

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 瀬戸 加大

平成25（2013）年5月

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 瀬戸 加大

平成25（2013）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 瀬戸加大

II. 分担研究報告

1. 特異な末梢性 T 細胞腫瘍のゲノム異常と病態..... 13
瀬戸加大 (愛知県がんセンター研究所・遺伝子医療研究部)
2. ATL のゲノム異常解析、遺伝子発現解析、遺伝子機能解析..... 19
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)
3. ATL 研究のための新しい実験系の創出..... 24
都築忍 (愛知県がんセンター研究所・遺伝子医療研究部)
4. TAX-specific CTL の ATLL 病変における分布の臨床病理的研究... 28
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 32
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 36
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 39

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24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 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: 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)はウイルス感染者の2-5%が発症する。これはウイルス単独では腫瘍化せず、ウイルス感染細胞に複数のゲノム異常がさらに加わって腫瘍化することを示唆する。我々は主として臨床病型や臨床病態の異なる臨床検体を対象にATLの発症に関するこれらのゲノム異常を解析し、臨床病態や病型に関連する遺伝子異常や遺伝子発現様式を検討することで、ATLの分子病態を明らかにし、臨床的に有用なマーカー並びに腫瘍化機序について明らかにすることを目的とし研究を進めている。

ATLの遺伝子異常の解析については、急性型と慢性型ATLを対象に研究を進めた。より、正確なアレイCGHデータを得るためには検体からCD4陽性分画を精製してこることで、腫瘍分画を多く含む検体を解析した。それらを対象に、アレイCGH解析法と遺伝子発現解析法を組み合わせた検討を行い、病型により異なるゲノム異常領域並びに両者に共通する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、慢性型を多く取り入れ、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みつつある。また、慢性型で約1年7ヶ月の間に急性転化した症例を経時的に追うことができ、急性転化に関与するゲノム異常として9p21.3欠失領域を見いだした。このゲノム欠失は急性型に特徴的なゲノム変化として抽出されており、急性転化のマーカーになることが明らかとなった。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可能な複数の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、病理組織学的な検討として、Tax-specific CTLの分布について検討し、FoxP3の発現の検討を進めた。その結果、Tax-specific CTL数はFoxP3陽性症例では有意に少なく、FoxP3による免疫抑制が病態に関与する可能性が示唆された。

臨床的な検討としては、HTLV-1抗体陽性でサザン解析した約10年間の症例、

1046 検体のうち、病理学的検討を詳細に加えた 57 症例について、retrospective に検討した。HTLV-1 キャリアにおいて、細胞病理学的に末梢性 T 細胞腫瘍の診断を得れば臨床的には ATL と診断される。しかし、一部の症例では、HTLV-1 のキャリアに発症した ATL 以外とのリンパ増殖性疾患との鑑別が困難である。サザンブロット解析と血液病理専門医による病理診断を施行した症例を後方視的に解析したところ、57 例中 4 例と稀ならず診断困難な症例を認めた。ATL の診断には、疾患単位を形成する特徴的なゲノム異常領域から責任遺伝子を見だし、より精度の高い診断方法を開発する必要がある。また、HTLV-1 キャリアの ALK 陰性未分化大細胞リンパ腫 (anaplastic large cell lymphoma: ALCL) 患者の末梢血幹細胞移植治療後、1 年 1 ヶ月を経て慢性型 ATL を発症した症例のゲノム異常について解析した。症例は 58 歳、男性で、ALCL 発症時のリンパ節、末梢血 CD4 陽性細胞、慢性型 ATL は未治療時の末梢血 CD4 陽性細胞より DNA を採取し、array CGH を用いてゲノム異常を解析した。ALCL と慢性型 ATL では、共通するゲノム異常領域があるもののゲノム異常数は、慢性型 ATL の方が多かった。本症例の慢性型 ATL 細胞のゲノム異常では、*MDM4*, *CDK6* の存在部に増幅異常を認めており、これらの遺伝子異常が本例の細胞増殖亢進に関与している可能性がある。また、1p13.1, 10p12.1-p11.2 の欠失は急性型 ATL で多く認められる異常であり、急性転化に関わるゲノム異常と考えられる。本症例は、初発時に ATL クローンが存在した可能性も考えられるので、T 細胞受容体 (TCR) のクローナリティーの検討を進めていく必要があり、興味を持たれる症例である。

ATL 発症に関与する遺伝子の評価をするために昨年度は初代培養 T 細胞に任意の遺伝子を導入し、マウスに移植する系を確立した。本年度は本系の発癌研究への有用性を評価するために、既知のがん遺伝子 *Myc*, *Bcl2*, *Ccnd1* を組み合わせて T 細胞に導入し、マウスに移植した。その結果、高効率で T 細胞腫瘍を作出することが可能であった。腫瘍は CD4 陽性 CD8 陰性 T 細胞であったことから、本系は ATL の病態解明のための有用な実験系となりうることを明らかにした。

研究分担者	所属施設名	職名
加留部謙之輔	愛知県がんセンター研究所	主任研究員
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 興	慈愛会今村病院分院	院長
今泉芳孝	長崎大学病院	助教

A. 研究目的

- 1) 病型、病態の異なる ATL ならびに末梢 T 細胞リンパ腫を対象にゲノム異常および遺伝子発現を行い、病態、病型に関与するゲノム異常領域ならびにその責任遺伝子を明らかにする。
- 2) 慢性型 ATL の経過中に急性転化した症

例の経時的臨床検体を用いて、急性転化に関わるゲノム異常領域ならびにその責任遺伝子を探索する。

- 3) 臨床的な ATL 関連疾患として末梢 T 細胞リンパ腫 (PTCL-NOS) 関連ならびに確定診断が困難であった症例について検討した。また、ゲノム異常を有する予後不良の PTCL-NOS の範疇に入ると考えられていたものの、異なる臨床病態を示した甲状腺原発の末梢 T 細胞リンパ腫についても検討した。
- 4) HTLV-1 の Tax の発現は、多くの ATL 細胞では低下しており、これによる Tax-specific CTL の存在の有無と ATL との関連ははっきりしていない。最近の研究より FoxP3 の発現が見られることより、抑制性 T 細胞由来と考えられているが、抑制性の機能についてはまだ確定されていない。そこで、Tax-specific CTL と FoxP3 の発現の関連を ATL のリンパ腫において免疫病理組織学的に解析した。
- 5) ATL 発症に関与する遺伝子の評価をするために昨年度は初代培養 T 細胞に任意の遺伝子を導入し、マウスに移植する系を確立していたので、具体的に遺伝子導入により、腫瘍化を検討することができるかどうかについて解析し、実験系の有用性を検討する。

B. 研究方法

- 1) 病態、病型の異なる ATL 症例を対象にゲノム異常ならびに遺伝子発現を解析し、病態、病型に関与するゲノム異常領域ならびにその責任遺伝子を明

らかにする。特に、今回は慢性型 ATL27 例を中心に解析を進めた。また、比較として 35 症例の急性型 ATL を用いた。

- 2) 慢性型 ATL 経過中に急性転化した症例を経時的に終えた症例があり、詳細にゲノム異常を比較することで急性転化に関わるゲノム異常領域を明らかにする。
- 3) 抗 HTLV-1 抗体陽性でサザン解析がなされた症例 (1046 検体) を対象に retrospective に解析を進めた。詳細な病理診断がなされている 57 例を対象に、モノクローナリティと診断名について検討した。
- 4) HTLV-1 キャリアの ALK 陰性未分化大細胞リンパ腫 (anaplastic large cell lymphoma: ALCL) の治療後、1 年 1 ヶ月後に慢性型 ATL として発症してきた患者検体の両者を比較することで、本症例における両疾患の関連を検討した。
- 5) これまでゲノム異常陽性 PTCL-NOS は予後不良であると報告してきたが、甲状腺原発の末梢 T 細胞リンパ腫は病態が異なるため、6 症例を集積して、ゲノム異常解析ならびに臨床病態を解析した。
- 6) ATL の病理組織学的な検討として、Tax-specific な CTL の分布について検討し、FoxP3 の発現の検討を進めた。
- 7) ATL 発症に関与する遺伝子の評価をするために初代培養 T 細胞に任意の遺伝子を導入し、マウスに移植する系を確

立していたが、実際に、既知のがん遺伝子 Myc、Bcl2、Ccd1 を組み合わせて T 細胞に導入し、マウスに移植し、実験系の有用性を検討した。

(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。

C. 研究結果

1) 病型の異なる ATL のゲノム異常解析

慢性型 27 例と急性型 35 例のゲノム異常様式は、両者に共通する部分と急性型に特徴的な領域があるが、急性型にはなく、慢性型に認められる特徴的な領域は無かった (図 1)。すなわち、急性型と慢性型は連続した疾患の病態変化としてとらえられるのかもしれないことが示唆された。

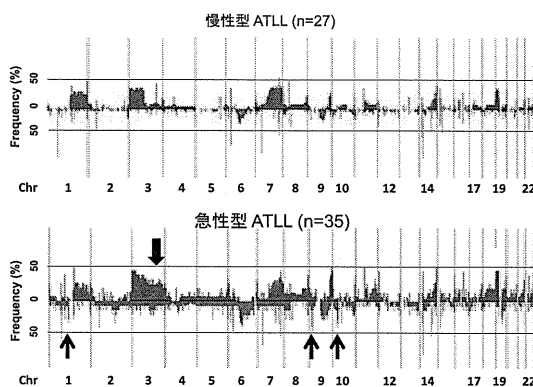


図 1. 慢性型と急性型 ATL のゲノム異常領域の頻度の比較。矢印は急性型に特徴的な領域を示す。

2) 慢性型 ATL の経過中に急性転化した症例の経時的ゲノム異常変化

慢性型 ATL の 1 年 7 ヶ月の経過中に急性転化した症例について、経時的な検体を解析することができた。この検体は同じクローン由来であることが他のゲノム異常領域の比較により明らかとなっており、慢性期には 9p21.3 領域に異常は認められなかったものの、急性転化 3 ヶ月前には異常が出現し、急性転化時にはホモ欠失となったことが明らかとなった。すなわち、急性転化に 9p21.3 欠失が関与することを示唆している (図 2)

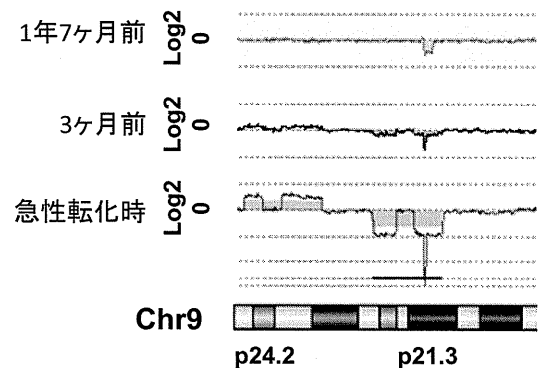


図 2. 急性転化を起こした慢性型症例の 9p21.3 領域の経時的変化

この領域に存在する責任遺伝子は *CDKN2A* と *CDKN2B* であるが、機能的検討により、*CDKN2A* がコードするタンパクのうち INK4a であることが明らかとなっている。また、この領域の欠失は急性型 ATL35 症例のうち 10 症例であり、急性型 ATL を特徴づけるゲノム異常であった。

3) HTLV-1 キャリアに発症した末梢性 T 細胞腫瘍の解析

HTLV-1 キャリアにおいて、細胞病理学的に末梢性 T 細胞腫瘍の診断を得れば臨床的には ATL と診断されている。しかし、HTLV-1 のキャリアに発症した ATL 以外のリンパ増殖性疾患との鑑別が困難である。

そこで、サザンブロット解析が行われた1046検体のうち、血液病理専門医による病理診断を施行した57例症例を後方視的に解析したところ、57例中4例と稀ならず診断困難な症例を認めた。また、HTLV-1のモノクローナルなバンドを認められたのは44症例であり、モノクローナルなバンドを認めなかった症例は13例であった。モノクローナルバンドを認めず、病理組織学的にもATLと言う診断が困難だった症例の転帰は3例がATLとして発症している。

4) ALCLと診断され、治療後に慢性型ATLを発症した症例の解析

HTLV-1キャリアに発症したALCLのリンパ節検体と末梢血検体ならびに1年1ヶ月後に発症した慢性型ATLの末梢血検体を400Kアレイで検討したところ、共通するポリモルフィズム(CNV:コピー数異常領域)があり、同一人由来であることが確認できている。ALCLリンパ節検体と治療後に発症した慢性型ATLでは、明らかにゲノム異常領域が異なっていた。ALCLで認める7, 17番染色体のgain異常は少し様式が異なるものの慢性型ATLでも認める異常部位であった。慢性型ATLのゲノム異常として1q増幅、7q21増幅、1p13.1欠失、10p12.1-p11.2欠失が認められた。

5) 甲状腺原発のPTCL-NOSの解析

甲状腺原発のPTCL-NOS、6症例を集積し解析した。臨床的にはindolentな経過をたどり、時に自然寛解を示す。マーカーはCD3、CD4、CXCR3陽性でTh1由来であることが示唆された。ゲノム異常様式としては、ATLによく似た病態を取る

PTCL-NOSのゲノム異常様式とは異なるゲノム異常を示した。6症例のうち4例と最も高頻度に認めたゲノム異常領域は6q23-qterであり、中でも、6q24.2が共通最小欠失領域であった。そこには、STX11とUTRN遺伝子が存在していた。

6) ATLの病理組織学的な検討

Tax-specificなCTLの分布について検討し、FoxP3の発現との関連を解析した。症例では、ATLのリンパ節病変内にはTax-specific CTLが認められた。また、Tax-specific CTL数は、形態との関連はみられなかったが、FOXp3陽性の症例では優位に低い傾向がみられた。

7) ATL発症に関与する遺伝子の評価実験系の確立

Bcl2+Mycを発現させたT細胞を移植したマウスの半数は120日以内に死亡し、Bcl2、Myc、Cnd1を共に発現させたT細胞を移植したマウスは全例が50日以内に死亡した。コントロールとしてGFP単独またはヒトCD4単独で発現させたT細胞を移植したマウスは無病であった。病態はリンパ節、脾臓、胸腺などの肥大をきたし、病理組織学的にもリンパ性白血病/リンパ腫の所見であった。Bcl2、Myc、Cnd1を共に発現させたT細胞を移植したマウスに発生した腫瘍はGFP陽性かつヒトCD4陽性であったことから、Bcl2、Myc、Cnd1の3者が協調して腫瘍化に至ったと考えられた。Bcl2、Mycによる腫瘍も含め、本実験系の腫瘍表現型はすべてCD4+であり、ATLとの表現型と同じであった。

D. 考察

1) 病型の異なる ATL のゲノム異常解析

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つつある。特に、9p21.3 領域欠失は慢性型の急性転化に伴って出現した異常であるばかりでなく、急性型に特徴的なゲノム異常である。この遺伝子は急性型を決定するのに重要な役割を担っていることが示唆された。同様に、現在検討中の 1p13.1、9p21.3、10p11-p12 の欠失ならびに 3q の増幅が急性型に特徴的であるので、これらの責任遺伝子も急性転化に関与する可能性が有り、今後の解析が急務である。これらは遺伝子発現解析を同時に相関させて検討し、責任遺伝子を追求する必要が有る。

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。また、複数の ATL の細胞株においても同様に成功しており、これらを用いた機能解析が可能な状態となっている。

また、慢性型と急性型に共通するゲノム異常領域も大変興味深い領域であり、これらは ATL 発症の比較的早期から腫瘍化に関与する遺伝子を含んでいるのかもしれない。これらについても遺伝子発現の結果と相関させながら責任遺伝子を追求していく必要が有る。

2) 慢性型 ATL の経過中に急性転化した症例の経時的ゲノム異常変化

慢性型 ATL の急性転化症例を経時的に

追求できたことにより、きわめて重要な情報を得ることができた。特に、9p21.3 領域欠失は慢性型の急性転化に伴って出現した異常であるばかりでなく、急性型に特徴的なゲノム異常である。この遺伝子は急性型を決定するのに重要な役割を担っていることが示唆された。同様に、慢性型には認められず、急性型に特徴的なゲノム異常領域の 1p13.1、9p21.3、10p11-p12 の欠失ならびに 3q 増幅は、同様に急性転化に関与する可能性が有り、責任遺伝子の探索を含め、今後の解析が急務である。これらの領域は遺伝子発現解析を同時に相関させて検討し、責任遺伝子を追求する必要が有る。

3) HTLV-1 キャリアに発症した末梢性 T 細胞腫瘍の解析

サザン解析で HTLV-1 ウイルスのモノクローナルバンドを認めず、病理学的にも ATL との鑑別が困難な症例を 57 例中 4 症例認めた。これらの症例は、比較的長期間生存し、ATL としては非典型的な臨床経過であった。この中には、非典型的な ATL 症例と、HTLV-1 キャリアに発症した ATL 以外のリンパ腫症例が含まれている可能性がある。ATL に対して、近年、同種造血幹細胞移植や抗体医薬などの有用性が報告されており、適切な診断に基づく治療方針の選択が必要であり、これらの境界領域の理解が必要である。

4) ALCL と診断され、治療後に慢性型 ATL を発症した症例の解析

ALCL 発症時の末梢血検体ではゲノム異常はみられず、末梢血中には ALCL の異常細胞や ATL 細胞は存在していないと考えられる。しかし、ALCL のリンパ節検体で

は、ALK 陰性 ALCL に特徴的とされる部のゲノム異常はみられなかったが、ALCL として多く認められる異常部位である 7q, 17q12-21 部のゲノム増幅異常を認めた。本例の慢性型 ATL 期の CD4 陽性細胞では、*MDM4* (1q23.3), *CDK6* (7q22.1) が存在する部にゲノム増幅異常を認めており、これらの遺伝子は、cell cycle の正の regulator として知られている。本例の病態においてもその細胞増殖亢進にこれらの遺伝子が関与している可能性がある。また、1p13.1 及び 10p12.1-p11.2 の欠失は急性型 ATL で多く認められるゲノム異常部位であり、同部の異常は急性転化に関わる部と考えられている。実際、本症例は、慢性型 ATL 発症後早期に中枢神経浸潤をきたし、急性転化をきたしており、これらのゲノム異常の所見と臨床経過の関連性が強く示唆された。

5) 甲状腺原発の PTCL-NOS の解析

今回検討したすべての症例にゲノム異常が存在した。臨床病態的に先行する自己免疫性甲状腺炎が存在し、マーカー CD3, CD4, CXCR3 がすべての症例で陽性であり、新たな疾患単位を形成する可能性が示唆された。それは、甲状腺炎を背景とし発症する比較的予後のよい Th1 由来の T 細胞性リンパ腫であり、経過中に自然寛解を示す点が特徴的である。これまで、ゲノム異常が存在する PTCL-NOS はリンパ腫型 ATL に近いと報告してきたが、甲状腺原発の PTCL-NOS は、従来の PTCL-NOS から区別しなければならない。実際、ゲノム異常様式は異なるので、同一の範疇ではないと考えてよいと思われる。6q24.2 最小共通ゲノム欠失領域の責任遺伝子は STX11 と UTRN であるが、これ

らの遺伝子がどのように腫瘍化に関わるかについては今後検討を進めていく必要が有る。

6) ATL の病理組織学的な検討

ATL の発症においては、HTLV-I の Tax の発現が感染細胞の腫瘍化において、アポトーシスの抑制、細胞増殖を介して重要であると、従来考えられていたが、Tax の発現は、多くの ATL 細胞では低下しており、これによる Tax-specific CTL の存在の有無と ATL との関連ははっきりしていない。また、ATL の由来は、CD4+CD25+ T 細胞と考えられていたが、最近の研究より FoxP3 の発現が見られるので、抑制性 T 細胞由来と考えられているが、抑制性の機能についてはまだ確定されていなかった。今回の研究により、ATL のリンパ節病変内には Tax-specific CTL が認められ、また、Tax-specific CTL 数は、形態との関連はみられなかったが、FoxP3 陽性の症例では優位に低い傾向がみられたことより、FoxP3 による免疫抑制の関与が考えられた。

7) ATL 発症に関与する遺伝子の評価実験系の確立

本研究により、初代培養マウス T 細胞に既知がん遺伝子を導入することにより再現性よく高効率に T 細胞性腫瘍が発生した。発生した腫瘍は CD4 陽性 CD8 陰性細胞であることから、本システムは ATL 研究に有用であることが期待される。導入遺伝子と同時に GFP やヒト CD4 をマーカーとして発現させているためマウス生体内での細胞追跡が可能である。現在、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細胞に種々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となっている。今後は、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。

E. 結論

1. 慢性型と急性型 ATL ゲノム異常様式を比較することにより、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つつある。特に、1p13.1、9p21.3、10p11-p12 の欠失ならびに 3q の増幅が急性型に特徴的であるので、これらの責任遺伝子も急性転化に関与する可能性があり、今後の解析が急務である。

2. 慢性型 ATL の経過中に急性転化した症例の経時的ゲノム異常変化を追うことにより、9p21.3 欠失が急性転化に関与していることが明らかとなった。この領域は急性型 ATL に特徴的なゲノム異常であり、他の急性型 ATL に特徴的なゲノム異常領域も急性転化マーカーになることが強く示唆された。

3. ATL のゲノム異常を対象とした本研究グループの解析結果により、ゲノム解析によって ATL の疾患特異的な遺伝子異常が同定し、診断に有用な分子マーカーが開発する必要がある。ゲノム解析を推進するために、検体の収集を継続するとともに、臨床病態の解析を進めていく。

4. ALCL と診断され、治療 1 年 1 ヶ月後

に慢性型 ATL を発症した症例を解析したところ慢性型 ATL の腫瘍細胞に急性型 ATL で多く認められるゲノム異常 1p13.1 及び 10p12.1-p11.2 の欠失があり、この症例は慢性型 ATL 発症後早期に中枢神経浸潤をきたし、急性転化をきたしている。すなわち、これらのゲノム異常は臨床的マーカーとして有用であることが強く示唆された。

5. 甲状腺原発の PTCL-NOS は先行する自己免疫性甲状腺炎が存在し、CD3、CD4、CXCR3 が検索したすべての症例で陽性であり、新たな疾患単位を形成する可能性が示唆された。臨床的には比較的予後のよい Th1 由来の T 細胞性リンパ腫であり、経過中に自然寛解を示すことが特徴である。

6. ATLL のリンパ節病変内には Tax-specific CTL が認められ、また、Tax-specific CTL 数は、FOXp3 陽性の症例では優位に低い傾向がみられた。

7. マウス初代培養未分化造血細胞から誘導した T 細胞に Myc, Bcl2, Ccnd1 を組み合わせることで遺伝子導入することにより効率よく T 細胞性腫瘍を誘導でき、発生した腫瘍は CD4 陽性 CD8 陰性であり、ATL 類似の表現型を示した。また、遺伝子導入した細胞には GFP やヒト CD4 を共発現させることでマウス体内での追跡が可能であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. 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*, 26: 166-169, 2012.
2. 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.*, 23: 1061-1066, 2012.
3. Liu F, Karube K, Kato H, Arita K, Yoshida N, Yamamoto K, Tsuzuki S, Kim W, Ko Y-H, Seto M.: Mutation analysis of NF- κ B signal pathway-related genes in ocular MALT lymphoma. *Int J Clin Exp.*, 5: 436-441, 2012.
4. Yoshida N, Umino A, Liu F, Arita K, Karube K, Tsuzuki S, Ohshima K, Seto M: Identification of multiple subclones in peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified with genomic aberrations. *Cancer Medicine*, 1: 289-294, 2012.
5. Liu F, Yoshida N, Suguro M, Kato H, Karube K, Arita K, Yamamoto K, Tsuzuki S, Ohshima K Seto M: Clonal heterogeneity of mantle cell lymphoma revealed by array comparative genomic hybridization. *The European Journal of Haematology*, 90: 51-58, 2012.
6. Karube K, Tsuzuki S, Yoshida N, Arita K, Liu F, Kondo E, Ko YH, Ohshima K, Nakamura S, Kinoshita T, Seto M. Lineage-specific growth inhibition of NK cell lines by FOXO3 in association with Akt activation status. *Exp Hematol*, 40: 1005-1015, 2012.
7. Hikino S, Ohga S, Kinjo T, Kusuda T, Ochiai M, Inoue H, Honjo S, Ihara K, Ohshima K, Hara T. : Tracheal aspirate gene expression in preterm newborns and development of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Int*, 54: 208-214, 2012.
8. Kiyasu J, Aoki R, Tanaka PY, Pracchia LF, Calore EE, Perez NM, Kimura Y, Niino D, Sugita Y, Takayanagi R, Abe Y, Matsuoka M, Ohshima K.: FOXP3(+) regulatory and TIA-1(+) cytotoxic T lymphocytes in HIV-associated Hodgkin lymphoma. *Pathol Int*, 62: 77-83, 2012.
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, 2012.
10. Sugata K, Satou Y, Yasunaga J, Hara H, Ohshima K, Utsunomiya A,

- Mitsuyama M, Matsuoka M.: HTLV-1 bZIP factor impairs cell-mediated immunity by suppressing production of Th1 cytokines. *Blood*, 119: 434-444, 2012.
11. Hirose Y, Kaida H, Ishibashi M, Uozumi J, Arikawa S, Kurata S, Hayabuchi N, Nakahara K, Ohshima K.: Comparison between endoscopic macroscopic classification and F-18 FDG PET findings in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma patients. *Clin Nucl Med*, 37: 152-157, 2012.
 12. Yoshida S, Arakawa F, Higuchi F, Ishibashi Y, Goto M, Sugita Y, Nomura Y, Niino D, Shimizu K, Aoki R, Hashikawa K, Kimura Y, Yasuda K, Tashiro K, Kuhara S, Nagata K, Ohshima K.: Gene expression analysis of rheumatoid arthritis synovial lining regions by cDNA microarray combined with laser microdissection: up-regulation of inflammation-associated STAT1, IRF1, CXCL9, CXCL10, and CCL5. *Scand J Rheumatol*, 41: 170-179, 2012.
 13. Kimura H, Ito Y, Kawabe S, Gotoh K, Takahashi Y, Kojima S, Naoe T, Esaki S, Kikuta A, Sawada A, Kawa K, Ohshima K, Nakamura S.: EBV-associated T/NK-cell lymphoproliferative diseases in nonimmunocompromised hosts: prospective analysis of 108 cases. *Blood*, 119: 673-686, 2012.
 14. Shimizu-Kohno K, Kimura Y, Kiyasu J, Miyoshi H, Yoshida M, Ichikawa R, Niino D, Ohshima K.: Malignant lymphoma of the spleen in Japan: A clinicopathological analysis of 115 cases. *Pathol Int*, 62: 577-582, 2012.
 15. Kannagi M, Hasegawa A, Takamori A, Kinpara S, Utsunomiya A.: The roles of acquired and innate immunity in human T-cell leukemia virus type 1-mediated diseases. *Frontiers in Microbiology*, 3: 1-10, 2012.
 16. Higashi Y, Kawai K, Yonekura K, Takeda K, Kanzaki T, Utsunomiya A, Kanekura K.: Indication for random skin biopsy for the diagnosis of intravascular large B cell lymphoma. *Dermatology*, 224: 46-50, 2012.
 17. Ishida T, Hishizawa M, Kato K, Tanosaki R, Fukuda T, Taniguchi S, Eto T, Takatsuka Y, Miyazaki Y, Moriuchi Y, Hidaka M, Akashi K, Uike N, Sakamaki H, Morishima Y, Kato K, Suzuki R, Nishiyama T, Utsunomiya A.: Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for adult T-cell leukemia-lymphoma with special emphasis on preconditioning regimen: a nationwide retrospective study. *Blood*, 120: 1734-1741, 2012.
 18. Satou Y, Utsunomiya A, Tanabe J, Nakagawa M, Nosaka K, Matsuoka M.: HTLV-1 modulates the frequency and phenotype of FoxP3+CD4+ T cells in the HTLV-1 infected individuals.

- Retrovirology, 9: 46, 2012.
19. Fukuda RI, Tsuchiya K, Suzuki K, Itoh K, Fujita J, Utsunomiya A, Tsuji T. : HTLV-I Tax regulates the cellular proliferation through the down-regulation of PIP3-phosphatase expressions via the NF- κ B pathway. *Int J Biochem Mol Biol*, 3: 95-104, 2012.
 20. Katsuya H, Yamanaka T, Ishitsuka K, Utsunomiya A, Sasaki H, Hanada S, Eto T, Moriuchi Y, Saburi Y, Miyahara M, Sueoka E, Uike N, Yoshida S, Yamashita K, Tsukasaki K, Suzushima H, Ohno Y, Matsuoka H, Jo T, Suzumiya J, Tamura K. : Prognostic index for acute- and lymphoma-type adult T-cell leukemia/lymphoma. *J Clin Oncol*, 30: 1635-1640, 2012.
 21. 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*, 119: 3097-3104, 2012.
 22. 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*, 30: 837-842, 2012.
 23. 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, Kuosawa G, Morishita K. : Clinical significance of CADM1/TSLC1/IgSF4 expression in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leukemia*, 26: 1238-1246, 2012.
 24. Kanda J, Hishizawa M, Utsunomiya A, Taniguchi S, Eto T, Moriuchi Y, Tanosaki R, Kawano F, Miyazaki Y, Masuda M, Nagafuji K, Hara M, Takanashi M, Kai S, Atsuta Y, Suzuki R, Kawase T, Matsuo K, Nagamura-Inoue T, Kato S, Sakamaki H, Morishima Y, Okamura J, Ichinohe T, Uchiyama T. : Impact of graft-versus-host disease on outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T-cell leukemia: a retrospective cohort study. *Blood*, 119: 2141-2148, 2012.
 25. Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, Yamochi T, Kagami Y, Tsutsumi A, Matsuda Y, Sato-Otsubo A, Muto S, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimarukawa 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.
26. Tsuzuki S, Seto M.: TEL(ETV6)-AML1(RUNX1) Initiates Self-renewing Fetal Pro-B Cells in Association with a Transcriptional Program Shared with Embryonic Stem Cells in Mice. *Stem Cells*, 31: 236-247. 2013.
 27. Umino A, Seto M.: Array CGH Reveals Clonal Evolution of Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. *Methods Mol Biol*. 973: 189-96. 2013.
 28. Yoshioka S, Tsukamoto Y, Hijiya N, Nakada C, Uchida T, Matsuura K, Takeuchi I, Seto M, Kawano K, Moriyama M.: Genomic profiling of oral squamous cell carcinoma by array-based comparative genomic hybridization. *PLoS One*. 8: e56165. 2013.
 29. Seto M.: Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma. *Blood*, 121: 1249-1250. 2013.
 30. Taguchi O, Tsujimura K, Kontani K, Harada Y, Nomura S, Ikeda H, Morita A, Sugiura H, Hayashi N, Yatabe Y, Seto M, Tatematsu M, Takahashi T, Fukushima A.: Behavior of Bone Marrow-Derived Cells Following in Vivo Transplantation: Differentiation into Stromal Cells with Roles in Organ Maintenance. *Am J Pathol*. 182: 1255-1262. 2013.
 31. Karube K, Tsuzuki S, Yoshida N, Arita K, Kato H, Katayama M, Ko Y-H, Ohshima K, Nakamura S, Kinoshita T, Seto M.: Comprehensive gene expression profiles of NK cell neoplasms identify vorinostat as an effective drug candidate. *Cancer Letter*, 333: 47-55. 2013.
 32. Yoshida N, Nishikori M, Izumi T, Imaizumi Y, Sawayama Y, Niino D, Tashima M, Hoshi S, Ohshima K, Shimoyama M, Seto M, Tsukasaki K.: Primary peripheral T-cell lymphoma, not otherwise: specified of the thyroid with autoimmune thyroiditis. *Br J Haematol*. 161: 214-223. 2013.
 33. Itonaga H, Taguchi J, Fukushima T, Tsushima H, Sato S, Ando K, Sawayama Y, Matsuo E, Yamasaki R, Onimaru Y, Imanishi D, Imaizumi Y, Yoshida S, Hata T, Moriuchi Y, Honda S, Miyazaki Y.: Distinct clinical features of infectious complications in adult T-cell leukemia/lymphoma patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective analysis in the Nagasaki Transplant Group. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2013 Jan 17. [Epub ahead of print]
 34. Itonaga H, Tsushima H, Taguchi J, Fukushima T, Taniguchi H, Sato S, Ando K, Sawayama Y, Matsuo E, Yamasaki R, Onimaru Y, Imanishi D, Imaizumi Y, Yoshida S, Hata T, Moriuchi Y, Uike N, Miyazaki Y.: Treatment of relapsed adult T-cell leukemia/lymphoma after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: the Nagasaki Transplant Group experience. *Blood*, 121: 219-225, 2013.
- 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

特異な末梢性 T 細胞腫瘍のゲノム異常と病態

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、末梢性 T 細胞リンパ腫分類不能型 (PTCL-NOS) のゲノム異常を有する群はリンパ腫型 ATLL とゲノム異常様式がよく似ていることを報告し、病態や予後もよく似ており、HTLV-1 ウイルスの情報がなければ両者は区別が困難であり、同一の疾患群に属している可能性を報告してきた。PTCL-NOS と分類しうるものの中で、ゲノム異常を有しながらも特殊な臨床病態を呈する甲状腺原発末梢性 T 細胞リンパ腫を解析し、独立した新しい疾患単位として認識しうる可能性を示した。その特徴は、甲状腺炎の既往があり、ゆっくりとした臨床経過をたどる予後良好な末梢性 T 細胞腫瘍であることが明らかとなった。また、特徴的なこととして、6q24.2 に共通してゲノム欠失を認め (6 症例中 4 例)、経過の途中で自然寛解を示す。これらの特徴は、新たな疾患単位を形成すると考えるに足る証拠であるが、今後、他の T 細胞リンパ腫との関連も考察する必要が有る。

A. 研究目的

ゲノム異常を有する末梢性 T 細胞リンパ腫 (PTCL-NOS) は、成人 T 細胞白血病/リンパ腫とよく似ていることを報告してきた。今回、甲状腺原発の PTCL-NOS を対象に、その病態とゲノム異常を解析した。

B. 研究方法

甲状腺原発の T 細胞性リンパ腫 6 症例を集積し、病理組織学的検討、臨床病態的検討とともに、ゲノム異常ならびに遺伝子発現も解析した。

(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、匿名化した上で愛知県がんセンターに送付された。

C. 研究結果

1. 臨床病態学的特徴

6 名は 2002 年から 2011 年の間に診断され。特徴としては、甲状腺腫大であり、病理診断のために、5 例は部分切

除をうけ、残り 1 症例は針生検をうけた。部分切除後 2 症例は自然消退を示した。残りの 4 症例は化学療法を受けた。これらの症例は indolent な経過をたどり、中間年齢は 65 歳であった (51-83 歳)。6 例中 4 例は頸部リンパ節腫大を認めたが、他のリンパ節腫大は認めなかった。3 症例は流血中に腫瘍細胞を認め、白血化していた。2 例は骨髄に腫瘍細胞を認めた。3 症例は Stage IV、のこり 3 症例は Stage IIE であった。1 例のみ、急激な転帰をたどり、5 ヶ月で死亡したが、他の 5 症例はすべて生存している。うち 3 例は 70 ヶ月を超えて生存中である。

2. 病理形態学的、免疫組織学的特徴

細胞の大きさは小型から中型で、4 症例に lymphoepitelioid 変化が認められる。マーカーはすべての症例で CD3、CD4、CXCR3 が陽性であり、Th1 細胞由来である。また、これらのリンパ腫は先行する甲状腺炎が特徴的である。6 症例中 4 症例には自己免疫性甲状腺炎の既往があり、5 症例には抗 Thyroglobulin 抗体、抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体が陽性であった。これらの抗体が認められない残る一例には高い Thyroid stimulating hormone (TSH) が認められ、甲状腺機能低下症が示唆されている。すなわち、すべての症例で何らかの形で自己免疫性甲状腺炎を疑わせる所見が存在し、それを背景として出現する T 細胞性リンパ腫であることが示唆された。

3. ゲノム異常と遺伝子発現の解析

各患者にまたがるゲノム異常領域が認められたが、これまでに報告した PTCL-NOS のゲノム異常と比較し、特に、4p16.3、4p17、8q24.3、9q33.3、17q25.3、19 短腕の増幅と 6q23-qter の欠失が特徴的であった (図 1)。急激な転帰をとった 1 症例は 9p21 のホモ欠失があり、*CDKN2A/CDKN2B* の欠失により急激な転帰をとったものと思われる。しかし、この症例も、ゲノム異常様式では他の症例とよく似た異常様式を示しているため、甲状腺炎関連 T 細胞リンパ腫という範疇に含めることができる。

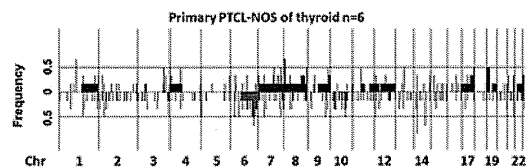


図 1. 甲状腺炎関連 T 細胞リンパ腫のゲノム異常様式

4. 6q24.2 欠失領域の責任遺伝子

今回検討したすべての症例にゲノム異常が存在した。特に、6q23-qter 領域は 6 症例中 4 症例に認められ、そのうちの 1 例は 6q24.2 のきわめて狭い領域に異常を示し、この領域に責任遺伝子が含まれていると考えられた (図 2)。その最小共通欠失領域には、*STX11* と *UTRN* 遺伝子が含まれており、これらのいずれか、あるいは両方が本リンパ腫に関連する重要な遺伝子である可能性が示唆された。

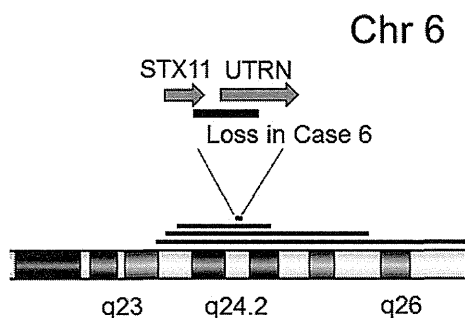


図2. 6q24.2領域の最小共通欠失領域

D. 考察

今回検討したすべての症例にゲノム異常が存在した。臨床病態的に先行する自己免疫性甲状腺炎が存在し、マーカーCD3, CD4, CXCR3がすべての症例で陽性であり、新たな疾患単位を形成する可能性が示唆された。それは、甲状腺炎を背景とし発症する比較的予後のよい Th1 由来の T 細胞性リンパ腫であり、経過中に自然寛解を示す点が特徴的である。

ゲノム異常としては、ATLに近いPTCL-NOSとは異なる特徴的なゲノム異常様式を示すことも、従来のPTCL-NOSから区別して判断しなければならない根拠となる。6q24.2 最小共通ゲノム欠失領域の責任遺伝子はSTX11とUTRNであるが、これらの遺伝子がどのように腫瘍化に関わるかについては今後検討を進めていく必要が有る。

E. 結論

1. これまで報告してきた ATL とよく似た病態を示すゲノム異常を有する末梢性 T 細胞リンパ腫分類不能型 (PTCL-NOS) の中に、これらとは異なる甲状腺原発の新しい末梢性 T 細胞リンパ腫が存在することを見いだした。

2. 臨床病態学的特徴は自己免疫性甲状腺炎を背景に出現する可能性が強いことと、マーカー上は CD3, CD4, CXCR3 陽性で Th1 由来の腫瘍であり、lymphoepithelioid 病変を有すること、また、経過中に自然寛解を示す症例があり、indolent な経過をたどることが多い。

3. 6q23-qter の欠失が高頻度に認められ、6q24.2 最小共通ゲノム欠失領域の責任遺伝子は STX11 と UTRN であることが明らかとなった。腫瘍化や病態にどのように関与するかは今後の問題である。

4. 6 症例中 1 例は急激な転帰をたどったが、これは 9p21.1 の欠失による急性転化を引き起こしたと考えられる。すなわち、indolent な経過を呈するとはいえ、注意深い観察が必要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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*, 26: 166-169, 2012.
2. 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.*, 23: 1061-1066, 2012.
 3. Liu F, Karube K, Kato H, Arita K, Yoshida N, Yamamoto K, Tsuzuki S, Kim W, Ko Y-H, Seto M.: Mutation analysis of NF- κ B signal pathway-related genes in ocular MALT lymphoma. *Int J Clin Exp.*, 5: 436-441, 2012.
 4. Yoshida N, Umino A, Liu F, Arita K, Karube K, Tsuzuki S, Ohshima K, Seto M: Identification of multiple subclones in peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified with genomic aberrations. *Cancer Medicine*, 1: 289-294, 2012.
 5. Liu F, Yoshida N, Suguro M, Kato H, Karube K, Arita K, Yamamoto K, Tsuzuki S, Oshima K Seto M: Clonal heterogeneity of mantle cell lymphoma revealed by array comparative genomic hybridization. *The European Journal of Haematology*, 90: 51-58, 2012.
 6. Karube K, Tsuzuki S, Yoshida N, Arita K, Liu F, Kondo E, Ko YH, Ohshima K, Nakamura S, Kinoshita T, Seto M. Lineage-specific growth inhibition of NK cell lines by FOXO3 in association with Akt activation status. *Exp Hematol*, 40: 1005-1015, 2012.
 7. Tsuzuki S, Seto M. TEL (ETV6)-AML1 (RUNX1) Initiates Self-renewing Fetal Pro-B Cells in Association with a Transcriptional Program Shared with Embryonic Stem Cells in Mice. *Stem Cells*, 31: 236-247. 2013.
 8. Umino A, Seto M.: Array CGH Reveals Clonal Evolution of Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. *Methods Mol Biol.* 973: 189-96. 2013.
 9. Yoshioka S, Tsukamoto Y, Hijiya N, Nakada C, Uchida T, Matsuura K, Takeuchi I, Seto M, Kawano K, Moriyama M.: Genomic profiling of oral squamous cell carcinoma by array-based comparative genomic hybridization. *PLoS One.* 8: e56165. 2013.
 10. Seto M.: Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma. *Blood*, 121: 1249-1250. 2013.
 11. Taguchi O, Tsujimura K, Kontani K, Harada Y, Nomura S, Ikeda H, Morita A, Sugiura H, Hayashi N, Yatabe Y, Seto M, Tatematsu M, Takahashi T, Fukushima A.: Behavior of Bone Marrow-Derived Cells Following in