

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關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領域が關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關与するが、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っており、がん關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 発症や病態に關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 ATLL(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)。

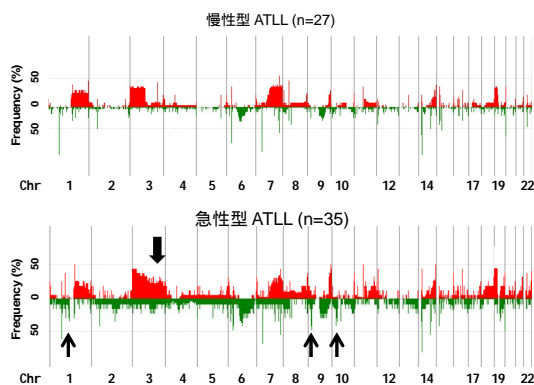


図1.慢性型と急性型 ATLL のゲノム異常領域の頻度の比較。矢印は急性型に特徴的な領域を示す。

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)

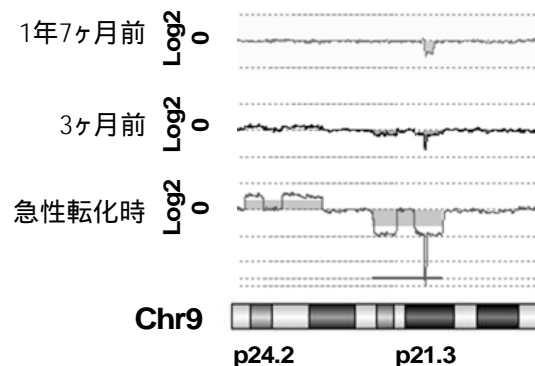


図2.急性転化を起こした慢性型症例の9p21.3領域の経時的変化

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)

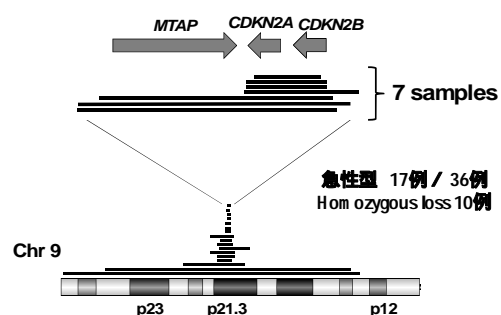


図3.9p21.3領域の責任遺伝子はCDKN2AかCDKN2Bである

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)。

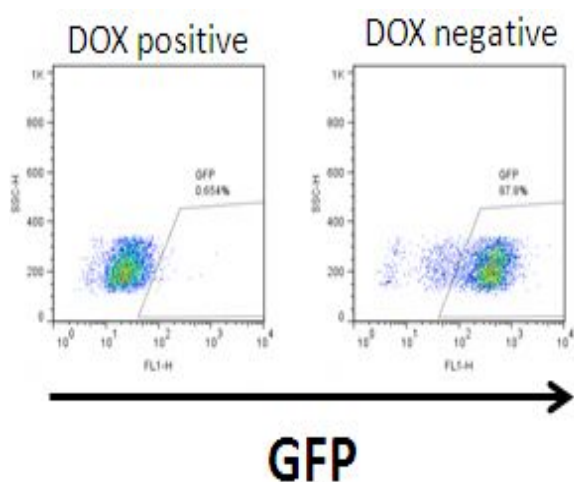


図4. 遺伝子発現誘導系での効果的な遺伝子発現誘導

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関連させて検討し、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関連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- 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, Kenosuke 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