

令和元年6月24日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06249

研究課題名(和文)ATLにおける遺伝子異常に基づく分子病態の解明

研究課題名(英文)Genetic dissection of molecular mechanisms in ATL

研究代表者

片岡 圭亮(Keisuke, Kataoka)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：90631383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：約200例のATL患者において遺伝子異常と進行性の病期や予後不良との関係を解析した。その結果、TP53変異、IRF4変異、および、複数のコピー数異常が進行性の病期(急性型・リンパ腫型)と関連があること、逆に、STAT3変異は慢性型・くすぶり型と関連があることを見出した。さらに、既知の臨床的予後因子と組み合わせた上で、一部の遺伝子異常(PRKCB変異など)は予後と関係があること、特にPDL1コピー数増加が強力な予後因子であることが明らかになった。また、PRKCB変異を持つトランスジェニックマウスを作成・解析したが、免疫系・造血系に表現型を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、臨床的因子と独立して予後不良と関連する遺伝子異常を同定することが出来た。この結果、臨床的な重要性に基づいた上で治療標的として有用な遺伝子異常が同定されたことのみならず、ATLにおける遺伝子異常のバイオマーカー(予後因子)として有用性が解明され、治療方針の決定に役立つ予後予測モデルの確立に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the association between genetic alterations and disease status in ATL. We found that TP53 and IRF4 mutations as well as numerous copy number alterations were associated with aggressive ATL (acute and lymphoma subtypes). By contrast, STAT3 mutations were related to chronic and smoldering subtypes. In addition, we analyzed the effect of genetic alterations on patient survival. We found that a set of genetic alterations, particularly PD-L1 copy number amplifications, were associated with worse prognosis even when established clinical prognostic factors were adjusted. We also developed a novel transgenic mouse model harboring the PRKCB D427 mutation. We analyzed this model, but found no phenotype in the immune and hematopoietic systems.

研究分野：血液内科学

キーワード：癌 成人T細胞白血病リンパ腫 遺伝学

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

成人T細胞白血病リンパ腫 (adult T-cell leukemia/lymphoma; ATL) は HTLV-1 ウイルス感染を原因とする T 細胞性腫瘍である。HTLV-1 キャリアの生涯 ATL 発症率は約 5% 程度であるが、一旦 ATL を発症すると現行の化学療法による長期生存率は約 15% と極めて予後不良であることから、造血器腫瘍の中でも非常に悪性度の高い腫瘍として位置付けられる (K Ishitsuka, Lancet Oncol, 2014)。日本では HTLV-1 キャリアが多く、少なくとも 120 万人の HTLV-1 キャリアが存在し、毎年 1,000 人以上が ATL により死亡している。そのため、本疾患の病態の解明および治療方法の改善はわが国で取り組むべき課題であると考えられる。ATL は発症までには 30 年以上の潜伏期間を要することから、その発症には HTLV-1 感染だけでなく、その後起こる体細胞の遺伝子異常の蓄積が重要であると考えられる。しかし、ATL の遺伝子異常の全体像についてはこれまでほとんど解明されていなかった。

そこで、申請者は世界に先駆けて 400 例を超える ATL 患者について、全エクソン解析・全ゲノム解析による変異解析、RNA シーケンスによる融合遺伝子解析、SNP アレイによるコピー数解析、メチル化アレイによる DNA メチル化解析を含む包括的な遺伝子解析を行い、ATL における遺伝子異常の全体像を明らかにした (K Kataoka, Nat Genet, 2015)。その結果、50 個の遺伝子において有意に変異が認められること、特に T 細胞受容体 (TCR) シグナリング/NF- κ B 経路には遺伝子異常の高度の集積を認め、この経路では PLCG1 (36%)、PRKCB (33%)、CARD11 (24%)、VAV1 (18%)、IRF4 (14%) などの hotspot のミスセンス変異や CTLA4-CD28/ICOS-CD28 などの融合遺伝子が認められることを明らかにした。同時に T 細胞において重要なシグナル伝達経路や転写制御因子、ケモカイン受容体、免疫回避などに関わる多数の遺伝子異常を同定した。

2. 研究の目的

このように申請者により ATL における遺伝子異常の全貌が解明されたが、次に解決すべき課題は、「これらの遺伝子異常が ATL の分子病態においてどのような役割を果たすか」、すなわち生理的な T 細胞の機能や T 細胞性腫瘍の発症にどのような影響を与えるか、T 細胞の分子機構にどのような変化をもたらすか、ということである。今回高頻度に認められた遺伝子異常の多くは機能獲得型の異常と予想され、分子標的薬のターゲットとして望ましい性格を有する。そのため、今後、ATL の遺伝子異常を標的とした治療戦略を開発するためには、その遺伝子異常の全体像に基づいて (本研究の特色)、ATL の分子病態を解明し、最適な治療標的を見出すことが不可欠である。そのために、本研究では、高頻度かつ機能的または臨床的に重要であると予想される遺伝子異常に焦点を当てて、その遺伝子異常が引き起こす分子病態を解明することを試みる。

ATL における臨床的に重要な遺伝子異常の同定

遺伝子異常の臨床的な重要性は主にその頻度と悪性度 (重症度) との関連性により規定される。申請者はすでに ATL における各遺伝子異常の頻度を明らかにしているが、「悪性度」、すなわち進行性の病期や予後不良との関係については明らかではない。この悪性度と関連する遺伝子異常の役割を解明することは、ATL 進展における分子病態の理解や予後不良群の治療成績の向上のために重要である。これまでに TP53 変異や p16 欠失が予後不良と関連することが報告されているが、それらは少数例を対象とした、解析した遺伝子異常も極めて限定された研究である。そのため、本研究では、申請者が明らかにした ATL の網羅的な遺伝子異常カタログを用いて、多数の症例において悪性度と関係する遺伝子異常の同定を試みる。本研究では、同様のコホートで生存解析を行うことにより予後と関連する遺伝子異常を同定することを目指す。

臨床的または機能的に重要な遺伝子異常が ATL の分子病態において果たす役割の解明

本研究では、申請者が実施してきた網羅的な遺伝子解析および生存解析により同定される高頻度かつ臨床的または機能的に重要な遺伝子異常に焦点を当てて、その分子病態の解明を試みる。申請者は ATL において 50 個の遺伝子が有意に変異していることを見出したが、中でもヒト腫瘍において初めて高頻度の hotspot のミスセンス変異を同定した遺伝子に PRKCB がある。PRKCB は protein kinase C- β (PKC β) をコードする遺伝子であり、ATL では 33% の症例に PRKCB 変異を認め、ほとんどの変異がキナーゼドメイン、特に D427 に位置する。申請者はすでに PRKCB D427N 変異が *in vitro* において NF- κ B 経路を活性化させる機能亢進型変異 (PKC ファミリーにおいて初めて同定された機能亢進型変異) であることを明らかにしている (K Kataoka, Nat Genet, 2015)。本研究では、この遺伝子変異に着目して、その遺伝子改変マウスモデルを作成し、*in vivo* において T 細胞機能や T 細胞性腫瘍発症に与える影響を評価する。

3. 研究の方法

ATL における臨床的に重要な遺伝子異常の同定

既に遺伝子変異とコピー数異常が同定済みであるコホートにおいて連携施設から生存情報を収集し、申請者が同定した遺伝子異常を用いた包括的な予後解析を行う。特に ATL では病型が予後に大きな影響を与えることが知られているため、コホート全体および病型別に予後解析を行う。さらに、他の臨床的な予後因子 (年齢など) も含めた多変量解析を行うことにより、臨床

的予後と有意に関連する遺伝子異常を同定する。その結果、臨床的な重要性に基づいた上で治療標的として有用な遺伝子異常が同定されるのみならず、ATLにおける遺伝子異常のバイオマーカー(予後因子)として有用性が解明され、治療方針の決定に役立つ予後予測モデルの確立に繋がることが期待される。

臨床的または機能的に重要な遺伝子異常がATLの分子病態において果たす役割の解明

高頻度の hotspot ミスセンス変異(PRKCB D427N)の生物学的意義を検討するために、その遺伝子変異を持つ遺伝子改変マウスを作成して、in vivo における変異の役割を解明する。具体的には、PRKCB D427N 変異をT細胞分画特異的なhCD2プロモーター下に発現するトランスジェニックマウスをすでに樹立する。このマウスモデルにおいて、

a) 末梢血・骨髄・胸腺・リンパ節などの造血組織におけるT細胞分画に与える影響

b) T細胞性腫瘍発症の有無やその表現型(生存期間や腫瘍細胞の表面マーカー)

を評価し、野生型と比較することにより in vivo において PRKCB D427N 変異が生理的なT細胞に与える影響およびT細胞性腫瘍の発生に与える影響を評価する。さらに、下流標的であるNF- κ B経路などの活性化をRNAシーケンスによる網羅的な遺伝子発現解析などで評価する。

4. 研究成果

ATLにおける臨床的に重要な遺伝子異常の同定

臨床的に重要な遺伝子異常を抽出することを目的として、約200例の大規模なコホートで遺伝子異常と進行性の病期や予後不良との関係を解析した。その結果、TP53変異、IRF4変異、および、複数のコピー数異常が進行性の病期(急性型・リンパ腫型)と関連があること、逆に、STAT3変異は慢性型・くすぶり型と関連があることを見出した。

さらに、これらの遺伝子異常が臨床的因子と組み合わせた上で、予後予測に有用であるか評価した。その結果、ATLで広く使用されているJCOG-PI(急性型・リンパ腫型)やLDH高値・A1b低値・BUN高値(慢性型)と合わせても、一部の遺伝子異常(PRKCB変異など)は予後と関係があること、特にPDL1コピー数増加が強力な予後因子であることが明らかになった。この結果は、ATLにおいて、世界で初めて網羅的な解析により、臨床因子と遺伝子異常を組み合わせることにより予後予測能が改善することを示したものである(K Kataoka et al, 2018 Blood)。

臨床的または機能的に重要な遺伝子異常がATLの分子病態において果たす役割の解明

ATLにおいて高頻度にホットスポットのミスセンス変異を認めるPRKCB変異を持つトランスジェニックマウスを作成し、解析を行った。本マウスでは、まず、PCRおよびサザンブロットにて目的のマウスが得られていることを確認した。その後、造血系・免疫系の評価を行ったが、表現型を認めなかった。その理由として、hCD2プロモーター下にヒトPRKCB変異を発現させていたが、マウスPrkcbと比較して十分なmRNA発現を認めなかった可能性が考えられた。

さらに、ATLにおいて臨床的に重要と考えられたIRF4変異を持つ条件的ノックインマウスを作成中であり、今年度はVav-creマウス・Mx-creマウスなどの造血系でCreを発現させるマウスと交配させて、造血系でIrf4変異の意義を解析するためのマウスを得ることが出来た。現在、その変異アレルの発現を確認できた段階であり、今後、その表現型を解析予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

1) PAK kinase inhibition has therapeutic activity in novel preclinical models of Adult T-cell Leukemia/Lymphoma. Chung EYL, Mai Y, Shah UA, Wei Y, Ishida E, Kataoka K, Ren X, Pradhan K, Bartholdy B, Wei X, Zou Y, Zhang J, Ogawa S, Steidl U, Zang X, Verma A, Janakiram M, Ye BH. Clin Cancer Res. In press.

2) Decreased RORC expression and downstream signaling in HTLV-1-associated Adult T-cell Leukemia/Lymphoma uncovers an antiproliferative IL17 link: a potential target for immunotherapy? Subramanian K, Dierckx T, Khouri R, Menezes SM, Kagdi H, Taylor GP, Farre L, Bittencourt A, Kataoka K, Ogawa S, Van Weyenbergh J. Int J Cancer. 2019;144(7):1664-1675.

3) North American ATLL has a distinct mutational and transcriptional profile and responds to epigenetic therapies. Shah UA, Chung EY, Giricz O, Pradhan K, Kataoka K, Gordon-Mitchell S, Bhagat TD, Mai Y, Wei Y, Ishida E, Choudhary GS, Joseph A, Rice R, Gitego N, Parrish C, Bartenstein M, Goel S, Mantzaris I, Shastri A, Derman O, Binder A, Gritsman K, Kornblum N, Braunschweig I, Bhagat C, Hall J, Graber A, Ratner L, Wang Y, Ogawa S, Verma A, Ye BH, Janakiram M. Blood. 2018;132(14):1507-1518.

4) Prognostic relevance of integrated genetic profiling in adult T-cell leukemia/lymphoma. Kataoka K, Iwanaga M, Yasunaga J, Nagata Y, Kitanaka A, Kameda T, Yoshimitsu M, Shiraishi Y, Sato-Otsubo A, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Ochi Y, Aoki K, Suzuki H, Shiozawa Y, Yoshizato T, Sato Y, Yoshida K, Nosaka K, Hishizawa M, Itonaga H, Imaizumi Y, Munakata W, Shide K, Kubuki Y, Hidaka T, Nakamaki T, Ishiyama K, Miyawaki S, Ishii R, Nureki O, Tobinai K, Miyazaki Y, Takaori-Kondo A, Shibata T, Miyano S, Ishitsuka K, Utsunomiya A, Shimoda K, Matsuoka M, Watanabe T, Ogawa S. Blood. 2018;131(2):215-225.

5) Genetic alterations in adult T-cell leukemia/lymphoma. Kogure Y, Kataoka K. Cancer Sci. 2017;108(9):1719-25.

〔学会発表〕(計5件)

1) 第76回日本癌学会学術集会 腫瘍別シンポジウム (SST3-2)

大阪、2018年9月28日

成人T細胞白血病リンパ腫の遺伝学的基盤とその臨床応用

片岡 圭亮

2) 第4回日本HTLV-1学会学術集会 特別講演、枚方、2017年8月19日

成人T細胞白血病リンパ腫におけるゲノム異常とその臨床的意義

片岡圭亮

3) 18th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses (0-4-5), Oral, Tokyo、2017年3月8日

Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Adult T-cell Leukemia/Lymphoma Yotaro Ochi, Keisuke Kataoka, Masako Iwanaga, Jun-ichirou Yasunaga, Yasunobu Nagata, Akira Kitanaka, Yuichi Shiraishi, Aiko Sato-Otsubo, Masashi Sanada, Kenichi Chiba, Hiroko Tanaka, Kosuke Aoki, Hiromichi Suzuki, Yusuke Shiozawa, Tetsuichi Yoshizato, Yusuke Sato, Kenichi Yoshida, Kisato Nosaka, Masakatsu Hishizawa, Hidehiro Itonaga, Yoshitaka Imaizumi, Wataru Munakata, Kotaro Shide, Yoko Kubuki, Tomonori Hidaka, Takuro Kameda, Tsuyoshi Nakamaki, Ken Ishiyama, Shuichi Miyawaki, Ryohei Ishii, Osamu Nureki, Kensei Tobinai, Yasushi Miyazaki, Akifumi Takaori-Kondo, Tatsuhiro Shibata, Satoru Miyano, Atae Utsunomiya, Kazuya Shimoda, Masao Matsuoka, Toshiki Watanabe, Seishi Ogawa

4) 第78回日本血液学会学術集会 一般口演 OS-1-66、横浜、2016年10月13日

Prognostic relevance of integrated molecular profiling in adult T-cell leukemia/lymphoma 越智 陽太郎, 片岡 圭亮, 永田 安伸, 北中 明, 安永 純一朗, 岩永 正子, 白石 友一, 真田 昌, 吉里 哲一, 吉田 健一, 野坂 生郷, 菱澤 方勝, 糸永 英弘, 今泉 芳孝, 棟方 理, 幣 光太郎, 久富木 庸子, 日高 智徳, 亀田 拓郎, 中牧 剛, 石山 謙, 宮脇 修一, 飛内 賢正, 宮崎 泰司, 高折 (近藤) 晃史, 柴田 龍弘, 宮野 悟, 松岡 雅雄, 下田 和哉, 渡邊 俊樹, 小川 誠司

5) 第75回日本癌学会学術集会 一般口演 J-1029、横浜、2016年10月6日

成人T細胞性白血病/リンパ腫における全遺伝子プロファイリングと予後の相関

越智 陽太郎, 片岡 圭亮, 永田 安伸, 北中 明, 安永 純一朗, 岩永 正子, 白石 友一, 千葉 健一, 佐藤 亜衣子, 真田 昌, 田中 洋子, 鈴木 啓道, 佐藤 悠佑, 塩澤 裕介, 吉里 哲一, 吉田 健一, 野坂 生郷, 菱澤 方勝, 今泉 芳孝, 日高 智徳, 中牧 剛, 宮脇 修一, 飛内 賢正, 宮崎 泰司, 高折 晃史, 柴田 龍弘, 宮野 悟, 下田 和哉, 松岡 雅雄, 渡邊 俊樹, 小川 誠司

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等: https://www.ncc.go.jp/jp/ri/division/molecular_oncology/index.html
(国立がん研究センター研究所分子腫瘍学分野)

6. 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：下田和哉

ローマ字氏名：Kazuya Shimoda

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。