

Ishizaka Y, Shimura M, Hagiwara S. DNA methylation profiling can classify HIV-associated lymphomas. AIDS. 2013 Dec 11. [Epub ahead of print]

- 2) Yanagisawa K, **Tanuma J**, Hagiwara S, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Epstein-Barr viral load in cerebrospinal fluid as a diagnostic marker of central nervous system involvement of AIDS-related lymphoma. Intern Med. 2013; 52(9): 955-9.

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

なし

難治性・再発性 HIV 関連血液腫瘍に対する自己末梢血幹細胞移植の開発 および特異的 DNA メチル化パターンによる診断法の開発

研究分担者 萩原将太郎 国立国際医療研究センター血液内科 医長

研究要旨 難治性・再発性 HIV 関連悪性リンパ腫の予後は極めて不良であり、有効な治療法の開発が急がれている。我々は、自己末梢血幹細胞移植による治療法の安全性と有効性を確かめるため多施設共同臨床第Ⅱ相試験を継続実施している。7施設で IRB 承認を得ており、12例の仮登録と7例の本登録を得ている。登録症例が予定を下回っているため、研究期間を3年間延長した。

HIV 関連リンパ腫における DNA メチル化解析により、診断への応用の可能性を示した。健常人の末梢血ナイーブ B リンパ球を HIV に感染させた T リンパ球と共培養することにより、DNA メチル化パターンが変化することを示した。これは、一部で HIV 関連リンパ腫における DNA メチル化パターンと共通することを見出した。

A. 研究目的

1. AIDS 関連リンパ腫は、HAART 時代における日和見合併症の中で重要かつ難治性の疾患である。特に初回治療不応あるいは再発性の AIDS 関連リンパ腫は極めて予後不良であり、治療方法の確立が喫緊の課題である。国立国際医療センターにおいて 2005 年より実施した難治性再発性 AIDS 関連リンパ腫に対する自己末梢血幹細胞移植を用いた治療法のパイロット研究では 10 例中 8 例に移植を実施し、7 例で長期寛解を得ている。初回治療抵抗性および再発性 AIDS 関連リンパ腫に対するサルベージ療法の有効性安全性を検討するため、多施設共同臨床第Ⅱ相試験を計画した。

2. 我々は、HIV 関連リンパ腫の DNA メチル化パターンが非 HIV リンパ腫と異なること既に示した。診断への応用を模索するため、正常ナイーブ B リンパ球を HIV 感染 T リンパ球と共培養することにより、B リンパ球における DNA メチル化パターンへの影響を検討する。

B. 研究方法

1. 難治性および再発性 HIV 関連悪性リンパ腫に対する MEAM 療法を前処置とする HAART 併用自己末梢血幹細胞移植に関する多施設共同第Ⅱ相臨床試験

HIV 感染に関連した日和見合併症としての悪性リンパ腫を発症した患者のうち、初回化学

療法に対して難反応のもの、あるいは再発例を対象とする。本試験では、初回治療で CR または CRu に到達できなかった症例、あるいは再発の患者について仮登録を行い、移植適応を確認できた症例について本登録を行う。本試験への参加者は、仮登録の際にサルベージ療法から始まる一連の幹細胞採取、本登録後の自己末梢血幹細胞移植について十分な説明を受けて文書で同意を得た者とし、さらに本登録前に確認のために自己末梢血幹細胞移植について再度十分な説明をうけることを前提とする。難治性再発性 HIV 関連悪性リンパ腫に対して、ESHAP 土リツキシマブあるいは ICE 土リツキシマブによるサルベージ療法を 1-4 コース施行する。サルベージ療法の骨髄回復期において自己末梢血幹細胞採取術を施行し、CD34 陽性細胞 $2 \times 10^6/\text{kg}$ 以上を採取する。サルベージ療法により部分寛解以上の治療効果が得られた症例で、HAART を併用し MEAM 療法を前処置とした自己末梢血幹細胞移植を行う。Primary endpoint は 2 年生存率。Secondary endpoints は移植後 100 日目の生存率、各治療段階での寛解率、毒性の評価、採取率、生着率、CD4 の数、HIV ウイルス量。

研究期間は 3 年間延長し、2018 年 3 月 31 日までとする。

（倫理面への配慮）本試験に関係する全ての研究者はヘルシンキ宣言（2008 年ソウル改訂）および臨床研究に関する倫理指針（平成 20 年

7月31日全部改正)に従って本試験を実施する。患者登録に先立って、担当医は患者本人に施設の倫理委員会の承認が得られた説明文書により同意を得る。

2. DNAメチル化プロファイリングによる診断への応用

健常人から提供された正常ナイーブ B 細胞を HIV に感染した T 細胞と共培養し、DNAメチル化パターンの変化を観察することで、HIV 感染における間接的な B 細胞への影響を証明する。

1) 検体収集

文書で同意を得た健常人ドナーから末梢血約 60ml をへparin加真空管にて採血する。

2) 試料調製

国立国際医療研究センターにおいて健常人末梢血リンパ球から T 細胞および B 細胞分画を分離

3) HIV 感染細胞作製

国立感染症研究所感染病理部において: T 細胞に HIV ウイルスを感染させ、トランスウェルチャンバーの下層に、B 細胞を上層にて培養する。

4) DNA 抽出

一定期間共培養後にリンパ球 DNA を抽出する。

5) メチル化 DNA マイクロアレイ解析

抽出された genomic DNA に対してイルミナ社のマイクロアレイチップを用いてメチル化 DNA マイクロアレイ解析を行う。

6) 詳細分析

マイクロアレイ解析の結果より、HIV 感染による特異的メチル化パターンの変動、メチル化遺伝子群の判定解析等を行う。

7) メチル化遺伝子の同定

メチル化特異的 PCR 等によりメチル化遺伝子の同定を行う。

(倫理面への配慮)

健常人ボランティアドナーにたいして、説明文書をもちいて説明を行い、文書による同意を得る。試料は、採取された後直ちに個人情報情報を削除(連結可能匿名化)した上で管理する。国立感染症研究所および解析委託業者へは個人情報情報は送付しない。メチル化解析の結果についても完全に匿名化することにより、個人情報情報の漏洩を防ぐ。連結可能匿名化の対応表は個人情報管理者が厳重に管理する。本研究の成果を学会や論文において公表する場合にあって

も、試料提供者個人の特定につながる情報が掲載されないようにする。

C. 研究結果

1. 難治性および再発性 HIV 関連悪性リンパに対する MEAM 療法を前処置とする HAART 併用自己末梢血幹細胞移植に関する多施設共同第 II 相臨床試験

2014年3月時点での IRB 承認施設は以下の7施設である。

国立病院機構 名古屋医療センター

国立病院機構 大阪医療センター

国立国際医療研究センター戸山病院

北海道大学病院

東京大学医科学研究所附属病院

国立病院機構九州医療センター

がん・感染症センター 都立駒込病院

症例登録の状況は、仮登録症例 12 例、本登録 7 例である。現時点では問題となる有害事象の報告はない。これまでの症例登録数は予定を下回っており、登録期間および総研究期間を3年間延長することとした。

2. HIV 関連リンパ腫における DNA メチル化プロファイリングの診断への応用

HIV 感染 T リンパ球と共培養したナイーブ B リンパ球の DNA メチル化解析を行った。HIV 非感染 T リンパ球と共培養した B リンパ球との比較では、Hypomethylation ターゲット 11、Hyper-methylation ターゲット 69 であり、HIV リンパ腫との共通ターゲット Hypomethylation 2、Hypermethylation1 箇所が見出された。

D. 考察

1. 難治性・再発性 HIV 関連悪性リンパ腫に対する MEAM 療法を前処置とする HAART 併用自己末梢血幹細胞移植に関する多施設共同第 II 相臨床試験

HIV 関連リンパ腫は、予後不良であり、再発難治例に対する有効な治療法は確立されていない。しかし、大量化学療法を用いた造血幹細胞移植療法は、大幅な予後改善の可能性はある。EBMT の lymphoma working group は HIV 関連リンパ腫における造血幹細胞移植療法と非 HIV 関連リンパ腫に対する造血幹細胞移植療法との比較で、両者に安全性および有効性に有意な差が無いことを報告している。本研究は、我が国における HIV 関連リンパ腫の難治例、再発例に対する標準療法の確立を目指したも

のであり、まずは、安全性・有効性の確認が必要である。早期の症例蓄積が望まれる。

2. HIV 関連リンパ腫における DNA メチル化プロファイリングの検討

昨年度、我々は、HIV 関連リンパ腫における DNA メチル化パターンが非 HIV 関連リンパ腫と明確に異なることを報告した。今年度、HIV 関連リンパ腫の診断および発症予測を目標として HIV 感染 T 細胞と共培養したナイーブ B 細胞への影響を DNA メチル化の観点から検討した。その結果、明らかなメチル化変動が観測され、さらに変動ターゲットが HIV 関連リンパ腫と一部共通していることを見出した。この現象は、リンパ腫発症メカニズムに寄与している可能性が示唆された。

E. 結論

1. 難治性・再発性 HIV 関連悪性リンパ腫

本登録症例数は 7 例であり、予定登録数 18 例への到達のために登録期間を延長した。更なる症例の組み込みが必要である。現時点での重篤な有害事象の報告はない。

2. HIV 関連リンパ腫における DNA メチル化プロファイリング

HIV 関連リンパ腫において DNA メチル化パターンは新たな診断法の開発に寄与する可能性が示唆された。また、今後、予後不良因子として特異的なメチル化遺伝子の特定により新規治療ターゲットの発見に結びつく可能性がある。

F. 健康危機情報

1. 難治性・再発性 HIV 関連悪性リンパ腫

現時点での予期せぬ有害事象報告はない。

2. HIV 関連血液疾患

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yanagisawa K, Tanuma J, Hagiwara S, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Epstein-Barr viral load in cerebrospinal fluid as a diagnostic marker of central nervous system involvement of AIDS-related lymphoma. Intern Med. 2013;52(9):955-9.
- 2) Matsunaga A, Hishima T, Tanaka N, Yamasaki M, Yoshida L, Mochizuki M, Junko Tanuma,

Oka S, Ishizaka Y, Shimura M, Hagiwara S. DNA methylation profiling can classify HIV-associated lymphomas. AIDS. 2014 Feb 20;28(4):503-10.

- 3) Ota Y, Hishima T, Mochizuki M, Kodama Y, Moritani S, Oyaizu N, Mine S, Ajisawa A, Tanuma J, Uehira T, Hagiwara S, Yajima K, Koizumi Y, Shirasaka T, Kojima Y, Nagai H, Yokomaku Y, Shiozawa Y, Koibuchi T, Iwamoto A, Oka S, Hasegawa H, Okada S, Katano H. Classification of AIDS-related lymphoma cases between 1987 and 2012 in Japan based on the WHO classification of lymphomas, fourth edition. Cancer Med. 2014 Jan 10. doi: 10.1002/cam4.178. [Epub ahead of print]
 - 4) Kojima Y, Hagiwara S, Uehira T, Ajisawa A, Kitanaka A, Tanuma J, Okada S, Nagai H. Clinical Outcomes of AIDS-related Burkitt Lymphoma: A Multi-institution in Japan. Jpn J Clin Oncol. 2014 Feb 20. [Epub ahead of print]
- H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）
なし

HIV 感染者における形質芽細胞リンパ腫に関する研究

研究分担者 上平 朝子 国立病院機構大阪医療センター 感染症内科
研究協力者 小泉 祐介 滋賀医科大学附属病院 消化器・血液内科
渡邊 大 国立病院機構大阪医療センター 臨床研究センター
小川 吉彦 国立病院機構大阪医療センター 感染症内科

研究要旨 HIV 感染者における形質細胞芽リンパ腫（plasmablastic lymphoma、以下 PBL）は近年急激に増加しており、予後が非常に悪いことより適切な診断と治療法の確立が喫緊の課題である。我々は本疾患に関して、主にエイズ診療拠点病院を対象にアンケートを実施した。結果として①PBL はここ 2-3 年で急激に患者数が増加、②患者は比較的高年齢で、かつ CD4 数の著明に低下した症例に多く、③発症部位は比較的節外病変が多く、④化学療法レジメンとしては EPOCH が成績良好であった可能性、⑤発症時 CD4 数が予後に大きく影響、等を見出した。更なる解析により本邦患者における予後因子、適切な治療方針について明らかにする。

A. 研究目的

抗 HIV 治療の進歩と共に、HIV 感染者の生命予後は飛躍的に改善した。AIDS 関連日和見感染症の発症頻度、死亡率はともに低下したが、悪性腫瘍の頻度が増加している。特に悪性リンパ腫は、HIV 感染者では健常人の 200-600 倍の頻度で生じるとされており、本邦でも急激に増加して大きな問題となっている。

形質芽細胞リンパ腫（plasmablastic lymphoma、以下 PBL）は、AIDS など高度免疫不全患者に生じる稀な疾患であり、標準治療を行っても治療反応性が不良で非常に予後が悪く、病態の解明・治療法の確立が望まれる。本研究は、HIV 感染者における PBL の疫学、病態、治療、予後についてアンケート調査によって詳細に解析し、今後の診療に寄与することを目的とする。

B. 研究方法

エイズ診療拠点病院を受診した HIV 感染者のうち、平成 7 年 1 月から平成 24 年 12 月までに施設病理診あるいは中央病理診断にて PBL と診断された症例を対象とし、病理所見や臨床

情報について、カルテ情報を収集して後方視的に解析した。

調査項目は以下の通りである。

年齢、性別、国籍、HIV 感染リスク、AIDS 既往歴、抗 HIV 療法の有無、身体機能評価（ECOG PS）、血液検査結果（CD4 数、HIV ウイルス量、LDH、可溶性 IL-2 レセプター、EBV 抗体価、血中 EBV-DNA 定量）、年齢調整国際予後指標（Age adjusted IPI）、臨床病期、リンパ節・節外病変の部位、巨大腫瘤病変（Bulky Mass）の有無、病理診断・遺伝子診断のために施行した検査（免疫染色、CD45・CD38 ゲートによる表面マーカー、染色体検査）、選択した治療法と施行コース数、化学療法の効果判定、治療関連有害事象・治療関連死亡の有無と種類、再発の有無、生存期間、無増悪生存期間

（倫理面への配慮）

1) 研究対象者に対する人権擁護上の配慮

診療記録は、氏名・生年月日・住所などの個人情報情報を削除し、代わりに新しく符号をつける連結不可能匿名化を行った。氏名と符号との関

係を対応させた対応表は各施設にて厳重に保管し、対応表は大阪医療センターには送付しないものとした。研究期間の終了をもって資料の利用を中止し、診療情報から収集した資料は大阪医療センター感染症内科にて、対応表は各施設にて厳重に保管する予定とした。

2) 研究方法による研究対象者に対する利益・不利益

本研究により、研究対象者が医学上の利益・不利益を得ることはない。

C. 研究結果

1. 参加施設

2014年1月現在、参加施設は次の8施設である。施設名(施設代表者)：国立国際医療研究センター病院血液内科(萩原将太郎)、都立駒込病院感染症科(味澤篤)、東京医科大学附属病院臨床検査部(四本美保子)、国立病院機構名古屋医療センター血液内科(永井宏和)、国立病院機構大阪医療センター感染症内科(上平朝子)、大阪市立総合医療センター血液内科(小川吉彦)、福井大学医学部附属病院血液内科(池ヶ谷諭史)、川崎医科大学附属病院血液内科(和田秀穂)

2. アンケートの進捗状況

本研究は2012年9月18日当院倫理委員会にて承認を受けた。全8施設からの合計登録症例数は24例であり、倫理委員会承認のあと各病院にアンケートを送付し、回答を得た。現時点で、詳細な病理所見について検討中である他は、ほぼ解析が終了した。

3. 解析結果

① 診断時期

1999年1名、2002年1名、2003年1名、2004年1名、2005年1名、2006年2名、2007年1名、2009年1名、2010年2名、2011年6名、2012年7名と、特にここ数年増加傾向にあった。

② 年齢分布

10歳代0名、20歳代1名、30歳代8名、40歳代7名、50歳代8名、60歳以上0名(平均年齢43.8歳)であった。

③ 発症時 CD4 数 (μL)

1-50が11名(46%)、51-100が3名(13%)、101-200が5名(21%)、201-350が2名(8%)、351-500が2名(8%)、501以上が1名(4%)であった。

④ 病変部位

リンパ節病変は14例(全症例の58%)に認め、頸部10例(42%)、胸部7例(29%)、腹部6例(24%)であった。リンパ節単独の症例はなかった。

節外病変では消化管が10例(42%)と最多で、骨髄9例(23例中、39%)、口腔9例(38%)、中枢神経4例(22例中、18%)、肺3例(13%)と続いた。

⑤ 臨床病期

診断時の臨床病期はStage I 3例(13%)、Stage II 5例(21%)、Stage III 2例(8%)、Stage IV 14例(58%)、と比較的進行期に至った症例が目立った。

⑥ 免疫染色

各マーカーの陽性率は、EBER 91%、MUM1 91%、CD38 87%、CD138 70%、CD79a 57%、CD10 56%、CD30 44%、bcl-2 31%、CD20 0%であった。MIB-1 indexは85%の症例で90%以上を示した。

⑦ 治療と予後

24例中23例が何らかの積極的治療を行い、1例はbest supportive careの方針となった。化学療法は23例(うち4例がbortezomibを使用)、放射線療法は9例、自己末梢血幹細胞移植は2例、手術は1例に行われていた。

First lineの化学療法としては61%がCHOP、17%がEPOCH、HyperCVAD/高用量MTX-AraCが9%、CODOX-M/IVACが9%、CDEが4%で施行され、初回治療成績は完全寛解44%、部分寛解35%、不変4%、増悪13%、判定不可4%であった。

症例全体の生存期間中央値は14.8カ月であった。

初回治療レジメンを、強度と投与形態から

1) Standard群(=CHOP)

2) Intermediate群(=CDE、EPOCH)

3) Intensive群(=HyperCVAD + HD-MTX/AraC, CODOX-M + IVAC)

の3群に分け、治療成績、生存期間を解析した。

初回奏効率ではstandard群85%、intermediate

群 80%、intensive 群 100%であったが、最終生存率はそれぞれ 36%、60%、50%であり、生存曲線解析でも intermediate 群の成績が比較的良好と考えられたが、統計学的有意差は得られなかった(log rank test, $p=0.069$)。

発症時 CD4 数と生存期間についての解析では、CD4 数が 100 以上の群では 100 未満の群に比べて優位に生存期間が長かった($p=0.027$, Log-rank test)。

D. 考察

現時点で本研究より得られている主な知見として、以下の 5 点が挙げられる。

①HIV 患者における PBL は、近年急増している。当研究班では国立国際医療研究センター、国立大阪医療センター、都立駒込病院、名古屋医療センターの症例に関しては過去に遡って病理標本を全例再検討しているため、ここ数年での PBL 急増の理由は診断基準が問題ではないと考えられる。

②比較的高年齢で、かつ CD4 の著明に低下した症例に多い。これは既存の報告と合致する。

③発症部位は比較的節外病変が多い。これはエイズ関連リンパ腫全般の特徴ともいえる。

④化学療法レジメンとしては EPOCH が成績良好である可能性がある。

但し、施設間で採用治療レジメンの偏りがあること、症例数がまだ少ないため、今後も多施設で症例を集積しての検討が必要である。

⑤発症時 CD4 数が予後に大きく影響する。

今後は新規症例の臨床データを追加し、そのアウトカム、予後因子などの更なるデータ解析を行い、適切な治療方針について検討する。詳細な病理学的検討が終了次第、論文化の予定である。

E. 結論

HIV 患者における PBL はここ数年で飛躍的に増加しており、臨床現場でもマネジメントに苦慮することが多い。このような中、PBL に関して 24 名と比較的まとまった数の症例をアンケート調査することにより本疾患の病態を詳細に解明し、現場の医師に役立つ情

報提供が可能であると考えられる。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watanabe D, Otani N, Suzuki S, Dohi H, Hirota K, Yonemoto H, Koizumi Y, Otera H, Yajima K, Nishida Y, Uehira T, Shima M, Shirasaka T, and Okuno T. Evaluation of VZV-specific cell-mediated immunity in adults infected with HIV-1 by using a simple IFN- γ release assay. *J Med Virol* 85(8):1313-1320, 2013

2. 学会発表

(国内学会)

- 1) 小泉祐介、廣田和之、米本仁史、伊熊素子、大寺 博、矢嶋敬史郎、渡邊 大、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨。播種性 M. genavense 感染症を呈した AIDS の 1 例。第 87 回日本感染症学会学術講演会、2013 年 6 月、横浜
- 2) 矢嶋敬史郎、伊熊素子、廣田和之、小川吉彦、笠井大介、渡邊 大、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨：抗 HIV 療法開始後に甲状腺機能亢進症を呈した 13 例の検討。第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会、2013 年 11 月、熊本
- 3) 大寺 博、矢嶋敬史郎、伊熊素子、廣田和之、小川吉彦、笠井大介、渡邊 大、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨。HIV 感染者に合併した肺の腺扁平上皮癌の一例。第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会 2013 年 11 月、熊本、
- 4) 廣田和之、矢嶋敬史郎、伊熊素子、小川吉彦、笠井大介、渡邊 大、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨：カポジ肉腫の治療中に新たに日和見感染症を発症した 3 例。第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会 2013 年 11 月、熊本、
- 5) 小川吉彦、廣田和之、伊熊素子、矢嶋敬史郎、渡邊 大、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨。治療抵抗性を示した HIV 感染

症合併 CD20 陰性 Diffuse Large B cell Lymphoma。第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会、2013 年 11 月、熊本

- 6) 藤友結実子、廣田和之、米本仁史、大寺博、小泉祐介、矢嶋敬史郎、渡邊 大、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨、小澤健太郎：HIV 感染後に尋常性乾癬を発症し、サイトメガロウイルス網膜炎と梅毒感染、カポジ肉腫を合併した一例。第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会、2013 年 11 月熊本
- 7) 矢嶋敬史郎、上平朝子、藤友結実子、廣田和之、米本仁史、小泉祐介、大寺 博、谷口智宏、渡邊 大、西田恭治、白阪琢磨：免疫再構築症候群により治療に難渋した HIV 合併クリプトコッカス髄膜炎の 2 例。第 56 回日本感染症学会中日本地方会学術集会、2013 年 11 月、大阪

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図1: PBL 新規発症者数

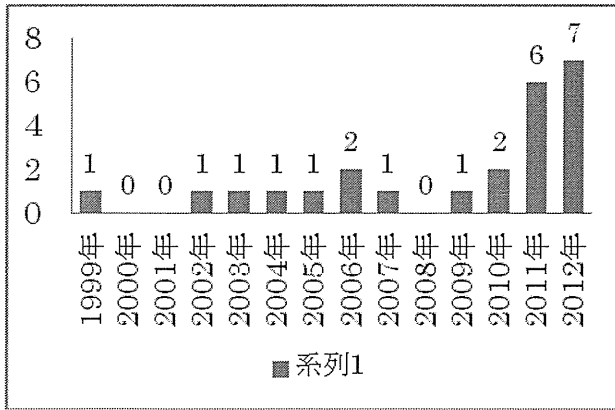


図2: 診断時の臨床病期

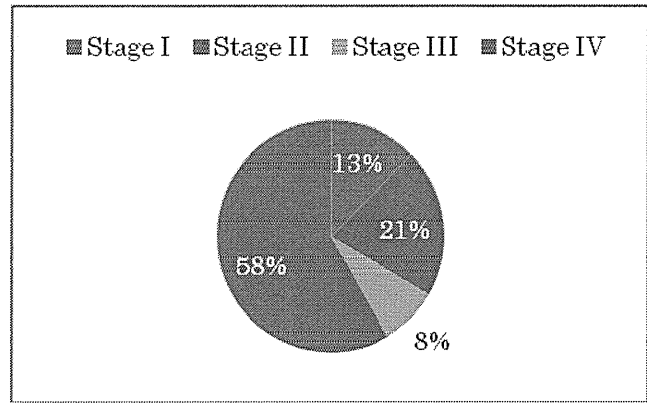


図3: 1st line 治療のレジメン (n=23)

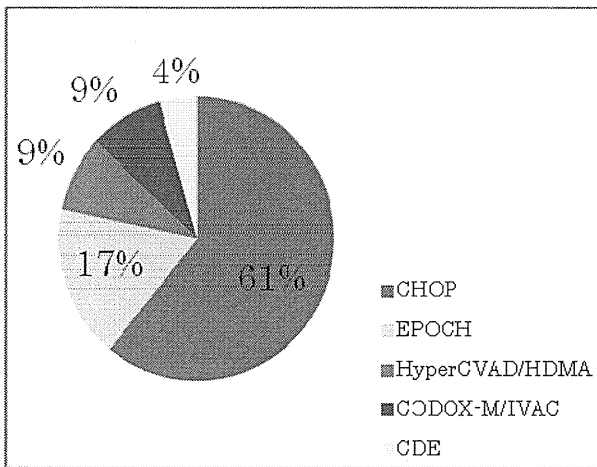


図4: 治療レジメンと生存期間

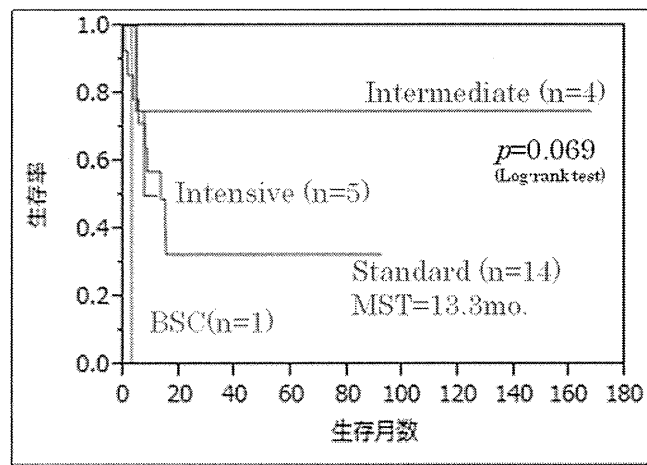
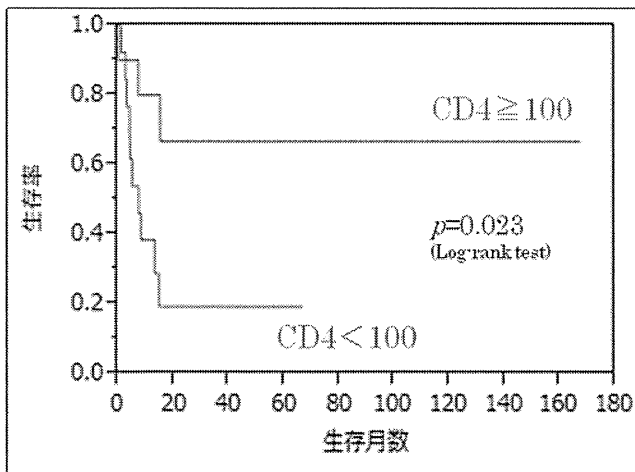


図5: 発症時 CD4 数と生存期間



悪性リンパ腫を中心としたがんを併発した HIV 感染者の 心理社会的支援についての研究

研究分担者	矢永由里子	（慶應義塾大学医学部）
研究協力者	有馬美奈	（東京都立駒込病院）
	大金美和	（国立国際医療研究センターACC）
	山本貴子	（神奈川県保健福祉局）
	石井祥子	（国立国際医療研究センターACC）
	野本和美	（東京都立駒込病院）
	平良律子	（東京都立駒込病院）
	及川真理子	（東京都立駒込病院）
	戸蒔祐子	（慶應義塾大学病院）

研究要旨

悪性リンパ腫の HIV 感染者・エイズ患者とその関係者（主に家族、パートナー）への包括的医療の推進として、特にメンタル面に焦点を合わせ、現状と課題の把握、そしてその把握に基づいた改善に向けての介入を目指したものである。

課題 1 では、悪性リンパ腫を合併した患者と家族、パートナーへのケアのあり方について、現場経験を積む 9 名のコメディカルを中心にケアの課題を時系列に抽出し、段階ごとに患者が抱えるテーマについて整理し、心理・看護のアプローチの実践の骨格をまとめていった。

課題 2 では、終末期医療での患者受け入れについて、特に心理的支援のあり方を検討した。全国調査では、患者・家族支援への困難さが受け入れや次の施設の紹介を阻害する一つの要因となっていることが判明した。一方で支援促進のための心理職の活用度は高くないことが明らかになった。経験値の低さ、セクシュアリティへの分からなさ、複雑な告知が関与する家族対応への躊躇が心理職側の課題として判明した。

A. 研究目的

治療薬の進歩により悪性リンパ腫を合併した HIV 感染者の予後は格段に改善されてきており、生存率も大幅に上がっている、多くの患者が治療後は社会復帰を遂げ、治療前の生活を取り戻している。しかし、他方、治療効果が望めない患者群では、治療経過とともに自身の生活や将来の計画の修正を余議なくされている場合もある。症状進行も早

く、終末期を迎える患者も少なくない。このように治療効果に個人差が大きい現在、患者を支援するケア体制もその両方の経過に対応できるような幅広いあり方が求められていると言える。

本研究は今年度より、悪性リンパ腫の HIV 感染者・エイズ患者（以後、患者とす）とその関係者（主に家族、パートナー）への包括的医療の推進として、特にメンタル面に焦点

を合わせ、現状と課題の把握、そしてその把握に基づいた改善に向けての介入を目指したものである。

具体的には、長期療養の特徴を踏まえ患者のケアを時系列的に捉えると同時に、病状が深刻になった場合の受け皿である緩和ケア・ホスピスの心理的支援の受け入れ体制に注目していく。

B. 研究方法

本研究を開始するに当たって、長年悪性リンパ腫を合併した患者の HIV 診療に携わっている医師 2 名に患者の状況と医療者としての心理社会的側面への具体的な関心についてヒアリングを実施した。

その結果、この領域の課題として、以下の点が指摘された。

- ・ある程度治療は確立されつつあり、治療後に社会復帰を遂げている患者も多い。一方で、未だ 4 割の患者は治療経過が厳しく病状悪化の可能性がある。患者の予後には大きな幅がある。

- ・化学療法の期間、特に最初の期間は入院治療となり、社会生活にも支障がでる場合もある。この間の心理社会的支援は重要になってくる。

- ・末期状態の際の患者受け入れ体制が不明である。全国における患者受け入れの実際や準備状況を知りたい。

上記ヒアリング結果と日々の臨床経験を踏まえ、本研究は二つの課題研究に取り組むこととした。

1) 【課題 1：長期療養への包括的ケアのあり方の検討】

悪性リンパ腫を合併した患者と家族、パートナーへのケアのあり方について、現場経験を積む 9 名のコメディカル（心理職 2 名、看護職 7 名）を中心に、ケアの課題を抽出した。そしてそれらの課題を時系列に整理し、段階ごとに患者が抱えるテーマについて整理し、心理・看護のアプローチの実践の骨格をまとめていった。

2) 【課題 2：終末期医療のケアのあり方の検討】

①全国の HIV 診療拠点病院における緩和ケアと全国のホスピスを対象とした HIV 感染者受け入れの調査（小島勇貴、永井宏和）に、患者や家族の心理的支援に関する項目を追加し、メンタル面での受け入れ状況について検討を加えた。

②全国調査の結果を踏まえ、心理的支援の受け皿作りについて、緩和ケア・ホスピスでの心理支援において後輩育成にも携わり中心的な活動を実施している心理職（6 名；九州、中四国、東海、関東）と精神科医（1 名）に対し、HIV 感染者の受け入れ状態のヒアリングを 3 回実施した。その内の 1 名は、エイズ領域でも自治体の派遣カウンセラーに登録しており、精神科医は地元の HIV 医療保健福祉教育のネットワーク会議の主要メンバーである。

C. 研究結果

1) 【課題 1：長期療養への包括的ケアのあり方の検討】

時系列での課題とケアの検討

- （1）告知時（がん判明；HIV 感染判明）
 - ・ 告知後の治療導入時の支援の重要性（患者の長期療養の態度との関連）

患者の治療理解や心理的な反応の理解

- ・ 長期治療導入前の入院準備時のオリエンテーションと準備に向けた具体的支援

- （2）長期療養

- ・ 支援体制作り：誰が作るか、誰を巻き込むか。

がんのみ告知している患者の家族への対応
家族の協力への働きかけ

独居の患者への地域サービスの活用

- ・ 患者の心理社会的テーマ

患者自身のゆとり、そこで浮上する生活

（仕事を含め）や対人関係（家族やパートナー）

精神的なテーマ

チーム医療の重要性

- ・ 副作用や合併症の出現、それに伴う治療方針の変更と再評価

チームでの検討の必要性。

患者の揺れ、退院調整、継続治療のテーマ
チームでの検討の必要性；各職種の専門性
の活用

・患者の社会復帰と、それに伴う退院調整、
継続治療のテーマ

(3) 緩和ケアの導入；地域への繋ぎ

・治療方針の決定、患者の選択、そこへの支
援

・患者説明とその後のフォローの重要性

・メンタル面や治療認識の把握

チーム体制の重要性

・家族の意思確認。家族、場合によっては
パートナーとの今後に向けての話し合い

・患者が在宅療養を希望した場合の地域へ
の繋ぎ

【課題2：終末期医療のケアのあり方の検 討】

① 「HIV 感染悪性腫瘍患者の終末期医療の
実態調査 全国調査より」

回答では、378HIV 拠点病院中 226 の施設が
回答を寄せ (59.8%)、終末期医療での患者受
け入れ経験ありと答えた施設が 55 施設
(24.3%) であった。拠点病院からの返答率
がかなり高いと思われる。一方、ホスピスで
の患者受け入れは今後の課題と考えられる。

(1) 受け入れの困難と思われる部分

・回答のなかで、緩和ケアやホスピスで患者
受け入れ時の困った項目としては、予想以上
に、患者、家族両方の心理的支援を挙げている
機関が多かった。

Q:「HIV 拠点病院での HIV 悪性腫瘍患者の
緩和ケアに困った内容」

家族への HIV 感染の告知の問題 42%

患者の心理的支援 37%

これらの数値は、治療判断の困難さへの回答
率とほぼ同等だった。

Q:「ホスピスでの HIV 悪性腫瘍患者の緩和
ケアに困った内容」

家族の心理的支援 62%

患者の心理的支援 51%

家族への HIV 感染の告知の問題 50%

これらの数値は、ARV の適性使用の困難さへ

の回答率とほぼ同等だった。

(2) 他機関紹介について困難と思われる
部分

・他機関紹介、患者受け入れについては主に
スタッフの知識や経験不足の回答が最も高
かったが、在宅への移行については、家族や
患者の受け入れの心理面の態勢も影響して
いることが判明した。

Q:「拠点病院から在宅へ転院できなかった理
由」

家族支援の経験が無いため 46.2%

患者の心理的な支援の受け入れ態勢が
整っていないため 15.4%

(3) 心理職の関わる比重の少なさ

・一方で、心理職が関わっているケースは、
HIV 拠点病院での緩和ケアでは、在院の心理
職の 50%、ホスピスではより低く、33%であ
った。

患者受け入れ困難の理由に患者と家族の
心理支援が挙げられながら、心理職の直接的
な支援は心理が在職しつつも 3 割から 5 割程
度の活用しか無かったのは、人材の有効利用
の視点からも非常に残念な結果になっている。

・今後、心理的支援を強化していくことが、
受け入れ体制の促進に繋がる大きな要因の
一つとなり得ることが、今回の調査でも判明
した。

② 心理職へのヒアリングの結果

今回、緩和ケア領域での心理職の中心メン
バーに、エイズ患者の受け入れについてヒア
リングを実施したが、そのなかから 3 点の問
題点が明確になった。

(1) 経験値の低さ

・全国的に緩和ケアでの患者受け入れ経験は
非常に限られている。

・医師から心理職への心理的支援の依頼もま
だ確定したルートは整備されていない。

・患者が入院した場合、医療関係者は院内感
染予防にまず注目した対応を取ろうとして、
患者支援の考えは後回しにされる傾向にあ
る。

(2) セクシュアリティの取り上げや対応への不安

・エイズ＝セクシュアリティを扱わなければならない、というイメージが強い。この部分を全面的に扱い専門にしている心理職は緩和ケアでは見受けられず、苦手意識も働いている。しかし、一方でこの機会にこのテーマを学んでみたいという動きもある。

(3) パートナー、家族への対応の明確化の必要性

・家族支援は緩和ケア・ホスピスでは重要な援助だが、病名を家族に告げない患者に対してどのような支援が実際可能なのか想像がつかない。わからなさから戸惑いも感じている。

D. 考察

1) 現場の実践を踏まえて

① 系統的なケア体制のあり方の検討

・本研究は、現場で患者支援に直接携わっている心理職、看護職を中心に、悪性リンパ腫合併の患者のケアのあり方を今年度検討していった。

それぞれの経験についてこれまで系統立って議論されたことがなく、今回の初年度の研究によって、患者や関係者の課題とケアのあり方について時系列に検討を進め、包括的ケアの骨格を整理していった。

・今後は説明を追加したうえで図式でまとめていき、告知時から終末期までの一連の流れのなかでの支援のポイントを提示していく予定である。このような全体図を示していくことで、現場の担当者に、自身の現在の支援がどの時点の関わりなのか、今後の見通しや具体的な準備としてどこを押さえるべきかについて検討する貴重な資材を提供できると考える。

② チーム医療の具体的な取り組みの提示

・チーム医療の重要性は HIV 医療では以前から強調されてきたが、具体的な場面に落とし込んだ議論は限られている。今回、悪性リンパ腫合併のケアという一つのケアのあり方にテーマを絞り、ケアの変遷によるチーム医療のあり方、職種別の動き方についても検

討を加えていく予定である。現場で一人職場のコメディカルにとっては、特にこのような提示は自身の介入や支援の参考として活用できる資料になり得ると思われる。

2) 重要なケアのポイントとして

① 最初の病状説明時対応の重要性

・検討会議で共有された重要な点として、患者への最初の病状説明が、その後の患者の受療や闘病全般に大きく影響を及ぼすことが挙げられた。この点は他の疾患の対応にも共通すると思われるが、特に悪性リンパ腫合併の場合は、がんとエイズの両方の治療に直面する患者の負担感やストレスは深刻で、成人層の患者が多いことから、受療は本人への社会面に大きく影響する。患者によっては、がんと HIV 両方の治療の同時説明に混乱が生じ、HIV 治療に対し否定的な反応を示す場合もある。

患者への最初の説明は、その後の闘病の持ち方を左右する可能性があり、そのオリエンテーションを医師とともにコメディカルが支援することは、治療を順調にスタートさせるうえで、また患者の全療養の過程を支える上でも非常に重要な位置づけと考えることができる。

② 家族対応

・悪性リンパ腫合併の患者支援に携わるコメディカル（課題1）と、緩和ケア・ホスピスの関係者（課題2）から共通して出された課題は、家族対応の難しさであった。

患者の多くは、がん疾患の罹患については家族に伝えるが、HIV 感染については告げることを躊躇したり最後まで告げないと決めている場合もある。患者と家族の板ばさみのところにコメディカルが置かれることもあり、どこまで患者の意思を尊重するのか、どの時点で患者に家族への告知を促すかが課題となっている。

また、緩和ケアやホスピス受け入れについても、全国調査の自由記述のところでも家族へどのように対応すべきかを課題として挙げた回答を多くあった。

・今後、家族対応のあり方について引き続き検討を進める必要がある。

③セクシュアリティのテーマ

・HIV感染症を取り上げる上でセクシュアリティは無視できないテーマである。特に心理支援においてはこのテーマについての理解を深めておく必要がある。しかし一方で、あまりこの部分を強調すると、「だから対応ができない、難しい。」と受け入れ困難の理由付けに遣われるリスクもある。セクシュアリティのテーマは HIV 感染症に限らず他の疾患でも重要なテーマであることを明示し、この部分の理解を進めることで他の疾患の患者対応にも活用できるとした一般化のメッセージを発することも重要と思われる。

3) 本研究の特徴

①がんを合併した HIV 感染者のケースが今後増加することが予測されている。これまで「がんとエイズ」の視点でケアのあり方が議論されることはあまり無かった。今回、悪性リンパ腫を併発した感染者の心理社会的課題について理解を進めることで、悪性リンパ腫に限らず他のがん疾患合併の患者のケアへ応用が可能となることが期待される。

②多職種、複数領域の研究として

・今回の研究は、包括的なケア体制を検討するため複数の職種による研究を進めており、様々な職種の特徴と視点をうまく活かして患者アプローチをより総合的なものへと提示していく予定である。

・また、今回はエイズ領域に限定するのではなく、がん、エイズの両方の専門家を交えて緩和ケア・ホスピスの受け入れ促進を検討していく予定である。この過程でそれぞれの専門性を交えながら、患者のより良い受け入れ体制についての検討が進めばと望んでいる。

4) 今後の研究に向けて

1) 【課題1：長期療養への包括的ケアのあり方の検討】

・より複数の視点(MSW等)も踏まえつつ、検討を進める。

- ・時系列のケアの図式の作成
- ・内容の検証(医師への協力要請予定)
- ・包括的なケア・チーム医療の活用に関する資料の作成
- ・資料の検証と修正

2) 【課題2：終末期医療のケアのあり方の検討】

- ・今回の調査から、緩和ケア・ホスピスでエイズ患者のケアに携わった経験を持つ心理職への聞き取り
- ・その聞き取りをもとにした、緩和ケア・ホスピススタッフを対象とした HIV 感染者理解促進するための具体的な資料と教育(研修)等の実践

G. 研究発表

論文・著作発表

1. 矢永由里子. 序章 身体医療と心理臨床. がんとエイズの心理臨床 矢永由里子・小池眞規子(編) 1~8, 2013. 創元社
2. 矢永由里子. HIV/エイズ医療のなかの心理臨床. がんとエイズの心理臨床 矢永由里子・小池眞規子(編) 199~202. 2013. 創元社
3. 矢永由里子. 終章 これからの新臨床. がんとエイズの心理臨床 矢永由里子・小池眞規子(編) 203~215. 2013. 創元社
4. 矢永由里子. カウンセリング概論 日本医療マネジメント学会 医療福祉連携士講習 22-27, 2013.

学会発表

1. 矢永由里子、長谷川直樹、岩田敏、加藤真吾. 病院での HIV 検査対応の実際、現場の教育・研修ニーズの内容把握と医療者主体の検査のあり方の検討. 第 27 回日本エイズ学術集会・総会(平成 25 年年 11 月 21 日、熊本市)
2. 矢永由里子、山田里佳、谷口晴記他. 妊婦 HIV スクリーニング検査の調査による検査時対応の現状と課題の検討. 第 27 回日本エイズ学術集会・総会(平成 25 年 11 月 22 日、熊本市)

エイズリンパ腫における miRNA の発現異常と シグナル伝達系の解析

研究分担者： 渡邊俊樹 東京大学大学院新領域創成科学研究科
メディカルゲノム専攻病態医療科学分野 教授

研究協力者： 山岸誠（東京大学大学院新領域科学研究科
メディカルゲノム専攻病態医療科学分野）
片野晴隆（国立感染症研究所感染病理部）
比島恒和（東京都立駒込病院病理科）
大田泰徳（虎の門病院病理部）

研究要旨：

エイズリンパ腫の病態解明と新たな危険因子の同定を目指す上で、臨床サンプルの解析データに基づいて miRNA とシグナル伝達経路の異常を明らかにし、さらにそれらの相互関係を明らかにすることが重要である。本研究では新たな miRNA のスクリーニング系と複数の実験モデルを用いて以下の事象を明らかにした。①正常 B 細胞において、miRNA 群は BCR シグナルに対して複数の遺伝子を標的とすることで、抑制的に機能する、②リンパ腫細胞ではこれらの miRNA 群がまとめて発現抑制されており、その結果 BCR 因子の発現異常を介して恒常的なシグナル活性化を誘導する、③エピジェネティックな抑制メカニズムが miRNA 群を抑制する。以上の結果はエイズリンパ腫における新たな危険因子を同定する上で重要な成果である。

A. 研究目的

エイズ合併 B 細胞リンパ腫は一般に進行が早く予後が不良である。HAART の導入後エイズリンパ腫の発症は減少しているが、依然としてエイズ患者の予後を左右する重大な合併症であり、分子基盤の理解と治療法の開発、また発症危険因子の探索は急務である。

我々はこれまでに、成人 T 細胞白血病を始めとするリンパ腫細胞における重要な miRNA の発現異常機構とその生物学的意義を報告してきた(Yamagishi et al., Cancer Cell, 2012)。また昨年度までにエイズリンパ腫を含む慢性大細胞型 B 細胞リンパ腫(DLBCL)における miRNA の発現異常パターンを網羅的解析によって明らかにし、さらに DLBCL で恒常的に活性化している BCR シグナルとの関連について検討を重ねて来た。

エイズリンパ腫の危険因子や予後予測因子を同定する上で、異常値を示す miRNA の機能を明らかにすることが重要な課題である。我々が明らかにした異常発現 miRNA 群はエイズリンパ腫で特に異常な減少を示していることから、本研究課題を遂行する上で重要な研究課題であると考えた。

しかしながら、そもそも B 細胞における miRNA 制御系の必要性やシグナル伝達経路に与える影響については、*Dicer* 遺伝子のノックアウトマウスを用いた報告を始めとする少数の知見しかなく、ヒト B 細胞における miRNA の存在意義やシグナル伝達経路における役割についてはほとんど不明である。

そこで本研究では3年間の研究計画で B 細胞の miRNA の存在意義を新たなスクリーニング系で再定義し、その上でエイズリンパ腫細胞にお

ける miRNA の発現異常の実態解明と分子標的
や予後予測因子としての利用可能性について
基礎研究の立場から取り組むこととした。

B. 研究方法

1. RISC-capture assay の確立と各種 B 細胞の解析

細胞中の RISC-RNA 複合体は、細胞溶解後 Ago2
に対する抗体を用いた免疫沈降法によって精
製した。その中に含まれる RNA を精製したの
ち、qRT-PCR によって標的 mRNA 及び miRNA
の定量を行った。

2. miR-200 ファミリーの機能解析

各 miRNA の機能やシグナル伝達系を解析する
ために、目的の miRNA や shRNA を発現するレ
ンチウイルスベクターの作成を行った。レンチ
ウイルスベクターは理化学研究所バイオリソ
ースセンター三好浩之教授が開発した系を利用
した。miRNA の標的遺伝子の同定は、
TargetScan による予測を行ったのち、3'UTR を
luciferase につなげたレポーターアッセイによ
り検証を行った。また各 miRNA を過剰発現さ
せた細胞を用いて RT-PCR 及び Western blot によ
り標的遺伝子を決定した。さらに miRNA によ
って直接制御されているかを確認する為に、
miRNA を過剰発現させた細胞から RISC-RNA
複合体を精製し、標的 mRNA の定量を行った。

3. B 細胞のシグナルについての検討

末梢血由来正常 B 細胞は健常人 PBMC から磁
気ビーズを用いて濃縮を行った。BCR からのシ
グナルの活性化には α -IgM を用いた。また BCR
シグナル阻害剤には、SYK の阻害剤として
Dasatinib 及び Fostamatinib、PKC β の阻害剤とし
て Enzastaurin、IKK β の阻害剤として
BMS-345541 を用いた。また shRNA によるノッ
クダウンによる検討も行った。B 細胞活性化の
指標としては CD25、CD83 などの遺伝子発現レ
ベルを検討し、また NF- κ B シグナルの活性化レ
ベルを指標とした。

C. 研究結果

1. RISC-capture assay の確立

昨年度までの研究結果から、エイズ関連リンパ
腫において miR-200 ファミリー、miR-203、及
び miR-31 の発現が著しく減少していることが
わかった。さらにこの miRNA 群を過剰発現さ
せた実験から、これらの miRNA が複数の BCR
経路因子を標的としていることが示唆されて
いるが、そもそも B 細胞シグナル伝達経路と
miRNA 群が相互作用するインターフェイスは
明らかでない。このようなシグナル経路と
miRNA 群の相互作用のマッピングは他のがん
研究においても当てはまる重要な課題である。
そこでまず最近提案されている RISC-capture
assay を用いることとした。本方法は miRNA の
機能的複合体である RISC を細胞内から免疫沈
降法を用いて抽出、精製し、その中に取り込ま
れている miRNA 及び mRNA を定量する方法で
ある。本手法を用いることで興味ある細胞中で
機能している miRNA 及びそれらによって制御
されている mRNA を検出、定量することができ
る。しかしながらこれまでに報告されている方
法論は用いる細胞、抗体、溶解法、定量法など
の点で最適化されておらず、B 細胞における
miRNA-mRNA 相互作用を正確に知る上で、ま
ず実験系の確立が必要であった。

RISC-RNA 複合体を効率よく精製できる条件を
検討し、さらに RISC の抗原タンパク質として
複数の抗体を用いて検討した結果、miRNA や
mRNA の定量に適して抗原は Ago2 であった。
細胞内に存在する Ago2 複合体には安定的に
miRNA が取り込まれており、細胞に存在する全
miRNA との相関が認められた。また標的となる
mRNA は RISC 内で想像以上に安定的に存在し
ていることがわかった。さらに luciferase を用い
たレポーターアッセイを組み合わせで検討し
た結果、取り込まれた mRNA 量と遺伝子発現量
は逆相関することが明らかになった。

2. B 細胞における BCR シグナル経路と miRNA のインターフェイスの同定

上記の系を用いて、ヒト末梢血由来正常 B 細胞

の RISC-RNA 複合体の解析を行った。標的 mRNA 候補は、その増減が BCR シグナル経路の活性レベルに影響する 36 遺伝子に注目し、それぞれを real-time PCR により定量を行った。驚くべき事に BCR 経路因子をコードする mRNA の多くが RISC に取り込まれており、BCR シグナルは定常状態で miRNA の制御下にあることがわかった。一方、BCR シグナルの活性化を確認した複数の DLBCL 由来細胞株を用いて同様の検討を行った結果、BCR 経路の mRNA が RISC にほとんど取り込まれていないことが明らかになった。さらに、miRNA の成熟過程に重要な Dicer もしくは TRBP をノックダウンする shRNA を LCL に導入し、同様の検討を行った結果、BCR 因子 mRNA の RISC への取り込みが急激に減少したことから、B 細胞でみられる mRNA の RISC への取り込みは miRNA に依存的であることが示唆された。

一方で RISC 中に存在する miRNA についても同時に定量した結果、我々が明らかにしたリンパ腫特異的に発現が減少している miRNA は、いずれもリンパ腫細胞の RISC 中にほとんど存在しないことがわかった。一方正常 B 細胞の RISC には miRNA 群が非常に高濃度に濃縮されており、定常状態で機能していると考えられた。また B 細胞の一次的な活性化ではこれらの miRNA、mRNA とともに RISC に取り込まれる量の変化は見られず、シグナル活性化による feedback ではない事も示唆された。

3. DLBCL のシグナル伝達経路の活性化と miRNA の発現減少の関係

DLBCL における miRNA 群の機能不全と BCR シグナルの活性化の関係を明らかにするため、まず RISC-capture 法を応用して各 miRNA の標的遺伝子のスクリーニングを行った。それぞれの miRNA の発現を誘導するレンチウイルスベクターを DLBCL 細胞株に導入し、その細胞から RISC-RNA 複合体の精製を行った。取り込まれた mRNA 量について野生株と miRNA 発現細胞株で比較した結果、複数の BCR 経路因子 mRNA が miRNA 依存的に RISC に取り込まれ

ることがわかった。miRNA の有無で RISC 取り込み量の差が大きい遺伝子に関して、アルゴリズムを用いて miRNA の結合配列を予測した後、レポーターアッセイ及びウエスタンブロット法を用いて実験的な検証を行った。その結果 miR-200c 及び miR-31 は主に NF- κ B 経路の様々な因子に対して抑制作用を持つ事、また miR-203 は NF- κ B 経路、PI3K-Akt 経路、及び Ras-Erk 経路に対して抑制的に働く事がわかった。実際に上記の miRNA をリンパ腫細胞株に発現させたところ、各シグナル経路の活性レベルが抑制され、さらに細胞の増殖能が抑制されることがわかった。興味深いことに、上記の分子間相互作用は B 細胞において特異的に見られ、上皮系細胞でこれらの miRNA が発現している低悪性度の細胞株では今回同定した mRNA の有為な取り込みを認めなかった。従って上述したメカニズムは B 細胞に特化したプロセスであると考えられた。

ここまでの結果から B 細胞において複数の miRNA が機能的に共役してシグナル経路に対して複数のブレーキのように働いていることが示唆された。実際に各 miRNA に対するスポンジ分子を設計し、内在性 miRNA を阻害した場合、一つの miRNA を単独で抑制しても自動的にシグナルが活性化されなかった。一方で 3 つの miRNA を同時に抑制できるスポンジ分子を発現させた場合、BCR 経路の活性化が促進されることがわかった。

以上のことから、B 細胞において複数の miRNA が BCR 経路に対して抑制的に働いており、一方でリンパ腫細胞ではこれらのブレーキがすべて機能不全な状態のため、恒常的なシグナル経路の活性化を助長すると考えられた。

4. DLBCL で見られる遺伝子異常と miRNA 発現減少の関係性

実際のリンパ腫細胞の一部では遺伝子異常によって特徴的なシグナル伝達経路の活性化が引き起こされている。なかでも CARD11, A20, MYD88, PTEN の各遺伝子異常はそれぞれの機能を増強もしくは欠失することによって

NF- κ B 経路や PI3K-Akt 経路の活性化を引き起こす事が知られている。これらの遺伝子は本研究で明らかにした miRNA 標的遺伝子群と密接な関係があり、リンパ腫細胞における相互関係が予想された。

そこでこれらの遺伝子異常を模倣する細胞株モデルを樹立し、miRNA の発現レベルとの関連を調べた。その結果、遺伝子異常によって引き起こされたシグナル伝達経路の強力な活性化に対して、miR-200c, miR-203, miR-31 はいずれも抑制的に働くことがわかった。逆に内在性 miRNA を阻害した場合には、遺伝子異常によって誘導される活性化がさらに増強されることもわかった。

5. Epigenetic 関連因子と miRNA の関係

上記の結果から、複数の miRNA が同時に抑制されることがリンパ腫細胞におけるシグナル伝達経路の活性化に重要であることがわかった。興味深いことに、我々はこれまでにこれらの miRNA がすべてエピジェネティックな異常によって抑制されていることを明らかにしてきた。そこでエピジェネティックな異常がこれらの miRNA を介して B 細胞のシグナル伝達系に関与しているかを検討するために、リンパ腫細胞に対して polycomb ファミリーの阻害剤処理、もしくは shRNA によるノックダウンを行った結果、miRNA の発現回復を介して BCR 経路の抑制が認められた。さらに本年度は polycomb に限定せず、エピジェネティック異常の詳細な解析を行った結果、DLBCL や FL で高頻度に遺伝子異常が認められる MLL2 の欠損が H3K4me3 の減少によって miRNA の発現減少に寄与していることがわかった。

D. 考察

miRNA が発見されて以来、非常に多くの研究が行われ、各 miRNA の機能やがんと関連が明らかとなってきた。しかしながら一つの miRNA が持つ生物学的インパクトは想像以上に小さく、実際に単独の miRNA 遺伝子を不活化したノックアウトマウスは大きな表現型の変化を

誘導することはまれである。一方でがん細胞では miRNA 経路の全体的な異常が保存されていることが明白であり、miRNA と標的遺伝子の 1 対 1 の研究だけでなく、異常な miRNA と標的遺伝子群の相互作用面(=インターフェイス)を明らかにすることが求められる。

本研究では上記を考慮し、これまでに明らかにした miRNA の異常が実際のリンパ腫細胞に与える影響と分子メカニズムを明らかにするために、新たなスクリーニング系の導入を試みた。本年度の研究成果として、①正常 B 細胞において、miRNA 群は BCR シグナルに対して複数の遺伝子を標的とすることで、抑制的に機能する、②リンパ腫細胞ではこれらの miRNA 群がまとめて発現抑制されており、その結果 BCR 因子の発現異常を介して恒常的なシグナル活性化を誘導する、③miRNA 群の抑制に共通するメカニズムとして、エピジェネティックな異常がある、ことがわかった。

本研究で明らかにした miRNA 群はエイズリンパ腫でより異常な抑制を示していることから、エイズリンパ腫ではよりこの経路の活性化が大きなインパクトを持つ事が示唆され、同時に分子標的としての可能性が期待される。今後はこれらの異常が与える細胞学的影響を詳細に解析し、またエイズ合併との関連について明らかにする必要がある。またこれらの異常を迅速にモニターできる系についても引き続き検討する必要がある。

E. 結論

エイズリンパ腫で抑制されている miRNA 群は、複数の遺伝子を標的とし、シグナル伝達経路に対して抑制的に働く。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 promotes T-cell growth. **Cancer Sci** 104(8):1097-1106, Aug. 2013 (doi: 10.1111/cas.12181)
- 2) Tsukasaki K, Imaizumi Y, Tokura Y, Ohshima K, Kawai K, Utsunomiya A, Amano M, Watanabe T, Nakamura S, Iwatsuki K, Kamihira S, Yamaguchi K, Shimoyama M. Meeting report on the possible proposal of an extra-nodal primary cutaneous variant in the lymphoma type of adult T-cell leukemia-lymphoma. **J Dermatol** in press
 - 3) Togano T, Nakashima M, Watanabe M, Umezawa K, Watanabe T, Higashihara M, Horie R. Synergistic Effect of 5-Azacytidine and NF-κB Inhibitor DHMEQ on Apoptosis Induction in Myeloid Leukemia Cells. **Oncol Res** 20(12):571-577, 2013 (doi: 10.3727/096504013X13775486749371)
 - 4) Ly BT, Chi HT, Yamagishi M, Kano Y, Hara Y, Nakano K, Sato Y, Watanabe T. Inhibition of FLT3 expression by green tea catechins in FLT3 mutated-AML cells. **PLoS One** 8(6):e66378, Jun. 2013 (doi: 10.1371/journal.pone.0066378)
 - 5) Mahieux R, Watanabe T. Forefront studies on HTLV-1 oncogenesis. **Front Microbiol** 4:156, Jun. 2013 (doi: 10.3389/fmicb.2013.00156)
 - 6) Nakano K, Ando T, Yamagishi M, Yokoyama K, Ishida T, Ohsugi T, Tanaka Y, Brighty DW, Watanabe T. Viral interference with host mRNA surveillance, the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) pathway, through a new function of HTLV-1 Rex: implications for retroviral replication. **Microbes Infect** 15(6-7):491-505, Jun. 2013 (doi: 10.1016/j.micinf.2013.03.006)
 - 7) Yuki H, Ueno S, Tatetsu H, Niuro H, Iino T, Endo S, Kawano Y, Komohara Y, Takeya M, Hata H, Okada S, Watanabe T, Akashi K, Mitsuya H, Okuno Y. PU.1 is a potent tumor suppressor in classical Hodgkin lymphoma cells. **Blood** 121(6):962-970, Feb. 2013 (doi: 10.1182/blood-2012-05-431429)
- (総説)
- 1) 山岸誠、渡邊俊樹、特集/血液疾患におけるエピゲノム異常と治療「ATL発症におけるエピゲノム解析の進歩 (The State of the Art in Epigenomics of Adult T Cell Leukemia)」、血液内科、66(2)、2013年2月1.
 - 2) 渡邊俊樹、特集：リンパ系腫瘍—最新の病態解析と治療—「成人T細胞白血病／リンパ腫の分子病態解析と治療の進歩」、最新医学、68(10)：40-47、2013年10月1.
 - 3) 渡邊俊樹 (分担執筆)、「IV.リンパ球系 3. 成人T細胞白血病/リンパ腫におけるNF-κB経路の活性化」、Annual Review 2014 血液、147-152、総239ページ程度、中外医学社、2014年1月
2. 学会発表
(国際学会)
- 1) Yamagishi M, Watanabe T, “EPIGENETIC DEREGULATION OF MIRNA IN MALIGNANT LYMPHOMAS”, 18th Congress of EHA, Stockholm, Sweden, June 16(June 12-June 16), 2013 (Oral)
 - 2) Nagata Y, Sato-Otsubo A, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Kon A, Yoshida K, Sanada M, Ishiyama K, Miyawaki S, Kitanaka A, Shimoda K, Miyano S, Watanabe T, Ogawa S, “Whole exome analysis reveals mutations of TET2 in adult T-cell leukemia/lymphoma”, 18th Congress of EHA, Stockholm, Sweden, June 14(June 12-June 16), 2013 (Poster)
 - 3) Takemoto S, Uzawa K, Morita K, Pornkunal R, Haga Y, Iwanaga M, Sagara Y, Kawano F, Watanabe T, “Adult T-cell leukemia/lymphoma following elevation of serum levels of soluble cytokine receptors, sCD25 and Scd30”, 16th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, Montreal, Canada, June 26-30, 2013(Poster)
 - 4) Watanabe T, “Hematological neoplasms and viral Infections”, XXVI Symposium IACRLRD, Lingotto Conference Center, Torino, Italy, Sept. 14(Sept. 11- Sept. 14), 2013(Invited)
 - 5) Yamagishi M, Fujikawa D, Kurokawa N, Soejima A, Takahashi R, Sakai N, Nakagawa S, Nakano K, Kobayashi S, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru K, Ogawa S, Watanabe T, “Molecular hallmarks of adult T cell leukemia: miRNA, epigenetics, and emerging signaling abnormalities”, 16th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, Montreal, Canada, June 29(June 26-30), 2013(Oral) **HTLV 2013 Young Investigator Travel Award**
 - 6) Nakano K, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru K, Watanabe T, “Disorders of the cMyb proto-oncogene expression and its significance in the course of ATL development”, 16th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses,

Montreal, Canada, June 26-30, 2013(Poster)

- 7) Fujikawa D, Yamagishi M, Kurokawa N, Soejima A, Ishida T, Tanaka Y, Nakano K, Watanabe T, “HTLV-1 Tax disrupts the host epigenome by interacting with a Polycomb group protein EZH2”, 16th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, Montreal, Canada, June 29(June 26-June 30), 2013(Poster) **Top10 posters**
- 8) Ly BTK, Chi HT, Yamagishi M, Kano Y, Hara Y, Nakano K, Sato Y, Watanabe T, “Inhibition of FLT3 expression by EGCG in FLT3 mutated-AML cells”, The 5th International Conference on O-CHA (Tea) Culture and Science(第5回国際 O-CHA 学術会議), Shizuoka Convention & Arts Center, Shizuoka, November. 8(November 6- November 8), 2013 (Poster) **Outstanding Poster Award**

(国内学会)

- 1) Ly BTK, Chi HT, Yamagishi M, Kano Y, Hara Y, Nakano K, Sato Y, Watanabe T, “Inhibition of FLT3 Expression by EGCG in FLT3 mutated-AML Cells”, 平成25年度東京大学医科学研究所研究成果発表会, 東京大学医科学研究所, 2013年5月30日-31日 (ポスター発表)
- 2) Fujikawa D, Yamagishi M, Kurokawa N, Soejima A, Ishida T, Tanaka Y, Nakano K, Watanabe T, “HTLV-1 Tax disrupts the host epigenome by interacting with a Polycomb group protein EZH2”, 平成25年度東京大学医科学研究所研究成果発表会, 東京大学医科学研究所, 2013年5月30日-31日 (ポスター発表) **ポスター賞**
- 3) 中野和民、安東友美、山岸誠、横山弘一、唐澤伸明、橋爪大明、高橋隆太郎、高橋碧、石田尚臣、大杉剛生、田中勇悦、David W. Brighty、渡邊俊樹、「ウイルス複製を有利にするHTLV-1 Rexの新たな機能の可能性と宿主細胞への影響」、第2回ATLシンポジウム、第6回HTLV-1研究会・シンポジウム、東京大学医科学研究所、2013年8月24日 (2012年8月23日-8月25日) (シンポジウム発表)
- 4) 渡邊俊樹、「我が国におけるHTLV-1/ATL研究の現状」、大河内メモリアルシンポジウム1:HTLV-1の現状、第61回日本輸血・細胞治療学会総会、パシフィコ横浜、横浜、2013年5月16日 (2013年5月16日—5月18日) (招待講演)
- 5) 堀江良一、渡邊真理子、伊藤金次、梅野富輝、Marshall E. Kadin, 渡邊俊樹、東原正明、「Hodgkinリンパ腫と未分化大細胞型リンパ腫におけるCD30過剰発現機構の解析」、第53回日本リンパ網内系学会総会、国立京都国際会館、京都、2013年5月18日 (2013年5月16日-5月18日) (ポスター発表)
- 6) 若林翼、矢持忠徳、矢持淑子、佐々木陽介、Sanaz Firouzi、瀧本雅文、渡邊俊樹、「成人T細胞白血病/リンパ腫(ATLL)における、がん幹細胞微小環境の組織病理学的同定の試み」、第102回日本病理学会総会、ロイトン札幌、札幌、2013年6月6日-6月8日 (ポスター発表)
- 7) 渡邊俊樹、「ATLの分子病態を基盤とした新規治療法の可能性」、腫瘍別シンポジウム、第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、横浜、2013年10月3日 (2013年10月3日—10月5日) (口演発表)
- 8) 矢持忠徳、守田陽平、矢持淑子、Sanaz Firoouzi、佐々木陽介、若林翼、渡辺信和、内丸薫、宇都宮與、渡邊俊樹、「Putative ATL tumor initiating cells の解析」、第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、横浜、2013年10月3日 (2013年10月3日—10月5日) (ポスター発表)
- 9) 堀江良一、渡邊真理子、伊藤金次、梅野富輝、カディン マーシャル、梅澤一夫、渡邊俊樹、東原正明、「Hodgkinリンパ腫と未分化大細胞性リンパ腫におけるCD30過剰発現機構の解析」、第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、横浜、2013年10月3日 (2013年10月3日—10月5日) (ポスター発表)
- 10) 福田裕章、日野原邦彦、島村徹平、渡邊俊樹、宮野悟、後藤典子、「ヒト乳がん細胞において Amphiregulin/EGFR 経路は mammosphere形成に寄与する」、第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、横浜、2013年10月3日 (2013年10月3日—10月5日) (ポスター発表)
- 11) 山本悠貴、大野麻美子、松田浩一、渡邊俊樹、太田力、「DNA修復因子NBS1の塩基多型によるDSBR機能低下と発がんリスクの増大」、第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、横浜、2013年10月4日 (2013年10月3日—10月5日) (口演発表)
- 12) Yamakawa N, Yokoyama K, Lu J, Imadome K, Watanabe T, Horie R, Hozumi K, Yahara T, Ando K, Nakamura N, Kotani A, “The regulation of “Inflammatory niche” with