

**全例登録を基盤とした臨床情報と遺伝子情報の融合による ATLL 予後予測モデル、
発症前診断の開発と、ATLL クローン進化機序の解明**

業務主任者： 下田和哉 宮崎大学医学部 内科学講座消化器血液学分野

研究要旨

本研究班は、研究参加施設より集積した成人 T 細胞白血病・リンパ腫（adult T-cell leukemia/lymphoma; ATLL）を対象として網羅的遺伝子解析を実施し、発症機構および病態形成に関わる遺伝子異常に関する詳細な情報を得ることによって、臨床情報と遺伝子情報の融合による ATLL 予後予測モデルの作成、ATLL の発症機序に重要なドライバー遺伝子変異の同定、ATLL のクローン進化機序解明を目的としている。

3 年計画の初年度である平成 26 年度は、業務主任者 1 名、担当責任者 5 名の体制で研究を実施した。ATLL 症例における臨床情報と遺伝子変異情報の統合については、研究参加施設における ATLL 症例の全例登録と遺伝子解析が可能となるシステムを構築して集積した ATLL 症例に対して全エクソーム解析を実施し、新たな予後予測モデルを作成するために必要な多数の症例を効率的に解析可能とする標的シーケンスを行うための基盤となる網羅的な遺伝子変異情報を得た。ATLL のドライバー遺伝子変異の同定については、ATLL 細胞において有意に変異している 50 個の遺伝子を見だし、ドライバー遺伝子候補に関して具体的なリストを作成することができた。また、ATLL のクローン進展解析を目的として、同一症例よりの経時的な検体の集積、および遺伝子解析の体制を整備し、次年度以降の網羅的遺伝子解析によるクローン進化メカニズムの解明を可能とした。

業務項目： ATLL 症例における臨床情報と遺伝子変異情報の統合

下田和哉

宮崎大学医学部内科学講座消化器血液学分野 教授

小川誠司

京都大学大学院医学研究科 腫瘍生物学教授

柴田龍弘

国立がん研究センター がんゲノミクス研究分野 分野長

宇都宮與

今村病院分院 院長

日高道弘

国立病院機構熊本医療センター 血液内科部長

北中 明

宮崎大学医学部内科学講座消化器血液学分野 准教授

業務項目： ATLL のドライバー遺伝子変異の同定

下田和哉

宮崎大学医学部内科学講座消化器血液学分野 教授

小川誠司

京都大学大学院医学研究科 腫瘍生物学教授

柴田龍弘

国立がん研究センター がんゲノミクス研究分野 分野長

業務項目： ATLL のクローン進展の解析

下田和哉

宮崎大学医学部内科学講座消化器血液学分野 教授

小川誠司

京都大学大学院医学研究科 腫瘍生物学教授

柴田龍弘

国立がん研究センター がんゲノミクス研究分野 分野長

北中 明

宮崎大学医学部内科学講座消化器血液学分野 准教授

A. 研究目的

成人 T 細胞白血病・リンパ腫 (adult T-cell leukemia/lymphoma; ATLL) は極めて予後不良の末梢性 T 細胞性悪性リンパ腫である。1977 年に行われた内山、高月らによる疾患概念の提唱から既に 40 年近くが経過しようとしているが、残念ながらその間に目立った治療成績の向上は得られていない。この現状を打破するためには、各症例の的確な層別化を可能とする手法を開発し既存の治療法の最適化を行うことによって予後を改善する、または、従来とは全く機序の異なる治療法を開発する、等のブレイクスルーが必要である。これらいずれのアプローチも、その実現には ATLL の発症機構、病態形成に関わる遺伝子異常に関する詳細な情報を得ることが必須である。そこで、網羅的遺伝子解析手法を用いて、1. ATLL 症例における臨床情報と遺伝子変異情報の統合、2. ATLL のドライバー遺伝子変異の同定、3. ATLL のクローン進展の解析、を行うことが、本研究班の目的である。

1. ATLL 症例における臨床情報と遺伝子変異情報の統合

HLV-1 キャリアの生涯 ATLL 発症率は約 5% 程度であるが一旦 ATLL を発症すると長期生存は約 15% と極めて予後不良である。一方、少数の症例に対しては化学療法のみでも長期生存を達成しうることが報告されている。造血幹細胞移植は ATLL に対して治癒を期待し得る治療手段であるが、発症の高齢化に伴い血縁ドナーを有する症例は少ない。非血縁者間移植の場合は、移植実施までに一定の期間を要するが安定した実績がある骨髄バンクを介した移植と、速やかに移植が実施可能であるものの、やや成績の劣る可能性がある臍帯血移植の何れを行うほうが有益であるかは症例毎に異なり、その選択は医療者を悩ませている。また、ATLL に対する移植療法は高い治療関連死亡を伴うため移植そのものの適用決定に苦慮することも多い。現在日常臨床で使用可能な手法を用いて ATLL 全体の治療成績を向上させるためには、短期間に予後不良となる症例には臍帯血移植、それ以外の症例には骨髄バンクを介した移植を実施し、少数例存在する化学療法による治癒可能群(予後良好群)には化学療法を継続するといった患者の層別化に基づいた治療戦略の確立が望まれる。

本研究では、ATLL 多発地域である宮崎県の全血液疾患診療施設と中・南九州の中核的診療施設から前向きに症例登録を行い、臨床パラメータと遺伝子変異パラメータを組み合わせた

より精度の高い ATLL 予後予測モデルの作成を目的とする。また、研究参加施設内において、染色体異常と予後に関する後方視的解析をあわせて実施する。

2. ATLL のドライバー遺伝子変異の同定

ATLL 発症者の高齢化に伴い、患者の約半数は、現在唯一治癒を期待しうる治療手段である同種造血幹細胞移植の対象となり得ない。そのため、化学療法、移植療法以外の手法による ATLL 治療戦略の確立が急務である。とりわけ、近年その可能性が広がっている腫瘍細胞に存在する遺伝子変異を対象とした分子標的療法は、次世代の ATLL 治療戦略として極めて魅力的である。

本研究では、ATLL 患者より得た腫瘍細胞のゲノム配列を解読し、ATLL にみられる体細胞突然変異について初めての網羅的解析を実施し、ATLL のドライバー遺伝子を同定するためのカタログ作成を試みる。

3. ATLL のクローン進展の解析

ATLL の多くは、化学療法の終了後あるいは化学療法継続中に、再燃、病勢の進行をきたし、最終的に患者の死亡へとつながる。ATLL において時間の経過とともに起きるクローン進展に関する知見は少なく、化学療法に対する早期の耐性獲得メカニズムを知る上でも重要な課題である。

本研究において、われわれは研究参加施設で治療を受けた ATLL 患者の再発時、再燃時に経時的なサンプル採取を行い、網羅的遺伝子解析によって ATLL におけるクローン進展の解析を行うこととする。

B. 研究方法

ATLL の実地臨床および臨床研究、悪性腫瘍に対する網羅的な遺伝子解析の領域でわが国を代表する専門家に研究分担者として参加を得て、密接な連携のもとで共同研究を推進している。

1. ATLL 症例における臨床情報と遺伝子変異情報の統合

ATLL の全例登録： ATLL 多発地域である宮崎県の全血液疾患診療施設と中・南九州の中核的診療施設より前向きに症例を登録し、患者検体の収集を実施する。

網羅的遺伝子解析： ATLL 細胞を対象とした全エクソーム解析により、反復する変異、有意に変異頻度が高い遺伝子を検索する。

臨床情報と遺伝子情報の融合： 臨床パラメータ、遺伝子変異パラメータ、選択された治療

などと予後の関連を検討する。

染色体異常が同種造血幹細胞移植に及ぼす影響の解析:単一施設における後方視的解析を行う。

2. ATLL のドライバー遺伝子変異の同定

本研究参加施設から得た ATLL 症例を中心とした Discovery cohort (N = 50) を用いて、50 例に全エクソーム解析、10 例に全ゲノム解析、31 例に RNA シークエンス、50 例に SNP アレイ解析を実施した。これらの解析結果を基盤として、別個に収集した Extended cohort (N = 406) を対象として、321 例に 146 個の候補遺伝子を対象とした標的シークエンス解析を、406 例に SNP アレイ解析を実施した。

3. ATLL のクローン進展の解析

本研究参加施設において診断し、これまでに診断時の腫瘍細胞に対して全エクソーム解析を実施し得た ATLL 症例を対象として、化学療法後の再発、再燃時に経時的なサンプル採取を行った。また、新規に発症した ATLL 症例についても、正常コントロールとしての口腔粘膜細胞 DNA の採取を行い、全ゲノム解析、全エクソーム解析によるクローン進展の解析を実施可能とした上で、経時的なサンプル採取を継続する。

(倫理面への配慮)

患者検体の収集、遺伝子解析については、宮崎大学医学部および参加施設において倫理委員会の承認を受けて実施されており、匿名化による個人情報保護等の人権擁護上の配慮、不利益・危険性の排除、説明と文書による同意が行なわれている。

C. 研究結果

1. ATLL 症例における臨床情報と遺伝子変異情報の統合

本研究参加施設より、これまでに合計 101 例の ATLL が症例登録され、臨床情報の集積と網羅的遺伝子解析が進行している。そのうち 39 例について全エクソーム解析が終了した。急性型 ATLL とリンパ腫型 ATLL では、1 症例あたりそれぞれ中央値で 84.3 個、83.8 個の遺伝子変異が存在していた。全エクソーム解析からは ATLL で有意に変異する遺伝子が 15 個見いだされ、それらの変異について 1 症例あたりの中央値は、急性型、リンパ腫型ともに 3.2 個であることが判明した。慢性型 ATLL とくすぶり型 ATLL では、全体の変異数の中央値はそれぞれ 70.3 個、25.5 個、有意な遺伝子変異の中央値は、2.3 個、2 個であった。予備的な検討であ

るが、ATLL において有意に変異している遺伝子について、遺伝子変異の数が多い程予後が不良である傾向が認められた。また、未だ少数例の検討であるため有意なデータではないものの、変異の存在が予後に影響する可能性がある遺伝子も複数見いだされている。

染色体異常が同種造血幹細胞移植の予後に及ぼす影響については、14 番の欠失や 1q21、5q、13p、15p などの構造異常と不良な予後の関連が示唆された。

2. ATLL のドライバー遺伝子変異の同定

全エクソーム解析から、ATLL (全ての病型を含む) では 1 症例あたり中央値 75.1 個の遺伝子変異が存在することが明らかとなった。15 個の遺伝子について変異が有意に高頻度で出現しており、ドライバー遺伝子の候補と考えられた。また、急性型 ATLL、リンパ腫型 ATLL におけるこれらドライバー遺伝子候補の中央値は 3 個であることが判明した。引き続いて実施した 321 症例を対象とした標的シークエンス解析からは、検討した 146 遺伝子のうち 50 個の遺伝子が ATLL 細胞において有意に変異していることが明らかとなり、ATLL のドライバー遺伝子同定のための網羅的カタログが作成できた。驚くべきことに、これらの遺伝子の中で 15 個の遺伝子が 10% 以上の頻度で認められた。また、ATLL で有意に認められる変異およびコピー数異常を来している遺伝子に関して、その遺伝子産物の機能に応じた分類を行ったところ、1. T cell receptor signaling/NF- κ B pathway、2. G protein-coupled receptor、3. NOTCH and JAK/STAT signaling、4. Transcriptional regulation、5. Immune-surveillance 等の様々な経路に関わっていることが明らかとなった。また、ATLL 細胞において有意に変異またはコピー数異常を来している遺伝子産物の約半数が、HTLV-1 の pX 領域にコードされ種々な細胞生存シグナルを活性化することで細胞を不死化する Tax と直接会合する、または Tax に関連する経路に関与するものであることが明らかとなった。

3. ATLL のクローン進展の解析

これまでに研究班で症例登録を行い、既に全エクソーム解析を終了した aggressive ATLL のうち 2 症例から化学療法後の再発時検体を採取した。また、全エクソーム解析を実施中の症例からも 3 例の再発時検体が得られており、今後、経時的検体集積を継続しながら再発時クローンの網羅的遺伝子解析を実施し、ATLL のクローン進展のメカニズムを明らかとする。

D. 考察

1. ATLL 症例における臨床情報と遺伝子変異情報の統合

近年、予後に直結する新たな疾患特異的マーカー検索のための遺伝子解析が広く行われている。中でも腫瘍細胞に頻発する体細胞変異の解析はシーケンス技術の進歩によって実施が容易となりつつあり、一部の遺伝子変異解析は既に日常診療で活用されている。さらに多数の遺伝子情報を患者の診療に利用する試みも行われており、骨髄異形成症候群においては、遺伝子変異の情報を臨床情報に組み込むことによって既存の予後予測モデルをさらに改善し得ることが、本研究班の研究分担者らによって報告されている (Haferlach et al. Leukemia, 2014)。本研究では臨床パラメータと遺伝子変異パラメータを融合した、より精度の高い新たな ATLL 予後予測モデルの作成を目的として症例集積と遺伝子解析を実施している。初年度は症例集積システムの構築と検体集積、次年度以降に多数の検体を効率よく解析するための標的遺伝子を決定する基盤となるデータを得ることが可能であった。次年度以降の研究によって、ATLL の予後に直結し、その有無を知ることが臨床的に有用な遺伝子変異の同定と、当該遺伝子の情報を組み込んだ予後予測モデルの作成が可能になると考えられる。

染色体異常が同種造血幹細胞移植に及ぼす影響の解析では、同種造血幹細胞移植を施行していない ATLL 患者でみられた染色体異常と予後との関連性が同種移植施行例では減弱していた。その理由として同種造血幹細胞移植療法が、ATLL 患者の予後不良因子をある程度克服している可能性が考えられた。

2. ATLL のドライバー遺伝子変異の同定

今年度、われわれは ATLL におけるドライバー遺伝子変異を同定するための基盤となる網羅的カタログ作成を行った。その結果、ATLL において有意に変異している 50 個の遺伝子を見いだした。これらの候補遺伝子産物の機能解析を通して ATLL におけるドライバー変異の同定を行うことが、ATLL の発症機序解明と新規治療法開発につながると考えられる。さらに、これまでの解析によって、変異遺伝子産物が様々な細胞内情報伝達機構に参与していることが明らかとなっている。とりわけ、変異遺伝子の約半数が Tax 経路に関与していることの発見は、ATLL 研究者にとって長年の疑問であった「ATLL 細胞における Tax 発現低下の意義」について、1. Tax の発現抑制による宿主免疫よ

りの回避、2. 関連した遺伝子の変異に伴う Tax 経路の活性化による増殖優位性と腫瘍原性の保持、という新たな仮説を提唱することにつながり意義深いと考えられる。

3. ATLL のクローン進展の解析

これまでに様々な悪性腫瘍について疾患の進行や、治療の過程における“クローン進展：Clonal Evolution”が研究されている。悪性腫瘍のゲノムは化学療法に使用された薬剤(抗がん剤)によって著しい修飾を受け変化すると考えられており、これが治療耐性クローンの出現メカニズムの一つとみなされている。ATLL においてクローン進展の様式を解明することは、治療耐性メカニズムの一端を明らかとするのみならず、疾患の経過によって治療の標的とする分子を変更または拡張することにつながり、ATLL に対する新規治療戦略の策定において、その一助になると期待される。

E. 結論

1. ATLL 症例における臨床情報と遺伝子変異情報の統合

研究参加施設における ATLL 症例の全例登録と遺伝子解析が可能となるシステムを構築した。ATLL 39 例に対して全エクソーム解析を実施し、今後、多数の症例を効率的に解析可能な標的シーケンスを実施するための基盤となる網羅的遺伝子変異情報を得た。

染色体異常と同種造血幹細胞移植後の予後との関連性を明らかとするためにはさらに多数例の解析が必要である。

2. ATLL のドライバー遺伝子変異の同定

ATLL を対象として、網羅的遺伝子解析を実施した。ATLL 細胞において 50 個の遺伝子が有意に変異していることを明らかとし、ドライバー遺伝子を同定するための基盤となるカタログ作成を行った。

3. ATLL のクローン進展の解析

ATLL を対象として、クローン進展のメカニズム解明を目的とした検体集積、遺伝子解析体制を構築し、検体収集と解析を開始した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Nakahata S, Ichikawa T, Maneesaay P, Saito Y, Nagai K, Tamura T, Manachai N, Yamakawa N, Hamasaki M, Kitabayashi I, Arai Y, Kanai Y, Taki T, Abe T, Kiyonari H, Shimoda K, Ohshima K, Horii A, Shima H, Taniwaki M, Yamaguchi R, Morishita K: Loss of NDRG2 expression

activates PI3K-AKT signalling via PTEN phosphorylation in ATLL and other cancers. *Nat Commun.* 5:3393, 2014

2) Maekawa K, Moriguchi-Goto S, Kamiunten A, Kubuki Y, Shimoda K, Takeshima H, Asada Y, Marutsuka K: Primary Central Nervous System Lymphoma in Miyazaki, Southwestern Japan, a Human T-Lymphotropic Virus Type-1 (HTLV-1)-Endemic Area: Clinicopathological Review of 31 Cases. *J Clin Exp Hematop.* 54:179-185, 2014

3) Fukushima T, Nomura S, Shimoyama M, Shibata T, Imaizumi Y, Moriuchi Y, Tomoyose T, Uozumi K, Kobayashi Y, Fukushima N, Utsunomiya A, Tara M, Nosaka K, Hidaka M, Uike N, Yoshida S, Tamura K, Ishitsuka K, Kurosawa M, Nakata M, Fukuda H, Hotta T, Tobinai K, Tsukasaki K: Japan Clinical Oncology Group (JCOG) prognostic index and characterization of long-term survivors of aggressive adult T-cell leukaemia-lymphoma (JCOG0902A). *Br J Haematol.* 166:739-748, 2014

4) Xia H, Yamada S, Aoyama M, Sato F, Masaki A, Ge Y, Ri M, Ishida T, Ueda R, Utsunomiya A, Asai K, Inagaki H: Prognostic impact of microRNA-145 down-regulation in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Hum Pathol.* 45:1192-1198, 2014

5) Chiba K, Shiraishi Y, Nagata Y, Yoshida K, Imoto S, Ogawa S, Miyano S: Genomon ITDetector: a tool for somatic internal tandem duplication detection from cancer genome sequencing data. *Bioinformatics.* 31:116-118, 2014

6) Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Yoshida K, Shiraishi Y, Ishii R, Miyake Y, Muto H, Tsuyama N, Sato-Otsubo A, Okuno Y, Sakata S, Kamada Y, Nakamoto-Matsubara R, Tran NB, Izutsu K, Sato Y, Ohta Y, Furuta J, Shimizu S, Komeno T, Sato Y, Ito T, Noguchi M,

Noguchi E, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Suzukawa K, Nanmoku T, Hasegawa Y, Nureki O, Miyano S, Nakamura N, Takeuchi K, Ogawa S, Chiba S: Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat Genet.* 46:171-175, 2014

7) Nakamoto-Matsubara R, Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Yoshida K, Yanagimoto S, Shiozawa Y, Nanmoku T, Satomi K, Muto H, Obara N, Kato T, Kurita N, Yokoyama Y, Izutsu K, Ota Y, Sanada M, Shimizu S, Komeno T, Sato Y, Ito T, Kitabayashi I, Takeuchi K, Nakamura N, Ogawa S, Chiba S: Detection of the G17V RHOA mutation in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and related lymphomas using quantitative allele-specific PCR. *PLoS One.* 9:e109714, 2014

8) Totoki Y, Yoshida A, Hosoda F, Nakamura H, Hama N, Ogura K, Yoshida A, Fujiwara T, Arai Y, Toguchida J, Tsuda H, Miyano S, Kawai A, Shibata T: Unique mutation portraits and frequent COL2A1 gene alteration in chondrosarcoma. *Genome Res.* 24:1411-1420, 2014

2. 学会発表

1) 上運天綾子、北中明、山下清、外山孝典、前田宏一、松岡均、河野浩、佐藤誠一、石崎淳三、下田和哉: ATLの予後因子: 患者側、腫瘍細胞側因子と dose intensity. 第111回日本内科学会講演会 京都 2014.04.11-13

2) Kataoka K, Nagata Y, Kitanaka A, Sato-Otsubo A, Totoki Y, Yasunaga J, Aburatani H, Miyano S, Watanabe T, Matsuoka M, Shibata T, Shimoda K, Ogawa S: Comprehensive genomic characterization of adult T-cell leukemia/lymphoma. 第73回日本癌学会学術総会 横浜 2014.09.25-27

3) Nagata Y, Enami T, Sakata-Yanagimoto M, Kataoka K, Kitanaka A, Sato A, Shiraishi Y,

Sanada M, Miyano S, Shimoda K, Watanabe T, Chiba S, Ogawa S: Novel distributions and biological effects of RHOA mutations in Adult T-cell Leukemia/Lymphoma and other PTCLs. 第 73 回日本癌学会学術総会 横浜 2014.09.25-27

4) Kataoka K, Nagata Y, Kitanaka A, Sato-Otsubo A, Totoki Y, Yasunaga J, Sanada M, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Yoshizato T, Kon A, Shiozawa Y, Yoshida K, Munakata W, Nakamura H, Hama N, Shide K, Kubuki Y, Hidaka T, Kameda T, Ishiyama K, Miyawaki S, Ishii R, Nureki O, Nagae G, Aburatani H, Miyano S, Watanabe T, Matsuoka M, Shibata T, Shimoda K, Ogawa S: Landscape of genetic alterations in adult T-cell leukemia/lymphoma. 第 76 回日本血液学会学術集会 大阪 2014.10.31-11.02

5) Kataoka K, Nagata Y, Kitanaka A, Totoki Y, Yasunaga J, Kotani S, Sato-Otsubo A, Sanada M, Shiraishi Y, Shimomura T, Chiba K, Tanaka H, Suzuki H, Sato Y, Shiozawa Y, Yoshizato T, Kon A, Yoshida K, Hishizawa M, Munakata W, Nakamura H, Hama N, Shide K, Kubuki Y, Hidaka T, Kameda T, Ishiyama K, Miyawaki S, Ishii R, Nureki O, Nagae G, Aburatani H, Miyano S, Takaori-Kondo A, Watanabe T, Matsuoka M, Shibata T, Shimoda K, Ogawa S: Landscape of genetic alterations in adult T-cell leukemia/lymphoma. 56th American Society of Hematology Annual Meeting, San Francisco, 2014.12.06-09

6) Nagata Y, Enami T, Kontani K, Kataoka K, Sakata-Yanagimoto M, Kitanaka A, Sato A, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Shiozawa Y, Kon A, Yoshida K, Sanada M, Ishiyama K, Miyawaki S, Ishii R, Nureki O, Miyano S, Shimoda K, Watanabe T, Katada T, Chiba S, Ogawa S: Novel biological effects and distinct patterns of RhoA mutations in adult T-cell leukemia/lymphoma and angioimmunoblastic

T cell lymphoma. 56th American Society of Hematology Annual Meeting, San Francisco, 2014.12.06-09

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

申請状況	特許庁出願済み
出願番号	特願2014-191287
出願日	平成26年9月19日
発明の名称	T細胞リンパ腫の検査方法
出願人	京都大学、宮崎大学
発明者	小川誠司、永田安伸、片岡圭亮、 下田和哉、北中 明

2. 実用新案登録

該当事項なし

3. その他

該当事項なし