

200807004A

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20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 渡邊 俊樹

平成21年（2009年）4月

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20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 渡邊 俊樹

平成21年（2009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. 「発現プロファイリング・SNP 解析と病態の解析」 渡邊 俊樹	7
2. 「ATL の発症に関わる標的遺伝子の解析」 小川 誠司	11
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	14
4. 「ATL モデルマウスを用いた NF- κ B 阻害剤による ATL 治療法の検討」 長谷川秀樹	17
5. 「ATL モデルマウスから単離された腫瘍細胞およびヒト ATL 細胞の浸潤機構」 澤 洋文	20

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	23
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	25
-----------------	----

「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 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、以下のような解析を行った。全国コホート研究班 JAPFAD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。本コホート研究では、平成20年度末までにのべ約 4,000 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 525 検体、ATL138 検体、HAM 13 検体、HTLV-1 ぶどう膜炎 41 検体の計 717 検体であった。キャリアコホートの解析から 12 例が ATL を発症した事が明らかになり、そのうち発症前検体が利用できた 4 検体は発現解析に供した。遺伝子発現解析には保存されていた ATL 症例 51 検体を用い、マイクロ RNA 発現解析には 40 症例の検体を供した。キャリア末梢血と健常人の発現プロファイル解析には 17 検体を供した。170 例の ATL 検体ゲノムコピー数解析で得られたデータをもとに、異常のあった領域にある CD28 などの遺伝子に注目して機能的解析を進めている。HAM 患者検体を用いた全ゲノム関連解析では、有意な結果を得るには検体数の相加が必要であるが、いくつかの候補が示唆された。発現解析では、通常の遺伝子発現プロファイル解析とマイクロ RNA (miRNA) 発現解析を行った。対照としては年齢を合わせた健常人検体を用いた。ATL の発現プロファイルの結果は、先行する別システムでの情報と比較検討して解析中である。また、キャリアと健常人の比較では、後に ATL を発症した検体が他と別のクラスターを形成する事を見だし、発症予測と早期診断への応用を検討中である。miRNA の発現解析では ATL 細胞では特異的に発現低下を示すものが 50 個あった。これらの miRNA の標的遺伝子にはシグナル伝達経路や転写などで重要なものが含まれており、その機能解析を開始した。一方、ATL のモデルマウスを用いた解析では、CXCR4 の拮抗剤である AMD3100 が SDF-1 α による ERK のリン酸化および走化性を阻害する事、また、NF κ B 経路の IKKb 阻害剤 Bay65-1942 の作用を検討し、アポトーシス誘導能とマウスの延命効果を認めた。これらの薬剤が ATL 治療薬の候補となる可能性が示された。

研究分担者：

山口一成 国立感染症研究所 部長
小川誠司 東京大学 特任准教授
長谷川秀樹 国立感染症研究所 室長
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事を目指す。本年度は、1) 発現アレイを用いた ATL の発現プロファイルの解析、2) ATL における micro RNA 発現のアレイ解析、3) HAM の全ゲノム関連解析、4) ゲノムコピー数解析に基づく ATL の発症に関わる標的遺伝子の解析、5) ATL モデルマウス細胞を用いた NF- κ B 阻害剤による ATL 治療法の検討、6) (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、を行うこととした

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 allelotyping と HAM の全ゲノム関連解析(渡邊・小川)

2-1 コピー数異常を示す遺伝子の解析

前年度までに、ATL で高頻度に遺伝子増幅および欠失を来す遺伝子として CD28 遺伝子(増幅)および CD2、Helios 遺伝子(欠失)を同定した。そこで本年度については、これらの遺伝子異常を有する ATL 症例について、当該遺伝子変異の有無を検討した。すなわち、CD28 の増幅、CD2 ないし Helios 遺伝子の欠失を有する ATL 検体のゲノム DNA より、当該遺伝子の全エクソンを PCR 法により増幅し、得られた PCR 産物を直接シーケンス法により解析した。

さらに、CD28 高発現細胞株 ST1 における CD28 の遺伝子ノックダウンをレンチウイルスベクターの siRNA の誘導的発現システムを用いて行い、その細胞増殖に及ぼす効果を検討した。

2-2. HAM 検体の全ゲノム関連解析

HTLV-1 のコホート研究で集積された HAM 症例 163 例と非発症キャリア 130 例を対象として、末梢血単核球のゲノム DNA を用いて、Affymetrix GeneChip® 250K NspI アレイにより、全ゲノムについて 25 万カ所の SNP タイピングを行い、得られた genotype データを用いて、HAM の発症リスクに関わる全ゲノム関連解析を行った。統計的な閾値については、極端な多重解析を考慮し、3000 回の permutation によりゲノムワイドな type I エラー率が 5%となる統計量の値を経験的に算出し、統計的閾値として検定を行った。

(3) 高密度発現アレイを用いた発現プロファイルの解析(渡邊)

3-1. 検体と対照群

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、および鹿児島大学で集積された HAM 検体と無症候性キャリア末梢血単核球 DNA である。後者は、斉藤峰輝准教授 (現 琉球大学) より提供された。保存試料より常法に従って抽出された total RNA をマイクロアレイ解析に用いた。健常者コントロールは、60 歳~70 歳代のボランティア 21 名から末梢血検体を採取した。

3-2. Agilent Technologies 社の発現アレイシステム: 一般の遺伝子発現解析には、Whole Human Genome Expression Array (44,000 genes)、miRNA の発現解析には Human miRNA V2 Oligo Microarray (723 human

miRNA+76 viral miRNA) を用いた。解析用の RNA はプロトコールに従い Trizol を用いて調整し、quality check にはバイオアナライザーを用いた。T7 プライマーを用いた RNA 増幅を施した後、cDNA プローブを合成した。

3-2. データ解析: 発現データは、アレイ解析ソフトウェア GeneSpring GX を用いて解析した。正常人末梢血 CD4 陽性細胞あるいは末梢血単核球と ATL あるいはキャリア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 特異的あるいはキャリア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 NF- κ B 阻害剤による ATL 治療法の検討(長谷川)

Tax トランスジェニックマウス由来の白血病/リンパ腫細胞 (mATL 細胞) を調整し 1 で実験に用いた。mATL 細胞 に対し Bay65-1942 を 2, 4, 10 μ g/ml の濃度で加え、24 時間処理してアポトーシスの誘導の有無を調べた。In vivo における抗腫瘍効果は mATL 細胞を移植した NOD-SCID に Bay65-1942 を投与し、生存期間延長効果を検討した。NOD-SCID マウスにおける腫瘍細胞の増殖・浸潤は病理組織学的に検討した。

(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)

1) 細胞の調整

上記 (4) と同様に mATL 細胞を調整した。

また、臨床的に ATL の診断がなされた症例からの腫瘍細胞は Ficoll-Hypaque 比重遠心法にて分離を行い、実験を行うまで -80°C で保存した。これらの細胞を用いて、ケモタキスタンパーを用いた走化性アッセイを行い、ERK1/2 のリン酸化は抗リン酸化抗体による Immunoblotting で検討した。

(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。対照の正常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、鹿児島大学および国立感染症研究所の設置する倫理委員会の審査を経て承認済みである。長谷川の動物実験は、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。澤の研究計画は北海道大学遺伝子組換え実験等安全委員会にて承認されている。また ATL 症例由来の腫瘍細胞を用いた実験は大分大学医学部倫理委員会にて承認されている。

C. 研究結果

(1) ATL 検体の発現プロファイル

ATL 検体 51 および健常者とコントロール検体 21

を用いて解析した。全ての遺伝子の発現プロファイルについての無作為クラスタリングでは、ATL患者と健常人が明確に異なるクラスターに分かれ、ATL患者が健常人と非常に異なる遺伝子発現パターンを示していることが改めて示された。次に、健常人に比べATL検体で有意かつ5倍以上の発現の変化がある遺伝子を検定によって選出しクラスタ解析したところ、ATLでは共通して発現異常が見られる遺伝子群があること、また、そのほとんどが上昇している事が示された。

(2) キャリア検体の発現プロファイル

無症候性キャリア17例の末梢血単核球と、健常人末梢血単核球5例の発現プロファイルを、全ての遺伝子について無作為にクラスタリングしたところ、両者は明確に異なる2つのクラスターに分類された。従って、低い感染細胞数の特徴を検出できており、無症候状態であっても、carrier細胞の発現パターンに変化が起きている結果であると考えられた。次にcarrierだけについてのクラスタリングでは、ウイルスロードのレベルと相関が示された。従って、発現プロファイルのかなりの部分が感染細胞数の遺伝子発現によって規定されていると考えられた。さらに、6ヶ月後にATLを発症したキャリアのデータを加えて検討したところ、ウイルスロードとは独立に、新たなブランチに位置づけられた。従って、ATL発症前に特有の遺伝子発現プロファイルを示す事が示唆された。

(3) miRNA 発現解析

ATL検体33例を用いてmiRNAのアレイ解析を行ったところ、信頼度の高いデータが得られた。現在知られているヒトmiRNA723個のうち、55個のmiRNAがATLで発現が変化しており、50個がATLで減少しておりました。ATLで最も顕著な減少が見られたmiRNA数個について標的遺伝子を検討したところ、NFkB経路や細胞周期調節に関わる遺伝子をターゲットとしている事が明らかになった。

(4) HAMの全ゲノム関連解析

図1に標準的なアレルテストによる全ゲノム関連解析の結果を示した。上段に算出されたp値の各SNPのゲノム上の位置順に表示した。

また、下段に対応するQQ-plotを示した。複数遺伝子座で $p = 2 \times 10^{-5}$ に相当する局所的な統計値のpeakが認められたが、多重解析を考慮した結果、ゲノムワイドな有意性を示すpeakは観測されなかった。

(5) ATLモデルマウスを用いたNF-kB阻害剤によるATL治療法の検討

分担研究者の長谷川らはATLマウスモデルの腫瘍細胞を用いて、NF-kB阻害剤Bay65-1942の作用を検討し、in vitroでの濃度依存的アポトーシスの誘導を確認し、mATL細胞を移植したNOD-SCIDマウスでは生存期間の延長効果を認めた。コントロールのDMSO投与群は移植後28日から32日の間(平均30.5日)に全6頭が白血病を発症し死亡した。移植後28日目における病理組織所見では、白血病細胞の末梢血出

現の抑制、脾腫および臓器浸潤の抑制が認められた。

(6) 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

分担研究者の澤らは、腫瘍細胞でのSDF-1 α に対する走化性の亢進とERK1/2のリン酸化が増強することを見出した。またATL症例から単離した腫瘍細胞でもpML細胞と同様に、SDF-1 α に反応して、ERK1/2のリン酸化が増強に伴い強い走化性を示した。さらに、AMD3100のmATLの走化性に対する阻害効果を検討し、ERK1/2のリン酸化および走化性を濃度依存性に抑制することを見いだした。さらにprimary ATL細胞でも同様の実験を行い、SDF-1 α の刺激下(1.25および12.5 $\mu\text{g/ml}$)での腫瘍細胞のERK1/2のリン酸化また走化性を抑制することが明らかになった。

D. 考察

(1) ATL検体の発現プロファイル:

健常者CD4+細胞を対照群とする多数検体を用いた新たなデータベースが構築された意義は大きい。今後、過剰発現遺伝子の機能解析、ゲノムコピー数異常のデータとの比較解析などを進める。

(2) キャリア検体の発現プロファイル:

キャリア末梢血単核球の発現プロファイルが健常者対照群と明確に異なる事の意義を検討する必要がある。また、ATL発症者の発症前の発現プロファイルデータが得られた意義は大きい。今後、発症予知への応用と、予防介入の基盤を整備する重要な知見である。

(3) miRNA 発現解析:

ATL細胞におけるmiRNA発現プロファイルが40例以上の検体を用いた大規模な解析で明らかになった。多くの発現異常は発現低下の形で認められる事は、ATLにおける種々の遺伝子の過剰発現を考えると興味深い。また、ほぼ全例で発現が欠損していたmiR 31の標的遺伝子候補が、ATL細胞で過剰発現したり、シグナル伝達異常に係わる分子群であった事は大変示唆的であり、機能解析を進めている。

(4) HAMの全ゲノム関連解析:

検体数の限界が明らかであり、100-200検体の解析を行う事で、有意な情報が得られるものと思われる。我が国のみで可能な解析なので更に検討を進める予定である。

(5) ATLモデルマウスを用いたNF-kB阻害剤によるATL治療法の検討:

NF-kBが治療標的として有望である事が、マウスモデルにおいても示された。実験系の利点を生かして、他剤との併用効果、特に薬剤耐性との関係を検討する事が有益な情報をもたらす可能性があると考えられる。

(6) 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:

ATL マウスモデル腫瘍細胞およびヒト ATL 症例由来腫瘍細胞のいずれの細胞においても、それらの走化性に SDF-1 α -CXCR4 経路が関与すること、CXCR4 を介したシグナル伝達経路である MEK-ERK が重要であることを明らかにし、CXCR4 の拮抗剤である AMD3100 により ERK のリン酸化の抑制を伴って、腫瘍細胞走化性の抑制に有効である事が示されたことは、実際の治療への応用可能性を示す。

E. 結論

昨年度までのゲノムコピー数解析データに加え、ATL 細胞の遺伝子発現プロファイルおよび micro RNA の発現プロファイルに関する、信頼度の高いデータベースがえられた。これらの情報は、分子標的薬開発、発症高危険群同定、分子病態の解明などに、極めて重要なデータベースとなるであろう。また、このようなデータは世界で唯一我が国のみで得られるものであり、と本領域の研究の発展に国際的にも貢献できる作業である。

今後は、機能解析などへの具体的な取り組みがあらに進展する事が望まれる。

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- κ B inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells *Blood* 111:5118-5129,2008
- 2) Miyake A, Dewan MZ, Ishida T, Watanabe M, Honda M, Sata T, Yamamoto N, Umezawa K, Watanabe T, Horie R. Induction of apoptosis in Epstein-Barr virus-infected B-lymphocytes by the NF- κ B inhibitor DHMEQ *Microbes Infect* 10: 748-756, 2008
- 3) Watanabe M, Nakashima M, Togano T, Higashihara M, Watanabe T, Horie R. Identification of the RelA domain responsible for action of a new NF κ B inhibitor DHMEQ *Biochem Biophys Res Commun* 376:310-314, 2008
- 4) Shimizu Y, Takamori A, Utsunomiya A, Kurimura M, Yamano Y, Hishizawa M, Hasegawa A, Kondo F, Kurihara K, Harashima N, Watanabe T, Okamura J, Masuda T, Kannagi M. Impaired Tax-specific T-cell responses with insufficient control of HTLV-1 in a subgroup of individuals at asymptomatic and smoldering stages *Cancer Sci* 100:481-489, 2008
- 5) Uchimarui K, Nakamura Y, Tojo A, Watanabe T, Yamaguchi K. Factor predisposing to HTLV-1 infection in residents of the greater Tokyo area *Int J Hematol* 88:565-570, 2008
- 6) Tsukasaki K, Hermine O, Bazarbachi A, Ratner L,

- Ramos JC, Harrington O'Mahony D, Janik JE, Bittencourt AL, Taylor GP, Yamaguchi K, Utsunomiya A, Tobinai K, Watanabe T. Definition, prognostic factors, treatment and response criteria of adult T-cell leukemia-lymphoma: A proposal from an International Consensus Meeting *J Clin Oncol* 27:453-459, 2009
- 7) Akagi T, Ogawa S, Dugas M, Kawamata N, Yamamoto G, Nannya Y, Sanada M, Miller CW, Yung A, Schnittger S, Haferlach T, Haferlach C, Koeffler HP. Frequent genomic abnormalities in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome with normal karyotype. *Haematologica*, 94:213-223, 2008.
 - 8) Chen Y, Takita J, Choi YL, Kato M, Ohira M, Sanada M, Wang L, Soda M, Kikuchi A, Igarashi T, Nakagawara A, Hayashi Y, Mano H, Ogawa S. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature*. 455:971-974, 2008.
 - 9) Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M, Niebuhr B, Stocking C, 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. Cloning of genes involved in chromosomal translocations by high-resolution single nucleotide polymorphism genomic microarray. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 11921-11926, 2008.
 - 10) Kawase T, Nanya Y, Torikai H, Yamamoto G, Onizuka M, Morishima S, Tsujimura K, Miyamura K, Kodaera Y, Morishima Y, Takahashi T, Kuzushima K, Ogawa S, Akatsuka Y. Identification of human minor histocompatibility antigens based on genetic association with highly parallel genotyping of pooled DNA. *Blood*. 111:3286-3294, 2008
 - 11) Walsh CS, Ogawa S, Karahashi H, Scoles DR, Pavelka JC, Tran H, Miller CW, Kawamata N, Ginther C, Dering J, Sanada M, Nannya Y, Slamon DJ, Koeffler HP, Karlan BY. ERCC5 is a novel biomarker of ovarian cancer prognosis. *J Clin Oncol*. 26:2952-2958, 2008.
 - 12) Hamaguchi I, Imai J, Momose H, Kawamura M, Mizukami T, Naito S, Maeyama J, Masumi A, Kuramitsu M, Takizawa K, Kato H, Mizutani T, Horiuchi Y, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K. Application of quantitative gene expression analysis for pertussis vaccine safety control. *Vaccine* 26:4686-4696, 2008.
 - 13) Otsubo H, Yamaguchi K. Current risks in blood transfusion in Japan. *Jpn J Infect Dis* 61:427-433, 2008.
 - 14) Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Fukushi S, Harashima A, Sato Y, Saijo M, Taguchi F, Morikawa S, Sata T. Mouse-passaged severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus leads to lethal pulmonary edema and diffuse alveolar damage in adult but not young mice. *Am J Pathol*. 172:1625-37, 2008.
 - 15) Orba Y, Sunden Y, Suzuki T, Nagashima K, Kimura T, Tanaka S, Sawa H. Pharmacological cdk inhibitor R-Roscovitine suppresses JC virus proliferation. *Virology* 370: 173-183, 2008
 - 16) Ohnishi N, Yuasa H, Tanaka S, Sawa H, Miura M, Matsui A, Higashi H, Musashi M, Iwabuchi K, Suzuki M, Yamada G, Azuma T, Hatakeyama M: Transgenic expression of Helicobacter pylori CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse.

17) Hirano M, Rakwal R, Shibato J, Sawa H, Nagashima K, Ogawa Y, Yoshida Y, Iwahashi H, Niki E, Masuo Y: Proteomics- and transcriptomics-based screening of differentially expressed proteins and genes in brain of Wig rat: A model for attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) research. *J Proteome Res* 7:2471-2489, 2008

2. 学会発表

<国内>

1) Nazanin Dabaghmanesh, 三宅在子, 片野晴隆, 佐多徹太郎, 梅澤一夫, 堀江良一, 渡邊俊樹. Inhibition of NF- κ B by DHMEQ in primary effusion lymphoma destroys cancer cells without induction of viral replication 第12回がん分子標的治療研究会総会 2008年6月26日~27日, 東京

2) 加賀美弥生, 松原亜以子, 正田桃子, 渡辺慎哉, 宇都宮與, 東條有伸, 山口一成, 渡邊俊樹. 遺伝子発現アレイ解析に基づくRT-PCR-ArrayによるATL診断系の確立と発症予征法への応用 第70回日本血液学会総会, 2008年10月10日~12日, 京都

3) 山本啓裕, 石田尚臣, 古川洋一, 田中勇悦, 渡邊俊樹. HTLV-1 Tax のヒストン H3K4 メチル化酵素 SMYD3 との相互作用を介した細胞周期異存的細胞内局在変化とその機能的意義, 第56回日本ウイルス学会学術集会, 2008年10月26日~28日, 岡山

4) 安東友美, 高橋隆太郎, 高橋碧, 中野和民, 渡邊俊樹. HTLV-1 による宿主細胞 mRNA 品質管理機構 (NMD) の阻害, 第56回日本ウイルス学会学術集会, 2008年10月26日~28日, 岡山

5) 包明久, 加賀美弥生, 吉田エリカ, 松原亜以子, 中野和民, 渡邊俊樹. ATL 細胞及び HTLV-1 感染細胞株の miRNA プロフィール, 第67回日本癌学会学術総会, 2008年10月28日~30日, 名古屋

6) 中野和民, 松原亜以子, 武藤早紀, 加藤元博, 滝田順子, 宇都宮與, 山口一成, 山田恭輝, 大島孝一, 小川誠司, 渡邊俊樹. ATL における遺伝子発現レベルおよびゲノムコピーナンバー異常の相関解析による網羅的遺伝子プロファイリング, 第67回日本癌学会学術総会, 2008年10月28日~30日, 名古屋

7) 高橋隆太郎, 安東友美, 高橋碧, 中野和民, 渡邊俊樹. ATL 多段階発がん過程における NMD 機能不全の可能性の検討, 2008年10月28日~30日, 名古屋

8) 加賀美弥生, 松原亜以子, 正田桃子, 渡辺慎哉, 宇都宮與, 東條有伸, 山口一成, 渡邊俊樹. RT-PCR Array に基づく ATL-type expression score を用いた診断と ATL 発症リスク評価の検討, 2008年10月28日~30日, 名古屋

9) 長谷川秀樹, 辻隆裕, 澤洋文, 佐多徹太郎. 成人 T 細胞性白血病マウスモデルにおける細胞走化因子の解析 第97回日本病理学会総会 2008年5月金沢

10) 武藤早紀, 松原亜以子, 中野和民, 真田昌, 加

藤元博, 田村梓, 宇都宮與, 山口一成, 山田恭輝, 大島孝一, 小川誠司, 渡邊俊樹. 成人 T 細胞白血病 (ATL) における網羅的ゲノム解析. 臨床血液. 49: 929, 2008.

11) 加藤元博, 中崎久美, 竹内健吾, 真田昌, 千葉滋, 石川雄一, 滝田順子, 林泰秀, 森茂郎, 小林幸夫, 黒川峰夫, 小川誠司. Genome-Wide Analysis of non-Hodgkin's Lymphoma. 日本癌学会総会. 67 回 :317-318, 2008.

12) 真田昌, 鈴木隆浩, 加藤元博, 坂田麻実子, 熊野恵城, 滝田順子, 黒川峰夫, 千葉滋, 小川誠司. Genomewide LOH Mapping Using SNP Array Disclosed Association between a Uniparental Disomy and Homozygous Mutation in MDS. 日本癌学会総会記事. 67 回:166, 2008. Abstracts. 112:807-, 2008.

13) 川口晶, 大場靖子, 木村享史, 伊波英克, 緒方正男, 辻隆裕, 佐多徹太郎, 澤洋文, 長谷川秀樹: ヒト ATL 細胞及び Tax トランスジェニックマウス由来腫瘍細胞の SDF-1 α に対する走化性 第56回日本ウイルス学会総会 (岡山) 2008年10月

14) 辻隆裕, 神戸光彦, 相内章, 岡本尚, 佐多徹太郎, 長谷川秀樹: NF-kappaB 阻害剤を用いた ATL モデルマウス治療の試み 第56回日本ウイルス学会総会 (岡山) 2008年10月

15) 長谷川秀樹, 辻隆裕, 澤洋文, 佐多徹太郎: 成人 T 細胞性白血病マウスモデルにおける細胞走化因子の解析. 第97回日本病理学会総会 2008年, 5月, 金沢

16) 大西なおみ, 湯浅眸, 田中伸哉, 澤洋文, 三浦太浩, 松井敦史, 東秀明, 岩淵和也, 武蔵学, 鈴木操, 山田源, 東健, 畠山昌則: ヘリコバクター・ピロリ cagA 遺伝子導入マウスにおける消化管腫瘍ならびに血液系腫瘍の発生. 日本分子生物学会第8回春季シンポジウム, 2008年5月25-27日, 札幌

17) 川口晶, 大場靖子, 木村享史, 伊波英克, 緒方正男, 佐多徹太郎, 澤洋文, 長谷川秀樹: ATL 腫瘍細胞の走化性における CXCR4 を介したシグナル経路の解析. 第73回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会・第19回日本生体防御学会学術総会・第45回補体シンポジウム 合同大会, 2008年7月10-12日, 北海道大学学術交流会館, 札幌

18) 川口晶, 大場靖子, 木村享史, 伊波英克, 緒方正男, 辻隆裕, 佐多徹太郎, 澤洋文, 長谷川秀樹: HTLV-I Tax トランスジェニックマウス由来腫瘍細胞の SDF-1 α に対する走化性とその阻害. 第1回 HTLV-1 研究会・合同班会議, 2008年8月23-24日, 東京大学医科学研究所, 東京

19) 川口晶, 大場靖子, 木村享史, 伊波英克, 緒方正男, 辻隆裕, 佐多徹太郎, 澤洋文, 長谷川秀樹: ヒト ATL 細胞及び Tax トランスジェニックマウス由来腫瘍細胞の SDF-1 α に対する走化性とその阻害. 第56回日本ウイルス学会総会, 2008年10月26-28日, 岡山コンベンションセンター, 岡山

20) 大西なおみ, 田中伸哉, 澤洋文, 三浦太浩, 東

秀明、東健、畠山昌則：ヘリコバクター・ピロリ cagA 遺伝子導入マウスにおける消化管腫瘍ならびに血液系腫瘍の発生。第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月 28-30 日、名古屋国際会議場、名古屋 <国際学会>

1) Masashi S, Yung SL, Suzuki T, Kato M, Sakata MY, Kumano K, Kawamata N, Takita J, Mori H, Kurokawa M, Chiba S, Omine M, Koeffler HP, Ogawa S.

Genome-Wide Analysis of MDS/MPD Disclosed Frequent Homozygous C-Cbl mutations Tightly Associated with 11q-UPD. 50th ASH Annual Meeting. Abstracts. 112:855-2008.

2) Kato M, Nakazaki K, Sato Y, Takeuchi K, Sanada M, Asakura Y, Muto S, Chen Y, Takita J, Hayashi Y, Igarashi T, Watanabe T, Tobinai K, Ishikawa Y, Mori S,

Kurokawa M, Yoshino T, Kobayashi Y, Ogawa S. Genome-Wide Analysis of B Cell Non-Hodgkin's Lymphoma Disclosed Frequent Involvement of Genes in NFkB Pathway. 50th ASH Annual Meeting

G. 知的所有権の出願・取得状況

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)

「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」

発現プロファイリング・SNP 解析と病態の解析

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

ATL の発現プロファイル解析には ATL 検体 51 例、健常対照者 21 名の検体を用いて遺伝子発現プロファイル解析を行った。健常者検体は CD4⁺T リンパ球 RNA を用いた。ATL の発現プロファイルの結果は、先行する別システムでの情報と比較検討して解析中である。また、キャリアと健常人の比較では、後に ATL を発症した検体が他と別のクラスターを形成する事を見だし、発症予測と早期診断への応用を検討中である。ATL 細胞における micro RNA (miRNA) の発現解析の結果、ATL 細胞では特異的に発現低下を示すものが 723miRNA 中 50 個あった。これらの miRNA の標的遺伝子にはシグナル伝達経路や転写などで重要なものが含まれており、その機能解析を開始した。

HAM の発症を規定する遺伝学的背景の探索を目的として、HAM 発症者 163 例と非発症キャリア 130 例について、全ゲノム関連解析を行った。解析症例数が限られていること、および、膨大な SNP の測定により極端な多重解析が生ずる結果として、本検討では弱い遺伝学的効果を捕らえることはできなかったが、少なくとも、HAM の発症リスクに単独で大きな影響を及ぼす SNP は検出されなかった。今後、弱い遺伝学的効果を捕らえるためには、検討症例を増やした解析が必要であると考えられた。

A. 研究目的

HTLV-1 感染細胞の多段階発癌の分子機構を明らかにし、治療標的分子を同定する事は、ATL の新たな治療法開発に必須の過程である。一方、腫瘍化へ向かう HTLV-1 感染細胞の特徴を明らかにする事は、発症高危険群の同定及び発症予防法の開発につながる。これらの情報を明らかにするアプローチとして、ATL 腫瘍細胞の発現プロファイルを明らかにして腫瘍細胞を特徴づける発現異常を解明するために、新たに、年齢をマッチさせた健常者末梢血 CD4 陽性細胞を対照とした発現アレイ解析を行った。さらに、無症候性キャリアの末梢血単核球集団を材料に、キャリアの遺伝子発現プロファイルを明らかにして腫瘍化へ向かう感染細胞のバイオマーカー探索を目指した。

一方、HTLV-1 感染で発症する難治性神経変性疾患である HAM について以下の検討を行った。HAM の発症

頻度はキャリア 10 万対 3 人と推定されているが、HAM の発症を規定する環境・遺伝要因については不明である。そこで、本研究では、HTLV-1 キャリアにおいて HAM の発症に影響を及ぼす遺伝学的背景の探索とその発症の分子メカニズムの解明を目的として、HAM 発症症例と非発症症例について、大規模 SNP タイピングを用いた全ゲノム関連解析を行った。

B. 研究方法

1) ATL の発現解析

1-1. 検体と対照群

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、および鹿児島大学で集積された HAM 検体と無症候性キャリア末梢血単核球 DNA である。後者は、斉藤峰輝准教授 (現 琉球大学) より提供された。保存試料より常法に従って抽出された total RNA をマイクロアレイ解析に用いた。健常者コントロールは、60 歳～70 歳代のボランティア 21 名から末梢血検

体を採取した。

1-2. Agilent Technologies 社の発現アレイシステム:一般の遺伝子発現解析には、Whole Human Genome Expression Array (44,000 genes)、miRNA の発現解析には Human miRNA V2 Oligo Microarray (723 human miRNA+76 viral miRNA) を用いた。解析用の RNA はプロトコールに従い Trizol を用いて調整し、quality check にはバイオアナライザーを用いた。T7 プライマーを用いた RNA 増幅を施した後、cDNA プロブを合成した。

1-3. データ解析:発現データは、アレイ解析ソフトウェア GeneSpring GX を用いて解析した。正常人末梢血 CD4 陽性細胞あるいは末梢血単核球と ATL あるいはキャリア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 特異的あるいはキャリア特異的に発現異常を示す遺伝子群の同定を行った。

2) HAM の全ゲノム関連解析

HTLV-1 のコホート研究で集積された HAM 症例 163 例と非発症キャリア 130 例を対象として、末梢血単核球よりゲノム DNA を抽出し、Affymetrix GeneChip® 250K NspI アレイにより、全ゲノムについて 25 万カ所の SNP タイピングを行い、得られた genotype データを用いて、HAM の発症リスクに関わる全ゲノム関連解析を行った。具体的には、タイピングされた SNP のうち、アレル頻度が 1%以上で勝つ、95%以上の call rate を示し、Hardy-Weinberg 平衡を満たす 192,560 SNP の各 SNP について、HAM 発症群と非発症群における統計量を算出し、統計学的に有意な SNP 座を探索した。統計的な閾値については、極端な多重解析を考慮し、3000 回の permutation によりゲノムワイドな type I エラー率が 5%となる統計量の値を経験的に算出し、統計的閾値として検定を行った。

(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。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

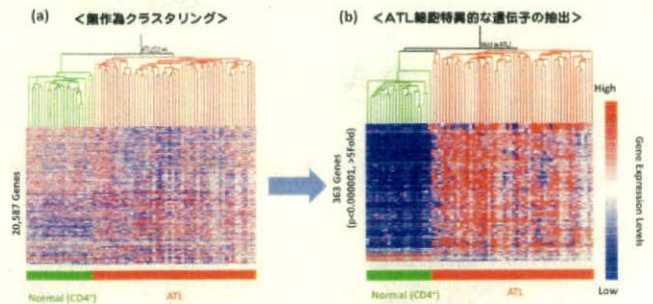
1) 発現プロファイル解析

(1)ATL 検体の発現プロファイル

ATL 検体 51 および健康者とコントロール検体 21 を用いて解析した。全ての遺伝子の発現プロファイルについての無作為クラスタリングでは、ATL 患者と健康人が明確に異なるクラスターに分かれ、ATL 患者が健康人と非常に異なる遺伝子発現パターンを示していることが改めて示された。次に、健康人に比べ ATL 検体で有意かつ 5 倍以上の発現の変化がある遺伝子を検定によって選出しクラスタリング解析した

ところ、ATL では共通して発現異常が見られる遺伝子群があること、また、そのほとんどが上昇している事が示された (図 1)。

図 1. ATL患者(52人)と健康人(21人)の遺伝子発現プロファイル

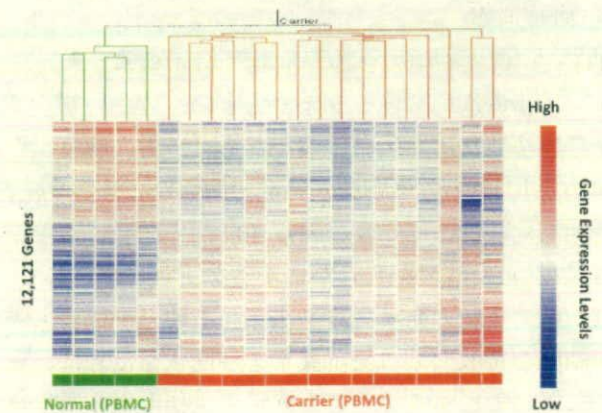


(2) キャリア検体の発現プロファイル

無症候性キャリアの末梢血単核球と、健康人末梢血単核球の発現プロファイルを、全ての遺伝子について無作為にクラスタリングしたところ、両者は明確に異なる 2 つのクラスターに分類された。従って、低い感染細胞数の特徴を検出できており、無症候状態であっても、carrier 細胞の発現パターンに変化が起こっている結果であると考えられた。

次に carrier だけについてのクラスタリングでは、ウイルスロードのレベルと相関が示された。従って、発現プロファイルのかなりの部分が感染細胞数の遺伝子発現によって規定されていると考えられた。さらに、6ヶ月後に ATL を発症したキャリアのデータを加えて検討したところ、ウイルスロードとは独立に、新たなブランチに位置づけられた。従って、ATL 発症前に特有の遺伝子発現プロファイルを示す事が示唆された (図 2)。

図 2. キャリアと健康人の遺伝子発現プロファイルのクラスタリング

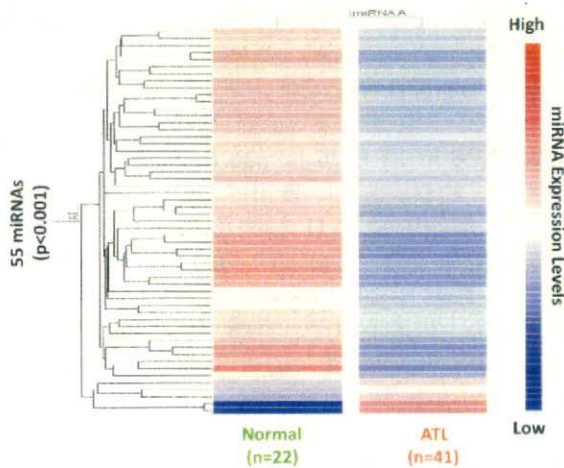


(3) miRNA 発現解析

ATL 検体 41 例を用いて miRNA のアレイ解析を行ったところ、信頼度の高いデータが得られた。ヒト miRNA 723 個のうち、55 個の miRNA が ATL で有意に発現が変化しており、その大多数である 50 個が ATL 検体で発現が減少していた (図 3)。顕著な減少が見られた miRNA には、miR 31, miR 146b-5p, let 7b お

よび let 7c が含まれていた。これらの miRNA について "TargetsCan" によって標的遺伝子を検討したところ、NFkB 経路や細胞周期調節に関わる遺伝子をターゲットとしている事が明らかになった。このうち、miR 31 の標的候補分子のうち、MAP3K14, FOXP3, NUMB, MAP4K5 および TACC1 について発現を、発現アレイデータで確認したところをいずれも多くの検体で過剰発現が確認できた。

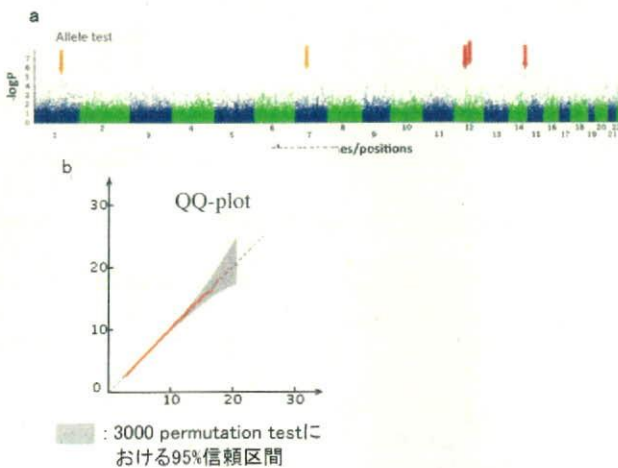
図3. ATL患者と健常人でのmiRNA発現プロファイルの比較



2) HAM の全ゲノム関連解析

図 1 に標準的なアレルテストによる全ゲノム関連解析の結果を示した。上段に算出された p 値の各 SNP のゲノム上の位置順に表示した。また、下段に対応する QQ-plot を示した。複数の遺伝子座で $p = 2 \times 10^{-5}$ に相当する局所的な統計値の peak が認められたが、多重解析を考慮した結果、ゲノムワイドな有意性を示す peak は観測されなかった (図 4)。

図4. 全ゲノム関連解析の結果



D. 考察

1) 発現プロファイル解析

多数の検体を用いて先行研究を追試し、より正確な ATL 細胞の発現プロファイルデータを獲得することができた。無作為クラスタリングでも対照群と明確に異なるクラスターを形成する事が確認され、ATL の発現異常の特徴が示された。有意な発現レベルの変化を示す遺伝子のリストを、先行データと比較し、機能解析を行う分子の選定や、ATL 型遺伝子発現を指標とする RT-PCR array の改良へ応用する作業を進めている。

キャリアの発現解析結果は、一部予想外な結果であった。つまり、キャリア検体と対照群が、無作為クラスタリングで明確に異なるクラスターに区分された事は、末梢血中に数%存在する HTLV-1 感染細胞そのものの遺伝子発現を反映していると考えるのは困難である。従って、感染細胞が存在する事あるいはキャリアである事そのものが末梢血中の非感染細胞における遺伝子発現に影響している可能性を検討する必要があると考えられる。

また、後に ATL を発症したキャリアの検体が独自のクラスターを形成する事が明らかになった。今後は、機会を見てコホートからの発症例のデータを追加して、確認する必要がある。また、クラスター解析から、発症予備軍を特徴づけるバイオマーカーが得られる可能性がある。

miRNA 発現解析は、ATL に特徴的な miRNA 発現異常を明らかにした。特異的に発現低下を示す miRNA の想定される標的遺伝子群は機能的に重要なものが多数含まれている。早急に、標的遺伝子の確定を行い、発現低下の機能的異議を明らかにする必要がある。

2) HAM の全ゲノム関連解析

HAM 発症者と非発症キャリアについて、ゲノム全体で約 25 万遺伝子座について SNP タイピングを行い、統計的に有意な頻度差を示す SNP の同定を行った (全ゲノム関連解析) が、極端な多重解析を補正した解析では、統計的に有意な頻度差を示す SNP は同定されなかった。本解析では、25 万 SNP 座が解析される一方、全体の検体数は 300 弱と小さいため、十分な検出力が得られない。従って、検出される可能性があるのは、非常に高い遺伝学的リスクを付与する SNP に限られる。本解析の結果は、HAM の発症に単独で極めて大きな影響を及ぼす common な SNP は殆どないと解釈される。一方、中等度ないし弱い遺伝学的な効果を本研究で検出することは不可能であった。一方、ゲノムワイドな有意性は検証できないが、比較的小さな p 値を示す遺伝子座は多数同定されており (表 1)、これらについては、今後これらの候補 SNP について独立な症例セットを用いた確認検定が有効である可能性が示唆される。

E. 結論

新たな系を用いて ATL 患者およびキャリアのプロファイル解析を行った。ATL では、検体数の増加からより有効なデータベースが得られたので、機能的意

義の解析を早急に進める必要が有る。キャリアの発現プロファイルデータは、発症予測や発症高危険群同定に直結する可能性がある。

163 例の HAM 症例および 130 例の HAM 非発症キャリアについて、25 万 SNP 座のタイピングによる全ゲノム関連解析を行った。多重解析を含めて有意性を示す SNP 座は検出されず、HAM の発症には、多数の弱い遺伝学的効果を有する common な複数の SNP が関与する可能性、およびアレル頻度は小さいが強い遺伝学的効果を示す多数の SNP が関与する可能性が示された。今後 1 次スクリーニングで同定された候補 SNP 座について確認タイピングを進める予定である。

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- κ B inducing kinase

contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells *Blood* 111:5118-5129, 2008

2) Miyake A, Dewan MZ, Ishida T, Watanabe M, Honda M, Sata T, Yamamoto N, Umezawa K, Watanabe T, Horie R. Induction of apoptosis in Epstein-Barr virus-infected B-lymphocytes by the NF- κ B inhibitor DHMEQ *Microbes Infect* 10: 748-756, 2008

3) Watanabe M, Nakashima M, Togano T, Higashihara M, Watanabe T. Identification of the RelA domain responsible for action of a new NF κ B inhibitor DHMEQ *Biochem Biophys Res Commun* 376:310-314, 2008

4) Shimizu Y, Takamori A, Utsunomiya A, Kurimura M, Yamano Y, Hishizawa M, Hasegawa A, Kondo F, Kurihara K, Harashima N, Watanabe T, Okamura J, Masuda T, Kannagi M. Impaired Tax-specific T-cell responses with insufficient control of HTLV-1 in a subgroup of individuals at asymptomatic and smoldering stages *Cancer Sci* 100:481-489, 2008

5) Uchimarui K, Nakamura Y, Tojo A, Watanabe T, Yamaguchi K. Factor predisposing to HTLV-1 infection in residents of the greater Tokyo area *Int J Hematol* 88:565-570, 2008

6) Tsukasaki K, Hermine O, Bazarbachi A, Ratner L, Ramos JC, Harrington O'Mahony D, Janik JE, Bittencourt AL, Taylor GP, Yamaguchi K, Utsunomiya A, Tobinai K, Watanabe T. Definition, Prognostic Factors, Treatment and Response Criteria of Adult T-cell Leukemia-Lymphoma: A Proposal from an International Consensus Meeting *J Clin Oncol* 27:453-459, 2009

2. 学会発表

1) Nazanin Dabaghmanesh, 三宅在子、片野晴隆、佐多徹太郎、梅澤一夫、堀江良一、渡邊俊樹. Inhibition of NF- κ B by DHMEQ in primary effusion lymphoma destroys cancer cells without induction of viral

replication 第12回がん分子標的治療研究会総会

2008年6月26日~27日、東京

2) 加賀美弥生、松原亜以子、正田桃子、渡辺慎哉、宇都宮與、東條有伸、山口一成、渡邊俊樹. 遺伝子発現アレイ解析に基づく RT-PCR-Array による ATL 診断系の確立と発症予征法への応用 第70回日本血液学会総会、2008年10月10日~12日、京都

3) 山本啓裕、石田尚臣、古川洋一、田中勇悦、渡邊俊樹. HTLV-1 Tax のヒストン H3K4 メチル化酵素 SMYD3 との相互作用を介した細胞周期異存的細胞内局在変化とその機能的意義、第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月26日~28日、岡山

4) 安東友美、高橋隆太郎、高橋碧、中野和民、渡邊俊樹. HTLV-1 による宿主細胞 mRNA 品質管理機構 (NMD) の阻害、第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月26日~28日、岡山

5) 包明久、加賀美弥生、吉田エリカ、松原亜以子、中野和民、渡邊俊樹. ATL 細胞及び HTLV-1 感染細胞株の miRNA プロフィール、第67回日本癌学会学術総会、2008年10月28日~30日、名古屋

6) 中野和民、松原亜以子、武藤早紀、加藤元博、滝田順子、宇都宮與、山口一成、山田恭輝、大島孝一、小川誠司、渡邊俊樹. ATL における遺伝子発現レベルおよびゲノムコピー数異常の相関解析による網羅的遺伝子プロファイリング、第67回日本癌学会学術総会、2008年10月28日~30日、名古屋

7) 高橋隆太郎、安東友美、高橋碧、中野和民、渡邊俊樹. ATL 多段階発がん過程における NMD 機能不全の可能性の検討、2008年10月28日~30日、名古屋

8) 加賀美弥生、松原亜以子、正田桃子、渡辺慎哉、宇都宮與、東條有伸、山口一成、渡邊俊樹. RT-PCR Array に基づく ATL-type expression score を用いた診断と ATL 発症リスク評価の検討、2008年10月28日~30日、名古屋

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

ATL の発症に関わる標的遺伝子の解析

分担研究者 小川 誠司 東京大学大学医学部附属病院がんゲノミクスプロジェクト
特任准教授

研究要旨

ATLはHTLV-1感染により不死化した末梢T細胞に新たな遺伝的変異が生ずることにより発症にいたると考えられる。本研究では、新規治療法の開発の基盤となるATLの分子病態の解明を目的として、マイクロアレイを用いた網羅的なゲノム解析によるこれらの遺伝的変異の同定を進めている。本年度は、H19年度までのアレイ解析で同定された主要な標的遺伝子候補であるCD28(遺伝子増幅)、CD2(欠失)、Helios(欠失)について変異解析・機能解析を行い、これらの遺伝子のATL発症への関与について検討を行った。変異解析の結果では、これらの遺伝子には腫瘍特異的な変異は検出されず、今後は、機能的な側面からこれらの遺伝子の増幅・欠失がATL発症に果たす役割についてさらに検討する必要があると考えられた。

A. 研究目的

ATLは、HTLV-1の感染キャリアに発症する極めて悪性度の高い末梢性T細胞腫瘍である。今後我が国において、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おらず、本疾患に対する有効な治療・予防手段を開発することは、我が国の医療・行政上の極めて重要な課題である。本分担研究では、ATL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ことを目的として、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の異常の網羅的な同定を進めている。最終年度にあたるH20年度の研究では、昨年までに行った170例のATLのゲノム解析の結果に基づいて、ATLで後発するゲノム異常の遺伝子標的の同定を行った。

B. 研究方法

(1) 解析症例と変異解析

H19年度までに行った171例のATL検体のSNPアレイ解析の結果より、ATLで高頻度に遺伝子増幅および欠失を来す遺伝子としてCD28遺伝子(増幅)およびCD2、Helios遺伝子(欠失)を同定した。そこで本年度については、これらの遺伝子異常を有するATL症例について、当該遺伝子変異の有無を検討した。すなわち、CD28の増幅、CD2ないしHelios遺伝子の欠失を有するATL検体のゲノムDNAより、当該遺

伝子の全エクソンをPCR法により増幅し、得られたPCR産物を直接シーケンス法により解析した。

(2) CD28高発現細胞株におけるCD28の遺伝子ノックダウン

レンチウイルスベクターを用いたsiRNAの誘導的発現システムを用いて、CD28を高発現するATL細胞株ST1について誘導的にCD28の発現抑制を行い、その細胞増殖に及ぼす効果を検討した。

(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。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

変異解析の結果では、CD28、CD2、およびHelios遺伝子のいずれについても腫瘍特異的な遺伝子変異は検出されなかった。また、tet-inducibleなCD28特異的siRNAを遺伝子導入したATL腫瘍細胞株ST1では、テトラサイクリン投与によりCD28の発現は著明に抑制されたが、ST1の細胞増殖に影響は認められなかった。

D. 考察

SNPアレイによる網羅的なゲノムコピー数解析から同定されたATLの標的遺伝子の候補に

ついて、腫瘍特異的な遺伝子変異の有無を検討したが、今回の解析では変異は検出されなかった。従って CD28 遺伝子については遺伝子増幅が、また CD2 および Helios 遺伝子についてはヘテロな欠失により生ずる haploinsufficiency が ATL の発症に重要である可能性が示唆される。CD28 を高発現する ATL 細胞株において siRNA による CD28 の発現抑制を行っても *in vitro* における細胞増殖には変化がみとめられなかった。CD28 のシグナル伝達はリガンドに依存しており、生体内では増幅した CD28 のリガンド刺激を通じて増殖シグナルが伝達される。このことから、CD28 の遺伝子増幅の腫瘍化への関与を検討するためには、免疫不全マウスへの xenograft model 等を用いた *in vivo* での検討が必要と思われる。

E. 結論

ATL の SNP アレイ解析で同定された 3 つの標的遺伝子の候補、CD28, CD2, および Helios について変異解析を行ったが、これらの遺伝子については腫瘍特異的な変異は検出されなかった。また、CD28 の遺伝子増幅を有する ATL 細胞株について、siRNA を用いた CD28 の発現抑制が細胞増殖の変化に及ぼす効果を検討したが、*in vitro* のアッセイでは CD28 の発現抑制による細胞増殖の抑制は認められなかった。これらの遺伝子のゲノムコピー数変化の ATL 発症における機能的関与を明らかにするためには、今後マウスモデルを用いた検討が必要であると考えられた。

F. 研究発表

論文発表

1. Akagi T, Ogawa S, Dugas M, Kawamata N, Yamamoto G, Nannya Y, Sanada M, Miller CW, Yung A, Schnittger S, Haferlach T, Haferlach C, Koeffler HP. Frequent genomic abnormalities in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome with normal karyotype. *Haematologica*, 94:213-223, 2008.
2. Chen Y, Takita J, Choi YL, Kato M, Ohira M, Sanada M, Wang L, Soda M, Kikuchi A, Igarashi T, Nakagawara A, Hayashi Y, Mano H, Ogawa S. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature*. 455:971-974, 2008.
3. Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M, Niebuhr B, Stocking C, 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. Cloning

of genes involved in chromosomal translocations by high-resolution single nucleotide polymorphism genomic microarray. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105: 11921-11926, 2008.

4. Kawase T, Nanya Y, Torikai H, Yamamoto G, Onizuka M, Morishima S, Tsujimura K, Miyamura K, Kodera Y, Morishima Y, Takahashi T, Kuzushima K, Ogawa S, Akatsuka Y. Identification of human minor histocompatibility antigens based on genetic association with highly parallel genotyping of pooled DNA. *Blood*. 111:3286-3294, 2008

5. Walsh CS, Ogawa S, Karahashi H, Scoles DR, Pavelka JC, Tran H, Miller CW, Kawamata N, Ginther C, Dering J, Sanada M, Nannya Y, Slamon DJ, Koeffler HP, Karlan BY. ERCC5 is a novel biomarker of ovarian cancer prognosis. *J Clin Oncol*. 26:2952-2958, 2008.

学会発表

1) 武藤早紀, 松原亜以子, 中野和民, 真田昌, 加藤元博, 田村梓, 宇都宮與, 山口一成, 山田恭輝, 大島孝一, 小川誠司, 渡邊俊樹. 成人 T 細胞白血病 (ATL) における網羅的ゲノム解析. 臨床血液. 49:929, 2008.

2) 加藤元博, 中崎久美, 竹内健吾, 真田昌, 千葉滋, 石川雄一, 滝田順子, 林泰秀, 森茂郎, 小林幸夫, 黒川峰夫, 小川誠司. Genome-Wide Analysis of non-Hodgkin's Lymphoma. 日本癌学会総会. 67 回:317-318, 2008.

3) 真田昌, 鈴木隆浩, 加藤元博, 坂田麻実子, 熊野恵城, 滝田順子, 黒川峰夫, 千葉滋, 小川誠司. Genomewide LOH Mapping Using SNP Array Disclosed Association between a Uniparental Disomy and Homozygous Mutation in MDS. 日本癌学会総会記事. 67 回:166, 2008.

4) Masashi S, Yung SL, Suzuki T, Kato M, Sakata MY, Kumano K, Kawamata N, Takita J, Mori H, Kurokawa M, Chiba S, Omine M, Koeffler HP, Ogawa S. Genome-Wide Analysis of MDS/MPD Disclosed Frequent Homozygous C-Cbl mutations Tightly Associated with 11q-UPD. 50th ASH Annual Meeting. Abstracts. 112:855-, 2008.

5) Kato M, Nakazaki K, Sato Y, Takeuchi K, Sanada M, Asakura Y, Muto S, Chen Y, Takita J, Hayashi Y, Igarashi T, Watanabe T, Tobinai K, Ishikawa Y, Mori S, Kurokawa M, Yoshino T, Kobayashi Y, Ogawa S. Genome-wide analysis of B cell non-Hodgkin's lymphoma disclosed frequent involvement of genes in NFκB Pathway. 50th ASH Annual Meeting Abstracts. 112: 807, 2008.

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 JAPFAD 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 α 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 20 年度末までにのべ約 4,000 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 525 検体、ATL138 検体、HAM 13 検体、HTLV-1 ぶどう膜炎 41 検体の計 717 検体であった。キャリアコホートの解析から 12 例が ATL を発症した事が明らかになり、そのうち発症前検体が利用できた 4 検体は遺伝子発現解析に供した。遺伝子発現解析には保存されていた ATL 症例 51 検体を用い、マイクロ RNA 発現解析には 40 症例の検体を供した。キャリア末梢血と健常人の発現プロファイル解析には 17 検体を供した。

A. 研究目的

文部科学省科学研究費補助金「がん研究に係わる特定領域研究」で組織されている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て形成されたバイオマテリアルバンクから、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ゲノムコピー数解析に供することを目的とする。さらに、ウイルロード情報、感染細胞のクローナリティ解析および疫学的解析に基づいて適切な検体を選定し、遺伝子発現解析に提供する事を目的とする。

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

東京大学新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻および東京大学大医学系学院研究科において行う。

(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 法で解析している。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/プローブを使用する。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。

（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20年度解析検体数

平成20年度に集積されて検体数はのべ717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：525 検体

ATL：138 検体

HAM：13 検体

ぶどう膜炎：41 検体

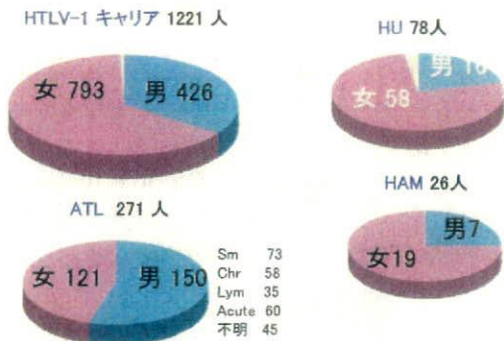
(2) コホート解析

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4000検体について適宜モニタリング会議を開催して、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。

その結果、研究参加の無症候性キャリアから、これまでに12例のATL発症者がいる事が明らかになった。各検体のウイルスロードを検討したところ、これらの例は、いずれもウイルスロードが2%以上である事が明らかになった。また、発症前の検体の単核球が保存されていた症例のうち、4検体を発現解析に提供した。

なお、平成20年12月現在のJSPFAD参加者の臨床診断の集計結果は無症候性キャリア1221人、ATL患者271人、ぶどう膜炎患者78人、HAM患者26人であった(図1)。

図1. JSPFAD 登録状況の内訳 (2008年12月現在)



D. 考察

新規加入者および定期的経過観察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、新たな研究協力施設参加申込が2件あり現在各施設の倫理審査委員会へ申請中

である。改良された伝票システムと、精神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た。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12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が、更に多くの施設の参加によってオールジャパン体制の共同研究が可能になる様準備を進めている。コホート研究としての解析で、キャリアからのATL発症例12例を同定でき、それらの検体を解析に提供できた事は、非常に有意義である。全ゲノム関連解析を進めるには、HAM検体数の拡充、ATL患者の正常組織DNAの収集体制の構築が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hamaguchi I, Imai J, Momose H, Kawamura M, Mizukami T, Naito S, Maeyama J, Masumi A, Kuramitsu M, Takizawa K, Kato H, Mizutani T, Horiuchi Y, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K. Application of quantitative gene expression analysis for pertussis vaccine safety control. *Vaccine* 26:4686-4696, 2008.

2. Tsukasaki K, Hermine O, Bazarbachi A, Ratner L, Ramos JC, Harrington W Jr, O'Mahony D, Janik JE, Bittencourt AL, Taylor GP, Yamaguchi K, Utsunomiya A, Tobinai K, Watanabe T.

Definition, prognostic factors, treatment, and response criteria of adult T-cell leukemia-lymphoma: a proposal from an

international consensus meeting.

J Clin Oncol 27:453-459, 2009.

3. Uchimaru K, Nakamura Y, Tojo A, Watanabe T, Yamaguchi K.

Factors predisposing to HTLV-1 infection in residents of the greater Tokyo area.

Int J Hematol 88:565-570, 2008.

4. Otsubo H, Yamaguchi K.

Current risks in blood transfusion in Japan.

Jpn J Infect Dis. 61:427-433, 2008.

2. 学会発表

1) 加賀美弥生、松原亜以子、正田桃子、渡辺慎哉、宇都宮與、東條有伸、山口一成、渡邊俊樹. 遺伝子発現アレイ解析に基づく RT-PCR-Array による ATL 診断系の確立と発症予征法への応用 第70回日本血液学会総会、2008年10月10日～12日、京都

2) 中野和民、松原亜以子、武藤早紀、加藤元博、滝田順子、宇都宮與、山口一成、山田恭輝、大島孝一、小川誠司、渡邊俊樹. ATL における遺伝子発現レベルおよびゲノムコピーナンバー異常の相関解析による網羅的遺伝子プロファイリング、第67回日本癌学会学術総会、2008年10月28日～30日、名古屋

3) 加賀美弥生、松原亜以子、正田桃子、渡辺慎哉、宇都宮與、東條有伸、山口一成、渡邊俊樹. RT-PCR Array に基づく ATL-type expression score を用いた診断と ATL 発症リスク評価の検討、2008年10月28日～30日、名古屋

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ATL モデルマウスを用いた NF- κ B 阻害剤による ATL 治療法の検討

分担研究者：長谷川秀樹 国立感染症研究所 感染病理部
研究協力者：辻 隆裕 国立感染症研究所、感染病理部

研究要旨

本研究では我々が作成した ATL モデルマウスを用い、腫瘍細胞で恒常的に活性化している NF κ B 経路を分子標的とした新しい ATL 治療法を開発することを目的とする。今回実験では NF κ B の上流で IKKb を阻害するとされる NF κ B 阻害剤：Bay65-1942 を用いた。まず Bay65-1942 を培養液中に添加することで、*in vitro* でマウス ATL 細胞に対してアポトーシスを誘導し、DNA の断片化を引き起こすことが確認された。次に NOD-SCID マウス腹腔内にマウス ATL 細胞を移植し、薬剤を腹腔内投与することで *in vivo* での薬剤の効果を検討したところ、薬剤未投与群では平均生存期間が 30.5 日であったものが、Bay65-1942 を 800 μ g/day 投与した群では平均生存期間が 37 日に延長し、約 1.2 倍の延命効果が認められた。また投与群では組織への白血病細胞の浸潤が著明に低く抑えられていることが病理組織学的に確認された。以上の結果から Bay65-1942 による NF κ B 経路の阻害は本モデルにおいて有効であり、今後 ATL 治療の候補の一つとなりうることを示唆された。

A. 研究目的

ATL マウスモデルを用いて NF κ B 経路を新規標的とした治療法の検討を *in vitro* と *in vivo* の両方で行う。

B. 研究方法

材料と方法：

・細胞

Tax トランスジェニックマウス由来の白血病/リンパ腫細胞 1×10^6 個を RPMI に懸濁し、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継代し、これを繰り返す事で腫瘍細胞のみの集団にした。更に Percoll を用いて腫瘍細胞を分離し、この集団を mouse ATL leukemic cell (mATL 細胞) として実験に用いた。mATL 細胞の培養は RPMI medium (10% Fetal Bovine Serum, β -mercapt ethanol) で行なった。

・アポトーシスの検出

mATL 細胞 1×10^6 cells を 1 ml の RPMI に懸濁し Bay65-1942 を 2, 4, 10 μ g/ml の濃度に加え、CO₂ インキュベーター内で 37°C, 24 時間処理した。その後細胞を回収し、アポトーシスの誘導の有無を調べた。アポトーシスの確認には、ゲノム断片化の検出及び TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling) 法を行った。ゲノム断片化の検出には、Apoptotic DNA Ladder Kit (Roche) を用いて細胞から DNA を抽出し、

電気泳動を 1%アガロースゲルで行い、DNA をエチジウムブロマイドで染色し検出した。また、TUNEL 法は細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定後、スライドガラス上で風乾し、アポトーシスの初期に生じる DNA の二本鎖切断端を In Situ Cell Death Detection Kit POD (BOEHRINGER MANNHEIM) を用いてプロトコールに従って染色を行った後、蛍光顕微鏡にて観察した。

・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。

mATL 細胞 1×10^6 個を NOD-SCID マウスに腹腔内投与し、その後 Bay65-1942 を 0, 200, 400, 800 μ g、20% DMSO 500 μ l に溶解し 6 匹/群で腹腔内投与を行った。0, 200, 400 μ g の群は、mATL 細胞を接種した日を 1 日目として、1~7 日目・12~18 日目・22~31 日目に薬剤を投与した。800 μ g の群は、途中体重減少等の副作用と考えられる体重減少が出現したため投与頻度を減らし、1~7 日目・15~17 日目・25 日目・29~31 日目に投与した。その後経過を観察し、生存率の解析、白血球数の測定及び病理組織学的解析を行った。

結果

1、*in vitro* でのアポトーシスの誘導

NF κ B 経路の恒常的活性化によるアポトーシス抑制、細胞増殖促進はヒト ATL 細胞の生存に必