

厚生労働科学研究費補助金
第3次対がん総合戦略研究事業

ATLの腫瘍化並びに急性転化、
病型変化に関連する遺伝子群の探索と
病態への関与の研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 加留部 謙之輔

平成24（2012）年5月

目 次

I. 総括研究報告

- ATL の腫瘍化並びに急性転化、病型変化に関連する遺伝子群の探索と
病態への関与の研究 1
研究代表者 加留部謙之輔

II. 分担研究報告

1. ATLL のゲノム異常解析、遺伝子発現解析、遺伝子機能解析..... 17
加留部謙之輔（愛知県がんセンター研究所・遺伝子医療研究部）
2. ATLL のゲノム異常解析 21
瀬戸加大（愛知県がんセンター研究所・遺伝子医療研究部）
3. ATL 研究のための新しい実験系の創出..... 27
都築忍（愛知県がんセンター研究所・遺伝子医療研究部）
4. 末梢性 T 細胞性リンパ腫濾胞型の臨床病理的研究..... 31
大島孝一（久留米大学医学部・血液病理学）
5. ATL の腫瘍化並びに急性転化、病型変化に関連する遺伝子群の
探索と病態への関与の研究 35
宇都宮與（慈愛会今村病院分院・血液内科）
6. ATL の腫瘍化並びに急性転化、病型変化に関連する遺伝子群の
探索と病態への関与の研究 39
今泉芳孝（長崎大学病院・血液内科）

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 45

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
総括研究報告書（平成23年度）

ATLの腫瘍化並びに急性転化、病型変化に関連する遺伝子群の探索と
病態への関与の研究

研究代表者 加留部 謙之輔
愛知県がんセンター研究所 遺伝子医療研究部・主任研究員

研究要旨: HTLV-1ウイルスを起因として発症する成人T細胞性白血病リンパ腫(ATL)は感染者の5%が発症する。これはウイルスに加え、ウイルス感染細胞にゲノム異常がさらに複数加わって腫瘍化することを示唆する。我々はATLの発症に関するこのようなゲノム異常をはじめとする分子機序を中心に研究を進めている。

ATLの遺伝子異常の解析については、アレイCGH解析法・遺伝子発現解析法を組み合わせた検討を行い、共通性の高い遺伝子異常を抽出した。これまでのATL研究においては、主に急性型およびリンパ腫型が検討されていたが、今回の研究では慢性型に注目し、そのゲノム異常を他の型と比較することでATLの病態の進展に重要な遺伝子異常を絞り込んだ。引き続き、これらの候補遺伝子について機能的影響を検討する予定であるが、そのための遺伝子発現誘導ATL細胞株の作成、および初代培養T細胞に遺伝子を導入する方法を確立した。また、末梢血検体とリンパ節検体が同時期に得られた急性型ATL13症例を用いてアレイ解析したところ、同一個体で末梢血腫瘍細胞とリンパ節腫瘍細胞間でゲノム異常様式が異なる症例があることを見出した。その割合は13症例中9症例(70%)と高率であることが判明した。解析の結果、急性型ATL患者リンパ節には由来の共通する複数の腫瘍細胞クローンが存在することが判明し、その複数クローンの内の一部が末梢血へと流れ出ていることが明らかとなった。また、リンパ腫型ATLとよく似た病態を示した末梢性T細胞リンパ腫分類不能型(PTCL-U)のゲノム異常陽性型についても検討を進めたところ、ATLと同様に同一個体内に複数のクローンが存在することが明らかとなった。発がんの過程においては、geneticな異常のほかにDNAメチル化やクロマチン修飾などによる塩基配列の変化を伴わないepigeneticな異常がある。Epigeneticな遺伝子発現制御に関与するpolycomb group protein (PcG) の1種であるEnhancer of zeste homolog 2 (EZH2) に注目し、そのATLにおける発現を検討した。またEZH2を抑制するHMT阻害剤3-deazaneplanocin A (DZNep) およびHDAC阻害剤LBH589のATLに対するepigenetic therapyとしての有効性

について検討した。

臨床的には、indolent ATL からの急性転化、病型変化についての遺伝子変化やメカニズムについて明らかにするために、ATL 診療についての実態調査を行った。2011 年 4 月から 12 月までの間で血液外来を受診した ATL 患者は 41 名、HTLV-1 キャリア 29 名であった。ATL の初診例は 14 名で、男性 7 名、女性 7 名、年齢中央 70.5 歳 (57~84 歳に分布) であった。臨床病型は、急性型 9 名、リンパ腫型 1 名、慢性型 1 名、くすぶり型 3 名であった。41 名中 2 名が慢性型から急性転化し、1 名が自然寛解した。急性転化や病型変化に関する遺伝子群の解析のために indolent ATL 患者を主体とした研究参加への体制作りを構築する予定である。

また、ATL と同種の T 細胞性リンパ腫である、末梢性 T 細胞性リンパ腫濾胞型 (Peripheral T-cell lymphoma NOS follicular variant: f-PTCL) と血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫 (AITL) における病理学的解析をおこなった。これらはいずれも follicular helper T-cell (Tfh) 由来であるとされている。今回 f-PTCL を AITL と比較し病理組織所見の検討を行ったところ、f-PTCL の大部分に AITL に特徴的な病理形態の一部がみられ、臨床所見では、f-PTCL と診断された症例でも AITL に特徴的な臨床所見 (高 γ グロブリン血症や Coombs test 陽性など) を有するものがあることより、また生存曲線による検討の結果、f-PTCL と AITL の連続性を示唆する結果が得られた。

研究分担者	所属施設名	職名
瀬戸加大	愛知県がんセンター研究所	副所長 兼 部長
都築 忍	愛知県がんセンター研究所	室長
大島孝一	久留米大学医学部	教授
宇都宮與	慈愛会今村病院分院	院長
今泉芳孝	長崎大学病院	助教

る。しかし、機能的側面の検討や遺伝子変異検索までの詳細な検討がなされた遺伝子は現在までほとんどない。今回の研究では、慢性型 ATL と急性型あるいはリンパ腫型 ATL のゲノム異常を比較し、発現解析、エピゲノム解析および機能解析も組み合わせることで、ATL の病態により重要な働きをしている遺伝子異常を同定することを目的とする。

A. 研究目的

a) ATL の分子病態解析

1) 遺伝子異常解析:

ATL においては、いくつかの遺伝子がゲノム異常や発現異常を示しており、がん関連遺伝子の候補として報告されてい

2) 末梢血検体とリンパ節検体の比較:
ATL の腫瘍細胞がどの臓器で増殖しているのか、明らかではなかった。代表的な浸潤臓器である末梢血およびリンパ節の検体について、ゲノム異常を比較す

ることで、各腫瘍クローンの発生、分化を検討する。

3) マウス T 細胞への遺伝子導入 :

ATL のゲノム異常を同定した後は、各候補遺伝子の機能的検討が望まれる。そのためには、T 細胞に簡便で高効率に遺伝子導入する方法が必要だが、従来法は必ずしも満足するものではなかった。そこで、初代培養細胞を用いて ATL 研究のための新しい実験系を創出することを目的とする。

4) エピゲノム異常と ATL :

Epigenetic な遺伝子発現制御に関与する polycomb group protein (PcG) の 1 種である Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) に注目した。その ATL における発現や阻害剤に対する ATL 細胞の反応をを検討することで ATL 発症におけるエピゲノムの役割、および epigenetic therapy の有効性について検討することを目的とする。

b) 慢性型 ATL と急性型 ATL の臨床的比較
HTLV-1 は主に母乳で児に感染し、50-60 年の潜伏期間の後、HTLV-1 キャリアの 2-5% が ATL を発症する。しかしながら、HTLV-1 の感染後、長期の潜伏期間を経て、一部の HTLV-1 キャリアから ATL がなぜ発症するのか、どのような遺伝子が増加するのか、くすぶり型や慢性型 ATL から急性転化の発症様式や遺伝子変化については明らかではない。ATL の腫瘍化並びに急性転化、病型変化に関連する遺伝子群の探索と病態への関与を検討することを目的とした。

c) T 細胞性リンパ腫の病理学的解析

ATL と性質が近い T 細胞性リンパ腫の検

討を行い、ATL との異同について検討する。末梢性 T 細胞性リンパ腫濾胞型 (Peripheral T-cell lymphoma NOS follicular variant: f-PTCL)、血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫 (AITL) いずれも follicular helper T-cell (Tfh) 由来であるとされている。今回この点を踏まえ、f-PTCL と AITL の臨床病理学的検討を行った。

B. 研究方法

a) ATL の分子病態解析

1) 遺伝子異常解析

急性型 ATL、リンパ腫型 ATL および慢性型 ATL の検体から DNA を抽出し、アレイ CGH を用いてゲノム異常を解析する。またこれらの検体について、発現解析を行わないゲノム異常の結果と比較し、ゲノム異常のみならず発現レベルにおいても異常のある標的遺伝子を抽出する。抽出された標的遺伝子について、細胞株への導入あるいは、後述するマウス T 細胞への導入によって機能的側面を検討する。

2) 末梢血検体とリンパ節検体の比較

同一患者で末梢血とリンパ節検体が得られる症例を対象にゲノム異常様式を調べる。同意の得られた急性型 ATL 患者 13 症例のリンパ節組織と末梢血を対象に検討した。末梢血検体から CD4 陽性細胞選択用マイクロビーズを用いて、CD4 陽性分画を選択し、DNA を精製した。リンパ節検体はそのまま DNA を精製し、アレイ CGH を施行した。

3) マウス T 細胞への遺伝子導入

マウス胎児より未分化造血細胞を分離し、デルタリガンドを発現させた OP9 ストローマ細胞上で培養することによ

り、T細胞を誘導する。その際にレトロウイルスを感染させることにより任意の遺伝子をT細胞に導入する。遺伝子導入T細胞は GFP などをマーカーとして共発現させてあり、マウスに移植することにより生体内での細胞動態を追跡し解析した。

4) エピゲノム異常と ATL

ATL 患者、HTLV-1 キャリア、および健康人由来の単核細胞および ATL 細胞株・HTLV-1 非感染 T 細胞株を用いて、各種 PcG 遺伝子の mRNA 発現を Real-time RT-qPCR により測定し、ウェスタンブロット (WB) により EZH2 蛋白発現および H3K27 メチル化状態を評価した。EZH2 発現制御を検討するため、マイクロ RNA (miRNA) の発現を Real-time RT-qPCR で測定した。さらに、DZNep と LBH589 の単剤および併用による ATL 細胞株に対する抗腫瘍効果を確認し治療標的としての可能性を検討した。

b) 慢性型ATLと急性型ATLの臨床的比較

ATL患者の背景 (年齢、性別、臨床病型などの背景因子) について検討した。急性転化や病型変化の有無についても検討した。臨床所見; 性別, 年齢, B症状, 節外病変, 肝脾腫, 皮疹, LDH高値, 高 γ -globulin血症, Ann Arbor stage 分類, International prognostic index (IPI), 初期治療, 治療効果, 予後の検討を行った。

c) T細胞性リンパ腫の病理学的解析

形態的検索に加え、免疫染色として、CD4, CD20, CD21 and/or FDC, CD10, bcl-6, PD-1, CXCL13 を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、愛知県がんセンターヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の倫理委員会の承認を得ている。また遺伝子組換え実験に関しては愛知県がんセンター遺伝子組換え実験等安全委員会の承認を、動物実験においては動物委員会の審査・承認を得て行った。

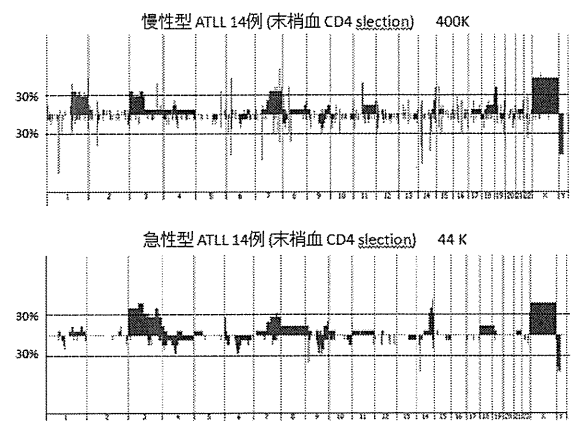
B. 研究結果

a) 分子病態解析

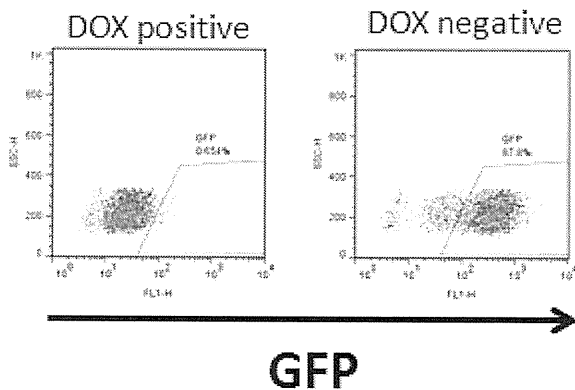
1) 遺伝子異常解析

急性型および慢性型 ATL について、いくつかの症例でアレイ CGH 解析が完了している。下図に結果を示す。赤色はゲノム増幅、緑色はゲノム欠失の頻度を示す。急性型と慢性型はゲノム異常様式が類似しているものの、4番および6番染色体の欠失など、急性型に特徴的な異常も見出された。

慢性型ATLLと急性型ATLLのゲノム異常



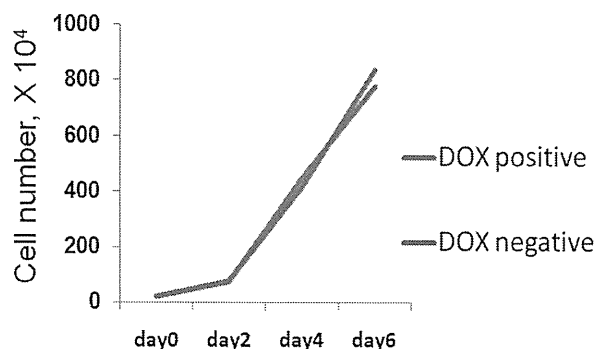
続いて、遺伝子導入による機能的影響を調べるために、ATL の細胞株において tetracycline による遺伝子発現誘導株を作成した。コントロールとして GFP を導入したところ、下図に示すように 90%近い細胞において遺伝子発現を誘導でき、また GFP の強制発現は細胞増殖に影響を



及ばさないことも確認できた。

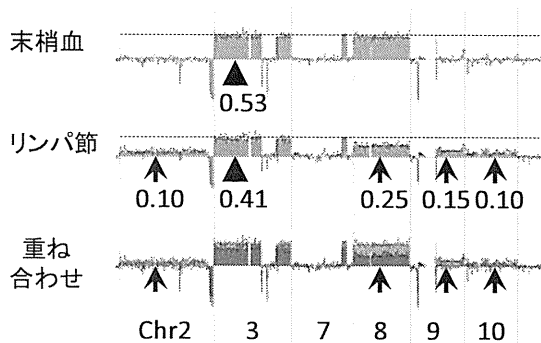
2) 末梢血検体とリンパ節検体の比較

末梢血腫瘍細胞とリンパ節腫瘍細胞のゲノム異常様式は、一部共通するものの、リンパ節内の腫瘍細胞のゲノム異常様



式はより多様性が認められた(図1)。また、その頻度は、13 症例中 9 例に認められた。

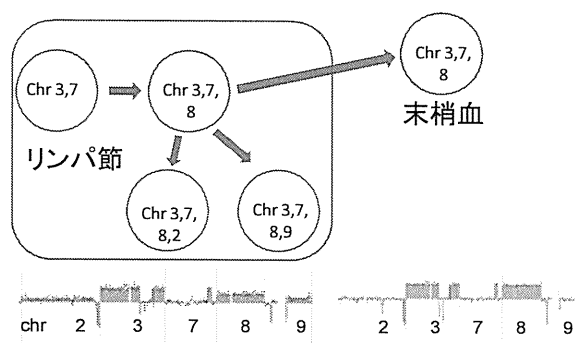
図1 Log2 ratio imbalance (検体 1)



リンパ節内では複数のクローンが存在することが示唆されたが、HTLV-1 ウイルス挿入サイト並びに T 細胞受容体を

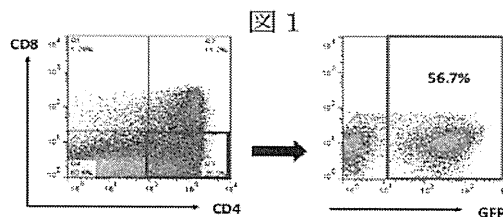
用いたサザンブロット解析により単クローン性であることが明らかとなった。すなわち、リンパ節内でのゲノム異常の多様性は、共通のクローンから由来し、ゲノム異常を蓄積しながらクローンが進化していることが示唆された。また、リンパ節内の複数のクローンの一部が末梢血中に流出していることが明らかとなった(図2)。

図2 アレイCGH解析による急性型ATLLの発展モデル



3) マウス T 細胞への遺伝子導入

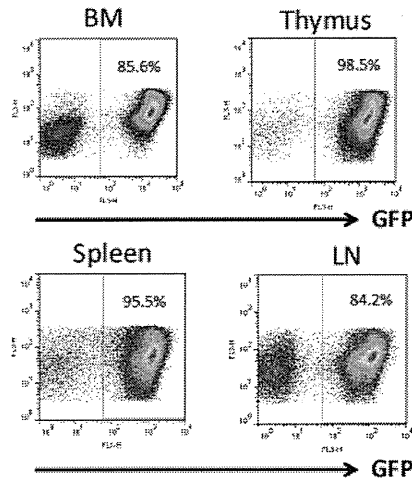
マウス初代造血細胞から高効率で T 細胞を誘導することが可能であった。また、GFP を発現するウイルスを感染させたところ、50%超という高効率で遺伝子導入できることが判明し、ATL の正常対応細胞である CD4 陽性 CD8 陰性細胞にも遺伝子導入可能であった(図1)。



GFP マーカー遺伝子を導入した T 細胞をマウスに移植すると、胸腺・骨髄・脾臓・リンパ節に GFP 陽性 T 細胞が検出できた(図2)。このことから、任意の遺伝子を T 胞に導入した後、生体内での動態を追跡することにより、遺伝

子の病態への関与を解析することが可能であることが示唆された。

図 2



4) エピゲノム異常と ATL

Real-time RT-qPCR では、マイクロアレイの結果と同様、EZH2 mRNA の発現量は患者 ATL 細胞で有意に高い発現を示した。WB および免疫組織染色でも ATL 症例において EZH2 蛋白の高発現を認めた。EZH2 の過剰発現に伴い患者 ATL 細胞では H3K27 のトリメチル化が観察された。ATL 患者細胞では、EZH2 の発現を抑制する miRNA として報告されている miR-101 の発現が抑制されており、EZH2 発現量と負の相関性が認められた。HMT 阻害剤 DZNep は ATL 株細胞に対し濃度依存的に抗腫瘍効果を示す一方、健常人由来の CD4 陽性 T 細胞に対しての影響は認めなかった。LBH589 は EZH2 の発現を抑制し、ATL 細胞株 KOB および LM-Y1 で検討した結果、DZNep との併用で相乗的効果を認めた。

慢性型 ATL および急性転化の病態解明のために慢性型の症例について、経時的に臨床情報を収集するとともに検体を集積中である。

b) 慢性型 ATL と急性型 ATL の臨床的比較

研究期間中に検査または治療を受けた ATL 患者は 41 名、無症候性 HTLV-1 キャリア 29 名であった。ATL の初診例は 14 名で、男性 7 名、女性 7 名、年齢中央 70.5 歳 (57~84 歳に分布) であった。臨床病型は、急性型 9 名、リンパ腫型 1 名、慢性型 1 名、くすぶり型 3 名であった。

研究期間中に慢性型から初診の 1 名と経過観察中の 1 名の 2 名が急性転化をした。初診例と経過観察中の indolent ATL の 15 名 (慢性型 3 名、くすぶり型 12 名) を未治療のまま経過観察している。そのうち慢性型の 1 名は自然寛解が得られ、長期間 HTLV-1 キャリアの状態になっている (白血球数 36400→4600/cm、末梢血中 HTLV-1 プロウイルス量 49.0 コピー→0.1 コピー/100 末梢血単核細胞)。今回の研究期間中にくすぶり型 ATL からの急性転化や HTLV-1 キャリアからの ATL 進展例はみられなかった。当該期間中の無症候性 HTLV-1 キャリア外来に受診したのは 29 名でそのうち末梢血中の HTLV-1 プロウイルス量の結果が判明している例は 24 名であった。HTLV-1 プロウイルス量は中央値 1.77 コピー/100 末梢血単核細胞 (0.06~14.87 コピーに分布) で、7 名に 2 親等以内の ATL の家族歴がみられた。

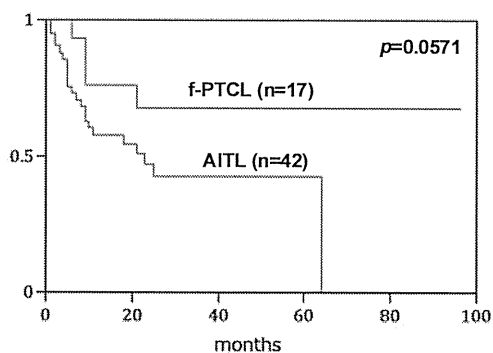
c) T 細胞性リンパ腫の病理学的解析

f-PTCL に関して、臨床的には、比較的高齢者 (55-80 才) に多く病期も III、IV のものが多く、AITL に特徴的な臨床所見 (高 γ グロブリン血症や Coombs test 陽性など) を有するものがあつた。

	FDC	Polymorphic infiltrate	Vascular proliferation	B- immunoblast	Clear cell	EBV	Tumor cell size	FL or PTGC	Diffuse proliferation
Bcl-6	NS (n=3156)	0.02	0.0494	0.0439	0.0085	0.0129	0.0432	0.0065	NS (n=9740)
CD19	0.0263	NS (n=2453)	NS (n=5033)	NS (n=4016)	NS (n=660)	NS (n=4150)	0.0340	0.0477	0.0103
FL or PTGC	0.0331	NS (n=2453)	0.0140	NS (n=2719)	NS (n=3340)	NS (n=4940)	NS (n=4117)	-	0.0129
FDC	-	NS (n=4950)	NS (n=4169)	NS (n=2183)	0.0219	NS (n=1599)	NS (n=3561)	0.0331	< 0.0001

	Bcl-6	CD19	FL or PTGC	FDC	Ann Arbor stage	IP	High platelet count	LDH	Neutrophils
Bcl-6	NS (n=4557)	NS (n=7113)	0.0036	0.0112	NS (n=1106)	NS (n=2264)	NS (n=1632)	NS (n=1709)	NS (n=1377)
CD19	NS (n=6490)	NS (n=2366)	0.0167	0.0022	NS (n=2404)	NS (n=3372)	0.0227	NS (n=1373)	NS (n=4714)
FL or PTGC	NS (n=1960)	NS (n=1225)	0.0129	0.0041	0.0361	0.011	NS (n=640)	NS (n=734)	NS (n=1000)
FDC	NS (n=6716)	NS (n=2417)	NS (n=3922)	0.021	NS (n=4345)	NS (n=2752)	0.0392	NS (n=6436)	NS (n=8549)

NS is significant association.



生存曲線による検討の結果、f-PTCL と AITL には有意な差は認めなかった。

f-PTCL においては、腫瘍細胞における免疫組織化学的な Bcl-6 の陽性率と AITL に特徴的な所見に関連がみられた。

D. 考察

a) ATL の分子病態解析

1) 遺伝子異常解析

ATL の網羅的なゲノム解析を行い、慢性型 ATL の遺伝子異常の特徴を把握しつつある。特に急性型 ATL、およびリンパ腫型 ATL との比較により、病勢の進行に重要な役割を果たす遺伝子を抽出することができると考えられる。今後は症例を追加して解析するとともに、発現解析の結果も含めてより少数の候補遺伝子に絞り込む予定である。

候補遺伝子を抽出したのちは、遺伝子導入による機能的解析を行うが、今回の実

験により、高率に遺伝子発現を誘導できる株を作成に成功した。ATL の細胞株において tetracycline による遺伝子発現誘導の系を作成したのは今回の実験が初めてと思われる。GFP を発現させても、細胞増殖には影響を及ぼさないこともわかったので、今後 GFP をコントロール遺伝子として使用できることもわかった。

今後さらに複数の ATL の細胞株において同様の系を作成し、候補遺伝子の導入に備える予定である。

2) 末梢血検体とリンパ節検体の比較

今回の解析で、急性型 ATL 患者の 70% に複数のクローンが存在することが明らかとなった。サザン解析の結果、それらは、共通のクローンに由来することが判明したので、急性型 ATL 患者には複数のサブクローンが存在することが明らかとなった。また、末梢血中の腫瘍細胞は、それらの複数のクローンの進化の途中の段階にあるものが出ていることが推測された。以上のことから、ATL 腫瘍細胞はリンパ節内で増殖することが示唆された。また、末梢血中に流出する腫瘍細胞は、リンパ節内に存在するクローンと完全に同一なのか、あるいは何らかの特殊なゲノム異常を獲得した結果流出するようになったのか、今後、解明していく必要がある。

今回の解析で明らかになったリンパ節内の複数のクローンの増殖は ATL の治療戦略を考える上で大変重要なことを意味する。すなわち、次々とゲノム異常を獲得してクローンが進化していく病態は、いろいろな治療法を潜り抜けることの分子基盤となっている可能性がある。また、予備的実験で病態のよく似ている

ゲノム異常陽性PTCL-Uも複数のクローンが存在していることが示唆されているので、今疾患グループはHTLV-1感染がないだけで、ATLと同様の疾患群と考えられることが明らかとなった。

3) マウス T 細胞への遺伝子導入

本研究により、初代培養 T 細胞に再現性よく高効率に遺伝子導入できるシステムを確立できた。ATL の正常対応細胞である CD4 陽性 CD8 陰性細胞にも遺伝子導入可能であり、さらに導入遺伝子と同時に GFP をマーカーとして発現させているためマウスに移植することで生体内でも遺伝子機能を解析することが可能である。現在、GFP 以外でも Kusabira オレンジやヒト CD8 などのマーカーも使用できるように改良しており、T 細胞に複数の遺伝子を同時に導入して、その協調作用を解析することも可能である。今後は、(1) まず、強力な発癌性のある遺伝子を T 細胞に導入し、その細胞が生体内で確かに腫瘍化することを確認し、本分担研究が T 細胞性腫瘍の研究に利用できる点を確立し、(2) 次に HTLV1 ウイルスの主要ながん遺伝子である Tax や HBZ を T 細胞に導入し、さらにゲノム解析などで見出した付加的遺伝子異常を同細胞に再現することで ATL の成立・進展機構を解析していくことが重要であると考えられる。

4) エピゲノム異常と ATL

本研究では、ATL における EZH2 の過剰発現を証明した。EZH2 に対する抑制作用が報告されている DZNep と LBH589 は ATL 細胞株に対し抗腫瘍活性を示した。慢性型の一部では EZH2 高発現を認め予後不良因子であることから、この病型の層別化因子、治療標的分子として今後の

解析が重要である。さらに ATL のゲノム異常を対象とした研究代表者らの解析結果により、慢性型 ATL の病態解明を目指している。

b) 慢性型 ATL と急性型 ATL の臨床的比較

HTLV-1 キャリアから ATL 発症のリスク因子として (1) 年齢 40 歳以上、(2) 高 HTLV-1 プロウイルス量 (4 コピー以上/100 末梢血単核細胞)、(3) 2 親等以内の ATL 家族歴の存在、(4) 何らかの症状を有する HTLV-1 キャリアの 4 つが報告されている。これらのリスク因子を複数有するキャリアもある程度みられたが、ATL 発症は今回の期間中にはみられなかった。

ATL の初診例は 14 名中 7 名が急性型であり、臨床病型としては急性型が多く、indolent ATL の割合は少なかった。しかし、くすぶり型 ATL や慢性型 ATL では未治療のまま経過観察できることが多い。急性型、急性転化型、慢性型、くすぶり型、HTLV-1 キャリアなどの患者の遺伝子変化を詳細に検索することと indolent ATL を粘り強くフォローアップし、検査を続けることは ATL の腫瘍化、急性転化、病型変化に関与する遺伝子群の同定につながる可能性が高いと考えられる。

c) T 細胞性リンパ腫の病理学的解析

末梢性 T 細胞性リンパ腫濾胞型 (Peripheral T-cell lymphoma NOS follicular variant: f-PTCL)、血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫 (AITL) いずれも follicular helper T-cell (Tfh) 由来であるとされている。今回 f-PTCL を AITL と比較し病理組織所見の検討を行

ったところ、f-PTCLの大部分にAITLに特徴的な病理形態の一部がみられ、臨床所見では、f-PTCLと診断された症例でもAITLに特徴的な臨床所見(高 γ グロブリン血症やCoombs test陽性など)を有するものがあることより、また生存曲線による検討の結果、f-PTCLとAITLの連続性を示唆する結果が得られた。

また、f-PTCLにおいては、腫瘍細胞における免疫組織化学的なBcl-6の陽性率とAITLに特徴的な所見に関連がみられたことより、Bcl6の発現が、AITLの特徴とされる①リンパ節の構造は破壊され、HEVの著明な樹枝状増生を伴う異型リンパ球のびまん性増殖が認められる。これにBリンパ球やB免疫芽球、形質細胞、好酸球、組織球、類上皮細胞などが種々の程度に混在し多彩な細胞構成を示す。②FDCの不規則な増殖を伴う。③腫瘍細胞では淡明細胞(clear cell)の出現がみられる。といった病理像の形成に関与しているもの推察された。

E. 結論

1. 慢性型ATLおよび急性型ATLのゲノム異常は類似点も多くある一方で、急性型にしか認められない異常もあり、急性転化への重要なトリガーになっている可能性がある。
2. 遺伝子発現誘導株を、ATL細胞株において作成することに成功した。
3. 3.70%の急性型ATL症例で、患者の末梢血腫瘍細胞とリンパ節では、ゲノム異常様式が異なる。
4. リンパ節内には複数のクローンが存在するが、それらは共通のクローンから進化したものである。

5. 末梢血ATL腫瘍細胞はクローン進化の途中のクローンが末梢血中に流出したものである。
6. 初代培養未分化造血細胞からT細胞を効率よく誘導できた。
7. 誘導したT細胞には、レトロウイルスをベクターとして用いることで、高効率に遺伝子を導入することが可能であった。
8. ATLの正常対応細胞であるCD4陽性CD8陰性細胞にも遺伝子導入可能であった。
9. 遺伝子導入した細胞をマウスに移植することにより、生体内での動態を追跡し解析することが可能であった。
10. ATL関連遺伝子をT細胞に導入することによってATLの成立・進展機構を明らかにし、治療戦略の開発に役立てたい。
11. EZH2は正常T細胞には発現せず、患者ATL細胞に比較的特異的に過剰発現しているために、診断および治療標的分子の候補と考えられる。
12. Indolent ATLの急性転化に関与する遺伝子変化を突き止めるために多くの患者の研究参加できる体制を整える必要がある。
13. 末梢性T細胞性リンパ腫濾胞型(Peripheral T-cell lymphoma NOS follicular variant: f-PTCL)、血管免疫芽球性T細胞リンパ腫(AITL)はWHO分類では、別の組織型として取り扱われているが、f-PTCLとAITLの連続性を示唆する結果が得られたことより、同一のものとして取り扱われるべきものと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Karube K, Nakagawa M, Tsuzuki S, Takeuchi I, Honma K, Nakashima Y, Shimizu N, Ko YH, Morishima Y, Ohshima K, Nakamura S, Seto M.: Identification of FOXO3 and PRDM1 as tumor suppressor gene candidates in NK cell neoplasms by genomic and functional analyses. *Blood*, 118: 3195-3204, 2011.
2. Sung CO, Kim SC, Karnan S, Karube K, Shin HJ, Nam DH, Suh YL, Kim SH, Kim JY, Kim SJ, Kim WS, Seto M, Ko YH.: Genomic profiling combined with gene expression profiling in primary central nervous system lymphoma. *Blood*, 117: 1291-1300, 2011.
3. Kato H, Kagami Y, Kodaira T, Oka S, Oki Y, Chihara D, Taji H, Yatabe Y, Nakamura T, Nakamura S, Seto M, Yamamoto K, Morishima Y.: Nodal Relapse After Helicobacter pylori Eradication in a Patient With Primary Localized Gastric Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma. *Am J Gastroenterol*, 106: 549-551, 2011.
4. Umino A, Nakagawa M, Utsunomiya A, Tsukasaki K, Taira N, Katayama N, Seto M.: Clonal evolution of adult T-cell leukemia/lymphoma takes place in lymph node. *Blood*, 117: 5473-5778, 2011.
5. Nakada C, Tsukamoto Y, Matsuura K, Nguyen TL, Hijiya N, Uchida T, Sato F, Mimata H, Seto M, Moriyama M.: Overexpression of miR-210, a downstream target of HIF1 α , causes centrosome amplification in renal carcinoma cells. *J Pathol*, 224: 280-288, 2011.
6. Tsuzuki S, Taguchi O, Seto M.: Promotion and maintenance of leukemia by ERG. *Blood*, 117: 3858-3868, 2011.
7. Iqbal J, Weisenburger DD, Chowdhury A, Tsai MY, Srivastava G, Greiner TC, Kucuk C, Deffenbacher K, Vose J, Smith L, Au WY, Nakamura S, Seto M, Delabie J, Berger F, Loong F, Ko YH, Sng I, Liu X, Loughran TP, Armitage J, Chan WC.: International Peripheral T-cell Lymphoma Project. Natural killer cell lymphoma shares strikingly similar molecular features with a group of non-hepatosplenic $\gamma\delta$ T-cell lymphoma and is highly sensitive to a novel aurora kinase A inhibitor in vitro. *Leukemia*, 25: 348-358, 2011.
8. Kuroda A, Tsukamoto Y, Nguyen LT, Noguchi T, Takeuchi I, Uchida M, Uchida T, Hijiya N, Nakada C, Okimoto T, Kodama M, Murakami K, Matsuura K, Seto M, Ito H, Fujioka T, Moriyama M.: Genomic profiling of submucosal-invasive gastric cancer by array-based comparative genomic hybridization. *PLoS One*,

- 6: e22313, 2011.
9. Nakagawa M, Tsuzuki S, Honma K, Taguchi O, Seto M.: Synergistic effect of Bcl2, Myc and Ccnd1 transforms mouse primary B-cells into malignant cells. *Haematologica*, 96: 1318-1326, 2011.
 10. Kumar V, Matsuo K, Takahashi A, Hosono N, Tsunoda T, Kamatani N, Kong SY, Nakagawa H, Cui R, Tanikawa C, Seto M, Morishima Y, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K.: Common variants on 14q32 and 13q12 are associated with DLBCL susceptibility. *J Hum Genet*, 56: 436-439, 2011.
 11. Kurahashi S, Hayakawa F, Miyata Y, Yasuda T, Minami Y, Tsuzuki S, Abe A, Naoe T.: PAX5-PML acts as a dual dominant-negative form of both PAX5 and PML. *Oncogene*, 30: 1822-1830, 2011.
 12. Sakurai N, Maeda M, Lee SU, Ishikawa Y, Li M, Williams JC, Wang L, Su L, Suzuki M, Saito TI, Chiba S, Casola S, Yagita H, Teruya-Feldstein J, Tsuzuki S, Bhatia R, Maeda T.: The LRF transcription factor regulates mature B cell development and the germinal center response in mice. *J Clin Invest*, 121: 2583-2598, 2011.
 13. Ando K, Miyazaki Y, Sawayama Y, Tominaga S, Matsuo E, Yamasaki R, Inoue Y, Iwanaga M, Imanishi D, Tsushima H, Fukushima T, Imaizumi Y, Taguchi J, Yoshida S, Hata T, Tomonaga M.: High expression of 67-kDa laminin receptor relates to the proliferation of leukemia cells and increases expression of GM-CSF receptor. *Exp Hematol*, 39: 179-186, 2011.
 14. Sasaki D, Imaizumi Y, Hasegawa H, Osaka A, Tsukasaki K, Choi YL, Mano H, Marquez VE, Hayashi T, Yanagihara K, Moriwaki Y, Miyazaki Y, Kamihira S, Yamada Y.: Overexpression of enhancer of zeste homolog 2 with trimethylation of lysine 27 on histone H3 in adult T-cell leukemia/lymphoma as a target for epigenetic therapy. *Haematologica*, 96: 712-719, 2011.
 15. Hasegawa H, Komoda M, Yamada Y, Yonezawa S, Tsutsumida H, Nagai K, Atogami S, Tsuruda K, Osaka A, Sasaki D, Yanagihara K, Imaizumi Y, Tsukasaki K, Miyazaki Y, Kamihira S.: Aberrant overexpression of membrane-associated mucin contributes to tumor progression in adult T-cell leukemia/lymphoma cells. *Leuk Lymphoma*, 52: 1108-1117, 2011.
 16. Tominaga-Sato S, Tsushima H, Ando K, Itonaga H, Imaizumi Y, Imanishi D, Iwanaga M, Taguchi J, Fukushima T, Yoshida S, Hata T, Moriuchi Y, Kuriyama K, Mano H, Tomonaga M, Miyazaki Y: Expression of myeloperoxidase and gene mutations in AML patients with normal karyotype: double CEBPA mutations

- are associated with high percentage of MPO positivity in leukemic blasts. *Int J Hematol.* 94: 81-89, 2011.
17. Norimura D, Isomoto H, Imaizumi Y, Akazawa Y, Matsushima K, Inoue N, Yamaguchi N, Ohnita K, Shikuwa S, Arima T, Hayashi T, Takeshima F, Miyazaki Y, Nakao K.: Case series of duodenal follicular lymphoma, observed by magnified endoscopy with narrow-band imaging. *Gastrointest Endosc.* 74: 428-434. 2011.
 18. Fukushima T, Taguchi J, Moriuchi Y, Yoshida S, Itonaga H, Ando K, Sawayama Y, Imaizumi Y, Imanishi D, Hata T, Miyazaki Y.: Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for ATL with central nervous system involvement: The Nagasaki Transplant Group experience. *Int J Hematol.* 94 : 390-394, 2011.
 19. Kannagi M, Hasegawa A, Kinpara S, Shimizu Y, Takamori A, Utsunomiya A.: Double control systems for human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) by innate and acquired immunity. *Cancer Sci*, 102: 670-676, 2011.
 20. Oka T, Satou H, Ouchida M, Utsunomiya A, Yoshino T.: Cumulative epigenetic abnormalities in host genes with viral and microbial infection during initiation and progression of malignant lymphoma/leukemia. *Cancers*, 3: 568-581, 2011
 21. Uota S, Dewan MZ, Saitoh Y, Muto S, Itai A, Utsunomiya A, Watanabe T, Yamamoto N, Yamaoka S.: An I κ B kinase 2 inhibitor IMD-0354 suppresses the survival of adult T-cell leukemia cells. *Cancer Sci*, 103: 100-106, 2011.
 22. Oka T, Sato H, Ouchida M, Utsunomiya A, Ennishi D, Tanimoto M, Yoshino T.: Accumulation of specific epigenetic abnormalities during development and progression of T cell leukemia/lymphoma. *T-CELL LEUKEMIA*, ed by Babusikova O, Dovat S and Payne KJ. INTECH, pp131-168, October 2011,
 23. Satou Y, Yasunaga J, Zhao T, Yoshida M, Miyazato P, Takai K, Shimizu K, Ohshima K, Green PL, Ohkura N, Yamaguchi T, Ono M, Sakaguchi S, Matsuoka M.: HTLV-1 bZIP factor induces T-cell lymphoma and systemic inflammation in vivo. *PLoS Pathog*, 7: e1001274, 2011.
 24. Hagiya K, Yasunaga J, Satou Y, Ohshima K, Matsuoka M.: ATF3, an HTLV-1 bZip factor binding protein, promotes proliferation of adult T-cell leukemia cells. *Retrovirology.* 8:19, 2011.
 25. Fujimoto K, Kawaguchi T, Nakashima O, Ono J, Ohta S, Kawaguchi A, Tonan T, Ohshima K, Yano H, Hayabuchi N, Izuhara K, Sata M.: Periostin, a matrix protein, has potential as a novel serodiagnostic marker for

- cholangiocarcinoma. *Oncol Rep*, 25:1211-1216, 2011.
26. Okamoto M, Hoshino T, Kitasato Y, Sakazaki Y, Kawayama T, Fujimoto K, Ohshima K, Shiraishi H, Uchida M, Ono J, Ohta S, Kato S, Izuhara K, Aizawa H.: Periostin, a matrix protein, is a novel biomarker for idiopathic interstitial pneumonias. *Eur Respir J*, 37: 1119-1127, 2011.
 27. Hamabashiri M, Daichou A, Yasumoto M, Ogasawara S, Nishinakagawa T, Enjoji M, Ohshima K, Yano H, Nakashima M.: Novel monoclonal antibodies against pancreatic juice from pancreatic cancer patients and their possible application in differential diagnosis. *Int J Mol Med*, 28: 599-603, 2011.
 28. Shimizu-Kohno K, Satou Y, Arakawa F, Kiyasu J, Kimura Y, Niino D, Sugita Y, Ishikawa F, Matsuoka M, Ohshima K.: Detection of HTLV-1 by means of HBZ gene in situ hybridization in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Cancer Sci*, 102: 1432-1436, 2011.
 29. Naito Y, Okabe Y, Nagayama M, Nishinakagawa T, Taira T, Kawahara A, Hattori S, Machida K, Ishida Y, Kaji R, Mikagi K, Kinoshita H, Yasumoto M, Akiba J, Kage M, Nakashima M, Ohshima K, Yano H.: Accuracy of differential diagnosis for pancreatic cancer is improved in the combination of RCAS1 and CEA measurements and cytology in pancreatic juice. *Med Mol Morphol*, 44: 86-92, 2011.
 30. Kimura Y, Sato K, Imamura Y, Arakawa F, Kiyasu J, Takeuchi M, Miyoshi H, Yoshida M, Niino D, Sugita Y, Morito T, Yoshino T, Nakamura S, Ohshima K.: Small cell variant of mantle cell lymphoma is an indolent lymphoma characterized by bone marrow involvement, splenomegaly, and a low Ki-67 index. *Cancer Sci*, 102:1734-1741, 2011.
 31. Pongpruttipan T, Kummalue T, Bedavanija A, Khuhapinant A, Ohshima K, Arakawa F, Niino D, Sukpanichnant S.: Aberrant antigenic expression in extranodal NK/T-cell lymphoma: a multi-parameter study from Thailand. *Diagn Pathol*, 6: 79, 2011.
 32. Asano N, Kinoshita T, Tamaru J, Ohshima K, Yoshino T, Niitsu N, Tsukamoto N, Hirabayashi K, Izutsu K, Taniwaki M, Morishima Y, Nakamura S.: Cytotoxic molecule-positive classical Hodgkin's lymphoma: a clinicopathological comparison with cytotoxic molecule-positive peripheral T-cell lymphoma of not otherwise specified type. *Haematologica*, 96: 1636-1643, 2011.
 33. Takahashi E, Ohshima K, Kimura H, Hara K, Suzuki R, Kawa K, Eimoto T, Nakamura S; for the NK-cell Tumor Study Group.: Clinicopathological analysis of the age-related differences in patients with

- Epstein-Barr virus (EBV)-associated extranasal natural killer (NK)/T-cell lymphoma with reference to the relationship with aggressive NK cell leukaemia and chronic active EBV infection-associated lymphoproliferative disorders. *Histopathology*, 59: 660-671, 2011.
34. Tsuzuki S, Seto M.: Expansion of functionally defined mouse hematopoietic stem and progenitor cells by a short isoform of RUNX1/AML1. *Blood*, 119: 727-735, 2012.
35. Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, Yamochi T, Kagami Y, Tsutsumi A, Matsuda Y, Sato-Otsubo A, Muto S, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimarui K, Ogawa S, Watanabe T.: Polycomb-mediated loss of miR-31 activates NIK-dependent NF- κ B pathway in adult T-cell leukemia and other cancers. *Cancer Cell*, 21: 121-135, 2012.
36. Nakahata S, Saito Y, Marutsuka K, Hidaka T, Maeda K, Hatakeyama K, Shiraga T, Goto A, Takamatsu N, Asada Y, Utsunomiya A, Okayama A, Kubuki Y, Shimoda K, Ukai Y, Kurosawa G, Morishita K.: Clinical significance of CADM1/TSLC1/IgSF4 expression in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leukemia*, 2012 [Epub ahead of print]
37. Ishida T, Joh T, Uike N, Yamamoto K, Utsunomiya A, Yoshida S, Saburi Y, Miyamoto T, Takemoto S, Suzushima H, Tsukasaki K, Nosaka K, Fuzjiwara H, Ishitsuka K, Inagaki H, Ogura M, Akinaga S, Tomonaga M, Tobinai K, Ueda R.: Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody (KW-0761) for relapsed adult T-cell leukemia-lymphoma: a multicenter Phase II study. *J Clin Oncol*, 2012. [Epub ahead of print]
38. Nishikawa H, Maeda Y, Ishida T, Gnjjatic S, Sato E, Mori F, Sugiyama D, Ito A, Fukumori Y, Utsunomiya A, Inagaki H, Old LJ, Ueda R, Sakaguchi S.: Cancer/testis antigens are novel targets of immunotherapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*, 2012. Feb 8 [Epub ahead of print]
39. Kato H, Yamamoto K, Oki Y, Ine S, Taji H, Chihara D, Kagami Y, Seto M, Morishima Y.: Clinical value of flow cytometric immunophenotypic analysis for minimal residual disease detection in autologous stem-cell products of follicular and mantle cell lymphomas. *Leukemia*, in press.
40. Chihara D, Matsuo K, Kanda J, Hosono S, Ito H, Nakamura S, Seto M, Morishima Y, Tajima K, Tanaka H.: Inverse association between soy intake and non-Hodgkin lymphoma risk among women: a case-control study in Japan. *Ann Oncol*, in press.
41. 新野大介、松木 啓、田中健之、柳原克紀、大楠清文、林徳真吉、今泉芳孝、宮崎泰司、有吉紅也、大島孝

- 一：AIDS 患者における播種性非結核性高酸菌症 (Mycobacterium genavense) の 1 例. 診断病理 28 : 18-20, 2011.
42. 糸永英弘、福島卓也、田口 潤、今西大介、今泉芳孝、波多智子、塚崎邦弘、宮崎泰司：【症例報告】顆粒リンパ球増多症に続発した急性単芽球性白血病 臨床血液 52 : 1870-1875, 2011.
43. 今泉芳孝、塚崎邦弘：【特集 ウィルス感染による造血器疾患の病態と治療】ATL の予後による層別化と治療の進歩. 血液内科 63 : 399-405, 2011.
44. 今泉芳孝、塚崎邦弘：K 成人 T 細胞白血病・リンパ腫. 専門医のための薬物療法 Q&A 血液 (小松則夫, 片山直之, 富山佳昭編集, (株)中外医学社 (東京)p265-272 所収) 2011.
45. 宇都宮與：第IX章 白血球系疾患：腫瘍性疾患 23. 成人 T 細胞白血病/リンパ腫 血液専門医テキスト 日本血液学会編. 南江堂 東京, pp302-312, 2011.
46. 宇都宮與, 窪田歩：§6. 悪性リンパ腫およびリンパ系腫瘍 9. 成人 T 細胞白血病/リンパ腫. 白血病・リンパ腫・骨髄腫—今日の診断と治療 第4版. 木崎昌弘編. 中外医学社 東京, pp436-444, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

II. 分担研究報告書

分担研究報告書

ATLL のゲノム異常解析、遺伝子発現解析、遺伝子機能解析

研究分担者：加留部 謙之輔
愛知県がんセンター研究所・遺伝子医療研究部・主任研究員

研究要旨

ATLの分子病態の解明のため、ATLの主な病型である急性型、リンパ腫型および慢性型の症例サンプルを収集し、遺伝子異常の解析を行った。アレイCGH解析法・遺伝子発現解析法を組み合わせた検討を行い、共通性の高い遺伝子異常をいくつか抽出した。これまでのATL研究においては、主に急性型およびリンパ腫型が検討されていたが、今回の研究では慢性型にも注目し、そのゲノム異常を他の型と比較することでATLの病態の進展に重要な遺伝子異常を絞り込んだ。今後はこれらの候補遺伝子について機能的影響を検討する予定であるが、そのためのアッセイ法として、doxycyclinによる遺伝子発現誘導が可能なATL細胞株を作成した。

A. 研究目的

ATLにおいては、いくつかの遺伝子がゲノム異常や発現異常を示しており、がん関連遺伝子の候補として報告されている。しかし、機能的側面の検討や遺伝子変異検索までの詳細な検討がなされた遺伝子は現在までほとんどない。今回の研究では、慢性型 ATL と急性型あるいはリンパ腫型 ATL のゲノム異常を比較し、発現解析および機能解析も組み合わせることで、ATL の病態により重要な働きをしている遺伝子異常を同定することを目的とする。

B. 研究方法

急性型 ATL、リンパ腫型 ATL および慢性型 ATL の検体から DNA を抽出し、アレイ CGH を用いてゲノム異常を解析する。Agilent

社 44K ヒト全ゲノムアレイ CGH グラスを用いてプロトコールに基づいてアレイ CGH を施行する。

またこれらの検体について、発現解析を行ないゲノム異常の結果と比較し、ゲノム異常のみならず発現レベルにおいても異常のある標的遺伝子を抽出する。

抽出された標的遺伝子について、細胞株への導入あるいは、後述するマウス T 細胞への導入によって機能的側面を検討する。

(倫理面への配慮)

本研究は愛知県がんセンターのヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会の承認を得ている。患者検体は対応する共同研究機関で IC を得た上で採取し