

201438010A

厚生労働科学研究委託費
革新的がん医療実用化研究事業

ATL の分子病態に基づく治療層別化のための
マーカー開発と分子標的の同定、および革新的マウス急性型

ATL 実験モデルを用いた臨床応用への展開

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 瀬戸 加大

平成27(2015)年3月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業（革新的がん医療実用化研究事業）による委託業務として、学校法人 久留米大学が実施した平成26年度「ATLの分子病態に基づく治療層別化のためのマーカー開発と分子標的の同定、および革新的マウス急性型 ATL 実験モデルを用いた臨床応用への展開」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

- ATLの分子病態に基づく治療層別化のためのマーカー開発と分子標的の同定、
および革新的マウス急性型 ATL 実験モデルを用いた臨床応用への展開… 1
瀬戸加大

II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. 高密度アレイ CGH グラスによるゲノム異常解析と標的遺伝子の同定、
意義の解析…………… 11
瀬戸加大（久留米大学医学部）
2. ATL 研究のための新しい急性型 ATL 実験モデルの創出と
小分子治療薬のスクリーニング…………… 15
都築 忍（愛知県がんセンター研究所）
3. ゲノム異常領域からの標的遺伝子の単離と機能解析…………… 18
大島孝一（久留米大学医学部）
4. ATL の分子病態に基づく治療層別化のためのマーカー開発と
分子標的の同定…………… 21
宇都宮 興（慈愛会今村病院分院）
6. ATL の分子病態に基づく治療層別化のためのマーカー開発と
分子標的の同定…………… 30
今泉芳孝（長崎大学病院）

III. 学会等発表実績 …………… 33

IV. 研究成果の刊行物・別刷 …………… 36

I. 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告

ATL の分子病態に基づく治療層別化のためのマーカー開発と分子標的の同定、および
革新的マウス急性型 ATL 実験モデルを用いた臨床応用への展開

業務主任者 瀬戸加大 久留米大学医学部 客員教授

研究要旨

成人 T 細胞白血病・リンパ腫 (Adult T-cell leukemia/lymphoma: ATLL) は Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) キャリアのうち約 2-7% に発症する T 細胞性腫瘍である。臨床症状から、ATLL は 4 つの病型（くすぶり型、慢性型、リンパ腫型、急性型）に分類される。私たちは慢性型 ATLL と急性型 ATLL のゲノム異常を比較し、慢性型 ATLL が急性型へと移行する際に細胞周期の脱制御ならびに免疫逃避機構が関与していることを報告した。また、臨床経過との相関から、細胞周期制御遺伝子の異常と免疫認識に関与する CD58 の異常が予後不良群を抽出し、予後予測マーカーとして有用であることを報告した。また、本研究グループは ATL の病態に関するマーカー TSC1 や治療の分子標的である CCR4 の発現様式などについて検討している。さらに、ゲノム異常の解析により明らかにした遺伝子を用いて ATL マウスモデルを作成することに成功し、特許申請をした。このモデルを使って有効な小分子ライブラリーのスクリーニングを始めている。

担当責任者	所属施設名	職名	
都築 忍	愛知県がんセンター研究所	室長	殖を抑制する小分子ライブラリーをスクリーニングし、治療に有用な分子を見いだす。
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	3. ATL で強く発現されることが示された癌抑制遺伝子 TSLC1 発現を免疫染色法で確認し、臨床病態的な意義を検討する。
今泉芳孝	長崎大学病院	講師	4. HTLV-1 感染者のコホート研究である Joint Study on predisposing Factors of ATL Development (JSPFAD) 研究に参加し、HTLV-1 キャリからの ATL 発症例と indolent ATL からの急性転化例について臨床的に検討する。

A. 研究目的

1. 細胞周期制御遺伝子 *P53* の機能欠失の探索し、予後マーカーとして有用かどうかを検討する。
2. ATL に関連する遺伝子群を用いて、マウス ATL モデルを作成し、それを用いて腫瘍増

5. 初発ATL症例では大多数の症例でCCR4が陽性であるが、再発・再燃症例におけるCCR4発現については十分に検討されていない。そこで、自験例で、CCR4抗体医薬投与後のCCR4の分子動態について検討する。

B.研究方法

各研究分担報告書参照

(倫理面への配慮)

本研究は、ヘルシンキ宣言に従って研究を実施しており、各分担研究者所属の倫理審査委員会の許可を得て行われている。

C.研究結果

1. 細胞周期制御遺伝子*P53*の機能欠失の探索

今回解析した19症例(HTLV-1キャリア期11例、慢性型検体8例)では一塩基多型を認めるのみ(SNP rs1042522)で、細胞周期の脱制御をもたらすような*TP53*変異はみられなかった。細胞周期関連遺伝子部のゲノムコピー数異常を有しない慢性型症例においても、*TP53*変異はみられなかった。

2. ATLに関連する遺伝子群を用いたマウスATLモデルによる研究

- a) マウス胎児由来造血細胞から*in vitro*で誘導したT細胞に、HBZ, AKT, BCLxLの3者を発現させマウスに移植すると、移植後1~4か月にかけて全例(n=7)が死亡したのに対し、HBZを抜いたAKTとBCLxLの2遺伝子の場合には5匹中4匹が6か月以上生存し、現在まで無病である。
- b) HBZ, AKT, BCLxLの3者を発現させたT細胞は、サイトカインを加えない条件でもOP9DL1ストローマ上で増殖した(7日で数十倍)のに対して、AKT, BCLxLの組み

合わせではT細胞はわずかな増殖を示したに過ぎなかった。この差は、HTLV-1ウイルスに由来する遺伝子HBZの有無によることから、本培養系を用いてHBZ, AKT, BCLxLの3者を発現させたT細胞の増殖抑制を指標にすれば、HBZの機能を抑制し、したがってATLの治療や発症予防に有用な薬剤の開発に役立つ可能性がある。そこで、96穴培養プレートフォーマットによりOP9DL1ストローマ上でHBZ, AKT, BCLxLの3者を発現させたT細胞を培養し、ここに化合物ライブラリーを添加し、細胞に組み込んだGFP蛍光強度あるいはCell Titer Blue試薬により算定する細胞数の減少を指標としたスクリーニングを開始した。

3. がん抑制遺伝子*TSLC1*発現の免疫染色法による確認と臨床病態的な意義の検討
 - a) 組織検体で免疫染色を行い、ATLL症例は、PTCL-NOS症例・ALK陰ALCL症例・AITL症例と比較して、*TSLC1*の発現の割合が有意に高く、PTCL-NOS症例で*TSLC1*陽性群は、*TSLC1*陰性群と比べて有意に予後不良であった。
 - b) CCR4陽性・*TSLC1*陽性のPTCL-NOSは、予後不良であり、その生存曲線は、ATLLの生存曲線と近似する
4. HTLV-1キャリアからのATL発症例とindolent ATLからの急性転化例についての臨床的検討
 - a) 研究対象期間中にJSPFAD研究に参加したHTLV-1キャリアは494名で、ATL患者は269名であった。初回検査時のsIL-2R値は、HTLV-1キャリアで中央値が428U/mL(172-27400)、ATLで中央値が4990U/mL(260-275000)であった。

末梢血中の HTLV-1 プロウイルス DNA 量は、HTLV-1 キャリアで中央値が 1.36 コピー/100 末梢血単核細胞 (PBMC) (0-115.74)、ATL で中央値が 16.45 コピー/100PBMC (0-368.23) であった。

- b) HTLV-1 キャリア 494 名のうち 5 名が ATL を発症した。臨床病型は急性型 2 名、慢性型 1 名、くすぶり型 2 名であった。これら 5 名の初回の sIL-2R 値の中央値は 685U/mL (671-27400)、HTLV-1 プロウイルス DNA 量の中央値は 9.26 コピー/100PBMC (6.34-11.87) であった。ATL 発症時の sIL-2R 値の中央値は 1550U/mL (534-28100)、HTLV-1 プロウイルス DNA 量の中央値は 7.57 コピー/100PBMC (7.57-89.95) であった。
- c) 慢性型もしくはくすぶり型から 22 名が急性転化した。くすぶり型 ATL から急性型へ移行した例は 10 名であり、急性転化までの期間の中央値は、12.3 か月 (2.5-74.1 ヶ月) であった。慢性型から急性転化した例は 12 名であり、急性転化までの期間の中央値は 23.5 か月 (5.5-57.8 ヶ月) であった。
- d) くすぶり型から急性転化した 10 名の初回の sIL-2R 値の中央値は 720U/mL (260-4650)、HTLV-1 プロウイルス DNA 量の中央値は 15.27 コピー/100PBMC (0.29-54.75) であった。急性転化時の sIL-2R 値の中央値は 37500U/mL (1260-245000)、HTLV-1 プロウイルス DNA 量の中央値は 36.00 コピー/100PBMC (1.31-87.54) であった。慢性型から急性転化した 12 名の初回の sIL-2R 値の中央値は 5375U/mL (836-155000)、HTLV-1 プロウイルス DNA 量の中央値は 25.35 コピー/100PBMC (0.48-133.14) であった。急性転化時の

sIL-2R 値の中央値は 26950U/mL (560-67600)、HTLV-1 プロウイルス DNA 量の中央値は 56.86 コピー/100PBMC (2.12-368.23) であった。

5. CCR4抗体医薬投与後のCCR4の分子動態についての検討

末梢血異常リンパ球は、治療前はほとんどの細胞が CCR4 陽性 (リンパ球領域で CR25 79.3%、CCR4 77.3%) であったが、治療後の FCM では CCR4 陰性分画の割合が増加 (リンパ球領域で CD25 42.0%、CCR4 8.5%) していた。治療前後で PVL は減少 (60.3 copies/100PBMCs → 17.0 copies/100PBMCs) していたが、サザンブロットのバンドパターンは不変で、同一クローンの細胞と考えられた。RT-PCR での検討でも治療後は *CCR4* mRNA 発現が著明に低下していた。一方、*CCR4* の発現調節に関与する転写因子 *FRA-2*、*JUND* の発現は維持されていた。また、*FRA-2*、*JUND* の下流遺伝子 (*c-MYB*、*SOX4* など) の発現も保たれており、*CCR4* 特異的な発現低下と考えられた。*CCR4* の Sanger sequencing では治療前後で新規に獲得された変異は認めなかった。

D. 考察

HTLV-1 キャリア期、また慢性型 ATLL 期で *TP53* 変異はみられないという本解析結果と、急性型 ATL で *TP53* 変異が多くみられるという既報を合わせると、*TP53* 変異は急性型病態にとって特に重要であると考えられる。私たちは以前にそれら *TP53* 変異以外の細胞周期関連遺伝子のゲノムコピー数 が慢性型 ATLL の約 56% で生じており、急性型への移行に関与していることを見出している (Yoshida et al. *Cancer Res.* 2014)。ATLL では *TP53* 変異と細胞周期関連遺伝子の一つ

である *CDKN2A* の異常は相互排他性の関係にあることが報告されている。これらのことから考えると、慢性型 ATLL での *TP53* 変異は低頻度である可能性がある。HTLV-1 感染細胞が polyclonal ないし、monoclonal に増殖しているキャリア検体においても *TP53* 変異はみられなかった。このことから、HTLV-1 感染細胞の増生には *TP53* 変異以外の機構が働いていると考えられる。

本研究により創出した急性型ATL実験モデルは、その腫瘍細胞がヒトの急性型ATLの特徴を備えていることから、今後ATLの治療や発症予防のための介入実験にも応用できる。また、現在多施設で行われているヒトATL臨床検体の解析から今後明らかにされることが期待される種々の遺伝子異常につき、その機能的意義を迅速に評価することを可能にする点でも有用性が高い。さらに、本研究により創出したATLモデル細胞は、大規模な薬剤スクリーニングを可能にするものである。

CCR4陽性・TSLC1陽性のPTCL-NOSは、ATLLに類似した疾患群である可能性が疑われる。今後、より多数例での検討、FOXP3の発現の有無など腫瘍細胞のT-cellのoriginによる臨床病理学的特徴を含めた検証が必要である。

HTLV-1 キャリアからの ATL 発症例と indolent ATL からの急性転化例について後方視的に解析した。HTLV-1 キャリアからの ATL 発症例は、全例初回時より末梢血中の HTLV-1 プロウイルス DNA 量が >6 コピー/100PBMC と高値を示した。末梢血中の HTLV-1 プロウイルス DNA 量の高値は、従来の報告通り ATL 発症のリスク因子と考えられる。

Indolent ATL から急性転化までの期間は、慢性型よりくすぶり型の方が短い傾向があり、くすぶり型 ATL は慢性型に比し、より

indolent であるわけではないことを示唆している。Indolent ATL からの急性転化においては、くすぶり型および慢性型のいずれの急性転化においても末梢血中の HTLV-1 プロウイルス DNA 量の増加よりも sIL-2R 値の上昇が顕著であった。

HTLV-1 キャリアからの ATL 発症や進展のメカニズムを解明するためには、ATL 発症時や急性転化時の遺伝子変化を捉える事が重要であり、ATL 発症ハイリスク HTLV-1 キャリアや indolent ATL の適切なフォローアップが必要であると考えられる。

CCR4特異的な発現低下の原因として、epigenetic異常の関与や、clonal evolutionによるCCR4陰性サブクローンの選択的な増生が示唆された。

E. 結論

TP53 変異は ATLL の急性型の病態、および他病型の急性転化機構に関与していると考えられる。急性型 ATLL 以外の ATLL 病型での *TP53* 変異頻度は低いと考えられるため、その変異のみだけでなく他の細胞周期関連遺伝子の異常を含めた評価が、急性型への移行を予測するバイオマーカーの確立には有用と考えられる。

In vitro で誘導したマウス T 細胞に HBZ, AKT, BCLxL の 3 者を発現させマウスに移植することにより、急性型 ATL モデルを新たに作成することに成功した。HBZ, AKT, BCLxL の 3 者導入 T 細胞は in vitro での培養が可能であることから、この培養系を用いて ATL の発症予防や治療に有用な薬剤の開発をめざした、化合物ライブラリーのスクリーニングを開始した。

ATLL 症例で TSLC1 の発現率が高いこと、PTCL-NOS 症例で TSLC1 陽性群は、TSLC1 陰性群と比べて有意に予後不良であることがわかった。

ATL 発症や進展のメカニズムを解明するためには、ATL 発症ハイリスク HTLV-1 キャリアや indolent ATL のフォローアップが必要である。

抗CCR4抗体医薬投与後の再発・再燃ではATL細胞におけるCCR4発現の変化を来す可能性があり、抗体医薬再投与前に改めてCCR4発現の有無について検討することが望まれる。抗体CCR4抗体医薬に対する耐性の克服のために、CCR4陰性化の分子機構についてさらなる検討が必要である。

F.健康危険情報
なし

G.研究発表

1. 論文発表

1. Utsunomiya A, Choi I, Chihara D, Seto M. Recent advances in the treatment of adult t-cell leukemia-lymphomas. *Cancer Sci*. 2015 Jan 23. doi: 10.1111/cas.12617. [Epub ahead of print]
2. 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 Research*. 74(21)6129-6138. 2014.
3. Arita K, Tsuzuki S, Ohshima K, Sugiyama T, Seto M.: Synergy of Myc, cell cycle regulators and the Akt pathway in the development of aggressive B-cell lymphoma in a mouse model. *Leukemia*. 28:2270-2272. 2014
4. Guo Y, Takeuchi I, Karnan S, Miyata T, Ohshima K, Seto M.: Array-comparative genomic hybridization profiling of immunohistochemical subgroups of diffuse large B-cell lymphoma shows distinct genomic alterations. *Cancer Sci*. 105:481-489. 2014
5. Suguro M, Yoshida N, Umino A, Kato H, Tagawa H, Nakagawa M, Fukuhara N, Karnan S, Takeuchi I, Hocking TD, Arita K, Karube K, Tsuzuki S, Nakamura S, Kinoshita T, Seto M.: Clonal heterogeneity of lymphoid malignancies correlates with poor prognosis. *Cancer Sci*. 105:897-904, 2014.
6. Chihara D, Kagami Y, Kato H, Yoshida N, Kiyono T, Okada Y, Kinoshita T, Seto M. :IL2/IL-4, OX40L and FDC-like cell line support the in vitro tumor cell growth of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leuk Res*. 38:608-612. 2014.
7. Iqbal J, Wright G, Wang C, Rosenwald A, Gascoyne RD, Weisenburger DD, Greiner TC, Smith L, Guo S, Wilcox RA, Teh BT, Lim ST, Tan SY, Rimsza LM, Jaffe ES, Campo E, Martinez A, Delabie J, Braziel RM, Cook JR, Tubbs RR, Ott G, Geissinger E, Gaulard P, Piccaluga PP, Pileri SA, Au WY, Nakamura S, Seto M, Berger F, de Leval L, Connors JM, Armitage J, Vose J, Chan WC, Staudt LM; Lymphoma Leukemia Molecular

- Profiling Project and the International Peripheral T-cell Lymphoma Project. Gene expression signatures delineate biological and prognostic subgroups in peripheral T-cell lymphoma. *Blood*. 123:2915-2923. 2014.
8. Kato H, Karube K, Yamamoto K, Takizawa J, Tsuzuki S, Yatabe Y, Kanda T, Katayama M, Ozawa Y, Ishitsuka K, Okamoto M, Kinoshita T, Ohshima K, Nakamura S, Morishima Y, Seto M.: Gene expression profiling of Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly reveals alterations of characteristic oncogenetic pathways. *Cancer Sci*. 105:537-544. 2014.
 9. Hashikawa K, Yasumoto S, Nakashima K, Arakawa F, Kiyasu J, Kimura Y, Saruta H, Nakama T, Yasuda K, Tashiro K, Kuhara S, Hashimoto T, Ohshima K.: Microarray analysis of gene expression by microdissected epidermis and dermis in mycosis fungoides and adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int J Oncol*. 45: 1200-1208, 2014.
 10. Guo Y, Arakawa F, Miyoshi H, Niino D, Kawano R, Ohshima K.: Activated janus kinase 3 expression not by activating mutations identified in natural killer/T-cell lymphoma. *Pathol Int*. 64: 263-266, 2014.
 11. 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*, 49(12): 1567-1577, 2014.
 12. 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(6): 1192-1198, 2014.
 13. 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*, 166(5): 739-748, 2014.
 14. 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*, 124(8): 3431-3442, 2014.
 15. Takahashi R, Yamagishi M, Nakano K,

- Yamochi T, Yamochi T, Fujikawa D, Nakashima M, Tanaka Y, Uchimaru K, Utsunomiya A, Watanabe T: Epigenetic deregulation of EVC confers robust Hedgehog signaling in adult T-cell leukemia. *Cancer Sci*, 105(9): 1160-1169, 2014.
16. 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*, 20(12): 1968-1974, 2014.
 17. 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*, 49(12): 1548-1549, 2014.
 18. 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*, 74(21): 6129-6138, 2014.
 19. 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]
 20. 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, Kimura K, Yamano Y: 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*, 211(2): 238-248, 2015.
 21. Utsunomiya A, Choi I, Chihara D, Seto M: Recent advances in treatment of adult T-cell leukemia-lymphomas. *Cancer Sci*, 2015 [Epub ahead of print]
 22. 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]
 23. Taguchi M, Imaizumi Y, Sasaki D, Higuchi T, Tsuruda K, Hasegawa H, Taguchi J, Sawayama Y, Imanishi D,

- Hata T, Yanagihara K, Yoshie O, Miyazaki Y. Molecular analysis of loss of CCR4 expression during mogamulizumab monotherapy in an adult T cell leukemia/lymphoma patient. *Ann Hematol*. [Epub ahead of print],2014 Oct 23
24. Taniguchi H, Hasegawa H, Sasaki D, Ando K, Sawayama Y, Imanishi D, Taguchi J, Imaizumi Y, Hata T, Tsukasaki K, Uno N, Morinaga Y, Yanagihara K, Miyazaki Y. Heat shock protein 90 inhibitor NVP-AUY922 exerts potent activity against adult T-cell leukemia-lymphoma cells. *Cancer Sci*, 105(12): 1601-1608, 2014.
 25. Makiyama J, Imaizumi Y, Tsushima H, Taniguchi H, Moriwaki Y, Sawayama Y, Imanishi D, Taguchi J, Hata T, Tsukasaki K, Miyazaki Y. Treatment outcome of elderly patients with aggressive adult T cell leukemia-lymphoma: Nagasaki University Hospital experience. *Int J Hematol*, 100(5): 464-472, 2014.
2. 学会発表
 1. 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. (2014) "Molecular Characterization of Chronic-Type Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma: Discovery of Molecular Biomarkers for Acute Transformation" Presented at 2014 American society of Hematology Meeting on Lymphoma Biology, Poster no. 35 Colorado Springs, CO.
 2. Yoshida N, Tsuzuki S, Karube K, Takahara T, Suguro M, Nishikori M, Shimoyama M, Tsukasaki K, Ohshima K, Seto M. (2014) "STX11 Acts As a Novel Tumor Suppressor Gene in Peripheral T-Cell Lymphomas" Presented at 56th annual meeting of American Society of Hematology, Abstract no. 1615 San Francisco CA.
 3. 在田幸太郎, 都築忍, 大島孝一, 杉山敏郎, 瀬戸加大. レトロウイルスによる正常 B 細胞への遺伝子導入を用いた成熟 B 細胞腫瘍マウスモデル. 第 24 回日本サイトメトリー学会. 学術総会 (枚方) .2014 年 6 月 (招聘講演)
 4. Arita K, Tsuzuki S, Ohshima K, Sugiyama T, Seto M. Synergy of Myc, cell cycle regulators and the Akt pathway in a mouse model of B-cell lymphoma. 2014 ASH Meeting on Lymphoma Biology (Colorado Springs, CO. 2014 年 8 月
 5. 都築 忍、在田幸太郎、大島孝一、杉山敏郎、瀬戸加大: Myc、細胞周期関連遺伝子、Akt パスウェイの協調によるマウスリンパ腫モデル. 第 73 回 日本癌学会学術総会 (横浜) 2014 年 9 月
 6. Arita K, Tsuzuki S, Ohshima K, Sugiyama T, Seto M. Synergy of Myc, cell cycle regulators and the Akt pathway in a mouse model of B-cell lymphoma. 第 76 回 日本血液学会学術総会 (大阪) 2014 年 10 月
 7. 都築 忍: 悪性リンパ腫の遺伝子異常. 第 32 回 日本染色体遺伝子検査学会

- (名古屋) 2014年11月
8. 加藤丈晴, 三好寛明, 今泉芳孝, 安東恒史, 澤山靖, 新野大介, 今西大介, 田口潤, 波多智子, 内丸薫, 大島孝一, 宮崎泰司. Peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified における TSLC1 発現の検討. 54 回日本リンパ網内系学会総会. 2014年6月20日.
 9. 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
 10. 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
 11. 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ーリング解析と 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
 12. Nosaka K, Iwanaga M, Ishizawa K, Ishida Y, Uchimar 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
 13. 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
 14. 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
 15. Ishigaki T, Kobayashi S, Ohno N, Nakano N, Utsunomiya A, Yamazaki S, Watanabe N, Uchimar 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
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 (出願中)
瀬戸 加大・都築 忍・春日井 由美子
「成人 T 細胞白血病モデル細胞及び動物、並びにそれらの製造方法」
特願 2014-169608 2014年8月22日

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

II. 委託業務成果報告（業務項目）

高密度アレイ CGH グラスによるゲノム異常解析と標的遺伝子の同定、意義の解析

瀬戸加大 久留米大学医学部 客員教授

研究要旨

慢性型 ATL と急性型 ATL のアレイ CGH 法によるゲノム異常様式の比較から、細胞周期制御遺伝子群の異常が予後に重要な影響を与えることを報告した。しかし、重要な細胞周期制御遺伝子である *TP53* 遺伝子についてはゲノムコピー数の異常が慢性型では全く認められなかった。*P53* についてはコピー数異常以外に塩基配列変異も機能失活において重要な役割を担っているため、シーケンスにより塩基配列を決定したが、検討した症例では全く昨日欠失変異は認められなかったため、慢性型 ATL においては *TP53* 遺伝子異常は関与せず、むしろ急性型を決定する重要な遺伝子であることが明らかとなった。

A. 研究目的

成人 T 細胞白血病・リンパ腫 (Adult T-cell leukemia/lymphoma: ATLL) は Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) キャリアのうち約 2-7% に発症する T 細胞性腫瘍である。臨床症状から、ATLL は 4 つの病型 (くすぶり型、慢性型、リンパ腫型、急性型) に分類される。以前に私たちは慢性型 ATLL と急性型 ATLL のゲノム異常を比較し、慢性型 ATLL が急性型へと移行する際に細胞周期の脱制御ならびに免疫逃避機構が関与していることを見出した (Yoshida et al. *Cancer Res.* 2014)。*TP53* は細胞周期を制御する代表的な遺伝子であり、その変異異常が急性型 ATLL で認められることが知られている。今回、本研究では HTLV-1 キャリア期検体、ならびに慢性型 ATLL 検体でその *TP53* 変異が認められるかどうかを検討し、*TP53* 変異が ATLL 発症や病期進行に関与して

いるかについて検討した。

B. 研究方法

HTLV-1 キャリア期 11 例、慢性型検体 8 例の末梢血検体を対象とし、解析を実施した。ATLL 細胞は CD4 陽性であるため、末梢血中の CD4 陽性細胞より DNA を抽出した (Ohshima et al. *Am J Hematol.* 1997, Yoshida et al. *Cancer Res.* 2014)。今回解析した HTLV-1 キャリア期の検体では、HTLV-1 感染 CD4 陽性細胞が monoclonal あるいは polyclonal に増殖している (Ohshima et al. *Am J Hematol.* 1997)。8 例の慢性型 ATLL のうち 5 例では細胞周期関連遺伝子部のゲノムコピー数異常を有しており、残りの症例は有していなかった (Yoshida et al. *Cancer Res.* 2014)。*TP53* 変異は、エクソン 4-8 領域を標的としサングーシーケンス法で解析し、変異同定には、

IARC TP53 database (<http://p53.iarc.fr/>) を用いた。慢性型 ATLL 検体は共同研究者 (宇都宮 興医学博士、今泉 芳孝医学博士) より提供された。

(倫理面への配慮)

本研究は久留米大学における倫理審査委員会により承認を得ている (No. 214)。慢性型 ATLL 検体については各施設よりインフォームドコンセントを得ており、それぞれの施設の倫理委員会により承認を受けている。HTLV-1 キャリア検体については連結可能匿名化検体として同倫理審査委員会より承認を得ている。

C. 研究結果

今回解析した 19 症例 (HTLV-1 キャリア期 11 例、慢性型検体 8 例) では一塩基多型を認めるのみ (SNP rs1042522) で、細胞周期の脱制御をもたらすような *TP53* 変異はみられなかった。細胞周期関連遺伝子部のゲノムコピー数異常を有しない慢性型症例においても、*TP53* 変異はみられなかった。

D. 考察

HTLV-1 キャリア期、また慢性型 ATLL 期で *TP53* 変異はみられないという本解析結果と、急性型 ATL で *TP53* 変異が多くみられるという既報を合わせると、*TP53* 変異は急性型病態にとって特に重要であると考えられる。私たちは以前にそれら *TP53* 変異以外の細胞周期関連遺伝子のゲノムコピー数が慢性型 ATLL の約 56% で生じており、急性型への移行に関与していることを見出している (Yoshida et al. *Cancer Res.* 2014)。ATLL では *TP53* 変異と細胞周期関連遺伝子の一つである *CDKN2A* の異常は相互排他性の関係にあることが報告されている。これらのことから考えると、慢性型 ATLL での *TP53* 変異は低頻度である可能性が

ある。HTLV-1 感染細胞が polyclonal ないし、monoclonal に増殖しているキャリア検体においても *TP53* 変異はみられなかった。このことから、HTLV-1 感染細胞の増生には *TP53* 変異以外の機構が働いていると考えられる。

E. 結論

TP53 変異は ATLL の急性型の病態、および他病型の急性転化機構に関与していると考えられる。急性型 ATLL 以外の ATLL 病型での *TP53* 変異頻度は低いと考えられるため、その変異のみだけでなく他の細胞周期関連遺伝子の異常を含めた評価が、急性型への移行を予測するバイオマーカーの確立には有用と考えられる。

F. 健康危険情報

記載無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Utsunomiya A, Choi I, Chihara D, Seto M. Recent advances in the treatment of adult t-cell leukemia- lymphomas. *Cancer Sci.* 2015 Jan 23. doi: 10.1111/cas.12617. [Epub ahead of print]
2. 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 Research.* 74(21)6129-6138. 2014.
3. Arita K, Tsuzuki S, Ohshima K, Sugiyama T, Seto M.: Synergy of Myc, cell cycle regulators and the Akt pathway in the development of aggressive B-cell lymphoma in a mouse

- model. *Leukemia*. 28:2270-2272. 2014 (PMID: 25034145)
4. Guo Y, Takeuchi I, Karnan S, Miyata T, Ohshima K, Seto M.: Array-comparative genomic hybridization profiling of immunohistochemical subgroups of diffuse large B-cell lymphoma shows distinct genomic alterations. *Cancer Sci*. 105:481-489. 2014 (PMID: 25034145)
 5. Suguro M, Yoshida N, Umino A, Kato H, Tagawa H, Nakagawa M, Fukuhara N, Karnan S, Takeuchi I, Hocking TD, Arita K, Karube K, Tsuzuki S, Nakamura S, Kinoshita T, Seto M.: Clonal heterogeneity of lymphoid malignancies correlates with poor prognosis. *Cancer Sci*. 105:897-904, 2014. (PMID: 24815991)
 6. Chihara D, Kagami Y, Kato H, Yoshida N, Kiyono T, Okada Y, Kinoshita T, Seto M. :IL2/IL-4, OX40L and FDC-like cell line support the in vitro tumor cell growth of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leuk Res*. 38:608-612. 2014. (PMID: 24679586)
 7. Iqbal J, Wright G, Wang C, Rosenwald A, Gascoyne RD, Weisenburger DD, Greiner TC, Smith L, Guo S, Wilcox RA, Teh BT, Lim ST, Tan SY, Rimsza LM, Jaffe ES, Campo E, Martinez A, Delabie J, Braziel RM, Cook JR, Tubbs RR, Ott G, Geissinger E, Gaulard P, Piccaluga PP, Pileri SA, Au WY, Nakamura S, Seto M, Berger F, de Leval L, Connors JM, Armitage J, Vose J, Chan WC, Staudt LM; Lymphoma Leukemia Molecular Profiling Project and the International Peripheral T-cell Lymphoma Project. Gene expression signatures delineate biological and prognostic subgroups in peripheral T-cell lymphoma. *Blood*. 123:2915-2923. 2014 (PMID: 24632715)
 8. Kato H, Karube K, Yamamoto K, Takizawa J, Tsuzuki S, Yatabe Y, Kanda T, Katayama M, Ozawa Y, Ishitsuka K, Okamoto M, Kinoshita T, Ohshima K, Nakamura S, Morishima Y, Seto M.: Gene expression profiling of Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly reveals alterations of characteristic oncogenetic pathways. *Cancer Sci*. 105:537-544. 2014. (PMID: 24581222)
2. 学会発表
 1. 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. (2014) "Molecular Characterization of Chronic-Type Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma: Discovery of Molecular Biomarkers for Acute Transformation" Presented at 2014 American society of Hematology Meeting on Lymphoma Biology, Poster no. 35 Colorado Springs, CO.
 2. Yoshida N, Tsuzuki S, Karube K, Takahara T, Suguro M, Nishikori M, Shimoyama M, Tsukasaki K, Ohshima K, Seto M. (2014) "STX11 Acts As a Novel Tumor Suppressor Gene in Peripheral T-Cell Lymphomas" Presented at 56th annual meeting of American Society of Hematology, Abstract no. 1615 San Francisco CA.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得(出願中)

瀬戸 加大・都築 忍・春日井 由美子

「成人T細胞白血病モデル細胞及び動物、
並びにそれらの製造方法」

特願 2014-169608 2014年8月22日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ATL 研究のための新しい急性型 ATL 実験モデルの創出と小分子治療薬のスクリーニング

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

ATL の発症・維持には HTLV-1 ウイルス由来の遺伝子と細胞由来の遺伝子との協調が必要である。この協調作用を個体レベルで解明するために、T 細胞性腫瘍を迅速に作成するシステムを新たに構築し応用した。その結果、HBZ, AKT, BCLxL の 3 遺伝子協調による急性型 ATL モデルを新たに作成することに成功した。作成した ATL モデル細胞は *in vitro* での培養が可能であることから、この培養系を用いて ATL の発症予防や治療に有用な薬剤の開発をめざして、化合物ライブラリーのスクリーニングを開始した。

A. 研究目的

ATL の発症には HTLV-1 ウイルスの感染が必須だが、それだけでは発症せず、細胞由来の遺伝子（変異遺伝子を含む）との協調作用が必要である。

本研究では、(1) HTLV-1 ウイルス由来の遺伝子と細胞由来の遺伝子との腫瘍化における協調作用を迅速に評価するための新しいシステムを構築・最適化し、同システムを応用して急性型 ATL 実験モデルを創出すること、(2) 作成した ATL モデル細胞を利用して、ATL の発症予防や治療に役立つ薬剤の候補を見出すために化合物スクリーニングを行うことの 2 点を目的とする。

B. 研究方法

われわれは、リンパ性腫瘍の発症・維持機構を解明するために、初代培養リンパ球にレトロウイルスにより任意の遺伝子や shRNA を導入

し、同細胞をマウスに移植することによってリンパ性白血病や悪性リンパ腫のマウスモデルを作成し解析してきた (Arita K, *Leukemia* 2014; Tsuzuki S, *Stem Cells* 2013; Arita K, *Exp. Hematol.* 2014; Tsuzuki S, *Blood* 2011)。

本研究では同手法を改変し、マウス胎児由来造血細胞をサイトカイン (Flt3 Ligand, IL7) 存在下に OP9DL1 ストローマ上で培養することによって *in vitro* で T 細胞を誘導し、この T 細胞にレトロウイルスにより任意の遺伝子を導入するシステムを最適化した。本システムを利用して、HTLV-1 ウイルス由来の遺伝子 HBZ と細胞由来の遺伝子 AKT, BCLxL の 3 者を発現させ、マウスに移植した。コントロールとして AKT, BCLxL の 2 者の組合せを用いた。

さらに、遺伝子導入 T 細胞を *in vitro* で培養し増殖させるシステムを構築し、細胞増殖の抑制を指標にした化合物ライブラリーのスクリーニング法を確立した。化合物ライブラリーは、