

200807004B

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18年度～20年度 総合研究報告書

研究代表者 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18年度～20年度 総合研究報告書

研究代表者 渡邊 俊樹

平成21年(2009年)4月

目次

I. 総合研究報告

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. 研究成果の刊行に関する一覧表 11

III. 研究成果の刊行物・別刷 15

「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」

研究代表者 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 年度末までに約 4,000 検体のサンプルを集積した。一方、分担研究者ら ATL のモデルマウスを作製した。本研究は、上記のバイオマテリアルバンクと ATL モデルマウスを基盤として、最新のアレイ技術を駆使して検体を解析し、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事を目的とした。具体的には以下の解析を行った。①ATL の 170 検体についてゲノムコピー数異常の解析、②HAM の全ゲノム関連解析、③ATL51 検体を用いた遺伝子発現プロファイル解析、④ATL 40 検体を用いたマイクロ RNA 発現解析、⑤ウイルスキャリア 17 例を用いた末梢血単核球発現プロファイル解析、⑥ATL 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。その結果、ATL を特徴づける増幅・欠失の標的となる遺伝子の候補が 100 以上同定され、機能解析が開始された。また、ATL 細胞の詳細な発現プロファイルデータが得られた。さらにキャリアの遺伝子発現プロファイルは特異なパターンを示す事、ATL 発症前の検体は特徴的な発現プロファイルを示す事が明らかになり、発症高危険群同定と発症予防法開発へ有力な情報が得られた。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。これらの成果は、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に多大な貢献をするものと期待される。

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。本研究計画では、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めざした。更に、ATL モデルマウスのシステムを利用し、腫瘍細胞の臓器浸潤の分子機構解明を試みた。

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。

全国42カ所の協力施設において得られた研究協力者の無症候性キャリアあるいはATLをはじめとするHTLV-1関連疾患患者の末梢血検体は、SRLを通じて、毎日東京大学大学院渡邊研究室へ送付される。血漿と単核球を分離した後、血症は可溶性IL-2Raの測定をSRLに依頼し、単核球からはゲノムDNAの抽出を行い、Taqman法によるreal time PCRでプロウイルスコピー数の定量を行い、20コピー/100単核球以上の場合にはサザンブロッティング法で感染細胞のクローナリティ解析を行った。これらの解析に用いない予備の単核球サンプルは-80度で凍結保存し、後の解析に備えた。臨床情報の解析を含め、コホートとしての疫学研究を進めて、ATL発症者の同定を行った。

このような体制で、HTLV-1感染者の末梢血検体のバンク形成を進め、種々の解析に備えた。

(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. 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 allelotyping)。全体で各病型を合わせて約200検体を用いて解析した。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、専用スキャナーで特異的なシグナルを検出した。

2-2. コピー数異常を示す遺伝子の解析

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、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。

2-3. 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® 250KNspI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typeI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(小川・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51例分用いた。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-κB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 μg/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)

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目し、種々の阻害剤を使用し、SDF-1α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。

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、ケモタキスチャ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 細胞のゲノムコピー数解析

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)。

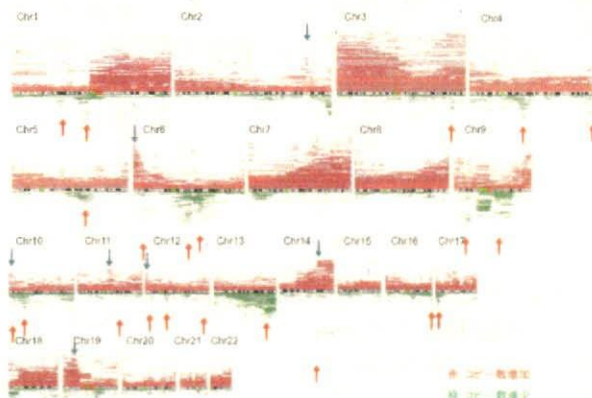


図1 171例のATL/ATLLのゲノムプロファイル

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。

また、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(表 1)。

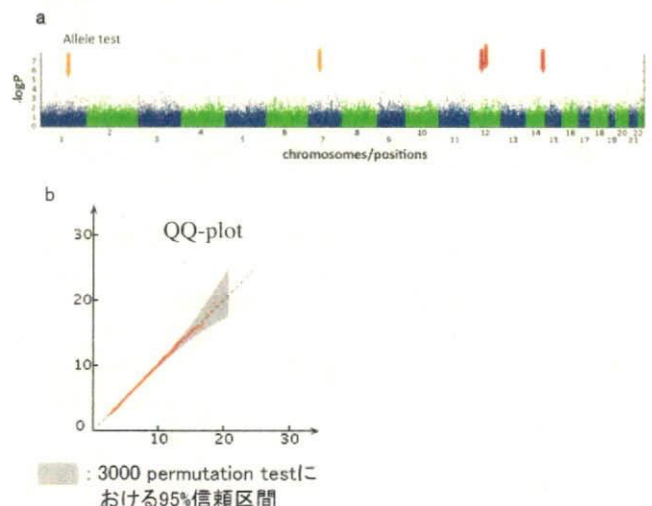
Chromosome	Location	Region	Gene	Copy Number	Gene	Copy Number	Gene	Copy Number	Gene	Copy Number	Gene	Copy Number
1q	1q21	1q21.31	CD28	2.5	CD28	2.5	CD28	2.5	CD28	2.5	CD28	2.5
			CD28	2.5	CD28	2.5	CD28	2.5	CD28	2.5	CD28	2.5
			CD28	2.5	CD28	2.5	CD28	2.5	CD28	2.5	CD28	2.5
			CD28	2.5	CD28	2.5	CD28	2.5	CD28	2.5	CD28	2.5
3p	3p21.31	3p21.31	CD28	0.5	CD28	0.5	CD28	0.5	CD28	0.5	CD28	0.5
			CD28	0.5	CD28	0.5	CD28	0.5	CD28	0.5	CD28	0.5
			CD28	0.5	CD28	0.5	CD28	0.5	CD28	0.5	CD28	0.5
			CD28	0.5	CD28	0.5	CD28	0.5	CD28	0.5	CD28	0.5
3q	3q26.32	3q26.32	CD28	1.5	CD28	1.5	CD28	1.5	CD28	1.5	CD28	1.5
			CD28	1.5	CD28	1.5	CD28	1.5	CD28	1.5	CD28	1.5
			CD28	1.5	CD28	1.5	CD28	1.5	CD28	1.5	CD28	1.5
			CD28	1.5	CD28	1.5	CD28	1.5	CD28	1.5	CD28	1.5

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

(2) HAM 検体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 2 a, b)。

図2. 全ゲノム関連解析の結果

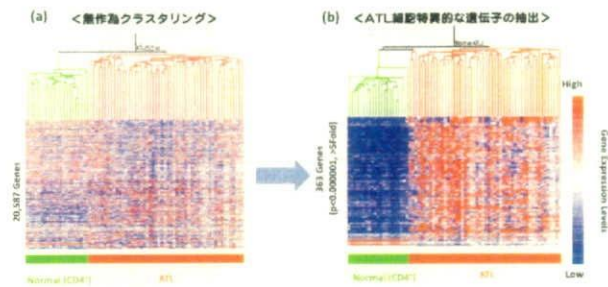


(3) ATL 検体の発現プロファイル

ATL 検体 5 1 および健康者とコントロール検体 2 1

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(図3)。

図3. ATL患者(52人)と健常人(21人)の遺伝子発現プロファイル



(3) 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(図4)。

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(図5)。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4. キャリアと健常人の遺伝子発現プロファイルのクラスタリング

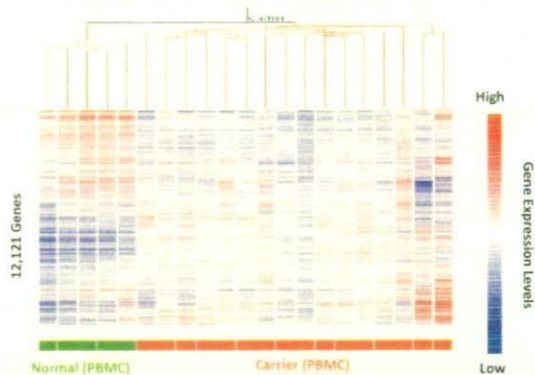
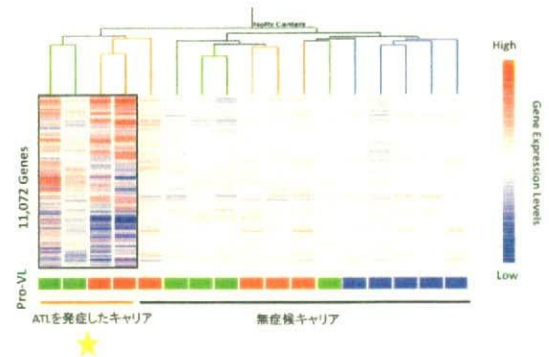


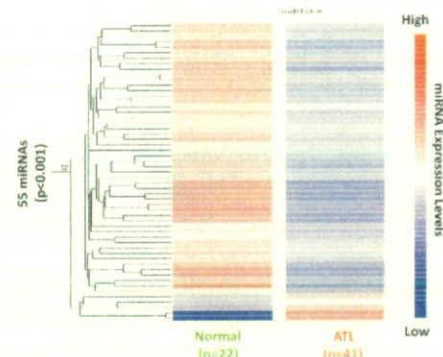
図5. ATLを発症したキャリアの遺伝子プロファイリング



(4) 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で減少していた(図6)。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、NFκB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検体で過剰発現が確認できた。

図6. ATL患者と健常人でのmiRNA発現プロファイルの比較



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

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-κB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 (澤)

まず、ATL マウスモデルの腫瘍細胞の遺伝子発現プロファイル解析を行った。本トランスジェニックマウスから腫瘍細胞を、また background である C57BL/6 マウスから T 細胞を採取して microarray による解析を行い、CD40, Caspase 1, IL-10, Cx43 が腫瘍細胞で発現の増加を認め、逆に IFN γ , IKK ϵ , FasL, NIK, pit1, Stat1, Jun, IKK α , Myd88, p38, IKK β , CBP 等の因子の発現は減少していることを確認した。

さらに ATL の症例から単離した腫瘍細胞およびトランスジェニックマウスから単離した腫瘍細胞および、を用いて、腫瘍細胞の組織への浸潤機構を解明するために、ケモカインに対する腫瘍細胞の走化性に着眼し *in vitro* における解析を行った。その結果、腫瘍細胞の走化性には SDF-1 α -CXCR4 と MEK-ERK シグナル経路が関与することが明らかになった。また CXCR4 の拮抗剤である AMD3100 を用いて腫瘍細胞の走化性の抑制効果について検討を加え、AMD3100 は ATL 症例から単離した腫瘍細胞およびマウス由来の腫瘍細胞において SDF-1 α による ERK のリン酸化および走化性を阻害した。これらの結果から AMD3100 は ATL の治療の選択肢の一つであることが示唆された。

D. 考察

(1) ATL 細胞のゲノムコピー数解析

研究期間内に計 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。

(2) 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。

(3) ATL 検体の発現プロファイル：

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。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。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。

(4) キャリア検体の発現プロファイル：

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。

(5) 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 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。

(6) 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：

NF- κ B 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。

(7) 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) Hasegawa H, Sawa H, Lewis MJ, Orba Y, Sherhy 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-1). *Nat Med*. 12:466-472, 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-1LTR. *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) 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.
- 5) 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 Chrom Cancer*. 45:482-94, 2006
- 6) 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

- 7) Ohsugi T, Kumasaka T, Okada S, Ishida T, Yamaguchi K, Horie R, Watanabe T, Umezawa K. Dehydroxymethyllepoxyquinomicin (DHMEQ) therapy reduces tumor formation in mice inoculated with Tax-deficient adult T-cell leukemia-derived cell lines. *Cancer Let*. 257: 206-215, 2007
- 8) 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
- 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) 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
- 11) 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.
- 12) 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.
- 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) Tsuji T, Sheehy N, Gautier VW, Hayaka-wa 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
- 15) Saitoh Y, Yamamoto N, Dewan MDZ, Sugimoto H, Martinez VJ, Iwasaki Y, Matsu-barak, 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
- 15) 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

16) 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

17) 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.

18) 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.

19) Kawase T, Nanya Y, Torikai H, Yamamoto G, Onizuka M, Morishima S, Tsujimura K, Miyamura K, Koda 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

20) 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.

21) 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.

22) 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.

23) 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.

24) Otsubo H, Yamaguchi K. Current risks in blood transfusion in Japan. *Jpn J Infect Dis* 61:427-433, 2008.

25) 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.

26) 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

27) 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:1003-1008, 2008

28) 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

29) 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, 2009

30) 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. 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 9 回日本病理学会総会
平成 19 年 3 月 13 日—15 日、横浜

7. 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 9 回日本臨床血液学会教育講演、2007 年 10 月 11—13 日、横浜

8. Dabaghmanesh N, Miyake A, Horie R, Dewan Md. Z, Yamamoto N, Watanabe T. “Transient inhibition of NF- κ B by DHMEQ in primary effusion lymphoma destroys cancer cells without induction of viral replication” 第 5 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月 21—23 日、札幌

9. 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- κ B 阻害薬 DHMEQ による Hodgkin リンパ腫治療の基礎的研究」第 1 回がん分子標的治療研究会総会、2007 年 7 月 5—6 日

10. 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 I κ B α を有する H-RS 細胞での I κ B β を介した NF- κ B 誘導と DHMEQ による分子標的療法」第 6 回日本血液学会、2007 年 10 月 11—13 日、横浜

11. 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.

12. 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.

13. 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)

14. 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

15. 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

16. 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

17. 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

18. 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

19. 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

20. 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

21. 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

22. 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

23. 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

24. 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.

25. 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.

26. 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.

27. 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

28. 辻隆裕、神戸光彦、相内章、岡本尚、佐多徹太郎、長谷川秀樹：NF- κ B 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

29. 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

30. 大西なおみ、湯浅暁、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

31. 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

32. 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

33. 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

34. 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. 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

2. 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

3. 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

4. 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

5. 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

6. 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

7. 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**.

8. 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, Kodaera 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**.

9. 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

10. 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.

11. 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

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)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ数
渡邊俊樹	HTLV-1の分子生物学：基礎と臨床をつなぐもの	渡邊俊樹、上平 憲、山口 一成	HTLV-1と疾患	文光堂	東京都	2007	263

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hasegawarā	Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type-I	<i>Nat Med</i>	12	466-472	2006
Kamoirā	SUV39H1 interacts with HTLV-1 Tax and abrogates Tax transactivation of HTLV-1 LTR	<i>Retrovirology</i>	e-pub 3	5	2006
Horiearā	DHMEQ, a new NF-κB inhibitor induces apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells and enhances effect of fludarabine	<i>Leukemia</i>	20	800-806	2006
Nakagawarā	AML1/Runx1 rescues Notch1-null mutation-induced deficiency of para-aortic splanchnopleural hematopoiesis	<i>Blood</i>	108	3329-3334	2006
Hosoyarā	Genomewide screening of DNA copy number changes in chronic myelogenous leukemia with the use of high-resolution array-based comparative genomic hybridization	<i>Genes Chromosomes Cancer</i>	45	482-494	2006
Jacobsarā	Genome-wide, high-resolution detection of copy number, loss of heterozygosity, and genotypes from formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue using microarrays	<i>Cancer Res</i>	67	2544-2551	2007
Ohsugiarā	Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) therapy reduces tumor formation in mice inoculated with Tax-deficient adult T-cell leukemia-derived cell lines	<i>Cancer Letters</i>	257	206-215	2007
Hanarā	ERK MAP Kinase Regulates Action Organization and Cell Motility by Phosphorylating the Actin Cross-Linking Protein EPLIN	<i>Mol Cell Biol</i>	27	8190-8200	2007
Matsuokarā	Meeting Report on the 13th International Conference on Human Retrovirology: Human T-Cell Leukemia Virus Research-30Years after Adult T-Cell Leukemia	<i>Cancer Res</i>	67	10638-10641	2007
Tsukasakiarā	VCAP-AMP-VECP compared with biweekly CHOP for adult T-cell leukemia-lymphoma: Japan Clinical Oncology Group Study JCOG9801	<i>J Clin Oncol</i>	25	5458-5464	2007
Kawazurā	Expression profiling of immature thymocytes revealed a novel homeobox gene that regulates double-negative thymocyte development	<i>J Immunol</i>	179	5335-5345	2007

Nannyaら	Evaluation of genome-wide power of genetic association studies based on empirical data from the HapMap project	<i>Hum Mol Genet</i>	16	2494-2505	2007
Yamamotoら	Highly sensitive method for genomewide detection of allelic composition in nonpaired, primary tumor specimens by use of affymetrix single-nucleotide-polymorphism genotyping microarrays	<i>Am J Hum Genet</i>	81	1114-1126	2007
Tsujiら	The nuclear import of the human T lymphotropic virus type I (HTLV-1) Tax protein is carrier and energy independent	<i>J Biol Chem</i>	282	13875-13883	2007
Saitohら	Overexpressed NF- κ B inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells	<i>Blood</i>	111	5118-5129	2008
Watanabeら	Identification of the Rela domain responsible for action of a new NFkappaB inhibitor DHMEQ	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	376	310-314	2008
Uchimarura	Factors predisposing to HTLV-1 infection in residents of the greater Tokyo area	<i>Int J Hematol</i>	88	565-570	2008
Kawamataら	Molecular allelokaryotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemias by high-resolution single nucleotide polymorphism oligonucleotide genomic microarray	<i>Blood</i>	111	776-784	2008
Lehmannら	Molecular allelokaryotyping of early-stage, untreated chronic lymphocytic leukemia	<i>Cancer</i>	112	1296-1305	2008
Kawaseら	Identification of human minor histocompatibility antigens based on genetic association with highly parallel genotyping of pooled DNA.	<i>Blood.</i>	111	3286-3294	2008
Akagiら	Frequent genomic abnormalities in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome with normal karyotype.	<i>Haematologica</i>	94	213-223.	2008
Chenら	Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma.	<i>Nature</i>	455	971-974	2008
Walshら	ERCC5 is a novel biomarker of ovarian cancer prognosis	<i>J Clin Oncol.</i>	26	2952-2958	2008
Kawamataら	Cloning of genes involved in chromosomal translocations by high-resolution single nucleotide polymorphism genomic microarray.	<i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i>	105	11921-11926	2008
Otsuora	Current risks in blood transfusion in Japan.	<i>Jpn J Infect Dis. .</i>	61	427-433	2008
Nagataら	Mouse-passaged severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus leads to lethal pulmonary edema and diffuse alveolar damage in adult but not young mice	<i>Am J Pathol</i>	172	1625-1637	2008
Orbora	Pharmacological cdk inhibitor R-Roscovitine suppresses JC virus proliferation	<i>Virology</i>	370	173-183	2008
Ohnishiら	Transgenic expression of Helicobacter pylori CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse	<i>Proc Natl Acad Sci USA</i>	105	1003-1008	2008

Hiranoら	Proteomics- and transcriptomics-based screening of differentially expressed proteins and genes in brain of Wistar rat: A model for attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) research	<i>J Proteome Res</i>	7	2471-2489	2008
Shimizuら	Impaired Tax-specific T-cell responses with insufficient control of HTLV-1 in a subgroup of individuals at asymptomatic and smoldering stages	<i>Cancer Sci</i>	100	481-489	2009
Tsukasakiら	Definition, Prognostic Factors, Treatment and Response Criteria of Adult T-cell Leukemia-Lymphoma: A Proposal from an International Consensus Meeting	<i>J Clin Oncol</i>	27	453-459	2009

IV. 研究成果の刊行物・別刷り

Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I

Hideki Hasegawa^{1,2,8}, Hirofumi Sawa^{3,4,8}, Martha J Lewis^{2,5}, Yasuko Orba³, Noreen Sheehy², Yoshie Yamamoto⁶, Takeshi Ichinohe¹, Yasuko Tsunetsugu-Yokota⁷, Harutaka Katano¹, Hidehiro Takahashi¹, Junichiro Matsuda⁶, Tetsutaro Sata¹, Takeshi Kurata¹, Kazuo Nagashima³ & William W Hall²

Adult T-cell leukemia-lymphoma (ATLL) is a group of T-cell malignancies caused by infection with human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). Although the pathogenesis of ATLL remains incompletely understood, the viral regulatory protein Tax is centrally involved in cellular transformation. Here we describe the generation of HTLV-I Tax transgenic mice using the Lck proximal promoter to restrict transgene expression to developing thymocytes. After prolonged latency periods, transgenic mice developed diffuse large-cell lymphomas and leukemia with clinical, pathological and immunological features characteristic of acute ATLL. Transgenic mice were functionally immunocompromised and they developed opportunistic infections. Fulminant disease also developed rapidly in SCID mice after engraftment of lymphomatous cells from transgenic mice. Flow cytometry showed that the cells were CD4⁻ and CD8⁻, but CD44⁺, CD25⁺ and cytoplasmic CD3⁺. This phenotype is indicative of a thymus-derived pre-T-cell phenotype, and disease development was associated with the constitutive activation of NF- κ B. Our model accurately reproduces human disease and will provide a tool for analysis of the molecular events in transformation and for the development of new therapeutics.

HTLV-I infection is endemic in a number of well-defined geographical regions and it is estimated that as many as 20 million individuals are infected worldwide¹. Although the vast majority of infected individuals remain clinically asymptomatic, some 2–5% will develop ATLL, which is a group of mature T-cell malignancies with distinct clinical presentations². ATLL generally occurs in individuals infected around the time of birth and presents after prolonged latency periods ranging from 20 to 60 years. This is consistent with an age-dependent accumulation of leukemogenic events¹. Transformed cells in ATLL are generally CD4⁺ T lymphocytes², although other, less common

phenotypes have been observed. These include CD4⁻CD8⁻ (refs. 3–7), CD8⁺ (ref. 8) and CD4⁺CD8⁺ transformed cells^{9,10}, which suggests that infection and transformation of distinct cell populations during thymic development is important in the pathogenesis of ATLL.

The distinct clinical subtypes of ATLL include the two indolent forms, smoldering and chronic, and the extremely aggressive forms, acute and lymphomatous^{2,11}. Individuals with aggressive ATLL present with extensive lymphadenopathy, hepatosplenomegaly, visceral invasion and characteristic cutaneous infiltration by malignant cells. Acute ATLL is also characterized by an aggressive high-grade T-cell leukemia, with leukemic cells showing a characteristic morphology of abnormally enlarged and cleaved nuclei, which are termed 'flower cells'. In addition to being poorly responsive to treatment, individuals with ATLL are functionally immunocompromised and develop a range of opportunistic infections similar to those seen in individuals with AIDS, such as *Pneumocystis jirovecii* pneumonia^{2,11}.

Although the pathogenesis of ATLL remains incompletely understood, the viral regulatory protein Tax seems to have a central role^{1,12,13}. Tax, an extremely pleiotropic protein, has been shown to transform primary lymphocytes. This transformation is related to the ability of Tax to dysregulate the transcription of genes involved in cellular proliferation, cell-cycle control and apoptosis. Tax is a potent transcriptional transactivator not only of viral but also of cellular gene expression. The protein physically interacts with a number of cellular transcription factors, which include components of the NF- κ B–Rel signaling complex, and persistent and constitutive activation of NF- κ B is central to the development and maintenance of the malignant phenotype in ATLL^{12–14}. Activation of NF- κ B by Tax results in upregulation of the expression of a large number of cellular genes involved in cell proliferation, including a number of cytokines and their corresponding receptor genes^{1,12–15} and this is believed to contribute to the autonomous expansion of infected and transformed cell populations.

¹Department of Pathology, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashimurayama-shi, Tokyo 208-0011, Japan. ²Centre for Research in Infectious Diseases, School of Medicine & Medical Science, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland. ³Laboratory of Molecular & Cellular Pathology and ⁴Department of Molecular Pathobiology, Hokkaido University Research Center for Zoonosis Control and 21st Century COE Program for Zoonosis Control, N18 W9, Kita-ku, Sapporo, 060-8638, Japan. ⁵Division of Infectious Diseases, UCLA School of Medicine, 10833 Le Conte Avenue, CHS 37-121, Los Angeles, California 90095, USA. ⁶National Institute of Biomedical Innovation, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan. ⁷Department of Immunology, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan. ⁸These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to W.W.H. (william.hall@ucd.ie).

Received 11 August 2005; accepted 5 December 2005; published online 19 March 2006; doi:10.1038/nm1389

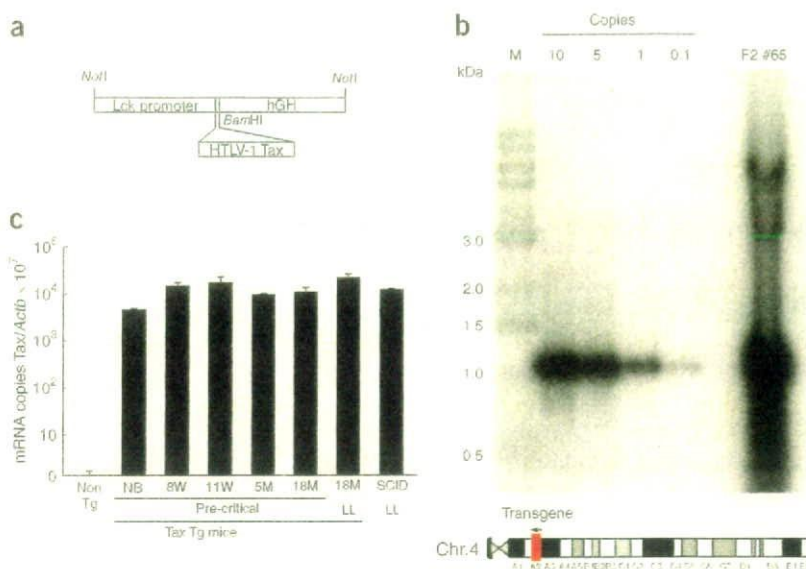


Figure 1 Construction of the Tax transgene and Tax mRNA expression in transgenic mice. (a) Schematic representation of the Tax transgene. HTLV-1 Tax cDNA was inserted in the *Bam*HI site of the p1017 vector at the 3' end of the *Lck* proximal promoter. (b) Estimation of integrated Tax copy number and mapping of the Tax integration site (transgenic mouse #65) by chromosomal walking analysis. Tax copy numbers were investigated by Southern blot analysis of *Bam*HI-digested genomic DNA from the transgenic mouse (#65) in parallel with a serially diluted plasmid containing HTLV-1 Tax cDNA. (c) Expression of Tax mRNA in Tax transgenic mice and SCID mice. RT-PCR was carried out on mRNAs extracted from spleens of newborn mice (NB), transgenic mice (Tg) at 8 weeks (8w), 11 weeks (11w), 5 months (5m), 18 months (18m), all without disease; 18 months with leukemia-lymphoma (18m LL) and in SCID mice with fulminant disease (SCID LL).

http://www.nature.com/naturemedicine

Attempts to directly show the oncogenic potential of Tax *in vivo* have been for the most part restricted to studies on expression of Tax in transgenic mouse models. These studies have resulted in a wide range of phenotypes, which have included the development of arthropathies, exocrinopathies, mesenchymal tumors, neurofibromas and large granular lymphocytic leukemia, a malignancy of natural killer cells^{16–21}. None of the models, however, has developed T-cell lymphoma or leukemia identical to ATLL. To address this discrepancy, we have generated transgenic mice with expression of Tax restricted to devel-

oping thymocytes, and we have shown that after prolonged latency periods these mice develop lymphoma and leukemia with the clinical, pathological and immunological features characteristic of human disease.

RESULTS

Lymphoma and leukemia in HTLV-1 Tax transgenic mice

We generated transgenic mice expressing Tax under the control of the *Lck* proximal promoter, which restricts expression to developing thymocytes^{22,23} because infection and transformation of cells during thymic development seems to be important in the pathogenesis of the disorder (Fig. 1a). We obtained three founder mice for each of the three lineages (#53, #14 and #17) and although each of the lineages was cross-bred with transgene-negative littermates, offspring were obtained from only one founder (#53; Table 1). PCR and Southern blot analysis of all founders and the progeny mice confirmed that all progeny carried the transgene. We studied transgene copy numbers and integration sites in selected mice. This number ranged from 10 to >20 copies, and genome walking analysis showed that the transgenes were tandemly inserted and integrated in the A2 region at position 14783143 of chromosome 4, which is a non-coding region (Fig. 1b).

Gross pathological examination of Tax founder mice #14 and #17 killed at 23 months, and of all selected offspring from founder #53 (*n* = 9) beginning at 10 months, showed the development of marked splenomegaly, hepatomegaly, lymphadenopathy and the presence of large mesenteric tumors (Fig. 2a,b and Table 1). Hepatosplenomegaly was characteristically a 5–20-fold increase in organ size (Fig. 2a–c). Lymphadenopathy

Table 1 Establishment of HTLV-1 Tax transgenic mice

Founder	F1	F2	Gender	Killed (month)	Involvement	Leukemia
#53	#50		M	12	Liver, spleen, bone marrow	+
		#52	M	17	Liver, spleen, kidney, lymph nodes, lung, skin, bone marrow, thymus	+
		#11	M	11	Early killing	-
		#12	F	14 (dead)	Liver, spleen, kidney, lymph nodes, lung, skin	ND
		#20	F	12 (dead)	Thymus*	ND
		#22	F	10	Liver, spleen, kidney, lymph nodes, lung, skin, eyelid, meninges, bone marrow	+
		#33	M	10	Early killing	-
		#36	F	18	Liver, spleen, lymph nodes, lung, bone marrow, thymus	-
		#44	F	19 (dead)	Liver, spleen, lymph nodes, lung	ND
		#52	F	17	Early killing	-
	#65	M	8	Early killing	-	
#14			M	23	Liver, spleen, kidney, lymph nodes, lung, skin	+
#17			F	23	Liver, spleen, kidney, lymph nodes, lung, skin	+

Offspring were generated from one of three founder mice (#53). Three mice (#11, #52, #65) were killed before the development of disease (early death). One mouse (#20) unexpectedly died. The remaining mice were killed at the time points indicated. Gross lymphomatous involvement was as noted and all tissues were subjected to histological examination. Peripheral blood smears were examined for leukemic cells using Giemsa staining. M, male; F, female; ND, not determined. *Thymus was exclusively examined; other organs were not examined.

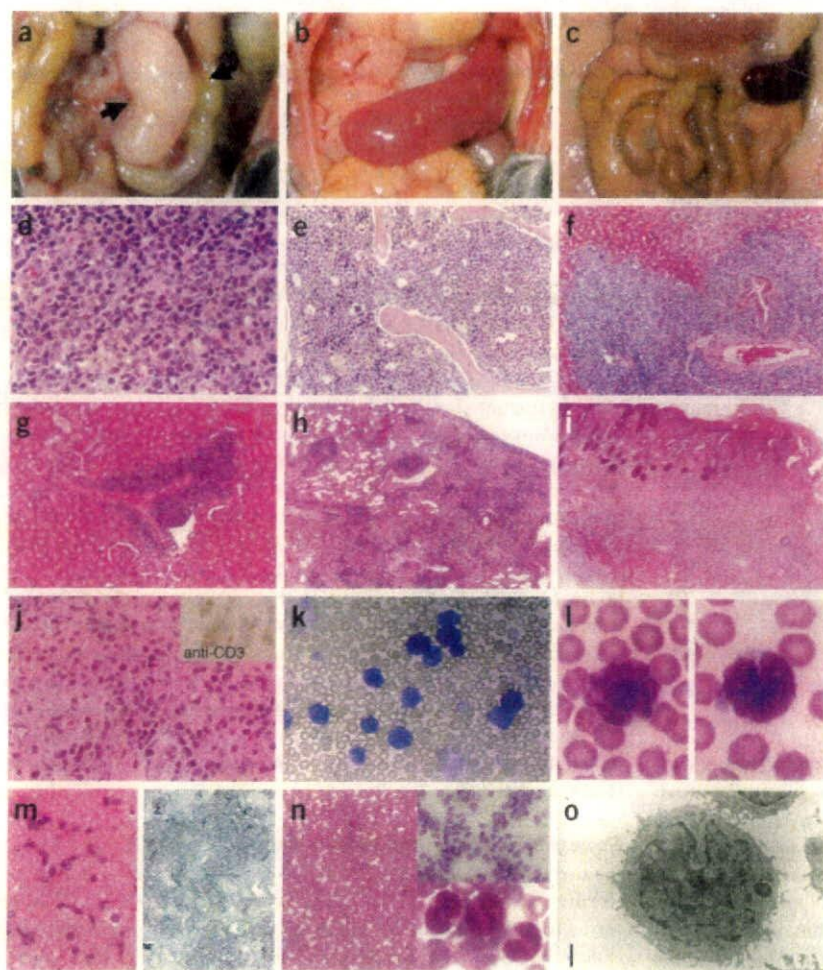


Figure 2 Pathological findings of T-cell lymphoma and leukemia in Tax transgenic mice. (a) Mesenteric tumor (black arrows) in the abdominal cavity of transgenic mouse #52. (b) Marked splenomegaly in transgenic mouse #22 with a greater than fivefold increase in size compared to an age-matched control littermate. (c) No tumors, lymphadenopathy or splenomegaly were evident in the control mice. Histological findings using H&E staining showed diffuse large-cell lymphoma in mesenteric lymph node (d), bone marrow with complete replacement of the marrow by lymphomatous cells (e), liver (f), kidney (g), lung (h) and lymphomatous infiltration of the skin with associated ulceration (i). (j) H&E staining and immunohistochemical staining with positive CD3-specific antibody staining (insert) of lymphomatous cells in the skin. (k,l) Peripheral blood smears from transgenic mouse #22. Leukemic cells with large and cleaved nuclei morphologically identical to flower cells found in human disease were present in peripheral blood smears of five mice. (m) H&E and Grocott staining of the lung showing opportunistic infection with *P. jiroveci*. (n) Peripheral blood smear with a large number of leukemia cells with segmented nuclei in a SCID mouse at 28 d after intraperitoneal injection of splenic lymphomatous cells from a transgenic mouse (lower magnification, left upper panel; higher magnification, left lower panel). Blood smear of a control age-matched SCID mouse is shown in the left panel. (o) Electron microscopic examination of leukemic cells from ascites fluid of SCID mice (original magnification, $\times 6,000$). Cells showed enlarged cerebriform nuclei with disrupted chromatin and scanty cytoplasm typical of human ATLL cells. Scale bar, 500 nm.

mpg was most often observed in the mesenteric, cervical and axillary lymph nodes but, in several cases, inguinal nodes were also involved. The mesenteric tumors ranged in size from 0.5 to 2.5 cm. All nine transgenic mice examined developed pathology beginning at 10 months of age, and findings were evenly distributed between males and females (Table 1). Histological examination showed diffuse, large-cell lymphomas involving spleen, lymph nodes, liver, thymus, bone marrow, kidney, lung, meninges and skin (Fig. 2 and Table 1). Specifically, perivascular infiltration of lymphomatous cells was readily observed in the liver, kidney and lungs (Fig. 2f–h) and in mice with liver involvement; it seems likely that the cells had spread from the mesentery to the liver through the portal vein (Fig. 2f). Four mice examined had bone marrow involvement (Fig. 2e) with complete replacement of the marrow by lymphomatous cells. We documented involvement of the meninges in one mouse, but there was no evidence of invasion of the central nervous system parenchyma. Five of seven mice had cutaneous involvement with gross ulceration of the skin, and histologically had prominent infiltration of leukemic cells into the dermis, which is characteristic of ATLL. Immunohistochemical staining indicated that these cells expressed CD3 but not B220, showing that they were T-cell lymphomas (Fig. 2j). Overall, the histopathological findings are identical to those observed in ATLL, and the cytological characteristics of the lymphomatous cells are consistent with an aggressive

malignancy and with the myriad of chromosomal abnormalities found in the disease¹³.

Giemsa staining of peripheral blood smears in five mice showed the presence of large and abnormal leukemic cells with cleaved nuclei, which were morphologically identical to the flower cells observed in ATLL (Fig. 2k,l).

We also examined age- and sex-matched transgene-negative littermates in parallel for each mouse. We did not detect lymphoma in any of the nontransgenic littermates; however, two littermates that died from unknown causes did not have any abnormal gross or microscopic pathology. Three mice were killed before the development of disease, but there was no evidence of leukemia or lymphoma (Table 1). In addition to the development of leukemia and lymphoma, we found that transgenic mice were clinically immunocompromised. Mice with disease, but not control mice housed under identical conditions, developed severe pulmonary infections with *P. jiroveci* (Fig. 2m), which is characteristic of human ATLL.

Transfer of leukemia and lymphoma to immunodeficient mice

To develop a more consistent and rapid model of disease development and to facilitate immunological analyses, we attempted to induce leukemia and lymphoma in mice with severe combined immunodeficiency (SCID) after intraperitoneal and intradermal injection of lymphomatous spleen cells from individual transgenic mice. After