

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2020

課題番号：16K08667

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の1細胞解析

研究課題名(英文)Single cell analysis of dynamic change of epigenetic abnormalities in 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・講師

研究者番号：50160651

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)：成人T細胞白血病・リンパ腫(ATL)はHTLV-1を原因ウイルスとする疾患であり、病期の進んだ症例の予後は大変不良で有効な治療法は確立されていない。我々は新たに開発したメチル化DNA結合蛍光蛋白MBD-EGFPによるDNAメチル化ライブイメージング法を用いて環境変化にตอบสนองするDNAメチル化動態をライブ解析した。網羅的DNAメチル化・遺伝子発現解析よりHTLV-1tax癌遺伝子発現ONの後、標的遺伝子群のDNAメチル化は次の定常状態への移行がみられ、生理的・病理的細胞内外環境変化に伴い標的遺伝子群のDNAメチル化平衡の変化による遺伝子発現異常誘導が発症に重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はこれまでに超微量検体を用いて造血器腫瘍のDNA異常メチル化を高感度・高精度に検出する方法を開発し、造血器腫瘍の早期診断、また低悪性度から高悪性度病型への進展可能性を評価する検査方法の開発に成功した。本研究に於いてlive cell imaging法を用いてHTLV-1tax癌遺伝子発現がDNA異常メチル化を誘発し遺伝子発現異常を引き起こすことを直接示し、そのダイナミクスを解析した。DNA異常メチル化誘発機構と発症との関連を明らかにすることは、エピジェネティック制御が可逆的であることから将来悪性腫瘍の新規早期発見・早期治療法更に予防法につながる可能性があり、さらなる発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL), an aggressive type of T-cell malignancy, is induced by human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) infection. The outcomes, following therapeutic interventions for ATL, have not been satisfactory. In the present investigation, we established live-cell imaging method of DNA methylation using methylated DNA binding protein (MBD) fused with enhanced green fluorescent protein (EGFP); MBD-EGFP to detect dynamic changes of DNA methylation induced by endogenous and/or exogenous environmental perturbations in human leukemia cells. Comprehensive global DNA methylation and gene expression analyses revealed dynamic changes of target gene methylation and gene expression followed by HTLV1tax gene expression. In vitro live cell imaging of DNA methylation with HTLV-1tax-oncogene ON/OFF system is useful system to investigate epigenetic mechanism of ATL leukemogenesis/lymphomagenesis.

研究分野：腫瘍病理学、病原ウイルス学、分子病理学

キーワード：HTLV-1 ATL DNAメチル化 1細胞解析 ライブセルイメージング 網羅的解析 de novo methylation DNA methylation foci

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、研究者個人に帰属します。

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成人 T 細胞白血病・リンパ腫(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。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 遺伝子等、遺伝子群に於いて CpG island の DNA メチル化によるエピジェネティック異常により誘導された遺伝子発現抑制が高頻度で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異常 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)) (図 1)。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) を引き起こし発癌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。

健全者・HTLV-1 キャリアーよりも、ATLL 患者で、より高頻度の遺伝子修飾異常がある。

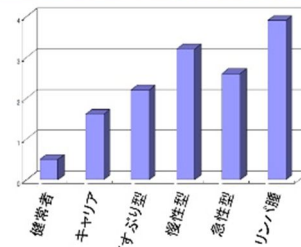


図1 ATLL患者DNAのメチル化異常

2. 研究の目的

我々が確立したメチル化 DNA 特異的結合蛋白 MBD-EGFP による DNA メチル化ライブイメージング法を用いて HTLV-1 tax 遺伝子 ON または OFF の後の DNA メチル化のダイナミックな変化を 1 細胞レベルで解析する。このシステムを用いてウイルス感染による異常 DNA メチル化の起こる分子機序、特に HTLV-1 tax 遺伝子発現による細胞内部環境変化及び免疫システムとの相互作用など外部環境変化にตอบสนองする DNA メチル化及びヒストン修飾の動的変化を細胞レベルでライブ解析し、HTLV-I の感染がどのようなメカニズムで異常 DNA メチル化及びエピジェネティック異常を誘導し、ATL 発症にいたるか詳細に解析するのが目的である。

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、培養細胞等の様々な実験系により ATL 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用いながら様々な角度から総合的且つ詳細に解析した。とくに新たに開発したメチル化 DNA 結合蛋白 MBD-EGFP による DNA メチル化ライブイメージング法を用いて FCM (Flow cytometry) 解析で観察されるグローバル DNA メチル化レベルの変動解析と平行して共焦点レーザー顕微鏡及び超高解像度 STED 顕微鏡による内部環境及び外部環境の変化にตอบสนองする DNA メチル化及びヒストン修飾の動的変化を細胞レベルでライブ解析した。これらの方法で HTLV-I の感染及び HTLV-1 tax 遺伝子がどのように異常 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

1. HTLV-*Itax* 遺伝子発現の ON/OFF がコントロールできる培養細胞において MBD-EGFP による DNA メチル化を定量的に計測するライブイメージングシステムの構築を試み成功した。*tax* 遺伝子 ON の後、一過的なグローバル DNA 脱メチル化が誘導された後、異常 DNA メチル化が起こることを確認し、その際多数の hyper-methylation foci が新たに形成されることを発見した。この実験系を用いて生きた状態で細胞内部環境及び外部環境の変化に応答してエピジェネティック状態がどのようにダイナミックに変化するか詳細を解析することが可能となった。

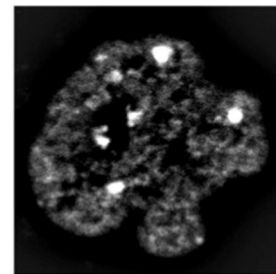


図2. MBD-GFPによるリンパ球DNAメチル化のライブイメージング

2. フローサイトメトリ (FACS) を用いた細胞周期解析方法と細胞周期変動に応じた DNA メチル化レベルの変動を MBD-EGFP 蛍光検出により同時計測した。*tax* 遺伝子 ON の後、一過的なグローバル DNA 脱メチル化誘導の後、引き続き異常 DNA メチル化が起こることを確認し、多数の hyper-methylation foci が新たに形成されていることを明らかにした。更に HTLV-*Itax* 遺伝子発現 ON にした後、細胞の DNA メチル化レベルの変動パターンの経時的変化を追跡し、異常 DNA メチル化進行過程の時間依存性をさらに詳細に解析した。FACS 解析で観察されるグローバル DNA メチル化レベルの変動解析と平行して共焦点レーザー顕微鏡及び超高解像度 STED 顕微鏡によるメチル化 DNA の hyper-methylation foci, Tax 蛋白質, の時間・空間局在分布変動を 1 細胞レベルで詳細に検討することにより新たに DNA methylation が起こっている現場で Tax 蛋白は早い時点で hyper-methylation foci と共局在することが明らかとなった。
3. HTLV-*Itax* 遺伝子発現 ON の後、経時的に培養細胞をサンプリングし DNA メチル化及び遺伝子発現の包括的網羅的解析を行い、異常 DNA メチル化により遺伝子発現が変化している標的遺伝子の同定を行った。更にクラスタリング解析、パスウェイ解析を行い、どのような分子経路の遺伝子がダイナミックに変動しているのか明らかになった。また 4 つの病型の ATL 患者, HTLV-1 キャリアの DNA メチル化プロファイルと *tax* 遺伝子発現誘導系で観察される異常 DNA メチル化の異同を遺伝子レベルで比較検討し、HTLV-1 感染後早期に起こる異常 DNA メチル化と後期に起こる DNA メチル化を検討し ATL 発症・進展の分子メカニズムについて検討を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sando Y, Matsuoka KI, Sumii Y, Kondo T, Ikegawa S, Sugiura H, Nakamura M, Iwamoto M, Meguri Y, Asada N, Ennishi D, Nishimori H, Fujii K, Fujii N, Utsunomiya A, Oka T, Maeda Y.	4. 巻 15
2. 論文標題 Author Correction: 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy can target aggressive adult T cell leukemia/lymphoma resistant to conventional chemotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 6420
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-86066-9	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 Yasuhisa Sando, Ken-ichi Matsuoka, Yuichi Sumii, Takumi Kondo, Shuntaro Ikegawa, Hiroyuki Sugiura, Makoto Nakamura, Miki Iwamoto, Yusuke Meguri, Noboru Asada, Daisuke Ennishi, Hisakazu Nishimori, Keiko Fujii, Nobuharu Fujii, Atae Utsunomiya, Takashi Oka, and Yoshinobu Maeda,	4. 巻 10
2. 論文標題 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy can target aggressive adult T cell leukemia/lymphoma resistant to conventional chemotherapy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17237
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-74174-x.	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 Oka T, Matsuoka KI, Utsunomiya A	4. 巻 12(2)
2. 論文標題 Sensitive Photodynamic Detection of Adult T-cell Leukemia/Lymphoma and Specific Leukemic Cell Death Induced by Photodynamic Therapy: Current Status in Hematopoietic Malignancies.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers (Basel)	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers12020335.	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 Takashi Oka, Hajime Mizuno, Masumi Sakata, Hirofumi Fujita, Tadashi Yoshino, Yoshihisa Yamano, Kozo Utsumi, Tsutomu Masujima & Atae Utsunomiya	4. 巻 8
2. 論文標題 Metabolic abnormalities in adult T-cell leukemia/lymphoma and induction of specific leukemic cell death using photodynamic therapy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14979
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-33175-7	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 Murakami I, Wada N, Nakashima J, Iguchi M, Toi M, Hashida Y, Higuchi T, Daibata M, Matsushita M, Iwasaki T, Kuwamoto S, Horie Y, Nagata K, Hayashi K, Oka T, Yoshino T, Imamura T, Morimoto A, Imashuku S, Gogusev J, Jaubert F.	4. 巻 16(1)
2. 論文標題 Merkel cell polyomavirus and Langerhans cell neoplasm.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Commun Signal.	6. 最初と最後の頁 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12964-018-0261-y.	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 該当する

1. 著者名 Washio K, Oka T, Abdalkader L, Muraoka M, Shimada A, Oda M, Sato H, Takata K, Kagami Y, Shimizu N, Kato S, Kimura H, Nishizaki K, Yoshino T, Tsukahara H.	4. 巻 58
2. 論文標題 Gene expression analysis of hypersensitivity to mosquito bite, chronic active EBV infection and NK/T-lymphoma/leukemia.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Leukemia & Lymphoma.	6. 最初と最後の頁 2683-2694
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10428194.2017.1304762.	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 該当する

1. 著者名 Lamia Abdalkader, Takashi Oka, Katsuyoshi Takata, Hiaki Sato, Ichiro Murakami, Arie P. Otte, Tadashi Yoshino.	4. 巻 48
2. 論文標題 Aberrant differential expression of EZH1 and EZH2 in Polycomb repressive complex 2 among B- and T/NK-cell neoplasms	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Pathology	6. 最初と最後の頁 467-482
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pathol.2016.05.002	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 該当する

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Takashi Oka, Hajime Mizuno, Masumi Sakata, Hirofumi Fujita, Ken-ichi Matsuoka, Tadashi Yoshino, Yoshihisa Yamano, Kozo Utsumi, Tsutomu Masujima, Yoshinobu Maeda, and Atae Utsunomiya
2. 発表標題 EARLY DETECTION OF ADULT T-CELL LEUKEMIA/LYMPHOMA AND INDUCTION OF SPECIFIC LEUKEMIC CELL DEATH WITH 5-AMINOLEVULINIC ACID MEDIATED PHOTODYNAMIC THERAPY
3. 学会等名 Nature Conference, "Transdisciplinary Cancer Interception: Leveraging Biology to Improve Prevention and Detection" March 9-11, 2020 Salt Lake City, Utah, USA (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡 剛史、水野 初、 阪田真澄、藤田洋史、吉野 正、山野嘉久、内海耕造、升島 努、宇都宮與
2. 発表標題 成人T細胞白血病 / リンパ腫 (ATL) 発症・進展における代謝異常と光動学的治療法によるATL白血病細胞特異的細胞死の誘導
3. 学会等名 第59回日本リンパ網内系学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Oka
2. 発表標題 Dynamic Changes and aberrant differential expression of EZH1 and EZH2 in Polycomb repressive complex 2 among B- and T/NK-cell neoplasms
3. 学会等名 17th Annual Congress of International Drug Discovery Science & Technology (IDDST-2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡 剛史、水野 初、 阪田真澄、藤田洋史、吉野 正、山野嘉久、内海耕造、升島 努、宇都宮與
2. 発表標題 ATL発症・進展における漸進的代謝異常と光動学的治療法によるATL白血病細胞特異的細胞死の誘導
3. 学会等名 第6回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Oka
2. 発表標題 Sensitive detection of metabolic abnormalities in adult T-cell leukemia/lymphoma and induction of specific leukemic cell death using photodynamic therapy
3. 学会等名 3rd World Congress on Cancer “New strategies to prevent, diagnose and treat Cancer based on Precision Medicine” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Oka, Hajime Mizuno, Masumi Sakata, Hirofumi Fujita, Ken-ichi Matsuoka, Tadashi Yoshino, Yoshihisa Yamano, Kozo Utsumi, Tsutomu Masujima, Yoshinobu Maeda, and Atae Utsunomiya
2. 発表標題 Dynamic changes of metabolic abnormalities in adult T-cell leukemia/lymphoma and induction of specific leukemic cell death using photodynamic therapy
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Oka, Masumi Sakata, Hajime Mizuno, Hirofumi Fujita, Tsutomu Masujima, Tadashi Yoshino, Yoshihisa Yamano, Atae Utsunomiya
2. 発表標題 Sensitive detection of dynamic changes of metabolic abnormalities during onset and progression of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) and induction of specific leukemic cell death by photodynamic action
3. 学会等名 18th International Conference on Human Retrovirology : HTLV and Related Viruses (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiaki Sato, Takashi Oka, Yoko Shinnou-Nakatani, Kana Washio, Ichiro Murakami, Mamoru Ouchida, Atae Utsunomiya, Tadashi Yoshino
2. 発表標題 Aberrant DNA methylation is associated with the clinical course in the same patients with ATL.
3. 学会等名 18th International Conference on Human Retrovirology : HTLV and Related Viruses (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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の変動との関連
3. 学会等名 日本病理学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 成人T細胞白血病/リンパ腫(ATL)を発症したHTLV-1キャリアにおける異常DNAメチル化の解析
3. 学会等名 日本リンパ網内系学会総会,
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ichiro Murakami, Michiko Matsushita, Takeshi Iwasaki, Satoshi Kuwamoto, Masako Kato, Keiko Nagata, Yasushi Horie, Kazuhiko Hayashi, Takashi Oka, Tadashi Yoshino
2. 発表標題 Proteomic analysis on Langerhans cell histiocytosis patients and a new triple-risk factor model
3. 学会等名 第106回日本病理学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 HTLV-1キャリアにおける異常DNAメチル化と成人T細胞白血病/リンパ腫(ATL)発症との関連について
3. 学会等名 日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ichiro Murakami, Junko Nakashima, Yumiko Hashida, Masanori Daibata, Michiko Matsushita, Takeshi Iwasaki, Satoshi Kuwamoto, Masako Kato, Keiko Nagata, Kazuhiko Hayashi, Takashi Oka, Tadashi Yoshino, Toshihiko Imamura, Akira Morimoto, Shinsaku Imashuku, Jean Gogusev, Francis Jaubert
2. 発表標題 ECOLOGY OF MERKEL CELL POLYOMAVIRUS IN HEALTHY SKIN SHOWS A CLOSE AGREEMENT WITH INTERLEUKIN-1 LOOP MODEL IN LANGERHANS CELL HISTIOCYTOSIS
3. 学会等名 32nd Annual Meeting of the Histiocyte Society (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Takashi Oka
2. 発表標題 Single cell dynamics of DNA methylation induced by the Tax gene expression of HTLV-I in adult T-cell leukemia/lymphoma
3. 学会等名 The 9th International Symposium for Future Technology Creating Better Human Health and Society. New Horizons in Interdisciplinary Cancer Research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Takashi Oka, Mamoru Ouchida, Yasushi Okada, Kazuo Yamagata and Tadashi Yoshino
2. 発表標題 Single cell dynamics of DNA methylation perturbed by tax-gene expression of HTLV-I in adult T cell leukemia/lymphoma (ATL)
3. 学会等名 Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2016年

〔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	大内田 守 (Ouchida Mamoru) (80213635)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授 (15301)	
研究分担者	岡田 康志 (Okada Yasushi) (50272430)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー (82401)	
研究分担者	吉野 正 (Yoshino Tadashi) (70183704)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
オランダ	University of Amsterdam	Swammerdam Institute for Life Sciences	Department of Biochemistry	
エジプト	Mansoura University	Faculty of Medicine	Department of Pathology	
フランス	University Paris Descartes (Paris 5)	AP-HP Hopital	Necker-Enfants Malades	