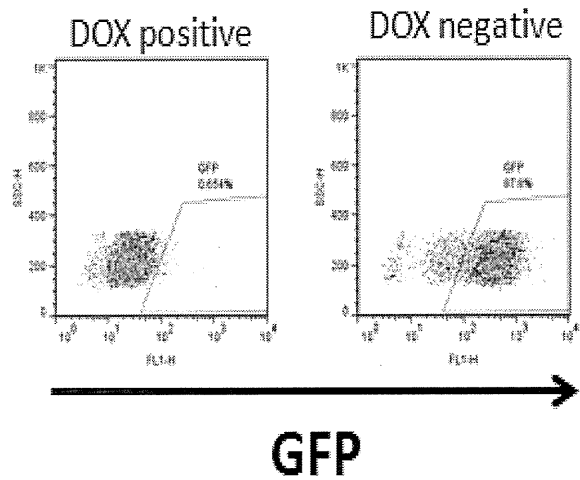


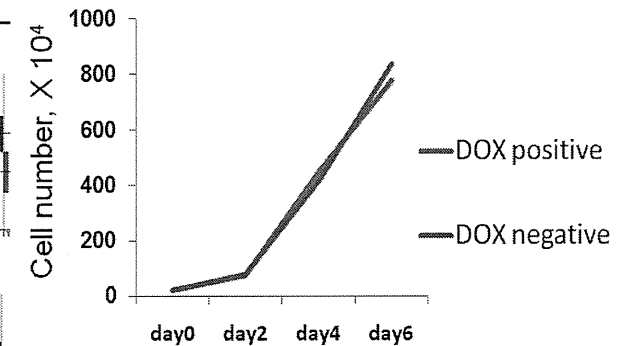
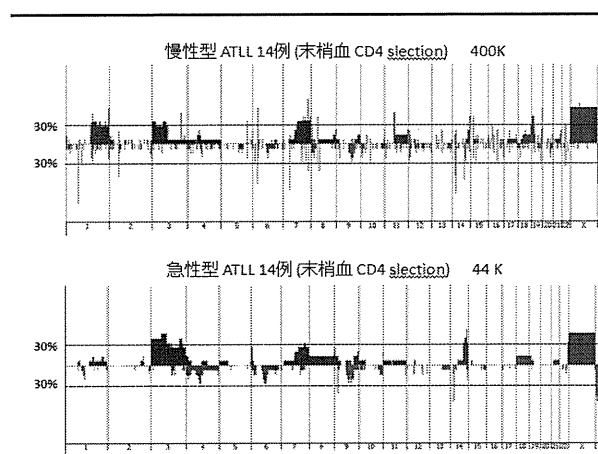
ている。

C. 研究結果

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



D. 考察

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

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ぼさないことも確認できた。

において tetracycline による遺伝子発現誘導の系を作成しえ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。

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った。これらの領域に含まれる遺伝子群は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。1. において抽出された遺伝子の機能的側面について、この系を用いて検証することができる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 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.

2. 学会発表

1. Karube K, Nakagawa M, Tsuzuki S, Ko YH, Nakamura S, Seto M.: Identification of FOXO3 and PRDM1 as tumor suppressor gene candidates in NK cell neoplasms by the combination of genomic and functional analyses. 第 11 回国際リンパ腫会議, 2011, ルガノ(スイス) [口演] 2011. 6. 16
2. 加留部謙之輔, 瀬戸 加大: NK 腫瘍の統合的な分子病態解析. 第 51 回日本

リンパ網内系学会総会, 2011, 福岡
国際会議場(福岡), [シンポジウム]
2011.7.1

3. 加藤 春美, 山本 一仁, 加留部謙之
輔、都築 忍, 谷田部 恭, 瀧澤 淳,
大島 孝一, 中村 栄男, 森島 泰雄,
瀬戸 加大: Gene expression
profiling of EBV-positive diffuse
large B-cell lymphoma (DLBCL) of
the elderly. 第70回日本癌学会学術
総会, 2011, 名古屋国際会議場(名古
屋) [口演] 2011.10.4
4. 加留部謙之輔, 中川 雅夫, 都築 忍,
清水 則夫, 中村 栄男, 高田 尚良,
瀬戸 加大: Identification of FOXO3
and PRDMI as tumor suppressor gene
candidates in NK cell neoplasms. 第
70回日本癌学会学術総会, 2011, 名
古屋国際会議場(名古屋) [ポスター
(示説)] 2011.10.5

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ATLL のゲノム異常解析

研究分担者 瀬戸 加大

愛知県がんセンター研究所、副所長 兼 遺伝子医療研究部・部長

研究要旨

我々はこれまでに、アレイ CGH 解析法により、急性型 ATLL とリンパ腫型 ATLL の間でゲノム異常様式が異なることを報告していた。今回、末梢血検体とリンパ節検体が同時期に得られた急性型 ATLL13 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 ATLL 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 ATLL 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、ATLL 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。

A. 研究目的

ATL は予後不良な疾患であるが、HTLV-1 ウイルス以外のゲノム異常については明らかではない。本研究は、ATLL のウイルス以外のゲノム異常による分子病態を明らかにすることを目的とし、急性型 ATL 患者のゲノム異常様式を詳細に検討した。

B. 研究方法

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た。

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 を精製した。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 を施行した。

(倫理面への配慮)

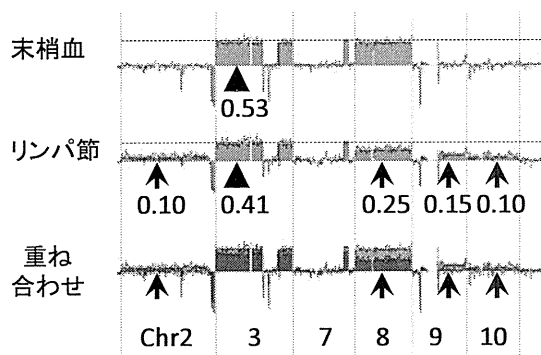
本研究は愛知県がんセンターのヒトゲノ

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を得た上で採取している。

C. 研究結果

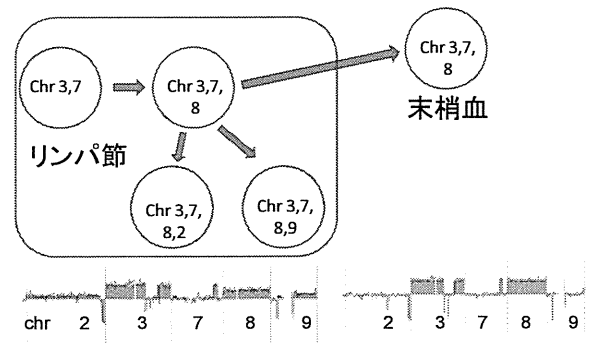
1. 末梢血腫瘍細胞とリンパ節腫瘍細胞のゲノム異常様式は、一部共通するものの、リンパ節内の腫瘍細胞のゲノム異常様式はより多様性が認められた(図1)。また、その頻度は、13症例中9例に認められた。

図1 Log2 ratio imbalance (検体 1)



2. 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



D. 考察

今回の解析で、急性型 ATLL 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 ATLL 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、ATLL 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 ATLL 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、ATLLと同様の疾患群と考えられることが明らかとなった。

E. 結論

1. 70%の急性型 ATLL 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。
2. 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。
3. 末梢血ATLL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。
4. 上記の結果は、ATLL腫瘍細胞の増殖の場はリンパ節であることを示唆し、治療戦略を考える上で、重要な知見を与える。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Tsuzuki S, Taguchi O, Seto M.: Promotion and maintenance of leukemia by ERG. *Blood*, 117: 3858-3868, 2011.
6. 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.
7. 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.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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.

2. 学会発表

1. Karube K, Nakagawa M, Tsuzuki S, Ko YH, Nakamura S, Seto M.: Identification of FOXO3 and PRDM1 as tumor suppressor gene candidates in NK cell neoplasms by the combination of genomic and

- functional analyses. 第11回国際リンパ腫会議, 2011, ルガノ(スイス) [口演] 2011.6.16
2. 瀬戸 加大: 悪性リンパ腫研究の楽しみ方. 第51回日本リンパ網内系学会総会, 2011, 福岡国際会議場(福岡), [口演] 2011.7.1
 3. 加留部謙之輔, 瀬戸 加大: NK腫瘍の統合的な分子病態解析. 第51回日本リンパ網内系学会総会, 2011, 福岡国際会議場(福岡), [シンポジウム] 2011.7.1
 4. 都築 忍、瀬戸 加大: Altered differentiation and enhanced self-renewal activity of B cells by the leukemia-associated TEL(ETV6)-AML1(RUNX1) fusion gene. 第70回日本癌学会学術総会, 2011, 名古屋国際会議場(名古屋) [シンポジウム] 2011.10.3
 5. 成松 隆弘, 松浦 恵子, 泥谷 直樹, 中田 知里, 井上 享, 野村 威雄, 佐藤 文憲, 瀬戸 加大, 三股 浩光, 守山 正胤: 9p24.1-p13.3 loss may be indicator to predict metastasis of clear cell renal cell carcinoma. 第70回日本癌学会学術総会, 2011, 名古屋国際会議場(名古屋) [シンポジウム] 2011.10.3
 6. 松浦 恵子, 中田 知里, 成松 隆弘, 塚本 善之, 野村 威雄, 佐藤 文憲, 三股 浩光, 瀬戸 加大, 守山 正胤: Frequent deregulation of the Hippo signaling pathway in high-grade clear cell renal cell carcinoma. 第70回日本癌学会学術総会, 2011, 名古屋国際会議場(名古屋) [シンポジウム] 2011.10.3
 7. 瀬戸 加大: Molecular bases of malignant lymphoma. 第70回日本癌学会学術総会, 2011, 名古屋国際会議場(名古屋) [シンポジウム] 2011.10.4
 8. 加藤 春美, 山本 一仁, 加留部謙之輔、都築 忍, 谷田部 恭, 瀧澤 淳, 大島 孝一, 中村 栄男, 森島 泰雄, 瀬戸 加大: Gene expression profiling of EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) of the elderly. 第70回日本癌学会学術総会, 2011, 名古屋国際会議場(名古屋) [口演] 2011.10.4
 9. 加留部謙之輔, 中川 雅夫, 都築 忍, 清水 則夫, 中村 栄男, 高田 尚良, 瀬戸 加大: Identification of FOXO3 and PRDMI as tumor suppressor gene candidates in NK cell neoplasms. 第70回日本癌学会学術総会, 2011, 名古屋国際会議場(名古屋) [ポスター(示説)] 2011.10.5
 10. Tashima M, Nishikori M, Kishimoto W, Yamamoto R, Samomi T, Suzuki T, Tsuzuki S, Seto M, Takaori-Kondo A.: Development of a mouse model for blastoid variant of mantle cell lymphoma. 第73回日本血液学会学術集会, 2011, 名古屋国際会議場(名古屋) [ポスター(示説)] 2011.10.14
 11. 都築 忍, 瀬戸 加大: ERG発現による白血病化. 第73回日本血液学会学術

- 集会, 2011, 名古屋国際会議場(名古屋) [ポスター(示説)] 2011.10.14
12. 加藤 春美, 山本 一仁, 加留部謙之輔, 都築 忍, 谷田部 恭, 瀧澤 淳, 大島 孝一, 中村 栄男, 森島 泰雄, 瀬戸 加大: 加齢性 EBV 関連 B 細胞性リンパ増殖性疾患の遺伝子発現プロファイル. 第 73 回日本血液学会学術集会, 2011, 名古屋国際会議場(名古屋) [口演] 2011.10.16

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

ATL 研究のための新しい実験系の創出

研究分担者 都築 忍
愛知県がんセンター研究所・遺伝子医療研究部・室長

研究要旨

本班ではアレイ CGH 解析法・遺伝子発現解析法により、ATL の成立、あるいは進展に重要と考えられる遺伝子異常を抽出している。次に重要なのは抽出した遺伝子異常が ATL の病態にどのように寄与するのかを解明することである。この目的のために、本分担課題研究では、初代培養 T 細胞に遺伝子を導入する方法を確立した。本法により、複数の遺伝子を容易に高効率に T 細胞に導入することが可能であり、さらに導入細胞をマウスに移植することによって生体内での細胞動態を解析することも可能となった。病態解明のための有用な実験系であると考えられる。

A. 研究目的

ATL は予後不良な疾患であるが、HTLV-1 ウイルス以外のゲノム異常がどのように病態に関与するのかを明らかにすることは重要課題である。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した。

B. 研究方法

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。

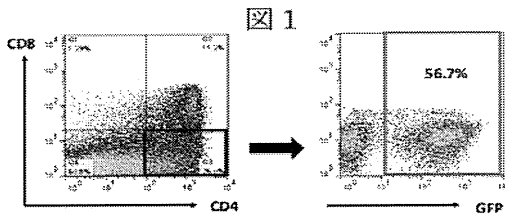
（倫理面への配慮）

本研究は愛知県がんセンター動物実験委員会および組み換え DNA 委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

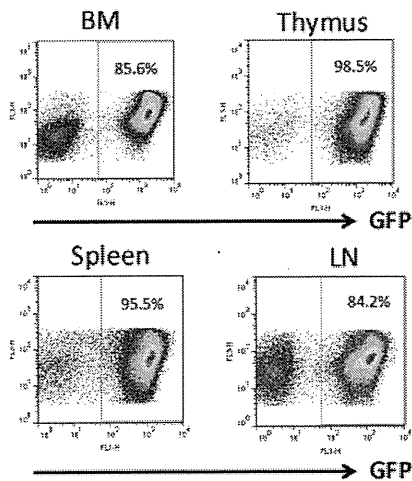
1. マウス初代造血細胞から高効率で T 細胞を誘導することが可能であった。また、GFP を発現するウイルスを感染させたところ、50%超という高効率で

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細胞に導入した後、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



D. 考察

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。

E. 結論

- 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。
- 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。
- 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。
- 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。

5. 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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsuzuki S, Taguchi O, Seto M.: Promotion and maintenance of leukemia by ERG. *Blood*, 117: 3858-3868, 2011.
2. 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.
3. 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.
4. 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.

5. 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.
6. 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, 2011.

2. 学会発表

1. Karube K, Nakagawa M, Tsuzuki S, Ko YH, Nakamura S, Seto M.: Identification of FOXO3 and PRDM1 as tumor suppressor gene candidates in NK cell neoplasms by the combination of genomic and functional analyses. 第11回国際リンパ腫会議, 2011, ルガノ(スイス) [口演] 2011. 6. 16
2. 都築 忍、瀬戸 加大: Altered differentiation and enhanced self-renewal activity of B cells by the leukemia-associated TEL(ETV6)-AML1(RUNX1) fusion gene. 第70回日

- 本癌学会学術総会, 2011, 名古屋国際会議場(名古屋) [シンポジウム] 2011.10.3
3. 加藤 春美, 山本 一仁, 加留部謙之輔、都築 忍, 谷田部 恭, 瀧澤 淳, 大島 孝一, 中村 栄男, 森島 泰雄, 瀬戸 加大: Gene expression profiling of EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) of the elderly. 第70回日本癌学会学術総会, 2011, 名古屋国際会議場(名古屋) [口演] 2011.10.4
 4. 加留部謙之輔, 中川 雅夫, 都築 忍, 清水 則夫, 中村 栄男, 高田 尚良, 瀬戸 加大: Identification of FOXO3 and PRDMI as tumor suppressor gene candidates in NK cell neoplasms. 第70回日本癌学会学術総会, 2011, 名古屋国際会議場(名古屋) [ポスター(示説)] 2011.10.5
 5. Tashima M, Nishikori M, Kishimoto W, Yamamoto R, Samomi T, Suzuki T, Tsuzuki S, Seto M, Takaori-Kondo A.: Development of a mouse model for blastoid variant of mantle cell lymphoma. 第73回日本血液学会学術集会, 2011, 名古屋国際会議場(名古屋) [ポスター(示説)] 2011.10.14
 6. 都築 忍, 瀬戸 加大: ERG 発現による白血病化. 第73回日本血液学会学術集会, 2011, 名古屋国際会議場(名古屋) [ポスター(示説)] 2011.10.14
 7. 加藤 春美, 山本 一仁, 加留部謙之輔, 都築 忍, 谷田部 恭, 瀧澤 淳, 大島 孝一, 中村 栄男, 森島 泰雄, 瀬戸 加大: 加齢性 EBV 関連 B 細胞性リンパ増殖性疾患の遺伝子発現プロフィール. 第73回日本血液学会学術集会, 2011, 名古屋国際会議場(名古屋) [口演] 2011.10.16

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）
分担研究報告書

末梢性T細胞性リンパ腫濾胞型の臨床病理的研究

研究分担者 大島 孝一
久留米大学医学部・血液病理学

研究要旨

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。

A. 研究目的

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 の異動を臨床病理学的に、検討を行った。

B. 研究方法

A) 症例は、結節状の増殖を示すPTCL17例で、形態学的基準としては、以下の所見を全て有するものはAITLとして除外した。
1) リンパ節の構造は破壊され、HEVの著明

な樹枝状増殖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。2) FDC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。

B) 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) 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。

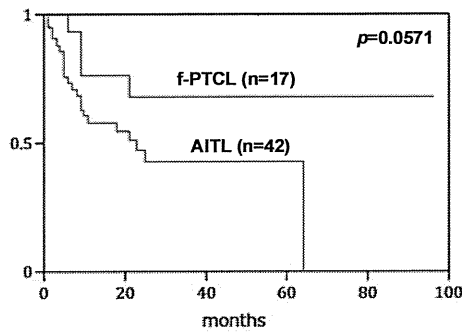
(倫理面への配慮)

本研究は久留米大学のヒトゲノム・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。

C. 研究結果

性別年齢	B症状	節外病変	好酸球	皮膚	Stage	IPI	Elevated LDH	高γ-globulin血症	初発治療	治療効果	追跡期間 (月)	状態
1 M 67	-	-	-	-	II	L	-	-	CHOP	CR	38	Alive
2 F 75	-	末梢血	-	-	III	H-int	+	-	CHOP	CR	27	Alive
3 F 68	+	胸腺水	+	+	IV	H	+	+	CHOP	CRu	23	Alive
4 M 66	+	末梢血	-	+	IV	H-int	+	-	Steroids	-	1	Drop out
5 F 68	+	骨髄	-	-	IV	H-int	+	Unknown	CHOP	CR (relapse after 77 mo)	96	Alive
6 F 55	+	骨髄	+	+	IV	H	+	+	CHOP	CR	7	Drop out
7 M 80	-	不明	-	-	II	H-int	+	-	Not done	-	1	Drop out
8 F 58	-	皮膚	-	+	IV	H-int	+	+	CHOP	CR	41	Alive
9 F 64	-	-	-	-	II	L-int	+	Unknown	CHOP	CR (relapse after 34 mo)	42	Alive
10 M 65	-	-	-	-	III	H-int	+	+	CHOP	PR	86	Alive
11 F 65	+	-	-	-	I	L-int	-	-	Not done	-	34	Alive
12 M 61	+	-	+	+	III	H	+	+	CHOP	PR	9	Dead
13 M 74	-	胸水	-	-	III	L-int	+	+	OPEC	PR	6	Dead
14 M 78	-	-	-	-	III	L-int	+	+	THP-COP	CR (relapse after 4 mo)	21	Dead
15 F 70	+	末梢血	-	-	IV	H-int	+	+	CHOP	PR	9	Dead
16 F 71	-	-	-	-	III	H	+	Unknown	THP-COP	CR	6	Alive
17 F 72	-	-	+	-	III	H-int	+	-	CHOP	CR	6	Alive

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。



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つた。

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

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。② FDC 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。

	FDC	Polymorphic infiltrate	Vascular proliferation	B-immunoblast	Clear cell	EBV	Tumor cell size	FL or PTGC	Diffuse proliferation
Bcl-6	NS (0.213)	0.02	0.0494	0.0439	0.0085	0.0129	0.0432	0.0065	NS (0.078)
CD10	0.0263	NS (0.254)	NS (0.603)	NS (0.085)	NS (0.666)	NS (0.626)	0.0340	0.0477	0.0103
FL or PTGC	0.0331	NS (0.345)	0.0140	NS (0.071)	NS (0.450)	NS (0.850)	NS (0.411)		0.0129
FDC		NS (0.499)	NS (0.816)	NS (0.210)	0.0219	NS (0.199)	NS (0.396)	0.0331	<0.0001

	B症状	節外病変	好酸球	皮膚	Ann Arbor stage	IPI	高γ-globulin血症	治療効果	Mortality
Bcl-6	NS (0.487)	NS (0.703)	0.0036	0.0112	NS (0.419)	NS (0.226)	NS (0.162)	NS (0.170)	NS (0.177)
CD10	NS (0.680)	NS (0.206)	0.0167	0.0022	NS (0.240)	NS (0.137)	0.0227	NS (0.137)	NS (0.474)
FL or PTGC	NS (0.199)	NS (0.125)	0.0129	0.0041	0.0361	0.011	NS (0.640)	NS (0.733)	NS (1.000)
FDC	NS (0.670)	NS (0.847)	NS (0.592)	0.021	NS (0.824)	NS (0.079)	0.0392	NS (0.946)	NS (0.864)

NS: no significant association.

E. 結論

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

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
- ## 2. 学会発表
1. Miyoshi H, Sato K, Niino D, Arakawa F, Kimura Y, Kiyasu J, Takeuchi M, Yoshida M, Okada Y, Nakamura Y, Sugita Y, Ohshima K.: Bcl-6 expression in peripheral T-cell lymphoma, follicular variant correlates with clinicopathological characteristics of angioimmunoblastic T-cell lymphoma, 第100回日本病理学会総会、横浜、2011年4月28日
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

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

研究分担者 宇都宮 興
公益財団法人慈愛会 今村病院分院 院長

研究要旨

HTLV-1 感染者の ATL 発症や 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は明らかではない。Indolent ATL から急性転化や病型変化に関与する遺伝子の解析のため当院での 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 名が急性転化（慢性型から）し、1 名が自然寛解（治癒？）した。急性転化や病型変化に関与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。

A. 研究目的

成人 T 細胞白血病リンパ腫（ATL）はヒト T 細胞白血病ウイルス I 型（human T cell leukemia virus type I: HTLV-1）が原因で発症する末梢性 T 細胞腫瘍である。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、どのような遺伝子群が変化するのか、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目的で当院血液外来を受診した ATL 患者の実態について調査を行った。

B. 研究方法

対象は2011年4月1日から2011年12月31日までに当院血液外来を受診、または入院したATL患者とHTLV-1キャリア外来を受診した無症候性HTLV-1キャリアを対象とした。

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。

（倫理面への配慮）

ATL患者やHTLV-1キャリアは不安を抱いている場合が多く、HTLV-1感染者の心理的な面にも配慮して研究に対する十分な説明と同意を得た。

C. 研究結果

研究期間中に当院で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。

D. 考察

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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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: 5473-5478, 2011.
4. 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, 2011, pp302-312
5. 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, .
6. 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.
7. 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, October 2011, pp131-168
8. Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, Yamochi T, Kagami Y, Tsutsumi A, Matsuda Y, Sato-Otsubo A, Muto S, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru 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
9. 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