ, Yamamoto N, Watanabe T. "Transient inhibition of NF- $\kappa$ B by DHMEQ in primary effusion lymphoma destroys cancer cells without induction of viral replication". 第55回日本ウイルス学会学術集会、2007

7年10月21-23日、札幌

5. 堀江良一、渡邊真理子、Dewan MdZ, 平美也子、山本直樹、渡邊俊樹、東原正明、梅澤一夫、「NF-kB 阻害薬 DHMEQ による Hodgkin リンパ腫治療の基礎的研究」第11回がん分子標的治療研究会総会、2007年7月5-6日

6. 堀江良一、渡邊真理子、Dewan MdZ, 平美也子、山本直樹、渡邊俊樹、東原正明、梅澤一夫、「変異型 IκBα を有する H-RS 細胞での IκBβ を介した NF-kB 誘導と DHMEQ による分子標的療法」第69回日本血液学会、2007年10月11-13日、横浜

7. Watanabe T, Aizawa S, Yamamoto K, Aoki S, Maruyama-Nagai M, Yamaguchi K, Kamihira S, Okayama A, Utsunomiya A, Kikuchi H, and collaborators of JSPFAD

“Nationwide cohort study of HTLV-1 carriers in Japan: Joint Study on Predisposing Factors of ATL Development (JSPFAD)”

13th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. Hakone, May 22-25. 2007

8. Yamamoto K, Ishida T, Furukawa Y, Tanaka Y, Nakamura Y, Watanabe T. “Interaction between HTLV-1 Tax and histone H3K4 methyltransferase SMYD3”.

13th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. Hakone, May 22-25. 2007

9. Misawa A, Kamoi K, Tokunaga C, Yamamoto K, Ishida T, Watanabe T. “Repression of HTLV-1 LTR promoter activity by SUV39H1-Tax interaction”.

13th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. Hakone, May 22-25. 2007

10. Muto S, Yamamoto G, Nannya Y, Sanada M, Dabaghmanesh N, Ishida T, Utsunomiya A, Yamada Y, Yamaguchi K, Ogawa S, Watanabe T. Molecular allelo-karyotyping of adult T-cell leukemia using high SNP genotyping microarrays.

13th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. Hakone, May 22-25. 2007

11. Muto S, Yamamoto G, Nannya Y, Sanada M, Dabaghmanesh N, Ishida T, Utsunomiya A, Yamada Y, Kamihira S, Yamaguchi Y, Watanabe T, Ogawa S. Molecular Allelo-Karyotyping of Adult T-Cell Leukemia Using High SNP Genotyping Microarray. (The American Society of Hematology 49th Annual Meeting and Exposition.)

12. 武藤早紀, 山本豪, 加藤元博, 真田昌, 南谷泰仁, 石田尚臣, 宇都宮與, 山田恭暉, 上平憲, 山口一成, 渡邊俊樹, 小川誠司.

高密度 SNP マイクロアレイを用いた成人 T 細胞白血病のアレル核型分析. 臨床血液 (0485-1439). Vol. 48; 2007:931.

13. 武藤早紀, 山本豪, 南谷泰仁, 真田昌, Dabaghmanesh Nazanin, 石田尚臣, 宇都宮與, 山田恭暉, 上平憲, 山口一成, 小川誠司, 渡邊俊樹. 高密度 SNP マイクロアレイを用いた成人 T 細胞白血病のアレル核型分析 (Molecular allelo-karyotyping of adult T-cell leukemia using high SNP genotyping microarrays). 日本癌学会総会記事 (1347-9032). Vol. 66 回; 2007:233.

#### H. 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  
なし

## 高密度発現アレイを用いた ATL の発現プロファイルの解析

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 特任准教授

### 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、44,000 個の遺伝子に対するオリゴヌクレオチドプローブを搭載する cDNA アレイを用いて、全国規模の HTLV-1 感染コホート研究組織 JSPFAD で集積した ATL 検体 26 例について網羅的な発現プロファイルの解析を行い、正常末梢血 CD4+ T 細胞における発現プロファイルと比較検討することにより、ATL に特異的な遺伝子発現の異常を解析した。遺伝子発現データに基づくクラスタリング解析では、ATL 検体と正常 CD4 陽性細胞と明確に異なる遺伝子発現が確認された。また、ATL で特異的な発現の異常をしめす遺伝子が多数同定された。ATL におけるゲノムコピー数と遺伝子発現については、明確な相関が確認され、ゲノムコピー数変化は遺伝子発現の異常を通じて ATL の発症に関わることが明らかとなった。このことから、また、発現データに基づく解析では、ゲノムコピー数変化にともなう非特異的な遺伝子発現の異常が ATL 特異的な発現異常として検出される可能性が示唆され、発現解析は ATL の遺伝子診断という観点では有用であるものの、発現解析のみに基づく分子標的の同定には一定の限界があることが示唆された。

### A. 研究目的

ATL は、HTLV-1 の感染により発症する極めて悪性度の高い末梢性 T 細胞腫瘍であるが、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。一方、本症は HTLV-1 感染により不死化した T 細胞にゲノムの変異が蓄積することにより生ずると考えられている。そこで、本研究事業では、ATL の新規診断技術の開発と治療標的分子の同定を念頭において、高密度 SNP アレイを用いた網羅的なゲノムコピー数の解析により、ATL の発症に関わるゲノム変異のゲノムワイドな探索を試みており(渡邊ら)、これまでに ATL に特徴的に認められるゲノムの異常を同定することに成功している。そこで、本分担研究では、これらのゲノムコピー数の変化と ATL の発症の関連をゲノムコピー数変化による遺伝子発現の異常という観点から解析することを目的として、SNP アレイで解析した検体について、高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を行い、ゲノム異常との関連についてゲノムワイドな視点から解析を試みた。

### B. 研究方法

#### (1) ATL 腫瘍検体および対照検体

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 ATL 患者検体で、SNP アレイによる網羅的なゲノムコピー数解析データが利用可能な検体 26 検体を解析の対象として、以下の方法で網羅的な発現解析を行った。正常対照としては、ATL 患者の年齢を考慮して、21 人の 50 歳以上の健康人ボランティアから採取した末梢血 CD4 陽性 T 細胞を用いた。

#### (2) Agilent 社製高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いた発現プロファイルの解析

常法にもとづいて RNA を抽出し、T7 プライマーを用いた RNA 増幅を施した後、cDNA プローブを合成、Agilent 社の高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いて発現解析を行った。また、正常対照として、健康人から採取された末梢血 CD4 陽性 T 細胞を用いた。

#### (3) データ解析

発現データは、アレイ解析ソフトウェア GeneSpring を用いて解析した。正常人末梢血 CD4 陽性細胞と ATL 試料の発現解析データに基づいて、クラスタリング解析を行い、また、二群間で発現量に関する t 検定を行うことにより、ATL 特異的に発現異常を示す遺伝子群の同定を行った。

#### (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。対照の成城人ボランティアの検体の採取及び解析も、

参加者からインフォームドコンセントを得た後に行った。これらの研究計画はいずれも、東京大学の設置する倫理委員会の審査を経て承認済みである。

### C. 研究結果

ATL 検体と健康人由来 CD4 陽性 T 細胞の発現データに基づくクラスタリング解析では、両者は明確に異なるクラスターに分類された。また、permutation テストによる多重比較の補正を考慮にいたした t 検定による遺伝子発現の比較においても、極めて小数の症例の解析にもかかわらず、ATL 細胞において、有意に正常 CD4 陽性細胞と異なる発現を示す遺伝子が多数同定された。

一方、特定のゲノムコピー数異常を有する症例と異常を示さない症例の二群についてゲノムコピー数異常と発現の関連について統計学的に検定を行った。すなわち、両群でゲノムコピー数変化のない領域については統計的に有意な遺伝子発現の異常は認められなかったが、コピー数の異なる領域については、多数の遺伝子に関する遺伝子発現の平均値は当該領域のゲノムコピー数変化のない群に比べて有意に高く、遺伝子発現とゲノムコピー数変化の間には明確な相関が確認された(図1)。

### D. 考察

未だ小数例での検討ではあるが、ATL 細胞は正常末梢血 CD4 陽性細胞とは明確に異なる遺伝子発現様式を示すことが示唆された。しかし発現解析に関して、臨床病理学的な興味はむしろ、通常の形態学的な診断、表面マーカー解析による診断では一見同一に見える一群の腫瘍に、治療戦略上有用な heterogeneity が確認されるかどうかという問題であるが、今回の限られた症例数の解析においては、検討困難であった。今後多数の症例について予後データを含めた解析を行うことが是非とも必要である。

一方、今回の解析を通じて、ATL 細胞では遺伝子発現量とゲノムコピー数との間には明確な相関が存在し、遺伝子発現量が域的にはゲノムコピー数によって制御されている可能性が示唆された。ATL が特徴的なゲノムコピー数異常のパターンを示すこと、すなわち、q, 3p, 3q, 6p, 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, 17p 18p におけるコピー数減少など、特定の染色体領域の増加や欠失を特徴的に認めることから、ATL と正常 CD4 細胞の遺伝子発現の相違の多くが、こうしたゲノムコピー数変化によって説明される可能性が示唆される。この観察結果は、ATL に特徴的な染色体変化

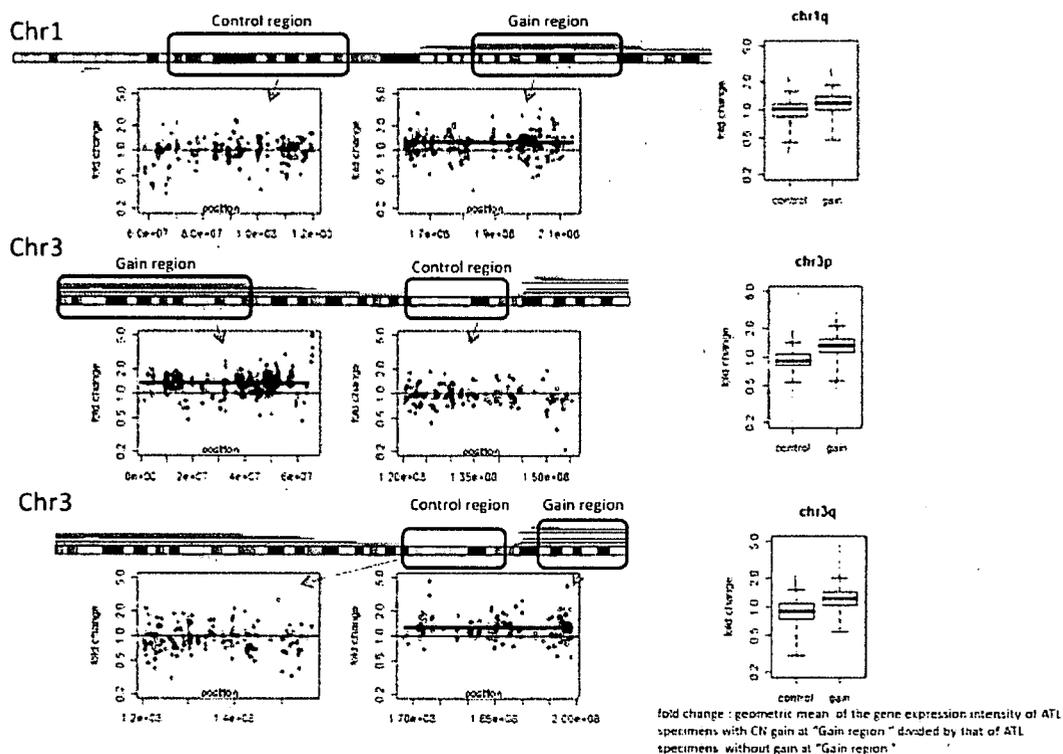


図1. ATLにおける遺伝子発現とゲノムコピー数の相関解析

は当該領域の遺伝子発現の異常を通じて ATL の発症に関わるという仮説を支持するものであるが、一方、同一染色体上にあるかぎり、直接的に ATL の発症とは関係のない遺伝子の多くが、発現プロファイルの解析で有意な発現変化を示す遺伝子として抽出される可能性をしめしており、発現解析のみからはコピー数の異常を示す染色体の大きなセグメントに含まれる多数の遺伝子のなかから、ATL の発症に関わる遺伝子を同定することが一般には困難であることが示唆される。際だった発現異常を示す遺伝子については、ATL 発症への関与は示唆されるものの、高度な増幅やホモ接合性欠失、ないし単一アレルの喪失による大きな発現低下を説明する他の原因がないかぎり、ゲノム構造の一時的な変化に帰着させることは難しいと思われる。

#### E. 結論

少数例の解析ではあるが、網羅的な遺伝子発現の解析を通じて、ATL 細胞が正常 CD4 陽性細胞と異なる遺伝子発現プロファイルを呈することが示唆された。

ATL 細胞では、ゲノムコピー数と遺伝子発現の間には強い相関が認められ、これらの遺伝子発現の変化の少なくとも一部はゲノムコピー数変化によって説明されることがしきされた。

今後多数例について網羅的な発現解析を行い、予後データや治療反応性、また、ゲノムコピー数のデータと併せて解析することにより、ATL の病態の解明と新規遺伝子診断技術の開発が期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Suzuki M, Kato M, Chen J, Takita J, Sanada M, Nannya Y, Yamamoto G, Takahashi A, Ikeda H, Kuwano K, Ogawa S, Hayashi Y. Whole-genome profiling of chromosomal aberrations in hepatoblastoma using high-density single-nucleotide polymorphism genotyping microarrays. *Cancer Sci*2008.
2. Lehmann S, Ogawa S, Raynaud SD, Sanada M, Nannya Y, Ticchioni M, Bastard C, Kawamata N, Koefler HP. Molecular allelokaryotyping of early-stage, untreated chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*2008.
3. Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M, Kato M, Sanada M, Hemminki K, Yamamoto G, Nannya Y, Koehler R, Flohr T, Miller CW, Harbott J, Ludwig WD, Stanulla M, Schrappe M, Bartram CR, Koefler HP. Molecular allelokaryotyping of pediatric acute

lymphoblastic leukemias by high-resolution single nucleotide polymorphism oligonucleotide genomic microarray. *Blood*. 111:776-784, 2008.

4. Yamamoto G, Nannya Y, Kato M, Sanada M, Levine RL, Kawamata N, Hangaishi A, Kurokawa M, Chiba S, Gilliland DG, Koefler HP, Ogawa S. Highly sensitive method for genomewide detection of allelic composition in nonpaired, primary tumor specimens by use of affymetrix single-nucleotide-polymorphism genotyping microarrays. *Am J Hum Genet*. 81:114-126, 2007.

5. Sanada M, Uike N, Ohyashiki K, Ozawa K, Lili W, Hangaishi A, Kanda Y, Chiba S, Kurokawa M, Omine M, Mitani K, Ogawa S. Unbalanced translocation der(1;7)(q10;p10) defines a unique clinicopathological subgroup of myeloid neoplasms. *Leukemia*. 21:992-997, 2007.

6. Nannya Y, Taura K, Kurokawa M, Chiba S, Ogawa S. Evaluation of genome-wide power of genetic association studies based on empirical data from the HapMap project. *Hum Mol Genet*. 16:3494-3505, 2007.

7. Lips EH, de Graaf EJ, Tollenaar RA, van Eijk R, Oosting J, Suzhai K, Karsten T, Nanya Y, Ogawa S, van de Velde CJ, Eilers PH, van Wezel T, Morreau H. Single nucleotide polymorphism array analysis of chromosomal instability patterns discriminates rectal adenomas from carcinomas. *J Pathol*. 212:269-277, 2007.

8. Kawazu M, Yamamoto G, Yoshimi M, Yamamoto K, Asai T, Ichikawa M, Seo S, Nakagawa M, Chiba S, Kurokawa M, Ogawa S. Expression profiling of immature thymocytes revealed a novel homeobox gene that regulates double-negative thymocyte development. *J Immunol*. 179:5335-5345, 2007.

9. 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.

##### 2. 学会発表

1. Muto S, Yamamoto G, Nannya Y, Sanada M, Dabaghmanesh N, Ishida T, Utsunomiya A, Yamada Y, Kamihira S, Yamaguchi Y, Watanabe T, Ogawa S. Molecular

Allelo-Karyotyping of Adult T-Cell Leukemia Using High SNP Genotyping Microarray. (The American Society of Hematology 49th Annual Meeting and Exposition.)

2. Nannya Y, Onizuka M, Kashiwase K, Sanada M, Akatsuka Y, Satake M, Chiba S, Kurokawa M, Yamamoto K, Saji H, Maruya E, Inoko H, Morishima Y, Kodera Y, Ogawa S. Exploring genetic basis of GVHD by whole-genome association studies in a large series from the Japan Marrow Donation Program (JMDP) (The American Society of Hematology 49th Annual Meeting and Exposition.)

3. 武藤早紀, 山本豪, 加藤元博, 真田昌, 南谷泰仁, 石田尚臣, 宇都宮與, 山田恭暉, 上平憲, 山口一成, 渡邊俊樹, 小川誠司. 高密度SNPマイクロアレイを用いた成人T細胞白血病のアレル核型分析. 臨床血液 (0485-1439). Vol. 48; 2007:931.

4. 武藤早紀, 山本豪, 南谷泰仁, 真田昌, Dabaghmanesh Nazanin, 石田尚臣, 宇都宮與, 山田恭暉, 上平憲, 山口一成, 小川誠司, 渡邊俊樹. 高密度 SNP マイクロアレイを用いた成人 T 細胞白血病のアレル核型分析 (Molecular allele-karyotyping of adult T-cell leukemia using high SNP genotyping microarrays). 日本癌学会総会記事(1347-9032). Vol. 66 回; 2007:233.

#### 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

SNP アレイを用いたゲノムコピー数解析ツール CNAG のライセンス提供(タカラバイオ)

## 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

全国コホート研究班 JSPFAD 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-2R $\alpha$  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 19 年度末までにのべ約 3,000 検体のサンプルを集積した。このうち本年度分は、キャリア 460 検体、ATL 128 検体、HAM 12 検体、HTLV-1 ぶどう膜炎 30 検体の計 630 検体であった。このバイオマテリアルの中から、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 検体約 150 検体を、解析に供してきた。このうち、データの質が評価に耐える結果の得られた約 130 検体のデータを用いて解析をすすめてきた。この解析から明らかになったいくつかのゲノムコピー数異常に関するデータの確認作業や、ATL に特異的な発現を示す遺伝子の解析や、遺伝子コピー数と遺伝子発現の相関を検討する発現解析へも検体を提供している。また、臨床情報を整理し、ゲノム異常に基づく ATL の亜型分類やゲノム異常と薬剤耐性あるいは予後との関係の解析を可能にしている。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。

### B. 研究方法

#### (1) 研究の対象および実施場所等

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、東京大学大学院新領域創成科学研究科、大阪市立大学医学部、鹿児島大学医学部および福岡日赤血液センターの分担研究者の責任のもとに、それぞれの関連施設を含めて、全国 42 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。

#### (2) 検体保存および DNA 抽出施設

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。

#### (3) 遺伝子情報解析

東京大学において行う。

#### (4) Multiplex Real Time PCR 法によるプロウイルス定量

検出系として TaqMan 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。

#### (5) サザンブロット法によるクローナリティー解析

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-1 DNA をプローブとしたサザンブロットングを行い、クローナリティーの解析を行った。

(倫理面への配慮)

検討に用いた検体は、当該患者から遺伝子解析を含めた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。この研究計画は、参加施設全てで倫理審査委員会の承認を得ており、実際の遺伝子解析に関しても、東京大学の設置する倫理委員会で審議の後に承認済みである。

### C. 研究結果

#### (1) 平成19年度解析検体数

平成19年度に集積されて検体数はのべ630検体あった。臨床情報の収集は並行して行われており、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、およそ以下の通りである。

無症候性キャリア：460 検体

ATL：128 検体

HAM：12 検体

ぶどう膜炎：30 検体

(2) 上記の今年度集積検体のみならず、過去の分をあわせて約3000検体について適宜モニタリング会議を開催し、臨床情報と個人番号の不備を補足して疫学用の解析に耐えられる情報管理を進めている。個人番号と臨床診断および臨床情報の明確なものを確定して、重複を避けて解析用検体とした。ATLに関しては、150検体を提供した。そのうち、今年度の解析にはSNPアレイの実験結果が解析に適合してイルと判断された約130件分のデータを取りまとめた。

高密度SNPアレイによる全ゲノム関連解析のために、ATL170検体に加え、約800検体の無症候性キャリア、HAM300検体、およびHU100検体の解析を順次進めている。

### D. 考察

規加入者の数もほぼ順調に推移しており、JSPFAD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。今年度は名古屋市立大学病院が参加し、参加施設は全国で42施設となった。昨年度改良された伝票システムと、精力的に進めてきた参加者の臨床情報の整理と補足によって、検体の選択は従来に比べて正確かつ容易になり、解析対照となる検体数が飛躍的に増加している。さらに、JSPFADの方で、情報管理・疫学担当の班員を増員し、この班員を中心として、過去の情報不備の検体に対しては積極的に検体に関する問い合わせや関連研究者のモニタリングの実施により更に情報の精度を

高める努力が行われている。これらの努力により、JSPFADのコホート研究としての質が向上し、分析が正確になってきている。実際、これまでの協力者の無症候性キャリアの中から、少なくとも4名がATLを発症していることが明らかになり、疫学的な検討を行うと共に、発症前と発症後の検体の解析を通じて、発症予測法の確立に貢献する情報解析が進められている。

### E. 結論

JSPFADによるバイオマテリアルバンクからの検体供給により、ATL細胞ゲノムのMolecular allelokaryotypingおよび遺伝子発現解析が可能になった。検体情報収集システムの改善を目指した伝票などの改善の効果が現れている。更にJSPFADの疫学研究担当班員の充実により、本研究の遂行状況が格段に改善された。今後は、整理されつつある臨床・疫学情報に基づく、コホート研究としての解析を進め、ATL発症危険因子の同定を進めるのと並行して、ゲノム解析と連結するための作業を充実させる予定である。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Mizukami T, Kuramitsu M, Takizawa K, Momose H, Masumi A, Naito S, Iwama A, Ogawa T, Noce T, Hamaguchi I, Yamaguchi K. Identification of transcripts commonly expressed in both hematopoietic and germ-line stem cells. *Stem Cells Dev* 17:67-80,2008.

2. Mizukami T, Imai J, Hamaguchi I, Kawamura M, Momose H, Naito S, Maeyama J, Masumi A, Kuramitsu M, Takizawa K, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K.

Application of complementary DNA microarray technology to influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) vaccine safety. *Vaccine* 25:8762-8770,2007

3. Ohsugi T, Kumasaka T, Okada S, Ishida T, Yamaguchi K, Horie R, Watanabe T, Umezawa K.: Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) therapy reduces tumor formation in mice inoculated with Tax-deficient adult T-cell leukemia-derived cell lines. *Cancer Letters* 257(2),206-215, 2007

4. Tsukasaki K, Utsunomiya A, Fukuda H, Fukushima T, Takatsuka Y, Ikeda S, Masuda M, Nagashi H, Ueda R, Tamura K, Sano M, Momita S, Yamaguchi K, Kawano F, Hanada S, Tobinao K, Shimoyama M, Hotta T,