

令和元年6月18日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09850

研究課題名(和文)成人T細胞白血病・リンパ腫の進展におけるエピゲノム異常の網羅的解析

研究課題名(英文)Epigenetic changes in the development of adult T cell leukemia

研究代表者

末岡 榮三郎 (Sueoka, Eisaburo)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：00270603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：HTLV-1ウイルス感染細胞特異的なエピジェネティック変化を、病型ごとに解析し悪性化に關与する因子に対する治療法の開発を行うことを目的とした。当院HTLV-1専門外来を受診した約180名の症例について、Has-Flow法の解析を行い、CADM1/TSLC1、CD7発現パターンからP,N,D分画を分離し、DNAメチル化を、網羅的に解析した。遺伝子発現に重要なTSS200領域のメチル化は病期の進展に關連して亢進していた。また、既報の遺伝子発現パターンとメチル化亢進のパターンが一致した、遺伝子群22種類を同定し、診断マーカーおよび治療標的候補として解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

いったん発症すると治癒の困難な、成人T細胞白血病(ATL)における遺伝子変化について、キャリアからくすぶり、慢性型と病期の比較的早期から生じるメチル化異常のパターンを明らかにした。これらの遺伝子の中には、がん化や細胞増殖の進展に關与することが知られている遺伝子群が含まれており、ATLの発症のリスク評価や治療法の開発の標的分子も含まれていることが示唆される。現在、それぞれの遺伝子の機能解析とともに、HTLV-1キャリアにおける病期進展のマーカーとしての有用性の検討を進めている。

研究成果の概要(英文)：HTLV-1 virus-infected cell-specific epigenetic changes for each stage of adult T cell leukemia were analyzed. About 180 cases who visited our hospital were analyzed by Has-Flow method and HTLV-1-infected fractions were separated from the expression pattern of CADM1 / TSLC1 and CD7. DNA methylation was analyzed comprehensively by DNA methylation array. Methylation of the TSS 200 region, which is important for gene expression, was enhanced in relation to the progression of the stage. In addition, we found 22 types of gene groups were coincided with the genes which expression were down regulated. Our results suggested that the genes thought to be candidates for diagnostic markers for disease progression and for therapeutic targets.

研究分野：血液内科学

キーワード：成人T細胞白血病 HTLV-1 DNAメチル化 エピジェネティック変化 分子標的治療 フローサイトメトリー法

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ATL は HTLV-1 の感染から数十年の経過を経て発症する極めて予後不良のリンパ系腫瘍である。特に ATL は急性化した際に、薬剤抵抗性を示す傾向が強く、治療後の再発が多い特徴を示す。実際に急性型と診断された患者の平均生存期間は約 1 年と短く、効果的な治療法の開発が望まれている。私共は ATL に対する新規薬物療法の開発研究として、NK314 等の腫瘍細胞の DNA 修復機構の阻害作用を利用した新規抗がん剤候補を見出している (Sueoka et al, Blood, 2011)。さらに、低酸素応答遺伝子(HIF-1) がリンパ球のアポトーシス抑制を介してリンパ腫の発症に関与していることを見出し、治療標的の可能性を報告した (Sueoka et al, PLoS One, 2013)。

ATL はくすぶり型、慢性型からリンパ腫型、急性型に進展する多段階がんの臨床経過を示すが、それぞれの段階における病期の進展や悪性化に関わる因子に関しては不明な点が多い。多段階がんの過程の中で様々な遺伝子変化が報告されているが、これまでは HTLV-1 感染細胞特異的な分子機構の解析は困難であった。そのような中で、東京大学医科学研究所 内丸薫博士らが開発した Has-Flow 法は、接着分子 CADM1/TSLC-1 の過剰発現 (Blood, 2005) と、ATL 細胞における CD7 の発現低下を細胞表面マーカーの特徴として、ATL 細胞群を分類する方法である。(Clin. Cancer Res., 2014) (図 1)。

私共は内丸薫博士らとの共同研究により、Has-Flow 法による、HTLV-1 感染細胞の同定とソーティングによる分離法を整備した。Has-Flow 法を用いることにより健常人コントロールの PBMC 中の CD4 (+) T 細胞 (CADM1/TSLC-1 が陰性で、CD7 が陽性) を「P 画分」、ATL 患者由来の PBMC 中の CD4 (+) T 細胞のうち、CADM1/TSLC-1 が陽性で、CD7 が(弱)陽性の「D 画分」と CD7 が陰性に変化している「N 画分」を分離することが可能である (図 2)。D および N 画分に含まれる細胞群は高率に HTLV-1 プロウイルス陽性であり、この方法により HTLV-1 感染細胞と非感染細胞を分離すること、また、感染細胞においても腫瘍化の段階として異なる細胞集団である、D と N 画分を分離して解析することによって、病期の進展に関与する因子の解析が可能であることを示唆している。

2. 研究の目的

成人 T 細胞白血病 (ATL) の HTLV-1 ウイルス感染細胞特異的なエピジェネティック変化を、病型ごとに解析し、悪性化に関与する因子に対する治療法の開発を目指した基礎的研究を行う。最近、開発されたフローサイトメトリーを用いた Has-Flow 法は、HTLV-1 感染細胞を感度よく分画することを可能にした。本研究では Has-Flow 法により、HTLV-1 感染細胞をソーティングし、メチレーションを中心にエピジェネティック変化を網羅的に解析する。さらに非感染細胞とくすぶり、慢性型、急性型それぞれの段階の HTLV-1 感染細胞に特異的に認められる因子を同定し、更に病期の進展と関連する因子を抽出する。また、その作用を阻害する化合物を探索し、ATL 発症の新規予防法の開発を目指した基礎的知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

ATL および HTLV-1 ウイルス感染者の感染細胞に生じるエピジェネティック変化を、CADM1/TSLC1, CD7 を指標とした Has-Flow 法により病型ごとに解析し、悪性化に関与する因子に対する治療法の開発を目指した基礎的研究を行う。

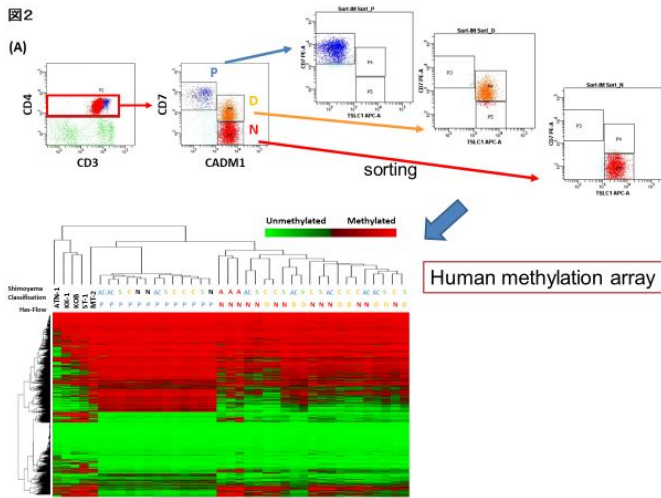
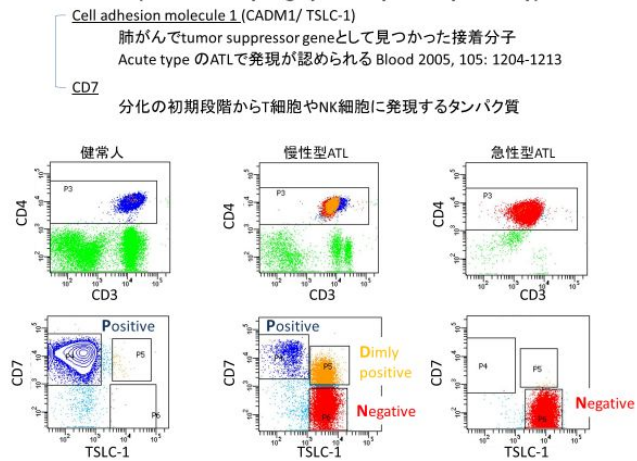
(1) HTLV-1 ウイルス感染者 (キャリア、くすぶり型、慢性型、急性、リンパ腫型 ATL 症例) の感染細胞集団を、Has-Flow 法で同定する。

(2) Has-Flow 法を応用し、末梢血リンパ球を CADM1/TSLC1, CD7 発現パターンから P, N, D 画分を分離し、DNA メチル化を、網羅的に解析する。

4. 研究成果

当院 HTLV-1 専門外来を受診した約 250 名の HTLV-1 ウイルス感染者の同意を得て Has-Flow 法

図 1 Has-Flow (HTLV-1 analyzing system by flow cytometry)



を行いCADM1/TSLC1, CD7, CCR4, FoxP3, Tax などの発現に関して評価を行った。これまで約 200 名の症例について、Has-Flow 法と HTLV-1 プロウイルス量を同時測定しており、臨床的病期分類による評価、HTLV-1 プロウイルス量と Has-Flow 法の結果に基づいた、分子マーカー評価との比較検討を行った。臨床的病期分類の基本となる、末梢血の異常リンパ球と分子マーカー評価はおおむね相関が認められたが、一部の症例においては臨床的分類ではキャリアに分類される群で、プロウイルス量および Has-Flow 法陽性細胞の多い症例が認められ、さらにその一部はくすぶり型や慢性型に病期の進行が認められた。

Has-Flow 法による CADM1/TSLC1, CD7 発現パターンから P, N, D 分画を分離し、DNA メチル化を、網羅的に解析した。遺伝子発現に重要な TSS200 領域のメチル化は病期の進展、P D N へと亢進していた。以上の結果は HTLV-1 感染細胞において、病期の進展とともに遺伝子発現に関与が強い領域のメチル化の蓄積が生じている事が確認できた。

以上の結果を基に脱メチル化剤による ATL 細胞の抗腫瘍効果についての解析を開始した。まず ATL 関連細胞株に対する抗腫瘍効果をアザシチジンやデシタピンなどの脱メチル化剤を用いて検討した。これらの化合物は濃度依存性に ATL 関連細胞株の増殖を抑制したが、現在動物への移植モデルや患者由来の腫瘍細胞においても抗腫瘍効果と脱メチル化効果の相関について検討を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. Sueoka E, Watanabe T, Mashima M, Shirakami Y, Komori A, Matsuo K, Yoshikawa, Cho KA, Park TJ, Seimiya H, Kim EG, Suganuma M and Chung J Meeting report of the 14th Japan-Korea Joint Symposium on Cancer and Aging Research: current status of translational research and approaching to precision medicine. *J Cancer Res Clin Oncol*, *J Cancer Res Clin Oncol*. 2019 Mar 11. doi: 10.1007/s00432-019-02887-2. [Epub ahead of print] (査読有)
2. Ureshino H, Kusaba K, Kidoguchi K, Sano H, Nishioka A, Itamura H, Yoshimura M, Yokoo M, Shindo T, Kubota Y, Ando T, Kojima K, Sueoka E, Kimura S. Clinical impact of the CONUT score and mogamulizumab in adult T cell leukemia/lymphoma. *Ann Hematol*. 2019 98: 465-471. (査読有)
3. Fujiki H, Sueoka E, Watanabe T, Suganuma M. The concept of the okadaic acid class of tumor promoters is revived in endogenous protein inhibitors of protein phosphatase 2A, SET and CIP2A, in human cancers. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018 ;144:2339-2349. (査読有)
4. Sato A, Nakashima C, Abe T, Kato J, Hirai M, Nakamura T, Komiya K, Kimura S, Sueoka E, Sueoka-Aragane N. Investigation of appropriate pre-analytical procedure for circulating free DNA from liquid biopsy. *Oncotarget*. 2018 ;9:31904-31914. (査読有)
5. Nakamura H, Bono H, Hiyama K, Kawamoto T, Kato Y, Nakanishi T, Nishiyama M, Hiyama E, Hirohashi N, Sueoka E, Poellinger L, Tanimoto K. Differentiated embryo chondrocyte plays a crucial role in DNA damage response via transcriptional regulation under hypoxic conditions. *PLoS One*. 2018 Feb 21;13(2):e0192136. (査読有)
6. Fujiki H, Watanabe T, Sueoka E, Rawangkan A, Suganuma M. Cancer Prevention with Green Tea and Its Principal Constituent, EGCG: from Early Investigations to Current Focus on Human Cancer Stem Cells. *Mol Cells*. 2018;41:73-82. (査読有)
7. Katsuya H, Shimokawa M, Ishitsuka K, Kawai K, Amano M, Utsunomiya A, Hino R, Hanada S, Jo T, Tsukasaki K, Moriuchi Y, Sueoka E, Yoshida S, Suzushima H, Miyahara M, Yamashita K, Eto T, Suzumiya J, Tamura K. Prognostic index for chronic- and smoldering-type adult T-cell leukemia-lymphoma. *Blood*. 2017 130:39-

47. (査読有)
8. Shindo T, Kitaura K, Ureshino H, Kamachi K, Miyahara M, Doi K, Watanabe T, Sueoka E, Shin-I T, Suzuki R, Kimura S. Deep sequencing of the T cell receptor visualizes reconstitution of T cell immunity in mogamulizumab-treated adult T cell leukemia. *Oncoimmunology*. 2017 Dec 11;7(3):e1405204. (査読有)
 9. 末岡 榮三朗, 柘植 薫 HTLV-1 関連疾患の診断と治療の進歩 HTLV-1 キャリア相談支援体制の現状 *日本内科学会雑誌* 106 巻, Page1383-1390, 2017 (査読無)
 10. Watanabe T, Sato A, Kobayashi-Watanabe N, Sueoka-Aragane N, Kimura S, Sueoka E Torin2 potentiates anti-cancer effects for adult T-cell leukemia/lymphoma by inhibiting mammalian target of rapamycin. *Anticancer Res*. 2016;36:95-102. (査読有)
 11. Fujiki H, Suganuma M, Watanabe T, Sueoka E. Progressive Insight into Tumor Promotion with Pro-inflammatory Cytokines. *SOJ Immunology*, 2016 (査読有)

[学会発表](計 20 件)

1. 嬉野 博志, 吉村 麻里子, 横尾 眞子, 進藤 岳郎, 久保田 寧, 安藤 寿彦, 小島 研介, 末岡 榮三朗, 木村 晋也 成人 T 細胞白血病における CONUT スコア及びモガムリズムマップが与える臨床的影響 *日本内科学会雑誌* (0021-5384)108 巻 Suppl. Page203(2019.02)
2. 渡邊達郎, 嬉野博志, 倉橋祐樹, 山下 聡, 牛島俊和, 末岡榮三朗, 木村晋也 DNA メチル化異常を標的とした成人 T 細胞白血病/リンパ腫の新規治療法の可能性 (Novel treatment strategy based on DNA methylation abnormalities for adult-T cell leukemia-lymphoma) 第 80 回日本血液学会学術集会 2018.10.12-14
3. 武藤 学, 豊岡 伸一, 松原 久裕, 秋田 弘俊, 三宅 智, 北川 雄光, 末岡 榮三朗 Precision Medicine の検証-遺伝子診断:ゲノム医療の実用化 臨床ゲノムと臨床情報の統合データベース事業 *日本癌治療学会学術集会抄録集* 56 回 Page S5Y1-4(2018.10)
4. 末岡 榮三朗, 中村 秀明, 佐藤 明美 グローバルデータシェアリング対応型次世代型バイオバンクの構築 *臨床病理* (0047-1860)66 巻補冊 Page122(2018.10)
5. Tatsuro Watanabe, Hiroshi Uresino, Satoru Yamashita, Toshikazu Ushijima, Eisaburo Sueoka, Shinya Kimura Abnormal CpG methylation around the transcription start sites as therapeutic target in adult-T cell leukemia-lymphoma 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association 2018.09.27-29
6. 安部 友範, 原田 陽平, 中島 千穂, 佐藤 明美, 末岡 榮三朗, 木村 晋也, 荒金 尚子 血中循環腫瘍 DNA は腫瘍進展と関連する(Circulating tumor DNA is associated with tumor progression *日本癌学会総会記事* (0546-0476)77 回 Page551(2018.09)
7. 中島 千穂, 安部 友範, 原田 陽平, 佐藤 明美, 中村 朝美, 小宮 一利, 末岡 榮三朗, 木村 晋也, 荒金 尚子 血漿遊離 DNA と細胞外小胞関連 DNA の関係についての探索 (Investigation of origin of circulating free DNA: Are extracellular vesicles the carrier?) *日本癌学会総会記事* (0546-0476)77 回 Page584(2018.09)
8. 末岡 榮三朗, 中村 秀明, 佐藤 明美 検体管理の自動化を志向した次世代型バイオバンクの構築 *日本臨床検査自動化学会会誌* (0286-1607)43 巻 4 号 Page529(2018.09)
9. 佐藤 明美, 中島 千穂, 安部 友範, 中村 秀明, 荒金 尚子, 木村 晋也, 末岡 榮三朗

- リキッド・バイオプシーにおける circulating free DNA の保存条件に関する検討 日本臨床検査自動化学会会誌 (0286-1607)43 巻 4 号 Page440(2018.09)
10. 中村秀明, 佐藤明美, 渡邊達郎, 末岡榮三朗 多項目自動血球分析装置 XN-9000 を用いた HTLV-1 感染者の細胞解析法についての検討 第 5 回日本 HTLV 1 学会学術集会 2018, 8, 31 - 9. 2
 11. 柘植薫, 豊田梨紗, 末岡榮三朗 妊婦健診における HTLV1 抗体検査陽性者相談体制の検討 当院外来受診妊婦に対する質問紙調査より 第 5 回日本 HTLV 1 学会学術集会 2018, 8, 31 - 9. 2
 12. 佐藤 明美, 中島 千穂, 安部 友範, 中村 秀明, 荒金 尚子, 木村 晋也, 末岡 榮三朗 Liquid biopsy のためのプレアナリシス段階の検体品質管理に関する検討 臨床化学 (0370-5633)47 巻 Suppl.1 Page304(2018.07)
 13. 本田 美穂, 西 眞範, 岡崎 智満, 海野 晃久, 吉原 由利重, 若山 一夫, 川崎 誠司, 末岡 榮三朗 Terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)陰性の T リンパ芽球性リンパ腫(T-Lymphoblastic Lymphoma;T-LBL)の一例 日本検査血液学会雑誌 (1347-2836)19 巻学術集会 Page S185(2018.06)
 14. 海野 晃久, 草場 香那, 本田 美穂, 岡崎 智満, 吉原 由利重, 若山 一夫, 川崎 誠司, 久保田 寧, 木村 晋也, 末岡 榮三朗 フローサイトメトリーにより治療経過を追跡しえた単一性上皮親和性腸症型 T 細胞リンパ腫の 1 例(会議録/症例報告) 日本検査血液学会雑誌 (1347-2836)19 巻学術集会 Page S152(2018.06)
 15. Sueoka E, Nakamura H, Watanabe T, Sato A, Kimura S, Yamashita S, Ushijima T, Comprehensive approach for eradication of Adult T-cell Leukemia-Lymphoma in Japan - prevention, translational research and clinical approach- The 14th Japan-Korea joint Symposium on Cancer and Ageing Research. 2018.05.31-06.02
 16. 佐藤 明美, 中島 千穂, 安部 友範, 中村 秀明, 加藤 潤一, 荒金 尚子, 木村 晋也, 末岡 榮三朗 遺伝子検査における Liquid biopsy 検体の管理・抽出・保存の最適化 日本臨床検査自動化学会会誌 (0286-1607)42 巻 4 号 Page445(2017.08)
 17. Kaoru Tsuge, Eisaburo Sueoka Demands of Counseling Supports for HTLV-1 Infected Pregnant Women in Japan 18th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses 2017, 3, 7 – 10
 18. Takero Shindo, Yasushi Kusunoki, Kazutaka Kitaura, Hiroyoshi Nishikawa, Nobukazu Watanabe, Hiroshi Ureshino, Masaharu Miyahara, Tatsuro Watanabe, Eizaburo Sueoka, Luis J Espinoza, Akiyoshi Takami, Tatsuo Ichinohe, Ryuji Suzuki, Hidenori Tanaka, Hiroh Saji, Shinya Kimura TCR Repertoire, Effector Regulatory T-cells and KIR Genotyping Uncover Immunological Dynamics in Mogamulizumab-treated ATL. 18th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses 2017, 3, 7 – 10
 19. 末岡 榮三朗 iPS バンクを含む国内のバイオバンクの現状と課題 日本のバイオバンク 現状と問題点、そして次世代バイオバンクの構築に向けて 臨床病理 (0047-1860)65 巻 2 号 Page190-198(2017.02)
 20. 中原 由利重, 若山 一夫, 本田 美穂, 大江 智満, 海野 晃久, 東谷 孝徳, 進藤 岳郎, 末岡 榮三朗 CD4 陰性 CD8 陰性を呈する成人 T 細胞白血病・リンパ腫(ATLL:リンパ腫型)の一例 日臨技九州支部医学検査学会 51 回 Page32(2016.10)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：成人T細胞性白血病・リンパ腫の発症・進行に強く関わる DNA メチル化亢進遺伝子群

発明者：渡邊達郎、末岡榮三郎、木村晋也、嬉野博志

権利者：佐賀大学法人

種類：特許

番号：特願 2019-037246

出願年：2019

国内外の別： 国内

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.hospital.med.saga-u.ac.jp/htmlv1.counselee/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：小島 研介

ローマ字氏名：Kensuke Kojima

所属研究機関名：佐賀大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 10332793

研究分担者氏名：荒金 尚子

ローマ字氏名：Naoko Aragane

所属研究機関名：佐賀大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 20321846

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。