

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 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。

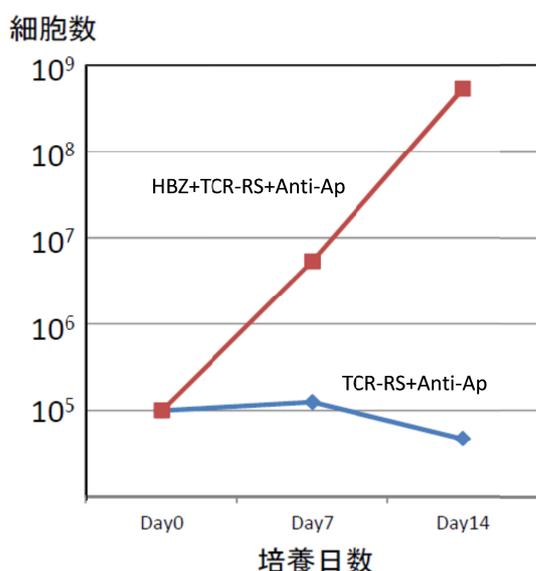
**(倫理面への配慮)**

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. INK4a/Arf<sup>-/-</sup> マウス由来胎児肝臓細胞から *in vitro* で誘導した T 細胞に HBZ, TCR-RS 遺伝子, Anti-Ap 遺伝子あるいはコントロールとして HBZ のみ、もしくは TCR-RS 遺伝子+Anti-Ap 遺伝子を発現させた T 細胞をサイトカイン非存在下で培養し、細胞増殖を比較した。HBZ 単独では細胞が速やかに減少したのに対し、HBZ, TCR-RS 遺伝子, Anti-Ap 遺伝子の 3 者を有する細胞は指数関数的に増殖し、一方 TCR-RS 遺伝子, Anti-Ap 遺伝子の 2 者を有する細胞はほとんど増殖しなかった (図 1)。

図 1

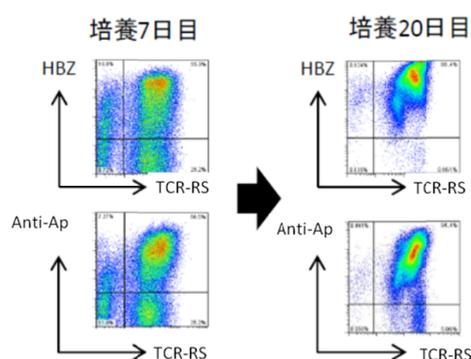


また、HBZ, TCR-RS 遺伝子, Anti-Ap 遺伝子の 3 者を有する細胞は、培養開始早期には全体の 50% を占めるにすぎな

かったにも関わらず、培養開始 20 日後には 95% を占めるに至り、3 者が協調して強く増殖促進に働くことが明らかとなった (図 2)。

現在、HBZ, TCR-RS 遺伝子, Anti-Ap 遺伝子の 3 遺伝子の *in vivo* での協調作用をマウス個体を用いて検討中であるが、3 者が協調して腫瘍化に働くとの予備的結果を得ている。

図 2



2. ATL 症例の一部で Notch1 遺伝子に変異が生じ、Notch1 経路が恒常的に活性化していることが知られている。そこで、次に HBZ, Tax, TCR-RS 遺伝子と Notch1 の組み合わせの T 細胞増殖への影響を検討した。INK4a/Arf<sup>-/-</sup> マウス由来胎児肝臓細胞から *in vitro* で誘導した T 細胞に HBZ+Tax (ヒト CD8 細胞外ドメインでマーク)、TCR-RS 遺伝子 (ヒト CD4 細胞外ドメインでマーク)、NOTCH1-ICN (GFP でマーク) を遺伝子導入して、*in vitro* での増殖態度を検討した。その結果、4 者を遺伝子導入した細胞は指数関数的に強い増殖能を示すことが明らかとなった。(Data not shown)。

## D. 考察

本研究により、初代培養マウスT細胞にATL関連遺伝子を導入することにより、そのT細胞増殖への影響を効率よく検討することが可能となった。導入遺伝子と同時にGFPやヒトCD4・ヒトCD8をマーカーとして発現させているため、細胞間競合を容易に追跡可能である。本系の使用により、HBZ, TCR-RS 遺伝子, Anti-Ap 遺伝子の3者が協調して強いT細胞増殖をもたらすことが初めて明らかとなった。この3遺伝子はATL患者検体で高発現あるいは活性化していることが知られていたが、その協調性については未検討であり、本システムはATL研究に有用な情報をもたらす可能性があることが示された。今後は、マウス個体での *in vivo* 解析を行い、さらにHTLV1ウイルスの主要ながん遺伝子であるTaxやHBZと、臨床検体のゲノム解析などで見出した付加的遺伝子異常をT細胞に再現することでATLの成立・進展機構を解析する計画である。

## E. 結論

1. Ink4a/Arf-null 初代培養未分化造血細胞から誘導したT細胞にHBZ, TCR-RS 遺伝子, Anti-Ap 遺伝子を組み合わせで遺伝子導入することにより、T細胞に強い増殖能が付与されることが明らかとなった。
2. TCR-RS遺伝子とAnti-Ap遺伝子の2者の組み合わせではT細胞は増殖しないことから、HBZが重要な役割を果たしていることが示唆され、したがってATL特異的な現象であると考えられる。

3. NOTCH1の活性型変異もATLの一部症例で見いだされているが、本研究では活性型NOTCH1とTCR-RS遺伝子の2者のみで強いT細胞増殖が見られ、ここにHTLV1関連遺伝子であるHBZやTaxを追加しても相乗効果は観察されなかった。
4. 本システムを用いてATL特異的に機能する遺伝子の組み合わせを明らかにすることにより、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. 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.

## 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、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