

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390267

研究課題名（和文） ATL発症予防と治療法開発を目指すゲノム創薬戦略基盤の確立

研究課題名（英文） Pursuit of a new system for a high throughput screening of drugs to develop a new strategy of prevention and treatment of ATL

研究代表者

渡邊 俊樹 (WATANABE TOSHIKI)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：30182934

研究成果の概要（和文）：

ATL細胞の遺伝子発現プロファイル解析に基づき、ATL細胞を特徴付ける発現異常を示す指標遺伝子パネルを作製し、これらの発現動態を同時に評価するシステム（QuantiGene Plex）を用いて、薬効判定の新規な系の作成を試み基本的なシステムを確立した。その過程で、個々の遺伝子の発現レベルと感染細胞の腫瘍化との相関に有益な情報を得た。従来の手法による作用機序の解析を並行して基礎データを蓄積し、HTLV-1感染細胞特異的な作用を示唆する薬物を同定した。

研究成果の概要（英文）：

We prepared a gene panel of 12 genes that show abnormal expression levels on ATL cells based on the expression profile analyses. The expression levels of these genes were measured by QuantiGene Plex simultaneously and in a short time. The measured values were transformed into an “ATL score” by calculation base on a formula. “ATL score” was used to monitor effects of drugs against ATL cells and cell lines derived from them, although experiments using this system were limited because of the cost. In the process of establishing this system, we obtained detailed information about the expression levels of specific genes in PBMCs of HTLV-1 carriers and ATL patients, which provided information about the changes in expression levels in the course of transformation of HTLV-1-infected cells. Conventional analyses were done on some chemicals as to the effects on the ATL cell lines, which provided interesting information about the ATL-specific activities of these molecules.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2009年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2010年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：ウイルス腫瘍学

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、発現解析、薬効評価、トキシコゲノミクス、ハイスループット、イマチニブ、セフェランチン

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究開始当初より、ATL に対する新規治療法の開発と発症予防法の探索が求められており、現在も喫緊の課題である。その理由は以下のとおりである。

① ATL は化学療法耐性であり既存の治療法には限界がある。

② 100万人以上存在する HTLV-1 キャリアから毎年1300人の新規 ATL 患者が発症し、毎年約1100人が ATL で死亡している。

③ 全国共同研究組織 JSPFAD の研究により、キャリア中の ATL 発症高危険群の同定を目指す研究が進んでいた。

(2) 薬効を評価する新規なシステムの開発が求められている。従来の薬効スクリーニングは以下のいずれかの原理に基づいている。

① 指標細胞に対する細胞毒性の評価

② 指標分子との結合と機能阻害

2. 研究の目的

我々は、特定の機能分子にこだわらず、細胞レベルでの効果判定を行う上で、より鋭敏に影響を検出する手段として、遺伝子発現に対する影響を評価する系の確立を目指した。

3. 研究の方法

以下の順に研究に取り組んだ。

(1) ATL 細胞の発現プロファイルに基づく

「ATL 細胞指標遺伝子パネル」の作製

(2) QuantiGene Plex を利用したハイスループット mRNA 定量系による ATL 型遺伝子発現の測定系とスコア化方式の確立

(3) 対照薬物を用いた予備実験による系の評価

(4) 比較対照と基礎情報を得るための、既知あるいは新規薬物の ATL 細胞に対する作用の解析

(5) 細胞株および患者検体を用いた系の評価

4. 研究成果

(1) 患者検体50と年齢をそろえた正常対照群検体22を用いて、ATL 細胞の発現プロファイル解析を行った。この結果に基づき、12遺伝子よりなる「ATL 細胞指標遺伝子パネル」を作製した。

(2) この遺伝子パネルに基づいて、種々の検体を用いた定量的 RT-PCR による発現評価を行い、「ATL score」を作成する式を策定した。測定結果をこのスコアで評価する事を可能にした。この過程で、腫瘍化と非腫瘍化状態の感染細胞における発現動態の詳細な情報分析を行った。

(3) QuantiGene Plex 系を作成した。これを用いて、種々の検体を用いて予備実験を行っ

た。

(4) ATLDHMEG、セファランチン、イマチニブ等の薬物を用いて、ATL 細胞に対する作用を解析した。

(5) ATL Score 等による評価を可能にするための患者の登録と分子病態解析を進めた。

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 (全て査読あり)] (計 10 件)

- 1) Umino A, Nakagawa M, Utsunomiya A, Tsukasaki K, Taira N, Katayama N, Seto M. Clonal evolution of adult T-cell leukemia/lymphoma takes place in lymph node. **Blood** 2011. [Epub ahead of print]
- 2) Yamamoto K, Ishida T, Nakano K, Yamagishi M, Yamochi T, Tanaka Y, Furukawa Y, Nakamura Y, Watanabe T. SMYD3 interacts with HTLV-1 Tax and regulates sub-cellular localization of Tax. **Cancer Sci** 2011;102(1): 260-266.
- 3) Kamihira S, Iwanaga M, Sasaki D, Yamano Y, Okayama A, Umeki K, Kubota R, Izumo S, Yamaguchi K, Watanabe T, Satake M. Intra- and inter-laboratory Variability in HTLV-1 Proviral Load Quantification Using Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays: A Multi-Center Study. **Cancer Sci** 2010;101(11):2361-7.
- 4) Takasaki Y, Iwanaga M, Imaizumi Y, Tawara M, Joh T, Kohno T, Yamada Y, Kamihira S, Ikeda S, Miyazaki Y, Tomonaga M, Tsukasaki K. Long-term study of indolent adult T-cell leukemia-lymphoma (ATL). **Blood** 2010;115:4337-43.
- 5) Hasegawa H, Yamada Y, Iha H, Tsukasaki K, Nagai K, Atogami S, Sugahara K, Tsuruda K, Ishizaki A, Kamihira S. Activation of p53 by Nutlin-3a, an antagonist of MDM2, induces apoptosis and cellular senescence in adult T-cell leukemia cells. **Leukemia** 2009;23:2090-101.
- 6) Tsukasaki K, Hermine O, Bazarbachi A, Ratner L, Ramos CJ, Harrington Jr W, O'Mahony D, Janik J, Bittencourt AL, Taylor GP, Yamaguchi K, Utsunomiya A, Tobinai K, Watanabe T. Definition, prognostic factors, treatment and response criteria of adult T-cell leukemia-lymphoma: a proposal from an international consensus meeting. **J**

- Clin Oncol** 2009;27:453-9.
- 7) 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;82:301-7.
 - 8) 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** 2008;81:209-17.
 - 9) 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** 2008;33:697-703.
 - 10) 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** 2008;88:551-564.
- [学会発表] (計 38 件)
- 1) Cai Y, Nakano K, Yamagishi M, Matsubara A, Kagami Y, Tsutsumi A, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru K, Watanabe T, “Exploring biological significance of microRNA-451 up-regulation in ATL leukemogenesis” 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、神戸、2010 年 12 月 9 日 (2010 年 12 月 7 日～10 日)
 - 2) Asanuma S, Nakano K, Yamagishi M, Ogawa S, Yamaguchi K, Utsunomiya A, Watanabe T, “Over-expression of dominant-negative Helios isoforms in adult T-cell leukemia (ATL) cells”, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、神戸、2010 年 12 月 9 日 (2010 年 12 月 7 日～10 日)
 - 3) Umino A, Nakagawa M, Utsunomiya A, Tsukasaki K, Katayama N, Seto M, “Array Comparative Genomic Hybridization Revealed Polyclonality In Acute Type Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma and PTCL NOS”, 52nd American Society of Hematology Annual Meeting, Orlando, FL, USA, Dec. 4-7, 2010 (Blood 116 (21) :1277, 2010)
 - 4) 山岸誠、中野和民、三宅在子、加賀美弥生、包明久、宇都宮與、山口一成、内丸薫、小川誠司、渡邊俊樹、「ATL 細胞におけるエピジェネティックな異常は、miR-31 発現低下を介して NF- κ B の恒常的活性化に寄与する」、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月 8 日 (2010 年 11 月 7 日～9 日)
 - 5) Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, Kagami Y, Tsutsumi A, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru K, Watanabe T, “Loss of miR-31 links NF- κ B activation in Adult T-cell leukemia”, Viruses, Genes and Cancer-2010, Venezia, Italy, Sep. 30, 2010 (Sep. 29 - Oct.1, 2010)
 - 6) Nakano K, Ando T, Ishida T, Ohsugi T, Tanaka Y, Watanabe T, “A Novel Function of HTLV-1 Rex in Inhibition of the Host NMD, the mRNA Surveillance Mechanism”, Viruses, Genes and Cancer-2010, Venezia, Italy, Sep. 30, 2010 (Sep. 29 - Oct.1, 2010)
 - 7) Iwanaga M, Watanabe T, Utsunomiya A, Okayama A, Uchimaru K, Koh K-R, Ogata M, Kikuchi H, Sagara Y, Uozumi K, Mochizuki M, Tsukasaki K, Saburi Y, Yamamura M, Tanaka J, Moriuchi Y, Hino S, Kamihira S, Yamaguchi K, JSPFAD investigators, “HTLV-1 proviral load and the relation to disease progression in carriers: a nationwide cohort study”, 第 72 回日本血液学会学術集会、横浜、2010 年 9 月 26 日 (2010 年 9 月 24 日～26 日)
 - 8) Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, Kagami Y, Tsutsumi A, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru K, Watanabe T, “Loss of miR-31 links NF- κ B activation in adult T-cell leukemia”, 第 72 回日本血液学会学術集会、横浜、2010 年 9 月 25 日 (2010 年 9 月 24 日～26 日)
 - 9) Takasaki Y, Iwanaga M, Imaizumi Y, Tawara M, Joh T, Kohno T, Yamada Y, Kamihira S, Ikeda S, Miyazaki Y, Tomonaga M, Tsukasaki K, “Chronic / smoldering ATL: long-term follow-up and prognostic factor analysis”, 第 72 回日本血液学会学術集会、横浜、2010 年 9 月 26 日 (2010 年 9 月 24 日～26 日)
 - 10) 山岸誠、中野和民、三宅在子、加賀美弥生、包明久、宇都宮與、山口一成、内丸薫、渡邊俊樹、「ATL 細胞におけるエピジェネティックな異常による miR-31 の発現

- 低下とNF- κ B活性化機構」、第69回日本癌学会学術総会、大阪、2010年9月22日(2010年9月22日~24日)
- 11) 中野和民、松原亜以子、矢持忠徳、宇都宮與、山口一成、内丸薫、渡邊俊樹、「ATLリスク・インディケータ―遺伝子同定の試みと、ATL発症における機能解析」、第69回日本癌学会学術総会、大阪、2010年9月22日(2010年9月22日~24日)
 - 12) 浅沼里実、中野和民、山岸誠、小川誠司、山口一成、宇都宮與、渡邊俊樹、「成人T細胞白血病に置ける Helios のドミナントネガティブ型アイソフォームの過剰発現」、第69回日本癌学会学術総会、大阪、2010年9月22日(2010年9月22日~24日)
 - 13) Watanabe T, "Molecular pathogenesis of ATL", The Japanese Society of Hematology / EHA Joint Symposium (Hematology-in-Focus session), The 15th Congress of the European Hematology Association (EHA), Barcelona, Spain, June 12, 2010 (Invited talk)
 - 14) 中野和民、山岸 誠、三宅在子、加賀美弥生、包 明久、宇都宮與、山口一成、内丸 薫、渡邊俊樹、「成人T細胞白血病(ATL)患者でのmicroRNA発現異常の実態」、第50回日本リンパ網内系学会総会、新潟、2010年6月18日(2010年6月18日~19日)
 - 15) 山岸 誠、中野和民、三宅在子、矢持忠徳、加賀美弥生、包 明久、宇都宮與、山口一成、内丸 薫、渡邊俊樹、「ATL細胞におけるmiR-31発現低下によるNF- κ Bの恒常的活性化機構」、第50回日本リンパ網内系学会総会、新潟、2010年6月19日(2010年6月18日~19日)
 - 16) 中野和民、山岸 誠、三宅在子、加賀美弥生、包 明久、宇都宮與、山口一成、内丸 薫、渡邊俊樹、「ATL患者におけるmicroRNA発現異常の解析:miR-31の発現低下がNIKおよびNF- κ Bシグナル伝達系に及ぼす影響」、第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009年12月9日(2009年12月9日~12日)
 - 17) 浅沼里実、中野和民、山岸 誠、山口一成、小川誠司、宇都宮與、渡邊俊樹、「Abnormal expression patterns of a lymphoid-specific transcriptional factor Helios in adult T-cell leukemia(ATL) cells」、第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009年12月9日(2009年12月9日~12日)
 - 18) 山岸 誠、三宅在子、中野和民、加賀美弥生、包 明久、宇都宮與、山口一成、内丸 薫、渡邊俊樹、「MicroRNA Expression Profiling and Abnormal MicroRNA Expression in Adult T-Cell Leukemia」、第71回日本血液学会学術集会、京都、2009年10月23日(2009年10月23日~25日)
 - 19) 中野和民、松原亜以子、宇都宮與、山口一成、内丸 薫、渡邊俊樹、「Potential Biomarker and Risk-Indicator Genes of ATL in Gene Expression Profiling of HTLV-1 Carriers」、第71回日本血液学会学術集会、京都、2009年10月23日(2009年10月23日~25日)
 - 20) 石渡 優、矢持忠徳、山岸誠、中野和民、渡邊俊樹、「ビスコクラウリン型アルカイド製剤セファランチンによる、HTLV-1感染細胞に対する細胞毒性効果」、第68回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、2009年10月2日(2009年10月1日~3日)
 - 21) 浅沼里実、渡邊俊樹、中野和民、山岸 誠、小川誠司、山口一成、宇都宮與、「血球系特異的転写因子 Helios のATLにおける発現パターンの異常」、第68回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、2009年10月1日
 - 22) 中野和民、松原亜以子、宇都宮與、山口一成、内丸 薫、渡邊俊樹、「HTLV-1キャリアの遺伝子発現プロファイリングによる ATL バイオマーカー遺伝子とリスク・インディケータ―遺伝子同定の試み」、第68回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、2009年10月1日(2009年10月1日~3日)
 - 23) 山岸誠、黒川直也、副島あい、石田尚臣、中野和民、渡邊俊樹、「ATL、HTLV-1感染細胞における EZH2 の発現及び機能的解析」、第68回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、2009年10月1日(2009年10月1日~3日)
 - 24) 三宅在子、山岸 誠、中野和民、加賀美弥生、包 明久、宇都宮與、山口一成、内丸 薫、渡邊俊樹、「ATL患者でのマイクロアレイ技術を用いたマイクロRNA発現異常の解析」、第68回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、2009年10月2日(2009年10月1日~3日)
 - 25) 山岸 誠、中野和民、三宅在子、加賀美弥生、包 明久、宇都宮與、山口一成、内丸薫、渡邊俊樹、「ATL細胞におけるmicroRNA発現異常の解析:miR-31の発現低下とNF- κ Bシグナル伝達系に及ぼす影響」、第2回HTLV-1研究会・合同班会議、東京大学医科学研究所、2009年8月30日(2009年8月29日~30日)
 - 26) 石渡 優、矢持忠徳、山岸 誠、中野和民、渡邊俊樹、「植物アルカロイドセファランチンによる、HTLV-1感染細胞に対

- する抗腫瘍効果」、第2回 HTLV-1 研究会・合同班会議、東京大学医科学研究所、2009年8月29日～30日
- 27) 浅沼里実、渡邊俊樹、中野和民、山岸 誠、小川誠司、山口一成、宇都宮與、「成人T細胞白血病(ATL)での血球系特異的転写因子 Helios の発現異常」、第2回 HTLV-1 研究会・合同班会議、東京大学医科学研究所、2009年8月29日～30日
- 28) 塚崎邦弘：シンポジウム2「ATL と HTLV-1 研究の最前線」ATL の臨床分子病態、治療戦略. 第49回日本リンパ網内系学会総会、淡路、2009年7月10日((2009年7月9日～11日)
- 29) Iwanaga M, Watanabe T, Utsunomiya A, Uozumi K, Ogata M, Uchimaruk K, Okayama A, Koh K-R, Kamihira S, Yamaguchi K, “ Sequential Monitoring of HTLV-1 Provirus Load and Clinical Data in HTLV-1 Infected Individuals in the Joint Study on Predisposing Factors of ATL Development (JSPFAD)”, Salvador, Brazil, Jul. 4, 2009
- 30) 加賀美弥生、松原亜以子、正田桃子、岩永正子、渡辺慎哉、宇都宮與、東條有伸、山口一成、渡邊俊樹、「ATL 型発現スコアによる ATL 発症ハイリスク HTLV-1 キャリアの同定」、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、神戸、2008年12月11日(2008年12月9日～12日)
- 31) 包 明久、加賀美弥生、吉田エリカ、松原亜以子、中野和民、渡邊俊樹、「ATL 細胞及び HTLV-1 感染細胞株の miRNA プロフィール」、第67回日本癌学会学術総会、名古屋、2008年10月29日(2008年10月28日～30日)
- 32) 加賀美弥生、松原亜以子、正田桃子、渡辺慎哉、宇都宮與、東條有伸、山口一成、渡邊俊樹、「RT-PCR Array に基づく ATL-type expression score を用いた診断と ATL 発症リスク評価の検討」、第67回日本癌学会学術総会、名古屋、2008年10月30日(2008年10月28日～30日)
- 33) 山本啓裕、石田尚臣、古川洋一、田中勇悦、渡邊俊樹、「HTLV-1Tax のヒストン H3K4 メチル化酵素 SMYD3 との相互作用を介した細胞周期異存的細胞内局在変化とその機能的意義」、第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月26日(2008年10月26日～28日)
- 34) 加賀美弥生、松原亜以子、正田桃子、渡辺慎哉、宇都宮與、東條有伸、山口一成、渡邊俊樹、「遺伝子発現アレイ解析に基づく RT-PCR-Array による ATL 診断系の確立と発症予測法への応用」、第70回日本血液学会総会、京都、2008年10月12日(2008年10月10日～12日)
- 35) 山本啓裕、石田尚臣、古川洋一、田中勇悦、中村祐輔、渡邊俊樹、「HTLV-1 Tax のヒストン H3K4 メチル化酵素 SMYD3 との相互作用を介した細胞周期異存的細胞内局在変化とその機能的意義」、第1回 HTLV-1 研究会・合同班会議、東京大学医科学研究所、2008年8月23日～24日
- 36) 加賀美弥生、松原亜以子、正田桃子、中野和民、岩永正子、渡辺慎哉、宇都宮與、東條有伸、山口一成、渡邊俊樹、「ATL 型発現スコアによる ATL 発症ハイリスク HTLV-1 キャリアの同定」、第1回 HTLV-1 研究会・合同班会議、東京大学医科学研究所、2008年8月23日(2008年8月23日～24日)
- 37) 包 明久、加賀美弥生、中野和民、松原亜以子、渡邊俊樹、「ATL 細胞におけるヒト miRNA の発現プロフィール解析」、第1回 HTLV-1 研究会・合同班会議、東京大学医科学研究所、2008年8月23日～24日
- 38) 加賀美弥生、松原亜以子、正田桃子、渡辺慎哉、宇都宮與、東條有伸、山口一成、渡邊俊樹、「発現アレイ解析に基づく RT-PCR-Array を用いた ATL 診断系の確立と HTLV-1 キャリアの ATL 発症予測法の検討」、第48回日本リンパ網内系学会総会・第11回日本血液病理研究会、札幌、2008年6月13日(2008年6月13日～14日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 俊樹 (WATANABE TOSHIKI)
 東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授
 研究者番号：30182934

(2) 研究分担者

塚崎 邦弘 (TSUKASAKI KUNIHIRO)
 長崎大学・歯歯薬学総合研究科・准教授
 研究者番号：40274659

石田 尚臣 (ISHIDA TAKAOMI)
 東京大学・医科学研究所・特任准教授
 研究者番号：80293447

中野 和民 (NAKANO KAZUMI)
 東京大学・大学院新領域創成科学研究科・助教
 研究者番号：60549591