

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460437

研究課題名(和文)成人T細胞白血病・リンパ腫におけるエピジェネティック異常と発症・進展機構の解析

研究課題名(英文) Epigenetic abnormalities during onset and progression of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL)

研究代表者

岡 剛史 (Oka, Takashi)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：50160651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：成人T細胞白血病・リンパ腫(ATL)の発症機構をエピジェネティック異常の観点から患者検体・培養細胞等を用いて解析した。その結果ATLにおいてポリコーム遺伝子群PRC1.4の発現がPRC1.2に対し異常な偏りが生じている事が明らかとなった。ウイルス癌遺伝子Tax発現によるDNA異常メチル化誘発によりHTLV-1感染細胞クローンのEpigenetic状態の多様性の誘導されATLの発症・進展に重要な役割をしている事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the epigenetic mechanism of onset and progression of non-Hodgkin lymphoma as well as adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL). We found that epigenetic abnormalities including unbalanced expression of Polycomb Repressive Complex (PRC) molecules, aberrant expression of miRNA and mRNA and also aberrant DNA methylation are playing the important role in the pathogenesis of ATL. Ezh2 was strongly expressed and polycomb repressive complex PRC1.4 dominates over PRC1.2 in aggressive lymphoma variants as well as ATL. Tax protein expression induced epigenetic heterogeneity with expanding the global DNA methylation profile to generate various epigenetic clones, suggesting that Tax-mediated epigenetic clonal heterogeneity and diversity may contribute to induce leukemic transformation and more aggressive clonal progression.

研究分野：分子腫瘍ウイルス学

キーワード：ATL エピジェネティクス ポリコーム ヒストン DNAメチル化 悪性リンパ腫 マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

近年の診断・治療技術の進歩に伴い悪性リンパ腫・白血病の予後は病型によっては顕著な進歩がみられている。しかし、最近疾患概念が確立したもののなかで mantle cell lymphoma、nasal (type) NK/T cell lymphoma、adult T cell leukemia/lymphoma (ATL) はとくに病期の進んだ症例の予後は大変不良であり、このような難治性リンパ腫・白血病をどのように扱うかは焦眉の課題となってきた。mantle cell lymphoma は細胞学的には低悪性度に分類されているが病期の進んだ症例が断然多いという特徴を示す。nasal (type) NK/T cell lymphoma はとくに鼻腔に発生するものは EB ウイルスとの関連が深く、現行の抗癌剤療法に対する反応性が全く悪いという問題点がある。ATL は HTLV-I を原因ウイルスとする疾患であるが現在のところ有効な治療法が確立されていない。

このような臨床病理学的特徴がどのような分子基盤により成り立っているかを検討するために我々は DNA マイクロアレイ及び病理組織マイクロアレイを用いた解析を行い血球系特異的チロシンフォスファターゼ SHP1 遺伝子がこれらの疾患をはじめ、広範な悪性リンパ腫・白血病で大きく発現低下または消失していることを見いだした (Amer. J Pathol.(2001))。さらに SHP1 遺伝子の CpG island の DNA メチル化によるエピジェネティックな遺伝子発現抑制が高頻度にこれらの患者で観察され、極めて広範な造血器腫瘍の発症機構と密接な関係があることを発見した (Cancer Res.(2002), Lab Inv.(2003), Int. J. Med. Biol. Front 2007)。更に我々は 8 個のターゲット遺伝子を詳細に解析し、HTLV-I キャリアからくすぶり型 ATL、慢性型 ATL の発症、更に急性型及びリンパ腫型 ATL に進展する際に特異的な DNA メチル化が高頻度におこる現象を発見し、ATL において CIMP (CpG Island Methylator Phenotype) というエピジェネティックな異常が起こっており発症・進展に重要な役割を果たしていることを証明した (Ame. J Pathol 176(1); 402-415, (2010))。又

胃 MALT リンパ腫においても *H. Pylori* 菌の感染が DNA メチル化による特異的ターゲット遺伝子群の発現抑制を誘導するというエピジェネティック異常 (CIMP) を引き起こし発症に重要な役割を果たしていることを示した (Int. J. Oncol 35:547-557, 2009)。最近、同一患者の病態進展過程の検体においてクローン・レベルでエピジェネティック異常が集積しつつある状況をダイナミックに捉えることに成功している。

2. 研究の目的

成人 T 細胞白血病・リンパ腫 (ATL) の発症・進展において異常 DNA メチル化、ヒストン修飾変化、miRNA 発現、ポリコム遺伝子群、クロマチン構造変換等エピジェネティック異常が重要な役割を果たしていると考えられる。我々がマイクロアレイ法を用いて特定した ATL 発症・進展において異常 DNA メチル化による SHP1 遺伝子など特定の標的遺伝子群サイレンシングの機構をマイクロアレイ等による包括的網羅的解析及び我々が開発した DNA メチル化細胞イメージング法を用いて解析する

3. 研究の方法

本研究では、これまでの成果をふまえ、患者検体、培養細胞、動物モデル等の様々な実験系により悪性リンパ腫・白血病におけるエピジェネティック異常の発症機構について包括的網羅的解析法を駆使しながら様々な角度から総合的且つ詳細に解析する。とくに新たに開発した DNA メチル化細胞イメージング法を用いて DNA メチル化の動的変化を解析し、HTLV-I の感染がどのように異常 DNA メチル化を誘導し、ATL 発症にいたるか詳細に解析した。

4. 研究成果

成人 T 細胞白血病・リンパ腫 (ATL) の発症機構について DNA メチル化状態、miRNA、ヒストン修飾状態、ポリコム遺伝子群、クロマチン構造変換関連遺伝子群の発現等エピジェネティック異常の観点から患者検体、培養細胞を用いて解析した。その結果ヒストン修飾状態、ポリコム遺伝子群について広範な悪性リンパ腫・白血病の患者検体を用い解析し、non-Hodgkin リンパ腫に於ける発現異常プロファイルを明らかにした。更に培養細胞を用いた解析から Ezh2, Ezh1, Eed, Suz12, Bmi1 をはじめとするポリコム遺伝子群の発現異常を解析し、反応性リンパ節及び正常末梢血単核球に於いて PRC1.4 が PRC1.2 とほぼ同等にバランスを保ち発現調節されているのに対し ATL をはじめ各種の悪性リンパ腫に於いて

PRC1.4の発現はPRC1.2の発現に対し大きな偏りが生じていることが明らかとなった。

HTLV-Iウイルス遺伝子発現のON/OFFがコントロールできる実験系において生きた細胞のDNAメチル化レベルを定量的に計測するシステムの開発を試み成功した。FACSを用いた細胞周期解析方法の応用により細胞周期変動に応じたDNAメチル化レベルの変動を検出した。さらにウイルス遺伝子発現ONとOFFの状況になった細胞のDNAメチル化レベルの変動パターンとウイルス遺伝子発現を比較した結果global methylationのパターンが大きく変化することが明らかとなった。更にウイルス遺伝子発現ONのあとに誘導されるglobal methylationのパターンの変化には細胞間に個性があることが明らかとなった。このことはウイルス感染とそれに伴うウイルス癌遺伝子の発現はEpigeneticな多様性を誘導する機構が存在する事を示しており、ウイルス癌遺伝子発現によるHTLV-I 感染細胞クローンのEpigenetic多様性の誘導がATLの発症・進展に重要な役割をしている事が示唆された。

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](計 12 件)

1. I Murakami, Y Oh, A Morimoto, H Sano, S Kanzaki, M Matsushita, T Iwasaki, S Kuwamoto, M Kato, K Nagata, K Hayashi, S Imashuku, J Gogusev, F Jaubert, T Oka and T. Yoshino, Acute-phase ITIH4 levels distinguish multi-system from single-system Langerhans cell histiocytosis via plasma. *Peptidomics. Clinical Proteomics* (2015) 12:16-23 査読有
2. Murakami I, Matsushita M, Iwasaki T, Kuwamoto S, Kato M, Nagata K, Horie Y, Hayashi K, Imamura T, Morimoto A, Imashuku S, Gogusev J, Jaubert F, Takata K, Oka T, Yoshino T. Interleukin-1 loop model for pathogenesis of Langerhans cell histiocytosis. *Cell Communication and Signaling*. 2015,13:13-28, doi:10.1186/s12964-015-0092-z, 査読有
3. Murakami I, Gogusev J, Jaubert F, Matsushita M, Hayashi K, Miura I, Tanaka T, Oka T, Yoshino T. Establishment of a Langerhans cell histiocytosis lesion cell line with dermal dendritic cell characteristics. *Oncol Rep*. 2015 Jan;33(1):171-8. 査読有
4. Ichiro Murakami, Michiko Matsushita, Takeshi Iwasaki, Satoshi Kuwamoto, Masako Kato, Yasushi Horie, Kazuhiko Hayashi, Jean Gogusev, Francis Jaubert, Shu Nakamoto, Mitsunori Yamakawa, Hirokazu Nakamine, Katsuyoshi Takata, Takashi Oka and Tadashi Yoshino High viral load of Merkel cell polyomavirus DNA sequences in Langerhans cell sarcoma tissues *Infectious Agents and Cancer* 2014,9:15-18 doi:10.1186/1750-9378-9-15, 査読有
5. Fujita H, Yamamoto M, Ogino T, Kobuchi H, Ohmoto N, Aoyama E, Oka T, Nakanishi T, Inoue K, Sasaki J. Necrotic and apoptotic cells serve as nuclei for calcification on osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells in vitro. *Cell Biochem Funct*. 2014 Jan;32(1):77-86. doi: 10.1002/cbf.2974. Epub 2013 May 8. 査読有
6. Murakami I, Matsushita M, Iwasaki T, Kuwamoto S, Kato M, Horie Y, Hayashi K, Imamura T, Morimoto A, Imashuku S, Gogusev J, Jaubert F, Takata K, Oka T, Yoshino T. Merkel cell polyomavirus DNA sequences in peripheral blood and tissues from patients with Langerhans cell histiocytosis. *Hum Pathol* 2014 Jan;45(1):119-26. doi: 10.1016 査読有
7. Miyata-Takata T, Takata K, Yamanouchi S, Sato Y, Harada M, Oka T, Tanaka T, Maeda Y, Tanimoto M, Yoshino T. Detection of T-cell receptor gene rearrangement in paraffin-embedded T or natural killer/T-cell lymphoma samples using the BIOMED-2 protocol. *Leuk Lymphoma*. 2014, Sep;55(9):2161-4. doi: 10.3109/10428194.2013.871634. 査読有
8. Tsuge M, Oka T, Yamashita N, Saito Y, Fujii Y, Nagaoka Y, Yashiro M, Tsukahara H, Morishima T. Gene expression analysis in children with complex seizures due to influenza A(H1N1)pdm09 or rotavirus gastroenteritis, *J Neurovirool*. 2014 Feb;20(1):73-84. doi: 10.1007/s13365-013-0231-5. Epub 2014 Jan 24. 査読有

9. Yamashita N, Tsukahara H, Tsuge M, Nagaoka Y, Yashiro M, Saito Y, Fujii Y, Oka T, Morishima T. Pathogenic mechanisms of influenza A(H1N1)pdm09 infection elucidated on gene expression profiling. *Pediatr Int*. 2013 Oct;55(5):572-7. doi: 10.1111/ped.12139. Epub 2013 Jul 30. 査読有
10. Lamia Abd Al Kader, Takashi Oka, Katsuyoshi Takata, Xu Sun, Hiaki Sato, Ichiro Murakami, Tomohiro Toji, Akihiro Manabe, Hiroshi Kimura, Tadashi Yoshino. In aggressive variants of non-Hodgkin lymphomas, Ezh2 is strongly expressed and polycomb repressive complex PRC1.4 dominates over PRC1.2, *Virchows Arch* 2013 Nov;463(5):697-711. doi: 10.1007/s00428-013-1428-y. Epub 2013 Aug 16. 査読有
11. Takata K, Sato Y, Nakamura N, Tokunaka M, Miki Y, Yukie Kikuti Y, Igarashi K, Ito E, Harigae H, Kato S, Hayashi E, Oka T, Hoshii Y, Tari A, Okada H, Al-Kader LA, Maeda Y, Tanimoto M, Kinoshita T, Yoshino T., Duodenal follicular lymphoma lacks AID but expresses BACH2 and has memory B-cell characteristics. *Modern Pathology* 2013, 26(1):22-31, doi: 10.1038/modpathol.2012.127. 査読有
12. Murakami I, Morimoto A, Oka T, Kuwamoto S, Kato M, Horie Y, Hayashi K, Gogusev J, Jaubert F, Imashuku S, Al-Kadar LA, Takata K, Yoshino T. IL-17A receptor expression differs between subclasses of Langerhans cell histiocytosis, which might settle the IL-17A controversy. *Virchows Arch* 2013 Feb: 462(2):219-28, doi:10.1007/s00428-012-1360-6. Epub 2012 Dec 27. 査読有
- [学会発表](計 24 件)
1. Takashi Oka, Single cell dynamics of DNA methylation induced by the Tax gene expression of HTLV-I in adult T-cell leukemia/lymphoma, The 9th International Symposium for Future Technology Creating Better Human Health and Society. New Horizons in Interdisciplinary Cancer Research, February 5, 2016, Okayama
2. Takashi Oka, Mamoru Ouchida, Yasushi Okada, Kazuo Yamagata and Tadashi Yoshino, Single cell dynamics of DNA methylation perturbed by Tax gene expression of HTLV-I in adult T cell leukemia/lymphoma (ATL), The 74rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2015 年 10 月 8 日(木) ~10 日(土), 名古屋
3. 佐藤妃映、岡 剛史、神農陽子、鷺尾佳奈、村上一郎、大内田守、宇都宮與、吉野 正, 成人 T 細胞白血病/リンパ腫(ATL)における DNA 異常メチル化と病態との関連, 第 2 回日本 HTLV-1 学会学術集会, 2015 年 8 月 21 ~ 23 日 東京
4. 岡 剛史、阪田真澄、水野 初、宇都宮與、藤田洋史、升島 努、吉野 正, 成人 T 細胞白血病/リンパ腫(ATL)発症・進展特異的な代謝異常に関するメタボローム解析, 第 55 回リンパ網内系学会学術集会, 2015 年 7 月 9-11 日, 岡山
5. 佐藤妃映、岡 剛史、神農陽子、鷺尾佳奈、村上一郎、大内田守、大島孝一、宇都宮與、吉野 正, 成人 T 細胞白血病/リンパ腫(ATL)における DNA 異常メチル化と病態との関連, 第 55 回リンパ網内系学会学術集会, 2015 年 7 月 9-11 日, 岡山
6. 岡 剛史, 大内田守、岡田康志、上田潤, 山縣一夫, 吉野正, 成人 T 細胞白血病リンパ腫に於ける一細胞 DNA メチル化の変動解析, 第 104 回日本病理学会, 2015 年 4 月 30 日(木) ~5 月 2 日(土), 名古屋
7. 村上一郎、松下倫子、岩崎 健、桑本聡史、加藤雅子、堀江 靖、林 一彦、岡 剛史、吉野 正, ランゲルハンス細胞組織球症患者血清の質量分析器による解析, 第 104 回日本病理学会, 2015 年 4 月 30 日(木) ~5 月 2 日(土), 名古屋
8. 佐藤妃映、岡 剛史、神農陽子、鷺尾佳奈、村上一郎、大内田守、大島孝一、宇都宮與、吉野 正, 成人 T 細胞白血病/リンパ腫(ATL)における特異的 DNA メチル化と病態との関連, 第 104 回日本病理学会, 2015 年 4 月 30 日(木) ~5 月 2 日(土), 名古屋
9. 岡 剛史、阪田真澄、水野 初、宇都宮與、藤田洋史、升島 努、吉野 正, 成人 T 細胞白血病・リンパ腫(ATL)発症・進展に於ける代謝異常に関するメタボローム解析, 第 1 回日本 HTLV-1 学会, 2014 年 8 月 22 日~24 日、東京
10. 佐藤妃映、岡 剛史、神農陽子、鷺尾佳

- 奈、村上一郎、大内田守、宇都宮與、高橋聖之、吉野 正、成人 T 細胞白血病/リンパ腫(ATL)関連細胞株における DNA 異常メチル化の解析, 第 1 回日本 HTLV-1 学会, 2014 年 8 月 22 日~24 日、東京
11. 佐藤妃映、岡 剛史、神農陽子、鷺尾佳奈、村上一郎、大内田守、宇都宮與、高橋聖之、吉野 正、成人 T 細胞白血病/リンパ腫(ATL)関連細胞株における特異的 DNA メチル化の解析, 第 5 3 回リンパ網内系学会, 2014 年 5 月 1 7 日~1 8 日、京都
 12. Takashi Oka, Lamia Abd Al-Kader, Ichiro Murakami, Tomohiro Toji, Akihiro Manabe, Hiaki Sato, Katsuyoshi Takata, and Tadashi Yoshino, Aberrant expression of Polycomb complex1 (PRC1) from balanced to Bmi-1/PCGF4 dominant over Me1-18/PCGF2 in malignant lymphoma, 第 5 3 回リンパ網内系学会, 2014 年 5 月 1 7 日~1 8 日、京都
 13. 岡 剛史, Lamia Abd Al-Kader, 高田尚良、佐藤妃映、村上一郎、都地友紘、真鍋明広、吉野 正, B 細胞腫瘍及び T/NK 腫瘍におけるポリコーム抑制性複合体 2 (PRC2) の Ezh1 と Ezh2 の特異的発現, 第 103 回日本病理学会, 2 0 1 4 年 4 月 2 4-2 6 日、広島
 14. 佐藤妃映、岡 剛史、神農陽子、鷺尾佳奈、村上一郎、大内田守、宇都宮與、高橋聖之、吉野 正、成人 T 細胞白血病/リンパ腫(ATL)細胞株における特異的 DNA メチル化の解析, 第 103 回日本病理学会, 2 0 1 4 年 4 月 2 4-2 6 日、広島
 15. 村上一郎、松下倫子、岩崎 健、桑本聡史、加藤雅子、堀江 靖、林 一彦、前田智治、中本 周、山川光徳、中峯寛和、高田尚良、岡 剛史、吉野 正、メルケル細胞ポリオーマウイルス解析に依るランゲルハンス細胞肉腫の疾患モデル, 第 103 回日本病理学会, 2 0 1 4 年 4 月 2 4-2 6 日、広島
 16. Takashi Oka, Hirofumi Fujita, Lamia Abd Al-Kader, Ichiro Murakami, Atae Utsunomiya and Tadashi Yoshino. Sensitive detection and specific induction of cell death in adult T-cell leukemia/lymphoma cells by photodynamic reactions. The 7th International Symposium for Future Technology Creating Better Human Health and Society, Okayama, Japan, Feb.7, 2014
 17. Takashi Oka, Hirofumi Fujita, Lamia Abd Al-Kader, Ichiro Murakami, Atae Utsunomiya and Tadashi Yoshino, Sensitive detection and cell death induced by ALA-mediated photodynamic actions in adult T-cell leukemia/lymphoma cells. The 72st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, Japan, Oct 3-5, 2013,
 18. Lamia Abd Al-Kader, Takashi Oka, Katsuyoshi Takata, Hiaki Sato, Ichiro Murakami, Tomohiro Toji, Akihiro Manabe, and Tadashi Yoshino, High expression of Ezh2, Eed and Suz-12 in the aggressive variants of non-Hodgkin lymphoma. Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, Japan, Oct 3-5, 2013,
 19. 岡 剛史, 藤田洋史, Lamia Abd Al-Kader, 村上一郎、宇都宮與、吉野 正、成人 T 細胞白血病・リンパ腫(ATL)細胞の光動力学的反応による特異的細胞死の誘導, 2 0 1 3 年 HTLV-I 研究会, 2 0 1 3 年 8 月 2 3~2 5 日、東京
 20. 佐藤妃映、岡 剛史、Abd Al-Kader Lamia、神農陽子、鷺尾佳奈、村上一郎、大内田守、宇都宮與、高橋聖之、吉野 正、成人 T 細胞白血病/リンパ腫(ATL)における特異的 DNA メチル化と予後との相関, 2 0 1 3 年 HTLV-I 研究会, 2 0 1 3 年 8 月 2 3~2 5 日、東京
 21. Takashi Oka, Hirofumi Fujita, Lamia Abd Al-Kader1, Ichiro Murakami, Atae Utsunomiya and Tadashi Yoshino, Sensitive detection and apoptotic cell death induction of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) cells with photodynamic actions. The 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses HTLV 2013, June 26 to 30, 2013 in Montreal, Quebec, Canada.
 22. 佐藤妃映、岡 剛史、Abd Al-Kader Lamia、神農陽子、鷺尾佳奈、村上一郎、大内田守、大島孝一、宇都宮與、高橋聖之、吉野 正 成人 T 細胞白血病/リンパ腫(ATL)における特異的 DNA メチル化と予後との相関 第 102 回日本病理学会, 2 0 1 3 年 6 月 6~8 日、札幌
 23. Lamia Abd Al-Kader, Takashi Oka, Xu Sun, Katsuyoshi Takata, Hiaki Sato, Ichiro Murakami, Tomohiro Toji, Akihiro Manabe, Otte AP and Tadashi Yoshino,

Expression of PcG protein members Ezh2 and Eed in aggressive variants of non-Hodgkin lymphoma, 第 102 回日本病理学会, 2013 年 6 月 6～8 日、札幌

24. 村上一郎、松下倫子、岩崎 健、桑本聡史、加藤雅子、堀江 靖、林 一彦、岡剛史、吉野 正, 網羅的遺伝子発現解析およびメルケル細胞ポリオーマウイルス解析に基づくランゲルハンス細胞組織球症の疾患モデル提唱, 第 102 回日本病理学会, 2013 年 6 月 6～8 日、札幌

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 3 件)

名称: EB ウイルス関連 NK 細胞リンパ増殖性疾患から NK 細胞腫瘍進展に至る疾患の検査補助のための測定方法
発明者: 岡 剛史、鷲尾佳奈、吉野正
権利者: 国立大学法人 岡山大学
種類: 特許
番号: 特願 2016-012847
出願年月日: 2016 年 1 月 26 日
国内外の別: 国内

名称: 異常活性化細胞検出による悪性腫瘍の検査方法および異常活性化細胞除去環流返血治療装置
発明者: 岡 剛史、藤田洋史、吉野 正
権利者: 国立大学法人 岡山大学
種類: 特許
出願番号: PCT / JP 2 0 1 4 / 6 6 4 8 0
出願日: 平成 26 年 6 月 20 日
国内外の別: 外国

名称: 異常活性化白血球除去還流治療装置
発明者: 岡 剛史、藤田洋史、吉野 正
権利者: 国立大学法人 岡山大学
種類: 特許
番号: 特願 2013-130758
出願年月日: 平成 25 年 6 月 21 日
国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 剛史 (OKA TAKASHI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助

教
研究者番号: 50160651

(2) 研究分担者

伊藤 佐智夫 (ITO SACHIO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 30335624

大内田 守 (OUCHIDA MAMORU)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号: 80213635

吉野 正 (YOSHINO TADASHI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 70183704