

ATLL 症例における臨床情報と遺伝子変異情報の統合

担当責任者 下田和哉 宮崎大学医学部 内科学講座消化器血液学分野 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

研究要旨

ATLL に対する化学療法の効果は不良であり、造血幹細胞移植は一定の割合で治癒を期待できる治療法である。移植の時期および非血縁骨髄、臍帯血等のドナー細胞の適切な選択と、少数存在する予後良好例に対する過剰な治療の回避のためには、個々の患者の予後を正確に予測することが必要である。これまで ATLL に有用な予後予測モデルは存在しなかったが、最近になって ATLL に特化した予後予測モデルである ATL-PI と JCOG-PI が相次いで報告された。両モデルは共に一定の精度で予後を予測することが可能であるが、前述の臨床決断に必要な十分な層別化を行うことは困難である。本研究では、より精度の高い ATLL 予後予測モデルの作成を目的として、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な症例登録を行い、臨床情報と包括的な遺伝子変異情報の集積、解析を実施している。未だ症例数は十分ではないが、これまでの解析によって遺伝子変異の数、特定の遺伝子変異の有無が予後と相関する可能性が見いだされている。

A. 研究目的

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 に対して治癒の期待でき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く、非血縁者間造血幹細胞移植が行われる症例が増加している。その場合、移植実施までに一定の期間を有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ると考えられ、両者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、移植実施の決定そのものに苦慮することも多い。現在日常診療で利用可能な治療手法を用いて ATLL 全体の治療成績向上を達成するためには、短期間に予後不良となる症例には臍帯血移植を、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予後による層別化に基づいた治療戦略の確立が必要である。

最近になって、我が国から ATLL に特化した予後予測モデルである ATL-PI (Katsuya et al. J Clin Oncol. 2012)、JCOG-PI (Fukushima et al. Br J Haematol. 2014) が相次いで報告され、治療前に一定の精度で患者予後を予測することが可能となった。宮崎県内で 2010 年～2012 年に発症した aggressive ATLL 患者コホートをを用いた検討によっても 2 つの予後予測モデルは、ATLL 患者に対する層別化が可能であったが、化学療法後の長期生存例を有効に抽出するほどに予後を分離することは困難であった(図 1)。また、臨床情報のみから得られた予後予測モデルで予後不良と判定される例には全身状態が不良な症例がより多く含まれており、それらの症例が本当に移植療法の良い対象となり得るかにも疑問が残る。そのため、腫瘍細胞の悪性をより強く反映すると考えられる遺伝子情報による症例の層別化が重要である。

われわれは、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して、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開始し、臨床情報と包括的な遺伝子変異情報の集積を行った。

B. 研究方法

ATLL の全例登録システム構築： 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を登録し、患者検体収集を実施する枠組みを作成した。各医療機関は研究参加の同意が得られた ATLL (疑い) の症例について、確定診断目的の HTLV-1 クロナリティ検査 (サザンブロット) 実施時に症例を登録し、研究用検体の採取を行う。全エクソーム解析の対象となる症例については、腫瘍細胞の採取と同時に正常コントロールとして口腔内粘膜細胞からの DNA 採取を行う。

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。

(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

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、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。全エクソーム解析の結果から ATLL では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。それに対し、慢性型 ATLL とくすぶり型 ATLL では、全体の変異数は中央値 70.3 個、25.5 個、ATLL に有意な遺伝子変異の中央値は、2.3 個、2 個であった (図 2)。遺伝子解析を完了した 39 例全体の予後は、50% 生存期間 14.7 ヶ月、1 年生存率 56.0%、2 年生存率 33.6% であった。そのうち、急性型

ATLL+リンパ腫型 ATLL では 50% 生存期間 11.5 ヶ月、1 年生存率 43.2%、2 年生存率 16.5%、慢性型 ATLL+くすぶり型 ATLL では 1 年生存率 77.4%、2 年生存率 60.9% 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 (図 3)。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見いだされた (図 4)。

D. 考察

治療開始以前に患者予後の正確な予測が可能となることは、その後の治療方針決定に極めて有用であり、様々な造血器悪性腫瘍に対して予後予測モデルが作成されている。悪性リンパ腫に対しても病型毎に予後予測モデルが作成され広く臨床に応用されているが、2012 年の ATL-PI 発表まで ATLL に特化した予後予測モデルは存在しなかった。その後、JCOG-PI が発表され、現在それぞれのモデルに対して日常診療における有用性の評価が行われている。これら 2 つのモデルは、他の造血器悪性腫瘍の予後予測モデルと同様に、年齢、PS 等による宿主要因の評価と、病期分類、検査データ等に反映される腫瘍要因 (腫瘍量や疾患活動性) の評価によって成立している。これらのパラメータは日常診療のなかで特別な努力をすること無く得られるものであり、前述した 2 つの予後予測モデルは実臨床の場において簡便に使用可能である。その反面、容易に得られる臨床データのみから症例毎の分子生物学的特性を十分反映した予後情報を得ることは困難である。

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。その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ズ技術の進歩によって年々容易となりつつあり、一部の遺伝子解析は既に商業展開され臨床の場で活用されている。これまで研究ベースでのみ実施可能であった次世代シーケンサーを用いた解析も日常診療への応用まであと一歩である。これら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為の標的遺伝子決定の基盤となる ATLL にみられる網羅的遺伝子変異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、当該遺伝子変異の情報を用いた予後予測モデルの作成が可能になると考えられる。

E. 結論

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。ATLL39 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とするための基盤となる網羅的遺伝子変異情報を得た。

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

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-Otubo 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

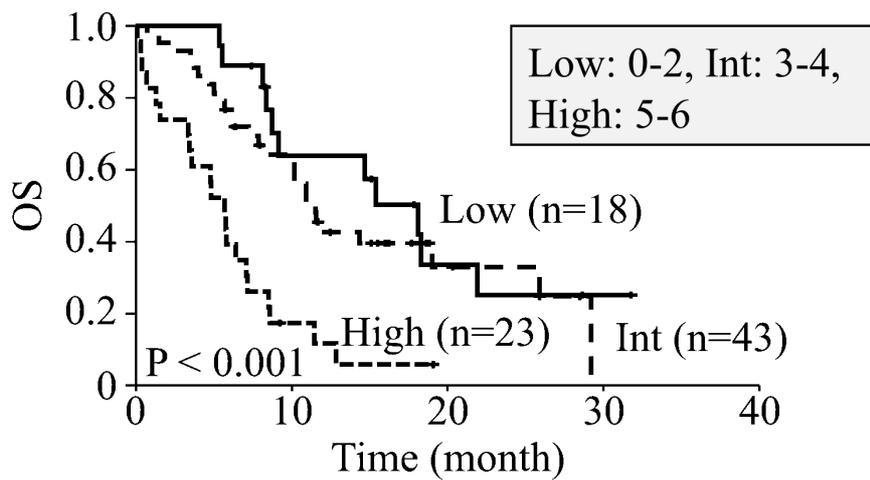
2. 実用新案登録

該当事項なし

3. その他

該当事項なし

ATL-PI Age ≥ 60 (1)、Stage \geq III (1)、PS ≥ 2 (1)、
 節外病変 ≥ 2 (1)、LDH $>$ 上限値 (1)



JCOG-PI Corrected Ca ≥ 11 mg/dl (1), PS ≥ 2 (1)

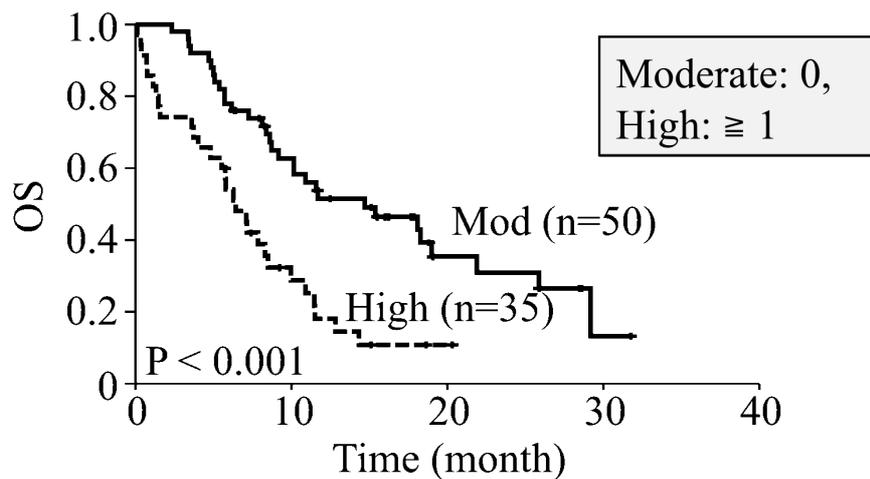
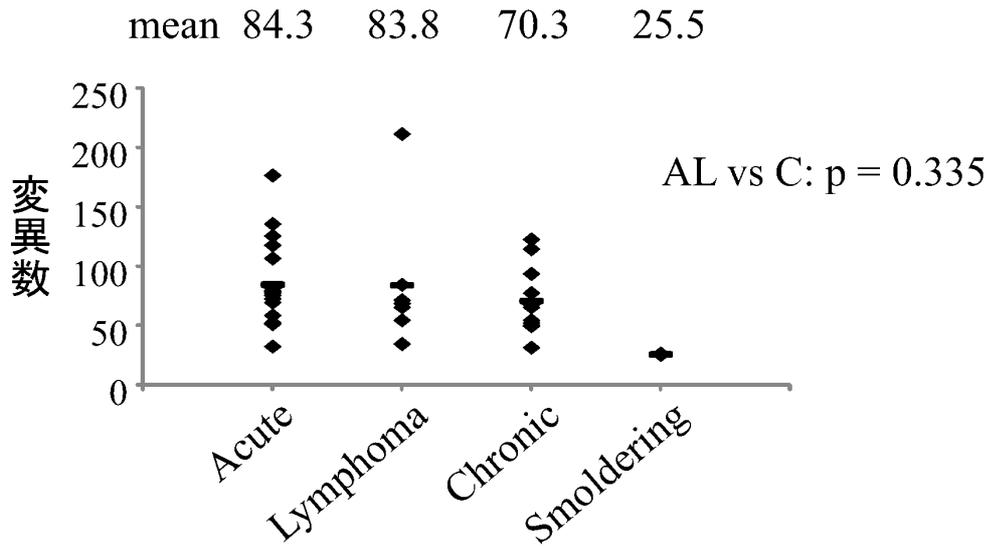


図1 ATLLL 予後予測モデル有用性の検討(2010～2012発症例)

ATLLにおける変異遺伝子数



ATLLで有意に変異が生じている遺伝子数

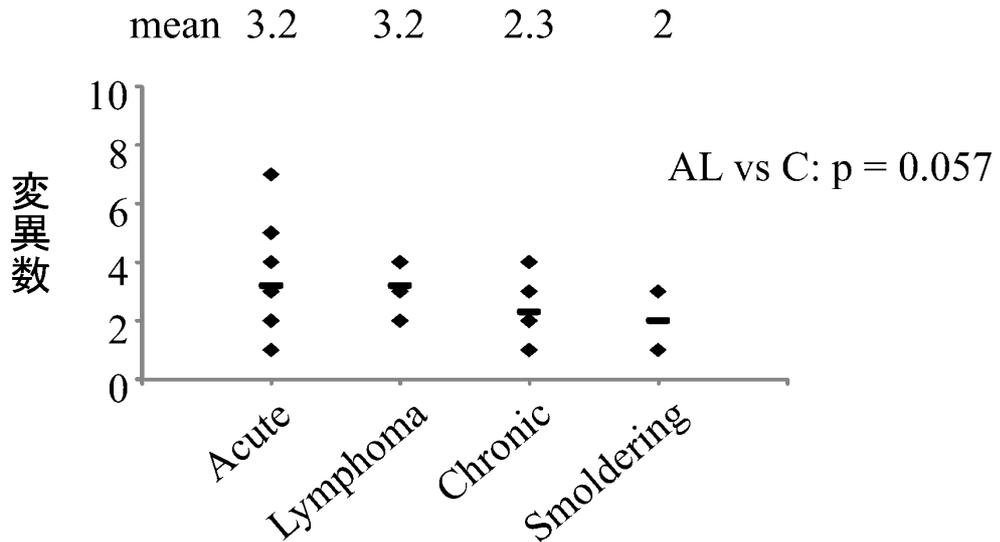
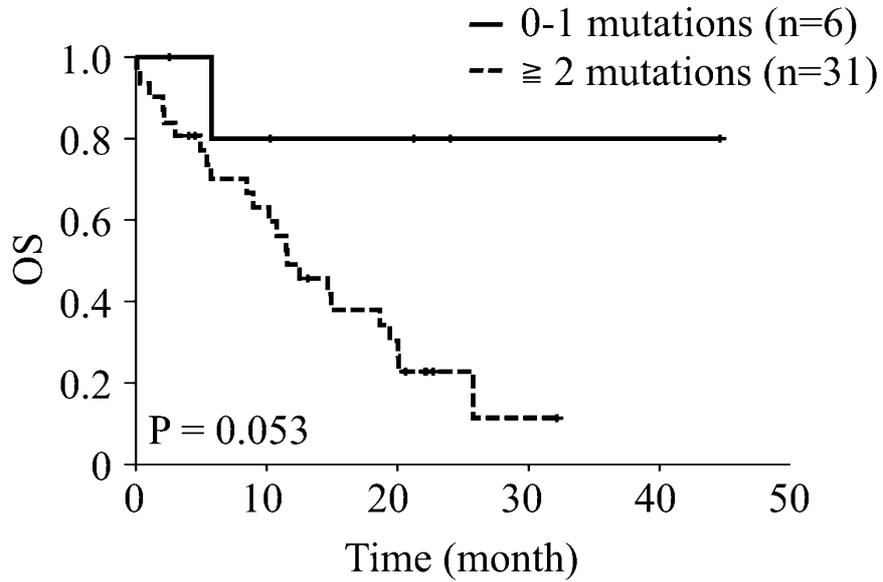


図2 ATLLの変異遺伝子数(全エクソーム解析)

ATLL(n=37)
(acute, lymphoma, chronic type)



	MST	1y OS	2y OS
0-1	—	80.0%	80.0%
≥2	11.5	49.1%	22.8%

図3 遺伝子変異数と予後

ATLL(n=37)
(acute, lymphoma, chronic type)

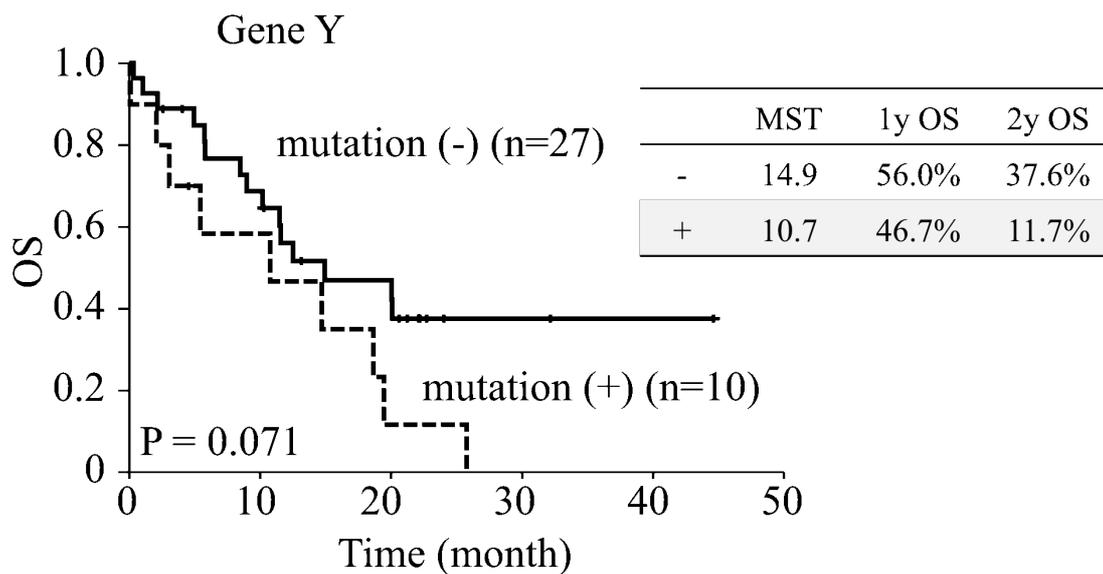
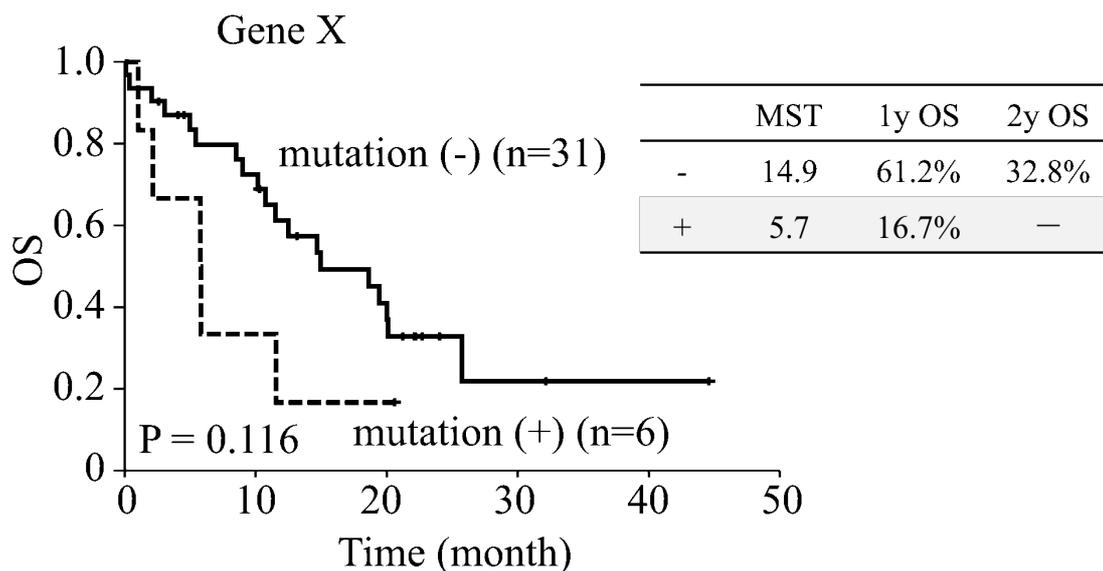


図4 特定の遺伝子変異の有無と予後

ATLL症例における臨床情報と遺伝子変異情報の統合

副題名 染色体異常がATLに対する同種造血幹細胞移植に及ぼす影響

担当責任者 宇都宮 與 今村病院分院 院長

研究要旨：同種造血幹細胞移植を受けたATL患者の染色体異常が移植後の生存に及ぼす影響について検討した。対象は当科で同種造血幹細胞移植を行った症例の中でATL細胞の染色体異常がみられた26名（男性13名、女性13名、年齢中央値54歳）である。染色体数の異常は、性染色体の欠失（-X 5例、-Y 1例）、-14番 5例、-10番 3例で、構造異常は、14q 10例、7q 7例、4q、6q、9qがそれぞれ6例に認められた。14番の欠失は、移植後の全生存期間が短くなる傾向がみられ、1q21、5q、13p、15pなどの構造異常は、全生存期間を短縮する傾向が認められた。今回の検討では、同種造血幹細胞移植非施行例で認められた染色体異常と予後の関連性が移植施行例ではみられなかったが、多くのATL症例の解析で今後明らかにする必要がある。

A. 研究目的

成人T細胞白血病/リンパ腫(ATL)は、強力な化学療法を施行しても予後不良な疾患である。最近、同種造血幹細胞移植によってATL患者の予後の改善が得られつつある。

ATL細胞の染色体異常と患者の予後が関連するという報告がみられる。しかしながら同種造血幹細胞移植を施行したATL患者の予後と染色体異常との関連性を解析した報告はみられない。

今回、ATL細胞の染色体異常が、同種造血幹細胞移植を受けた患者の生存に影響を及ぼすかどうかについて後方視的に解析した。

B. 研究方法

2006年6月から2014年3月までに当科で同種造血幹細胞移植を行ったATL患者72名のうち染色体検査を施行した46名の中で染色体異常を認めた26名について検討した。染色体検査を行った検体は、末梢血11名、骨髄8名、

リンパ節6名、胸水1名であった。

染色体検査は、Gバンド染色を行い、染色体数の異常と構造異常について解析を行った。また、染色体異常と移植後の生存に及ぼす影響について検討した。

統計解析は、EZR (Kanda Y. Bone Marrow Transplantation 2013)を用いた。

（倫理面への配慮）

ATL患者の予後は不良であり、常に患者は不安を抱えており、同種移植の実施についても常に患者心理に配慮し慎重に同意と説明を得た。

C. 研究結果

患者背景は、男性13名、女性13名、年齢中央値は54歳（34-65歳に分布）、急性型25名、リンパ腫型1名、移植細胞源は、骨髄21名、末梢血2名、臍帯血3名であった。前処置方法は、骨髄破壊的前処置18名、骨髄非破壊的前処置8名で、移植時の寛解状態は完全寛解6名、非完全寛解20名であった。

26名の生存期間中央値は、173日（12-2895日に分布）で、3年生存率は40.1%であった。

染色体数の異常は、性染色体の欠失（-X 5例、-Y 1例）、-14番 5例、-10番 3例であった。14番の欠失は、移植後の全生存期間が短くなる傾向がみられた（ $P=0.064$ ）。染色体の構造異常は、14q 10例、7q 7例、4q、6q、9qがそれぞれ6例に認められた。染色体の構造異常の数の中央値は4個であった。ATL患者の移植後の全生存期間に有意な影響を及ぼす染色体の構造異常はみられなかったが、1q21（ $P=0.068$ ）、5q（ $P=0.051$ ）、13p（ $P=0.051$ ）、15p（ $P=0.060$ ）などの構造異常は、全生存期間を短縮する傾向が認められた。

D. 考察

染色体異常が同種造血幹細胞移植を施行したATL患者の生存に及ぼす影響について解析を行った。ATL患者の移植後の全生存期間に影響を及ぼす共通した染色体の数的異常や構造異常は認められなかったが、14番の欠失や1q21、5q、13p、15pなどの構造異常は予後不良と関連する傾向が認められた。同種造血幹細胞移植を施行していないATL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少なかったが、その理由として同種造血幹細胞移植療法がある程度ATL患者の予後不良を克服している可能性が考えられる。

いずれにしてもさらに多くのATL症例での解析によって、ATL患者の染色体異常と移植後の患者の予後との関連性を明らかにする必要がある。

E. 結論

今回の解析では、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示すことはできなかったが、多くのATL症例の解析にて明らかにする必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

英文雑誌

1. Tokunaga M, Uto H, Oda K, Tokunaga M, Mawatari S, Kumagai K, Haraguchi K, Oketani M, Ido A, Ohnou N, Utsunomiya A, Tsubouchi H. Influence of human T-lymphotropic virus type 1 coinfection on the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol*, 2014, 49(12):1567-77.
2. 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*, 2014, 45(6):1192-8.
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 prognostic index and characterization of long-term survivors of aggressive adult T-cell leukaemia-lymphoma (JCOG0902A). *Br J Haematol*, 2014, 166(5):739-48.
4. Araya N, Sato T, Ando H, Tomaru U, Yoshida M, Coler-Reilly A, Yagishita N, Yamauchi J, Hasegawa A, Kannagi M, Hasegawa Y, Takahashi T, Kunitomo Y, Tanaka Y, Nakajima T, Nishioka K, Utsunomiya A, Jacobson S, Yamano Y. HTLV-1 induces a Th1-like state in CD4+CCR4+ T cells. *J Clin Invest*, 2014, 124(8):3431-42.
 5. Takahashi R, Yamagishi M, Nakano K, Yamochi T, Yamochi T, Fujikawa D, Nakashima M, Tanaka Y, Uchimarum K, Utsunomiya A, Watanabe T. Epigenetic deregulation of EVC confers robust Hedgehog signaling in adult T-cell leukemia. *Cancer Sci*, 2014, 105(9):1160-9.
 6. Kato K, Choi I, Wake A, Uike N, Taniguchi S, Moriuchi Y, Miyazaki Y, Nakamae H, Oku E, Murata M, Eto T, Akashi K, Sakamaki H, Kato K, Suzuki R, Yamanaka T, Utsunomiya A. Treatment of adult T-cell leukemia/lymphoma with cord blood transplantation: a Japanese nationwide retrospective survey. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2014, 20(12):1968-74.
 7. Nakano N, Kubota A, Tokunaga M, Tokunaga M, Itoyama T, Makino T, Takeuchi S, Takatsuka Y, Utsunomiya A. High incidence of CMV infection in adult T-cell leukemia/lymphoma patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 2014, 49(12):1548-9.
 8. Yoshida N, Karube K, Utsunomiya A, Tsukasaki K, Imaizumi Y, Taira N, Uike N, Umino A, Arita K, Suguro M, Tsuzuki S, Kinoshita T, Ohshima K, Seto M. Molecular characterization of chronic-type adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer Res*, 2014, 74(21):6129-38.
 9. Takekiyo T, Dozono K, Mitsuishi T, Murayama Y, Maeda A, Nakano N, Kubota A, Tokunaga M, Takeuchi S, Takatsuka Y, Utsunomiya A. Effect of exercise therapy on muscle mass and physical functioning in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Support Care Cancer*, 2014 [Epub ahead of print]
 10. Yamauchi J, Coler-Reilly A, Sato T, Araya N, Yagishita N, Ando H, Kunitomo Y, Takahashi K, Tanaka Y, Shibagaki Y, Nishioka K, Nakajima T, Hasegawa Y, Utsunomiya A, Mogamulizumab, an anti-CCR4 antibody, targets human T-lymphotropic virus type 1-infected CD8+ and CD4+ T cells to treat associated myelopathy. *J Infect Dis*, 2015, 211(2):238-48.
 11. Kinpara S, Ito S, Takahata T,

- Saitoh Y, Hasegawa A, Kijiyama M, Utsunomiya A, Masuda M, Miyazaki Y, Matsuoka M, Nakamura M, Yamaoka S, Masuda T, Kannagi M. Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase and anti-sense viral RNA in the constitutive NFκB activation in adult T-cell leukemia/lymphoma cells. *Leukemia*, 2015 [Epub ahead of print]
12. Utsunomiya A, Choi I, Chihara D, Seto M. Recent advances in treatment of adult T-cell leukemia- lymphoma. *Cancer Sci*, 2015 [Epub ahead of print]
13. Suehiro Y, Hasegawa A, Iino T, Sasada A, Watanabe N, Matsuoka M, Takamori A, Tanosaki R, Utsunomiya A, Choi I, Fukuda T, Miura O, Takaishi S, Teshima T, Akashi K, Kannagi M, Uike N, Okamura J. Clinical outcomes of a novel therapeutic vaccine with Tax peptide-pulsed dendritic cells for adult T cell leukaemia/lymphoma in a pilot study. *Br J Haematol*, 2015 [Epub ahead of print]

和文雑誌

1. 宇都宮與、崔日承、鵜池直邦:ATL に対する同種造血幹細胞移植と細胞療法に関する研究の現状. *血液内科*, 2014, 68(1):51-7.
2. 宇都宮與:オンコロジーエマーゼンシーとしての代謝異常—特に,高カルシウム血症と低ナトリウム血症について—. *癌の臨床*, 2014, 60(1):1-8.

和文書籍

1. 宇都宮與:成人 T 細胞白血病・リンパ腫(ATL). 白血病と言われたら - 発症間もない患者さんご家族のために - 疾患・治療編. p131-139, 特定非営利法人全国骨髄バンク推進連絡協議会(東京), 2014.
2. 宇都宮與:[. リンパ系腫瘍 F. 成人 T 細胞白血病/ リンパ腫(ATL)] ATL の治療方針 . EBM 血液疾患の治療 2015-2016 (金倉譲・木崎昌弘・鈴木律朗・神田善伸編集) , pp 309 -313, (株)中外医学社 (東京), 2014.

2. 学会発表

1. Tokunaga M, Nakano N, Kubota A, Tokunaga M, Itoyama T, Makino T, Takeuchi S, Takatsuka Y, Utsunomiya A: Prognostic significance of EBMT score and serum soluble IL-2R level on outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T-cell leukemia/lymphoma. 40th Annual Meeting of the European Society for Blood and Marrow Transplantation, Milan, Italy, 30 March - 2 April, 2014. (Poster)
2. Takeuchi S, Nakano N, Kubota A, Tokunaga M, Takatsuka Y, Utsunomiya A: EBMT score only predicts day 100 overall survival and overall survival after allogeneic stem cell transplantation in adult T-cell leukemia/lymphoma patients. 40th Annual Meeting of the European Society for Blood and Marrow Transplantation, Milan, Italy, 30 March - 2 April, 2014. (Poster)

3. Nakano N, Kubota, Tokunaga M, Takeuchi S, Takatsuka Y, Utsunomiya A: Efficacy and feasibility of umbilical cord blood transplantation with myeloablative non-TBI conditioning regimen using Flu180/ivBU12.8/Mel80 for adult patients with advanced hematological diseases. 40th Annual Meeting of the European Society for Blood and Marrow Transplantation, Milan, Italy, 30 March - 2 April, 2014. (Poster)
4. 佐藤妃映、岡剛史、神農陽子、鷺尾佳奈、村上一郎、大内田守、宇都宮與、高橋聖之、吉野正：成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (ATL) 細胞株における特異的 DNA メチル化の解析，第 103 回日本病理学会，広島，2014 年 4 月 24 日～26 日。(ポスター)
5. Choi I, Eto T, Tanosaki R, Shimokawa M, Takatsuka Y, Utsunomiya A, Takemoto S, Taguchi J, Fukushima T, Kato K, Teshima T, Nakamae H, Suehiro Y, Yamanaka T, Okamura J, Uike N: Unrelated bone marrow transplantation with reduced intensity conditioning regimen for elderly patients with adult T-cell leukemia/lymphoma, feasibility study with twoyear follow up data. 19th Congress of the European Hematology Association, Milan, Italy, 12-15 June, 2014.(Poster)
6. 正木彩子、石田高司、前田康博、稲垣淳、鈴木進、伊藤旭、成田朋子、榊原健夫、滝野寿、李政樹、楠本茂、小松弘和、上田龍三、稲垣宏、宇都宮與、飯田真介：成人 T 細胞性白血病 / リンパ腫における indoleamine 2, 3-dioxygenase の臨床的意義。第 54 回リンパ網内系学会総会，山形，2014 年 6 月 19 日～21 日。(口演)
7. 佐藤妃映、岡剛史、神農陽子、鷺尾佳奈、村上一郎、大内田守、宇都宮與、高橋聖之、吉野正：成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (ATL) 関連細胞株における特異的 DNA メチル化の解析。第 54 回リンパ網内系学会総会，2014 年 6 月 19 日～21 日。(ポスター)
8. Utsunomiya A : Possible proposal of an extranodal primary gastric variant of lymphoma type ATL / リンパ腫型 ATL における節外性胃原発亜型の提案。第 12 回日本臨床腫瘍学会学術集会(ワークショップ Progress in basic research and treatment for ATL / ATL 基礎と治療の進歩)，福岡，2014 年 7 月 17 日～19 日。(口演)
9. 米倉健太郎、川上延代、神崎保、徳永雅仁、高塚祥芝、宇都宮與：モガムリズムマブによる治療後に TEN を発症した急性型 ATL の 1 例。第 12 回日本臨床腫瘍学会学術集会，福岡，2014 年 7 月 17 日～19 日。(ポスター)
10. 勝屋弘雄、石塚賢治、天野正宏、河井一浩、日野亮介、宇都宮與、花田修一、山中竹春、鈴宮淳司、田村和夫：本邦における慢性・くすぶり型 ATL の後方視的解析。第 12 回日本臨床腫瘍学会学術集会，福岡，2014 年 7 月 17 日～19 日。(口演)
11. Yoshida N, Karube K, Utsunomiya A, Tsukasaki K,

- Imaizumi Y, Taira N, Uike N, Umino A, Arita K, Suguro M, Tsuzuki S, Kinoshita T, Nakamura S, Ohshima K, Seto M: Molecular characterization of chronic-type adult T-cell leukemia/lymphoma: discovery of molecular biomarkers for acute transformation 2014. American society of Hematology Meeting on Lymphoma Biology, Colorado Springs, CO, USA, 10-13 August, 2014. (Poster)
12. 中野伸亮、糸山貴浩、窪田歩、徳永雅仁、徳永真弓、牧野虎彦、竹内昇吾、高塚祥芝、宇都宮與：染色体異常が成人 T 細胞白血病/リンパ腫に対する同種移植の成績に及ぼす影響。第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会，東京，2014 年 8 月 22 日～24 日。(口演)
 13. 徳永雅仁、吉田稚明、中野伸亮、窪田歩、徳永真弓、糸山貴浩、牧野虎彦、竹内昇吾、高塚祥芝、瀬戸加大、宇都宮與：ALK 陰性未分化大細胞リンパ腫 (ALCL) の治療後に慢性型成人 T 細胞性白血病 (ATL) を発症した症例。第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会，東京，2014 年 8 月 22 日～24 日。(ポスター)
 14. 米倉健太郎、徳永雅仁、川上延代、武田浩一郎、神崎保、高塚祥芝、中野伸亮、窪田歩、竹内昇吾、宇都宮與：ATL 患者に対するモガムリズマブ投与後の皮膚障害の検討。第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会，東京，2014 年 8 月 22 日～24 日。(口演)
 15. 吉森みゆき、西垂水和隆、登美奈子、室屋朗子、高塚祥芝、宇都宮與：当院における HTLV-1 感染者の針刺し皮膚粘膜曝露後のフォローアップ。第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会，東京，2014 年 8 月 22 日～24 日。(ポスター)
 16. 新谷奈津美、佐藤知雄、安藤仁、外丸詩野、Ariella Coler-Reilly、八木下尚子、山内淳司、長谷川温彦、神奈木真理、田中勇悦、宇都宮與、山野嘉久：HTLV-1 による Th-like CD4⁺CCR4⁺T 細胞の発生機構の解析。第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会，東京，2014 年 8 月 22 日～24 日。(口演)
 17. 中武彩子、小林行治、中畑新吾、西片一朗、岩永正子、相良康子、北中明、天野正宏、前田宏一、末岡榮三朗、瀬戸山充、岡山昭彦、宇都宮與、下田和哉、渡邊俊樹、森下和広：血中可溶性 CADM1/TSLC1 測定による ATL 診断法の開発。第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会，東京，2014 年 8 月 22 日～24 日。(口演)
 18. 金原秀一、斉藤愛記、長谷川温彦、宇都宮與、増田昌人、宮崎泰司、松岡雅雄、中村正孝、山岡昇司、増田貴夫、神奈木真理：ATL 細胞内 NF- κ B 経路活性化に対する PKR 分子と HTLV-1 LTR 領域由来転写産物の寄与。第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会，東京，2014 年 8 月 22 日～24 日。(口演)
 19. 山内淳司、新谷奈津美、安藤仁、國友康夫、高橋克典、Ariella Coler-Reilly、八木下尚子、佐藤知雄、宇都宮與、山野嘉久：HAM における抗 CCR4 抗体療法の有用性および CCR4⁺CD8⁺T 細胞の異常に関する検討。第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会，東京，2014 年 8 月 22 日～24 日。(口演)
 20. 石原誠人、新谷奈津美、佐藤知雄、

- 藤井理沙、最知直美、宇都宮與、山野嘉久、菅野純夫、植田幸嗣：CD4陽性 T 細胞を用いた膜プロテオーム解析による HTLV-1 関連脊髄症に対する新規治療標的分子の探索。第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会，東京，2014 年 8 月 22 日～24 日。(口演)
21. 石垣知寛、小林誠一郎、大野伸広、中野伸亮、宇都宮與、山崎聡、渡辺信和、東條有伸、中内啓光、内丸薫：急性型 ATL における細胞表面抗原のクラスタリング解析と ATL 幹細胞マーカーの探索。第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会，東京，2014 年 8 月 22 日～24 日。(口演)
22. 佐藤妃映、岡剛史、神農陽子、鷺尾佳奈、村上一郎、大内田守、宇都宮與、高橋聖之、吉野正：成人 T 細胞白血病/リンパ腫(ATL)関連細胞株における DNA 異常メチル化の解析。第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会，東京，2014 年 8 月 22 日～24 日。(ポスター)
23. 岡剛史、阪田真澄、水野初、宇都宮與、藤田洋史、升島努、吉野正：成人 T 細胞白血病・リンパ腫(ATL)発症・進展に於ける代謝異常に関するメタボローム解析。第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会，東京，2014 年 8 月 22 日～24 日。(ポスター)
24. Kinpara S, Saitoh Y, Hasegawa A, Utsunomiya A, Masuda M, Miyazaki Y, Matsuoka M, Nakamura M, Yamaoka S, Masuda T, Kannagi M: Involvement of PKR and anti-sense HTLV-1 transcripts in the constitutive NF-kB activation in ATL cells. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 25-27 September, 2014.(Oral)
25. Yamochi T, Morita Y, Yamochi T, Firouzi S, Sasaki Y, Watanabe N, Uchimaru K, Utsunomiya A, Watanabe T: Characterization of putative ATL tumor initiating cells. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 25-27 September, 2014.(Poster)
26. Ishigaki T, Kobayashi S, Nakano N, Utsunomiya A, Uchimaru K, Tojo A: Comprehensive analysis of surface antigens on acute-type ATL cells and search for ATL-initiating cell markers. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 25-27 September, 2014.(Poster)
27. Ishihara M, Araya N, Sato T, Utsunomiya A, Yamano Y, Sugano S, Ueda K: Comprehensive membrane-proteome analysis for discovery of novel therapeutic targets against adult T-cell leukemia. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 25-27 September, 2014.(Oral)
28. Ito S, Okano Y, Izumida W, Shimoyama T, Sugawara T, Takatsuka Y, Takeuchi S, Fujisawa Y, Tsukushi Y, Shimosegawa K, Ikuta K, Oyake T, Murai K, Kakinoki Y, Utsunomiya A, Ishida Y: Phase 2 study of dose-adjustment of lenalidomide and dexamethasone in unfit myeloma patients. 第 76 回日本血液学会学術集会，大阪，平

- 成 26 年 10 月 31 日 ~ 11 月 2 日。(口演)
29. Nakano N, Kubota A, Tokunaga M, Tokunaga M, Itoyama T, Makino T, Takeuchi S, Takatsuka Y, Utsunomiya A: UCBT with myeloablative non-TBI regimen using Flu/Bu/Mel for advanced hematological diseases. 第 76 回日本血液学会学術集会, 大阪, 平成 26 年 10 月 31 日 ~ 11 月 2 日。(口演)
 30. Yamagishi M, Takahashi R, Sakai N, Fujikawa D, Nakagawa S, Yamochi T, Yamochi T, Nakano K, Uchimaruru K, Utsunomiya A: Tumor-specific gene expression leads to p38 and Hedgehog activation in adult T cell leukemia. 第 76 回日本血液学会学術集会, 大阪, 平成 26 年 10 月 31 日 ~ 11 月 2 日。(口演)
 31. Ishihara M, Araya N, Sato T, Tatsuguchi A, Saichi N, Utsunomiya A, Yamano Y, Sugano S, Ueda S: Membrane proteome analysis to discover therapeutic targets for HTLV-I associated diseases. 第 76 回日本血液学会学術集会, 大阪, 平成 26 年 10 月 31 日 ~ 11 月 2 日。(口演)
 32. Nosaka K, Iwanaga M, Ishizawa K, Ishida Y, Uchimaruru K, Ishitsuka K, Amano M, Ishida T, Imaizumi Y, Uike N, Utsunomiya A, Oshima K, Kawai K, Tanaka J, Tokura Y, Tobinai K, Watanabe T, Tsukasaki K: A nationwide survey of patients with adult T cell leukemia/lymphoma (ATL) in Japan: 2010-2011. 第 76 回日本血液学会学術集会, 大阪, 平成 26 年 10 月 31 日 ~ 11 月 2 日。(口演)
 33. Tokunaga M, Nakano N, Kubota A, Tokunaga M, Itoyama T, Makino T, Takeuchi S, Takatsuka Y, Utsunomiya A: Prognostic significance of EBMT score and sIL-2R on outcomes after allo-HSCT for ATL. 第 76 回日本血液学会学術集会, 大阪, 平成 26 年 10 月 31 日 ~ 11 月 2 日。(ポスター)
 34. 竹内昇吾、中野伸亮、窪田歩、徳永雅仁、徳永真弓、糸山貴浩、牧野虎彦、高塚祥芝、宇都宮與：成人 T 細胞性白血病/リンパ腫に対する高齢者移植の検討。第 76 回日本血液学会学術集会, 大阪, 平成 26 年 10 月 31 日 ~ 11 月 2 日。(ポスター)
 35. Tokunaga M, Nakano N, Kubota A, Tokunaga M, Itoyama T, Makino T, Takeuchi S, Takatsuka Y, Utsunomiya A: Recent significance of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for adult T cell leukemia/lymphoma (ATL). 56th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, San Francisco, CA, USA, 6-9 December, 2014.(Poster)
 36. Tanosaki R, Choi I, Shimokawa M, Utsunomiya A, Tokunaga M, Nakano N, Fukuda T, Nakamae H, Takemoto S, Kusumoto S, Tomoyose T, Sueoka E, Shiratsuchi M, Suehiro Y, Yamanaka T, Okamura J, Uike N: Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation using reduced-intensity conditioning regimen with fludarabine and

- busulfan from HLA-matched related donor for elderly adult T-cell leukemia/lymphoma: Results of Multicenter Phase II Study (ATL-NST-3). 56th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, San Francisco, CA, USA, 6-9 December, 2014.(Poster)
37. Ishigaki T, Kobayashi S, Ohno N, Nakano N, Utsunomiya A, Yamazaki S, Watanabe N, Uchimaruru K, Tojo A, Nakauchi H : Comprehensive analysis of surface antigens on adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) cells and search for ATL-initiating cell markers. 56th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, San Francisco, CA, USA, 6-9 December, 2014.(Poster)
38. Nakano N, Itoyama T, Kubota A, Tokunaga M, Takeuchi S, Tokunaga M, Makino T, Takatsuka Y, Utsunomiya A: Impact of chromosomal abnormalities in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with adult T-cell leukemia/lymphoma. 2015 BMT Tandem Meeting. San Diego, CA, USA, February 11-15, 2015. (Oral)
39. Yoshimitsu M, Tanosaki R, Kato K, Ishida T, Choi I, Fukuda T, Takatsuka Y, Eto T, Uchida N, Moriuchi Y, Nagamura-Inoue T, Mori S, Sakamaki H , Atsuta Y, Utsunomiya A: Risk stratification of outcomes among patients with adult T-cell leukemia/lymphoma receiving allogeneic hematopoietic cell transplantation: a retrospective analysis of the JSHCT ATL working group. 2015 BMT Tandem Meeting. San Diego, CA, USA, February 11-15, 2015.(Oral)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(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

ATLL のドライバー遺伝子変異の同定

担当責任者 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
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

研究要旨： ATLL に対する化学療法の効果は不良であり、造血幹細胞移植は一定の割合で治癒が期待できるものの、発症年齢の高齢化等から対象となる症例は限られている。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。今後の ATLL 治療戦略において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の開発は極めて重要な位置を占めると考えられる。今年度、われわれは ATLL に対する遺伝子解析を行い、ATLL のドライバー遺伝子同定のための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 個の遺伝子を同定した。見いだされた変異遺伝子産物の多くは、既知の重要な細胞内情報伝達機構に関与しており、この中に ATLL の発症メカニズムに直結するドライバー遺伝子が含まれていると考えられる。パスウェイ解析からは、変異遺伝子の約半数が Tax に関連した経路に関与していることが明らかとなった。本研究によって、ドライバー遺伝子の同定、ひいては ATLL の発症機序の解明と発症前診断の開発、新規治療標的を同定するための基盤となる網羅的遺伝子変異情報が得られた。

A. 研究目的

ATLL に対する化学療法の効果は限定的であり化学療法単独による長期生存は約 15% と極めて予後不良である。同種造血幹細胞移植は治癒を期待しうる治療手段であるが、ATLL 発症者の高齢化も相まって血縁ドナーを有する症例は少なく、コーディネートに一定の時間を要する非血縁者間造血幹細胞移植を実施するまでの期間に病状が悪化し、移植が不可能となる患者も少なくない。さらに、ATLL に対する造血幹細胞移植は高い治療関連死亡を伴う。最近行われた全国調査によると ATLL の発症平均年齢は 68.8 歳であり、これは造血幹細胞移植療法の適応とされる年齢の上限にほぼ等しい。以上から、ATLL 患者の多くは同種造血幹細胞移植の対象となり得ず、化学療法、移植療法以外の手法による治療戦略の確立が期待されている。とりわけ、近年その可能性が広がっている腫瘍細胞におけ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な手法である。

体細胞突然変異は全てのがん細胞において存在しており、その一部はドライバー変異と呼称されている。ドライバー変異の存在は、腫瘍細胞に増殖面での優位性を付

与する等して発がんに関わるとされている。それに対して、その他の変異はパッセンジャー変異と呼ばれ、偶然乗り合わせたバスの乗客になぞらえて表現、解釈されている。言い換えれば、ドライバー遺伝子とは「がん化に重要な遺伝子」であると定義できる。今回われわれは 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た。

B. 研究方法

本研究参加施設より得られた 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。

（倫理面への配慮）

患者検体の収集、遺伝子解析については、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

全エクソーム解析から、ATLL 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 ATLL では有意に高頻度で変異が出現しており、これらはドライバー遺伝子の候補と考えられた。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 個であった。引き続いて実施した 321 症例を対象とした標的シーケンス解析からは、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(図)。これらの遺伝子の中には、TP53 や FAS、CCR4 などの既知の遺伝子異常、PLCG1 や CARD11、IRF4、STAT3、TBL1XR1、GATA3、POT1、RHOA、TET2 などの他のリンパ系腫瘍で同定されている変異、さらに新規の遺伝子変異(Gene A~U)が含まれていた。驚くべきことに、これらの遺伝子の中で15個の遺伝子に10%以上の頻度で変異が認められた。また、ATLL で有意に変異が認められる遺伝子に関して、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 等の重要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きた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。

D. 考察

腫瘍細胞に存在している多数の体細胞突然変異から、がん化に重要なドライバー変異とパッセンジャー変異を区分することは、単に腫瘍の発症機序を解明することにつながるのみならず、従来の抗がん剤を中心とした治療法とは全く異なった機序の新規治療法(分子標的療法)を開発する上で極めて重要である。様々な阻害剤や化合物が開

発され、個々の遺伝子変異を対象にした分子標的療法の可能性が広がった現在では、ドライバー遺伝子の中でも短期間に実現可能な治療の対象となり得る遺伝子を見いだすことが重要である。

今回、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個の遺伝子を抽出することが可能であった。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、発症前診断の開発、新規治療法の開発につながると考えられる。また、これまでの解析によって、変異遺伝子の産物が様々な細胞内情報伝達機構に関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は、ATLL 研究者の間において長年の疑問であった「ATLL 細胞における Tax 発現の低下」について、1. Tax の発現抑制による宿主免疫よりの回避、2. 遺伝子変異に伴う 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。一般に、ドライバー変異とパッセンジャー変異を明快に区分することは難しく、また臨床現場において治療標的となるものが、必ずしもドライバー変異だけとは限らないとされていることから、ATLL に対する新規治療法の開発においては、Tax 経路を含め、今回の検討で見いだされた情報伝達経路の関連分子(上流または下流分子)の阻害も視野に入れた検討を行う必要があると思われる。

E. 結論

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遺伝子変異情報を得た。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Chiba K, Shiraiishi 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
- 2) 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

3) 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

4) Takahashi R, Yamagishi M, Nakano K, Yamochi T, Yamochi T, Fujikawa D, Nakashima M, Tanaka Y, Uchimarui K, Utsunomiya A, Watanabe T: Epigenetic deregulation of *Ellis Van Creveld* confers robust Hedgehog signaling in adult T-cell leukemia. *Cancer Sci.* 105:1160-1169, 2014

5) 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. 24:1411-1420, 2014

2. 学会発表

1) 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

2) 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

3) 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

4) 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

5) 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

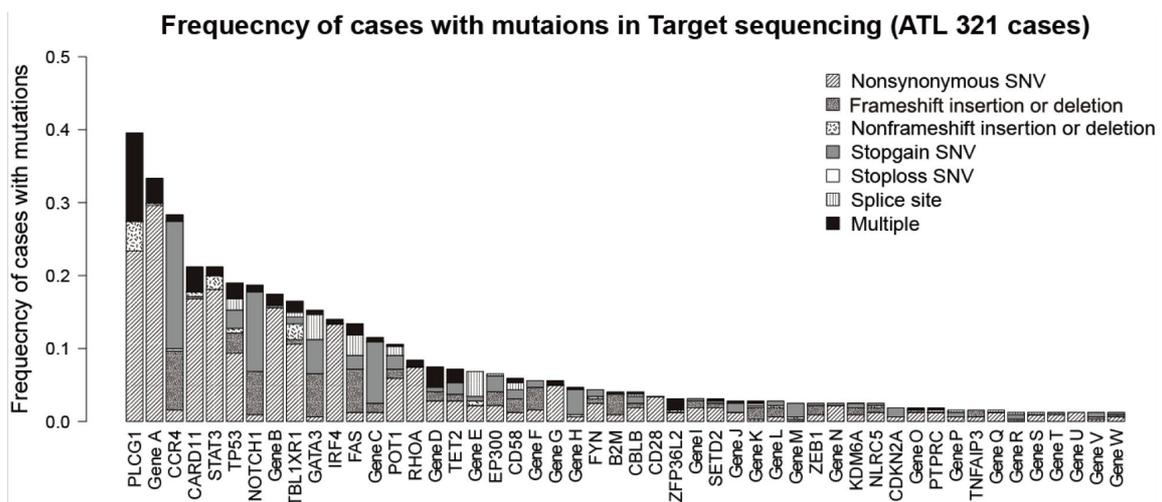


図 ATLにおいて高頻度に変異が存在する遺伝子

ATLL のクローン進展の解析

担当責任者 下田和哉 宮崎大学医学部 内科学講座消化器血液学分野 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

研究要旨： ATLL に対する化学療法の効果は不良であり、ATLL 症例の多くは化学療法の終了後あるいは化学療法継続中に病勢の進行をきたし、最終的に死亡への転帰をとる。ATLL 細胞が短期間に治療不応性となる機序は不明であり、初診時と再発時の腫瘍細胞における遺伝子プロファイルの詳細も不明である。ATLL の再発時クローンが、1. 初診時に中心的であったクローンに更なる遺伝子変異が付加され再燃する、2. 化学療法後に残存したマイナークローンに新たな変異が加わり再発時の主要クローンとなる等、どのようなパターンを取るのかわかることは、今後の治療戦略の策定に重要な情報となる。われわれは、研究参加施設で化学療法を受けた ATLL 患者を対象として再発時、再燃時に同一症例から経時的なサンプル採取を行い、ATLL におけるクローン進展の解析を実施している。

A. 研究目的

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。これまでに他の造血器腫瘍において時間の経過とともに腫瘍細胞内で細胞遺伝学レベルのクローン進展が起きることが報告されている。例えば急性骨髄性白血病(AML)では、再発時の腫瘍細胞についてディープ・シーケンシングを用いた解析を行うことによって、初発時と再発時の遺伝子変異スペクトラムが詳細に比較検討されている。その結果、AML では、1. 初診時に中心的であったクローンに更なる遺伝子変異が付加され再燃する、2. 化学療法後に残存したマイナークローンに新たな変異が加わり再発時の主要クローンとなる、の2つのクローン進展機序が見いだされた。ATLL においては、このようなクローン進展に関する検討はこれまで十分になされておらず、化学療法に対する早期の耐性獲得の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化学療法を受けた ATLL 患者の再発時、再燃時に経時的なサンプル採取を可能とするシステムを構築し、ATLL におけるクローン進展の解析を行うことを目的とした。また、クローン進展解析の一環として、HTLV-1 キャリア末梢血より CD4 陽性細胞を濃縮し、HTLV-1 感染細胞

胞中において、ATLL に頻発するものと同様の遺伝子変異が存在するのかがどうかを検討するための解析手法の確立を目指すこととした。

B. 研究方法

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行った。

HTLV-1 キャリア末梢血より濃縮した CD4 陽性細胞中の遺伝子変異解析を実施するための予備的検討として、凍害防止剤の存在下で凍結保存した健常人ヒト末梢血より CD4 マイクロビーズ及び LS カラムを用いて CD4 陽性細胞を純化し、遺伝子解析が可能な検体を回収し得るかを検討した。

（倫理面への配慮）

患者検体、健常人検体の収集、遺伝子解析については、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

これまでに全エクソーム解析を終了した症例のうち 2 症例から再発時の検体採取を行った。現在、全エクソーム解析を実施中または実施予定の症例から 3 例の再発時検体が集積されており、順次、再発時クローンの網羅的遺伝子解析を実施していく。

濃縮 CD4 陽性細胞を用いた検討において、1 ヶ月間液体窒素中で凍結保存した 1×10^7 個の健常人末梢血単核球中の CD4 陽性細胞の割合は約 50%、CD4 ポジティブセレクション施行後の回収細胞中 CD4 陽性細胞は、>95%であった。純化後の細胞からは、0.5 μ g 程度のゲノム DNA が抽出可能であった。この DNA を鋳型とした PCR 反応では良好な増幅がみられ、様々なアプリケーションに使用可能であることが確認された。

D. 考察

次世代シーケンサーは、従来のサンガー法とは異なったシーケンス原理を用いることによって DNA の塩基配列を網羅的かつ超高速に解析することを可能とした。次世代シーケンサーを用いてディープ・シーケンスを実施することにより、単に代表的腫瘍細胞クローンにおける遺伝子変異を検出するのみにとどまらず、様々な変異をもつごく微量のクローンの存在までもが解析可能となった。これまでに各種の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”が観察されている。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、疾患の経過に伴って治療の標的となる分子を変更または拡張しうることにつながり、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。また、HTLV-1 キャリア末梢血より濃縮した CD4 陽性細胞を用いた標的シーケンスによる遺伝子変異の検出が可能になった場合、キャリアから ATLL への発症前診断を可能とすることにつながる。ATLL 発症リスクの高いキャリアが同定できると、発症予防を目的とした早期治療介入を実現する可能性があり、その意義は大きい。

E. 結論

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。また、HTLV-1 キャリア末梢血を用いた次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析を行うための予備的な検討を実施した。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

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-Otubo 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
該当事項なし
2. 実用新案登録
該当事項なし
3. その他
該当事項なし