

Vivo

Transplantation: Differentiation into Stromal Cells with Roles in Organ Maintenance. *Am J Pathol.* 182: 1255-1262. 2013.

12. 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.
13. 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.

2. 学会発表

1. Karube, K., Seto, M.: Genomic and functional analyses of NK-cell neoplasms. 4th T cell lymphoma forum, 2011, サンフランシスコ(米国), [口演] 2012. 1. 26
2. 瀬戸 加大: Genomic alterations in malignant lymphoma and its implication in cancer treatment. The 38th Annual Meeting of Korean Cancer Association. 招請口演. 2012, (COEX Seoul, Korea) 2012. 6. 13
3. 吉田 稚明, 海野 啓, Liu Fang, 在田 幸太郎, 加留部謙之輔, 都築 忍, 大島 孝一, 瀬戸 加大: ゲノム異常陽性 PTCL, NOS におけるサブクローンの存在. 第 52 回日本リンパ網内系学会総会, 2012, 福島ビューホテル(福島) [口演] 2012. 6. 15
4. 吉田 稚明, 海野 啓, Liu Fang, 在田 幸太郎, 加留部謙之輔, 都築 忍, 大島 孝一, 瀬戸 加大: ゲノム異常陽性 PTCL, NOS におけるサブクローンの存在. 第 52 回日本リンパ網内系学会総会, 2012, 福島ビューホテル(福島) [ポスター (示説)] 2012. 6. 16
5. 瀬戸 加大: NK 細胞性腫瘍の機能特異的がん抑制遺伝子としての FOXO3. 第 16 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2012, 西日本総合展示場(北九州市) [ワークショップ] 2012. 6. 29
6. 岸本 渉, 錦織 桃子, 田嶋 政治, 山本 玲, 坂井 智美, 都築 忍, 瀬戸 加大, 高折 晃史: マントル細胞リンパ腫のマウスモデルの作製. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012, ロイトン札幌(札幌) [ポスター (示説)] 2012. 9. 19
7. 加留部 謙之輔, 都築 忍, 中村 栄男, 瀬戸 加大: NK 細胞性腫瘍に特異的ながん抑制遺伝子である FOXO3. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012, ロイトン札幌(札幌) [ポスター (示説)] 2012. 9. 19
8. 都築 忍, 瀬戸 加大: CML-BC における AML1/RUNX1 変異と BCR-ABL の協調作

- 用. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012, ロイトン札幌(札幌) [ポスター (示説)] 2012.9.19
9. 吉田 稚明, 海野 啓, 劉 芳, 在田 幸太郎, 加留部 謙之輔, 都築 忍, 大島 孝一, 瀬戸 加大: ゲノム異常陽性の末梢性 T 細胞性リンパ腫、非特異型におけるサブクローンの存在. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012, ロイトン札幌(札幌) [口演] 2012.9.20
10. 加留部 謙之輔, 大島 孝一, 瀬戸 加大: 悪性リンパ腫の臨床病理および分子病態の解析. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012, ロイトン札幌(札幌) [口演] 2012.9.21
11. 都築 忍, 瀬戸 加大: Expansion of mouse hematopoietic stem/progenitor cells by a short isoform of RUNX1/AML1. 第 74 回日本血液学会総会, 2012, 国立京都国際会館(京都) [ポスター (示説)] 2012.10.19
12. 瀬戸 加大 : Molecular characterization of T/NK cell malignancies Masao Seto. 第 74 回日本血液学会総会, 2012, 国立京都国際会館(京都) [シンポジウム(口演)] 2012.10.20
13. Noriaki Yoshida, Akira Umino, Fang Liu, MD, Kotaro Arita, Kennosuke Karube, MD, Shinobu Tsuzuki, Koichi Ohshima, and Masao Seto.: Identification of Multiple Subclones in Peripheral T-Cell Lymphoma, Not Otherwise Specified with Genomic Aberrations. 第 54 回米国血液学会総会, 2012, アトランタ(米国) [口演] 2012.12.10
14. Kotaro Arita and Masao Seto.: New mouse models of B-cell lymphoma using in vitro retroviral transduction system. 第 9 回日本癌学会・AACR 合同会議, 2013, ラハイナ(米国) [ポスター] 2013.2.22

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検体を収集し、遺伝子異常の解析を行った。特に慢性型ATLを多数集積し、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ゲノム異常領域を絞り込んだ。慢性型と急性型と比較することで、急性型に特徴的なゲノム異常領域を見だし、これらが急性転化や急性型の病態に関与することを示唆した。また、慢性型の中にも臨床的に治療を要する群と経過観察した群では予後が明らかに異なり、ゲノム異常様式も異なることが明らかとなった。また、慢性型から急性転化した症例を経時的に観察することができ、そのゲノム異常は9p21.3領域が関与していることが示唆された。今後はこれらのゲノム異常領域の候補遺伝子を探索するとともに、機能的検討を行う予定である。

A. 研究目的

ATL においては、HTLV-1 ウイルスが発症に大きく関与するが、それ以外のゲノム異常についてはあまり詳細には検討されていない。これまでいくつかの遺伝子がゲノム異常や発現異常が明らかとなり、がん関連遺伝子の候補として報告されているものの、機能的側面など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。平成 24 年度の研究は前年度の研究に引き続き、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し、機能的検討を加え、ATL 発症や病態に関与する分子基盤を明らかに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、可能な検体は CD4 陽性細胞を選択し、DNA ならびに RNA を抽出する。検体 DNA を用いて Agilent 社 400K 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、細胞株への導入により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を得た上で採取している。

C. 研究結果

昨年度よりも症例数が増え、合計では急性型(35 症例)および慢性型 ATL(27 症例)について、アレイ CGH を行った。部分的には 44K のデータを用いている。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、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った (図 1)。

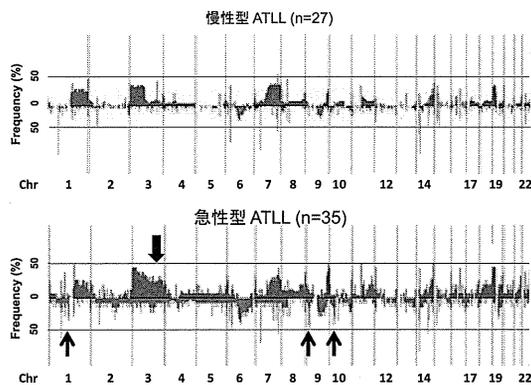


図 1. 慢性型と急性型 ATL のゲノム異常領域の頻度の比較。矢印は急性型に特徴的な領域を示す。

慢性型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 (図 2)。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)

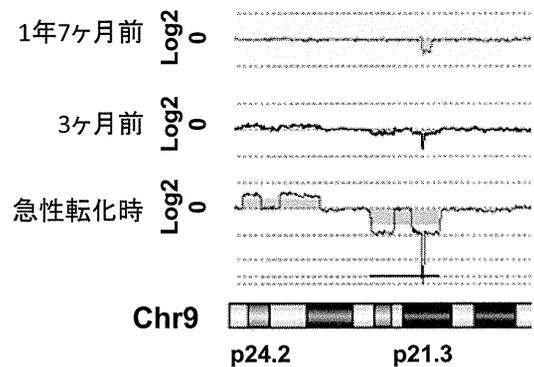


図 2. 急性転化を起こした慢性型症例の 9p21.3 領域の経時変化

実際に 9p21. 3 領域欠失は急性型に特徴的であり、この領域の異常について、検討したところ、きわめて狭い領域に最小共通欠失領域が集中することが明らかとなった (図 3)

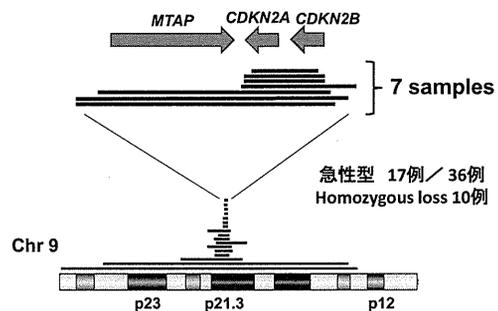


図 3. 9p21.3 領域の責任遺伝子は CDKN2A か CDKN2B である

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、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ている(図4)。

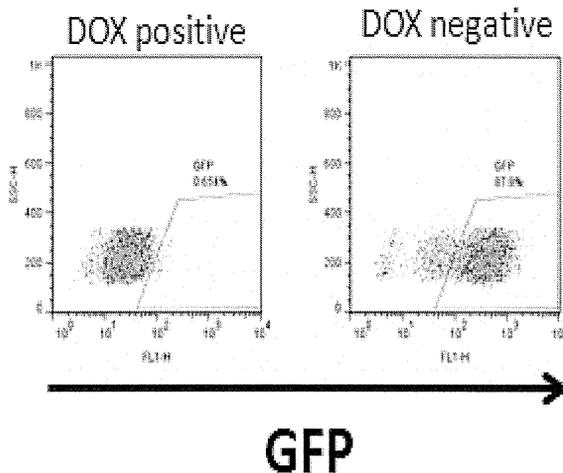


図4. 遺伝子発現誘導系での効果的な遺伝子発現誘導

この系を用いて、責任遺伝子を探索したところ、*CDKN2A* がコードするタンパクのうちの INK4a である可能性が示唆されている。

D. 考察

1) 慢性型と急性型 ATL の比較

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。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ある。

E. 結論

1. 慢性型および急性型ATLのゲノム異常を比較し、急性型に特徴的な領域を見いだした。そのうちの9p21.3欠失は慢性型の急性転化時に変化した遺伝子であり、本遺伝子のATLの急性転化への重要な役割が示唆された。
2. 慢性型と急性型ATLのゲノム異常様式には類似点も多くあり、これらの役

割を検討することは今後重要な研究課題である。

3. 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、一部、責任遺伝子を詳細に解析することができた。特に、急性転化に関与する9p21.3領域の責任遺伝子はCDK2Aであり、それがコードするタンパクのうちINK4aが責任遺伝子であることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.

4. 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.
5. 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.

2. 学会発表

1. Karube K., Seto, M.: Genomic and functional analyses of NK-cell neoplasms. 4th T cell lymphoma forum, 2011, サンフランシスコ(米国), [口演] 2012. 1. 26
2. 吉田 稚明, 海野 啓, Liu Fang, 在田 幸太郎, 加留部 謙之輔, 都築 忍, 大島 孝一, 瀬戸 加大: ゲノム異常陽性 PTCL, NOS におけるサブクローンの存在. 第 52 回日本リンパ網内系学会総会, 2012, 福島ビューホテル(福島) [口演] 2012. 6. 15

3. 吉田 稚明, 海野 啓, Liu Fang, 在田 幸太郎, 加留部 謙之輔, 都築 忍, 大島 孝一, 瀬戸 加大: ゲノム異常陽性 PTCL, NOS におけるサブクローンの存在. 第 52 回日本リンパ網内系学会総会, 2012, 福島ビューホテル(福島) [ポスター (示説)] 2012. 6. 16
4. 加留部 謙之輔, 都築 忍, 中村 栄男, 瀬戸 加大: NK 細胞性腫瘍に特異的ながん抑制遺伝子である FOXO3. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012, ロイトン札幌(札幌) [ポスター (示説)] 2012. 9. 19
5. 吉田 稚明, 海野 啓, 劉 芳, 在田 幸太郎, 加留部 謙之輔, 都築 忍, 大島 孝一, 瀬戸 加大: ゲノム異常陽性の末梢性 T 細胞性リンパ腫、非特異型におけるサブクローンの存在. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012, ロイトン札幌(札幌) [口演] 2012. 9. 20
6. 加留部 謙之輔, 大島 孝一, 瀬戸 加大: 悪性リンパ腫の臨床病理および分子病態の解析. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012, ロイトン札幌(札幌) [口演] 2012. 9. 21
7. Noriaki Yoshida, Akira Umino, Fang Liu, MD, Kotaro Arita, Kennosuke Karube, MD, Shinobu Tsuzuki, Koichi Ohshima, and Masao Seto.: Identification of Multiple Subclones in Peripheral T-Cell Lymphoma, Not Otherwise Specified with Genomic Aberrations. 第 54 回米国血液学会総会, 2012, アトランタ

(米国) [口演] 2012. 12. 10

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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 ATL の成立・進展に関与する遺伝子異常の抽出を課題としている。抽出した遺伝子異常の ATL 病態への寄与を実験的に解明するために、本分担課題研究では、昨年度、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。

A. 研究目的

ATL で見られる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目的で、昨年度、初代培養マウス T 細胞に簡便かつ高効率に遺伝子を導入する方法を確立した。本年度は、この方法によって、特定の遺伝子の腫瘍化への寄与をアッセイ可能かどうか検討した。

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。その際に既知のがん遺伝子である Myc, Bcl2, Ccnd1 をレトロウイルスにより T 細胞に導入した。 Myc と

Bcl2 は一つのウイルスベクターで発現させ、マーカーとして GFP を共発現させた。 Ccnd1 は別ベクターで発現させ、ヒト CD4 細胞外ドメインをマーカーとして共発現させた。従って GFP 陽性細胞は Myc と Bcl2 を共に発現する細胞であり、ヒト CD4 を発現する細胞は Ccnd1 を発現する細胞である。遺伝子導入した細胞をマウスに移植し、造腫瘍性や生体内での細胞動態を解析した。

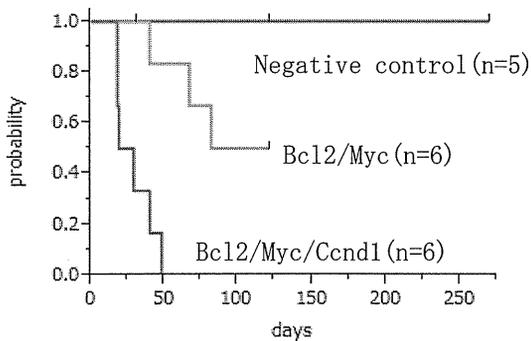
（倫理面への配慮）

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. 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 (図 1)。

図 1



2. マウスは、リンパ節・脾臓・胸腺などの肥大をきたし (図 2)、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 (図 3)。

図 2

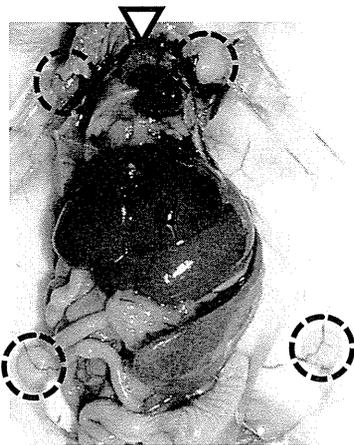
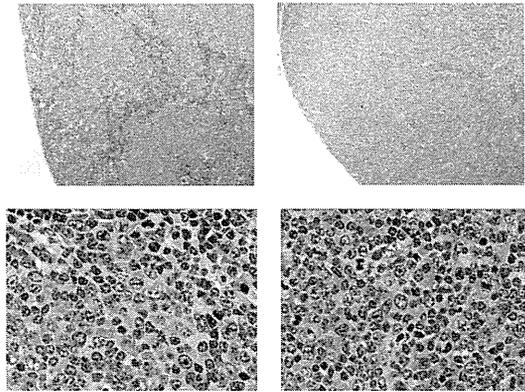


図 3



3. 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。
4. 発生した腫瘍は Bcl2+Myc の場合も、Bcl2+Myc+Cnd1 の場合も、ともに CD4 陽性 CD8 陰性であり、ATL に類似した表現型であった。

D. 考察

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である。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と考えられる。

E. 結論

1. 初代培養未分化造血細胞から誘導した T 細胞に Myc, Bcl2, Ccnd1 を組み合わせて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た。
2. 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。
3. 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。
4. 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. Liu F, Karube K, Kato H, Arita K, Yoshida N, Yamamoto K, Tsuzuki S, Kim W, Ko YH, Seto M.: Mutation analysis of NF- κ B signal pathway-related genes in ocular

MALT lymphoma. *Int J Clin Exp Pathol*, 5: 436-441, 2012.

2. 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.
3. 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 Med*, 1: 289-294, 2012.
4. 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. *Eur J Haematol*, 90: 51-58, 2013.
5. 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.
6. Karube K, Tsuzuki S, Yoshida N, Arita K, Kato H, Katayama M, Ko YH, Ohshima K, Nakamura S, Kinoshita T, Seto M.: Comprehensive gene

expression profiles of NK cell neoplasms identify vorinostat as an effective drug candidate. *Cancer Lett*, (in press)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

2. 学会発表

1. 岸本 渉, 錦織桃子, 田嶋政治, 山本 玲, 坂井智美, 都築 忍, 瀬戸加大, 高折晃史.: Establishment of a mouse model for mantle cell lymphoma. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012, 札幌、ポスター (示説)
2. 加留部謙之輔, 都築 忍, 中村栄男, 瀬戸加大.: FOXO3 is a lineage-specific tumor suppressor gene to NK cell neoplasms. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012, 札幌、ポスター (示説)
3. 都築 忍, 瀬戸加大.: Cooperation of altered AML1/RUNX1 with BCR-ABL in inducing blast crisis-like disease of chronic myelogenous leukemia. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012, 札幌、ポスター (示説)
4. 吉田稚明, 海野 啓, 劉 芳, 在田幸太郎, 加留部謙之輔, 都築 忍, 大島孝一, 瀬戸加大.: Identification of multiple subclones in Peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified with genomic aberrations. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012, 札幌、口演

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

TAX-specific CTL の ATLL 病変における分布の臨床病理的研究

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

HTLV-1 の Tax の発現は、多くの ATLL 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 ATLL との関連ははっきりしていない。また、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。今回、Tax-specific CTL と FoxP3 の発現の関連を ATLL のリンパ腫において研究を行ったところ、一部の症例で、ATLL 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 FOX p 3 陽性の症例では優位に低く、FOX p 3 による免疫抑制の関与が考えられた。

A. 研究目的

ATLL 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、考えられてが、Tax の発現は、多くの ATLL 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 ATLL との関連ははっきりしていない。また、ATLL 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。今回、Tax-specific CTL と FoxP3 の発現の関連を ATLL のリンパ腫において研究を

行った。

B. 研究方法

- 1) 症例は、病理および臨床診断で ATLL と確定できた症例を選択した。
- 2) PCR法で HLA-A24 の確定できた 14 例の ATLL の凍結材料を用いた。
- 3) MHC dextramer により HLA-A24 restricted Tax-specific CTL を蛍光染色を、凍結材料からの薄切切片で行った。
- 4) CD20, CD3, CD4, CD8, TIA-1, FOXP3 の免疫染色を凍結材料からの薄切切片で行った。
- 5) ホルマリ固定材料で、CD20, CD3, CD45RO, CD4, CD8, TIA-1, FoxP3 の免疫染色も行った。

(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

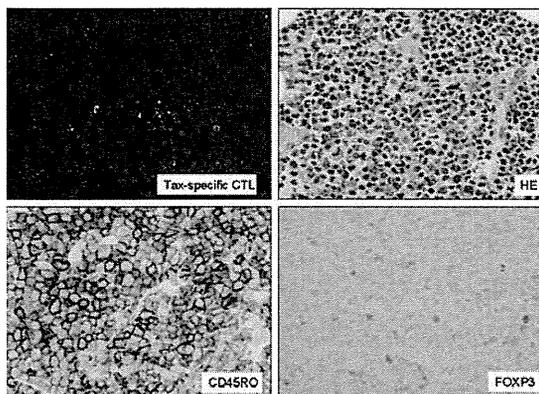


図 Case2 HE: Large cell variant, CD45RO: positive, FOXP3 positive rate: 2%

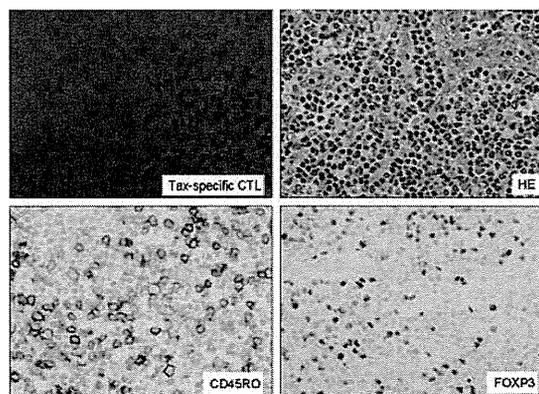


図 Case6 HE: Small cell variant, CD45RO: positive, FOXP3 positive rate: 40%

Case	Sex	Age	Morphology	CD3	CD4	CD8	FOXP3 positive rate(%)	Tax-CTL
1	M	76	Large	+	+	-	10	4
2	M	55	Large	+	+	+	2	4
3	F	69	Hodgkin like	+	+	-	90	0
4	F	72	Small	+	+	-	20	6
5	M	62	Small	+	+	+	50	0
6	F	76	Small	+	+	-	40	0
7	M	73	Large	+	+	+	10	2
8	F	89	Large	-	+	-	2	0
9	M	75	Small	+	+	+	40	0
10	F	71	Small	+	+	-	5	6
11	M	61	Large	+	+	-	7	7
12	M	69	Anaplastic	+	+	-	7	5
13	F	72	Large	+	+	+	10	4
14	F	66	Large	+	+	-	0	8

Large: Large cell predominant, Small: Small cell predominant, Anaplastic: Anaplastic variant

		Tax-CTL (mean)	
Foxp3 expression	Foxp3 positive rate>30%	4.6	p=0.0006
	Foxp3 positive rate<30%	0	
Morphology	Small cell predominant	2	p=0.17
	Large cell predominant	4	
	Anaplastic variant	5	

症例では、ATLL 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、FOX p 3 陽性の症例では優位に低い傾向がみられた。

D. 考察

ATLL 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 ATLL 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 ATLL との関連ははっきりしていない。また、ATLL 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とされていたが、今回の研究により、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、形態との関連はみられなかったが、FOX p 3 陽性の症例では優位に低い傾向がみられたことより、FOX p 3 による免疫抑

制の関与が考えられた。今後、ワクチン療法の開発においての検討が期待される。

E. 結論

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、FOX p 3 陽性の症例では優位に低い傾向がみられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.

8. 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.

2. 学会発表

1. Ayako Ichikawa, Junichi Kiyasu, Fumiko Arakawa, Yoshizo Kimura, Masanori Takeuchi, Maki Yoshida, Hiroaki Miyoshi, Kensaku Sato, Daisuke Niino, Yasuo Sugita, Koichi Ohshima: Detection of Tax-specific cytotoxic T lymphocyte in lymph nodes of adult T-cell leukemia/lymphoma. 第71回日本癌学会総会、札幌、2012年9月20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（がん臨床研究事業）
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 與
公益財団法人慈愛会 今村病院分院 院長

研究要旨

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）患者の治療後に慢性型 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。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、ゲノム異常様式は異なり、ゲノム異常数は、慢性型 ATL の方が多かった（図 1）。ALCL で認める 7, 17 番染色体の gain 異常は共通であるが、異常領域は異なった。本例の慢性型 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（図 2）、急性転化に関わるゲノム異常と考えられる。

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) キャリアから長期潜伏期間の後、発症する末梢性 T 細胞腫瘍である。HTLV-1 からどのようなゲノム異常が積み重なって発症し、さらに進展するのか完全には明らかにされていない。

HTLV-1 キャリアの ALCL 患者の治療後、慢性型 ATL を発症し、早期に急性転化を起こした症例を経験した。本症例の両疾

患のゲノム異常の関連性について探索することを旨とした。

B. 研究方法

症例：58歳、男性。2010年11月全身のリンパ節腫脹がみられた。血清抗HTLV-1抗体は陽性であった。リンパ節生検では、ALK 陰性未分化大細胞リンパ腫（anaplastic large cell lymphoma: ALCL）の診断であった。リンパ腫細胞の免疫染色では、CD4, CD30, CD25, TIA-1, Granzyme B陽性、EBER 陰性で、サザンブロット検査では、HTLV-1

プロウイルスのモノクローナルな組み込みを認めなかった。染色体検査では、3倍体の複雑核型 [1/20]、46 XY, t(2;14)(q11.2; q13) [1/20], 46 XY, t(9;14)(q22; q22) [1/20], 46 XY [17/20]を認めた。TCR C β の再構成は認めなかった。化学療法にて、寛解が得られた後、自家末梢血幹細胞移植を施行し、経過観察となった。2012年12月末梢血中に異常リンパ球の増加（白血球数16750/ μ l, 異常リンパ球76%）がみられ、慢性型ATLと診断した。慢性型ATL診断後、2週間後に動眼神経麻痺がみられた。精査の結果、ATLの中樞神経浸潤と判明し、急性転化と診断した。

検体及び方法：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を採取した（慢性型ATL診断後早期に中樞神経浸潤により急性転化したが、末梢血には変化のない時期の未治療末梢血CD4陽性細胞を用いた）。400K array CGH (Agilent Cat# G4448)を用いてゲノム異常を調べ、Genomic Workbench のADM-2 threshold 6.0で異常領域の解析を行った。コントロールとして8名の男性DNA mixを用いた。

（倫理面への配慮）

ALCL や ATL 患者は疾患や予後について大きな不安を抱えているので、十分な配慮のもとに説明を行い同意を得た。

C. 研究結果

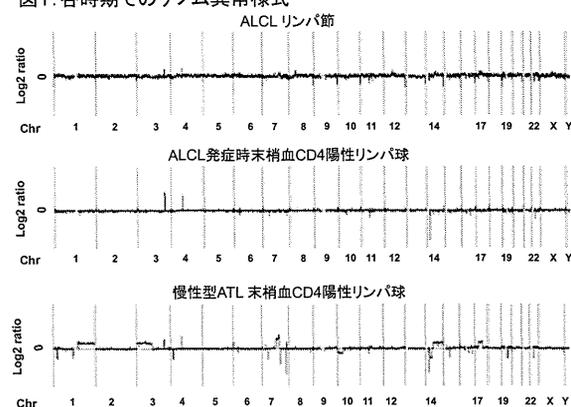
3 検体ともに共通して CNV 部に異常が認められ、同一患者由来のDNAであった。

ALCL と慢性型 ATL では、ゲノム異常様

式は異なり、ゲノム異常数は、慢性型 ATLの方が多かった（図1）。ALCLで認める7, 17番染色体のgain異常は慢性型ATLでも認める異常部位であるが、異常領域は異なった。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。

ALCL 発症時の末梢血検体では、CNV 部のみの異常であった。

図1:各時期でのゲノム異常様式



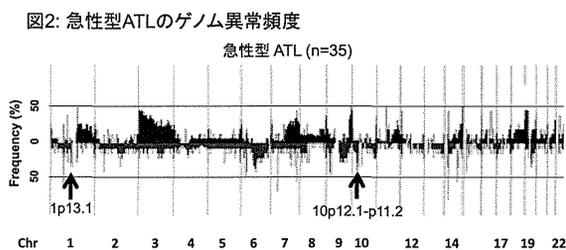
D. 考察

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。

ALK 陰性 ALCL では、1q41-qter 及び 6p21.2 のゲノム増幅異常が特徴的とされている (Br J Haematol, 2008; 140: 516-26)。また、7q, 17q12-21 の増幅は ALK に関わらず ALCL で約 15-20%程度認められる異常部位と報告されている (Br J Haematol, 2008; 140: 516-26, ASH 2011 abstr # 2634)。本例の ALCL 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 患者の 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る (図 2)。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示唆された。



E. 結論

ATL 細胞のゲノム異常の一部は ATL の進展と関連する可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Kannagi M, Hasegawa A, 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
 7. Nishikawa H, Maeda Y, Ishida T, Gnjatic 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.
 8. 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.
 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, Kuosawa G, Morishita K.: Clinical significance of CADM1/TSLC1/IgSF4 expression in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leukemia*, 26: 1238-1246, 2012.
 10. 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.
 11. 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.
- 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 今泉 芳孝
長崎大学病院 血液内科 助教

研究要旨

成人 T 細胞白血病リンパ腫(ATL)は human T-lymphotropic virus type-I (HTLV-1)によっておこる末梢性 T 細胞腫瘍(PTCL) である。ATL は予後不良な疾患であるが、近年、同種造血幹細胞移植や抗体医薬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選択の重要性が高まっている。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。

A. 研究目的

成人 T細胞白血病リンパ腫 (ATL) は human T-lymphotropic virus type-I (HTLV-1) によっておこる末梢性 T細胞腫瘍 (PTCL) である。HTLV-1 キャリアにおいて、細胞病理学的に末梢性 T細胞腫瘍と診断されれば臨床的には ATL と診断される。Southern blot hybridization (SBH) 解析を用いて腫瘍細胞における HTLV-1 の単クローン性組み込みを確認できれば ATL の診断は確実となる。しかし、検体中の ATL 細胞の population が少なく SBH で HTLV-1 感染細胞の単クローン性

増殖が証明できない症例も存在する。そのような症例の診断、治療は臨床的に重要な問題点であり、ゲノム解析の結果、より精度の高い診断方法を開発することで、治療方針決定に有用な情報をもたらすことが期待される。我々は自験例で retrospective な検討を行い、診断が困難であった症例の頻度、臨床的特徴について検討した。

B. 研究方法

抗 HTLV-1 抗体陽性で、当院検査部で HTLV-1 の SBH 解析を施行し、久留米大学病理学教室で病理診断を行った症例のうち、B