

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：37104
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K08751
研究課題名(和文) PTCL-NOSにおけるTERT promoter 遺伝子変異の検索

研究課題名(英文) TERT promoter gene mutations in PTCL-NOS

研究代表者

荒川 文子 (Arakawa, Fumiko)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：50212618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)についてT細胞リンパ腫でのpromoter変異、タンパク発現頻度、また病態への影響について検討した。末梢性T細胞リンパ腫、非特定(PTCL-NOS)、血管免疫芽球性T細胞リンパ腫(AITL)で、hTERTプロモーターの遺伝子解析で、PTCL-NOS 2例のみ遺伝子変異があり、1例(既存の変異)はタンパク発現もしていたが、残りの1例(新規部位)は、タンパク発現はしていなかった。hTERT promoter の変異は、直接的に発現には関わっていないようである。統計解析を行うとhTERT 発現PTCL-NOSのみ、有意に予後不良であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

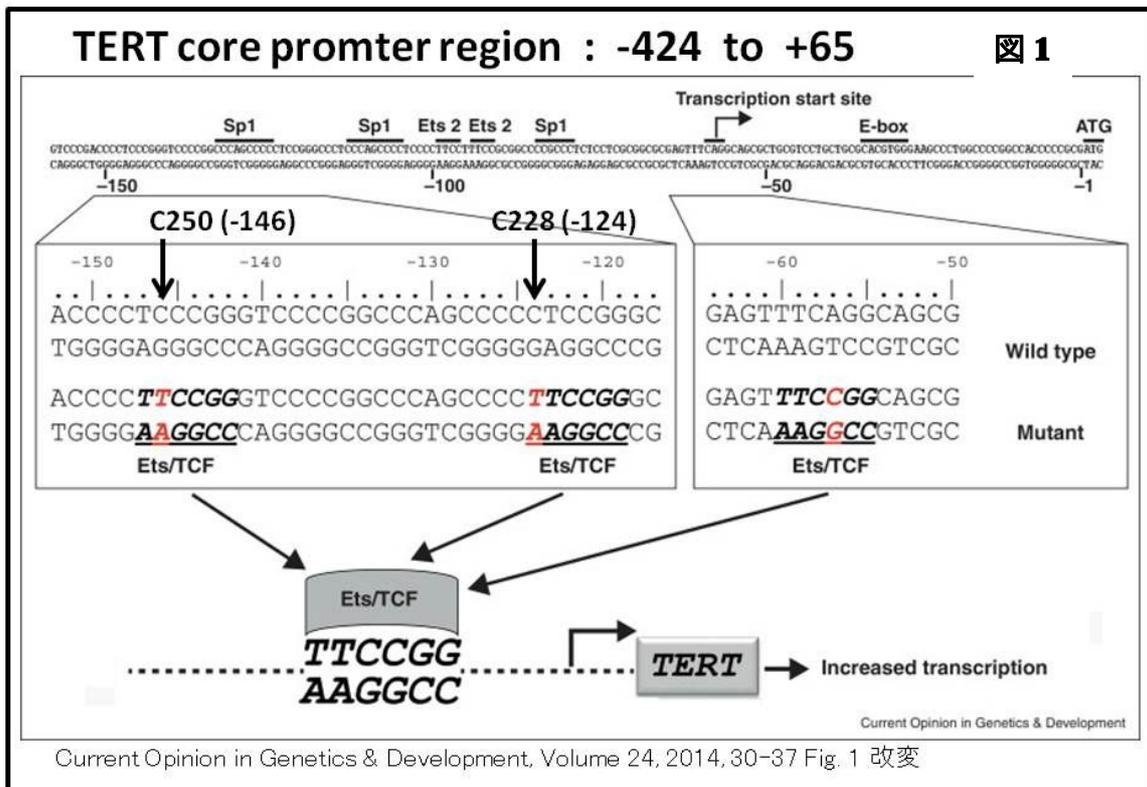
悪性リンパ腫はリンパ球(主にB細胞、T細胞由来)が癌化したものである。末梢性T細胞リンパ腫、非特定(PTCL-NOS)、血管免疫芽球性T細胞リンパ腫(AITL)は極めて多様性に富む疾患である。hTERTとの関連性は、ほとんど調べられていない。今回、PTCL-NOSで、hTERTタンパクを発現しているT細胞リンパ腫が予後不良であったことは、予後の層別化を行うことが可能となり、今後、そのようなPTCL-NOSに対して何らかの新しい治療法に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of human telomerase reverse transcriptase (hTERT), which is closely related to telomerase activity, on the promoter mutation, protein expression frequency, and pathology in T-cell lymphoma. Gene analysis of the hTERT promoter was performed in peripheral T-cell lymphoma, nonspecific (PTCL-NOS), and angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL), which are common in T-cell lymphoma. Only 2 cases of PTCL-NOS had a gene mutation, and 1 case (known mutation site) also expressed protein, but the remaining 1 case (new site) did not express protein. The mutation of hTERT promoter does not seem to be directly related to its expression. A statistical analysis of protein expression revealed that only hTERT-expressing PTCL-NOS had a significantly poor prognosis.

研究分野：分子生物学

キーワード：リンパ腫 hTERT hTERT promoter PTCL-NOS

1. 研究開始当初の背景



テロメラーゼ活性は、発生と発癌に基本的に重要な役割を持っている。そのテロメラーゼ活性は、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) の発現に強く依存している。Human telomerase reverse transcriptase (TERT) 遺伝子の promoter 領域 (上図) には、主な遺伝子変異個所として、C>T (C228T) と C>T (C250T) が、存在する。これらの変異が E-twenty six/ternary complex factors (Ets/TCF) の新たな結合部位となり、結果、腫瘍特異的な TERT 発現増加を引き起こすと考えられている (Heidenreich, *et al.*, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2014, 24:30-37) (図1)。他にも、hTERT 発現に関わる数種の制御機構が、報告されている (Pestana, *et al.*, *J. Mol. Endocrinol.*, 2017, 58, R129-R146)。

悪性リンパ腫はリンパ球 (主に B 細胞、T 細胞由来) が癌化したものと考えられている。その中の約 25% を占める成熟 T および NK 細胞リンパ腫は、極めて多様性に富む疾患群であり WHO 分類では 20 の病型がある。世界的に頻度の高い病型は、末梢性 T 細胞リンパ腫、非特定 (peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified: PTCL-NOS)、血管免疫芽球形 T 細胞リンパ腫 (angioimmunoblastic T-cell lymphoma: AITL)、未分化大細胞型リンパ腫 (anaplastic large cell lymphoma: ALCL), ALK 陽性、ALK 陰性 ALCL である。

ヒトの悪性腫瘍の大部分 (最大 90%) において hTERT 発現とテロメラーゼ活性は、広く検出される。しかし、hTERT プロモーターの突然変異率は、種々のヒト悪性腫瘍によって大きく異なる。その変異は、膀胱癌、腎盂癌、甲状腺癌、肝細胞癌、悪性神経膠芽腫および黒色腫で最も頻繁に発生し、血液腫瘍、前立腺癌、胃腸癌、乳癌、肺癌にはまれにしか存在しない (Heidenreich, *et al.*, 2014, Pestana, *et al.*, 2017, Leao, *et al.*, *J. Biomed. Sci.*, 2018, 25:22)。

悪性リンパ腫での TERT promoter 遺伝子変異検索は、ほとんどなされていないが、その変異を持つ mantle cell lymphoma においては高い hTERT 転写活性との関連性が示唆された。 (Panero *et al.*, *Am. J. Hematol.*, 2016, 91, 481-485)。T-cell リンパ腫では、hTERT promoter の変異についてあまり調べられていない。また、ATLL では、TERT promoter 変異は、調べられていないが、HTLV-1 HBZ と JunD が、協調して hTERT 転写活性を上げ、癌化の進展に寄与しているという報告 (Kuhlmann *et al.*, *Retrovirology*, 2007, 4:92) がある。

一方 網羅的ゲノム解析技術や次世代シーケンサーによって得られたゲノム変異の知見が蓄

積され、悪性リンパ腫の発症・進展のメカニズムが次第に明らかになり、悪性リンパ腫の多様な病態の解明が進んでいる。新WHO分類では、リンパ腫細胞を免疫学的、分子生物学的に分類するため、遺伝子検査は必須の検査項目となっており、LPLでは、MyD88遺伝子変異、AITL、Th由来PTCL-NOSでは、RhoA遺伝子変異がある。

遺伝子変異解析では、組織サンプル（FFPE切片組織を含む）からDNA抽出を行い、次に、目的遺伝子をPCRで増幅し、direct sequenceを行って、遺伝子変異を同定する。塩基配列によっては、変異があるかどうか判別不能の場合もある。最近では、Real time PCR のmelting curveを利用した新しい遺伝子変異解析法が出てきており、一度に多量のサンプルを解析できるようになってきている。その一つにPCR産物の融解温度を利用する方法の一つに、HRM法（High Resolution Melting、高感度融解温度曲線解析）がある。

2．研究の目的

今回、本研究の対象にしているPTCL-NOSは、WHO 分類でいずれの病型にも分類されない、節性、節外性の成熟T細胞リンパ腫から構成される病型で、不均一な疾患集団である。EBVと HTLV-1が関連しないが、一部のPTCL-NOS が、ATLLと形態的に区別のつかないリンパ腫が存在している。Nakagawa, Ohshima, Seto, *et al.*, Clin Cancer Res., 2009, 15, 30-38)。また、ATLLでは、TERT promoter 変異は、調べられてないが、HTLV-1感染により、HTLV-1 HBZとJunD が、協調してhTERT転写活性を上げ、癌化の進展に寄与している（Kuhlmann *et al.*, 2007）。

本研究ではT細胞リンパ腫においてTERT promoter変異およびhTERTの発現がどれくらいの頻度で見られ、病態にどのような影響を与えているかについて検討を行う事を目的とした。

3．研究の方法

予後検索がされている PTCL-NOS、および対象として AITL サンプルについて TERT promoter 遺伝子変異を、direct sequence や Real time PCR の melting curve を利用した新しい遺伝子変異解析法(HRM 法)で検索する。 PTCL-NOS、AITL のそれぞれの Tissue microarray slide を用いて hTERT の発現を免疫染色で調べ、TERT promoter に遺伝子変異状態と比較する。また、hTERT 発現と予後との関係を統計解析する。特に ATLL 様 PTCL-NOS の TERT promoter 遺伝子解析、hTERT 活性などの解析を行い、hTERT と ATLL 様 PTCL-NOS との関連性を調べる。

4．研究成果

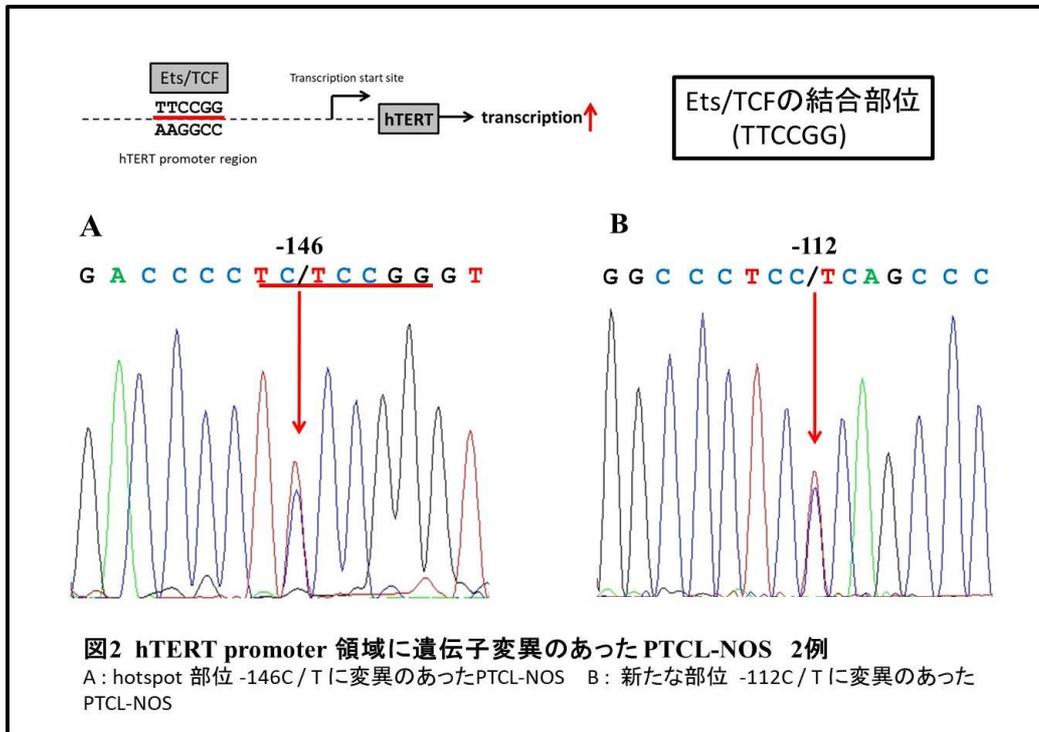
(1) hTERT promoter 領域の遺伝子変異の解析

TERT promoter 変異の hotspot である ATG 開始コドンから 5' 上流位置 -124 および -146 部位を含む領域で PCR を行った。PCR 産物は 193 bp で、使用した primer 配列は、以下のものである：TERT-P-FW、5'-caccgtcctgccccttcaccttcc-3' TERT-RV、5'-ggcttcccacgtgcgagcagga-3' (Liu, *et al.*, Endocri. Relat. Cancer, 2014, 21, 427-434)。増幅 PCR 産物は、ExoSAP-IT または、ExoSAP-IT Express (Applied Biosystem) で、cleanup され、Direct sequence を行った。

予後の分かった PTCL-NOS 40 例と AITL 21 例の精製 DNA を用いて、TERT promoter 領域の Sequence 解析を行った。PTCL-NOS の 2 例のみで、ヘテロ変異を検出した。1 例は、hotspot である -146 部位 C/T 変異で、Ets/TCF の新たな結合部位に相当した。残りひとつは、-112 部位に C/T 変異があったが、Ets/TCF の新たな結合部位配列ではなかった (図 2)。

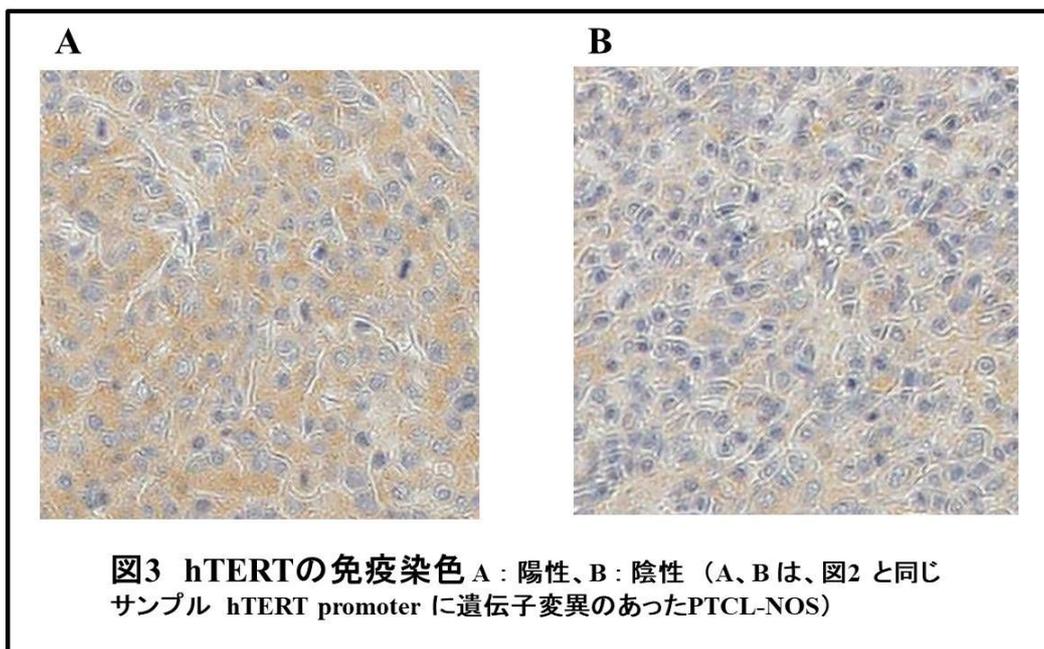
Real time PCR の melting curve を利用した HRM 法での TERT promoter 領域の遺伝子変異解析法の確立を進めていたが、promoter 領域には、塩基配列 G、C が多いため、また 2 か所の hotspot を含む領域では、解離温度 T_m 値 (約 90、通常 70 前後) が高すぎ、Melting Curve で、遺

伝子変異の差異がはっきりせず、系の確立には至らなかった。



(2) hTERT タンパクの発現解析

Tissue microarray (TMA) slide を使用して、免疫染色で、hTERT タンパク発現解析を行った。PTCL-NOS は 73 例、AITL は、49 例、どちらも、Sequence 解析を行った、PTCL-NOS 40 例、AITL 21 例を含んでいる。また、tissue 組織での hTERT 免疫染色の報告があまりない ATLL TMA slide (78 例) も解析した。抗体は、hTERT aa1100-1200 (C-端) を免疫源とした Rabbit monoclonal 抗体 [Y182] (Abcam, Cambridge, MA, USA) を使用した。30% 以上免疫染色されたものを、陽性とした (図 3)。



PTCL-NOS では、73 例中 8 例、AITL では、49 例中 15 例が陽性だった。ATLL では、78 例中 4 例が弱陽性、4 例が陽性だった。

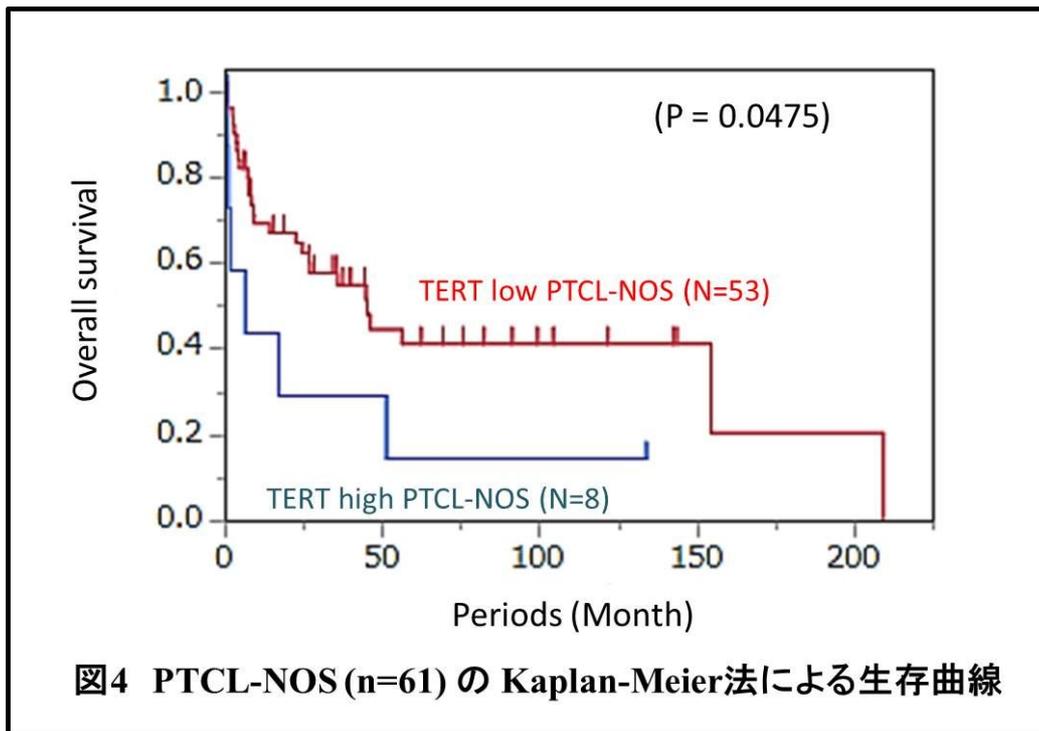
hTERT promoter 領域に変異のあったPTCL-NOS 2例では、hotspot-146部位C/T変異で、hTERT

タンパク発現も陽性であった。新たなEts/TCF結合部位によるhTERT発現増強によるものかもしれない。また、このサンプルでは、CCR4のC-端にもmutationがあった。ATLLの約90%がsurface CCR4を発現している事とも共通点を持ち、ATLLと形態の区別がつかない癌化過程を経るPTCL-NOSであるかもしれない。このようなPTCL-NOSでは、mogamulizumab(抗CCR4抗体)でのcytotoxic効果が期待できる(Yoshida, Seto, Ohshima, *et.al.*, J. Pathol., 2016; 238, 621-626)。一方、-112部位にC/T変異があったPTCL-NOSは、hTERTタンパク発現はしていなかった。hTERT promoter領域に変異はなくとも、PTCL-NOS 7例、AITL 15例が、タンパク発現をしていた。

ATLLでは、HTLV-1 HBZとJunDが、協調してhTERT転写活性を上げ、癌化の進展に寄与していると報告(Kuhlmann *et al.*, 2007)されているが、今回のTMAを使用したhTERT発現では、弱陽性を含めても、10%(8/78)であった。初期段階のTAXとTAL1(T-cell acute lymphoblastic leukemia 1)因子は、hTERTを抑制することでゲノムの不安定性を指示する可能性があるが、HBZなどの因子の発現が後の段階でhTERT産生を増加させ、その結果テロメラーゼ活性が増加するモデルもある(Terme *et al.*, Leukemia, 2009, 23, 2081-2089)。このことより、ATLLでは、常時hTERTを発現していないことが示唆される。

(3) TERT発現と予後との統計解析

hTERTタンパク発現に関して、PTCL-NOS、AITL、ATLLそれぞれについて、JMP, version 10 (SAS institute, Tokyo, Japan)を用いて統計解析を行った。hTERT発現しているPTCL-NOSでのみ、有意に予後不良であった。図4にPTCL-NOSのKaplan-Meier法による生存曲線を示している(n=61、p=0.0475)。



hTERTの発現・活性化には、数種の制御機構が考えられている。hTERT promoter領域の遺伝子変異の他にも、c-MYC、NF- κ B、Wnt/B-catein signalingや、また promoter領域では、上流域のメチル化が関わっていると報告されている(Leao, *et.al.*, 2018)。

今回PTCL-NOSとAITLでのhTERT promoter領域のmutation解析を行ったが、遺伝子変異を持ち、hTERTタンパク発現と関連があったものはPTCL-NOS 1例のみで、promoter領域の変異とhTERT発現とは、関連していなかった。また、hTERT発現の陽性率も、あまり高くなかった。しかし、PTCL-NOSのhTERT発現は、統計解析で予後不良であることが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawano N, Yoshida N, Kawano S, Arakawa F, Miyoshi H, Yamada K, Nakashima K, Yoshida S, Kuriyama T, Tochigi T, Nakaïke T, Shimokawa T, Yamashita K, Marutsuka K, Mashiba K, Kikuchi I, Ohshima K.	4. 巻 58
2. 論文標題 Clinical Features, Pathological Features, and Treatment Outcomes of 22 Patients with Aggressive Adult T-cell Leukemia-lymphoma Treated with a Humanized CCR4 Antibody (Mogamulizumab) at a Single Institution during a 6-year Period (2012-2018).	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Intern Med.	6. 最初と最後の頁 2159-2166
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.2513-18.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida N, Shigemori K, Donaldson N, Trevisani C, Cordero NA, Stevenson KE, Bu X, Arakawa F, Takeuchi M, Ohshima K, Yoda A, Ng SY, Weinstock DM.	4. 巻 135
2. 論文標題 Genomic landscape of young ATLL patients identifies frequent targetable CD28 fusions.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1467-1471
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/blood.2019001815.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	大島 孝一 (Ohshima Koichi) (50203766)	久留米大学・医学部・教授 (37104)	
研究分担者	瀬戸 加大 (Seto Masao) (80154665)	久留米大学・医学部・客員教授 (37104)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	三好 寛明 (Miyoshi Hiroaki)	久留米大学・医学部・准教授 (37104)	