

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、エピゲノム解析および機能解析も組み合わ
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
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、オリゴアレイ 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する必要がある。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, Uchimaru 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- (IFN-) suppresses human T-lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) gene expression and cell cycling, while IFN- 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 の急性転化に關与する. 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 の急性転化に關与する. 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 の急性転化に關与する. 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 の急性転化に關与する.
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