

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790553

研究課題名(和文)成人T細胞白血病/リンパ腫の多段階発癌機構に基づく検査法への応用

研究課題名(英文) Application to laboratory procedure based on the multistep tumorigenic events in adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL)

研究代表者

佐藤 妃映 (Sato, Hiaki)

岡山大学・保健学研究科・助教

研究者番号：70362960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：成人T細胞白血病/リンパ腫(ATLL)の多段階発癌機構を解明するために、ATLLにおける癌性幹細胞の存在の有無と造血細胞特異的なSHP1に焦点をあて、解析を行った。

免疫染色において、各種ATLL関連細胞株では、SHP1や腫瘍関連遺伝子群の発現が低下していた。次に、methylation specific PCR(MSP)法を用いて検討したところ、これは異常DNAメチル化に起因することがわかった。さらに、特徴的な異常DNAメチル化プロファイルを認め、メチル化異常が病態に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed to clarify the multistep tumorigenic events in adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL) by focusing on SHP1. SHP1 is a nonreceptor type protein-tyrosine phosphatase, which acts as a negative regulator in hematopoietic cells. In immunostaining, the expression of SHP1 and tumor-related genes decreased in various ATLL-related cell lines. By performing methylation specific PCR (MSP) assay, we detected aberrant methylation of SHP1 and these genes. Moreover, we identified specific aberrant DNA methylation profile in ATLL-related cell lines. Our findings demonstrate that the presence of aberrant methylation is deeply involved in the development and progression of ATLL in multistep leukemogenesis.

研究分野：病理検査学

キーワード：成人T細胞白血病/リンパ腫(ATLL) SHP1

### 1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (ATLL) は、原因ウイルスとして HTLV-1 が同定されており、ウイルスキャリア数は現在 108 万人といわれている。40~60 年という長い潜伏期間を経て、そのうちの約 5% が発症し、急性型・リンパ腫型・慢性型・くすぶり型に分類される極めて予後不良な疾患である。しかしながら、この多段階発癌機構について詳細は明らかとなっていない。さらに、非常に難治性のため、有効な治療法や早期診断を可能にする検査法が望まれている。

本研究では、チロシンホスファターゼである SHP1 に注目した。SHP1 は、細胞増殖等において抑制性のシグナル伝達に関与し、その発現低下により悪性リンパ腫や白血病が発症すると報告されている。

### 2. 研究の目的

ATLL の多段階発癌機構を解明し、ATLL 発症高度危険群を同定する検査法と有効な治療法の開発を目的としている。そのために、ATLL における癌性幹細胞の存在の有無と造血細胞特異的な SHP1 に焦点をあて、検討を行った。

### 3. 研究の方法

ATLL 関連細胞株を用いて、腫瘍細胞に特異的マーカーの検索と癌性幹細胞存在について検討した。

ATLL 腫瘍細胞における SHP1 を含む悪性腫瘍関連遺伝子の発現の検討を行った。悪性腫瘍関連遺伝子として、癌抑制遺伝子 (p15, p16, p73)、DNA 修復酵素関連遺伝子 (hMLH1, MGMT)、アポトーシス関連遺伝子 (DAPK)、細胞接着 (カドヘリン) 関連遺伝子 (HCAD) を解析した。

ATLL 腫瘍細胞における SHP1 を含む悪性腫瘍関連遺伝子の発現調節機構として、異常 DNA メチル化の関与について検討した。というのは、DNA メチル化を検出する methylation specific PCR (MSP) 法は、 $10^4 \sim 10^6$  個に 1 個の割合で存在するメチル化を有するリンパ球 (腫瘍細胞) を検出でき、非常に高感度で安定した技術のため、検査法への応用が期待できるからである。

臨床検体 (ATLL 患者の末梢血検体) を用いて、異常 DNA メチル化の解析を行った。

### 4. 研究成果

性質や由来が異なる各種 ATLL 関連細胞株において、数種のフェノタイプマーカーの発現レベルを検討した。その結果、腫瘍細胞の大部分は、CD4、CD25、Foxp3 陽性となり、制御性 T 細胞フェノタイプを示した。他の悪性

腫瘍において癌性幹細胞に特異的マーカーであると報告されている CD44、CD133、ALDH3、ALDH5 等に陽性を示す細胞は認めず、明らかな癌性幹細胞を同定できなかった。このことから、ATLL は、他の悪性腫瘍とは発癌機構が異なる可能性が示唆される。

正常リンパ節組織、各種 ATLL 関連細胞株における SHP1 発現は、免疫染色 (酵素抗体法、2 重蛍光染色法) を用いて解析した。通常 SHP1 は細胞膜上に存在し、増殖等を抑制する機能を有する。正常成熟リンパ球が陽性となり、休止期にあることを示した。これに対して、腫瘍細胞では発現が低下し、増殖能の亢進を示唆した。しかし、ATLL 関連細胞株では SHP1 陽性を認めるものも存在し、正常リンパ球とは局在が異なっていることがわかった。この SHP1 の局在の違いがどのような機序により生物学的差異に影響があるのかどうか、今後検討を重ねていきたい。

次に、SHP1 の他に、悪性腫瘍関連遺伝子のタンパク発現を検討したところ、ATLL 関連細胞株では発現が低下或いは全く発現を認めなかった。

各種 ATLL 関連細胞株では、SHP1 や悪性腫瘍関連遺伝子群の発現が低下していた。この発現低下の機序として、エピジェネティクス制御機構の DNA メチル化に着眼した。そこで、各種 ATLL 関連細胞株における SHP1 と悪性腫瘍関連遺伝子群異常の異常 DNA メチル化について検討した。その結果、HTLV-1 不死化細胞株 (IWA1, IWA3) よりも、特に ATLL 患者の白血病細胞由来 T 細胞株 (ATL-43Tb, ATL55T, ED40515) では、SHP1 と悪性腫瘍関連遺伝子群に異常 DNA メチル化を高頻度に認めた。(図 1、図 2、図 3) また、特徴的な異常 DNA メチル化プロファイルを認め、メチル化異常が病態に関与していることが示された。(図 2) このことから、ATLL 細胞関連細胞株は、ATLL 発症におけるエピゲノム異常を解析するモデル系として、有用であることも示唆される。

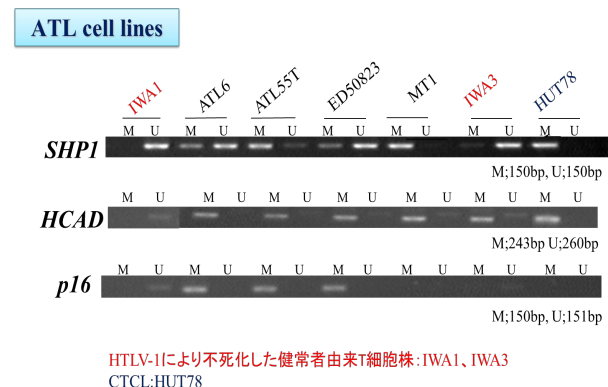


図 1 : MSP 電気泳動結果  
ATLL 関連細胞株における、各遺伝子の異常

DNA メチル化の有無を示す。  
HTLV-1 不死化細胞株 (IWA1, IWA3) は、HTLV-1 キャリアの状態に該当する。

Methylation profile in ATL cell lines								
cell line	SEPF	p15	p16	p73	MLL1	DAPK	PCAD	CIMP
ATL患者の白血病細胞由来細胞株	ATL-47b		**			*	*	*
	ATL-377		*					*
	ED9803		*					*
% methylation	100% (3/3)	67% (2/3)	67% (2/3)	67% (2/3)	0% (0/3)	100% (3/3)	100% (3/3)	100% (3/3)
ATL患者由来細胞株	HT-Ma	*	**			*	*	*
	MT-1		**					*
	TU-Oml		*					*
	ATL-18		*			*	*	*
% methylation	100% (4/4)	25% (1/4)	30% (2/4)	40% (2/4)	0% (0/4)	100% (4/4)	100% (4/4)	100% (4/4)
ATL患者の非白血病細胞由来細胞株	ATL-67		*					*
	ATL-377		*					*
	TO36TEM		*					*
	ED9803		*					*
	ATL-6		*					*
% methylation	80% (4/5)	20% (1/5)	80% (4/5)	20% (1/5)	0% (0/5)	20% (1/5)	100% (5/5)	67% (4/5)
HTLV-1により不死化した健康帯血由来細胞株	MT-4	*	*					*
	MT-2	*	*					*
% methylation	100% (2/2)	100% (2/2)	50% (1/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	100% (2/2)	100% (2/2)
正常細胞由来株	HT-A1							
	HT-A3							
% methylation	50% (1/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	30% (1/2)	0% (0/2)
CTCL	MT-9	*	**	*		*	*	*
% methylation	100% (3/3)	1% (1/3)	0% (0/3)	100% (3/3)	0% (0/3)	100% (3/3)	100% (3/3)	100% (3/3)

ATL患者の白血病細胞由来細胞株で、DNAメチル化を示す遺伝子群が増加している。

図2：各種 ATLL 関連細胞株における8種類の遺伝子の異常 DNA メチル化の有無を示す。メチル化を有する場合、水色で示す。

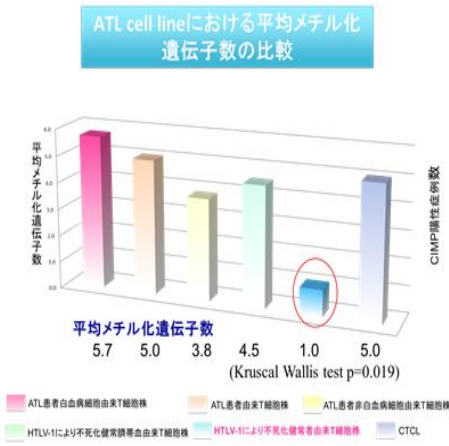


図3：各種 ATLL 関連細胞株における平均メチル化遺伝子数を示す。

ATL 患者の白血病細胞由来 T 細胞株では 5.7 個、ATL 患者由来 T 細胞株では 5.0 個、ATL 患者の非白血病細胞由来 T 細胞株では 3.8 個、HTLV-1 により不死化した健康帯血由来 T 細胞株では 4.5 個となるのに対し、HTLV-1 により不死化した健康者由来 T 細胞株では 1.0 個、CTCL では 5.0 個となり、有意な差を認めている。

臨床検体を用いた異常 DNA メチル化の解析においても、各臨床病期 (HTLV-1 感染キャリア、くすぶり型、慢性型、リンパ腫型、急性型) において、特徴的な異常 DNA メチル化プロファイルを認め、DNA メチル化異常が病態に関与している可能性が示された。

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0件)

[学会発表](計5件)

佐藤妃映、岡 剛史、神農陽子、鷲尾佳奈、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 HTLV-1 学会学術集会、東京大学医科学研究所(東京都港区)2014 年 8 月 22~24 日

佐藤妃映、岡 剛史、神農陽子、鷲尾佳奈、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 54 回日本リンパ網内系学会総会、山形国際ホテル(山形県山形市)2014 年 6 月 20~21 日

佐藤妃映、岡 剛史、神農陽子、鷲尾佳奈、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 103 回日本病理学会総会、広島国際会議場(広島市中区)2014 年 4 月 24~26 日

佐藤妃映、岡 剛史、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 6 回 HTLV-1 研究会・合同班会議、東京大学医科学研究所(東京都港区)2013 年 8 月 22~24 日

佐藤妃映、岡 剛史、Abd Al-Kader Lamia、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 回日本病理学会総会、ロトイン札幌(北海道札幌市)2013 年 6 月 6 日~8 日

[図書](計0件)

[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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

佐藤 妃映 (SATO, Hiaki)  
岡山大学・大学院保健学研究科・助教  
研究者番号：70362960

##### (2) 研究分担者

該当ありません。

##### (3) 連携研究者

該当ありません。