

201313039B

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23～25年度 総合研究報告書

研究代表者 瀬戸 加大

平成26（2014）年4月

目 次

I. 総合研究報告

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 (研究代表者 瀬戸加大)	1
---	---

特異な末梢性 T 細胞腫瘍のゲノム異常と病態
(瀬戸加大・愛知県がんセンター研究所・遺伝子医療研究部)

ATL 研究のための新しい実験系の創出
(都築忍・愛知県がんセンター研究所・遺伝子医療研究部)

末梢性 T 細胞性リンパ腫 T ゾーン型の臨床病理的研究
(大島孝一・久留米大学医学部・血液病理学)

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
(宇都宮典・慈愛会今村病院分院・血液内科)

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
(今泉芳孝・長崎大学病院・血液内科)

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	35
--------------------------	----

I. 総合研究報告書

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）
総合研究報告書

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。

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
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

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。

A. 研究目的

ATL においては、いくつかの遺伝子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せることで、ATL の病態により重要

B. 研究成果

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9p21.3w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、フラワー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。

*各々の研究成果については分担研究者の報告を参照

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。ATL の臨床病型のうち、慢性型 ATL に着目しその急性転化機構の解明を試みた。Oligo-array CGH と発現解析を組み合わせ慢性型 ATL の分子病態を解析し、それらを急性型 ATL の分子病態と比較することで急性転化に関与しているゲノム異常、ならびに責任遺伝子を見出した。中でも 9p21.3 部に存在する *CDKN2A* に着目し、ATL 細胞株を用いた機能実験から同遺伝子が ATL の病態生理にとって重要な働きを有することを見出した。また、慢性型 ATL 患者検体で、*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 HTLV-1 によって引き起こされ、臨床学的特徴により 4 つの病型分類される。このうちくすぶり型と慢性型は、悪性度の高いリンパ腫型、急性型に比べて比し緩徐進行性の予後良好な病型とされている。しかし、その予後良好な病型である慢性型 ATL 患者の半数が急性型へと移行し、死亡している。しかしその分子機構に関する集学的な研究は今までなされていなかった。

そこで、(1)慢性型 ATL、急性型 ATL のゲノム異常解析、発現解析を実施、両者を比較することで急性転化に関わるゲノム異常、遺伝子を抽出し、(2)次に ATL 細胞株を用いて急性転化に関わる遺伝子の機

能解析を実施し、(3)さらに臨床情報と合わせて慢性型患者の急性転化、ないし予後マーカーを発見することを目的とした。

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。遺伝子導入には Tet-OFF system (Clontech)を用いて、より精度の高い遺伝子導入を実施した。

(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。

C. 研究結果

【1:慢性型と急性型 ATL のゲノム異常解析】

慢性型と、急性型 ATL のゲノム異常様式は良く似通っていた (図 1)。特に 1p 増幅、3p 増幅、6q 欠失、7q 増幅、9q 欠失、14q 増幅、19 増幅は両者で 20%異常を認めた。一方で、1p13.1 の欠失、3q の増幅、9p21.3 の欠失、10p11 の欠失は急性型で特に特徴的であった (図 1、矢印)。従ってこれらは、急性転化に関与しているゲノム異常である可能性がある。中でも 9p21.3 の欠失は急性型で最も多く、また有意に急性型で多い異常であった。同部に存在する遺伝子は *CDKN2A*, *CDKN2B*, *MTAP* の 3 つであった。

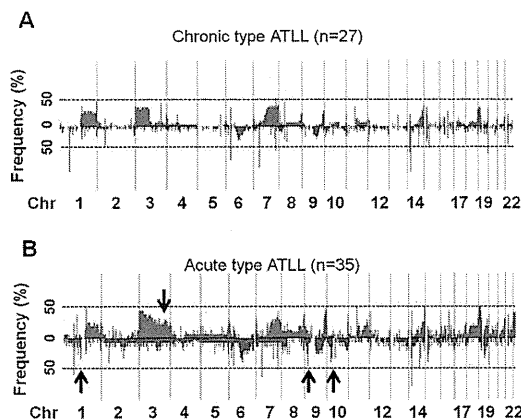


図 1

次に、それら 3 遺伝子の mRNA 発現がゲノム異常に伴い変化しているかどうかを評価した (図 2)。すると、急性型 ATL 検体内で *CDKN2A* の発現値のみが 9p21.3 欠

失に伴い変動していた。*CDKN2A* の発現値はまた、慢性型症例と比較しても有意に 9p21.3 欠失を伴う急性型サンプルで低値となっていた。このことから、*CDKN2A* が 9p21.3 部に存在する慢性型 ATL の急性転化に関与する遺伝子の一つであると考えた。

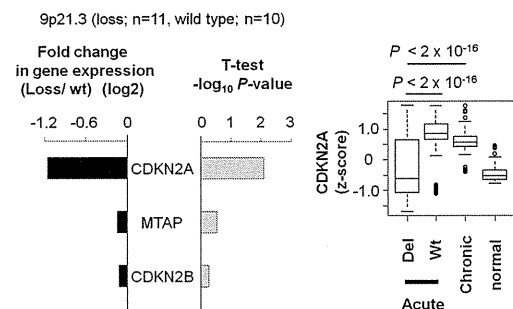


図 2

今回解析したうちの 1 例では、慢性型発症時、急性転化発症 3 ヶ月前、ならびに急性転化時の連続サンプルを得ることができた。本症例においても、9p21.3 部のゲノム欠失が急性転化時かけて出現しており、また急性転化にかけて *CDKN2A* の発現値が最も変化していた (図 3)。

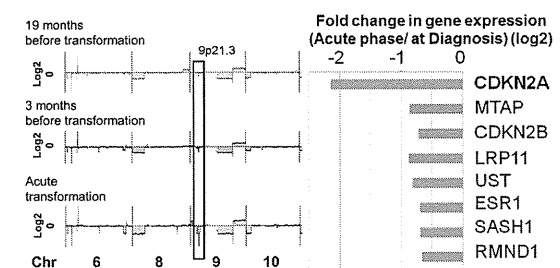


図 3

【2:ATL での *CDKN2A* の機能解析】

次に *CDKN2A* の機能解析について ATL 細胞株を用いて実施した。用いた細胞株は *CDKN2A* の欠失を認めた。*CDKN2A* には 2 つ

の transcriptional variants (INK4a, ARF) が存在する。このため両者をそれぞれ細胞株に導入した。

より精度高く目的遺伝子の機能を評価するため、Doxycycline (DOX) の有無により遺伝子導入が可能な系を樹立した。GFP を用いて確認したところ、約 80% の細胞に目的遺伝子の誘導ができ、また GFP の導入では細胞増殖抑制が出現しないことを確認した (図 4)。

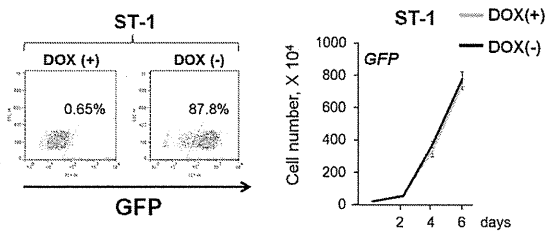


図 4

この系を用いて、INK4a と ARF の導入を実施した。すると、INK4a, ARF の導入ともに細胞増殖抑制をもたらした (図 5A)。

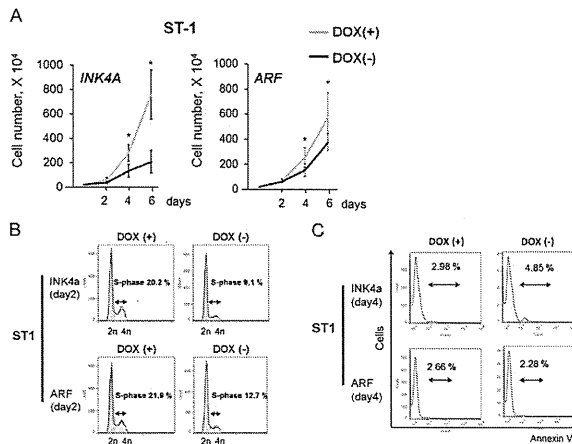


図 5

細胞周期を評価したところ、両者の導入により S 期の減少を認めた (図 5B)。アポトーシスも評価したところ、INK4a 導入でのみアポトーシス細胞の増加を認めた

(図 5C)。

【3: 慢性型 ATL における予後予測マーカー、急性転化予測マーカーの確立】

以上のことから、CDKN2A の欠失は ATL の病態生理にとって重要な働きを有し、かつ慢性型 ATL から急性型への移行にも関与していると考えた。CDKN2A は Cell cycle を制御する重要な遺伝子であることが知られている。このことから、Cell cycle の脱制御が急性転化にとって重要なのではないかと考えた。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 6A)。そのように分類すると、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)。

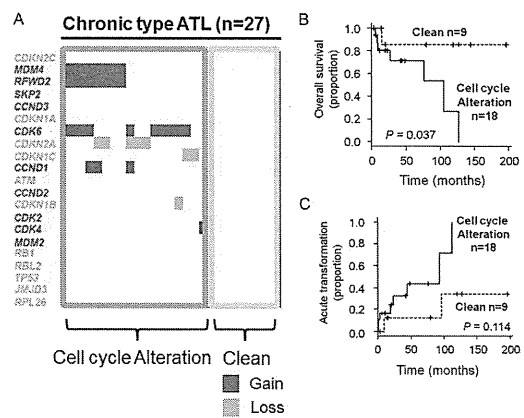


図 6

これら Cell cycle Alteration 群の予後は Clean 群に比べて有意に不良であり (図 6B)、また Clean 群に比べて Cell cycle Alteration 群は後に急性転化が生じている傾向を認めた (図 6C)。

以上のことから CDKN2A および、Cell cycle 関連遺伝子の異常が慢性型 ATL の急性転化に関与していると考えた。これらは今後、慢性型患者での急性転化予測ならびに予後予測の有用なマーカーとなりうる。

また慢性型と比べて急性型に特徴的であった 9p21.3 部以外のゲノム異常についても、急性転化に関与する重要な異常と考えられ、現在追加検討中である。

D. 考察

本研究では、慢性型 ATL のゲノム異常解析を詳細に実施した。また、急性型との比較により、慢性型と急性型で共に認める異常部位、急性型で特に頻度高く認める異常部位を同定した。慢性型のみで特徴的に認める異常部位はなかった。このことは、慢性型 ATL は急性型 ATL の前病変であることを示している。また、両病型で認める異常部位は ATL 発症にとって重要な異常と考えられる。実際、急性型で最も異常の多いゲノム異常部である 9p21.3 に着目し、同部に存在する CDKN2A が ATL において重要な役割を担うことを示した。また患者臨床情報と組み合わせることで、CDKN2A が制御する Cell cycle pathway が慢性型 ATL での急性転化に関与している可能性を示した。これらは、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

部位であり、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。また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. 慢性型 ATL のゲノム異常で特徴的な部は急性型 ATL でも認め、今後これらの解析は ATL 発症機構の解明につながる可能性がある。
2. 慢性型 ATL と比べて急性型 ATL で多いゲノム異常として、1p13.1 欠失、3q 増幅、9p21.3 欠失、10p11 欠失を挙げた。
3. 最も急性型で頻度が多く認められることから 9p21.3 に着目し、同部に存在する CDKN2A の発現値が 9p21.3 欠失に伴い減少していることを見出した。
4. Doxycycline 誘導 ATL 細胞株を樹立し、CDKN2A (INK4a と ARF) の遺伝子導入を実施したところ、細胞増殖抑制、細胞周期の停止、またアポトーシス細胞の増加を認めた。
5. 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。
7. 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る。

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、本分担当課題研究では、初代培養 T 細胞に任意の遺伝子を導入することにより、当該遺伝子の腫瘍化への寄与を評価する系を確立した。まず、既知のがん遺伝子である MYC、BCL2、CCND1 の組み合わせにより T 細胞リンパ腫の作成が可能であることを示し、次に ATL に関連の深い遺伝子の組み合わせとして HBZ、T 細胞受容体(TCR)関連シグナル (TCR-RS) 遺伝子、抗アポトーシス (Anti-Ap) 遺伝子の 3 者により T 細胞が強い増殖能を獲得することが明らかとなった。

A. 研究目的

ATL は予後不良な疾患であるが、HTLV-1 ウイルス以外のゲノム異常が、HBZ などの HTLV-1 関連遺伝子とどのように協調して病態を形成するのかは多くが不明である。複数遺伝子の協調作用を解析するには、T 細胞に簡便で高効率に遺伝子導入する方法が必要だが、従来法は必ずしも満足するものではなかった。そこで、(1)初代培養細胞を用いて ATL 研究のための新しい実験系を創出し、(2)次に本系により既知発癌遺伝子で腫瘍を作出できることを確認し、(3)さらに HBZ などの HTLV-1 関連遺伝子と、臨床検体解析で見いだされた遺伝子異常の組み合わせが腫瘍化をもたらさうのか、の順で検討することを目的とした。

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。その際にレトロウイルスによって T 細胞に遺伝子を導入・発現させる。(1)最初に遺伝子導入条件を比較検討して最適な条件を決定し、(2)次に任意の遺伝子を複数導入することにより、腫瘍化における複数遺伝子の協調作用を観察することが可能かどうか検討する目的で、MYC、BCL2、CCND1 の既知発癌遺伝子 3 種を T 細胞に遺伝子導入し、T 細胞の増殖動態・個体内での造腫瘍性について検討した。(3)最後に、HBZ などの HTLV-1 関連遺伝子と ATL 臨床検体で高発現あるいは活性化の認められる Anti-Ap 遺伝子や TCR-RS の 3 者協調作用を検討した。な

お、異なる遺伝子は各々GFP、ヒト CD4 細胞外ドメイン、ヒト CD8 細胞外ドメインなどをマーカーとして共発現させるので、細胞動態の追跡が容易である。

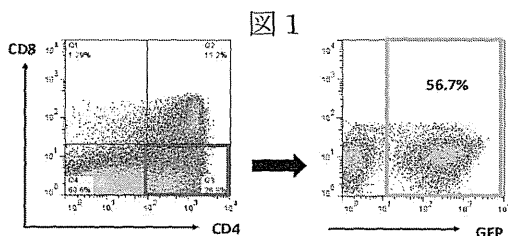
(倫理面への配慮)

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

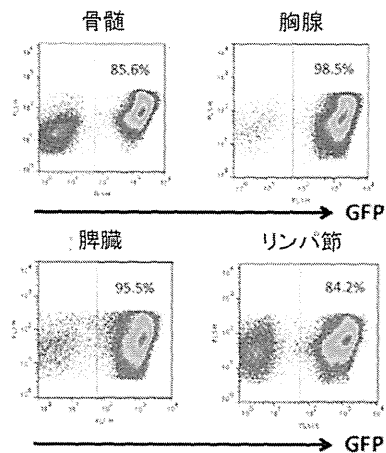
【1:マウスT細胞への新規遺伝子導入法の確立】

マウス初代造血細胞をデルタリガンドを発現する OP9 ストローマと共培養することにより高効率でT細胞を誘導することが可能であった。また、GFPを発現するウイルスを感染させたところ、50%超という高効率で遺伝子導入できることが判明し、ATLの正常対応細胞であるCD4陽性CD8陰性細胞にも遺伝子導入可能であった(図1)。



GFP マーカー遺伝子を導入したT細胞をマウスに移植すると、胸腺・骨髄・脾臓・リンパ節に GFP 陽性T細胞が検出できた(図2)。このことから、任意の遺伝子をT細胞に導入した後、生体内での動態を追跡することにより、遺伝子の病態への関与を解析することが可能であると示唆された。

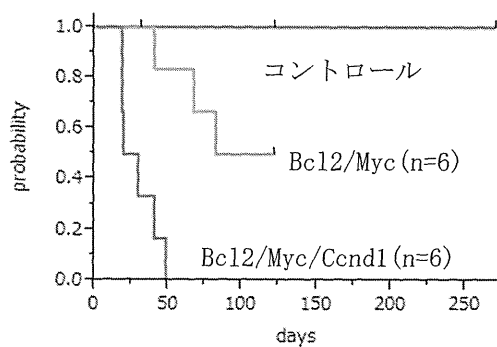
図2



【2:既知発癌遺伝子の協調作用の解析】

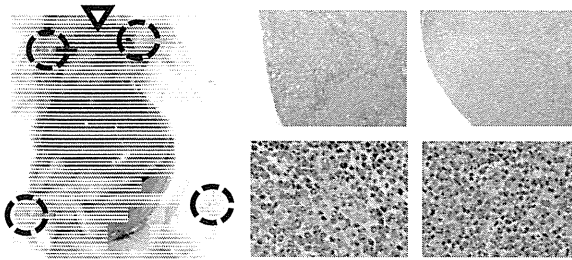
次に既知の癌遺伝子として MYC, BCL2, CCND1 を T 細胞に発現させてマウスに移植した。MYC, BCL2 の2者発現T細胞移植マウスの半数は120日以内に死亡し、Bcl2・Myc・Cnd1 3者を共発現させたT細胞を移植したマウスは全例が50日以内に死亡した。コントロールとしてGFP単独またはヒトCD4単独で発現させたT細胞を移植したマウスは無病であった(図3)。

図3



マウスは、リンパ節・脾臓・胸腺などの肥大をきたし、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4)。このことから、本系により複数遺伝子の協調作用を検討することが可能であると考えられた。

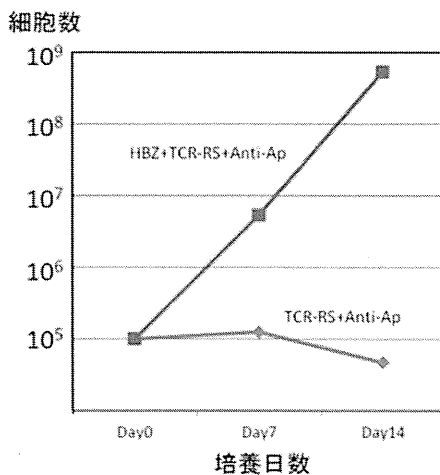
図4



【3：ATL 関連遺伝子の協調作用の検討】

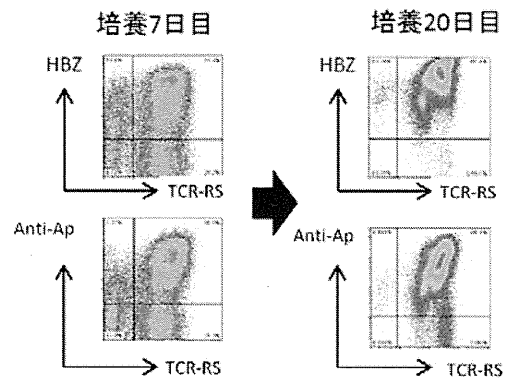
最後に HTLV-1 関連遺伝子 HBZ と ATL 臨床検体で高発現あるいは活性化の認められる Anti-Ap 遺伝子、TCR-RS 遺伝子の 3 者の協調作用を検討した。INK4a/Arf^{-/-}マウス由来胎児肝臓細胞から *in vitro* で誘導した T 細胞に HBZ, TCR-RS 遺伝子, Anti-Ap 遺伝子あるいはコントロールとして HBZ のみ、あるいは TCR-RS 遺伝子 + Anti-Ap 遺伝子を発現させた T 細胞をサイトカイン非存在下で培養し、細胞増殖を比較したところ、HBZ 単独では細胞が速やかに減少したのに対し、HBZ, TCR-RS 遺伝子, Anti-Ap 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 5)。

図 5



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 6)。

図 6



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の結果を得ている。

D. 考察

本研究により、(1) 初代培養マウス T 細胞に高効率に任意の遺伝子を導入する方法を確立した。(2) また、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、ヒト CD8 などをマーカーとして発現させているため、細胞間競合やマウス生体内での細胞追跡が可能である。(3)

最後に、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・進展機構を解析可能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T細胞を効率よく誘導でき、レトロウイルスをベクターとして用いることで、高効率に遺伝子を導入することが可能であった。
2. ATLの正常対応細胞であるCD4陽性CD8陰性細胞にも遺伝子導入可能であった。
3. 遺伝子導入した細胞をマウスに移植することにより、生体内での動態を追跡し解析することが可能であった。
4. 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。
5. 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。
6. 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て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。
7. 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。
8. 本システムは、ATL特異的に機能する遺伝子の組み合わせ効果を検証し、ATLの成立・進展機構の解明さらには治療戦略の開発に役立つことが期待できる。

F. 健康危険情報

特になし

TAX-specific CTL の ATLL 病変における分布、 および末梢性 T 細胞性リンパ腫濾胞型、濾胞型の臨床病理的研究

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。末梢性 T 細胞性リンパ腫 T ゾーン型(Peripheral T-cell lymphoma NOS T-zone variants: T zone-PTCL)、濾胞型(Peripheral T-cell lymphoma NOS follicular variant: f-PTCL)は、両者とも PTCL-NOS と比較すると緩徐な臨床経過をとることがわかった。

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

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。

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	80	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

C. 研究結果

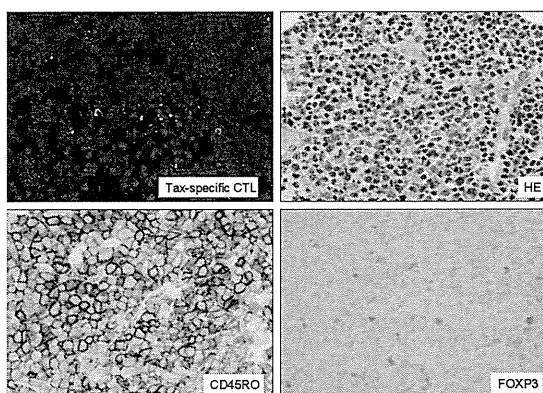


図 Case2 HE: Large cell variant, CD45RO: positive, FOXP3 positive rate: 2%

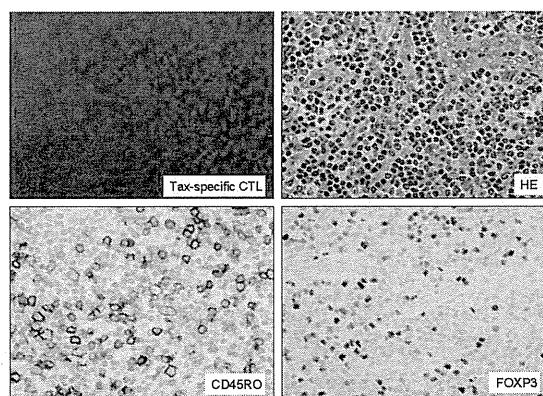


図 Case6 HE: Small cell variant, CD45RO: positive, FOXP3 positive rate: 40%

		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

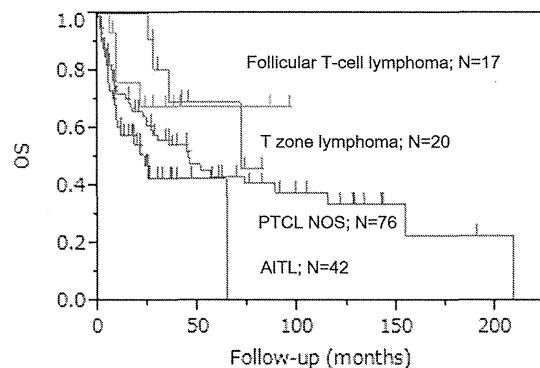
特になし

末梢性 T 細胞性リンパ腫濾胞型、濾胞型の臨床病理的研究

末梢性 T 細胞性リンパ腫濾胞型 (Peripheral T-cell lymphoma NOS follicular variant: f-PTCL)、血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫 (AITL) いずれも follicular helper T-cell (Tfh) 由来であるとされている。今回 f-PTCL を AITL と比較し病理組織所見の検討を行ったところ、f-PTCL の大部分に AITL に特徴的な病理形態の一部がみられ、臨床所見では、f-PTCL と診断された症例でも AITL に特徴的な臨床所見 (高 γ グロブリン血症や Coombs test 陽性など) を有するものがあ

ることより、また生存曲線による検討の結果、f-PTCL と AITL の連続性を示唆する結果が得られた。

また、末梢性 T 細胞性リンパ腫 T ゾーン型 (Peripheral T-cell lymphoma NOS T-zone variants: T zone-PTCL) は、末梢性 T 細胞性リンパ腫非特異型 (Peripheral T-cell lymphoma NOS: PTCL-NOS) の 3 亜型の濾胞型、lymphoepithelioid 型、T ゾーン型の 1 つとされている。今回 T zone-PTCL の臨床病理的検討を行った。リンパ腫細胞の多くは CD3, CD4 を発現し、CD5, CD7 の発現は欠損することが多くみられた。また、PTCL-NOS と比較すると緩徐な臨床経過をとることが多くみられた。



生存曲線による検討の結果、T zone-PTCL は PTCL NOS や AITL よりも、濾胞型 PTCL と同様に緩徐な臨床経過をとることが示された。

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 興

公益財団法人慈愛会 今村病院分院 院長

研究要旨

ATL の腫瘍化や急性転化に関連する遺伝子群の探索と病態への関与を明らかにする目的で、慢性型 ATL 患者のゲノム異常の有無と臨床病態について検討した。対象は、2011年4月から2013年11月30日の間に当科を受診してゲノム異常の解析を行った慢性型 ATL 8例と HTLV-1 キャリアの T細胞型慢性リンパ性白血病 (T-CLL) 1例であった。末梢血 CD4 陽性細胞のゲノム異常の解析では、慢性型 ATL 8例全例に急性型・慢性型 ATL に共通するゲノム異常が認められた。細胞周期関連遺伝子の異常は、6例に認められ、そのうち4例が早期に急性転化もしくは増悪した。細胞周期関連遺伝子の異常を認めなかった慢性型 2例は、1例は急性転化を起こしたが、2例とも予後良好であった。一方、HTLV-1 キャリアの T-CLL 症例では ATL にみられるゲノム異常を全く認めなかった。慢性型 ATL のゲノム異常の解析は、ATL 発症や急性転化のメカニズム解明に有用であると考えられる。

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) を保有する HTLV-1 キャリアから長期の潜伏期間ののち発症する T 細胞悪性腫瘍である。ATL の臨床病型には、急性型・リンパ腫型・慢性型・くすぶり型の 4 つがある。慢性型やくすぶり型からは急性転化することも知られている。HTLV-1 キャリアからの ATL 発症や慢性型・くすぶり型からの急性転化においてそのメカニズムや遺伝子変化についての十分な解明はなされていない。

今回、分担研究課題のうち慢性型 ATL のゲノム異常の有無について検査し、臨

床病態との関連性についての検討を加えた。

B. 研究方法

対象は2011年4月1日から2013年11月30日までに当院血液を受診し、ゲノム異常の解析を行った未治療慢性型 ATL 患者 8例と HTLV-1 キャリアの T細胞型慢性リンパ性白血病 (T-CLL) 1例を対象とした。

ゲノム異常の解析は、末梢血 CD4 陽性細胞より DNA を採取し、400K array CGH (Agilent Ca## G4448) を用いてゲノム異常を調べ、Genomic Workbench の MDM-2 threshold 6.0 で異常領域の解析を行った。

慢性型 ATL と T-CLL の背景として年齢、性別、臨床病型変化の有無や予後について検討した。

(倫理面への配慮)

ATLなどの白血病患者は、常に不安や悩みを抱えており、心理面には十分配慮して説明を行って、同意取得を得た。

C. 研究結果

ゲノム解析を行った9例の内訳は、男性6例、女性3例、平均年齢64.4歳(51~78歳)であった。慢性型ATLの8例のうち予後不良因子を有する例が5例(LDHの増加:4例、アルブミン値の低下:5例)であった。

急性型、慢性型ATLに共通するゲノム異常として1q gain 4例、3q gain 4例、6q loss 3例、7q gain 4例、14q gain 3例、19p gain 4例が認められた(図1A)。

急性型で高頻度に認められるゲノム異常として1p 13.1 loss 1例、3q gain 1例、9p 21.3 loss 1例、10p11 loss 1例が認められた(図1B)。

これらゲノム異常が全くみられなかったのはT-CLLの1例のみであった。

急性型と慢性型ATLのゲノム異常を比較すると、CDKN2Aが存在する9p21.3部の欠失は最も頻度が高く急性型で認められ、慢性型と比べて急性型で特に有意に多かった。CDKN2Aは細胞周期を負に制御することが知られている遺伝子であるため、その欠失は細胞周期の脱制御を引き起こすと考えられる。このことから、CDKN2Aを含む細胞周期関連遺伝子を対象とし、それら遺伝子存在部のゲノム異常を評価した(図2)。MDM4、RFWD2、CDK6、CDKN2A、CDKN1C、CCND1、CDKN1B存在部のゲノム異常を幾つかの症例で認めた。慢性型検体

内でTP53の欠失を有する症例は認めなかった。これらの遺伝子部の異常を持つ群を“Cell Cycle Alteration群”、ひとつも認めない群を“Clean群”と定義した。ゲノム異常の解析を行った9例中6例がCell Cycle Alteration群で、3例がClean群(3例のうち1例はT-CLL症例)であった。

慢性型ATL 8例のうち3例が急性転化した。このうちの2例がCell Cycle Alteration群に属していた。Cell cycle Alteration群の中で、急性転化のなかった4例のうち2例は早期に悪化したため化学療法を施行し、1例は予後不良因子を有していたため併用化学療法を行った。Cell cycle alteration群のうち1例のみ無治療で慢性型を維持している。この症例では急性型・慢性型ATL共通のゲノム異常を認めたが、急性型で高頻度にみられるゲノム異常は認められなかった。

Clean群の3例中1例は、T-CLL症例で、1例は予後不良因子を有するものの無治療で1年9か月病勢の悪化なく経過観察中である。残りの1例は11か月後に急性転化したが、化学療法後に同種造血幹細胞移植を施行し、寛解持続中である。

D. 考察

慢性型ATL患者8例の末梢血CD4陽性細胞のゲノム異常の有無について検査を行った。8例全例に急性型・慢性型ATLに共通するゲノム異常が認められた。細胞周期関連遺伝子の異常は6例にみられ、異常を認めない例は2例のみであった。細胞周期関連遺伝子の異常を有する例は、

Cell Cycle Alteration 群と名付けたが、6 例中 4 例が早期に急性転化もしくは増悪した。慢性期を維持している例は 1 例のみで、これら細胞周期関連遺伝子の異常は ATL の進展と何らかの関連を有していると考えられる。

Clean 群の 3 例のうち 2 例が ATL 症例で、1 例は予後不良因子を有しながらも無治療で長期間増悪せず、また、もう 1 例は長期観察後に急性転化したものの治療により長期生存が得られている。

また、HTLV-1 キャリアの T-CLL 症例では ATL に特徴的なゲノム異常は全く認められず、ATL の発症機構とは異なる可能性

が考えられる。

いずれにしても慢性型 ATL のゲノム異常の解析は、慢性型 ATL からの急性転化のみでなく、HTLV-1 キャリアからの ATL 発症のメカニズムの解析にも有用である可能性がある。

E. 結論

慢性型 ATL のゲノム異常の解析は、ATL 発症や急性転化のメカニズム解明に有用であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

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)の診療に際して、現状では、診断後臨床所見に基づき病型分類を行い、治療方針を決定する。くすぶり型や予後不良因子を有さない慢性型 ATL は、indolent ATL と呼ばれ急性転化するまでは無治療経過観察とされる。しかし、くすぶり型および慢性型 ATL の予後が必ずしも良好とはいえないことが報告されている。今回、これらの病型に対して増悪・急性転化と判断した時点での ATL の病勢について、病型分類の診断基準に基づき後方視的に検討を行ったところ、臨床的に増悪と判断した時点で、病型分類の基準に該当しなかった症例を 1 例認めた。また、解析対象のうち約 35% (16/44) では Performance status (PS) の悪化 (≥ 3) を伴っており、病型分類の診断基準は早期診断には不十分な可能性が示唆された。適切な治療介入時期の判断のために、急性転化に特徴的なゲノム異常領域および責任遺伝子を同定し、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) によって引き起こされる末梢性 T 細胞腫瘍である。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。診断後は、臨床情報に基づき病型分類を行い治療方針を決定する。急性型、リンパ腫型、および予後不良因子 (血清 LDH 高値、BUN 高値、アルブミン低値のいずれか) を有する慢性型 ATL は aggressive ATL と総称され、早期に化学療法の対象とされる。一方で、くすぶり型や予後不良因子を有さない慢性型

ATL は、indolent ATL と総称され、急性転化を来すまでは無治療経過観察とされる。しかし、病型分類は、診断時の所見に基づき ATL の予後や自然史を反映するものとして作成されたものであり、経過観察および急性転化の判断に病型分類の診断基準を用いることの妥当性については十分に検証されているとはいいがたい。急性転化の診断は臨床的に重要な問題であり、当研究班におけるゲノム解析の結果、より精度の高い診断方法の開発および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、検体収集を進める一方で、診断後無治療経過観察としたくすぶり型・慢