

201313039A

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 瀬戸 加大

平成26(2014)年4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 ..... 11  
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 研究のための新しい実験系の創出 ..... 16  
都築忍 (愛知県がんセンター研究所・遺伝子医療研究部)
3. 末梢性 T 細胞性リンパ腫 T ゾーン型の臨床病理的研究 ..... 21  
大島孝一 (久留米大学医学部・血液病理学)
4. 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 ..... 25  
宇都宮典 (慈愛会今村病院分院・血液内科)
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 ..... 30  
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 ..... 34

# 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

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

本研究班は上記タイトルで、研究結果を臨床へと展開することに大きな重みをおいて共同研究を行った。臨床家の洞察と病理学者の診断力、推察力が大きな力を発揮し、基礎研究者とともに緊密な共同研究が行われ、当初の予想を上回る成果が得られたと考えられている。3年間の間に27症例もの慢性型ATL症例を集積できたのは臨床家が普段から患者と緊密で信頼関係を保っているため、協力が得られたと考えている。また、主任研究者らの研究グループは他の臨床研究グループともよく連携できているので、急性型に関しては、当研究班班員以外の協力も得られたことを申し添える。3年目の成果としては、慢性型ATLの急性転化機構に関連する責任遺伝子群を見出せたことは大きな成果である。しかしながら、これらの研究成果は塚崎班の、別の患者コホートでの検証が必要であり、その意味では、現在走っている臨床研究コホートは当研究班にとっても塚崎班にとっても、大変重要な意義がある。

研究分担者	所属施設名	職名	
都築 忍	愛知県がんセンター研究所	室長	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、エピゲ
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	
A. 研究目的			ノム解析および機能解析も組み合わせ
ATL においては、いくつかの遺伝子			

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、臨床的に有用なマーカーの確立ならびに分子病態の解明を目的とする。

## B. 研究方法

各研究分担報告書参照

## C. 研究結果

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)は感染者のうち2-5%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。本研究の目的は、ATL 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、腫瘍化や急性転化、病型変化などへの関与を機能的に解明し、病型変化の早期発見のマーカーを確立することである。ATL の臨床病型の中で、慢性型 ATL は均一な病態を示し緩徐進行性な病型と考えられていたが、うち半数例が急性型へ移行し、死亡している。このことから慢性型 ATL に着目し、急性型 ATL と合わせて分子病態の解析を実施した。

27 例の慢性型 ATL ならびに 35 例の急性型 ATL (うち 1 例は慢性型から急性型への連続サンプル) を対象とし、オリゴレイ CGH でそのゲノム異常解析を実施した。両病型のゲノム異常様式は似通っていたが、幾つか急性型

ATL でのみ高頻度に認めるゲノム異常部位が存在していた。このうち 9p21.3 部のゲノム欠失は慢性型 ATL と比べて急性型 ATL で特に特徴的であったため同部に着目した。その欠失部に存在する遺伝子のうち、CDKN2A の mRNA 発現値のみが 9p21.3 欠失に伴い低下していた。1 例得られた連続サンプルでの評価でも、急性転化期につれて 9p21.3 にゲノム欠失が生じ、CDKN2A の発現値が著減していた。このため CDKN2A は急性転化に関与する責任遺伝子の一つと考え、機能解析を ATL 細胞株を用いて実施した。CDKN2A (INK4a と ARF) の導入により ATL 細胞株の増殖抑制を認め、ATL の病態生理においてがん抑制遺伝子として機能していることを確認した。CDKN2A は細胞周期の負の調節因子として働くことが知られている。このことから、細胞周期の脱制御が急性転化機構にとって重要であると考えられる。臨床像として、慢性型 ATL の中で細胞周期関連遺伝子部にゲノム異常を有する群は有しない群に比べて有意に予後不良であり、また累積急性転化発症率も高い傾向を認めた。このことは、CDKN2A を始めとする細胞周期関連遺伝子が慢性型 ATL の急性転化に関与していることを示しており、またこれら遺伝子は新規急性転化予測マーカーとなりうる可能性がある。慢性型と急性型 ATL のゲノム異常の比較から、急性型に特徴的なゲノ

ム異常領域を 9p21.3 を含む 4 か所見出し、そのうちの 3 か所から責任遺伝子を見出すことに成功した。これらは、慢性型 ATL の急性転化の予測マーカーとしても有用であることを明らかにした。

また、マウス正常 T 細胞に遺伝子を複数導入して、Flower 細胞の出現を伴う急性型 ATL に類似したリンパ腫モデルを作成することに成功した。薬剤スクリーニングなどを行うとともに、本実験モデルは治療実験にも用いることができるのでそのインパクトは大きい。

#### D. 考察

慢性型 ATL 急性型 ATL のゲノム異常を比較することで、HTLV-1 感染後の初期のゲノム異常と急性転化するときのゲノム異常が判明しつつあると考えている。それら 4 領域のうちの 3 領域から、責任遺伝子を見出せたことは大きな成果である。本研究班は研究費の額のため、次世代シーケンスなどの手法をとることができなかったが、それに匹敵する成果をることができたと自負している。次世代シーケンスによる解析がもたらす結果は、各患者個人ごとに遺伝子変化の蓄積が異なるということである。すでに、B 細胞リンパ腫で明らかにされているように、患者は多様なゲノム異常を蓄積している。昨年度の研究成果で明らか

にしたように、特に、ATL はゲノム異常が高頻度に認められ、次世代シーケンスによる解析がもたらす成果は、ピンポイントの遺伝子を抽出できたとしてもその意義づけは困難であることは、B 細胞腫瘍での成果から容易に推測される。現時点で臨まれる研究の方向性は、当研究班の成果の確認と、見出されているゲノム異常をいかに効率よく見出すかという点にかかっている。その意味では、検査会社などとの共同研究を行うなど、より簡便で、臨床に直接的に還元できるシステムを確立することである。また、当研究班としては、これまでに見出した成果に基づき、免疫染色や遺伝子セットの組み合わせを工夫することでより精度の高い送別化ができるようになる必要がある。具体的には細胞周期遺伝子群の異常は現在の組み合わせだけでよいのかどうかを考慮する必要がある。たとえば、アレイ CGH の解析では TP53 遺伝子の異常はあまり検出されないが、本遺伝子について、シーケンスにより遺伝子変異の解析やメチレーションの解析を加える必要がある。それらを加えて、現コホートを再検討することは重要である。

#### E. 結論

各個の研究成果については分担研究報告を参照

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 論文発表

1. 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*, 333: 47-55, 2013.
2. Arita K, Maeda-Kasugai Y, Ohshima K, Tsuzuki S, Suguro-Katayama M, Karube K, Yoshida N, Sugiyama T, Seto M.: Generation of mouse models of lymphoid neoplasm using retroviral gene transduction of in vitro-induced germinal center B and T cells. *Exp Hematol*, 41: 731-741, 2013.
3. Yamamoto K, Tsuzuki S, Minami Y, Yamamoto Y, Abe A, Ohshima K, Seto M, Naoe T.: Functionally deregulated AML1/RUNX1 cooperates with BCR-ABL to induce a blastic phase-like phenotype of chronic myelogenous leukemia in mice. *PLoS One*, 8: e74864, 2013.
4. Yoshida N, Oda M, Kuroda Y, Katayama Y, Okikawa Y, Masunari T, Fujiwara M, Takashi Nishisaka, Sasaki N, Sadahira Y, Mihara K, Asaoku K, Matsui H, Seto M, Kimura A, Arihiro K, Sakai A.: Clinical significance of sIL-2R levels in B-cell lymphomas. *PLOS One*, 8: e78730, 2013.
5. Watanabe Y, Suefuji H, Hirose Y, Kaida H, Suzuki G, Uozumi J, Ogo E, Miura M, Takasu K, Miyazaki K, Nakahara K, Ishibashi M, Okamura T, Ohshima K, Hayabuchi N.: 18F-FDG uptake in primary gastric malignant lymphoma correlates with glucose transporter 1 expression and histologic malignant potential. *Int J Hematol*, 97: 43-49, 2013.
6. Ando M, Sato Y, Takata K, Nomoto J, Nakamura S, Ohshima K, Takeuchi T, Orita Y, Kobayashi Y, Yoshino T.: A20 (TNFAIP3) deletion in Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders/lymphomas. *PLoS One*, 8: e56741, 2013.
7. 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.
8. Ishimura M, Yamamoto H, Mizuno Y, Takada H, Goto M, Doi T, Hoshina T, Ohga S, Ohshima K, Hara T.: A non-invasive diagnosis of histiocytic necrotizing lymphadenitis by means of gene expression profile analysis of peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Immunol*, 33: 1018-1026, 2013.
  9. Niino D, Tsuchiya T, Tomonaga M, Miyazaki Y, Ohshima K.: Clinicopathological features of acute megakaryoblastic leukaemia: Relationship between fibrosis and platelet-derived growth factor. *Pathol Int*, 63: 141-149, 2013.
  10. Arita K, Maeda-Kasugai Y, Ohshima K, Tsuzuki S, Suguro-Katayama M, Karube K, Yoshida N, Sugiyama T, Seto M.: Generation of mouse models of lymphoid neoplasm using retroviral gene transduction of in vitro-induced germinal center B and T cells. *Exp Hematol*, 41: 731-741, 2013.
  11. Kimura Y, Arakawa F, Kiyasu J, Miyoshi H, Yoshida M, Ichikawa A, Niino D, Sugita Y, Okamura T, Doi A, Yasuda K, Tashiro K, Kuhara S, Ohshima K.: The Wnt signaling pathway and mitotic regulators in the initiation and evolution of mantle cell lymphoma: Gene expression analysis. *Int J Oncol*, 43: 457-468, 2013.
  12. Ichikawa A, Arakawa F, Kiyasu J, Sato K, Miyoshi H, Niino D, Kimura Y, Takeuchi M, Yoshida M, Ishibashi Y, Nakashima S, Sugita Y, Miura O, Ohshima K.: Methotrexate/iatrogenic lymphoproliferative disorders in rheumatoid arthritis: histology, Epstein-Barr virus, and clonality are important predictors of disease progression and regression. *Eur J Haematol*, 91: 20-28, 2013.
  13. Teshima K, Nara M, Watanabe A, Ito M, Ikeda S, Hatano Y, Ohshima K, Seto M, Sawada K, Tagawa H.: Dysregulation of BMI1 and microRNA-16 collaborate to enhance an anti-apoptotic potential in the side population of refractory mantle cell lymphoma. *Oncogene*, 2013 May 20, doi: 10.1038/onc.



- 2013.177. [Epub ahead of print]
14. Kim SW, Yoon SS, Suzuki R, Matsuno Y, Yi HG, Yoshida T, Imamura M, Wake A, Miura K, Hino M, Ishikawa T, Kim JS, Maeda Y, Lee JJ, Kang HJ, Lee HS, Lee JH, Izutsu K, Fukuda T, Kim CW, Yoshino T, Ohshima K, Nakamura S, Nagafuji K, Suzumiya J, Harada M, Kim CS. : Comparison of outcomes between autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for peripheral T-cell lymphomas with central review of pathology. *Leukemia*, 27: 1394-1397, 2013.
  15. Tamai Y, Hasegawa A, Takamori A, Sasada A, Tanosaki R, Choi I, Utsunomiya A, Eto T, Koh H, Suehiro Y, Kato K, Takemoto S, Okamura J, Uike N, Kannagi M. : Identification of an HLA-DRB1\*0101-restricted dominant epitope of Tax-specific CD4+ T-cells augmenting in vitro CTL expression in ATL patients after allo-HSCT. *J Immunol* 190: 4382-4392, 2013.
  16. Nakano N, Kusumoto S, Tanaka Y, Ishida T, Takeuchi S, Takatsuka Y, Akinaga S, Mizokami M, Ueda R, Utsunomiya A. : Reactivation of hepatitis B virus in a patient with adult T-cell leukemia-lymphoma receiving the anti-CC chemokine receptor 4 antibody mogamulizumab. *Hepatol Res*, 44: 354-357, 2014.
  17. Asanuma S, Yamagishi M, Kawanami K, Nakano K, Sato-Otsubo A, Muto S, Sanada M, Yamochi T, Kobayashi S, Utsunomiya A, Iwanaga M, Yamaguchi K, Uchimarui K, Ogawa S, Watanabe T. : Adult T-cell leukemia cells are characterized by abnormalities of Helios expression that promote T-cell growth. *Cancer Sci*, 104: 1097-1106, 2013.
  18. Kinpara S, Kijiyama M, Takamori A, Hasegawa A, Sasada A, Masuda T, Tanaka Y, Utsunomiya A, Kannagi M. : Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) suppresses human T-lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) gene expression and cell cycling, while IFN- $\alpha$  combined with zidovudin induces p53 signaling and apoptosis in HTLV-1-infected cells. *Retrovirology*, 10: 52, 2013.
  19. Ishihara M, Araya N, Sato T, Tatsuguchi A, Saichi N, Utsunomiya A, Nakamura Y, Nakagawa H, Yamano Y, Ueda K. : Preapoptotic protease calpain-2 is frequently suppressed in adult T-cell leukemia. *Blood*,

- 121: 4340-4347, 2013.
20. Ando H, Sato T, Tomaru U, Yoshida M, Utsunomiya A, Yamauchi J, Araya N, Yagishita N, Coler-Reilly A, Shimizu Y, Yudo K, Nishioka K, Nakajima T, Jacobson S, Yamano Y. : Positive feedback loop via astrocytes causes chronic inflammation in virus-associated myelopathy. *Brain*, 136: 2876-2887, 2013.
  21. Ishida T, Hishizawa M, Kato K, Tanosaki R, Fukuda T, Takatsuka Y, Eto T, Miyazaki Y, Hidaka M, Uike N, Miyamoto T, Tsudo M, Sakamaki H, Morishima Y, Suzuki R, Utsunomiya A. : Impact of GVHD on allogeneic HCT for adult T-cell leukemia-lymphoma focusing on preconditioning regimens: nationwide retrospective study. *Biol Blood Marrow Transplant* 19: 1731-1739, 2013.
  22. Chihara D, Ito H, Matsuda T, Katanoda K, Shibata A, Taniguchi S, Utsunomiya A, Sobue T, Matsuo K. : Association between decreasing trend in the mortality of adult T-cell leukemia/ lymphoma and allogeneic hematopoietic stem cell transplants in Japan: Analysis of Japanese vital statistics and Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation (JSHCT). *Blood Cancer Journal*, 3:e159, 2013.
  23. Sato T, Coler-Reilly A, Utsunomiya A, Araya N, Yagishita N, Ando H, Yamauchi J, Inoue E, Ueno T, Hasegawa Y, Nishioka K, Nakajima T, Jacobson S, Izumo S, Yamano Y. CSF CXCL10, CXCL9, and neopterin as candidate prognostic biomarkers for HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *PLoS Negl Trop Dis*, 7: e2479, 2013.
  24. Taguchi M, Imaizumi Y, Taguchi J, Imanishi D, Sasaki D, Hasegawa H, Tsushima H, Hata T, Miyazaki Y. : Transient proliferation of donor-derived ATL cell-like lymphocytes early after allogeneic stem cell transplantation in an adult T-cell leukemia/lymphoma patient. *Blood*, 121: 4428-4430, 2013.
  25. Fukushima T, Itonaga H, Moriuchi Y, Yoshida S, Taguchi J, Imaizumi Y, Imanishi D, Tsushima H, Sawayama Y, Matsuo E, Hata T, Miyazaki Y. : Feasibility of cord blood transplantation in chemosensitive adult T-cell leukemia/lymphoma: a

retrospective analysis of the Nagasaki Transplantation Network. Int J Hematol, 97: 485-490, 2013.

26. 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, 19: 607-615, 2013.

## 2.学会発表

1. 吉田稚明、加留部謙之輔、宇都宮與、塚崎邦弘、今泉芳孝、平良直也、鵜池直邦、海野啓、在田幸太郎、片山幸、都築忍、大島孝一、瀬戸加大.: Cell cycle 関連遺伝子の異常が慢性型 ATL の急性転化に関与する. 2013. 5. 17. 第 53 回日本リンパ網内系学会, 京都, 口演
2. 吉田稚明、加留部謙之輔、宇都宮與、塚崎邦弘、今泉芳孝、平良直也、鵜池直邦、海野啓、在田幸太郎、片山幸、都築忍、大島孝一、瀬戸加大.: Cell cycle 関連遺伝子の異常が慢性型 ATL の急性転化に関与する. 2013. 5. 18. 第 53 回日本リンパ網内系学会, 京都, ポスター (示説)
3. 都築 忍、片山幸、吉田稚明、在田幸太郎、大島孝一、瀬戸加大.: インビトロで誘導した T 細胞への遺伝子導入によるマウスリンパ腫モデル. 2013. 10. 05. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, ポスター (示説)
4. 勝呂 幸、田川博之、竹内一郎、吉田 稚明、在田幸太郎、都築 忍、瀬戸 加大.: リンパ腫を形成するクローン細胞の多様性は、臨床病態を反映する. 2013. 10. 04. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, ポスター (示説)
5. 吉田稚明、加留部謙之輔、宇都宮與、塚崎邦弘、今泉芳孝、平良直也、鵜池直邦、海野啓、在田幸太郎、片山幸、都築忍、大島孝一、瀬戸加大.: Cell cycle 関連遺伝子の異常が慢性型 ATL の急性転化に関与する. 2013. 10. 05. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 口演
6. 在田幸太郎、都築忍、大島孝一、杉山敏郎、瀬戸加大.: レトロウイルスによる正常 B 細胞への遺伝子導入を

- 用いたB細胞リンパ腫マウスモデル.  
2013. 10. 04. 第72回日本癌学会学術  
総会, 横浜, 口演
7. 都築 忍、瀬戸加大.: TEL(ETV6)-  
AML1(RUNX1)は自己複製能を有する  
胎児プロB細胞を開始する.  
2013. 10. 11. 第75回日本血液学会学  
術集会, 札幌, ポスター (示説)
  8. 吉田稚明、加留部謙之輔、宇都宮與、  
塚崎邦弘、今泉芳孝、平良直也、鶴  
池直邦、海野啓、在田幸太郎、片山  
幸、都築忍、大島孝一、瀬戸加  
大.: Cell cycle 関連遺伝子の異常が  
慢性型 ATL の急性転化に関与する.  
2013. 10. 11. 第75回日本血液学会学  
術集会, 札幌, 口演
  9. 在田幸太郎、都築忍、大島孝一、杉  
山敏郎、瀬戸加大.: 新規マウス胚中  
心由来 B 細胞リンパ腫モデル  
2013. 10. 11. 第75回日本血液学会学  
術集会, 札幌, 口演
  10. Ying Guo, Hiroaki Miyoshi, Fumiko  
Arakawa, Daisuke Niino, Koichi  
Ohshima: Clinicopathological  
analysis of Peripheral T Cell  
lymphoma T zone variant. 第53  
回日本リンパ網内系学会総会、京都、  
2013年5月18日
  11. Yoshitaka Imaizumi, Michinori  
Ogura, Naokuni Uike, Norio Asou,  
Atae Utsunomiya, Toshiki Uchida,  
Tomohiro Aoki, Kunihiro Tsukasaki,  
Jun Taguchi, Ilseung Choi, Dai  
Maruyama, Kisato Nosaka, Nianhang  
Chen, Tetsuhiro Shiota and Kensei  
Tobinai: Phase I Dose-Escalation  
Study of Lenalidomide in Relapsed  
Patients with ATL or  
PTCL(CC-5013-ATLL-001). 第75回日  
本血液学会学術総会、札幌、2012年  
10月13日
  12. Hiroaki Taniguchi, Yoshitaka  
Imaizumi, Makiko Horai, Masataka  
Taguchi, Junya Makiyama, Shinya  
Sato, Koji Ando, Yasushi Sawayama,  
Yuji Moriwaki, Emi Matsuo, Daisuke  
Imanishi, Jun Taguchi, Hideki  
Tsushima, Tomoko Hata, Hiroo  
Hasegawa, Shinichiro Yoshida,  
Yukiyoshi Moriuchi, Koichi Oshima,  
Yasushi Miyazaki.: Mogamulizumab  
in clinical practice for  
relapsed/refractory adult T-cell  
leukemia-lymphoma. 第75回日本血  
液学会学術総会、札幌、2012年10月  
12日
  13. Jynya Makiyama, Yoshitaka Imaizumi,  
Hiroaki Taniguchi, Yasushi  
Sawayama, Daisuke Imanishi, Jun  
Taguchi, Hideaki Tsushima, Tomoko  
Hata, Kunihiro Tsukasaki, Yasushi

Miyazaki. :Re-evaluation of  
VCAP-AMP-VECP in clinical practice  
for aggressive adult T-cell  
leukemia-lymphoma. 第75回日本血  
液学会学術総会、札幌、2012年10月  
11日

14. Noriaki Yoshida, Kennosuke Karube,  
Atae Utsunomiya, Kunihiro  
Tsukasaki, Yoshitaka Imaizumi,  
Naoya Taira, Naokuni Uike, Akira  
Umino, Kotaro Arita, Miyuki  
Katayama, Hsinobu Tsuzuki, Koichi  
Ohshima, Masao Seto. :Alterations  
of cell cycle-related genes are  
involved in transformation of  
chronic ATL. 第75回日本血液学会学  
術総会、札幌、2012年10月11日

15. 牧山純也、今泉芳孝、谷口広明、森  
脇裕司、澤山靖、今西大介、田口潤、  
對馬秀樹、波多智子、塚崎邦弘、宮  
崎泰司、当科における高齢者成人T  
細胞白血病・リンパ腫の診療実態と  
治療成績. 第53回日本リンパ網内系  
学会総会 : 2013年5月18日、京都

#### H.知的財産権の出願・登録状況

なし

## II. 分担研究報告書

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）  
分担研究報告書

慢性型 ATL の急性転化に関わる分子機構の解明

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

本班は 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。本研究では慢性型 ATL の急性転化機構の解明を試みた。網羅的ゲノム異常解析、ならびに機能解析から 9p21.3 に存在する *CDKN2A* の欠失が慢性型 ATL の急性転化機構に関与していることを見出した。本年は、これら網羅的ゲノム異常解析の結果と臨床情報を組み合わせ、見出したゲノム異常が慢性型 ATL 患者におけるバイオマーカーとなりうるか検討を実施した。その結果、慢性型 ATL 患者で、*CDKN2A* を含む Cell cycle 関連遺伝子の異常を持つ群は、持たない群に比べて予後不良であり、また急性転化しやすい傾向があることを見出した。

A. 研究目的

成人 T 細胞性白血病・リンパ腫 (ATL) は臨床病型から 4 つに分類される。このうち、予後良好な病型とされる慢性型 ATL 患者の半数が急性型へと移行し、死亡している。私たちは昨年までに、9p21.3 に存在する *CDKN2A* の欠失が慢性型 ATL の急性転化機構に関与していることを見出した。本年は臨床情報と、ゲノム異常解析の結果を合わせ、*CDKN2A* がバイオマーカーとなりうるかの検討を実施した。

B. 研究方法

慢性型 27 例、急性型 35 例の患者末梢血検体を共同研究者施設より得た。ATL 細胞

は CD4 陽性であるため、CD4 陽性細胞から DNA, RNA は抽出した。ゲノム異常解析は 400K or 44K oligo-array comparative hybridization (aCGH) (Agilent Technologies) を用い、遺伝子発現解析には 44K microarray Kit (Agilent Technologies) を用いた。

予後評価のために、全生存期間 (OS) と累積急性転化率を求めた。OS は診断日から原因を問わない死亡日、または最終フォローアップ日とした。累積急性転化率は、診断日から急性転化までの日数、あるいは治療介入日、または最終フォローアップ日とした。これらは Kaplan-Meier 法を用いて評価を行った。

患者情報は共同研究施設より得た。

(倫理面への配慮)

全ての患者には適切なインフォームドコンセントを実施し、了承を得ている。また、本研究は愛知県がんセンターにおける IRB の承認を得ている。全ての臨床情報については匿名化して得ている。

C. 研究結果

1. CDKN2A の欠失は慢性型 ATL27 例のうち 5 例、急性型 ATL35 例のうち 17 例で認め、有意に急性型で多い異常であった

(Fisher's exact test,  $P < 0.05$ )。また、急性型 ATL では 10 例が homozygous loss を示しているのに対し、慢性型ではいずれも heterozygous loss であった(図 1A)。慢性型 ATL では CDKN2A の欠失の有無により累積急性転化率に有意な差は認められなかった(図 1B)。

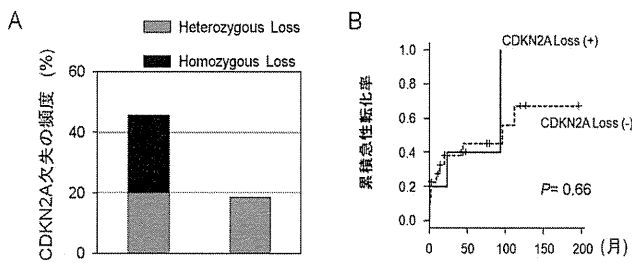
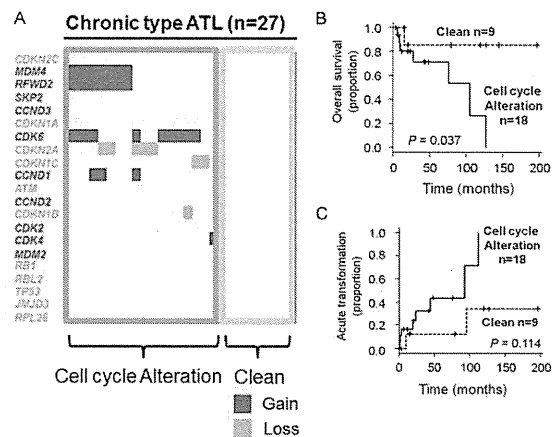


図 1

2. CDKN2A には INK4a と ARF という 2 つの transcriptional variants が存在している。昨年までの機能実験から、双方の欠失ともに ATL の病態生理に関与していることを見出している。これら INK4a、ARF はそれぞれ異なる経路で Cell cycle を制

御していることが知られている。このことから、CDKN2A (INK4a と ARF) の欠失を含む Cell cycle 関連遺伝子の異常が急性転化に関与している可能性があると考えた。このことを確かめるべく、慢性型 ATL 症例で Cell cycle 関連遺伝子のゲノム異常についてまとめた(図 2A)。そのように分類すると、慢性型 27 例中 18 例が 1 つ以上 Cell cycle 関連遺伝子の異常を有し (Cell cycle Alteration 群)、9 例は一つも認めなかった (Clean 群)。慢性型 ATL では、TP53 部の欠失や RB1 の欠失は認められなかったが、TP53 の機能を障害する *MDM4*、TP53 を分解する *RFWD2* のゲノム増幅を認めた。また *CDKN2A* 欠失と *CDK4* 増幅は mutual exclusion である傾向を認めた。

図 2



Cell cycle Alteration 群は Cell cycle の脱制御が生じていると考えられる。Cell cycle Alteration 群の予後は Clean 群に比べて有意に不良であり (Figure 2B)、また後に急性転化が生じている傾向を認めた (Figure 2C)。



#### D. 考察

本研究から、CDKN2A 欠失を含む Cell cycle 関連遺伝子の異常が急性転化に関与している可能性を見出した。急性型 ATL での CDKN2A の異常の多くは homozygous loss であるのに対し、慢性型では heterozygous loss であった。昨年までに報告した、慢性型から急性転化した症例の連続サンプルでの評価でも、CDKN2A 部は homozygous loss となり急性転化していた。また、CDKN2A を含む他の Cell cycle 関連遺伝子の異常を有する慢性型 ATL は有意に予後不良であり、また後に急性転化しやすい傾向があった。これらのことから、CDKN2A を始めとする Cell cycle 関連遺伝子の異常が協調しあい、急性転化、急性型 ATL の病態を維持している可能性があると考えられる。これら Cell cycle 関連遺伝子異常は、今後慢性型 ATL 患者にとって有用なバイオマーカーとなる可能性がある。

また、9p21.3 欠失の他に、1p13.1 欠失、3q 増幅、10p11 欠失も急性型に特徴的な部位であることを昨年までに報告している。これら異常部にも急性転化に関与する遺伝子が存在すると推測される。急性型症例内においてこれらゲノム異常の相互排他性を認めなかった。このことは、ATL の急性転化機構が遺伝子間の協調作用で生じている可能性を示唆する。

#### E. 結論

1. CDKN2A の欠失異常は慢性型 ATL と比較し急性型 ATL に有意に多い異常であったが、CDKN2A 欠失のみでは慢性

型 ATL のバイオマーカーとしては不十分であった。

2. CDKN2Aを含むCell cycle 関連遺伝子のゲノム異常は、慢性型ATL患者の予後予測マーカー、急性転化予測マーカーとなりうる可能性を見出した。
3. 9p21.3部以外のゲノム異常も急性転化に関与している可能性、またより良いバイオマーカーとなりうる可能性があり、今後解析が必要である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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.* 333(1):47-55, 2013.
2. Arita K, Maeda-Kasugai Y, Ohshima K, Tsuzuki S, Suguro-Katayama M, Karube K, Yoshida N, Sugiyama T, Seto M.: Generation of mouse models of lymphoid neoplasm using retroviral gene transduction of in vitro-induced germinal center B and T cells. *Exp Hematol.* 41(8):731-741, 2013.

3. Yamamoto K, Tsuzuki S, Minami Y, Yamamoto Y, Abe A, Ohshima K, Seto M, Naoe T.: Functionally deregulated AML1/RUNX1 cooperates with BCR-ABL to induce a blastic phase-like phenotype of chronic myelogenous leukemia in mice. PLoS One. 8(9):e74864, 2013.

4. Yoshida N, Oda M, Kuroda Y, Katayama Y, Okikawa Y, Masunari T, Fujiwara M, Takashi Nishisaka, Sasaki N, Sadahira Y, Mihara K, Asaoku K, Matsui H, Seto M, Kimura A, Arihiro K, Sakai A.: Clinical significance of sIL-2R levels in B-cell lymphomas. PLOS one 8(11):e78730, 2013.

## 2. 学会発表

1. 吉田稚明、加留部謙之輔、宇都宮與、塚崎邦弘、今泉芳孝、平良直也、鶴池直邦、海野啓、在田幸太郎、片山幸、都築忍、大島孝一、瀬戸加大.: Cell cycle 関連遺伝子の異常が慢性型 ATL の急性転化に関与する. 2013. 5. 17. 第 53 回日本リンパ網内系学会, 京都, 口演
2. 吉田稚明、加留部謙之輔、宇都宮與、塚崎邦弘、今泉芳孝、平良直也、鶴池直邦、海野啓、在田幸太郎、片山幸、都築忍、大島孝一、瀬戸加大.: Cell cycle 関連遺伝子の異常が慢性型 ATL の急性転化に関与する. 2013. 5. 18.

第 53 回日本リンパ網内系学会, 京都, ポスター (示説)

3. 都築 忍、片山幸、吉田稚明、在田幸太郎、大島孝一、瀬戸加大.: インビトロで誘導した T 細胞への遺伝子導入によるマウスリンパ腫モデル. 2013. 10. 05. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, ポスター (示説)

4. 勝呂 幸、田川博之、竹内一郎、吉田 稚明、在田幸太郎、都築 忍、瀬戸 加大.: リンパ腫を形成するクローン細胞の多様性は、臨床病態を反映する. 2013. 10. 04. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, ポスター (示説)

5. 吉田稚明、加留部謙之輔、宇都宮與、塚崎邦弘、今泉芳孝、平良直也、鶴池直邦、海野啓、在田幸太郎、片山幸、都築忍、大島孝一、瀬戸加大.: Cell cycle 関連遺伝子の異常が慢性型 ATL の急性転化に関与する. 2013. 10. 05. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 口演

6. 在田幸太郎、都築忍、大島孝一、杉山敏郎、瀬戸加大.: レトロウイルスによる正常 B 細胞への遺伝子導入を用いた B 細胞リンパ腫マウスモデル. 2013. 10. 04. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 口演

7. 都築 忍、瀬戸加大.: TEL(ETV6)-AML1(RUNX1)は自己複製能を有する胎児プロ B 細胞を開始する. 2013. 10. 11. 第 75 回日本血液学会学術集会, 札幌,

ポスター (示説)

8. 吉田稚明、加留部謙之輔、宇都宮與、塚崎邦弘、今泉芳孝、平良直也、鵜池直邦、海野啓、在田幸太郎、片山幸、都築忍、大島孝一、瀬戸加大. :Cell cycle 関連遺伝子の異常が慢性型 ATL の急性転化に関与する. 2013. 10. 11. 第 75 回日本血液学会学術集会, 札幌, 口演
9. 在田幸太郎、都築忍、大島孝一、杉山敏郎、瀬戸加大. :新規マウス胚中心由来 B 細胞リンパ腫モデル 2013. 10. 11. 第 75 回日本血液学会学術集会, 札幌, 口演

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、初代培養 T 細胞に任意の遺伝子を導入し、同細胞をマウスに移植することにより遺伝子の腫瘍原性を評価する系を確立した。本年度は ATL で発現する HLTV1 ウイルス由来 HBZ と、ATL 患者検体で発現の高い抗アポトーシス (Anti-Ap) 遺伝子, TCR-RS (TCR-RS) 遺伝子の 3 者の協調作用を検討した。その結果、これら 3 遺伝子は協調して T 細胞の増殖を強く促進することが判明した。3 遺伝子の協調は ATL 発症機構の一端を担う可能性がある。

A. 研究目的

ATL で見られる遺伝子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、昨年度までに本分担研究では、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独自に開発し、同法を利用することにより発癌過程における複数の遺伝子の協調作用をアッセイする方法を確立した。本年度は、本法を用いて、ATL で発現する遺伝子の腫瘍化における協調作用を検討した。

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 HLTV1 ウイルス由来 HBZ と、ATL で高発現する Anti-Ap 遺伝子, TCR-RS 遺伝子をレトロウイルスにより T 細胞に導入した。HBZ は 5' non-coding region を含むように発現させ、ヒト CD8 細胞外ドメインをマーカーとして共発現させた。活性型 TCR-RS 遺伝子は GFP マーカーとともに、また Anti-Ap 遺伝子はヒト CD4 細胞外ドメインマーカーとともに発現させた。遺伝子導入した細胞を *in vitro* で培養し、3 者の協調作用を検討した。

(倫理面への配慮)