

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：平成 19 年度 ～ 平成 20 年度  
 課題番号：195 91117  
 研究課題名（和文） DNA/RNA 量の網羅的解析による ATL の進展を制御する細胞遺伝子群の同定

研究課題名（英文） Identifying progression-associated genes in adult T-cell leukemia-lymphoma by using oligonucleotide microarrays for DNA/RNA loads.

研究代表者 塚崎邦弘 (Kunihiro Tsukasaki)  
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
 研究者番号：40 274659

## 研究成果の概要：

oligonucleotide array を用いた RNA 量と DNA 量の網羅的解析により、成人 T 細胞白血病・リンパ腫（ATL）の発症/進展に関連する細胞遺伝子群を抽出するために、以下の検体のデータを用いた。すなわち、3 例のヒト T リンパ球好性ウイルス 型非感染健康人の 6 検体（PHA 刺激あり/なし）、19 例の慢性型 ATL と 22 例の急性型 ATL についての array 発現データと、9 例の慢性型 ATL と 15 例の急性型 ATL についての SNP array による約 100Kb レベルの aneuploidy データを、それぞれ純化した CD4 陽性細胞を用いて既に得たものである。健康人より慢性型 ATL で高発現であり、さらに急性型 ATL で高まっている遺伝子に着目し、ポリコムグループ（PcG）分子群とチロシンキナーゼ型受容体 c-Met を解析した。

PcG による転写制御には、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）の関与も報告されているのでアレイでの HDAC の発現についても検討したところ、慢性型と比較して急性型 ATL で発現の亢進を認めたので、HDAC 阻害剤の ATL に対する開発応用も検討している。

c-Met の発現が急性型で高まっているのに加えて、そのリガンドである肝細胞増殖因子（HGF）の血漿中濃度も同型で高値であった。c-Met は急性型 ATL のプライマリー細胞に特異的に発現し、患者血漿中の HGF の濃度は慢性型より急性型で有意に高値であった。ATL 細胞の培養上清では、それぞれ一部の急性型および慢性型症例で HGF およびストローマ細胞に HGF 産生を誘導する IL-6 は高値であった。急性型は、c-Met 陽性の細胞株と同様に HGF 添加時に DNA 合成と c-Met リン酸化を認めた。肝浸潤した ATL 細胞は c-Met と HGF が陽性であり隣接する間質細胞では、HGF が陽性であった。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,800,000	540,000	2,340,000
20年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：ATL、HTLV-1、網羅的解析、多段階発がん、アレイ

## 1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞白血病リンパ腫（ATL）は日本では九州地方を中心として発症する悪性度の高い CD4 陽性ヘルパー T 細胞性の白血病/悪性リンパ腫であり、全国で推定 100 万人存

在する human T-lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) キャリアのうち毎年数千人に 1 人が本疾患を発症すると考えられている。HTLV-1 の主な感染経路は母乳であり、現在母乳遮断の試みがなされつつありキャリア

数は今後減少することが期待されている。

ATL の臨床病態は多様であり高悪性度群である急性型とリンパ腫型は多剤併用療法にても治療抵抗性であり、生存期間中央値は約 8 ヶ月であるのに対し、低悪性度群である慢性型とくすぶり型は 2 年生存率が 52%、78% と高い。低悪性度群は無治療で経過観察されることが多いことから、診断から 2 年のうちに慢性型の 5 割、くすぶり型の 2 割程度が急性転化し、死亡していると推測される。

1980 年に報告された HTLV-1 と ATL の関連の発見は、レトロウイルスによるヒト発癌という新たな発癌メカニズムを提示した。その後臨床的には、ATL の病態の多様性の解明と HTLV-1 の関連した新たな炎症性疾患群の発見が、また基礎的には、HTLV-1 の Tax によるウイルスおよび宿主細胞遺伝子の活性化メカニズムの解明などがなされてきた。しかし患者体内で ATL 細胞の大多数は Tax を発現しておらず、ATL の発癌機構の多くは未解明である。しかし近年、ATL 細胞では宿主ゲノムのうちがん遺伝子、がん抑制遺伝子などの異常が蓄積していることが明らかとなっている。

## 2 . 研究の目的

oligonucleotide array を用い、健常人、低悪性度 ATL と高悪性度 ATL 細胞での約 30000 の遺伝子の発現プロファイルと 100kb レベルでの aneuploidy プロファイルを解析する。この網羅的解析でピックアップした遺伝子群をキャリアの HTLV-1 感染細胞、低悪性度と高悪性度 ATL 細胞でさらに比較し重要なものをセレクトした後に ATL 細胞株と primary ATL 細胞で機能解析することにより、ATL の病型進展に関与する細胞遺伝子を同定する。

## 3 . 研究の方法

献上 HTLV-1 キャリア/ATL 患者検体と ATL クローン由来の細胞株を用いた。

oligonucleotide array を用いた RNA 量と DNA 量の網羅的解析により、ATL の発症/進展に関連しうる細胞遺伝子群を抽出する多数例の低悪性度 ATL と高悪性度 ATL 症例検体を用いて、抽出した ATL の発症/進展に関連しうる個々の細胞遺伝子の aneuploidy と発現の差につき両群間で比較する。健常 HTLV-1 キャリアについては HTLV-1 感染細胞のコロニー形成法で検討した。

ATL の発症/進展に関連しうる遺伝子の機能を、ATL 細胞株と primary ATLL 細胞で解析した。

ヒトリンパ系腫瘍検体及び細胞株における ATL 病型進展に関連した遺伝子を解析した。

## 4 . 研究成果

健常人より慢性型 ATL で高発現であり、さらに急性型 ATL で高まっている遺伝子に着目し、ポリコムグループ (PcG) 分子群とチロシンキナーゼ型受容体 c-Met を解析した。

PcG による転写制御には、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の関与も報告されているのでアレイでの HDAC の発現についても検討した。HDAC1 と HDAC2 は、慢性型と比較して急性型 ATL で発現の亢進を認めたので、HDAC 阻害剤の ATL に対する開発応用も検討している。

c-Met の発現が急性型で高まっているのに加えて、そのリガンドである肝細胞増殖因子 (HGF) の血漿中濃度も同型で高値であったので、c-Met、HGF、および間質細胞に HGF 産生を誘導するインターロイキン (IL)-6 について、プライマリー ATL 細胞、ATL 剖検肝組織、ATL 細胞株を解析した。c-Met は急性型に特異的に発現し、患者血漿中の HGF の濃度は慢性型より急性型で有意に高値であった。ATL 細胞の培養上清では、それぞれ一部の急性型および慢性型症例で HGF およびストローマ細胞に HGF 産生を誘導する IL-6 は高値であった。急性型は、c-Met 陽性の細胞株と同様に HGF 添加時に DNA 合成と c-Met リン酸化を認めた。肝浸潤した ATL 細胞は c-Met と HGF が陽性であり隣接する間質細胞では、HGF が陽性であった。HGF/c-Met 系は、ATL 治療の分子標的となる可能性がある。

## 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 8 件)

1) Hasegawa H, Yamada Y, Komiyama K, Hayashi M, Ishibashi M, Sunazuka T, Izuhara T, Sugahara K, Tsuruda K, Masuda M, Takasu N, Tsukasaki K, Tomonaga M, Kamihira S, A novel natural compound, a cycloanthranilylproline derivative (Fuligocandin B), sensitizes leukemia cells to apoptosis induced by tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) through 15-deoxy-Delta 12, 14 prostaglandin J2 production, Blood, 110, 1664-74, 2007, (査読あり)

2) Tsukasaki K, Utsunomiya A, Fukuda H, Shibata T, Fukushima T, Takatsuka Y, Ikeda S, Masuda M, Nagoshi H, Ueda R,

Tamura K, Sano M, Momita S, Yamaguchi K, Kawano F, Hanada S, Tobinai K, Shimoyama M, Hotta T, Tomonaga M, Japan Clinical Oncology Group Study JCOG9801. VCAP-AMP-VECP compared with biweekly CHOP for adult T-cell leukemia-lymphoma: Japan Clinical Oncology Group Study JCOG9801, J Clin Oncol, 25, 5458-64, 2008 (査読あり)

3) Usui T, Yanagihara K, Tsukasaki K, Murata K, Hasegawa H, Yamada Y, Kamihira S, Characteristic expression of HTLV-1 basic zipper factor (HBZ) transcripts in HTLV-1 provirus-positive cells. Retrovirology, 22, 34, 1-11, 2008, 4.04 Abe M, Uchihashi K, Kazuto T, Osaka A, Yanagihara K, Tsukasaki K, Hasegawa H, Yamada Y, Kamihira S, Foxp3 expression on normal and leukemic CD4(+)CD25(+) T cells implicated in human T-cell leukemia virus type-1 is inconsistent with Treg cells, Eur J Haematol, Jul 7. [Epub ahead of print], 2008 (査読あり)

4) Onimaru Y, Tsukasaki K, Murata K, Imaizumi Y, Choi YL, Hasegawa H, Sugahara K, Yamada Y, Hayashi T, Nakashima M, Taguchi T, Mano H, Kamihira S, Tomonaga M. Autocrine and/or paracrine growth of aggressive ATLL cells caused by HGF and c-Met, Int J Oncol, 33, 697-703, 2008 (査読あり)

5) Nagai K, Jinnai I, Hata T, Usui T, Sasaki D, Tsukasaki K, Sugahara K, Hishikawa Y, Yamada Y, Tanaka Y, Koji T, Mano H, Kamihira S, Tomonaga M. Adhesion-dependent growth of primary adult T cell leukemia cells with down-regulation of HTLV-I p40Tax protein: a novel in vitro model of the growth of acute ATL cells, Int J Hematol, 88, 551-564, 2008 (査読あり)

6) Kamihira S, Terada C, Sasaki D, Yanagihara K, Tsukasaki K, Hasegawa H, Yamada Y. Aberrant p53 protein expression and function in a panel of hematopoietic cell lines with different p53 mutations, Eur J Haematol, 2009 Apr;82(4):301-7. Epub Jan 29. 2009(査読あり)

7) Tsukasaki K, Olivier Hermine, Ali Bazarbachi, Lee Ratner, Juan Carlos Ramos, William Harrington Jr, Deirdre O'Mahony, John Janik, Achiléa L.

Bittencourt, Graham P Taylor, Kazunari Yamaguchi, Atae Utsunomiya, Kensei Tobinai, Toshiki Watanabe, Definition, Prognostic Factors, Treatment and Response Criteria of Adult T-cell Leukemia-Lymphoma: A Proposal from an International Consensus Meeting, J Clin Oncol, 27, 453-9, 2009 (査読あり)

8) 今泉芳孝, 塚崎邦弘, 成人T細胞白血病リンパ腫(ATLL)の予後と分子病態, 臨床血液, 49, 147-152, 2008 (査読あり)

[学会発表](計7件)

1) Tsukasaki K, Atae Utsunomiya, Haruhiko Fukuda, Masato Masuda, Yasuaki Yamada, Kensei Tobinai, Masao Tomonaga, Masanori Shimoyama, Tomomitsu Hotta, Clinical Trials for the treatment of adult T-cell leukemia/lymphoma by the Japan Clinical Oncology Group, 13th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, Hakone, Japan, 2007, 51, 2007

2) Tsukasaki K, K. Tobinai, K. Yamamoto, N. Uike, A. Utsunomiya, K. Uozumi, M. Tomonaga, K. Matsushima, K. Shitara, S. Akinaga, R. Ueda, PHASE I STUDY OF KW-0761, A HUMANIZED ANTI-CCR4 ANTIBODY, IN PATIENTS WITH RELAPSED ADULT T-CELL LEUKEMIA-LYMPHOMA (ATL) AND PERIPHERAL T-CELL LYMPHOMA (PTCL), 9th International Conference on Malignant Lymphoma, Lugano, 2008, Annals of Oncology, 19 (Suppl), 255, 2008

3) 塚崎邦弘, Rituximabによるびまん性大細胞型B細胞リンパ腫治療の進歩と最新の臨床試験結果, シンポジウム B細胞リンパ腫に対する抗体療法の動向, 第47回日本リンパ網内系学会総会, 日本リンパ網内系学会会誌, 兵庫, 47, 65, 2007

4) 塚崎邦弘, ATLLの予後と分子病態, 司会, 合同シンポジウム1. 悪性リンパ腫の病態・治療研究の進歩, 第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会合同総会, 横浜, 臨床血液 48, 698, 2007

5) 塚崎邦弘, Recent Advances in the Pathophysiology and Treatment of Adult T-cell Leukemia-Lymphoma, International

Sessions、Recent Progress in Malignant Lymphoma Research、第 69 回日本癌学会総会、名古屋、日本癌学会誌、19、2008

6) 塚崎邦弘、渡辺隆、吉村健一、木下朝博、鏡味良豊、伊藤国明、小椋美知則、加幡晴美、山口素子、黒澤光俊、笠井正晴、飛内賢正、鈴木孝世、薄井紀子、正木康史、末岡榮三郎、張高明、永井宏和、安藤潔、大西一功、畑裕之、吉田功、松田信、前田義治、向井清、中村栄男、大島孝一、堀田知光、下山正徳(JCOG リンパ腫グループ)、多施設共同臨床試験併合解析による末梢 T/NK 細胞リンパ腫の新たな予後予測モデル(JCOG0108A)、プレナリーセッション、第 70 回日本血液学会総会、横浜、臨床血液 48、698、2008

7) 塚崎邦弘、ATLL 診療の国際的コンセンサス形成の試みと新規治療開発、シンポジウムリンパ増殖性疾患診療の新展開、第 48 回日本リンパ網内系学会総会、日本リンパ網内系学会会誌、北海道、48、51、2008

〔図書〕(計 13 件)

1) 塚崎邦弘、成人 T 細胞白血病/リンパ腫～その白血病細胞形態の多様性～血液フロンティア、17、1622-26、2007

2) 塚崎邦弘、成人 T 細胞白血病・リンパ腫に対するこれからの治療戦略、最新医学、62、2645-54、2007

3) 塚崎邦弘、成人 T 細胞白血病の治療。総合臨床 57(4):694-701、2008

4) 塚崎邦弘、ATL 患者の治療選択に関する国際的合意形成の試み。血液・腫瘍科 56(5):535-542、2008

5) 高崎由美、塚崎邦弘、成人 T 細胞白血病/リンパ腫。病気の話、検査と技術 36(8):686-690、2008

6) 塚崎邦弘、清水和宏：【シリーズ/感染症における皮膚病変】ATL (adult T-cell leukemia-lymphoma) における皮膚病変。化学療法の領域、24、1299-1303、2008

7) 塚崎邦弘、【特集 悪性リンパ腫診療 update in 2008】免疫異常に伴う悪性リンパ腫と悪性リンパ腫に伴う免疫異常。内科、102、229-231、2008

8) 塚崎邦弘：解説：成人 T 細胞白血病・リンパ腫に対する VCAP - AMP-VECP 療法。血液・腫瘍科 57(3)、366-372、2008

9) 塚崎邦弘、What s going on, VCAP-AMP-VECP compared with biweekly CHOP for adult T-cell leukemia-lymphoma:Japan Clinical Oncology Group Study JCOG9801、Mebio Oncology 5、115-117、2008

10) 塚崎邦弘、18. 成人 T 細胞白血病/リンパ腫の治療。飛内賢正編集：よくわかる悪性リンパ腫のすべて、214-227、永井書店、大阪、2008

11) 塚崎邦弘、【B. 白血球系疾患とその他の骨髄性疾患】成人 T 細胞白血病/リンパ腫。講義録 血液・造血器疾患学。編集：小澤敬也、直江知樹、坂田洋一、192-193、メジカルレビュー、東京、2008

12) 塚崎邦弘、ATL. Cancer Treatment Navigator. 編集：中川和彦、共同編集：勝俣範之、西尾和人、畠清彦、朴成和、212-213、メディカルレビュー社、東京、2008

13) 塚崎邦弘、成人 T 細胞白血病リンパ腫。山口徹ほか編。今日の治療指針 2009、506-508、医学書院、東京、2009

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)  
なし

取得状況(計 0 件)  
なし

〔その他〕  
特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚崎邦弘

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：40274659

(2) 研究分担者

朝長万左男

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40100854

(3) 連携研究者

なし