

- Uchimaru K, Utsunomiya A, Watanabe T. Epigenetic deregulation of Ellis Van Creveld confers robust Hedgehog signaling in adult T-cell leukemia. *Cancer Sci*. 2014 Sep;105(9):1160-9. doi: 10.1111/cas.12480. Epub 2014 Sep 8.
5. Kobayashi S, Nakano K, Watanabe E, Ishigaki T, Ohno N, Yuji K, Oyaizu N, Asanuma S, Yamagishi M, Yamochi T, Watanabe N, Tojo A, Watanabe T, Uchimaru K. CADM1 expression and stepwise down regulation of CD7 are closely associated with clonal expansion of HTLV-I-infected cells in adult t-cell leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2014 Jun 1;20(11):2851-61. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3169. Epub 2014 Apr 11.
  6. Takaaki Konuma, Seiko Kato, Jun Ooi, Maki Oiwa-Monna, Yasuhiro Ebihara, Shinji Mochizuki, Koichiro Yuji, Nobuhiro Ohno, Toyotaka Kawamata, Norihide Jo, Kazuaki Yokoyama, Kaoru Uchimaru, Arinobu Tojo, and Satoshi Takahashi. Impact of sex incompatibility on the outcome of single-unit cord blood transplantation for adult patients with hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant*. 2014 May;49(5):634-9. doi: 10.1038/bmt.2014.10. Epub 2014 Feb 17
  7. Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Ebihara Y, Mochizuki S, Yuji K, Ohno N, Kawamata T, Jo N, Yokoyama K, Uchimaru K, Tojo A, Takahashi S. Effect of ABO Blood Group Incompatibility on the Outcome of Single-Unit Cord Blood Transplantation after Myeloablative Conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014 Apr;20(4):577-81. doi: 10.1016/j.bbmt.2013.12.563. Epub 2013 Dec 22.
  8. Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Ebihara Y, Mochizuki S, Yuji K, Ohno N, Kawamata T, Jo N, Yokoyama K, Uchimaru K, Asano S, Tojo A, Takahashi S. Single-Unit Cord Blood Transplantation after Granulocyte Colony-Stimulating Factor-Combined Myeloablative Conditioning for Myeloid Malignancies Not in Remission. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014 Mar;20(3):396-401. doi: 10.1016/j.bbmt.2013.12.555. Epub 2013 Dec 11
  9. Kobayashi Seiichiro, Watanabe Eri, Ishigaki Tomohiro, Ohno Nobuhiro, Yuji Koichiro, Nakano Kazumi, Yamochi Tadanori, Watanabe Nobukazu, Tojo Arinobu, Watanabe Toshiki, Uchimaru Kaoru. Advanced HTLV-1 carriers and early-stage indolent ATLs are indistinguishable based on CADM1 positivity in flow cytometry. *Cancer Science*. in press. 2015
  10. 内丸 薫 わが国におけるHTLV-1キャリアとATL患者に対する相談機能と知識の普及 *血液内科* 68(1); 58-64, 2014
  11. 内丸 薫 成人T細胞白血病 (ATL) 検査と技術 42 ; 1370-1375, 2014
  12. 内丸 薫 成人T細胞白血病 *medicina* 52 (4) in press
2. 学会発表
    1. 間質依存性増殖を示す新規急性型ATL細胞株の樹立と in vivo 増殖モデルの解析 石垣知寛、小林誠一郎、大野伸広、大田泰徳、渡辺信和、東條有伸、中内啓光、内丸 薫 第76回日本血液学会学術集会 大阪 2014
    2. Tumor-specific gene expression leads to p38 and Hedgehog activation in adult T-cell leukemia. Yamagishi M, Takahashi R, Sakai N, Fujiwara D, Nakagawa S, Yamochi T, Yamachi T, Nakano K, Uchimaru K, Utsunomiya A and Watanabe T. 第76回日本血液学会学術集会 大阪 2014
    3. A nationwide study of patients with adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) in Japan:2010-2011. Noasaka K,
    4. Iwanaga M, Ishizawa K, Ishida Y, Uchimaru 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. 第76回日本血液学会学術集会 大阪 2014
    5. ESHAP regimen as salvage therapy for patients with relapsed or refractory adult T cell leukemia. JO N, Ohno N, Takeda R, Nakamura S, Hirano M, Takei S, Kawamata T, Yokoyama K, Fukuyama T, Yuji K, Uchimaru K and Tojo A. 第76回日本血液学会学術集会 大阪 2014
    6. Differential diagnosis of by flow

- cytometric analysis of post allo-SCT myelopathy; a case report  
Kawamata T, Ohno N, Sato K, Kobayashi M, Jo N, Yuji K, Tanosaki R, Yamano Y, Uchimaru K and Tojo A. 第76回日本血液学会学術集会 大阪 2014
7. Impact of clearance of blasts from peripheral blood during induction chemotherapy of AML. Konuma T, Kato S, Yuji K, Ohno N, Kawamata T, Yokoyama K, Jo N, Uchimaru K, Takahashi S and Tojo A. 第76回日本血液学会学術集会 大阪 2014
  8. Scouting risk factors for CMV and HBV reactivation in 4,631 non-transplant malignant lymphoma cases. Ohshima Y, Tanimoto T, Yuji k, Uchimaru K, Takahashi S and Tojo A. 第76回日本血液学会学術集会 大阪 2014
  9. 急性型ATLとHTLV-1ぶどう膜炎の同時発症の1例. 平野光人、大野伸広、小林誠一郎、石垣知寛、田野崎隆二、鴨居功樹、内丸 薫、東條有伸. 第1回日本HTLV-1学会学術集会 東京 2014
  10. 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. 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. 第1回日本HTLV-1学会学術集会 東京 2014
  11. Hierarchical clustering analysis of surface antigens on ATL cells and search for ATL-initiating cell marker. Ishigaki T, Kobayashi S, Nakano N, Utsunomiya A, Uchimaru K and Tojo A. 第73回日本癌学会学術総会 横浜 2014.
  12. The BRAF-V600E mutation in circulating cell-free DNA is a promising biomarker of high-risk adult Langerhans cell histiocytosis. Kobayashi M, Ohno N, Fukuyama T, Kawamata T, Uchimaru K, Tojo A. The 56th ASH Annual Meeting and Exposition. San Francisco, CA, 2014.
  13. Comprehensive Analysis of Surface Antigens on Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma (ATL) Cells and Search for ATL-Initiating Cell Markers. Ishigaki T, Uchimaru K et al. The 56th ASH

Annual Meeting and Exposition. San Francisco, CA, 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む)

1. 特許取得  
特許出願番号 特願 2013-034326  
名称 患者検体を用いたHTLV-1キャリア、成人T細胞白血病の発癌過程進行度又は悪性度の評価法  
発明者 内丸 薫、小林誠一郎、渡辺信和
2. 実用新案登録
3. その他

成人T細胞白血病に対する標準治療としての同種造血幹細胞移植法の確立および  
ゲノム解析に基づく治療法の最適化に関する研究

分担研究「成人T細胞白血病の患者検体を用いたゲノム解析などの  
付随研究の実施および検体バンキング基盤の確立」

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・教授

村上善則 東京大学医科学研究所・教授

研究要旨：登録献体のバンキングについてBBJへのバンキング方法を検討したが、当面は既存の共同研究組織JSPFADのシステムを利用してダブルバンキングの形で検体登録を行い、将来の統合に備えることとした。付随研究としては、検体登録開始前のため、ゲノム解析は次年度以降に開始することとし、遺伝子発現解析とクローナリティ解析については、JSPFADの既存検体を用いて試験的な実験を開始した。遺伝子発現異常の例としてc-Mybのisoformの過剰発現とその意義について検討し、クローナリティ解析では、39検体のパイロット解析から、臨床病型とクローナリティの間の相関について更に検討すべき課題があることが示された。

A. 研究目的

本研究班の目的は、アグレッシブATLに対する治療法の有力な選択肢である造血幹細胞同種移植法について、適応症例の適切な選択と最適なタイミングで安全性の高い同種移植を行えるシステムを構築することを目指す。検体バンキング基盤と付随研究により、治療選択の根拠となるマーカーを明らかにし、各症例毎に治療法の最適化を可能にすることを目指す。これらを通じて、aggressive ATLに対する治療成績を短期間で向上させることを目標とする。

本分担研究は、(1) 検体バンキング基盤の確立と、(2) 以下の付随研究課題、を遂行する。

1) ATL細胞のゲノム異常解析、2) ATL細胞の遺伝子発現とクローナリティ解析。

B. 研究方法

(1) 検体バンキング基盤の確立

本研究において、前向き登録された患者のATL細胞検体および移植後に定期的に収集し

た検体とドナー検体の一部をBBJにバンキングすることを目指す。これを可能にするため、現状のBBJの運用体制の改定を目指す。まず、問題点の明確化と必要な体制整備の項目を検討する。一方、既存の全国共同研究組織JSPFADが構築し運用している検体収集とバンキングシステムについては、将来的にBBJへ統合することを視野に入れて、運用方法に関して具体的な方策の検討を進める。

(2) 付随研究

1) ATL細胞のゲノム異常解析

臨床研究開始後は、前向きに登録された患者検体のATL細胞と類粘膜検体(germline)を用いて、エクソーム解析、全ゲノム解析およびエピジェネティクス解析を行い、遺伝子変異やエピジェネティクス異常のデータ収集を開始する。これにより、将来的に臨床経過情報とゲノム異常との関係の統合的解析を可能にする。登録検体解析前の今年度は、JSPFADに登録

されている検体を用いて、種々の臨床病型の患者末梢血中の ATL 細胞検体と、multicolor FACS (HAS-2G 法) によって分画された検体を用いてエクソーム解析と全ゲノム解析のパイロット的な解析を行い基礎データの取得を目指す。

## 2) ATL 細胞の遺伝子発現とクローナリティ解析

上記と同様に、臨床研究の検体登録開始前の今年度は、JSPFAD に登録されている検体を用いて、種々の臨床病型の患者末梢血中の ATL 細胞検体と、multicolor FACS (HAS-2G 法) によって分画された検体を用いてパイロット的な解析を行い基礎データの取得を目指す。

遺伝子発現解析：遺伝子発現アレイ解析 (mRNA, miRNA) および次世代シーケンサーを用いた RNAseq などにより発現している RNA の量的および質的異常の特徴を検討する。

クローナリティ解析：我々が開発した定量性に優れた方法によるクローナリティ解析システムである NGS Tag-mediated Clonality Analysis System (NGS-TagCAS)を用いて、各病態における HTLV-1 感染細胞のクローン性増殖の実態を解析する。

(倫理面への配慮)

倫理審査委員会の承諾のもと本研究を行った。

## C. 研究結果

### (1) 検体バンキング基盤の確立

現状の BBJ の運用体制は、固形癌の組織から抽出された DNA サンプルと一部のホルマリン固定標本の受け入れと保存を前提としている。これらの検体運搬と DNA 抽出は検査会社に委託する体制になっている。一方、本研究の付随研究では、ATL 細胞の免疫学的解析、マルチカラー-FACS 解析、遺伝子発現解析などが、重要な解析項目となることから、現状の BBJ バンキングシステムは、目的にそぐわない。従

って、BBJ のバンキング検体の種類および検体の運搬システムの改変を行い、生細胞の運搬と解析を可能にしつつ、バンキング用の検体も確保する柔軟な制度が必要である。これらを含めて、現状の BBJ のシステムに関して、本研究計画の立場から、問題点の整理を行い、BBJ 運用方式の改定により対応が可能な部分と、別途、本研究計画遂行のために整備すべき体制を検討する必要があるようになった。

一方、HTLV-1 キャリアと関連疾患患者の参加によって運用されている、既存の全国共同研究組織 JSPFAD は、全国の協力施設から、研究協力者の末梢血検体を定期的に (原則として 1 年に 1 回) 採取し担当研究者の渡邊の研究室へ集約し、単核球の分離、DNA 抽出、プロウイルス量の定量および血漿の保存を行っている。すでに延べ約 10,000 検体が集積されており、年間 1000 検体以上が登録される。この現行の共同研究体制とバンキングシステムを有効に活用し、将来的に BBJ へ統合することを視野に入れて、運用方法に関して具体的な方策の検討を進めた。

検討の結果、本研究の登録患者の検体を、既存の JSPFAD 共同研究にも登録し、将来 BBJ へ統合できるダブルバンキング体制をとること、JSPFAD の検体運搬法に関して、当研究計画の目的に合わせた第 2 の運搬方法を組み込むことにより、目的が達成できるとの結論になった。この結論に基づき、運用体制の詳細についての検討を開始した。

### (2) 付随研究

#### 1) ATL 細胞のゲノム異常解析

前向きに登録された患者検体の ATL 細胞と類粘膜検体 (germline) のエクソーム解析、全ゲノム解析およびエピジェネティクス解析を行い、遺伝子変異やエピジェネティクス異常のデータ収集を開始し、将来的に臨床経過情報とゲノム異常との関係の統合的解析を可能にするデータの取得を始める。

## 2) ATL 細胞の遺伝子発現とクローナリティ解析

今年度は、登録検体がなかったため、新規のアレイ解析は実施しなかったが、RNA 発現の量的および質的異常について解析を進めるため、分担研究者が解析しデータベースに登録済みの情報に基づき、JSPFAD の検体を用いて、幾つかの遺伝子の発現解析を行った。中でも、c-Myb の種々のアイソフォームの過剰発現の実態を明らかにし特に oncogenic isoform とされる c-Myb9A の過剰発現と下流のシグナル伝達系の異常を明らかにした（投稿中）。

クローナリティ解析については、我々が開発した定量性に優れた Clonality 解析法 (NGS-TagCAS 法)を用いて、JSPFAD に登録されている以下の既存検体を用いて基礎的データの収集を行った。

解析検体内訳：

HTLV-1 キャリア 12 検体

くすぶり型 ATL 7 検体

慢性型 ATL 12 検体

急性型 ATL 8 検体

さらに各病態と病系について検体数を増やして検討予定であるが、現在までに、以下のような情報が得られている。

臨床的に無症候性キャリアとされる検体は、polyclonal な増殖を示す。くすぶり型 ATL の検体は、polyclonal 増殖と oligoclonal 増殖を示す例が混在する。慢性型 ATL の検体は、monoclonal 増殖と oligoclonal 増殖を示す検体がある。急性型 ATL の検体は monoclonal 増殖である。

また、経時的に解析できた 2 検体のうち 1 例は major クローンが入れ替わっていることが示唆された。

## D. 考察

検体バンキング基盤の確立：

BBJ のバンキングシステムの早急な改変が困難であることと、本研究の目的に合った形で体制整備には時間がかかることが明らかに

なった。将来的な BBJ への登録を見据えて、既存の JSPFAD システムとの統合に向けた準備を開始すること、そのためには当面、ダブルバンキング体制を構築して対処することとした。

付随研究

### 1) ATL 細胞のゲノム異常解析

本研究課題の検体が入手できなかったため、エクソーム解析や全ゲノム解析の実施は次年度以降となる。検体登録開始に合わせて、速やかに解析を進めるための体制整備を進める必要が有る。

### 2) ATL 細胞の遺伝子発現とクローナリティ解析

発現アレイ解析は登録検体がある次年度以降の課題として、分担研究者らが登録した既存のデータベースを基盤に、個別の遺伝子に注目した解析を進めた。c-Myb の高発現と isoform ごとの発現異常が明らかになり、ATL 細胞における遺伝子発現とシグナル伝達異常の実態解明に新たな情報が得られた。

JSPFAD を用いた試験的な Clonality 解析を進めたが、臨床診断と clonality pattern の間の関係に興味有る情報が得られている。臨床病型分類の見直しにつながる可能性がある知見と考えられるので、次年度以降に検体数を増やして情報の蓄積を行い、臨床的な意義を検討する予定である。

## E. 結論

バンキング体制の整備に向けて、問題点の整理と今後の方針について明らかにすることができた。

検体登録前の状態で、可能な範囲の試験的解析を行い情報の蓄積を行った。遺伝子発現及びクローナリティ解析が、分子病態の把握と最適治療法の選定に有用なバイオマーカー探索につながる可能性が示された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

英文雑誌 (全て査読有)

1. Kobayashi S, Watanabe E, Ishigaki T, Ohno N, Yuji K, Nakano K, Yamochi T, Watanabe N, Tojo A, **Watanabe T**, Uchimaru K. Advanced HTLV-1 carriers and early-stage indolent ATLS are indistinguishable based on CADMI positivity in flow cytometry. *Cancer Sci.* in press
2. Kuramitsu M, Okuma K, Yamagishi M, Yamochi T, Firouzi S, Momose H, Mizukami T, Takizawa K, Araki K, Sugamura K, Yamaguchi K, **Watanabe T**, Hamaguchi I. Identification of TL-Om1, an ATL Cell Line, as a Reference Material for Human T-Lymphotropic Virus 1 Quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 53(2):587-596, 2015 (doi: 10.1128/JCM.02254-14)
3. 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 *Ellis Van Creveld* confers robust Hedgehog signaling in adult T-cell leukemia. *Cancer Sci* 105(9):1160-1169, 2014 (doi: 10.1111/cas.12480)

和文雑誌

1. **渡邊俊樹**、III 章. 主要な感染症 (原因微生物毎) J. RNA ウイルス感染症「ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型感染症 (Human T-cell leukemia virus type Infection)」, 日本医師会雑誌『感染症診療 update』、143 巻・特別号 (2) : 394-397、2014 年

### 1. 学会発表

(国際学会)

1. Kataoka K, Nagata Y, Kitanaka A, Sato-Otsubo

A, Totoki Y, Yasunaga J, Sanada M, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Suzuki H, Sato Y, Shiozawa Y, Yoshizato T, Kon A, 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”, 56<sup>th</sup> of ASH Annual Meeting and Exposition, Moscone Center, San Francisco, U.S.A., Dec. 7, 2014 (Dec. 6- Dec. 9, 2014) (Oral/Poster)

2. Nagata Y, Enami T, Kontani K, Kataoka K, Sakata-Yanagimoto M, Kitanaka A, Sato A, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Shiozawa Y, Yoshizato T, 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” 56<sup>th</sup> of ASH Annual Meeting and Exposition, Moscone Center, San Francisco, U.S.A., Dec. 7, 2014 (Dec. 6- Dec. 9, 2014) (Oral/Poster)
3. Okayama A, Iwanaga M, Sagara Y, Hidaka T, Umekita K, Nakano K, **Watanabe T**, Yamano Y, Horai Y, Nakamura H, Kawakami A, “Human T-Lymphotropic Virus Type 1 Biomarkers in Patients with Rheumatoid Arthritis”, ACR/ARHP Annual Meeting, , Boston, U.S.A., Nov 18th, 2014 (Poster)

(国内学会)

1. 堀真琴, 藤川大, 中川翔太, 田中勇悦, 中野和民, **渡邊俊樹**, 山岸誠, 「成人 T 細胞白血病における EZH2 依存的エピジェネティック異常の包括的解析」、第 37 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、横浜、2014 年 11 月 25 日 (2014 年 11 月 25 日～27 日) (ポスター)

2. Sanaz Firouzi, Tadanori Yamochi, Osvany Lopez, Yutaka Suzuki, Kenta Nakai, Sumio Sugano, **Toshiki Watanabe**, "Monitoring clonal composition of HTLV-1-infected cells based on provirus integration sites", 第 37 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、横浜、2014 年 11 月 27 日 (2014 年 11 月 25 日～27 日) (ポスター)
3. 相良康子、井上由紀子、守田麻衣子、後藤信代、岩永正子、矢持忠徳、**渡邊俊樹**、浜口功、相良康弘、清川博之、「HTLV-1 PVL と HLA Class I 結合 peptide の乖離時間との関連」、第 62 回日本ウイルス学会学術総会、パシフィコ横浜、横浜、2014 年 11 月 11 日 (2014 年 11 月 10 日～12 日) (一般口演)
4. Nakashima M, Yamochi T, Higashihara M, **Watanabe T**, Horie R, "CD30 expressing cells in HTLV-1 carriers reveal abnormal nuclear morphology resembling flower cells", 第 76 回日本血液学会学術集会、大阪国際会議場、大阪、2014 年 11 月 1 日 (2014 年 10 月 31 日～11 月 2 日) (一般口演)
5. 野坂生郷、岩永正子、石澤賢一、石田陽治、内丸薫、石塚賢治、天野正宏、石田高司、今泉芳孝、鶴池直邦、宇都宮與、大島孝一、河井一浩、田中淳司、戸倉新樹、飛内賢正、**渡邊俊樹**、塚崎邦弘、「全国医療機関における成人 T 細胞白血病・リンパ腫(ATL)患者の実態調査：2010 年～2011 年」、第 76 回日本血液学会学術集会、大阪国際会議場、大阪、2014 年 11 月 1 日 (2014 年 10 月 31 日～11 月 2 日) (一般口演)
6. Yamagishi M, Takahashi R, Sakai N, Fujikawa D, Nakagawa S, Yamochi T, Yamochi T, Nakano K, Uchimarui K, Utsunomiya A, **Watanabe T**, "Tumor-specific gene expression leads to p38 and Hedgehog signaling activation in adult T cell leukemia", 第 76 回日本血液学会学術集会、大阪国際会議場、大阪、2014 年 11 月 1 日 (2014 年 10 月 31 日～11 月 2 日) (一般口演)
7. Nagata Y, Enami T, Sakata-Yanagimoto M, Kataoka K, Kitanaka A, Sato A, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Shiozawa Y, Yoshizato T, Kon A, Yoshida K, Sanada M, Ishiyama K, Miyawaki S, Ishii R, Nureki O, Miyano S, Shimoda K, **Watanabe T**, Chiba S, Ogawa S, "Distinct patterns of RHOA mutations in Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma and peripheral T-Cell lymphomas", 第 76 回日本血液学会学術集会、大阪国際会議場、大阪、2014 年 11 月 1 日 (2014 年 10 月 31 日～11 月 2 日) (一般口演)
8. Kataoka K, Nagata Y, Kitanaka A, Sato-Otsubo A, Totoki Y, Yasunaga J, Sanada M, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Suzuki H, Sato Y, Shiozawa Y, Yoshizato T, Kon A, 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、大阪国際会議場、大阪、2014 年 11 月 1 日 (2014 年 10 月 31 日～11 月 2 日) (一般口演)
9. 永田安伸、榎並輝和、坂田(柳元)麻実子、片岡圭亮、北中明、佐藤亜以子、白石友一、眞田昌、宮野悟、下田和哉、**渡邊俊樹**、千葉滋、小川誠司、「成人 T 細胞白血病/リンパ腫と他の末梢性 T 細胞性腫瘍における RHOA の特徴的な変異分布と生物学的機能の解析」、第 73 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、横浜、2014 年 9 月 26 日 (2014 年 9 月 25 日～27 日) (口演)
10. **渡邊俊樹**、山岸誠、「ATL 発症の基盤となるゲノム・エピゲノム異常の解析」、シンポジウム: 16. ATL 発がん機構と治療の新展開、第 73 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、横浜、2014 年 9 月 25 日 (2014 年 9 月 25 日～27 日) (招待口演)
11. 片岡圭亮、永田安伸、北中明、佐藤亜以子、十時康、安永純一郎、油谷浩幸、宮野悟、**渡邊俊樹**、松岡雅雄、柴田龍弘、下田和哉、小川誠司、「成人 T 細胞白血病/リンパ腫におけるゲノム異常の網羅的解析」、シンポジウム: 16. ATL 発がん機構と治療の新展開、第 73 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、横浜、2014 年 9 月 25 日 (2014 年 9 月

25日～27日) (シンポジウム口演)

12. 藤川大、山岸誠、中川翔太、黒川直也、副島あい、石田尚臣、田中勇悦、中野和民、渡邊俊樹、「ATL細胞におけるEZH2依存のエピジェネティック異常の包括的解析」、第73回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、横浜、2014年9月25日(2014年9月25日～27日)(ポスター)
13. 矢持忠徳、守田陽平、矢持淑子、Sanaz Firouzi、佐々木陽介、渡辺信和、内丸薫、宇都宮與、渡邊俊樹、「Putative ATL tumor initiating cellsの解析」、第73回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、横浜、2014年9月25日(2014年9月25日～27日)(ポスター)
14. Sanaz Firouzi, Tadanori Yamochi, Yosvany López, Yutaka Suzuki, Kenta Nakai, Sumio Sugano, Toshiki Watanabe, “A new high-throughput method to investigate the clonality of HTLV-1-infected cells based on provirus integration sites”, 第73回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、横浜、2014年9月25日(2014年9月25日～27日)(ポスター)

1. (その他)

- 1.渡邊俊樹、「HTLV-1の病原性発現機構とATLの発症機構」、第5回病原微生物部門セミナー、山口大学農学部、山口、2015年1月20日(招待講演)
- 2.渡邊俊樹、「ATL発症機構の解析に基づく発症予防・新規治療法の探索」、第13回さいたま血液勉強会、大日本住友製薬(株)主催、大日本住友製薬(株)埼玉支店、埼玉、2014年11月14日(招待講演)
- 3.Watanabe T, “Molecular mechanisms of leukemogenesis of adult T-cell leukemia (ATL) caused by HTLV-1”, 2d IARI Symposium, Lyon, France, Nov. 3 (Nov. 3-4), 2014
- 4.渡邊俊樹、「ATL発症機構の解析に基づく発症予防法と治療法の開発」、ATL学術集会、協和発酵キリン(株)主催、盛岡グランドホテル、岩手、2014年10月9日(招待講演)

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



成人T細胞白血病に対する標準治療としての同種造血幹細胞移植法の確立および  
ゲノム解析に基づく治療法の最適化に関する研究

題名 ATLのバンキングとマーカー、遺伝子解析

研究分担者 村上 善則 東京大学医科学研究所・教授

研究要旨：骨髄移植前後の ATL細胞のマーカー分子発現解析、シーケンス解析を可能とするために、ATL細胞や非腫瘍部試料を系統的にバイオバンクジャパンにバンク化するための基盤的条件検討を行った。また、ATL細胞で特異的に発現し、診断マーカーとして用いられる CADM1タンパク質に対する複数種のモノクローナル抗体をマウスで作成した。さらに、MT2細胞を用いた細胞生物学的解析、またマウスを用いた転移実験により、CADM1がMT2細胞のin vitroの浸潤活性、またNOG マウスでの尾静脈から肝臓への細胞の生着、血管外への湧出を促進し、結果として肝臓への実験的転移を促進することを示した。

#### A. 研究目的

同種造血幹細胞移植を受けた ATL 患者の移植前後の遺伝子異常、マーカー変化を系統的に解析するために、ATL 腫瘍細胞、非腫瘍部組織、各 DNA などをバイオバンクジャパンと連携してバンク化して解析するシステムを構築する。また、ATL 細胞で特異的に発現し、診断マーカーとして用いられる CADM1 タンパク質に対するモノクローナル抗体を作成して、ATL の診断、治療への応用を目指す。さらには CADM1 の ATL における病的意義を明らかにする。

#### B. 研究方法

##### ATL 細胞のバンキングシステムの構築：

本研究班の前向きコホート研究に登録された症例の臨床情報と生体試料を、ATL の研究に沿う形でバイオバンクジャパンにバンキングする方針、手順 (SOP) について検討した。

##### 抗 CADM1 マウスモノクローナル抗体

##### の作成：

*Cadm1* 遺伝子欠損マウスを Balb/c 系統に戻し交配して得たマウスを用いて、哺乳類細胞に発現させ、培養上清より精製した CADM1 断片を免疫原として免疫し、抗 CADM1 モノクローナル抗体を作成した。

##### CADM1 による ATL 細胞の転移抑制：

CADM1 の発現抑制は、2つの shRNA である shCADM1-5, shCADM1-8 と GFP 発現細胞を細胞にエレクトロポレーション法により導入し、安定発現細胞株を樹立することにより行った。ヒト臍帯血内皮細胞 (HUVEC) との細胞接着活性は、ATN-1, MT-2 細胞を各々 HUVEC 上に共培養して行った。In vitro 細胞増殖アッセイは5日間、トリパンプルー排除法により細胞数を計測して行った。多臓器浸潤のモデル実験は、NOG マウスの尾静脈にMT-2細胞を注入し、24日後に解剖して検討した。初期の肝臓への浸潤の評価は、細胞をNOGマウス尾静脈に注入し、24時間後

に解剖し、共焦点顕微鏡により行った。

(倫理面への配慮)

東京大学医科学研究所倫理審査委員会の承諾を得て、本研究を行った(承認番号 24-34-1004)。

## C. 研究結果

### ATL 細胞のバンキングシステムの構築:

ATL の研究に沿う形で腫瘍組織、非腫瘍部組織をバイオバンクジャパンにバンキングするための SOP を共同で作成した。また、ATL 検体の既存バンクである JSPFAD と連携して、ダブルバンキングする方針を決定した。

### 抗 CADM1 マウスモノクローナル抗体の作成:

*Cadm1* 遺伝子欠損マウスを免疫することにより、合計 60 種の抗 CADM1 モノクローナル抗体を得た。その一部にあたる 6 種に関して、クローン化を終了した。

### CADM1 による ATL 細胞の転移抑制:

shCADM1-5, shCADM1-8 は、HTLV-1 トランスフォーム細胞 MT-2 に導入することにより、CADM1 タンパク質発現を各々 50%, 30% 低下させた。次に MT-2/shCADM1-5, MT-2/shCADM1-8, と HUVEC を共培養すると、MT-2 に shControl をトランスフェクションした細胞 MT-2/shControl と比較して、各々 20%, 20% 細胞接着能が低下した。ATL 細胞 ATN-1 に shCADM1-5, shCADM1-8 を導入した実験でも同様の傾向を示した。

次に、MT-2/shCADM1-5、MT-2/shControl を各々 NOG マウスの尾静脈に注入後、24 日後に解剖して検討した

ところ、MT-2/shCADM1-5 導入マウスでは、MT-2/shControl 導入マウスと比較して、有意な体重減少、肺、肝臓、脾臓への浸潤の低下が認められた。さらに肝臓では壊死を示す領域の減少を認めたが、血管密度、腫瘍細胞の Ki67 陽性細胞には有意な変化は認めなかった。

次に、ATL モデルにおける早期の細胞接着と血管外侵出への CADM1 の意義を検討するために、MT-2/shCADM1

-5-GFP 細胞、MT-2/shControl-GFP 細胞を NOG マウスに注入し、26 時間後に解剖して肝臓組織に関して共焦点顕微鏡にて観察したところ、GFP 陽性細胞の血管内から血管外への侵出は、前者の細胞で有意に高かった。

## D. 考察

本研究班の前向きコホート研究に登録された ATL 患者の移植前後の遺伝子異常、マーカー変化を系統的に解析するためには、ATL 腫瘍細胞、非腫瘍部組織、各 DNA などをバイオバンクジャパンと連携してバンク化して解析するシステムを構築することが必須である。そこで、本分担研究ではこのシステムを構築することを初年度の目的とし、SOP を共同で構築した。この過程で、従来のバイオバンクジャパンがゲノム疫学を想定して構築された組織であるため、臨床研究を進める際に必須、かつ有用となる各腫瘍の指標や試料の収集が、各々特徴的であることが改めて浮き彫りになった。そこで ATL に関しては、既存の ATL バンクである JSPFAD との連携により、ダブルバンキングを行う方針を決定し、次年度以降に具体的な試料移管を進める予定である。

一方、ATL 細胞の特異診断マーカーとして CADM1 が確立され、抗 CADM1 抗体を用いた FACS による診断が実用

化してきた。分担研究者は CADM1 を同定し、ATL での特異的発現についても共同で報告した実績がある。そこで本研究では、CADM1 が複雑な糖鎖修飾を受ける膜タンパク質であることから、新たな抗 CADM1 抗体の作成を目指し、6 種の抗体をクローン化して、現在その性質を検討中である。

また、CADM1 が ATL 細胞に特徴的な臓器浸潤や皮下浸潤を促進する可能性が示されている。そこで本研究では、CADM1 を共に高発現する ATL 患者由来腫瘍細胞 ATN-1, HTLV-1 感染細胞 MT-2 を用いて、CADM1 発現を shRNA により低下させた安定細胞株を作成し、in vitro, in vivo での増殖、浸潤活性を検討した。この結果、CADM1 は、in vitro では ATN-1, MT-2 細胞の HUVEC との接着能の亢進、in vivo (NOG マウス)での肺、肝臓、脾臓への浸潤、肝臓の壊死巣、さらには細胞注入 24 時間後における腫瘍細胞の血管外侵出を抑制することが示された。In vivo の実験は MT-2 細胞で得られたものではあるが、これらの結果は、ATL 細胞の悪性化、特に疾患に特徴的にみとめられる多臓器浸潤、皮下浸潤を、CADM1 発現が高めていることを示唆している。したがって CADM1 は、ATL の診断マーカーのみならず、治療の分子標的としても有用であることが示された。

#### E. 結論

ATL 試料のバイオバンクジャパンへのバンク化への道筋をつけた。また CADM1 が ATL の浸潤を促進することを示し、診断、治療の目的で、抗 CADM1 モノクローナル抗体を多数作成した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

英文雑誌

1. Sakurai-Yageta M, Maruyama T, Suzuki T, Ichikawa K, Murakami Y. Dynamic Regulation of a Cell Adhesion Protein Complex Including CADM1 by Combinatorial Analysis of FRAP with Exponential Curve-fitting. *PLoS ONE*, in press.
2. Matsubara D, Murakami Y, Niki T. Immunohistochemical analysis of the expression of E-cadherin and ZEB1 in non-small cell lung cancer. *Pathology International*, in press
3. Ebihara Y, Iwai M, Akashi K, Ito T, Omura G, Saito Y, Yoshida M, Ando M, Asakage T, Yamasoba T, Murakami Y. High incidence of null-type mutations of the TP53 gene in Japanese patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Cancer Therapy*, 5, 664-671, 2014. (doi.org/10236/jct2014.57075)
4. Wang F, Akashi K, Murakami Y, Inoue Y, Furuta T, Yamada H, Ohtomo K, Kiryu S. Detection of lung tumors in mice using a 1-Tesla compact magnetic resonance imaging system. *PLoS One*, 9, e94945, 2014. (doi: 10.1371/journal.pone.0094945).
5. Ibrahim R, Matsubara D, Osman W, Morikawa T, Goto A, Morita S, Ishikawa S, Aburatani H, Takai D, Nakajima J, Fukayama M, Niki T, Murakami Y. Expression of PRMT5 in lung

adenocarcinoma and its significance in epithelial-mesenchymal transition. *Human Pathology*, 45, 1397-1405, 2014. (doi: 10.1016/j.humpath.2014.02.013).

6. Cortez VS, Cervantes-Barragan L, Song C, Gilfillan S, McDonald KG, Edelson BT, Murakami Y, Newberry RD, Sibley LD, Colonna M. CRTAM controls residency of gut CD4+CD8+T cells in the steady state and maintenance of gut CD4 TH17 during parasitic infection. *J Exp. Med.*, 211, 623-633, 2014. (DOI: 10.1084/jem.20130904).
7. Murakami S, Sakurai-Yageta M, Maruyama T, Murakami Y. Intercellular adhesion of CADM1 activates PI3K by forming a complex with MAGuK-family proteins MPP3 and Dlg. *PLoS One*, 9:e82894, 2014. (DOI: 10.1371/journal.pone.0082894.)

## 2. 学会発表

1. Ito T, Sakurai-Yageta M, Goto A, Murakami Y. Genomic and transcriptional alterations of cholangiocarcinoma. International Symposium for Biomarkers of Cholangiocarcinoma、東京都、2015年1月24日、招待講演。
2. Kogai H, Sakurai-Yageta M, Delloye-Bourgeois C, Tauszig-Delamasure S, Mehlen P, Murakami Y. Involvement of CADM1 in apoptosis induction of detached epithelial cells as a new type of dependence receptor. 4<sup>th</sup> France-Japan Cancer Workshop、京都市、2014年11月18-21日、招待講演。
3. Murakami Y. Involvement of a cell adhesion molecule CADM1 in oncogenesis. The 2nd International Alliance Research Internship Program Symposium of the University of Lyon. フランス、リヨン市、2014年11月3-4日、招待講演。
4. Kogai H, Sakurai-Yageta M, Tauszig-Delamasure S, Mehlen P, Murakami Y. Involvement of CADM1 in apoptosis induction of detached epithelial cells as a new type of dependence receptor. The 20<sup>th</sup> International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research、チリ、アリカ市、2014年10月8-11日、招待講演。
5. Murakami Y. Roles of a cell adhesion molecule CADM1 in epithelial integrity and malignant phenotype of cancer cells. The 73rd Annual Meeting of Japanese Cancer Association、横浜市、2014年9月26日、招待講義。
6. Ito T, Kogai H, Murakami S, Sakurai-Yageta M, Matsubara D, Murakami D. Context dependent features of a cell adhesion molecule CADM1 in human oncogenesis. The 21<sup>st</sup> East Asia Joint Conference、京都市、2014年7月15-18日、招待講演。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1.特許取得：なし
- 2.実用新案登録：なし
- 3.その他：なし

成人T細胞白血病に対する標準治療としての同種造血幹細胞移植法の確立およびゲノム解析に基づく治療法の最適化に関する研究

題名 HTLV-1感染細胞の動態とゲノム解析

研究分担者 松岡雅雄 京都大学ウイルス研究所・教授

研究要旨:ヒトT細胞白血病ウイルス1型(HTLV-1)は生体内で感染細胞を増やすという戦略を取っている。感染細胞の増加は、ウイルス遺伝子の発現や宿主免疫応答によって規定されている。HTLV-1 bZIP factor (HBZ) は全てのATL症例、HTLV-1感染者で発現しているが、その免疫原性が低いことが知られている。マウスを使った実験によりHBZに対する細胞傷害性Tリンパ球が誘導可能であり、抗腫瘍効果を有することを明らかにした。また、細胞傷害性Tリンパ球が認識する主要ペプチドをマウス、ヒトで同定し、ELISPOTによる解析が可能であることを示した。

#### A. 研究目的

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) は、感染細胞を介して感染するために、生体内では感染細胞を増やすという戦略を取っている。感染細胞の増殖は、ウイルス遺伝子の発現、宿主の免疫応答などによって規定されており、宿主免疫は ATL 細胞の増殖にも影響を与えている。我々は HTLV-1 がマイナス鎖にコードする HTLV-1 bZIP factor (HBZ) 遺伝子が全ての ATL 症例、感染者で発現していることを明らかにしてきた。そのため、HBZ は免疫療法の格好のターゲットになるものと期待される。本研究では HBZ に対する免疫誘導と、HBZ の腫瘍抗原としての可能性を検討した。

#### B. 研究方法

1) HBZ 発現ワクチニアウイルスによる免疫誘導: HBZ を発現するワクチニアウイルスを作製し、C57BL/6 マウスに接種し免疫を誘導した。脾細胞は CD4 又は CD8 を除去し、IFN- $\gamma$  ELSIPOT アッセイを行った。脾細胞は

1 $\mu$ M overlapped peptide(20mer) と anti-CD28mAb(final 2 $\mu$ g/ml)の存在下で6時間刺激した。

2)細胞障害性はフローサイトメトリーを用いて測定した。Ly5.1 マウスは rVV-HBZ で免疫し脾細胞を回収した。CD4T 細胞を除去後、1 $\mu$ M overlapped peptide と IL-2 の存在下で1週間培養し、effector 細胞とした。EL4 細胞 (Ly5.2)は1 $\mu$ M overlapped peptide をパルスし、target 細胞とした。それらの細胞は混合後、6hr 培養して Ly5.2 陽性細胞でのアネキシン V 陽性細胞をフローサイトメトリーを使用して測定した。
$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{(E:T_{(x:1)} - E:T_{(0:1)})}{(100 - E:T_{(0:1)})} \times 100$$

(倫理面への配慮)

動物実験は、京都大学の承認を得て動物実験指針に則り行われた。

#### C. 研究結果

1) HBZ を発現するワクチニアウイルスを作製し、C57BL/6 マウスに免疫した。Tax は1回の免疫で IFN- $\gamma$  産生細胞を

ELISPOT で確認できたが、HBZ は 6 回の免疫により検出された。HBZ が Tax と比較して免疫原性が低いことが確認できた。

2) HBZ で免疫したマウスの脾細胞を使って、HBZ ペプチドでパルスした EL-4 細胞への細胞傷害能が確認できた。同様に HBZ トランスジェニックマウスの CD4 陽性 T リンパ球に対する細胞傷害能を解析し、確認できた。このことから HBZ で免疫し誘導した T リンパ球は HBZ ペプチドを認識し、傷害することが確認できた。

3) HBZ トランスジェニックマウスから樹立した細胞株 (Ht48) を使い HBZ に対する細胞性免疫が腫瘍に作用するかを検討した。C57B/6 マウスを HBZ 発現ワクチニアウイルスで免疫した。その脾細胞を、Ht48 接種マウスに移入したところ、マウスの生存延長が認められた。従って、HBZ に対する細胞性免疫は HBZ を発現する腫瘍に対する抵抗性を賦与することが示された。

4) HBZ のペプチドを使い、マウス、ヒトで細胞傷害性 T リンパ球が認識する主要ペプチドを明らかにした。

#### D. 考察

HTLV-1 がコードするウイルスタンパク質に関しては、これまで Tax を中心に研究が進んできた。Tax は免疫原性が高く、細胞傷害性 T リンパ球の検出も容易である。しかし、ATL 症例では Tax を発現しないものも多く、免疫源としての問題点もあった。一方、HBZ は全ての症例で発現しているが、免疫原性が低いという問題点があった。しかし、感染細胞数 (プロウイルス量) は HBZ に対する細胞傷害性 T リンパ球によって規定されているという報告もあり、生体内で有効に働いている可能性が示唆され

ていた。今回の研究で、HBZ ワクチニアウイルスを反復して接種することにより HBZ に対する免疫応答を誘導することが可能であることが示された。また、細胞傷害性 T リンパ球が認識する主要ペプチドを同定したことにより、ヒトでも HBZ に対する細胞傷害性 T リンパ球を ELISPOT で検出することが可能となった。

#### E. 結論

HBZ に対する細胞傷害性 T リンパ球が誘導可能であり、腫瘍に対して抑制効果があることが示された。また、ヒトにおいても HBZ に対する細胞傷害性 T リンパ球の検出が可能となった。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Ma G, Yasunaga J-I, Akari H, and Matsuoka M. TCF1 and LEF1 act as T-cell intrinsic HTLV-1 antagonists by targeting Tax. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, (in press).
2. Takachi T, Takahashi M, Takahashi-Yoshita M, Higuchi M, Obata M, Mishima Y, Okuda S, Tanaka Y, Matsuoka M, Saitoh A, Green P, Fujii M. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein represses the expression of the BCL11B tumor suppressor in T-cells. **Cancer Sci**, (in press).
3. 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 NF $\kappa$ B activation in adult T-cell leukemia/lymphoma cells. **Leukemia** (in press).
4. Suehiro Y, Atsuhiko Hasegawa A, Tadafumii Iino T, Amane Sasada A, Nobukazu Watanabe N, Masao Matsuoka M, Ayako Takamori A, Ryuji Tanosaki R, Atae Utsunomiya A, Ilseung Choi I, Tetsuya Fukuda T, Osamu Miura O, Shigeo Takaishi

- S, Takanori Teshima T, Koichi Akashi K, Mari Kannagi M, Naokuni Uike N, Jun Okamura J. Clinical outcomes of a novel therapeutic vaccine with Tax peptide-pulsed dendritic cells for adult T-cell leukemia/lymphoma in a pilot study. **Br J Haematol** (in press).
5. Niederer HA, Laydon DJ, Melamed A, Elemans M, Asquith B, Matsuoka M, Bangham CR. HTLV-1 proviral integration sites differ between asymptomatic carriers and patients with HAM/TSP. *Virology J.* 11: 172, 2014.
  6. Lavorgna A, Matsuoka M, Harhaj EW. A critical role for IL-17RB signaling in HTLV-1 Tax-induced NF- $\kappa$ B activation and T-cell transformation. *PLoS Pathogens* (in press).
  7. Cook LB, Melamed A, Niederer H, Valganon M, Laydon D, Foroni L, Taylor GP, Matsuoka M, Bangham CR. The role of HTLV-1 clonality, proviral structure and genomic integration site in adult T cell leukemia/lymphoma. *Blood*, 123: 3925-3931, 2014.
  8. Furuta RA, Ma G, Matsuoka M, Otani S, Matsukura H, Hirayama F. Re-evaluation of screening of plasma positive for human T-cell leukemia virus type 1 using a luciferase immunoprecipitation system in blood donors. *Transfusion*, (in press).
  9. Zhao, T, Satou Y and Matsuoka M. Development of T cell lymphoma in HTLV-1 bZIP factor and Tax double transgenic mice. *Arch Virol*, 159: 1849-1856, 2014.
  10. Azuma Y, Kükenshöner T, Ma G, Yasunaga JI, Imanishi M, Arndt KM, Matsuoka M, and Futaki S. Controlling leucine-zipper partner recognition in cells through modifications of a-g interactions. *Chem. Commun.* 50: 6364-6367, 2014.
  11. Tanaka-Nakanishi A, Yasunaga J-I, Takai K and Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor suppresses apoptosis by attenuating the function of FoxO3a and altering its localization. *Cancer Res*, 74:188-200, 2014.
2. 学会発表
    1. Masao Matsuoka. How Human T-cell Leukemia Virus Type 1 Causes Diseases: The 4<sup>th</sup> International Symposium on Carcinogenic Spiral Infection, Immunity, and Cancer, Keio Plaza Hotel Sapporo, Japan, February 10-11, 2014.
    2. 松岡雅雄: HTLV-1 感染が仕掛ける巧妙な罠: HBZ タンパク質: 成人 T 細胞白血病 (ATL) と原因ウイルス (HTLV-1) 「ATL 細胞の培養から始まった HTLV-1 研究: ATL シンポジウム、高新文化ホール(高知)、2014 年 5 月 24 日
  3. Masao Matsuoka. Mechanism of leukemogenesis by human T-cell leukemia virus type 1: The 12<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Society of Medical Oncology. Fukuoka Sunpalace, Japan, July 17-19, 2014.
  4. 安永純一郎、園直希、馬広勇、萩谷啓太、松岡雅雄: 宿主 F-box タンパク質 FBXL11 は Tax と HBZ のユビキチン化を誘導し機能を活性化する: 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京大学医科学研究所 1 号館講堂 (東京)、2014 年 8 月 22 日-24 日
  5. 栗林和華子、水上拓郎、滝澤和也、倉光球、浅田善久、岩間厚志、松岡雅雄、濱口功: HTLV-1 モデルマウスである HBZ-Tg マウスにおける癌幹細胞の同定と機能解析: 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京大学医科学研究所 1 号館講堂 (東京)、2014 年 8 月 22 日-24 日
  6. 三田上侑生、安永純一郎、大島孝一、松岡雅雄: HTLV-1 bZIP factor が惹起する炎症には IFN $\gamma$  が重要な役割を果たす: 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京大学医科学研究所 1 号館講堂 (東京)、2014 年 8 月 22 日-24 日
  7. Guangyong Ma, Jun-ichiro Yasunaga, Masao Matsuoka. TCF1/LEF1 are T-cell natural HTLV-1 Tax antagonists that restrict viral expansion in thymus. The 1<sup>st</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of HTLV-1 and Associated Diseases. The Institute of Medical Science, Tokyo University, Japan, August 22<sup>nd</sup>-24<sup>th</sup>, 2014.
  8. 松岡雅雄: HTLV-1 による発がん機構: 第 73 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜 (神奈川)、2014 年 9 月 25 日-27 日
  9. 川月章弘、安永純一郎、松岡雅雄: HTLV-1 bZIP factor (HBZ) は Rb タンパクと相互作用し、E2F-1/Rb 経路を改変する: 第 73 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜 (神奈川)、2014 年 9 月 25 日-27 日
  10. 安永純一郎、松岡雅雄: 転写因子 TCF1、LEF1 は HTLV-1 Tax を阻害し末梢 T リンパ球への感染指向性に関与する: 第 73 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜 (神奈川)、2014 年 9 月 25 日-27 日
  11. 三田上侑生、安永純一郎、大島孝一、松岡雅雄: HTLV-1 bZIP factor が惹起する炎症における IFN $\gamma$  の役割: 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜 (神奈川)、2014 年 11 月 10 日-11 月 12 日
  12. 菅田謙治、安永純一郎、三浦未知、明里宏文、小柳義夫、小原道法、松岡雅雄:

Anti-CCR4 抗体は Treg と感染細胞を同時に標的にする事で、STLV-1 自然感染ニホンザルでのウイルス特異的免疫反応を活性化させる:第 62 回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜 (神奈川)、2014 年 11 月 10 日-11 月 12 日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

##### 1.特許取得

HTLV-1 関連疾患の予防及び／又は治療用ワクチン (出願中)

##### 2.実用新案登録

なし

##### 3.その他



成人T細胞白血病に対する標準治療としての同種造血幹細胞移植法の確立およびゲノム解析に基づく治療法の最適化に関する研究

題名：ATLのRNA発現解析による治療標的の探索

研究分担者：加藤 光次、九州大学病院血液腫瘍内科助教

**研究要旨：**難治性といわれ続けてきた ATL も、同種移植導入や新規薬剤開発により、一部で治癒が目指せる時代になった。しかし、その予後は依然不良である。治療成績向上のための今後の課題として、適切なリスク層別化を行なうこと、そして、分子標的を探索し、新規治療法を開発することが急務である。特に、抗 CCR4 抗体の効果が乏しいとされるリンパ腫タイプに注目し、リンパ腫病変の遺伝子プロファイリング解析を通して、予後層別化と新規の治療法を探索する。

#### A. 研究目的

ATL のリンパ節病変の遺伝子プロファイリング解析から、予後層別化と新規の治療法を探索する。

#### B. 研究方法

本研究では、nCounter system(NCS)を用いて、ATL の微小環境を含めた病変の遺伝子プロファイリングを試みる。RNA 断片化により困難な PCR 反応に依らない方法で直接 RNA 定量が可能な NCS は、formalin-fixed paraffin embedded tissue (FFPE)を用いた研究に極めて有用な新規核酸定量システムである。NCS を用いて、ATL リンパ節病変の腫瘍および微小環境の遺伝子プロファイリングを検討、予後層別化に有用な遺伝子を抽出する。特に、その機能が未だ解明されていない long non-coding RNA(LncRNA)の探索を NCS で行ない、機能解析を試みる。あわせて、これらで抽出された遺伝子を参考に、他の T 細胞性リンパ腫病変とも比較検討することで、T 細胞リンパ腫における ATL の特殊性も検討を加える。

(倫理面への配慮)

倫理審査委員会の承諾のもと本研究を行った。

#### C. 研究結果

本研究班臨床試験でのリンパ腫検体の取り扱いにあたり、提出される FFPE から作製された未染プレパラート上の検体から抽出された RNA が抽出でき、NCS で検討できうるかを検証した。同一検体からの凍結検体、ブロック標本、未染プレパラートからそれぞれ RNA を抽出し、NCS にて約 50 遺伝子で検討したところ、各々で高い相関が見られた。前向き登録時のリンパ節検体提出および NCS 解析は、簡便な未染プレパラートで可能であることが検証できた。

現在、既存検体のリンパ節病変を用い、ATL および T 細胞性リンパ腫の NCS 解析を行ない、LncRNA を含む予後を規定する遺伝子の抽出を行っており、本研究班前向き試験での validation を行なう予定で準備を進めている。

#### D. 考察

保存状態が懸念された未染プレパラートからも NCS を用いることで、十分な遺伝子解析が可能で、既存検体や臨床試験の検体での解析に有用である。

#### E. 結論

NCS を用いた研究は、特に FFPE 検体を

用いるリンパ腫検体に有用である。

191-200

F. 健康危険情報

なし

和文書籍

G. 研究発表

1. 論文発表

英文雑誌

1. **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 Patients with Adult T Cell Leukemia/Lymphoma with Cord Blood Transplantation: A Japanese Nationwide Retrospective Survey. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014; 20: 1968-74.
2. **Kato K**, Ohno Y, Kamimura T, Kusumoto H, Tochigi T, Jinnouchi F, Kohno K, Kuriyama T, Henzan H, Takase K, Kawano I, Kadowaki M, Nawata R, Muta T, Eto T, Iawasaki H, Ohshima K, Miyamoto T, Akashi K. Long-term remission after high-dose chemotherapy followed by auto-SCT as consolidation for intravascular large B-cell lymphoma. *Bone Marrow Transplant.* 2014; 49: 1543-4.
3. Kako S, Izutsu K, **Kato K**, Kim SW, Mori T, Fukuda T, Kobayashi N, Taji H, Hashimoto H, Kondo T, Sakamaki H, Morishima Y, Kato K, Suzuki R, Suzumiya J; on behalf of the Adult Lymphoma Working Group of the Japanese Society for Hematopoietic Cell Transplantation. The role of hematopoietic stem cell transplantation for relapsed and refractory Hodgkin lymphoma. *Am J Hematol.* 2015; 90: 132-8.

和文雑誌

1. **加藤光次**: 悪性リンパ腫、成人 T 細胞性白血病／リンパ腫 (総説) . *臨床血液* 2014; 55:

1. **加藤光次**:造血幹細胞移植に伴う合併症に対して、抗凝固療法はどの程度期待できますか. P300-304, *ファーマナビゲーター-DIC* 編, 2014.

2. 学会発表

1. Shimoji S, Hashimoto D, **Kato K**, Tujigiwa H, Akashi K, Teshima T. Graft-Versus-Host Disease Targets Granulosa Cell of Ovarian Follicle and Causes Infertility after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. 2015 BMT Tandem Meeting. San Diego, CA, USA, February 11-15, 2015. (Oral, Plenary)
2. 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

成人T細胞白血病に対する標準治療としての同種造血幹細胞移植法の確立および  
ゲノム解析に基づく治療法の最適化に関する研究

題名 フローサイトメトリーによるATL細胞と免疫細胞の同時解析に関する研究

研究分担者 渡辺信和 東京大学医科学研究所 特任准教授

研究要旨：我々は成人T細胞白血病（ATL）に対する造血細胞移植の先行研究（ATL monitoring）において、フローサイトメトリー（FCM）を使用したATL細胞と制御性T細胞（Treg）の解析を行ない、移植前後のATL細胞のモニタリングに成功した。また、ATL細胞以外の正常なCD4<sup>+</sup>T細胞におけるTregフェノタイプの動態も解析したが、モガムリズマブ投与や急性GVHD発症との関連は認められなかった。

#### A. 研究目的

造血細胞移植においてATL細胞と免疫細胞をより詳細に解析するマルチカラー-FACS解析システムを確立し、移植前後における病態のモニタリングとメカニズムの解明を目指す。

#### B. 研究方法

患者の末梢血からファイコール比重遠心法で単核細胞を分離し、蛍光標識抗体で染色してフローサイトメーター（BD FACS Aria II SORP、BD社）で測定した。得られたFCSデータはFlowJoソフトウェア（TreeStar社）で解析した。

（倫理面への配慮）

国立がん研究センターをはじめとする各医療機関において、研究計画書を倫理審査委員会に提出し、審査を受けて承諾されてから研究を開始した。担当医が患者に研究計画を説明し、同意を得てから採血した。

#### C. 研究結果

ATL monitoring-01 から ATL monitoring-25 まで、計 25 名の登録があり、2013 年 5 月 14 日から 2015 年 2 月 20 日までの間に計 165 検体を

解析した。多くの症例で移植前と移植後早期の CD4 陽性細胞中に有意な頻度の ATL 細胞が検出された。それらは移植後 50 日以降は急速に減少した。ATL の再燃とは無関係に TSLC-1 陽性細胞が増加する症例がみられたが、それらの細胞は CD25 が陰性であった。

モガムリズマブの投与と、非 ATL 細胞における Treg フェノタイプ（真の Treg を含む分画）の頻度との間には、明らかな相関関係は認められなかった。

#### D. 考察

移植後 50 日以内に ATL 細胞フェノタイプが急速に減少する背景には、移植に伴う GVL 効果が影響していると考えられる。

本臨床研究では、モガムリズマブ投与群は非投与群と比較して、急性 GVHD が重症化する傾向が認められている（共同研究者からの情報）。そのため我々は、移植後における非 ATL 細胞における Treg フェノタイプ（真の Treg を含む分画）の頻度は、モガムリズマブ投与群で低下してい

るのではないかと予想していた。しかしながら、今回の解析では有意な相関は認められなかった。

その理由として、①急性 GVHD などの激しい炎症が起こる場合、Treg はそれを抑えようとして増加する可能性があること、②我々が Treg の頻度を測定しているのは末梢血であり、実際に炎症が起こっている病巣局所とは異なること、などが考えられた。

## E. 結論

TSLC-1 と CD7 を使用した ATL 細胞解析法は、ATL に対する造血細胞移植前後での ATL 細胞のモニタリングに有用であった。一方、ATL 細胞をのぞいた正常な CD4<sup>+</sup>T 細胞における Treg フェノタイプの頻度は、モガムリズマブ投与や移植後 GVHD の重症度との相関が認められなかった。急性 GVHD の重症度は、実際に炎症が起きている臓器組織から末梢血に漏れ出てくる低分子のマーカーの方が、よりよい指標となると思われる。

## F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Ishigaki T, Zaike Y, Nojima M, Kobayashi S, Ohno N, Uchimaru K, Tojo A, Nakauchi H, Watanabe N. Quantification of adult T-cell leukemia/lymphoma cells using simple four-color flow cytometry. Clin Chem Lab Med. 2014 Jul 23. pii: /j/cclm.ahead-of-print/cclm-2014-0183/cclm-2014-0183.xml. doi: 10.1515/cclm-2014-0183. [Epub ahead of print] PMID: 25060346 [PubMed - as supplied by publisher]

2) Kobayashi S, Nakano K, Watanabe E, Ishigaki T, Ohno N, Yuji K, Oyaizu N,

Asanuma S, Yamagishi M, Yamochi T, Watanabe N, Tojo A, Watanabe T, Uchimaru K. CADM1 expression and stepwise downregulation of CD7 are closely associated with clonal expansion of HTLV-I-infected cells in adult t-cell leukemia/lymphoma. Clin Cancer Res. 20(11): 2851-2861, 2014.

### 2. 総説と著書

1) 佐藤奈津子、渡辺恵理、石垣知寛、渡辺信和：BD FACS™ を用いたマルチカラー解析による ATL 患者のモニタリング (著書)、BD Science Avanzato、Vol. 9、1-8、2014。

2) 渡辺恵理、佐藤奈津子、渡辺信和：臨床への応用 -患者の病態をリアルタイムで可視化する- (著書)、直伝！フローサイトメトリー (実験医学別冊、中内啓光監修・清田純編集、羊土社)、110-121、2014。

### 3. 学会発表

1) 渡辺恵理、佐藤奈津子、末廣陽子、崔日承、末廣陽子、鶴池直邦、渡辺信和、12 カラー・フローサイトメトリーによる ATL に対する樹状細胞療法後の ATL 細胞と免疫細胞の同時解析、第 76 回日本血液学会、ポスター発表、2014 年 11 月 1 日 (大阪国際会議場、大阪)

2) Tomohiro Ishigaki, Seiichiro Kobayashi, Nobuhiro Ohno, Yasunori Ota, Nobukazu Watanabe, Arinobu Tojo, Hiromitsu Nakauchi, Kaoru Uchimaru, Establishment of a stroma-dependent ATL cell-line and analysis of its proliferation in vivo. Oral, The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Nov 1, 2014, Osaka.

3) 佐藤奈津子、渡辺信和、渡辺恵理、崔日承、鶴池直邦、キメリズム解析・HLA-Flow 法による臍帯血移植後の生着、ATL 細胞、および ATL 細胞の HLA クラス I 欠失の解析、第 1 回日本 HTLV-1 学会、口頭発表、2014 年 8 月 24 日 (東京大学医科学研究所、東京)

4) 石垣智寛、小林誠一郎、大野伸広、中野