

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591394

研究課題名(和文) 低悪性度ATLとHTLV-1キャリアの併合解析による中間群の抽出

研究課題名(英文) Extraction of an intermediate state between the healthy HTLV-1 carrier and indolent ATL.

研究代表者

塚崎 邦弘 (TSUKASAKI, KUNIHIRO)

独立行政法人国立がん研究センター・東病院・科長

研究者番号：40274659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：低悪性度ATLとHTLV-1キャリアを併合解析し、共通の病態を持つ中間群を抽出し、その境界領域の臨床的意義を見出すため、典型/非典型的キャリアとくすぶり型(S)ATLの末梢血を比較検討。CD25/CCR4発現細胞比率、HTLV-1プロウイルス量/クローナリティに相関があり、中間群はオーバーラップしたこの3因子を示した。低悪性度ATLの増悪様式につき臨床/分子病態で検討。増悪の際に全身状態の悪化、多臓器浸潤、LDH、Ca値異常が高頻度であり、一部同一症例の増悪を含むCと急性型のアレイゲノム/発現解析により其々ががん抑制遺伝子のCDKN2Aと免疫監視回避に重要なCD58の異常を同定。

研究成果の概要(英文)：To better understand indeterminate HTLV-1 carriers and indolent ATL, ATL-related biomarkers were examined in 57 indolent cases, including unusual carriers with a ATL-like cells. According to Southern blot hybridization analytic features, 28 pts with smoldering ATL could be divided into 3 groups consisting of 16 pts with a monoclonal band, 6 with oligoclonal bands and the remaining 6 with smears. Although no clinical differences were observed among the 3 subtypes, HTLV-1-infected CD4 T-cell counts increased in order of poly-, oligo- and monoclonal subtypes. This trend began in the carrier stage and also was observed in proviral load, CD25 and CCR4, indicating that a clone consisting of leukemic phenotypic cells was continuously growing. Then we evaluated clinical/molecular features in transformation of indolent ATL. Advanced PS, multi-organ involvement and high LDH/Ca values were frequent, and tumor suppressor genes and CD58 alterations were involved in the transformation.

研究分野：自然科学

科研費の分科・細目：血液内科学

キーワード：HTLV-1 キャリア ATL くすぶり型 多段階発がん 併合解析 中間群 低悪性度

1. 研究開始当初の背景

ATLとは:成人T細胞白血病リンパ腫(ATL)は日本では九州地方を主として発症する悪性度の高いCD4陽性ヘルパーT細胞性の白血病/悪性リンパ腫であり、全国で推定100万人存在するhuman T-lymphotropic virus type-I (HTLV-1)キャリアのうち毎年数千人に1人が本疾患を発症すると推定されている。世界では、ATL多発地域を中心に数千万人のキャリアが存在すると推測されているが、発症の詳細は不明である。HTLV-1の主な感染経路は母乳であり、現在日本の多発地域では母乳遮断の試みがなされつつあり、自然減と合わせてキャリア数は少なくとも日本では減少することが予測されてきた。しかし最近の献血者による調査では、九州や沖縄では減少傾向にあるものの、首都圏や中部地方などの都市部ではむしろキャリア数が増加傾向にあり、全体では1980年代とほぼ不変であることが報告されており、改めてATLに対する基礎・臨床両面からの研究の推進と治療法の開発の必要性が指摘されている。

ATLの臨床病態は多様であり、厚生省班のLymphoma Study Group分類により4病型に分類されている。高悪性度群である急性型とリンパ腫型は多剤併用療法にても極めて治療抵抗性であり、生存期間中央値は約8ヶ月であるのに対し、低悪性度群である慢性型とくすぶり型は2年生存率が52%、78%と高い。低悪性度群は無治療で経過観察されることが多いことから、診断から2年のうちに慢性型の5割、くすぶり型の2割程度が急性転化し、死亡していると推測される。

ATL研究の動向: 1980年に報告されたHTLV-1とATLの関連の発見は、レトロウイルスによるヒト発癌という新たな発癌メカニズムを提示した。その後臨床的には、ATLの病態の多様性の解明とHTLV-1の関連した新たな炎症性疾患群の発見が、また基礎的には、HTLV-1のTaxによるウイルスおよび宿主細胞遺伝子の活性化メカニズムの解明などがなされてきた。しかし患者体内でATL細胞の大多数はTaxを発現しておらず、最近発見されたHTLV-1 HBZ蛋白/RNAの関与を含めATLの発癌機構の多くは未解明である。着想にいたった経緯: 我々はこれまでHTLV-1感染からATL発症にいたる臨床的/分子生物学的な病態解析とATLの治療/予防につき研究を進めてきた。ATL患者と異なり、HTLV-1キャリアからウイルス感染細胞を純化して得ることは困難であったが、末梢血単核球をIL-2添加メチルセルロース培地で培養しコロニーを形成させることにより、低悪性度ATLとHTLV-1キャリアにおいてクローナルなウイルス感染T細胞集団を得る方法確立した(Hata T et al., *Leukemia*, 1999)。この解析法により健常キャリアでもHTLV-1感染細胞に複雑な染色体異常を認められた(Fujimoto T et al., *Cancer Genetics Cytogenetics*, 1999)。染色体分染法と10Mb

レベルのconventionalなcomparative genomic hybridization法による解析では、低悪性度から高悪性度ATLへの病勢進展に伴いcloneの多様性および染色体の不安定性は増大すること、本疾患の染色体異常の多くは白血病や悪性リンパ腫で高頻度に認めるbalanced相互転座ではなく増幅または欠失すなわちaneuploidyであることを明らかにした(Itoyama T et al., *Blood*, 2002)(Tsukasaki K et al., *Blood*, 2002)。また3割以上の症例で14q32や7q21-q35の増幅を、約2割の症例で6q14-qterの欠失を認め、癌遺伝子や癌抑制遺伝子の関与が推定された。さらには遺伝子の発現プロファイルをoligonucleotide arrayより網羅的に解析し、肝細胞増殖因子リガンド(c-Met)などのATLの病型進展に関連する細胞遺伝子群を同定した(Choi YL et al., *Oncogene*, 2006)。そのなかに細胞増殖に重要な遺伝子のほかに分裂checkpoint/aneuploidyに関わる遺伝子群の発現異常も認められた(Tsukasaki K et al., *Int J Cancer*, 2004)(Choi YL et al., *Oncogene*, 2006)。

低悪性度ATLとキャリアの区別は、くすぶり型ATLが他病変や高Ca/LDH血症がなく、末梢血に5%以上のATL細胞を有するか、皮膚・肺に組織学的病変を有することによった。しかしこのような形態的診断の標準化は困難な場合もあり、サザンプロット法によるHTLV-1プロウイルスの病変への単クローン性組み込みを重視することもある。この方法によればしかし、末梢血に5%未満のATL細胞があっても陽性となることがありPre-ATLとして報告してきた(Ikeda S, et al., *Blood*, 1993)。我々はこれまでにPre-ATLと低悪性度ATLについて研究を継続してきた。いずれも高悪性度ATLと比べると短期的予後は良好だが、長期予後は必ずしも良好ではなかった。多変量解析では予後因子は同定されなかった(Imaizumi Y, et al., *Blood*, 2005, Takasaki Y, et al., *Blood*, 2010)。一方キャリアについては、我々を含む大規模な日本でのコホート研究により、1218例中14例がATLを発症し、そのリスクとしては多変量解析でATLの家族歴年齢などと共に同定されたHTLV-1ウイルス量が最も重みがあった(Iwanaga M, et al., *Blood*, 2010)。

以上より、本疾患の多段階発がんの中期をより詳細に解析するために、低悪性度ATLとHTLV-1キャリアを併合解析し、共通の病態を持つ中間群を抽出するという着想を得た。そのために、低悪性度ATLは後方視的に解析し急性転化(急性型へ病型が移行すること)の遅速により2群とする。キャリアについてはそのATL発症の最強リスクとして最近同定されたウイルス量の高低で2群に分ける。そして4群を比較し、高ウイルス量キャリアと急性転化リスクの低い低悪性度ATLの類似性を見出すことにより、ATL多段階発がんの臨床的指標であるキャリアと

低悪性度 ATL という峻別ではなくその境界領域の臨床的意義を見出すことを目指す。

2. 研究の目的

低悪性度 ATL と HTLV-1 キャリアを併合解析し、共通の病態を持つ中間群を抽出する。そのために、低悪性度 ATL は後方視的に解析し急性転化の遅速により 2 群とする。キャリアについてはその ATL 発症の最強リスクとして最近同定されたウイルス量の高低で 2 群に分ける。そして高ウイルス量キャリアと急性転化リスクの低い低悪性度 ATL の類似性を見出すことにより、ATL 多段階発がん過程を病型分類によりキャリアと低悪性度 ATL とに峻別するのではなく、その境界領域の臨床的意義を見出すことを目指している。

健常 HTLV-1 キャリアと低悪性度 ATL の検体を収集し、その臨床データを用いて中間群を抽出する。さらにはその中から高悪性度 ATL へ転化するときの、臨床および分子病態を解明する。

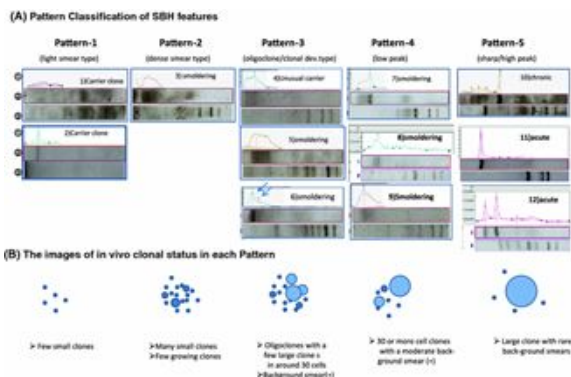
3. 研究の方法

1) 17 例の典型的キャリア、12 例の非典型的キャリア (ATL 様細胞が末梢血に 5%前後) と 28 例のくすぶり型 ATL の末梢血を比較検討した。CD25、CCR4 ほかの表面抗原の発現細胞比率、HTLV-1 プロウイルス量、サザンプロット法による HTLV-1 のクローナリティ (Poly, Ologo, Mono) について解析した。

2) 低悪性度 ATL が高悪性度 ATL へ転化するときの臨床病態の変化について、病型分類の基準に用いられている臓器浸潤、検査値異常また、全身状態の推移を評価した。さらにはその分子病態を解明するために、一部同一症例の増悪を含む慢性型と急性型 ATL 患者の白血球細胞の DNA と RNA を用いてアレイゲノムとアレイ発現の解析を行った。

4. 研究成果

1) CD25 と CCR4 発現細胞比率、HTLV-1 プロウイルス量、サザンプロット法による HTLV-1 のクローナリティ (Poly, Ologo, Mono) に相関があり、くすぶり型 ATL と非典型的キャリアのそれぞれ一部は、オーバーラップした表面形質、ウイルス量、クローナリティを示すことが明らかとなった。ただしその特徴の下限・上限は、それぞれ典型的キャリア、典型的くすぶり型と連続性があることも明らかとなった (下図参照: Int J Hematol, 5:399-408, 2012)。



2) 慢性型 (C) またはくすぶり型 (S) ATL の 90 例中 44 例が Watchful waiting 中に高悪性度の急性型 ATL に増悪した。その際 PS の悪化を伴っていた症例を 17 例認めた。増悪時の所見は、主要臓器浸潤 21 例、高 Ca 血症 8 例、血清 LDH 高値 30 例 (S 型 6 例、C 型 24 例)、リンパ節病変 29 例で、それぞれ認められた (重複あり)。増悪時に複数の所見が陽性であった症例は 38 例で、単独の所見のみ陽性であった症例は 6 例 (臓器浸潤 2 例、高 Ca 血症 1 例、リンパ節病変 3 例) であった。S 型は増悪時に LDH 上昇を伴わない症例が多かった (8/14) が C 型では大多数の症例 (26/30) で LDH 上昇を伴っていた。ATL の診断から増悪までの期間の中央値は 18.4 カ月 (0.2-208.2 カ月)、増悪後の生存期間中央値は 7.6 カ月 (0.0-180.7 カ月) であった。S 型・C 型 ATL では、急性転化時には約 40% の症例で PS の悪化を伴っており、その後の予後は不良であった。分子病態解析では、一部同一症例の増悪を含む慢性型と急性型のアレイゲノムとアレイ発現の解析によって、それぞれ細胞周期に重要ながん抑制遺伝子の CDKN2A と免疫監視からの回避に重要な CD58 の異常が同定された。

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 6 件)

1. Tsukasaki K, Imaizumi Y, Tokura Y, Ohshima K, Kawai K, Utsunomiya A, Amano M, Watanabe T, Nakamura S, Iwatsuki K, Kamihira S, Yamaguchi K, Shimoyama M. Meeting report on the possible proposal of an extranodal primary cutaneous variant in the lymphoma type of adult T-cell leukemia-lymphoma. J Dermatol. 41(1):26-8, 2014.

2. Tsukasaki K, Tobinai K. Biology and treatment of HTLV-1 associated T-cell lymphomas. Best Pract Res Clin Haematol, 26:3-14, 2013.

3. Tsukasaki K, Tobinai K, Hotta T, Shimoyama M.: Lymphoma study group of JCOG. Jpn J Clin Oncol, 42:85-95, 2012.

4. Katsuya H, Yamanaka T, Ishitsuka K,

Utsunomiya A, Sasaki H, Hanada S, Eto T, Moriuchi Y, Saburi Y, Miyahara M, Sueoka E, Uike N, Yoshida S, Yamashita K, Tsukasaki K, Suzushima H, Ohno Y, Matsuoka H, Jo T, Suzumiya J, Tamura K. Prognostic index for acute- and lymphoma-type adult T-cell leukemia/lymphoma. *J Clin Oncol*, 30:1635-40, 2012.

5. Kamihira S, Iwanaga M, Doi Y, Sasaki D, Mori S, Tsurda K, Nagai K, Uno N, Hasegawa H, Yanagihara K, Morinaga Y, Tsukasaki K, Taniguchi H. Heterogeneity in clonal nature in the smoldering subtype of adult T-cell leukemia: continuity from carrier status to smoldering ATL. *Int J Hematol*, 5:399-408, 2012.

6. Ishida T, Joh T, Uike N, Yamamoto K, Utsunomiya A, Yoshida S, Saburi Y, Miyamoto T, Takemoto S, Suzushima H, Tsukasaki K, Nosaka K, Fujiwara H, Ishitsuka K, Inagaki H, Ogura M, Akinaga S, Tomonaga M, Tobinai K, Ueda R. Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody (KW-0761) for relapsed adult T-cell leukemia-lymphoma: a multicenter phase II study. *J Clin Oncol*, 30:837-42, 2012.

〔学会発表〕(計 15 件)

1. Imaizumi Y, Ogura M, Uike N, Asou N, Utsunomiya A, Uchida T, Aoki T, Tsukasaki K, Taguchi J, Choi I, Maruyama D, Nosaka K, Chen N, Shiota T, Tobinai K: Phase I dose-escalation study of Lenalidomide in relapsed patients with ATL or PTCL. 第 75 回日本血液学会学術集会, 札幌, 2013.

2. Uozumi K, Ishida T, Jo T, Suzushima H, Takemoto S, Yamamoto K, Uike N, Saburi Y, Nosaka K, Utsunomiya A, Tobinai K, Fujiwara H, Ishitsuka K, Yoshida Y, Taira N, Moriuchi U, Imada K, Miyamoto T, Tsukasaki K, Tomonaga M, Ueda R: Randomized Phase study of mLSG15 plus mogamulizumab vs mLSG15 alone for untreated, aggressive ATL. 第 75 回日本血液学会学術集会, 札幌, 2013.

3. Utsunomiya A, Takashi Ishida, Tsukasaki K, akahashi T, Ogura M: Change in NK cell number and activity resulting from first-line chemotherapy for ATL/PTCL. 第 75 回日本血液学会学術集会, 札幌, 2013.

4. Makiyama J, Imaizumi Y, Taniguchi H, Sawayama Y, Imanishi D, Taguchi J, Suzushima H, Hata T, Tsukasaki K, Miyazaki Y: Re-evolution of VCAP-AMP-VECP in clinical for aggressive adult T-cell leukemia lymphoma. 第 75 回日本血液学会学術集会, 札幌, 2013.

5. Taniguchi H, Hasegawa H, Imaizumi Y, Tsukasaki K, Mori N, Miyazaki

Y: NVP-AUY922, a heat shock protein 90 inhibitor, has potent antitumor activity in adult T-cell leukemia lymphoma. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013.

6. Yoshida N, Karube K, Utsunomiya A, Tsukasaki K, Imaizumi Y, Taira N, Uike N, Umino A, Arita K, Katayama M, Tsuzuki S, Ohsima K, Seto M: Cell cycle-related gene alterations are involved in transformation of chronic ATL. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013.

7. Takemoto S, Ishida T, Jo T, Uozumi K, Suzushima H, Yamamoto K, Uike N, Saburi Y, Nosaka K, Utsunomiya A, Tobinai K, Fujiwara H, Ishitsuka K, Yoshida S, Taira N, Moriuchi Y, Imada K, Miyamoto T, Tsukasaki K, Tomonaga M, Ueda R. Combination of Mogamulizumab (KW-0761) with VCAPAMPVECP (MLSG15) is well tolerated and effective as an initial therapy for against Adult T-cell Leukemia Lymphoma (ATL). 12th international conference on malignant lymphoma, Lugano, 2013.

8. 吉田雅明、加留部謙之輔、宇都宮與、塚崎邦弘、今泉芳孝、平良直也、鶴池直邦、海野啓、在田幸太郎、片山幸、都筑忍、大島孝一、瀬戸加大: Cell cycle 関連遺伝子の異常は慢性型 ATLL の急性転化に關与する. 第 53 回日本リンパ網内系学会, 京都, 2013.

9. 牧山純也、今泉芳孝、谷口広明、森脇裕司、澤山靖、今西大輔、田口潤、對馬秀樹、波多智子、塚崎邦弘、宮崎泰司: 当科における高齢者成人 T 細胞白血病・リンパ腫の診療実態と治療成績. 第 53 回日本リンパ網内系学会, 京都, 2013.

10. Maruyama D, Ogura M, Imaizumi Y, Uike N, Asou N, Utsunomiya A, Uchida T, Aoki T, Tsukasaki K, Taguchi J, Choi I, Shiota T, Nosaka K, Chen N, Tobinai K. Phase Dose -Escalation Study of Lenalidomide in Relapsed Patients with Adult T-cell Leukemia-Lymphoma (ATL) or Peripheral T-cell Lymphoma (PTCL). 5th Annual T-cell Lymphoma Forum, San Francisco, 2013.

11. Uike N, Ogura M, Imaizumi Y, Asou N, Utsunomiya A, Uchida T, Aoki T, Tsukasaki K, Taguchi J, Choi I, Maruyama D, Nosaka K, Chen N, Shiota T, Tobinai K. Multicenter Phase I Dose-Escalation Study of Lenalidomide in Patients with Relapsed Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma (ATL) or Peripheral T-Cell Lymphoma (PTCL). *Blood*. 120: 2737, 2012. 54th ASH Annual Meeting, Atlanta, 2012.

12. Hasegawa H, Tsukasaki K, Miyazaki Y, Kamihira S. CD26 antigen acts as a predictive biomarker in the evolution of ATL: continuity from carrier status to smoldering ATL. 第 71 回日本癌学会学術総

会,札幌,2012.

13. Hasegawa H, Tsukasaki K, Tsuruda K, Sasaki D, Doi Y, Mori S, Ishihara K, Nagai K, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kamihira H. CD26 antigen act as a predictive biomarker in the evolution from early to overt smoldering ATL. 京都, 第 74 回日本血液学会学術集会, 2012.

14. Imaizumi Y, Tsukasaki K, Tsushima H, Matsuo M, Sasaki D, Hasegawa H, Kamihira S, Niini D, Ohshima K, Miyazaki Y. Lymphoma cases without detectable monoclonal HTLV-1 integration in HTLV-1 carrier. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.

15. Ishihara K, Tsukasaki K, Hasegawa H, Sasaki D, Tsuruda K, Inokouchi N, Nagai K, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kamihira S. Impact of miR-155 and miR-126 as novel biomarkers on the assessment of disease progression in ATL. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.

〔図書〕(計 2 件)

1. Tsukasaki K, Tobinai K. [Rare Lymphomas] 8. Adult T-cell Leukemia Lymphoma. Editor: Martin Dreying, Maicheal E. Williams. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014.

2. Tsukasaki K, Tobinai K. [T-cell Lymphomas] 8. HTLV-1-Assorted T-cell Diseases. Editor: Francine Foss. Springer Science/Business Media New York 2013.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚崎 邦弘 (TSUKASAKI, Kunihiro)
独立行政法人国立がん研究センター・東
病院・科長
研究者番号：40274659

(2) 研究分担者

今泉 芳孝 (IMAIZUMI, Yoshitaka)
長崎大学・大学病院・助教
研究者番号：20404305

(3) 連携研究者

()

研究者番号：