

博士論文

成人 T 細胞白血病におけるエピゲノム異常の包括的解析
及びその機能的意義の解明

藤川 大

1. 目次

1. 目次	p.1
2. 略語集	p.2~3
3. 背景	p.4~10
4. 目的	p.10
5. 実験材料、方法	p.11~26
6. 結果	p.27~42
7. 考察	p.43~55
8. 総括	p.56
9. 謝辞	p.57
10. 参考文献	p.58~72
11. 図表	p.73~114

2. 略語集

ATL: adult T-cell leukemia

Aza-dC: 5-aza-2-deoxycytidine

BSA: bovine serum albumin

CTL: cytotoxic T-lymphocyte

DMEM: Dulbecco's modified eagle medium

DMSO: dimethyl sulfoxide

DZNep: 3-Deazaneplanocin A

HAM/TSP: HTLV-1 associated myelopathy / tropical spastic paraparesis

HTLV-1: human T-cell leukemia virus type 1

HEK: human embryonic kidney

H3K27me3: histone H3 lysine 27 trimethylation

IP: immunoprecipitation

IRES: internal ribosome entry site

LTR: long terminal repeat

MQ: MilliQ water

NMD: nonsense mediated mRNA decay

PBMC: peripheral blood mononuclear cell

PBS: phosphate buffered saline

PFA: paraformaldehyde

PHA: phytohaemagglutinin

rpm: rotation per minute

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SAHA: suberoylanilide hydroxamic acid

SIN: self inactivating

TE: Tris-EDTA

WT: Wild type

3. 背景

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1)、成人 T 細胞白血病 (ATL) とは

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) は δ レトロウイルス属に属するウイルスで、1980 年に人に感染する初のレトロウイルスとして発見された (1)。感染後約 50 年という長期潜伏感染期間を経て成人 T 細胞白血病 (ATL) を起こすこと、HTLV-1 関連脊髄症 (HAM/TSP)、HTLV-1 ぶどう膜炎 (HU) の原因ウイルスであることが知られている (2, 3)。HTLV-1 感染者の生涯を通じた ATL 発症可能性は男性が 6-7%、女性が 2-3%、HAM の発症可能性は 0.25% であり、大半の HTLV-1 感染者は無症候性である (4, 5)。世界的には 500-1000 万人、国内には 108 万人の HTLV-1 感染者がいると推測されており、今後国内の 100 万人超の感染者から約 5 万人が ATL、約 3 千人が HAM/TSP、約 1 千人が HU を発症すると考えられている (6, 7)。

ATL は 1977 年に報告された末梢性成熟 T 細胞の白血病/リンパ腫である (8)。病態から急性型、リンパ腫型、慢性型、くすぶり型の 4 つに分類される (9)。ATL の症状は非常に多彩であり、白血球増多、T 細胞の機能不全による日和見感染、高カルシウム血症による意識障害、腫瘍細胞の浸潤が原因のリンパ節腫脹、肝腫大、脾腫大、皮疹などがある。ATL の病状の多彩さと症例間の病状の幅広さが特徴となっている。ATL はその約 7 割が白血病の病態を示すが、悪性リンパ腫が白血病化したものにとらえられている。初発の高悪性度 ATL に対しての標準的初回化学療法として mLSG15 が用いられているが、生存期間中央値が 12.7 か月と他の造血器腫瘍と比べても予後が悪い (10)。初回治療例の場合約 7 割で寛解状態となるが、無増悪生存期間の中央値が 7 か月と再発が早く、再発時の治療抵抗性が問題となっている。現状、造血幹細胞移植以外に長期間寛解を維持できる治療法は確立されていないが、造血幹細胞移植が有効な患者は全体

の30%程度であり、生存期間中央値は6か月程度である(11)。また、ATL患者は発症年齢が高いため、移植の適応とならない患者も多く、ATLの病態を反映した治療薬の開発が喫緊の課題である。2012年、ATLに対するヒト化抗CCR4抗体が国産初のがんに対する抗体医薬として発売された。再発難治性ATLに対する第2相試験において単剤で26例中13例において完全寛解もしくは部分寛解という有望な成績を残しているが、ATL患者の約9割がCCR4陽性である事実から期待された奏効率とは乖離がある(12、13)。奏功した患者も早期に再発しており、依然として治癒は困難である。mLSG15と抗CCR4抗体の併用療法ではmLSG15のみに比べて、より高い奏効率を達成できていることから(14)、標的の異なる様々な薬剤、治療法との併用により相乗的な効果が期待され、更なる新規治療薬開発と、そのためのATL細胞の分子生物学的な理解や薬剤耐性メカニズムの理解が必須であると考えられる。一方、悪性度の低いくすぶり型、予後不良因子を有さない慢性型については国内では無治療経過観察という方針がとられている。2010年に、米国、英国、仏国の3か国でのATL治療の後ろ向き研究から低悪性度ATLに対しAZT/IFN療法が有効であり、5年生存率100%という調査報告がなされた(15)。これを受けて国内においてもAZT/IFNの臨床試験が進行中であるが(JCOG1111)、この後ろ向き研究での治療方法の選択における不明瞭な点や、少ない患者数で結論付けることへの疑問、比較に用いられた化学療法の成績の悪さが指摘されており、その効能を疑問視する声もある(16)。従って、低悪性度ATLに対する積極的な治療法の確立、また、HTLV-1無症候性キャリアに対する発症予防法の確立はなされているとは言えず、ATLに対し有効な治療標的の探索、発症メカニズムの解明、HTLV-1による細胞の不死化、腫瘍化メカニズムの基礎的な理解が求められている。

HTLV-1は2つのLong Terminal Repeat (LTR) に挟まれた9.5 kbの長さの

ゲノム中に、ウイルスの構造タンパク質である Gag、Pro、Pol、Env に加え、pX 領域に Rex、p30、p13、p12、p8、そして Tax の 6 つのアクセサリータンパク質と、アンチセンス鎖側から発現する HBZ を有している (17)。Rex はウイルス由来 RNA を核外に輸送することや NMD を抑制すること (18、19)、p30 は Tax と競合し LTR からの転写を抑制すること、また翻訳を阻害しウイルスの潜伏化に関与すること (20)、p13 は p30 の一部が分解されてできるタンパク質であり、p30 同様 Tax による LTR の活性化を抑制すること (21)、p12、p8 は MHC class I の発現を低下させ免疫系からの回避に寄与することや STAT5 の活性化に寄与することが明らかにされている (22、23)。HBZ は *hTERT* や JunD、TGF- β の活性化を介して、また、Tax による NF- κ B、AP-1、Wnt の過剰な活性化を抑制し細胞老化を抑制することで、細胞増殖に有利に働くことが報告されている (24-29)。

Tax に注目する 3 つの理由

Tax の重要性はこれまで様々な形で示されてきている。例えば、Tax トランスジェニックマウスが ATL 様の白血病 / リンパ腫を発症すること (30、31)、Tax 特異的樹状細胞の活性化が ATL 患者に対し有効である可能性が示されたこと (32)、くすぶり型、慢性型に効果があると報告された AZT/IFN は、Tax の発現抑制により抗腫瘍効果を発揮する可能性があること (33)、Tax に対する反応性の低さが ATL 発症のリスク因子である可能性 (34) などである。

HTLV-1 腫瘍化因子 Tax は HTLV-1 ゲノムの pX 領域にコードされる分子量約 40 kDa のリン酸化タンパク質である。Tax の主な機能としては LTR からのウイルス遺伝子発現の増強と、CREB/ATF など知られているだけで 100 種類を超える宿主細胞タンパク質との相互作用を介した、宿主細胞遺伝子発現や細胞

内シグナルの攪乱が明らかにされている (35、36)。これらの分子生物学的な知見は、Tax が強く発現する HTLV-1 感染初期において感染細胞の増殖や生存に有利に働くことを強く示唆している。加えて、Tax の遺伝子導入により T 細胞が不死化すること、Tax トランスジェニックマウスが ATL 様白血病、リンパ腫を発症することから、Tax が ATL の発症において中心的な役割を果たすことが明確に示されている。一方、Tax は免疫応答を惹起するため、Tax を発現する細胞は細胞障害性 T 細胞 (CTL) の標的となり、宿主免疫により体内から排除されるというデメリットもある (37)。実際、ATL 患者から採取された直後の細胞においては、Tax の発現はウェスタンブロットでの検出限界以下であるが、培養により CTL やインターフェロンによる抑制を受けなくなると Tax の発現が検出されることが報告されている (37-39)。また、ATL 患者の HTLV-1 の配列を調べると Tax の変異や LTR の欠損、DNA のメチル化による抑制が認められることから、腫瘍化の後期段階や ATL 細胞において Tax 非依存的な影響が強くなると考えられている (40)。

ATL の多段階発癌モデル

ATL はその発症年齢の分布から、独立した 5 ないし 6 の事象の蓄積によって発症するという多段階発癌モデルが提唱されている (41)。全ての HTLV-1 感染細胞が腫瘍化するわけではなく、HTLV-1 感染者の一部が ATL を発症することからも、このモデルが妥当であると考えられる。ATL 発症前期では HTLV-1 感染による影響が強く、Tax などウイルスタンパク質依存的なシグナル伝達経路の活性化や、細胞周期制御因子の不活化などにより細胞増殖に有利に働くことで腫瘍化へのリスクを高めている時期ととらえられる。内的要因として報告されている特定の HLA 型との関連性が強く影響するものと考えられる (42)。ATL

の発症後期の事象としては、増殖能の獲得、免疫系からの回避などがあり、これまでに報告されている機構としては CDKN2A、p53 の変異のようなゲノムの異常や、後述する DNA のメチル化の蓄積によるものだと考えられている (43、44)。

HTLV-1 感染細胞は、HTLV-1 のゲノムへの挿入部位から感染クローンを識別することが可能であるため、多段階発癌やクローン進化のモデルとして非常に有用であり、inverse PCR や次世代シーケンサーによる解析によりクロナリティーの解析が行われている (45、46)。無症候性キャリアの段階ではサイズの小さかったクローンが、ATL を発症した際には感染細胞の過半数を占める例も報告されており、クローンの進化を捉える研究が進められている (47)。これらの結果を踏まえ、現在は、HTLV-1 感染 T 細胞、樹状細胞、マクロファージから HTLV-1 の感染が広がり、感染した一部の T 細胞が不死化、増殖して感染クローンを形成し、ゲノム、エピゲノムの変化や加齢による影響などが積み重なっていくことでポリクローナル、オリゴクローナルに感染クローンが増殖し、最終的に変異の蓄積したクローンがモノクローナルな増殖をして、ATL を発症すると考えられている (17、48、49)。

ATL におけるエピジェネティックな異常

近年 DNA のメチル化に加えて、ヌクレオソームを構成するヒストンタンパク質がメチル化、アセチル化、ユビキチン化などの修飾を受けること、これらの修飾がクロマチンの凝集やタンパク質結合の足場として機能し、遺伝子発現の維持や制御に重要な役割を果たすこと、また、細胞分裂を経ても維持される遺伝情報として機能することが明らかにされてきた (50-53)。このような DNA 配列に変化を生じずに遺伝子発現を調節し、それを維持する機構はエピジェネティック

スと呼ばれている。X 染色体の不活化や発生段階での遺伝子発現制御など同一のゲノムを持つ細胞が別々の表現型を示すのが本来のエピジェネティクスの機能によるものである。このような本来の機能に加えて、様々な悪性腫瘍においてエピジェネティクスの異常が遺伝子発現を攪乱し、癌細胞の性状や悪性度に関与していることが明らかとなってきた。ATL 細胞においても LTR のメチル化、病型の進行に伴う CDKN2A の DNA のメチル化の蓄積やその他の細胞周期制御因子 CDKN2B、CDKN1A の DNA のメチル化が報告されている (40、54)。

当研究室の先行研究により、抑制的なヒストン修飾、ヒストン H3 の 27 番目のリジン残基のトリメチル化 (H3K27me3) の異常な蓄積が miRNA の発現を抑制し、結果的に NF- κ B の恒常的活性化を誘導することを見出している (55)。このヒストン修飾 H3K27me3 を導入する Polycomb タンパク質 EZH2 はエピジェネティックな制御の上流に位置し、安定した DNA のメチル化、可逆的なヒストン修飾、非翻訳 RNA の全てに関与するエピジェネティクスの鍵となる分子であり、Polycomb による負の遺伝子発現制御はエピジェネティクスの中心的な制御機構である (56-59)。EZH2 は幹細胞研究、癌研究において注目を集めているタンパク質であり、造血幹細胞の幹細胞性の維持やリンパ球の分化に必須であること、ATL、固形がんにおいて過剰発現していること、悪性リンパ腫において活性型変異が存在すること、癌幹細胞の幹細胞性に必須であることなどが示されている (60-67)。しかしながら、ATL における EZH2 の標的は miR-31 以外には明らかになっておらず、H3K27me3 の異常な蓄積の全体像、細胞に与える影響、原因メカニズム、時期について、また、ATL の発症、進行への関与や HTLV-1 との関連については不明である。

HTLV-1 感染細胞と ATL 細胞は非常によく似た表現型を示し、癌化の初期段階で Tax により誘導された遺伝子発現の異常が、Tax 非存在下の ATL 細胞でも

保持される「Tax の記憶」とも言うべき現象が起きていることが指摘されている (68)。ATL 細胞で見られる NF- κ B や AP-1 の恒常的活性化は「Tax の記憶」の顕著な例である。Tax が誘導する異常の候補として、ゲノムの変異と、DNA 配列の変化を伴わないエピジェネティックな変異が挙げられるが、これまでに ATL 細胞に共通したゲノムの異常は報告されていない (69、70)。本研究室で行われた ATL 細胞の発現アレイ解析、ゲノムコピーナンバー解析、miRNA 発現アレイ解析からも ATL 細胞に共通したゲノムの異常は見つかっていないが、高頻度にゲノムの欠損が見られた 9p21.3 領域にはエピジェネティクス異常も蓄積していることが明らかとなった (55)。このことから「Tax の記憶」の実態はゲノムの異常とエピゲノムの異常の複合である可能性が示唆された。これまでに Tax とゲノムの異常との関連については複数の報告がなされており、Tax による DNA PolIII の発現抑制を介した base excision repair や nucleotide excision repair の抑制や、Chk1/2、p53 の機能抑制による DNA 損傷修復機構の阻害と細胞周期チェックポイントの不活化などである (71-76)。しかし、Tax とエピジェネティクスとの関連は、ヒストン脱メチル化酵素 (HDAC) との相互作用と、本研究室より報告されたヒストンメチル化酵素 SUV39H1、SMYD3 との相互作用が報告されているのみである (77-79)。Tax がこれらの相互作用を介して LTR からのウイルス遺伝子発現をエピジェネティックに抑制することは示されているものの、Tax が宿主細胞に対してエピジェネティクス異常を誘導するという報告はなされていない。

4. 目的

本研究の目的を、ATL におけるエピゲノム異常の実態とそれがもたらす影響を明らかにし、また HTLV-1 感染から ATL 発症、悪性化の過程でのエピジェネ

ティックな異常の変遷を明らかにすること、そして HTLV-1 が誘導するエピジェネティックな異常の実態とその分子メカニズムを明らかにし、T 細胞に与える影響を解明することとした。

5. 実験材料、方法

ATL 及び HTLV-1 キャリア検体

ATL 検体および HTLV-1 無症候性キャリア検体は、HTLV-1 感染者コホート共同研究班（Joint Study on Predisposing Factors of ATL Development (JSPFAD)）より供与されたものを使用した。検体の採取は、インフォームドコンセントを書面にて得たうえで行った。健常者の採血は、東京大学医科学研究所の研究用採血の指針に従って行った。本研究は東京大学医科学研究科の倫理審査委員会の承認を得て実施された（審査番号 No. 14-155）。検体の基本情報は Table 1 に示した。

ベクター

理化学研究所 三好浩之先生より供与いただいたレンチウイルスベクター CSII-EF-MCS-IRES2-Venus vector に、HTLV-1 Tax の野生型 (WT)、FLAG タグ付き WT (F-Tax)、変異型 M22、C29A の cDNA を挿入した。Tax の鋳型には関西医科大学 藤澤順一先生より分与された pCG-Tax vector を使用した。使用した primer の配列は Table 2 に示した。また、CS-RfA-EVBsd-shEZH2、CS-RfA-EVBsd-shSUZ12、pGL4.10-EZH2 promoter は山岸誠博士より、pME-FLAG-Rex、pME-FLAG-HBZ、pME-FLAG-p30 は中野和民博士より供与いただいたものを使用した (19)。

クローニングとベクター作製

PCR には Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) を用い、推奨されているプロトコールに従って行った。反応条件は 94°C×2 min + (94°C×30 sec + 50°C×30 sec + 68°C×2 min) ×32 cycles で行った。得られた

PCR 産物を 1%アガロースゲルで電気泳動し、目的の長さの DNA 断片が増幅されていることを確認した後、ゲルを切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて DNA 断片を精製した。精製した DNA 断片は、TA クローニングを行い pGEM T Easy vector (Promega) に挿入し、配列が正しいことを確認した後、CSII vector へ挿入した。

細胞培養

ATL 細胞株 TL-Om1、MT-1、ATN-1 は 10% FBS (GIBCO)、1000 U/ml Penicillin (GIBCO)、1000 µg/ml Streptomycin (GIBCO) を含む RPMI1640 培地で培養した。HEK293FT、HeLa 細胞は 10% FBS、1000 U/ml Penicillin、1000 µg/ml Streptomycin を含む DMEM 培地(日水製薬株式会社)で培養した。培養はすべて 37°C、5% CO₂ の条件下で行った。

アガロースゲル電気泳動

EtBr を添加した 1~2%のアガロースゲルを用いて 100 V で 35 分間電気泳動を行い、ゲルを Whealtec dolphin-View (KURABO) で撮影した。マーカーにはλHindIII (TaKaRa) と 100 bp marker (GeneDireX、DM003-R500) を用いた。

抗体

使用した抗体は以下の通りである。

抗 H3K27me₃ 抗体 (Millipore、07-449)、抗 H3K4me₃ 抗体 (Millipore、07-473)、抗 EZH2 抗体 (D2C9) (Cell Signaling、5246)、抗 EZH2 抗体 (AC22) (Cell Signaling Technology、3147)、抗 H3 抗体 (Abcam、10799)、抗 TSLC1

抗体 (MBL、CM005)、抗 Actin 抗体 (Santa Cruz、AC-15)、抗 RelA 抗体 (Santa Cruz、sc-8008)、抗 RelB 抗体 (Santa Cruz、sc-226)、抗 FLAG 抗体 M2 (Sigma-Aldrich、F1804)、IgG マウス血清由来 (SIGMA、I3581-5MG)、Normal rabbit IgG (Cell Signaling、2729S)、アルカリフォスファターゼ標識の二次抗体、抗マウス抗体 IgG (H&L、Promega)、抗ラビット抗体 IgG (Fc、Promega)

抗 Tax 抗体 (Lt-4) は琉球大学 田中勇悦先生より頂いたものを使用した (80)。

抗 TSLC1 抗体は biotin N-hydroxysuccinimide ester (Sigma-Aldrich、H1759-5MG) を用いてビオチン化したものを使用した (81)。

阻害剤

DZNep (13828、Cayman Chemical)、GSK126 (15415、Cayman Chemical)、U0126 (V1121、Promega) は DMSO に溶解させ使用した。5-aza-2-deoxycytidine (Aza-dC) (A3656、SIGMA) は PBS に溶解させ使用した。Cyclosporin A (30024、SIGMA) はエタノールに溶解させ使用した。

リコンビナントウイルス作製

遺伝子導入を行う前日に HEK293FT 細胞を 4×10^6 cells/10 cm dish で播種した。播種後、約 24 時間培養したのち、SIN ベクタープラスミド (CSII-EF-Tax-IRES-Venus vector) 4.25 μ g、2 種類のパッケージングプラスミド (pCMV-VSV-G-RSV-Rev vector、pCAG-HIV-gag pol vector) 各 2.5 μ g を遺伝子導入した。遺伝子導入には 0.323 g/L の PEI (Polyethyleni mine "Max"、Polysciences Inc.) を使用した。遺伝子導入後、6 時間で培地交換を行い、72 時間後に培養上清を回収した。その際、培養上清を $400 \times g$ で 1 min 遠心し、0.45 μ m フィルターを

通すことで細胞を除去した。得られた培養上清を $6000\times g$ 、 4°C で 3 時間遠心し、ペレットを RPMI1640 培地 (FBS-) で再懸濁し、 -80°C に保存した。

PBMC の分離、活性化

健康人の全血を等量の Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) に重層し、 $400\times g$ 、30 min、室温で遠心した。遠心後、リンパ球を含む層のみを分取し、PBS で 2 度洗浄したものを PBMC として以降の実験に用いた。得られた PBMC を、PHA (SIGMA、終濃度 $1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$) を添加した RPMI1640/10% FBS で 48 時間培養した。これを PHA-activated PBMC として以降の実験に使用した。

CD4 陽性 T 細胞の分離

CD4 陽性 T 細胞の分離は Dynabeads CD4 Positive Isolation kit (ThermoFisher) のマニュアルに従って行った。健康人末梢血から分離した 1×10^7 個の PBMC に対し $25\ \mu\text{l}$ の Dynabeads を加え 4°C で 20 分間回転混和した。Dynal MPC ラックに 2 分間静置し、上清を CD4 depleted PBMC として回収した。PBS/0.1% BSA で beads を 3 度洗浄し、 $10\ \mu\text{l}$ の DETACHaBEAD を加え、室温で 45 分間反応させた。この際、10 分置きに tube を軽くタッピングして攪拌した。Dynal MPC ラックに 1 分間静置し、上清を CD4 陽性 T 細胞分画として回収した。

抗 CD3/28 抗体による T 細胞の活性化

あらかじめ抗 CD3 抗体 (Miltenyi、130-093-387)、抗 CD28 抗体 (Miltenyi、130-093-375) それぞれ $0.5\ \mu\text{g}$ を固相化させた 96 well plate に 1×10^6 個の CD4 陽性 T 細胞を 48 時間培養することで活性化 T 細胞を作製した。

Tax 導入細胞 (Tax-cell) の作製

上記の通りに分離し、活性化した PHA-activated PBMC を 1.5 ml tube に回収し、 $2,000\times g$ 、1 min、室温で遠心した。上清を捨て、細胞のペレットをリコンビナントウイルス溶液で懸濁し、 37°C で 5 min 静置したのち $400\times g$ 、3 h、 30°C で遠心した。遠心後、 5×10^6 cells/ml の濃度になるように RPMI1640/10% FBS/IL-2+ (終濃度 10 ng/ml) に懸濁し、100 μl ずつ 96 well plate に分注した。2 日おきに培地の半量を捨て、新しい培地を加えて培養した。

RNA 抽出

目的の細胞を 1.5 ml tube に回収し、 $2,000\times g$ 、1 min、室温で遠心した。上清を捨て、得られた細胞のペレットに 1 ml の ISOGEN (ニッポンジーン) を加えて数回ピペッティングをし、ペレットを完全に溶解させた。200 μl のクロロホルム (Wako) を添加しよく懸濁した後、 $16,000\times g$ 、30 min、 4°C で遠心した。上清に等量のイソプロパノール (Wako) を添加し、 -20°C で 2 時間以上静置した。その後、 $16,000\times g$ 、30 min、 4°C で遠心し、得られたペレットに DNase solution (MQ 45 μl 、 $10\times$ DNase I Buffer (TaKaRa) 5 μl 、Recombinant DNase I (RNase-free) (TaKaRa) 2 μl 、Recombinant Ribonuclease Inhibitor (TakaRa) 0.5 μl) を加え 37°C で 30 min 反応させた。再び ISOGEN 1 ml を加えてよく混和し、200 μl のクロロホルムを添加しよく懸濁した後、 $16,000\times g$ 、30 min、 4°C で遠心した。得られた上清に 30 μl の 3 M NaOAc (pH 6.0) を加え、上清と等量のイソプロパノールを添加し、 -20°C で 2 時間以上静置した。その後、 $16,000\times g$ 、30 min、 4°C で遠心し、得られたペレットを MQ に溶解させ、RNA 溶液とした。

逆転写反応

RNA 抽出により得られた RNA から Super Script II (Invitrogen) を用いて cDNA を合成した。RNA 溶液 8 μ l に 2.5 μ l の dNTP solution、1 μ l の Random primer mix (300 ng/ μ l) を添加し、65°C、5 min の保温後、氷上に静置した。その後、5×First strand buffer 4 μ l、0.1 M DTT 2 μ l、reverse transcriptase (200 units) 1 μ l を加え、42°C で 50 min、70°C で 15 min 反応させた。反応後の溶液に、RNA の濃度が 10 ng/ μ l となるように MQ を加え、realtime PCR に使用した。

Realtime PCR

realtime PCR は SYBR Premix Ex Taq (Appliedbiosystems) を用いて行った。反応は SYBR Premix Ex Taq 5 μ l、MQ 2.5 μ l、10 μ M Forward primer 0.25 μ l、10 μ M Reverse primer 0.25 μ l、sample 2 μ l の 10 μ l の系で行い、Thermal cycler Dice (TAKARA) を用いて反応、測定を行った。PCR の条件は 95°C×30 sec + (95°C×10 sec + 60°C×1 min) ×45 cycles で行った。インターナルコントロールには RPL19 を用いた。使用した primer は Table 2 に示した。

miRNA の定量

miRNA の定量は TaqMan® MicroRNA Assays (Appliedbiosystems) を用いて行った。反応は SYBR Premix Ex Taq 5 μ l、MQ 2.5 μ l、10 μ M Forward primer 0.25 μ l、10 μ M Reverse primer 0.25 μ l、sample 2 μ l の 10 μ l の系で行い、Thermal cycler Dice (TAKARA) で反応、測定を行った。PCR の条件は 95°C×30 sec + (95°C×10 sec + 60°C×1 min) ×45 cycles で行った。インターナルコント

ロールには RNU48 を使用した。用いた primer set は Table 2 に示した。

蛍光免疫染色法

1×10⁵個の細胞を 50 μl の PBS に懸濁し、cytospin を用いて 800 rpm、3 min、室温で遠心した後、風乾させた。乾燥後、4% PFA で 5 分間固定し、1% Triton X-100/PBS で膜透過処理をした後、1% BSA/PBS で 30 分ブロッキングを行った。その後、1% BSA/PBS で 1/200 に希釈した 1 次抗体を 4°C で 12 時間以上反応させた。反応後、スライドガラスを 0.1% BSA/PBS に浸して抗体を洗い流し、1% BSA/PBS で 1/500 に希釈した 2 次抗体を室温で 2 時間反応させた。0.1% BSA/PBS で二次抗体を洗い流し、スライドガラスの水分を拭き取った後、マウンティングメディウム (80% glycerol、5 ng/μl DAPI) 30 μl で封入し、共焦点顕微鏡 Zeiss LSM 710、もしくは蛍光顕微鏡 Olympus BX50 で観察、撮影した。得られた画像はフォトショップ CS5 (Adobe) を用いて色付け、画像の変換、色調の調整を行った。明るさ、コントラストについては同じ実験のサンプル間では同一の処理を行った。

ウェスタンブロットによるタンパク質の検出

ウェスタンブロットに供する細胞を 1.5 ml tube に回収し、PBS で 2 回洗浄し、RIPA buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、1 mM EDTA (pH 8.0)、1% NP-40、0.1% sodium deoxycholate、0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) に懸濁し、20 min 氷上で静置した。16,000×g、20 min、4°C で遠心し、上清を回収した。得られた上清に、その半量の 3×sample buffer (10% glycerol、3% SDS、65 mM Tris-HCl (pH 6.8)、0.01% bromophenol blue) を加え 100°C で 3 min 処理し、泳動用サンプルとした。10~15%のアクリルアミドゲルで泳動

し、泳動線が流れ切る直前で泳動を止め、semi-dry の転写装置 (BIO CRAFT BE-300) を用いて定電圧 14 V、90 min の条件でタンパク質を PVDF 膜に転写した。転写後、1% スキムミルク/TBST (20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、0.05% Triton X-100) に 30 min 浸してブロッキングを行い、終夜で一次抗体を反応させた。TBST で 10 min×3 回洗浄し、二次抗体 anti-mouse IgG AP conjugate (Promega) を室温で二時間反応させた後、TBST で 10 min×3 回、TBS で 10 sec×1 回洗浄し、NBT/BCIP Colour Development Substrate (Promega) で発色させた。画像はスキャナー (GT-X980、EPSON) で取り込み、バンド強度の測定は ImageJ を用いて行った。

レポータージーンアッセイ

Opti-MEM 培地 25 μ l に effector である CSII-EF-Tax-IRES-Venus vector を 100 ng、reporter である HTLV-1 LTR Luciferase vector、6kB Luciferase vector、もしくは EZH2 promoter Luciferase vector を 50 ng、Internal control 用 pRSV Renilla Luciferase vector を 3.3 ng 添加し、これを A 液とした。おなじく Opti-MEM 培地 25 μ l に Lipofectamine2000 (Invitrogen) を 1 μ l 添加し、穏やかに混和した後 5 min 以上室温で静置したものを B 液とした。A 液と B 液を穏やかに混和し、20 min 以上室温で静置した後、全量を、前日に HEK293FT 細胞を 1×10^5 cells/250 μ l の濃度で播種した 48 well plate へ添加した。播種した際は抗生物質の含まれていない DMEM 培地を使用した。添加から 4 時間後に培地を交換し、2 日間培養した後、細胞を剥がさないように PBS で培地を洗い流し、200 μ l の Passive Lysis Buffer (Promega) を添加して細胞を溶解させた。室温で 20 min 静置し、10,000 $\times g$ 、1 min、4°C の遠心により不溶性画分を沈殿させた。この上清 10 μ l に基質 2 μ l を添加、plate を 2 秒振盪、10 秒測定とい

う設定で発光量の測定を行った。

Flow cytometry による Venus の検出及び Venus アッセイ

接着細胞の場合、トリプシン処理により細胞を剥がし、FACS buffer (PBS/2%FBS) 1 ml で細胞を懸濁し、 $1,000\times g$ 、2 min、室温で遠心した。上清を除去し、細胞濃度が 1×10^5 cells/ml 程度になるように FACS buffer で懸濁し、FACSCalibur (Becton Dickinson) により測定した。

浮遊細胞の場合、培養している dish または well の中で細胞を懸濁し、 $1,000\times g$ 、2 min、室温で遠心した。上清を除去し、細胞濃度が 1×10^5 cells/ml 程度になるように FACS buffer で懸濁し、FACSCalibur により測定した。

Flow cytometry による細胞表面マーカーの検出

浮遊細胞を 1.5 ml tube に回収し、 $1,000\times g$ 、2 min、室温で遠心をして培地を除去した後に FACS buffer 50 μ l に懸濁し、FACS 用の fluorescence dye-conjugated antibody を 1 μ l 添加し、遮光して室温で 30 min 静置した。その後、FACS buffer で残存する抗体を洗い流し、300 μ l の FACS buffer に懸濁し、FACSCalibur により測定した。使用した FACS 用抗体は FITC anti-human CD7 Antibody (Biolegend、343104)、PE anti-human CD8 Antibody (BD、555367)、APC anti-human CD4 Antibody (BD、555349) である。

Flow cytometry による細胞の分離

前項の Flow cytometry による細胞表面マーカーの検出と同様に細胞を染色し、 1×10^7 cells/ml の濃度で FACS buffer に懸濁した。分離は FACS Aria を用いて、東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター FACS コアラボラトリー

のオペレーターの協力のもと行った。

Flow cytometry による H3K27me3 の検出

1×10⁶ 個の細胞を 1.5 ml tube に回収し、1,000×g、2 min、室温で遠心をして培地を除去した後に 4% PFA で懸濁し、10 分間 37°C に静置し細胞を固定した。再び 1,000×g、2 min、室温で遠心をして上清を除去し、90% methanol で懸濁して氷上に 30 min 静置し、膜透過処理を行った。三たび、1,000×g、2 min、室温で遠心をして上清を除去し、FACS buffer で細胞を懸濁し、室温で 10 min ブロッキングを行った。その後、抗 H3K27me3 抗体を 1/200 の希釈率になるように添加し、室温で 1 時間反応させた。FACS buffer で 1 回洗浄を行い、1/500 に希釈した Alexa fluor 546 Goat anti-Rabbit IgG (Molecular Probes、A-11035) を 30 min、室温で反応させた。FACS buffer で 2 回洗浄した後、300 μl の FACS buffer に懸濁し、FACSCalibur により測定した。

アポトーシスアッセイ

アポトーシスの検出には PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences、559763) を用い、推奨プロトコールに従って行った。細胞を、Annexin V-PE、7-AAD を含む Annexin V binding buffer に懸濁し、15 分室温に静置した。その後、その 2 倍量の Annexin V binding buffer を加え、FACSCalibur にて測定し、Annexin 陽性細胞をアポトーシス細胞とした。

Bisulfite sequence 法

目的の細胞から QIAamp DNA mini kit (QIAGEN、51304) を用いて genomic DNA を分離、精製し、2 μg を bisulfite 処理に使用した。bisulfite 処理は Methyl

Easy Xceed (Human Genetic Signatures、ME002) を用いて行い、20 ng/ μ l の濃度になるように溶出し、PCR に使用した。PCR には Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) を用い、推奨されているプロトコールに従って行った。反応条件は 95°C \times 2 min + (95°C \times 30 sec + 55°C \times 30 sec + 68°C \times 30 sec) \times 40 cycles で行った。2%アガロースゲルで電気泳動を行い、目的の長さの DNA 断片が増幅されていることを確認した後、ゲルを切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて DNA を精製した。精製された DNA を TA クローニングにより pGEM T Easy vector に挿入し、大腸菌 DH5 α を用いて増幅し、DNA 配列を確認した。

Cell proliferation assay

1 \times 10³~5 \times 10⁴個の目的の細胞を 96well plate に播種し、Cell Counting Kit-8 (DOJINDO、347-07621) を 10 μ l 添加して 1~3 時間培養し、450 nm と 630 nm の吸光度を測定した。

クロマチン免疫沈降法

1 \times 10⁶個の細胞を含む培地 10 ml に formaldehyde (Wako、064-00406) を 270 μ l 添加し、室温で 10 分間静置した。600 \times g、2 min、4°C で遠心し、上清を除去し、ice cold PBS を 10 ml 加え、懸濁した。この操作を 2 回繰り返したのち、細胞を 500 μ l の SDS Lysis Buffer (50 mM Tris (pH8.1)、10 mM EDTA、1% SDS) で懸濁し、氷上に 10 分間静置した。その後、超音波で DNA を断片化し、20,000 \times g、10 min、4°C で遠心した。この上清に 5 ml の IP buffer (16.7 mM Tris (pH8.1)、1.2 mM EDTA、16.7 mM NaCl、1.1% Triton X-100、0.01% SDS) と、50 μ l の IP buffer/50% protein G sepharose (GE、17061801) を加

えて 1 時間回転混和を行った。1,400×g、1 min、4°C で遠心し、得られた上清 1 ml に抗 H3K27me3 抗体を 2 μg 添加し 12 時間以上 4°C で回転混和した。IP buffer/50% protein G sepharose を加えてさらに 1 時間回転混和し、Wash buffer a (20mM Tris (pH 8.1)、2 mM EDTA、150 mM NaCl、0.1% SDS、1% Triton X-100)、Wash buffer b (20 mM Tris (pH8.1)、2 mM EDTA、500 mM NaCl、0.1% SDS、1% Triton X-100)、Wash buffer c (10 mM Tris (pH8.1)、1 mM EDTA、1% sodium deoxycholate、1% NP-40、0.25 M LiCl)、TE buffer (TE buffer による洗浄は二回) の順でビーズを洗浄した。ビーズに 250 μl の Elution buffer (0.1 M NaHCO₃、1% SDS) を加えて 15 秒 vortex で攪拌し、室温で 15 min 静置した。3,300×g、30 秒、室温で遠心し、得られた上清を新しいチューブに回収した。この操作を繰り返し、500 μl の Elution buffer で DNA-タンパク質複合体を遊離させた。そこに 20 μl の 5 M NaCl を添加し、65°C で 4 時間反応させた後、20 μl の 1 M Tris-HCl (pH 6.5)、10 μl の 0.5 M EDTA、2 μl の Proteinase K (ThermoFisher、10 mg/ml、25530-049) を添加し、更に 45°C で 1 時間反応させた。その後、500 μl の Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol 液を加えてタンパク質を除去し、等量の 2-Propanol を加えて 20,000×g、30 min、4°C で遠心し、得られた沈殿を 70 μl の MQ に溶かし、realtime PCR の反応に使用した。

μChIP アッセイ

1~5×10⁴ 個の細胞を 250 μl の RPMI/10% FBS に懸濁し、終濃度が 1% になるように formaldehyde を添加した。室温で 8 分間静置し、ice cold PBS を 400 μl 加え、スイングローターの遠心機で遠心した。ice cold PBS による洗浄を 2 回行ったのち、細胞を 60 μl の Lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10

mM EDTA、1% SDS、1 mM PMSF、20 mM Sodium butyrate) で懸濁し、氷上に10分間静置した。210 μ l の RIPA buffer を加え、Ultrasonic processor XL (Astrason) を用いて、10分間超音波破碎を行った。20,000 \times g、10 min、4°C で遠心し、上清を回収した。残った沈殿物に210 μ l の RIPA buffer を加え、10秒間 Voltex mixer で懸濁し、20,000 \times g、10 min、4°C で遠心したのち上清を回収し、先に回収した上清と合わせてサンプル溶液とした。磁気ビーズを RIPA buffer で2回洗浄後、200 μ l の RIPA buffer に懸濁し、2 μ g の抗体を加え、4°C で2時間回転混和した。磁気ラックにビーズを吸着させて上清を除き、150 μ l のサンプル溶液を加え、12時間以上4°C で回転混和した。RIPA buffer による洗浄を3回、ice cold TE buffer による洗浄を1回行い、150 μ l の complete elution buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、5 mM EDTA、50 mM NaCl、20 mM Sodium butyrate、1% SDS、50 μ g/ml Proteinase K) に懸濁し、65°C で2時間反応させた。この間、15分毎にビーズを攪拌した。磁気ラックにビーズを吸着させて上清を回収し、350 μ l の Elution buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、5 mM EDTA、50 mM NaCl) を加え、Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol を用いてタンパク質を除去した。1 ml のエタノールを加えて-80°C に30分静置し、20,000 \times g、10 min、4°C で遠心し、得られた沈殿を35 μ l の MQ に溶かし、realtime PCR に使用した。

ChIP-on-chip (Coc) 法によるプロモーターアレイ解析

ChIP-on-chip は Agilent ChIP-on-chip protocol (v11.0) に従って行った。1 \times 10⁷個の細胞を tube に回収し、遠心後に上清を捨て fixing solution (50 mM HEPES-KOH (pH 7.5)、100 mM NaCl、1 mM EDTA、0.5 mM EGTA、11% formaldehyde) に懸濁し、15分室温に静置した。1.375 M glycine を1 ml 加え

固定反応を止めた後、1,400×g、10 min、4°C で遠心し、PBS で 2 度洗浄した。その後、10 ml の LB1 (50 mM Hepes-KOH (pH 7.5)、140 mM NaCl、1 mM EDTA、10% Glycerol、0.5% IGEPAL CA-630、0.25% Triton X-100) に細胞を懸濁し、氷上で 10 分静置した。1,400×g、10 min、4°C で遠心し上清を捨て、10 ml の LB2 (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、200 mM NaCl、1 mM EDTA、0.5 mM EGTA) に細胞を懸濁し、室温で 10 分静置した。1,400×g、10 min、4°C で遠心し上清を捨て、MNase digestion buffer (50 mM Tris (pH 7.4)、4 mM MgCl₂、1 mM CaCl₂) に懸濁し、37°C でそれぞれの細胞に適切な時間保温した。反応後、20 µl の 0.5 M EDTA を加えて反応を止め、室温で 1,400×g、10 min 遠心した。上清を捨て、500 µl の LB3 (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、100 mM NaCl、1 mM EDTA、0.5 mM EGTA、0.1% sodium deoxycholate、0.5% N-Lauroylsarcosine、1% Triton X-100) に懸濁し、20 分間超音波破碎を行った。核が破碎されたことを確認し、20,000×g、10 min、4°C で遠心し上清を回収した。得られた上清から 50 µl を Input として分取し、2.5 ml の LB3 を加えて希釈した上で、あらかじめ用意した Dynabeads M-280 sheep anti-rabbit IgG (Invitrogen、11203D) もしくは Dynabeads Protein G (Invitrogen、10003D) と目的の抗体 10 µg を混ぜ 4°C で 12 時間以上回転混和したものを加え、4°C で 12 時間以上回転混和した。翌日、磁気ラックを用いてビーズを吸着させ、RIPA buffer で 6 度、50 mM NaCl を添加した TE buffer で 1 度洗浄し、その後 200 µl の Elution buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM EDTA、1% SDS) を加えて 65°C で 15 分間保温した。この際、2 分ごとに Vortex mixer を用いてビーズを攪拌した。磁気ラックを用いてビーズを吸着させ、上清を回収し、65°C で 12 時間以上保温した後、8 µl の RNaseA (SIGMA、R6513-50MG) を添加して 37°C で 2 時間反応させた。さらに Proteinase K (ThermoFisher、10 mg/ml、

25530-049) を加えて 55°C で 30 分反応させた。Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol を加えてタンパク質を除去し、1 ml のエタノールを加え、-80°C で 30 分冷却した後、20,000×g、10 min、4°C で遠心した。得られたペレットを 70 µl の TE buffer に溶解させ、そのうちの 55 µl を次の反応に使用した。T4 DNA Polymerase (TaKaRa、2040A) を 12°C で 30 分反応させ DNA 断片の末端を平滑化し、Linker DNA を添加し 16°C で 16 時間反応させた。AmpliTaq DNA Polymerase (ThermoFisher、N8080160) を用いて 2 度 Linker-mediated PCR を行った。1 度目の反応条件は 55°C×4 min +72°C×3min + (95°C×30 sec + 60°C×30 sec + 72°C×1 min) ×15 cycle、2 度目の反応条件は 95°C×2min + (95°C×30 sec + 60°C×30 sec + 72°C×1 min) ×25 cycle で行った。PCR 産物はエタノール沈殿をした後に Nanodrop で濃度を測定し、2.6 µg をラベリングに使用した。ラベリングは SureTag DNA Labeling Kit (Agilent Technologies) を用いてプロトコールに従って行った。ラベリング後に Nanodrop を用いて DNA の濃度と、Cy3 もしくは Cy5 の濃度を測定し、アジレントの定める Yield、Specific Activity の基準 (Yield > 5 µg、Specific Activity > 15 (Cy3) or 18 (Cy5) pmol/µg) を満たしていることを確認した。ラベル化された DNA を Sureprint G3 Human Promoter Microarrays (Agilent Technologies) と 65°C で 40 時間反応させた。アレイの洗浄、アレイの画像化は全て定められているプロトコールに従って行った。得られた画像は Feature Extraction ソフトウェアを用いて数値化し、GeneSpring 12.5 (Agilent Technologies) で正規化を行い、Cy5/Cy3 のシグナル値を算出した。その際、発光がわずかしか検出されなかった probe については除外した。アレイ毎の測定誤差を減らすため、全ての probe の第三四分位点の値で全てのアレイの値を揃え、probe の値を遺伝子毎に平均化したものを使用した。

遺伝子発現アレイ解析

網羅的な遺伝子発現のデータは過去に当研究室で行われたものを使用した（55、81）。4×44K Whole Human Genome Oligo Microarray（Agilent Technologies）を用いて測定を行い、Gene spring 12.5（Agilent Technologies）でデータの取り込み、補正、正規化を行った。GEOの登録番号はGSE33615（ATL検体52例、健常人21例）、GSE55851（ATL検体6例、HTLV-1キャリア検体2例、健常人3例）である。GSE33615のデータについてはPVLの低いくすぶり型1検体のデータは除外した51例のデータを使用した。GSE33615の検体の情報はAppendix 1に示した。

統計学的な処理及びデータ解析

遺伝子発現、ヒストンのメチル化、種々の *in vitro* で行ったアッセイについては Welch の T 検定を用いた。q-value、ピアソンの相関係数は R version 3.1.3 を用いて算出した (<https://cran.r-project.org/>)。転写因子の結合サイトの解析には oPOSSUM (<http://opossum.cisreg.ca/oPOSSUM3/>) を使用した (82)。GO 解析には DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) を使用した (83)。過去に報告されている網羅的な遺伝子発現データ、SNP アレイデータは Array Express (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) 及び GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) から取得した。SNP アレイのデータは CNAG 2.0 を用いて解析を行った (84)。過去に報告されている ChIP-seq データは SraTailor を用いて SRA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) より取得し、Bowtie2 によりマッピングを行い、MACS によりピークコールを行った (85)。

6. 結果

ATL 細胞における PRC2 の異常

当研究室で行われた、ATL 検体（急性型、n=26）、健常者（n=21）の遺伝子発現アレイの結果を再解析し、エピジェネティックな遺伝子発現制御に関わる遺伝子の発現比較を行った。SET ドメインを有するヒストンメチル化酵素の中で、EZH2 の発現上昇が最も顕著であった（Figure 1）（86）。また、エピジェネティックな遺伝子発現制御を行う複合体という視点でとらえると、PRC2 の構成因子は全て ATL で発現が有意に上昇していた（Figure 2）。PRC1 や TrxG、SWI/SNF についても同様に発現を比較したところ、有意に発現が変動している遺伝子が複数見つかった。しかしながら、複合体の構成因子全ての発現が上昇しているという PRC2 の特徴は、他の複合体には見られなかった。

SNP アレイの結果（GSE33602）を解析したところ、36/168 検体（21.4%）で EZH2 を含むゲノム領域の重複が観察された（Figure 3）。SUZ12、EED、RBBP4 についても同様に解析したところ、SUZ12、EED は 12/168 検体（7.1%）、RBBP4 は 4/168 検体（2.4%）でゲノムの重複が観察された。

PRC2 が ATL 細胞に与える影響

PRC2 が ATL 細胞に与える影響を調べるため、EZH2 及び SUZ12 に対する shRNA を用いて発現量を低下させ、生存能を比較した。shRNA の発現にはレンチウイルスベクターを用いた。このベクターは H1 プロモーターから shRNA が、EF-1 プロモーターから Venus 遺伝子が発現するように設計されており、shRNA の導入された細胞を Venus の発現で可視化できる。コントロールとして firefly luciferase に対する shRNA を使用した。それぞれの shRNA を持つレンチウイルスを ATL 細胞株 TL-Om1、MT-1 に感染させ、3 日後に FACSCalibur

にて Venus 陽性細胞の割合を測定した。Venus 陽性/陰性細胞の割合がほぼ同等になるように調整し、感染 8 日目から 2 日ごとに Venus 陽性率を測定した。shLuc を発現させた細胞群では Venus 陽性率はほぼ一定であったのに対し、shEZH2、shSUZ12 を発現させた細胞群では Venus 陽性率の低下が観察され、PRC2 の構成因子の発現は ATL 細胞の生存に寄与していることがわかった (Figure 4)。

EZH2 活性阻害剤 GSK126 は ATL 細胞の生存率を時間、濃度依存的に低下させる

EZH2 の活性化変異を有する B 細胞リンパ腫細胞に対し有効である GSK126 を用いて、ATL 細胞の生存に与える影響を調べた。ATL 細胞株には TL-Om1、ATN1 を用い、DLBCL の細胞株 WSU-DLCL2 を比較対象に使用した。GSK126 の濃度を 2500 nM から 1/4 ずつ希釈した 7 段階の希釈系列と DMSO 処理群を 2 日毎に継代しつつ、14 日目まで生存率を測定した。ATL 細胞株では時間、濃度依存的に生存率の低下が見られ、14 日目での IC50 は TL-Om1 で 307.7 nM、ATN1 で 272.9 nM であった (Figure 5)。これは EZH2 の活性化変異を有する B 細胞リンパ腫と同等であった (67)。次に、この生存率の低下が EZH2 の阻害によるものであるのか、また細胞死によるものであるのかを検討した。GSK126 を処理した TL-Om1 をウェスタンブロットに供し、H3K27me3 と Annexin V 陽性率を測定した。ウェスタンブロットの結果から H3K27me3 の量が減少していることが確認された (Figure 6A)。また、GSK126 処理群では約 9 割の細胞が Annexin V 陽性であり、EZH2 の阻害によりアポトーシスが誘導されたことがわかった (Figure 6B)。同様に、患者検体を用いて EZH2 阻害により H3K27me3 の減少が見られるかを検討した。ATL 患者検体に 6 日間 GSK126

を処理し、ウェスタンブロットに供した (Figure 6C)。用いた 3 検体全てで H3K27me3 の減少が見られた。GSK126 の ATL 検体に対する影響は、当研究室の修士学生の中川翔太氏が検討しており、有意にアポトーシスが誘導されることを明らかにしている (Appendix 3)。

GSK126 処理した TL-Om1 細胞から RNA を採取し、遺伝子発現アレイ解析を行ったところ、1,807 遺伝子で 1.5 倍以上発現が上昇していた (Figure 7A)。EZH2 阻害により複数の遺伝子プロモーター上において H3K27me3 の減少とその遺伝子発現の上昇が起こっていた (Figure 7B-C)。また、その発現上昇は HDAC や DNMT の共阻害により増強された (Figure 7C)。これらの結果から、EZH2 の阻害により H3K27me3 の量が減少し、様々な遺伝子が脱抑制された結果、ATL 細胞がアポトーシスを起こし、生存率が低下したことが示唆された。

ChIP-on-chip を用いたエピゲノム解析

エピゲノムの異常の実態を明らかにするため、正常 CD4 陽性 T 細胞、ATL 患者検体、ATL 細胞株 TL-Om1 における H3K27me3、転写活性化に關与する H3K4me3 のゲノムワイドな分布を明らかにすることを目的とし、ChIP-on-chip 法 (Coc 法) を用いて検討した。使用した ATL 患者検体の情報、正常 CD4 陽性 T 細胞は Table 1、Figure 8A に示した。Coc 法には 2×400K Agilent G3 promoter array (Agilent Technology) を用い、Agilent Technology の推奨するプロトコールに則って行った。このプロトコールでは①クロマチンの断片化、②PCR によるクロマチン断片の増幅、及び Cy3、Cy5 のラベリングの段階でサンプルの評価を行うことが推奨されているため、Coc 法に先立って 3 点の評価を行った。

①のクロマチンの断片化について、クロマチン構造を保存しつつ断片化を行うため、MNase を用いてクロマチンを切断し、核の破碎にのみ超音波破碎を用

いることとした。クロマチン断片は 1000 bp 以下の長さにするのが推奨されているため、MNase の適正な量を検討した。primary の細胞では 1 kilo gel units を 37°C で 5 分、TL-Om1、MT-2 では 37°C で 20 分の処理により、目的の長さのクロマチン断片が得られることがわかった (Figure 8B)。この条件で免疫沈降を行ったところ、H3K27me3 の蓄積があることが報告されている MYT-1 遺伝子プロモーター上に H3K27me3 の蓄積が確認された (Figure 8C) (87)。

②の PCR によるクロマチン断片の増幅、及びラベリング効率について、Nanodrop の測定により評価を行った。2 度の増幅と SureTag DNA labeling Kit (Agilent Technology) を用いたラベリング後に Nanodrop を用いて DNA の収量 (Yield (μg))、Cy3、Cy5 のラベリング効率 (Specific Activity (pmol/μg)) を測定したところ、いずれも基準値を上回っており、Coc 法に適したサンプルの調整が行えたことが確認された (Table 3)。

サンプルのクオリティに問題がないことがわかったため、次にサンプルをプロモーターアレイにハイブリシ、全てのアレイについてスキャンが正しく行われたことを確認した上で、得られたデータを Genespring 12.5 で解析した。Cy3 及び Cy5 の値が極めて小さい probe についてはその値を削除し、アレイ間の測定誤差を少なくするため、第三四分位点の値によって全てのサンプルの値を揃えることで補正を行った。さらに、信頼度の高い probe を抽出するために、標準偏差が 2 より大きい probe は排除した (Figure 9A)。

Coc 法により得られたデータを、正常 T 細胞を用いた H3K27me3 の ChIP-seq データ (SRX000143) (88) と比較し、実験系の評価を行った。ChIP-seq データの解析は Sratailor を用いてデータのダウンロード、マッピング、ピークコールを行った。ChIP-seq で H3K27me3 のピークの見られた遺伝子について Coc のデータと比較したところ、Coc でも H3K27me3 のレベルが有意に高いことが

わかった (Figure 9B)。また、上述の EZH2 阻害により発現が上昇した 1,807 遺伝子についてそのプロモーター上の H3K27me3 のレベルを調べたところ、全遺伝子に比べ有意に高いことがわかった (Figure 9C)。これらの結果から、Coc 法によりヒストン修飾の評価ができていたことが検証された。

ATL 検体と正常 T 細胞の比較

ATL における異常なメチル化の分布を明らかにするため、ATL 検体、正常 T 細胞の Coc データを probe レベル、遺伝子レベルで比較した。有意に H3K27me3 の変化の見られた probe では、正常 T 細胞において低メチル化状態にある領域に異常なメチル化の蓄積が起こっていることがわかった。H3K27me3 について遺伝子毎に平均化したところ、ATL では全遺伝子の 38.9%で増加、10.6%で減少しており、約半数の遺伝子上に変動が起こっていた (Figure 10A)。さらに、ATL、正常 T 細胞それぞれのメチル化パターンをクラスター分析したところ、全ての検体に共通したメチル化の変動が見られ、H3K4me3 に比べて、H3K27me3 のメチル化の大規模な再構成が起こっていた (Figure 10B-D、Figure 11)。また、メチル化レベルにもとづいて ATL と正常細胞がそれぞれのクラスターを形成することがわかった。

H3K27me3 の蓄積が見られた 7,862 遺伝子について H3K4me3 の変化を調べたところ、約半数の遺伝子で H3K4me3 の減少が起こっており、H3K27me3 の蓄積とそれに伴う H3K4me3 の減少が ATL 細胞におけるエピゲノムの再構成の実態であることがわかった (Figure 12A-B)。

異常なメチル化の蓄積の見られた遺伝子について、PRC2 の機能が重要であることが既知の ES 細胞、DLBCL 細胞と比較した。ES 細胞、DLBCL のデータは過去に報告されているデータを使用した (67、89)。大部分は重複しない、

ATL に特徴的なメチル化パターンであることがわかった (Figure 12C)。

H3K27me3 は遺伝子プロモーター上やエンハンサー上に蓄積し、遺伝子発現を負に制御することが知られている (88、90、91)。そこで、H3K27me3 のレベルを転写開始点 (TSS) からの距離に従って調べたところ、正常 T 細胞、ATL 細胞のどちらでも TSS 付近にピークのある緩やかな山型を示すことが分かった (Figure 13A)。また、有意に H3K27me3 の変化した probe についてその分布を同様に TSS からの距離に従って解析したところ、ATL に有意に高い probe は転写開始点から上流 3000kb 付近に高頻度に存在し、TSS 付近、gene body 上では低頻度であることがわかった (Figure 13B)。一方、上述の通り、プロモーターから遠く離れたエンハンサーについても H3K27me3 の変化が遺伝子発現に影響することが報告されているため、正常 CD4 陽性 T 細胞のエンハンサー領域における ATL と正常 T 細胞での H3K27me3 のレベルを比較した。エンハンサーの定義は一般的に用いられる H3K4me1 と H3K27ac の 2 つのヒストン修飾の見られる領域とした (92)。正常 T 細胞における H3K4me1 と H3K27ac の網羅的な分布は Epigenetic roadmap project のデータを使用した (93)。その結果、正常 T 細胞におけるエンハンサーは H3K27me3 が低レベルであることと、ATL では有意に H3K27me3 の蓄積が見られることがわかり、ATL における異常な H3K27me3 の蓄積は遺伝子プロモーター上、エンハンサー上の両方に見られることが分かった (Figure 13C)。

H3K27me3 の蓄積については CpG アイランドとの関連が報告されている (56、94、95)。そこで、CpG アイランドの有無と ATL での異常な H3K27me3 の蓄積の関係を調べた。CpG アイランドは過去の報告を参考に、UCSC Table Browser (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTables>) より取得した、TSS を含む 300 bp 以上の G もしくは C が 50%以上を占める領域と定義し (96)、その有

無で H3K27me3 のレベルを比較したところ、CpG アイランドを有する遺伝子の方が H3K27me3 の蓄積が顕著であった (Figure 13D)。

メチル化の変化と網羅的な遺伝子発現の統合解析

ATL において大規模なメチル化の変化が遺伝子プロモーター上、エンハンサー上に存在することが明らかになったため、次に遺伝子発現に与える影響を解析した。遺伝子発現解析には当研究室で過去に行った網羅的な遺伝子発現解析のデータを使用した (GSE33615) (55)。ATL と正常 T 細胞との遺伝子発現変化、H3K27me3 の変化を統合したところ、ATL で発現の低下した遺伝子の過半数に H3K27me3 の異常な蓄積が見られることがわかった (Figure 14A)。また、遺伝子発現の変化と H3K27me3 の変化には緩やかな逆相関関係があることがわかり、ATL において H3K27me3 の増加した遺伝子は発現が低下し、逆に H3K27me3 が低下した遺伝子は発現が上昇していた (Figure 14B-C)。ATL における H3K27me3 の蓄積は、*NDRG2*、*CDKN1A*、*ZEB1*、*BCL2L11* (*BIM*)、*CD7* など ATL において重要な癌抑制遺伝子や細胞表面マーカーが含まれていた (Figure 7、Figure 14B) (81、97-100)。一方、H3K27me3 の減少は *CADM1* や *EVC1/2* などの遺伝子と関連していた (101、102)。これらの結果から、ATL に特徴的なメチル化の変化は遺伝子発現変化と密接に関与していることがわかった。

ATL におけるエピジェネティックに抑制される遺伝子群の同定と機能解析

エピゲノムの変化が ATL 細胞に与える影響を調べるために、エピジェネティックに抑制される遺伝子群を絞り込み、GO 解析を行った。急性型 ATL で発現が低下し、H3K27me3 の蓄積があった、つまりエピジェネティックに抑制を受

けると考えられる遺伝子群を絞り込み 856 遺伝子を同定した (Figure 15)。856 遺伝子には多数のがん抑制遺伝子が含まれていた。856 遺伝子の抑制の強さと病態の関係性を調べたところ、856 遺伝子の抑制の強さと、総腫瘍量を反映する sIL-2R や WBC の値は相関していた (Figure 16)。また、DNA のメチル化による抑制を受けると考えられる遺伝子と比較したところ、あまり重複しないことがわかった (Figure 17)。さらに、その発現レベルの推移と病型の進行との関係を調べたところ、病型の進行に伴い発現が低下することがわかった (Figure 18A)。興味深いことに、これらの遺伝子の大半はくすぶり型もしくは慢性型において既に発現が低下しており (Figure 18B)、ATL の発症初期から PRC2 依存的なエピジェネティックな異常が存在し、ATL の進行に関与する可能性が示唆された。

GO 解析により、エピジェネティックに抑制される遺伝子群の機能解析を行ったところ、転写制御、リンパ球活性化に関与する遺伝子が最も有意に含まれることがわかった (Figure 18C)。転写制御に関与する遺伝子群には、多数の転写因子と機能が未知の Zinc フィンガータンパク質、ヒストン脱メチル化酵素が含まれていた (Table 4)。これらの遺伝子は ES 細胞や DLBCL では H3K27me3 の蓄積の見られない、ATL に特徴的な遺伝子群であることがわかった (Figure 18D)。

ヒストン脱メチル化酵素の発現低下について、EZH2 の過剰発現の見られる子宮頸がん、乳がんの網羅的な遺伝子発現解析データと比較したところ、複数のヒストン脱メチル化酵素の発現低下は ATL に顕著に見られた (Figure 19)。その中でも、H3K27me3 の脱メチル化酵素である JMJD3 をコードする *KDM6B* が最も顕著に低下しており、その発現は EZH2 阻害剤処理により有意に回復した (Figure 20A-C) (103)。また、ゲノムコピーナンバー解析から 11/168 検体

(6.5%) において *KDM6B* のゲノムの欠失が存在することがわかった (Figure 20D)。KDM6B の抑制が H3K27me3 の蓄積に関与する可能性を検証したところ、shKDM6B を発現させた細胞では H3K27me3 の蓄積が見られた (Figure 20E)。この結果から、EZH2 は直接的のみならず、KDM6B の抑制を介して間接的にも H3K27me3 の蓄積を誘導していることが明らかとなった。

メチル化と miRNA 発現の統合解析

当研究室では、大規模な miRNA 発現解析から、ATL に特徴的な多く miRNA の発現低下を明らかにし、特に EZH2 が YY1 との結合を介して miR-31 の発現をエピジェネティックに抑制していることを報告している (55)。今回 Coc により得られた H3K27me3 の結果と miRNA の発現解析を統合したところ、ATL において発現低下の見られる miRNA と H3K27me3 の蓄積の見られた miRNA は大部分が重複することがわかった (Figure 21A)。重複した 75 の miRNA について、その発現と病型とを比較したところ、くすぶり型、慢性型において既に発現が低下していることが分かった (Figure 21B)。これらの miRNA のプロモーター領域に存在する転写因子の結合サイトを、oPOSSUM (82) を用いて解析したところ、YY1、ZEB1、MZF1 の結合サイトが有意に多く含まれていた (Figure 21C)。この結果は、YY1 が PRC2 のリクルーターとして機能し、miR-31 のみならず多数の miRNA の発現抑制に関与している可能性を示唆している。そこで次に、全遺伝子についてプロモーター上の YY1 の結合サイトの有無と H3K27me3 のレベルを調べた。YY1 の結合サイトを有する遺伝子は MotifMap から取得した (104)。YY1 の結合サイトを有する遺伝子群の方が若干 H3K27me3 のレベルが高いことがわかった (Figure 21D)。

エピジェネティックな抑制を受ける 75 種の miRNA が細胞に与える影響を調

べるため、その標的遺伝子を mirPath から取得し、Pathway 解析を行った(105)。Neurotrophin signaling、Insulin signaling、Wnt signaling など膜上のレセプターからのシグナル伝達系に関与する遺伝子群が多く含まれることがわかった (Figure 21E)。

HOXA 遺伝子クラスターにおけるエピジェネティックな脱制御

H3K27me3 の正常 T 細胞と ATL の比較から、遺伝子は少ないものの ATL における H3K27me3 の減少も観察されている (Figure 14B)。この中に HOXA 遺伝子群が含まれていたため、HOXA クラスターのメチル化と発現レベルを調べたところ、H3K27me3 の減少とそれに伴う発現の上昇がクラスター全体に起こっていた (Figure 22A-B)。この発現の上昇は慢性型から急性型にかけてより顕著であった。

HTLV-1 タンパク質 Tax は EZH2 の発現上昇を誘導し、H3K27me3 を蓄積させる

ATL では EZH2 の過剰発現が miR-31 の発現抑制に必須であり、NF- κ B の恒常的な活性化が EZH2 の発現上昇に必須であることが当研究室の山岸誠博士、修士学生の中川翔太氏により示されている。ただし、正常 T 細胞に対して TNF- α 処理をして NF- κ B を活性化しただけでは EZH2 の発現上昇は起こらず、抗 CD3/28 抗体により TCR を刺激すると発現が上昇することも併せて明らかにしており (Appendix 4)、ATL においては TCR の下流に存在する様々なシグナル伝達系が活性化している中で、NF- κ B がドミナントに機能していると考えられる。

EZH2 の発現量と、その抑制の強さとの関係を調べたところ、若干ではあるが

EZH2 の発現が高い群の方が、抑制される遺伝子群の発現が低いことがわかり、EZH2 の発現量がエピゲノムの異常の一因であることがわかった (Figure 23)。

ATL 発症に至るまでには HTLV-1 タンパク質が様々なシグナル伝達系を攪乱し発症に寄与していると考えられている。そこで、HTLV-1 が EZH2 の発現亢進に影響する可能性を検討した。Tax、HBZ、p30、Rex が EZH2 のプロモーター活性に与える影響を調べたところ、Tax のみが EZH2 のプロモーター活性を上昇させることがわかった (Figure 24A)。この Tax による活性化は NF- κ B 阻害剤 DHMEQ、MEK1/2 阻害剤 U0126 の処理により有意に抑制された (Figure 24B)。また、NF- κ B を活性化できない Tax mutant の M22 では野生型 Tax に比べ、EZH2 プロモーター活性の上昇は有意に低かった (Figure 24B-C)。

Tax はクロマチン上に EZH2 と共局在する

Tax は多数の宿主因子と結合し、細胞の増殖、不死化過程に関与していると報告されている (36)。当研究室では Tax が、EZH2 を含む複数のヒストンメチル化酵素と物理的に相互作用することを明らかにしている (Appendix 5) (78, 79)。今回、新たに HBZ、Rex、p30 と EZH2 との局在を検討したところ、Tax のみが核内で EZH2 と共局在していた (Figure 24D)。そこで、Tax が EZH2 との結合を介してクロマチン上に局在し、抑制性に機能する可能性を検討した。HTLV-1 感染細胞 MT-2 を用いて Tax、EZH2、H3K27me3 について Coc 法によりゲノムワイドな分布を解析した。この実験は当研究室の修士学生堀真琴氏の協力のもとに行った。Tax、EZH2 の結合する遺伝子、H3K27me3 の蓄積の見られる遺伝子は有意に重複することがわかった (Figure 25A)。Tax の結合の有無で EZH2 の結合、H3K27me3 の蓄積度を比較したところ、興味深いことに Tax の結合がある遺伝子では EZH2、H3K27me3 の蓄積が有意に高かった

(Figure 25B-E)。

Tax は ATL 様なエピゲノムの異常を誘導する

Tax が宿主細胞のエピゲノムに与える影響をより詳細に捉えるため、Tax を発現させるレンチウイルスベクターを作出し、健常人の末梢血由来単核球 (PBMC) に遺伝子導入を行った (Figure 26A)。このベクターは Tax の直後に IRES 配列、Venus 遺伝子を有しているため、Venus の発光により Tax を発現する細胞の割合、Tax の発現レベルを検出することができる。Tax 野生型、Tax 変異型 M22、C29A、F-Tax を遺伝子導入したところ、Tax 野生型のみで Venus 陽性細胞の増殖と不死化が観察された (Figure 26B)。この過程に EZH2 依存的なエピジェネティックな変化が関与する可能性を検討したところ、2 種類の EZH2 阻害剤を処理した群ではどちらも Venus 陽性細胞の増殖は見られず、EZH2 の酵素活性が Tax 依存的な細胞増殖、不死化過程に必須であることがわかった (Figure 26B)。増殖した Tax 導入細胞 (以降 Tax-cell) は、CD4 陽性もしくは CD8 陽性の T 細胞マーカーを発現し、NF- κ B 活性化の指標である、p65、p52 の核内移行が観察された (Figure 26C-D)。また、Tax による不死化能について異なる 3 人の健常人由来の PBMC を用いて検討したところ、そのいずれにおいても Tax を導入した細胞の増殖、不死化は起こらず、Tax による不死化能は限定的であるという過去の報告と一致する結果となった (Figure 27A-B) (106)。

Tax の遺伝子導入によるエピジェネティックな変化について次に検討した。Tax-cell では EZH2 の発現がコントロール群より有意に上昇し、miR-31 の発現は有意に減少していた (Figure 28A)。また、細胞内の H3K27me3 の全体量を評価したところ、Tax-cell において H3K27me3 の増加が観察された (Figure

28B)。Tax の導入により細胞増殖が亢進したため細胞周期制御因子を調べたところ、CDKN1A の発現量の低下が起こっていた (Figure 28C)。EZH2 阻害剤 DZNep の処理により CDKN1A の発現量が上昇したこと、また、プロモーター領域に H3K27me3 の蓄積が見られたことから Tax の遺伝子導入により CDKN1A がエピジェネティックな抑制を受けたことが明らかとなった (Figure 28D-E)。CDKN1A は ATL 細胞において DNA のメチル化による抑制を受けることが報告されているため (100)、正常 T 細胞、Tax-cell、ATL 細胞株 MT-1 について CDKN1A プロモーターの DNA のメチル化を調べたところ、Tax-cell ではわずかに、MT-1 細胞では高頻度に DNA のメチル化が起こっていた (Figure 28F)。

次に Tax 依存的なエピジェネティックな変化を網羅的に明らかにするため、Coc 法を用いて Tax-cell の H3K27me3 の分布を解析した。その際、正常 T 細胞に抗 CD3/28 抗体による刺激を行った活性化 T 細胞も同時に解析した。上記の、ATL において H3K27me3 が有意に変化した probe について、Tax-cell の H3K27me3 レベルを調べたところ、正常 T 細胞に比べて異常な増加が観察され、そのメチル化パターンは ATL のものと酷似していた (Figure 29A)。メチル化のレベルに基づいてクラスター解析を行ったところ、Tax-cell と ATL 細胞、活性化 T 細胞と正常 T 細胞の類似度が高いことがわかった (Figure 29B)。さらに、ATL において有意に H3K27me3 の増加した probe について Tax-cell と比較したところ、驚くべきことに 82.9%が重複し、重複した領域における H3K27me3 のレベルは正常 T 細胞、活性化 T 細胞、Tax-cell、ATL 細胞の順に段階的に増加していた (Figure 29C-D)。また、TSS からの距離に従って H3K27me3 のレベルを調べたところ、Tax-cell では TSS より上流 2~3kb 付近の蓄積が顕著であること、その一方で Tax-cell における H3K27me3 のレベルは

ATL 細胞より有意に低いことがわかった (Figure 29E)。ATL においてエピジェネティックな抑制を受ける *NDRG2*、*BIM* では Tax-cell においても H3K27me3 のレベルが高かった (Figure 30A)。さらに、GO 解析の結果から、転写制御や細胞の活性化に関わる遺伝子が有意に含まれていることがわかった (Figure 30B)。また、Tax-cell に EZH2 阻害剤 DZNep を処理したところ、ATL 細胞ほどではないが、濃度依存的に生存率が低下し、エピゲノムの異常が生存に寄与していることがわかった (Figure 30C)。

HTLV-1 感染細胞においてエピジェネティックな変化が存在する

エピジェネティックに抑制される遺伝子はくすぶり型、慢性型において既に発現が低下していること (Figure 18、21)、HTLV-1 因子 Tax により ATL 様なエピゲノムの変化が誘導されること (Figure 29) から、ATL 発症前の HTLV-1 感染無症候性キャリア中の HTLV-1 感染細胞において既にエピジェネティックな変化が存在するという仮説を立て、検証を行った。HTLV-1 無症候性キャリア中の CD4 陽性 T 細胞は、細胞表面の CD7、CADM1 の発現によって3つの分画 (P, CD7+/CADM1-; D, CD7+/CADM1+; N, CD7-/CADM1+) に分けられ、HTLV-1 感染細胞は D、N 分画に濃縮されること、D、N 分画において miR-31 の発現低下がみられることが報告されている (81、107)。当研究室で行われた P、D、N 分画の網羅的な遺伝子発現解析の結果を再解析したところ、EZH2 の発現量は P 分画に比べ、D、N 分画において約 4 倍発現が上昇していた (Figure 31A)。また、ATL においてエピジェネティックに抑制されている 856 遺伝子について、その発現量を調べたところ、D、N 分画において有意に発現が低下していた (Figure 31B)。これらの結果から、HTLV-1 感染細胞においてもエピジェネティックな変化の存在が示唆された。

ATL においてエピジェネティックに抑制される遺伝子群についてどの段階で発現低下が起こるのかを調べるために、P 分画から急性型 ATL の N 分画を 3 段階に分け (Stage I、P から D 分画; Stage II、D から N 分画; Stage III、N から急性型 N 分画)、各段階で有意に発現が低下し、かつ ATL で H3K27me3 の異常な蓄積の見られる遺伝子を比較した。その結果、Stage I に含まれる遺伝子が最も多く、次に Stage III に含まれる遺伝子が多かった (Figure 31C)。Stage I のみに含まれる 407 遺伝子と III のみに含まれる 181 遺伝子について、そのプロモーター上の H3K27me3 の変化、発現変化を比べたところ、Stage I のみに含まれる遺伝子の方が、H3K27me3 がより蓄積し、発現がより低下していた (Figure 31D)。

網羅的な遺伝子発現解析の結果を踏まえ、HTLV-1 無症候性キャリア中の CD4T 細胞を細胞表面の CADM1 の発現で分取し、免疫染色法により H3K27me3 を検出した。その結果、CADM1 陽性細胞では陰性に比べ H3K27me3 の蓄積が見られた (Figure 32A)。また、同様に分取した細胞を μ ChIP アッセイに供したところ、CADM1 陽性細胞では陰性細胞に比べ複数の遺伝子座において H3K27me3 の蓄積が見られた (Figure 32B)。さらに、HTLV-1 無症候性キャリアの PBMC に EZH2 阻害剤 GSK126 を処理したところ、CD4 陽性 T 細胞中の CADM1 陽性率の低下が観察された (Figure 32C)。

7. 考察

ATL は、HTLV-1 の感染から約 50 年という長期潜伏期間を経て HTLV-1 無症候性キャリアの数%が発症する。化学療法による生存期間中央値が 12.7 か月と非常に予後不良であり、新規の治療法の開発のために、有効な治療標的の探索、ATL 発症メカニズムの解明が求められている (10)。HTLV-1 の感染者の分布には地域性があり、日本の西南地域、中東、中央アフリカ、カリブ海沿岸地域に集中している (6)。この中でも特に研究が盛んにおこなわれている日本からの情報発信が求められている。2012 年に抗 CCR4 抗体ポテリジオが発売され、ATL 再発例 26 例に対し奏効率 50%という有望な結果が得られているが、抗 CCR4 抗体のみでは制圧できておらず依然として ATL は難治性であり、更なる治療法の開発が求められている。また、低悪性度 ATL に対しては無治療経過観察が現在の国内の方針であるが、海外からの報告を受け、AZT/IFN 治療の臨床試験がはじまり、ATL の発症予防という新たなフェーズに入った。この観点からも有効な治療標的、治療方法が求められている。

このような現状に対し 2011 年から HTLV-1 抗体検査が妊婦の健康診査の標準検査項目に追加されるなど、国全体として HTLV-1 の撲滅に力を入れており、断乳や母乳の凍結により母子感染の率を著しく低下させることに成功している (108)。また、全国の病院の協力のもと、多数の ATL 検体、HTLV-1 無症候性キャリア検体を収集し、大規模な発症前兆の調査と検体バンクの構築、供与を行う HTLV-1 感染者コホート共同研究班 (JSPFAD) の活動がはじまり、希少な ATL 患者検体を用いた研究や発症リスクに関する大規模な疫学調査が行われ、HTLV-1 のプロウイルス量が発症のリスク因子になることなど様々な報告がなされている (101、109-111)。本研究で使用した ATL 患者検体も JSPFAD より供与いただいたものである。当研究室では、JSPFAD より供与いただいた多数

の ATL 検体を用いて、現京都大学の小川誠司先生との共同研究により大規模な遺伝子発現アレイ解析、miRNA アレイ解析、コピーナンバー解析を行い、ATL に共通した遺伝子発現異常を明らかにしてきている (55)。特に、ATL 細胞では EZH2 が過剰発現し、H3K27me3 の蓄積が見られ、EZH2-miR-31-NF- κ B 経路が ATL 細胞の生存を支配していること、エピジェネティックな脱制御により *EVC1/2* の発現が亢進し、Hedgehog 経路の活性化を介して ATL 細胞の生存に寄与すること (101) を報告した。細胞の可塑性、分化、幹細胞性の維持に必要なエピジェネティックな遺伝子発現制御メカニズムが ATL において破綻している可能性が示されたことから、その実態の解明は ATL 細胞の新たな分子メカニズムの解明につながると予想された。また、ATL における様々な遺伝子発現異常の存在は明らかになってきたが、それが維持されるメカニズムには不明な点が多く、遺伝子の発現レベルを規定し細胞の状態を維持する役割を果たすエピジェネティックな遺伝子発現制御メカニズムの理解が役立つと予想された。治療標的という観点からも、エピジェネティックな制御は可塑性があるため、異常な状態であっても正常な状態へと変化させることが可能であり、分子標的として有効である可能性が考えられた。

これらの背景を踏まえ、本研究は PRC2 依存的なエピゲノム異常の実態とそれが及ぼす影響の解明を目的とし、ATL 検体の異常な H3K27me3/H3K4me3 の分布を網羅的に明らかにした。得られた結果を大規模な遺伝子発現解析の結果と統合することで、エピゲノム異常が ATL 発症前から存在し、病型の進行とともに強まること、さらに HTLV-1 因子 Tax が関与することを明らかにした。

ATL においてエピゲノム異常は高頻度に存在する

先行研究として当研究室で行われた大規模な ATL 検体の網羅的な遺伝子発現

解析の結果から、EZH2を含む、PRC2の主要構成因子の発現上昇が明らかとなっていた。本研究ではATLのエピゲノムの実態を理解するために、エピジェネティックな遺伝子発現制御において重要な役割を果たす複合体として、PRC2の他に、PRC1、TrxG、SWI/SNFの遺伝子発現解析を行った。その結果、主要構成因子が全てATLで高発現しているのはPRC2だけであった (Figure 2)。メチル化活性に必須なSETドメインを持つ遺伝子の中でもEZH2が最も発現上昇しており、ATLにおけるPRC2の機能亢進が改めて示された。この結果を踏まえ、網羅的にH3K27me3の分布を解析したところ、7,000以上の遺伝子プロモーターにおいてH3K27me3の蓄積が見られた (Figure 10A)。このH3K27me3の異常な蓄積のあった遺伝子のうち、約半数ではH3K4me3の減少が起こっていることがわかり、遺伝子発現への影響が強く示唆されるとともに、ATLのエピゲノムの実態が明らかとなった (Figure 12)。また、ATLにおいて発現が変化しているSETドメインを持つ遺伝子にはその機能が未知のものも含まれており、H3K9me2/3、H3K36me3などの他にも様々なヒストン修飾が異常になっている可能性が示唆された (86)。ヒストン脱メチル化酵素の発現抑制についてはヒストン脱メチル化酵素の発現抑制が意味するものの項で述べる。

エピゲノムの変化が遺伝子発現に影響を与えていると考えられたため、発現遺伝子発現との統合解析を行ったところ、856遺伝子が異常な抑制を受ける遺伝子群として同定された。これらの遺伝子はATL検体に共通して発現が低下しており、エピゲノム異常は高頻度に存在することが示唆された (Figure 15)。ATLに共通するということは、エピゲノム異常がATLに必須であり、その病態に深く関与する可能性を示しており、治療標的としての有効性が期待される。ATLにおけるEZH2の発現は予後と相関することが報告されている (112)。今回明らかにしたエピジェネティックに抑制される遺伝子の発現レベルと、予後

不良因子とが相関したことから、EZH2 のメチル化活性依存的な機能の重要性が示唆された (Figure 16)。一方で EZH2 の阻害剤に対する感受性に違いが見られた (Figure 5、Figure 30) (113)。活性を阻害する GSK126 は細胞死を誘導するのに最低でも 4 日はかかっているのに対し、EZH2 の量を減少させる DZNep は 2 日で生存率を低下させた。DZNep は他のヒストン修飾にも影響するという特異性の低さが指摘されているため断定はできないが、EZH2 のメチル化活性非依存的な non-canonical な機能も示唆された (114、115)。ATL における EZH2 の全容の解明は今後の課題である。

EZH2 と DNA のメチル化との関係性

H3K27me3 と DNA のメチル化の関係性には様々な報告がなされており、統一見解は得られていない。H3K27me3 と DNA のメチル化に関しては、PRC2 と DNMT が相互作用し、H3K27me3 の蓄積が DNA のメチル化を誘導することが報告されている (56)。その一方で、H3K27me3 と DNA のメチル化箇所は重複せず、H3K27me3 と DNA のメチル化は関連しないという報告も存在する (116)。また、非メチル化 CpG に PRC2 がリクルートされるという報告もある (94、95)。今回、CpG アイランドをプロモーター上に持つ遺伝子では、持たない遺伝子に比べ H3K27me3 の蓄積がより顕著であるという結果が得られた (Figure 13D)。また、CDKN1A や NDRG2 など、H3K27me3 と DNA のメチル化の両方に抑制されている遺伝子が見つかった (Figure 7D、28F) (98、100)。しかしながら、全体的に捉えると、H3K27me3 によって抑制される遺伝子と DNA の高メチル化によって抑制される遺伝子はあまり重複しなかった (Figure 17)。この結果は、ATL においては非メチル化 CpG アイランドに H3K27me3 が蓄積しやすいという傾向と、H3K27me3 の蓄積が CpG のメチル化の蓄積を

誘導する可能性は限定的である可能性を示している。PRC2 や DNMT のリクルートメカニズムについては、より詳細にそれぞれのゲノムワイドな分布を調べることで解明が期待され、今後の課題である。

エピジェネティックな変化は遺伝子発現の調節の他にスプライシングにも影響しうる

クロマチン構造の変化は RNA ポリメラーゼ II の転写の速さに影響し、結果としてスプライシングに影響することが知られている (117)。当研究室では、ATL において Helios 遺伝子のスプライシングの変化が ATL 細胞の増殖、生存に寄与することを明らかにしている (110)。一部のスプライシングの変化はゲノムの欠失や点変異によって説明できるが、そのメカニズムには不明な点が残されている。遺伝子プロモーターのみならず、エクソン上でのエピジェネティックな変化がスプライシングパターンにあたる影響については今後の検討課題である。クロマチン構造を包括的に明らかにすることで、転写量のみならず RNA の構造に与える影響の解明が期待される。

H3K27me3 の蓄積パターン

正常 T 細胞、ATL 細胞において H3K27me3 のレベルは TSS 付近に高く、なだらかな山型を示すという、他の細胞と同じ特徴であった (Figure 13A)。また、プロモーターのみならず、エンハンサー領域にも H3K27me3 の変化が起こっていた (Figure 13C)。エンハンサーは一般的に配列的には遠く離れた領域が折りたたまれることによって空間的に近づき、転写に影響を与えること、その際 Med1 などのメディエータータンパク質が仲介することが知られている。その中でも特に、メディエータータンパク質との親和性が高いスーパーエンハンサー

と呼ばれる領域ががん細胞において重要な役割を果たすことが報告されている (118)。このような 3 次元的なクロマチン構造は **Topologically associated domain (TAD)** と呼ばれる塊を形成し、TAD はその領域に含まれる遺伝子発現の制御に必須であることが知られている (119、120)。今回明らかとなった **HOXA** 遺伝子クラスターの全体的な脱制御はこの TAD が変化した典型的な例であると考えられ (Figure 22) (121)、TAD を形成する因子が変化している可能性が考えられる。そのような因子の一つに **CTCF** が知られている。**HTLV-1** はゲノム内に **CTCF** の結合配列を有すること (122)、**HTLV-1** のゲノムへの挿入部位は遺伝子プロモーターに多いこと (46) が報告されており、ゲノムに **HTLV-1** が挿入されることによって **CTCF** の結合が乱れ、遺伝子プロモーター近傍の TAD が大きく変化する可能性が指摘されている。エピジェネティックな変化と TAD の構造、**HTLV-1** のゲノムへの挿入位置との関係性は今後明らかになっていくものと期待される。

エピゲノムの異常とゲノムの異常との関係性

EZH2 の活性阻害により **H3K27me3** の激的な減少が起こったことから (Figure 6)、**EZH2** の活性が **H3K27me3** の異常な蓄積に必須であると考えられる。**B** 細胞リンパ腫において **EZH2** の活性化変異が高頻度に存在し、腫瘍化に関与することが報告されているため (64-67、123)、**ATL** における **EZH2** の活性化変異の有無について、当研究室の修士学生の中川翔太氏が **ATL** 検体 50 例で検討している (Appendix 2)。その結果によると、**B** 細胞リンパ腫で見られる **Tyr641**、**Ala677**、**Ala687** の活性化変異は検出されなかった。その一方で **NF-κB** 経路の恒常的な活性化が **EZH2** の過剰発現に必須であることを明らかにしており、**NF-κB** による **EZH2** の発現量の上昇が **H3K27me3** の蓄積に貢献して

いると考えられる。今回、新たに ATL 検体の SNP アレイの結果を再解析したところ、36/168 検体 (21.4%) で EZH2 の遺伝子領域を含むゲノムの重複が起こっていた (Figure 3)。SUZ12、EED、RBBP4 についても一部の検体においてゲノムの重複が起こっていた。この結果から、一部の検体においてはゲノムの重複も EZH2 の過剰発現に寄与し、エピゲノム異常の維持、亢進に関与する可能性が示唆された。一方、エピゲノムからゲノム異常への影響については、腫瘍の起源となる細胞のクロマチン構造が、腫瘍における遺伝子変異の部位を最もよく説明できる因子であるという報告がなされている (124)。今回、H3K27me3 と H3K4me3 について大規模な再構成が遺伝子プロモーター、エンハンサー上に存在することを明らかにしたが、プロモーターアレイを使用したため遺伝子上や遺伝子の存在しない領域でのメチル化の変化は検出できていない。今後、ChIP-seq などを用いてより詳細にメチル化の分布について解析し、遺伝子変異との関係性について検討することで、ゲノム変異の蓄積部位の傾向やその起こる時期についての知見が得られる可能性があり、今後の課題である。エピゲノム異常からゲノムの構造異常の影響については **ZNF タンパク質の発現抑制が意味するもの**の項で述べる。

ZNF タンパク質の発現抑制が意味するもの

前述の通り、ATL には多様なゲノム異常が存在することが示唆されてきた一方で、共通したゲノムの変異は報告されていない。当研究室と小川誠司現京都大学教授の研究室との共同で行われたゲノムコピーナンバー解析の結果から、大規模な遺伝子重複や欠損が明らかとなっている (55、110、125)。本研究により明らかになった、エピジェネティックに抑制される多数の ZNF タンパク質は、そのほとんどが C2H2 タイプであり、KRAB ドメインを有していた。これらの

ZNF タンパク質はレトロトランスポゾンなどの Endogenous Retroelements (ERE) を抑制していることが報告されている (126)。すなわち、ZNF タンパク質の発現抑制は ERE の活性化を誘導する可能性がある。ERE の活性化は相同組み換えを誘発し、ゲノムの構造変化をもたらす可能性が指摘されている (126、127)。前述の通り、PRC2 構成因子の遺伝子領域の重複や、後述する *KDM6B* 遺伝子領域の欠損、当研究室が報告した *miR-31* の欠損など、ゲノムの異常がエピゲノムの異常を補佐している可能性があり、エピゲノムの異常が ERE の脱制御を介して多様なゲノムの構造変化をもたらし、結果としてエピゲノムの異常に寄与するという循環が存在するのかもしれない。

miRNA の発現抑制が意味するもの

当研究室で行われた miRNA アレイ解析の結果から、ATL では多数の miRNA が減少傾向にある特徴を見出している (55)。今回、エピゲノムの変化と miRNA の発現低下を統合して捉えた結果、発現が低下した miRNA の大部分において、その遺伝子プロモーター上に異常な H3K27me3 の蓄積が起こっていることがわかった (Figure 21A)。miRNA はその標的遺伝子の決定にゆらぎを持ち、1 つの miRNA が複数の mRNA を標的とするため、エピジェネティックな miRNA の抑制は間接的に広範な遺伝子発現に影響する可能性が示唆された。

今回明らかとなった 75 種の miRNA が標的とする可能性のある遺伝子群について GO 解析を行ったところ、Neurotrophin signaling や Insulin signaling、Wnt signaling、ErbB signaling など様々なシグナル伝達系に関与する可能性が示唆された。実際に影響を及ぼすのかについては検証が必要であるが、今回の解析結果は膜上のレセプターからのシグナル伝達系に影響することを示しており、下流に位置する様々なシグナル伝達系に影響する可能性がある。

miRNA の様々な発現異常は多くのがんに存在し、エピジェネティックな抑制以外にもシグナル伝達系の活性化、Dicer の異常など様々なメカニズムによって引き起こされていることが報告されている (128)。しかしながら、今回明らかになったような大規模なエピジェネティックな抑制はほとんど報告されておらず、ATL に特徴的な遺伝子発現異常のメカニズムの一つに考えられる。また、くすぶり型、慢性型 ATL において既に発現低下が起こっており、その 2 つの病型と急性型との差は見られなかったことから、miRNA の発現低下は ATL の発症初期から存在すると考えられる (Figure 21B)。miR-31 の発現低下は HTLV-1 無症候性キャリア中の HTLV-1 感染細胞ですでに起こっていることが報告されており (81)、ATL 発症前から存在し、生存や増殖に寄与しているのかもしれない。

miRNA は、siRNA のように mRNA の安定性を低下させるのみならず、その mRNA の翻訳レベルを低下させる機能を有している (129)。そのため、miRNA の発現低下は標的 mRNA の翻訳レベルの活性化につながると予想される。今回用いたような網羅的な遺伝子発現アレイ解析では、翻訳レベルを評価することはできておらず、質量分析器によるプロテオーム解析や、ポリソーム分画の mRNA 解析による発癌、悪性化メカニズムの解明は今後の課題であろう。Tax と miRNA との関係については後述する。

ヒストン脱メチル化酵素の発現抑制が意味するもの

ATL の遺伝子発現解析から、発現が低下しているヒストン脱メチル化酵素が複数見つかった (Figure 19A)。EZH2 の過剰発現が報告されている乳がん、子宮頸がんと比較したところ、ヒストン脱メチル化酵素の発現低下は ATL に特徴的であった (Figure 19B)。特に発現低下が顕著であった *KDM6B* について検討したところ、H3K27me3 のレベルは ATL で高く、EZH2 の阻害により発現が回

復したことからエピジェネティックに抑制されていることが分かった (Figure 20A-C)。他のヒストン脱メチル化酵素についても H3K27me3 の蓄積があることからエピジェネティックに抑制されていると考えられる (Figure 19A)。また、実験的に乳がん細胞株 MCF-7 に shKDM6B を導入したところ、H3K27me3 の蓄積が見られたことから (Figure 20E)、KDM6B の発現抑制は H3K27me3 の蓄積に寄与しており、本来動的なヒストンのメチル化の可塑性が失われるような“エピジェネティックなロック”の存在が示唆された。ゲノムコピーナンバー解析の結果から、*KDM6B* について一部の ATL 検体でその遺伝子領域の欠損が起こっており (Figure 20D)、この遺伝子領域においてもゲノムの異常がエピゲノムの異常を補佐しているのかもしれない。

ATL において、SET ドメインを有するヒストンメチル化酵素群の中では発現が減少している遺伝子の方が多い (Figure 1)。一方でヒストン脱メチル化酵素も発現が低下しているものがほとんどであったため、様々なヒストン修飾の動的平衡状態が失われている可能性がある。このような可塑性の喪失は、クロマチン構造を安定に保ち、転写を維持するように影響しているのかもしれない。

PRC2 の局在を決定するメカニズム

当研究室の先行研究により、*miR-31* の遺伝子領域においては YY1 が PRC2 のリクルーターとして機能することが明らかとなっている (55)。しかしながら、YY1 の結合配列の有無と H3K27me3 のレベルを全遺伝子について比較したところ、わずかな違いしか見られず、YY1 以外に要因があると推察された (Figure 21D)。ショウジョウバエにおいては Polycomb response element (PRE) が存在することが報告されており、DNA 配列依存的な PRC2 の局在決定メカニズムが明らかとなっている (130)。現在のところ、哺乳類ではそのような PRE は

HOXD 遺伝子でのみ報告されている (131)。YY1 と PRC2 のゲノムワイドな局在から YY1 はリクルーターとして機能しないことや non-coding RNA(ncRNA) がリクルーターとして働くことが報告されている (95、132、133)。また、遺伝子発現が低下することが PRC2 を呼び寄せるという報告や、PRC1 によるヒストン H2A119Ub の修飾が PRC2 の局在に重要であることが報告されている (94、134)。本研究では Tax と EZH2 との結合が PRC2 の局在を決定する一つのメカニズムである可能性を示唆した (Figure 25)。Tax による遺伝子発現の抑制が Tax-PRC2 複合体を呼び寄せ、ヘテロクロマチンを形成し、ひとたびその抑制状態が形成されれば、Tax の発現がなくともその抑制は維持されるのかもしれない。Tax 存在下、非存在下における PRC2 の局在決定メカニズムの解明は今後の課題である。

Tax は ATL 様なエピゲノムの異常を誘導する

正常 T 細胞に Tax を遺伝子導入することにより、EZH2 の発現上昇、miR-31 の発現低下、H3K27me3 の蓄積、ATL 様な H3K27me3 の分布が引き起こされたことから、Tax がエピジェネティックな異常を誘導することが明らかとなった (Figure 28-30)。そして、EZH2 の阻害により Tax 依存的な細胞増殖、不死化が起こらなかったことから、Tax による不死化にはエピジェネティックな変化が必須であると考えられる。Tax 存在下では、Tax による NF- κ B や MEK-ERK 経路など様々なシグナル伝達系の活性化が EZH2 の発現を亢進させ、CDKN1A や miR-31 などの遺伝子発現のエピジェネティックな抑制を誘導することが示唆された (Figure 24、28)。miR-31 の低下は NIK の発現量の亢進を介して NF- κ B の活性化を誘導するため (55)、Tax により EZH2-NF- κ B 間のポジティブフィードバックループが形成され、エピジェネティックな異常が誘

導されると考えられる。しかしながら、Tax 導入によって引き起こされた EZH2 の発現亢進、H3K27me3 の蓄積、miR-31 の抑制はいずれも ATL に見られるものよりその度合いが低かったため、Tax はエピジェネティックな異常を誘導し、EZH2-NF- κ B のループを形成し、細胞運命の方向付けのみを行う可能性がある。では、何が EZH2-NF- κ B のループを促進し、ATL 発症につながるのだろうか。ATL の全ゲノム DNA 配列解析の結果から、TCR の下流に位置する遺伝子、及び Tax の interactome に属する遺伝子に高頻度に変異が存在することが報告された (125)。すなわち、ATL においては Tax が影響を与える分子に遺伝子変異が蓄積したことにより、Tax の発現が消失してもその影響は保持されていると考えられる。また TCR の下流に位置する様々なシグナル伝達系の活性化は EZH2 の発現上昇を誘導することもわかっており (Appendix 4)、遺伝子変異の蓄積は EZH2 の過剰発現にも大きく影響していると考えられる。統合すると、Tax により EZH2-NF- κ B のループが形成され、遺伝子変異の蓄積により置換、増強され、「Tax の記憶」として細胞に定着すると考えられる。

Tax と miRNA の関連については、Jurkat 細胞に Tax を発現させたところ 41 種の miRNA で 2 倍以上の発現変化があり、そのうち 35 種が発現低下であったと報告されている (135)。また、Tax は Dicer との結合を介して miRNA の成熟過程を阻害するという報告もある (136)。今回、Tax の遺伝子導入により miR-31 の発現が低下したが、それ以外にも Tax は miRNA の発現や成熟過程に影響し、細胞の遺伝子発現を攪乱している可能性が考えられる。

多段階発癌とエピジェネティックな変化

本研究により明らかとなった Tax によるエピゲノム異常の誘導、HTLV-1 感染細胞におけるエピジェネティックな異常の存在、EZH2 阻害による HTLV-1

感染細胞特異的な排除は、エピジェネティックな異常が多段階発癌の初期から存在し、細胞の不死化、生存に寄与しているという考え方を支持するものである。一方で、急性型 ATL に特異的な発現抑制も観察されたことから (Figure 13、Figure 31)、ATL の悪性化の過程にも深く関与している可能性が示唆された。前述の通り、遺伝子変異の蓄積が EZH2 - NF- κ B のループを増強している可能性があり、エピゲノムの異常は ATL の多段階発癌に広く影響し、また影響されるものと考えられる。

治療標的としての有効性

上述の通り、ATL は非常に予後が悪く、新規治療法の開発が望まれている。また、mLSG15 と呼ばれる多剤併用療法が標準治療になっているが、抗 CCR4 抗体と mLSG15 の併用による奏効率の向上が報告され、標的の異なる様々な薬剤を組み合わせることで、更なる相加、相乗的な効果が期待できる。EZH2 の阻害は B 細胞リンパ腫に対し有効であると報告され、現在複数の臨床試験が進行中である。ATL に対しても長期間の EZH2 阻害により B 細胞リンパ腫と同等の濃度で細胞死を誘導できたことから、その有効性が示唆された (Figure 5)。興味深いことに、短期間の EZH2 阻害であっても数日後に生存率を低下させた。これは EZH2 が間接的に支配する様々な遺伝子発現の攪乱が、細胞の生存に影響するまでに数日要したものと考えられる。また、EZH2 の阻害により HTLV-1 無症候性キャリア中の HTLV-1 感染細胞を体内から排除できる可能性が示唆され、ATL の発症予防や、さらには HAM/TSP や HU に対しても応用可能性が考えられる。

8. 総括

本研究により、ATLにおいてPRC2によるエピゲノムの異常が大規模に遺伝子発現を攪乱し、転写因子、miRNA、エピジェネティック因子の発現を抑制し、ATL細胞の生存、増殖に寄与するという、新たなATL細胞の分子メカニズムが示された。エピジェネティックな抑制を受ける遺伝子群は病型の進行とともに発現が低下していたこと、抑制の強さと予後不良因子には相関が見られたことから、PRC2依存的なエピゲノムの異常がATLの病態に大きく影響していることが示唆され、EZH2の分子標的としての重要性が改めて示された。また、HTLV-1との関連からHTLV-1タンパク質Taxが、EZH2の発現亢進とEZH2との結合を介してATL様なエピゲノムの異常を誘導すること、このエピゲノムの変化はTaxによる不死化に必須であることが明らかとなった。加えて、EZH2阻害剤の処理により低濃度であってもATL細胞に対しアポトーシスを誘導できることがわかり、さらに、EZH2の阻害によりHTLV-1無症候性キャリア中のCADM1陽性細胞率が低下したことから、HTLV-1感染細胞を選択的に体内から排除し、ATLの発症を予防する治療への応用可能性が期待できる結果が得られた。

9. 謝辞

本研究に際し多大なる御指導を頂きました東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻病態医療科学分野 渡邊俊樹教授に慎んで御礼申し上げます。

実験の遂行に当たり、昼夜を問わず御指導、御鞭撻を頂きました東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻病態医療科学分野 山岸誠博士、また、研究の遂行にあたり、終始親切なご助言、ご協力をいただきました、佐藤均准教授、中野和民博士、矢持忠徳博士に深く感謝いたします。

JSPFAD の活動にご尽力いただいている医師の皆様、患者の皆様、中島誠氏、赤司貴子氏にこの場をお借りして深く感謝申し上げます。

5年間お世話になりました東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻病態医療科学分野の皆様にご心より御礼申し上げます。

最後に、終始応援し、背中を押してくれた家族に感謝申し上げます。

10. 参考文献

1. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1980;77(12):7415–7419.
2. Gessain A, Barin F, Vernant JC, et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet.* 1985;2(8452):407–410.
3. Mochizuki M, Watanabe T, Yamaguchi K, et al. Uveitis associated with human T-cell lymphotropic virus type I. *Am. J. Ophthalmol.* 1992;114(2):123–129.
4. Iwanaga M, Watanabe T, Yamaguchi K. Adult T-cell leukemia: a review of epidemiological evidence. *Front Microbiol.* 2012;3:322.
5. Kaplan JE, Osame M, Kubota H, et al. The risk of development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1990;3(11):1096–1101.
6. Gessain A, Cassar O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front Microbiol.* 2012;3:388.
7. Satake M, Yamaguchi K, Tadokoro K. Current prevalence of HTLV-1 in Japan as determined by screening of blood donors. *J. Med. Virol.* 2012;84(2):327–335.
8. Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K, Uchino H. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood.* 1977;50(3):481–492.
9. Shimoyama M. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). *Br. J. Haematol.* 1991;79(3):428–437.
10. Tsukasaki K, Utsunomiya A, Fukuda H, et al. VCAP-AMP-VECP Compared With Biweekly CHOP for Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma: Japan Clinical Oncology

- Group Study JCOG9801. *Journal of Clinical Oncology*. 2007;25(34):5458–5464.
11. Katsuya H, Ishitsuka K, Utsunomiya A, et al. Treatment and survival among 1594 patients with ATL. *Blood*. 2015;126(24):2570–2577.
 12. Ishida T, Joh T, Uike N, et al. Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody (KW-0761) for relapsed adult T-cell leukemia-lymphoma: a multicenter phase II study. *J. Clin. Oncol*. 2012;30(8):837–842.
 13. Yoshie O, Fujisawa R, Nakayama T, et al. Frequent expression of CCR4 in adult T-cell leukemia and human T-cell leukemia virus type 1-transformed T cells. *Blood*. 2002;99(5):1505–1511.
 14. Ishida T, Jo T, Takemoto S, et al. Dose-intensified chemotherapy alone or in combination with mogamulizumab in newly diagnosed aggressive adult T-cell leukaemia-lymphoma: a randomized phase II study. *Br. J. Haematol*. 2015;169(5):672–682.
 15. Bazarbachi A, Plumelle Y, Carlos Ramos J, et al. Meta-analysis on the use of zidovudine and interferon-alfa in adult T-cell leukemia/lymphoma showing improved survival in the leukemic subtypes. *J. Clin. Oncol*. 2010;28(27):4177–4183.
 16. Ishitsuka K, Fukushima T, Tsukasaki K, Tobinai K. Is zidovudine and interferon-alfa the gold standard for adult T-cell leukemia-lymphoma? *J. Clin. Oncol*. 2010;28(36):e765.
 17. Matsuoka M, Jeang K-T. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat. Rev. Cancer*. 2007;7(4):270–280.
 18. Grassmann R, Berchtold S, Aepinus C, et al. In vitro binding of human T-cell leukemia virus rex proteins to the rex-response element of viral transcripts. *J. Virol*. 1991;65(7):3721–3727.
 19. Nakano K, Ando T, Yamagishi M, et al. Viral interference with host mRNA surveillance, the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) pathway, through a new function of

- HTLV-1 Rex: implications for retroviral replication. *Microbes Infect.* 2013;15(6-7):491–505.
20. Zhang W, Nisbet JW, Albrecht B, et al. Human T-lymphotropic virus type 1 p30(II) regulates gene transcription by binding CREB binding protein/p300. *J. Virol.* 2001;75(20):9885–9895.
 21. Andresen V, Pise-Masison CA, Sinha-Datta U, et al. Suppression of HTLV-1 replication by Tax-mediated rerouting of the p13 viral protein to nuclear speckles. *Blood.* 2011;118(6):1549–1559.
 22. Nicot C, Mulloy JC, Ferrari MG, et al. HTLV-1 p12(I) protein enhances STAT5 activation and decreases the interleukin-2 requirement for proliferation of primary human peripheral blood mononuclear cells. *Blood.* 2001;98(3):823–829.
 23. Pise-Masison C, Castro-Amarante M, Enose-Akahata Y, et al. Co-dependence of HTLV-1 p12 and p8 Functions in Virus Persistence. *PLoS Pathog.* 2014;10(11):e1004454
 24. Kuhlmann A-SS, Villaudy J, Gazzolo L, et al. HTLV-1 HBZ cooperates with JunD to enhance transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Retrovirology.* 2007;4:92.
 25. Matsumoto J, Ohshima T, Isono O, Shimotohno K. HTLV-1 HBZ suppresses AP-1 activity by impairing both the DNA-binding ability and the stability of c-Jun protein. *Oncogene.* 2005;24(6):1001–1010.
 26. Ma G, Yasunaga J, Fan J, Yanagawa S, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor dysregulates the Wnt pathways to support proliferation and migration of adult T-cell leukemia cells. *Oncogene.* 2013;32(36):4222–4230.
 27. Zhao T, Yasunaga J, Satou Y, Nakao M, Takahashi M. Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF- κ B. *Blood.* 2009;113(12):2755-2764.

28. Satou Y, Yasunaga J-I, Zhao T, et al. HTLV-1 bZIP factor induces T-cell lymphoma and systemic inflammation in vivo. *PLoS Pathog.* 2011;7(2):e1001274.
29. Zhi H, Yang L, Kuo Y-LL, et al. NF- κ B hyper-activation by HTLV-1 tax induces cellular senescence, but can be alleviated by the viral anti-sense protein HBZ. *PLoS Pathog.* 2011;7(4):e1002025.
30. Hasegawa H, Sawa H, Lewis M, et al. Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I. *Nat. Med.* 2006;12(4):466–472.
31. Ohsugi T, Kumasaka T, Okada S, Urano T. The Tax protein of HTLV-1 promotes oncogenesis in not only immature T cells but also mature T cells. *Nat. Med.* 2007;13(5):527–528.
32. Suehiro Y, Hasegawa A, Iino T, et al. Clinical outcomes of a novel therapeutic vaccine with Tax peptide-pulsed dendritic cells for adult T cell leukaemia/lymphoma in a pilot study. *Br. J. Haematol.* 2015;169(3):356–367.
33. Kinpara S, Kijiyama M, Takamori A, et al. Interferon- α (IFN- α) suppresses HTLV-1 gene expression and cell cycling, while IFN- α combined with zidovudine induces p53 signaling and apoptosis in HTLV-1-infected cells. *Retrovirology.* 2013;10:52.
34. Hisada M, Okayama A, Shioiri S, et al. Risk factors for adult T-cell leukemia among carriers of human T-lymphotropic virus type I. *Blood.* 1998;92(10):3557–3561.
35. Barnhart MK, Connor LM, Marriott SJ. Function of the human T-cell leukemia virus type 1 21-base-pair repeats in basal transcription. *J. Virol.* 1997;71(1):337–344.
36. Boxus M, Twizere J-CC, Legros S, et al. The HTLV-1 Tax interactome. *Retrovirology.* 2008;5:76.
37. Hanon E, Hall S, Taylor GP, et al. Abundant tax protein expression in CD4+ T cells

- infected with human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is prevented by cytotoxic T lymphocytes. *Blood*. 2000;95(4):1386–1392.
38. Tochikura T, Iwahashi M, Matsumoto T, et al. Effect of human serum anti-HTLV antibodies on viral antigen induction in vitro cultured peripheral lymphocytes from adult T-cell leukemia patients and healthy virus carriers. *Int. J. Cancer*. 1985;36(1):1–7.
39. Kinpara S, Hasegawa A, Utsunomiya A, et al. Stromal cell-mediated suppression of human T-cell leukemia virus type 1 expression in vitro and in vivo by type I interferon. *J. Virol*. 2009;83(10):5101–5108.
40. Takeda S, Maeda M, Morikawa S, et al. Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells. *Int. J. Cancer*. 2004;109(4):559–567.
41. Okamoto T, Ohno Y, Tsugane S, et al. Multi-step carcinogenesis model for adult T-cell leukemia. *Jpn. J. Cancer Res*. 1989;80(3):191–195.
42. Yashiki S, Fujiyoshi T, Arima N, et al. HLA-A*26, HLA-B*4002, HLA-B*4006, and HLA-B*4801 alleles predispose to adult T cell leukemia: the limited recognition of HTLV type 1 tax peptide anchor motifs and epitopes to generate anti-HTLV type 1 tax CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2001;17(11):1047–61.
43. Fujiwara H, Arima N, Hashimoto-Tamaoki T, et al. Alteration of p16 (CDKN2) gene is associated with interleukin-2-induced tumor cell growth in adult T-cell leukemia. *Exp. Hematol*. 1999;27(6):1004–1009.
44. Sakashita A, Hattori T, Miller CW, et al. Mutations of the p53 gene in adult T-cell leukemia. *Blood*. 1992;79(2):477–480.
45. Okayama A, Stuver S, Matsuoka M, et al. Role of HTLV-1 proviral DNA load and clonality in the development of adult T-cell leukemia/lymphoma in asymptomatic carriers. *Int. J. Cancer*. 2004;110(4):621–625.

46. Gillet NA, Malani N, Melamed A, Gormley N, Carter R. The host genomic environment of the provirus determines the abundance of HTLV-1–infected T-cell clones. *Blood*. 2011;117(11):3113–3122.
47. Bangham CR, Cook LB, Melamed A. HTLV-1 clonality in adult T-cell leukaemia and non-malignant HTLV-1 infection. *Semin. Cancer Biol.* 2014;26:89–98.
48. Yamaguchi K, Watanabe T. Human T lymphotropic virus type-I and adult T-cell leukemia in Japan. *Int. J. Hematol.* 2002;76 Suppl 2:240–245.
49. Bangham CR, Ratner L. How does HTLV-1 cause adult T-cell leukaemia/lymphoma (ATL)? *Curr Opin Virol.* 2015;14:93–100.
50. Lachner M, O’Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*. 2001;410(6824):116–120.
51. Rea S, Eisenhaber F, O’Carroll D, et al. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*. 2000;406(6796):593–599.
52. Nakayama J, Rice JC, Strahl BD, Allis CD, Grewal SI. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science*. 2001;292(5514):110–113.
53. Margueron R, Justin N, Ohno K, et al. Role of the polycomb protein EED in the propagation of repressive histone marks. *Nature*. 2009;461(7265):762–767.
54. Nosaka K, Maeda M, Tamiya S, et al. Increasing methylation of the CDKN2A gene is associated with the progression of adult T-cell leukemia. *Cancer Res.* 2000;60(4):1043–1048.
55. Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, et al. Polycomb-mediated loss of miR-31 activates NIK-dependent NF- κ B pathway in adult T cell leukemia and other cancers. *Cancer Cell*. 2012;21(1):121–135.

56. Viré E, Brenner C, Deplus R, et al. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature*. 2005;439(7078):871–874.
57. Yap K, Li S, Muñoz-Cabello A, et al. Molecular Interplay of the Noncoding RNA ANRIL and Methylated Histone H3 Lysine 27 by Polycomb CBX7 in Transcriptional Silencing of INK4a. *Mol. Cell*. 2010;38(5):662-674.
58. Asangani I, Ateeq B, Cao Q, et al. Characterization of the EZH2-MMSET Histone Methyltransferase Regulatory Axis in Cancer. *Mol. Cell*. 2013;49(1):80-93.
59. Tsang D, Cheng A. Epigenetic regulation of signaling pathways in cancer: Role of the histone methyltransferase EZH2. *J. Gastroenterol. Hepatol*. 2011;26(1):19–27.
60. Mochizuki-Kashio M, Mishima Y, Miyagi S, et al. Dependency on the polycomb gene *Ezh2* distinguishes fetal from adult hematopoietic stem cells. *Blood*. 2011;118(25):6553-6561.
61. Varambally S, Dhanasekaran S, Zhou M, et al. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*. 2002;419(6907):624–629.
62. Suvà M-L, Riggi N, Janiszewska M, et al. EZH2 Is Essential for Glioblastoma Cancer Stem Cell Maintenance. *Cancer Res*. 2009;69(24):9211–9218.
63. Fujii S, Fukamachi K, Tsuda H, et al. RAS oncogenic signal upregulates EZH2 in pancreatic cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2012;417(3):1074-1079.
64. Yap D, Chu J, Berg T, et al. Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation. *Blood*. 2011;117(8):2451–2459.
65. McCabe M, Graves A, Ganji G, et al. Mutation of A677 in histone methyltransferase EZH2 in human B-cell lymphoma promotes hypertrimethylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 2012;109(8):2989–2994.

66. Ott H, Graves A, Pappalardi M, et al. A687V EZH2 Is a Driver of Histone H3 Lysine 27 (H3K27) Hypertrimethylation. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2014;13(12):3062-3073.
67. McCabe M, Ott H, Ganji G, et al. EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature*. 2012;492(7427):108–112.
68. Sun S-C, Yamaoka S. Activation of NF- κ B by HTLV-I and implications for cell transformation. *Oncogene*. 2005;24(39):5952–5964.
69. Tsukasaki K, Krebs J, Nagai K, et al. Comparative genomic hybridization analysis in adult T-cell leukemia/lymphoma: correlation with clinical course. *Blood*. 2001;97(12):3875–3881.
70. Oshiro A, Tagawa H, Ohshima K, et al. Identification of subtype-specific genomic alterations in aggressive adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*. 2006;107(11):4500-4507.
71. Jeang KT, Widen SG, Semmes OJ, Wilson SH. HTLV-I trans-activator protein, tax, is a trans-repressor of the human beta-polymerase gene. *Science*. 1990;247(4946):1082–1084.
72. Kao SY, Marriott SJ. Disruption of nucleotide excision repair by the human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein. *J. Virol*. 1999;73(5):4299–4304.
73. Park HU, Jeong J-HH, Chung JH, Brady JN. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax interacts with Chk1 and attenuates DNA-damage induced G2 arrest mediated by Chk1. *Oncogene*. 2004;23(29):4966–4974.
74. Akagi T, Ono H, Tsuchida N, Shimotohno K. Aberrant expression and function of p53 in T-cells immortalized by HTLV-I Tax1. *FEBS Letters*. 1997;406(3):263-266
75. Zane L, Yasunaga J, Mitagami Y, et al. Wip1 and p53 contribute to HTLV-1 Tax-induced tumorigenesis. *Retrovirology*. 2012;9:114.
76. Mulloy JC, Kislyakova T, Cereseto A, et al. Human T-cell lymphotropic/leukemia virus

- type 1 Tax abrogates p53-induced cell cycle arrest and apoptosis through its CREB/ATF functional domain. *J. Virol.* 1998;72(11):8852–8860.
77. Ego T, Ariumi Y, Shimotohno K. The interaction of HTLV-1 Tax with HDAC1 negatively regulates the viral gene expression. *Oncogene.* 2002;21(47):7241-7246.
78. Kamoi K, Yamamoto K, Misawa A, et al. SUV39H1 interacts with HTLV-1 Tax and abrogates Tax transactivation of HTLV-1 LTR. *Retrovirology.* 2006;3(1):5.
79. Yamamoto K, Ishida T, Nakano K, et al. SMYD3 interacts with HTLV - 1 Tax and regulates subcellular localization of Tax. *Cancer Sci.* 2011;102(1):260–266.
80. Tanaka Y, Yoshida A, Takayama Y, et al. Heterogeneity of antigen molecules recognized by anti-tax1 monoclonal antibody Lt-4 in cell lines bearing human T cell leukemia virus type I and related retroviruses. *Jpn. J. Cancer Res.*1990;81(3):225–231.
81. Kobayashi S, Nakano K, Watanabe E, et al. CADM1 Expression and Stepwise Downregulation of CD7 Are Closely Associated with Clonal Expansion of HTLV-I–Infected Cells in Adult T-cell Leukemia/Lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 2014;20(11):2851–2861.
82. Ho Sui SJ, Mortimer JR, Arenillas DJ, et al. oPOSSUM: identification of over-represented transcription factor binding sites in co-expressed genes. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(10):3154–3164.
83. Huang DW a W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009;4(1):44–57.
84. Ogawa S, Nanya Y, Yamamoto G. Genome-wide copy number analysis on GeneChip platform using copy number analyzer for affymetrix GeneChip 2.0 software. *Methods Mol. Biol.* 2007;396:185–206
85. Oki S, Maehara K, Ohkawa Y, Meno C. SraTailor: graphical user interface software for

- processing and visualizing ChIP-seq data. *Genes Cells*. 2014;19(12):919–926.
86. Greer EL, Shi Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat. Rev. Genet.* 2012;13(5):343–357.
87. Kirmizis A, Bartley S, Kuzmichev A, et al. Silencing of human polycomb target genes is associated with methylation of histone H3 Lys 27. *Genes Dev.* 2004;18(13):1592–1605.
88. Barski A, Cuddapah S, Cui K, et al. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*. 2007;129(4):823–837.
89. Lee T, Jenner R, Boyer L, et al. Control of Developmental Regulators by Polycomb in Human Embryonic Stem Cells. *Cell*. 2006;125(2):301-313
90. Schmidl C, Klug M, Boeld TJ, et al. Lineage-specific DNA methylation in T cells correlates with histone methylation and enhancer activity. *Genome Res.* 2009;19(7):1165–1174.
91. Rada-Iglesias A, Bajpai R, Swigut T, et al. A unique chromatin signature uncovers early developmental enhancers in humans. *Nature*. 2011;470(7333):279–283.
92. Creighton MP, Cheng AW, Welstead GG, et al. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010;107(50):21931–21936.
93. Kundaje A, Meuleman W, Ernst J, et al. Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature*. 2015;518(7539):317–330.
94. Riising E, Comet I, Leblanc B, et al. Gene Silencing Triggers Polycomb Repressive Complex 2 Recruitment to CpG Islands Genome Wide. *Mol. Cell*. 2014;55(3):347-360.
95. Mendenhall EM, Koche RP, Truong T, et al. GC-rich sequence elements recruit PRC2 in mammalian ES cells. *PLoS Genet.* 2010;6(12):e1001244.
96. Vavouri T, Lehner B. Human genes with CpG island promoters have a distinct

- transcription-associated chromatin organization. *Genome Biol.* 2012;13(11):R110.
97. Nakahata S, Yamazaki S, Nakauchi H, Morishita K. Downregulation of ZEB1 and overexpression of Smad7 contribute to resistance to TGF-beta1-mediated growth suppression in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Oncogene.* 2010;29(29):4157–4169.
98. Nakahata S, Ichikawa T, Maneesaay P, et al. Loss of NDRG2 expression activates PI3K-AKT signalling via PTEN phosphorylation in ATLL and other cancers. *Nat. Commun.* 2014;5:3393.
99. Mühleisen A, Giaisi M, Köhler R, Krammer PH, Li-Weber M. Tax contributes apoptosis resistance to HTLV-1-infected T cells via suppression of Bid and Bim expression. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1575.
100. Watanabe M, Nakahata S, Hamasaki M, et al. Downregulation of CDKN1A in Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma despite Overexpression of CDKN1A in Human T-Lymphotropic Virus 1-Infected Cell Lines. *J. Virol.* 2010;84(14):6966–6977.
101. Takahashi R, Yamagishi M, Nakano K, et al. Epigenetic deregulation of Ellis Van Creveld confers robust Hedgehog signaling in adult T-cell leukemia. *Cancer Sci.* 2014;105(9):1160–1169.
102. Sasaki H, Nishikata I, Shiraga T, et al. Overexpression of a cell adhesion molecule, TSLC1, as a possible molecular marker for acute-type adult T-cell leukemia. *Blood.* 2005;105(3):1204–1213.
103. Agger K, Cloos P, Christensen J, et al. UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature.* 2007;449(7163):731–734.
104. Xie X, Rigor P, Baldi P. MotifMap: a human genome-wide map of candidate regulatory motif sites. *Bioinformatics.* 2009;25(2):167–174.

105. Vlachos IS, Zagganas K, Paraskevopoulou MD, et al. DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(W1):W460–466.
106. Bellon M, Baydoun H, Yao Y, Nicot C. HTLV-I Tax-dependent and -independent events associated with immortalization of human primary T lymphocytes. *Blood.* 2010;115(12):2441–2448.
107. Kobayashi S, Watanabe E, Ishigaki T, et al. Advanced human T-cell leukemia virus type 1 carriers and early-stage indolent adult T-cell leukemia-lymphoma are indistinguishable based on CADM1 positivity in flow cytometry. *Cancer Sci.* 2015;106(5):598–603.
108. Hirata M, Hayashi J, Noguchi A, et al. The effects of breastfeeding and presence of antibody to p40tax protein of human T cell lymphotropic virus type-I on mother to child transmission. *Int. J. Epidemiol.* 1992;21(5):989–994.
109. Iwanaga M, Watanabe T, Utsunomiya A, et al. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) proviral load and disease progression in asymptomatic HTLV-1 carriers: a nationwide prospective study in Japan. *Blood.* 2010;116(8):1211–1219.
110. Asanuma S, Yamagishi M, Kawanami K, et al. Adult T-cell leukemia cells are characterized by abnormalities of Helios expression that promote T cell growth. *Cancer Sci.* 2013;104(8):1097–1106.
111. Ishihara M, Araya N, Sato T, et al. Preapoptotic protease calpain-2 is frequently suppressed in adult T-cell leukemia. *Blood.* 2013;121(21):4340–4347.
112. Sasaki D, Imaizumi Y, Hasegawa H, et al. Overexpression of Enhancer of zeste homolog 2 with trimethylation of lysine 27 on histone H3 in adult T-cell leukemia/lymphoma as a target for epigenetic therapy. *Haematologica.* 2011;96(5):712–

- 719.
113. Fiskus W, Wang Y, Sreekumar A, et al. Combined epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A and the histone deacetylase inhibitor panobinostat against human AML cells. *Blood*. 2009;114(13):2733–2743.
 114. Xu K, Wu ZJ, Groner AC, et al. EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb-independent. *Science*. 2012;338(6113):1465–1469.
 115. Yan J, Ng S, Tay J, et al. EZH2 overexpression in natural killer/T-cell lymphoma confers growth advantage independently of histone methyltransferase activity. *Blood*. 2013;121(22):4512–4520.
 116. Kondo Y, Shen L, Cheng A, et al. Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. *Nat. Genet*. 2008;40(6):741–750.
 117. Luco R, Pan Q, Tominaga K, et al. Regulation of Alternative Splicing by Histone Modifications. *Science*. 2010;327(5968):996–1000.
 118. Lovén J, Hoke HA, Lin CY, et al. Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell*. 2013;153(2):320–334.
 119. Dixon JR, Selvaraj S, Yue F, et al. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*. 2012;485(7398):376–380.
 120. Lupiáñez DGG, Kraft K, Heinrich V, et al. Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell*. 2015;161(5):1012–1025.
 121. Vieux-Rochas M, Fabre PJ, Leleu M, Duboule D, Noordermeer D. Clustering of mammalian Hox genes with other H3K27me3 targets within an active nuclear

- domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015;112(15):4672–4677.
122. Satou Y, Paola M, Ishihara K, et al. HTLV-1 inserts an ectopic CTCF-binding site into the human genome. *Retrovirology*, 2015; 12(Suppl 1): P12.
123. Berg T, Thoene S, Yap D, et al. A transgenic mouse model demonstrating the oncogenic role of mutations in the polycomb-group gene EZH2 in lymphomagenesis. *Blood*. 2014;123(25):3914–3924.
124. Polak P, Karlić R, Koren A, et al. Cell-of-origin chromatin organization shapes the mutational landscape of cancer. *Nature*. 2015;518(7539):360–364.
125. Kataoka K, Nagata Y, Kitanaka A, et al. Integrated molecular analysis of adult T cell leukemia/lymphoma. *Nat. Genet.* 2015;47(11):1304–1315.
126. Najafabadi HS, Mnaimneh S, Schmitges FW, et al. C2H2 zinc finger proteins greatly expand the human regulatory lexicon. *Nat. Biotechnol.* 2015;33(5):555–562.
127. She X, Cheng Z, Zöllner S, Church DM, Eichler EE. Mouse segmental duplication and copy number variation. *Nat. Genet.* 2008;40(7):909–914.
128. Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2015;15(6):321–333.
129. Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev.* 2006;20(5):515–524.
130. Müller J, Kassis JA. Polycomb response elements and targeting of Polycomb group proteins in *Drosophila*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2006;16(5):476–484.
131. Vasanthi D, Nagabhushan A, Matharu NK, Mishra RK. A functionally conserved Polycomb response element from mouse HoxD complex responds to heterochromatin factors. *Sci. Rep.* 2013;3:3011.
132. Kotake Y, Nakagawa T, Kitagawa K, et al. Long non-coding RNA ANRIL is

- required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15(INK4B) tumor suppressor gene. *Oncogene*. 2011;30(16):1956–1962.
133. Rinn J, Kertesz M, Wang J, et al. Functional Demarcation of Active and Silent Chromatin Domains in Human HOX Loci by Noncoding RNAs. *Cell*. 2007;129(7):1311-1323.
134. Blackledge N, Farcas A, Kondo T, et al. Variant PRC1 Complex-Dependent H2A Ubiquitylation Drives PRC2 Recruitment and Polycomb Domain Formation. *Cell*. 2014;157(6):1445-1459.
135. Rahman S, Quann K, Pandya D, et al. HTLV-1 Tax Mediated Downregulation of miRNAs Associated with Chromatin Remodeling Factors in T Cells with Stably Integrated Viral Promoter. *PLoS ONE*. 2012;7(4):e34490
136. Van Duyne R, Guendel I, Klase Z, et al. Localization and sub-cellular shuttling of HTLV-1 tax with the miRNA machinery. *PLoS ONE*. 2012;7(7):e40662.
137. Ballabio E, Milne TA. Molecular and Epigenetic Mechanisms of MLL in Human Leukemogenesis. *Cancers (Basel)*. 2012;4(3):904–944.
138. Mills AA. Throwing the cancer switch: reciprocal roles of polycomb and trithorax proteins. *Nat. Rev. Cancer*. 2010;10(10):669–682.
139. Rosin O, Koch C, Schmitt I, et al. A Human T-cell Leukemia Virus Tax Variant Incapable of Activating NF- κ B Retains Its Immortalizing Potential for Primary T-lymphocytes. *J. Biol. Chem*. 1998;273(12):6698–6703.
140. Robek MD, Ratner L. Immortalization of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes by human T-cell leukemia virus type 1 Tax mutants expressed in a functional molecular clone. *J. Virol*. 1999;73(6):4856–4865.

Figure 1

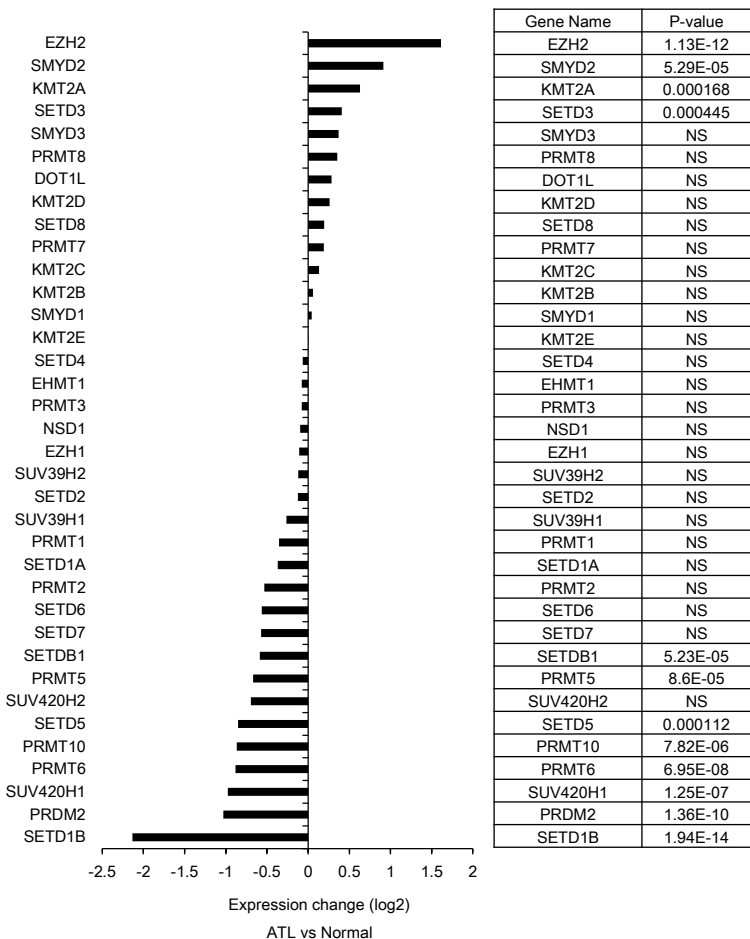


Figure 1 SETドメインを有する遺伝子のATL細胞と正常T細胞での発現変化。ATL検体(急性型、n=26)と健常人由来正常CD4陽性T細胞(n=21)の遺伝子発現アレイの結果(GSE33615)を、ATLで最も発現上昇している遺伝子から降順に、その発現変化を示した。P < 1E-3の遺伝子はNot Significant(NS)とした。遺伝子は(86)に記載されているものを使用した。

Figure 2

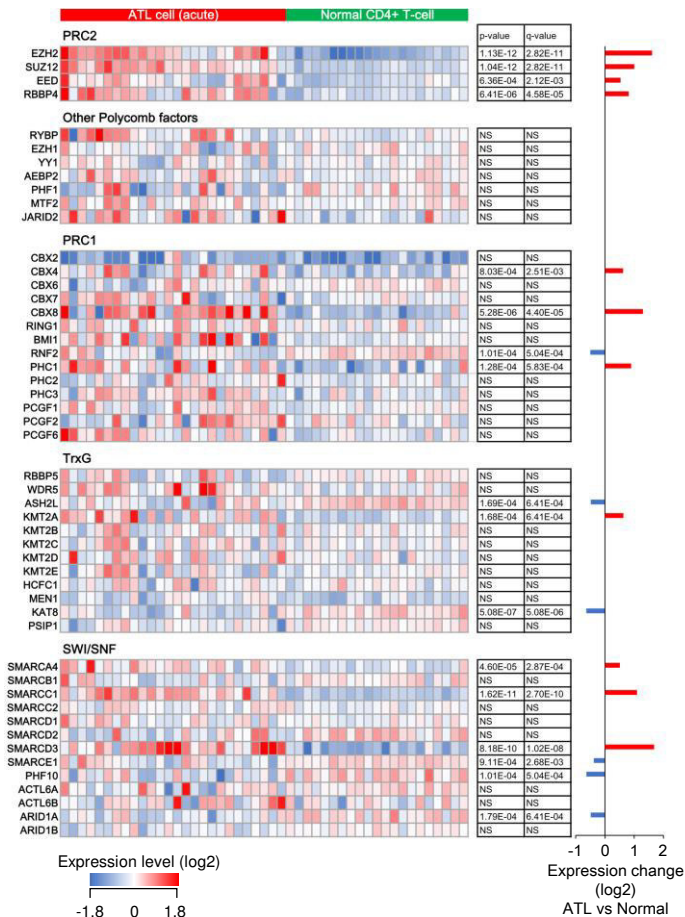


Figure 2 ATL細胞におけるエピジェネティックな遺伝子制御に関わる遺伝子群の発現解析。ATL検体(急性型、n=26)、健常人由来正常CD4陽性T細胞(n=21)の網羅的な遺伝子発現解析の結果(GSE33615)を再解析した。遺伝子は(137、138)に従って選定し、高発現を赤色、低発現を青色に表示した。p-value、q-valueはそれぞれWelchのT検定、Benjamini-Hochberg法によって算出し、 $P < 1E-3$ を満たす遺伝子のみを表示した。正常T細胞に対するATL検体での発現変化を棒グラフに表示した。

Figure 3

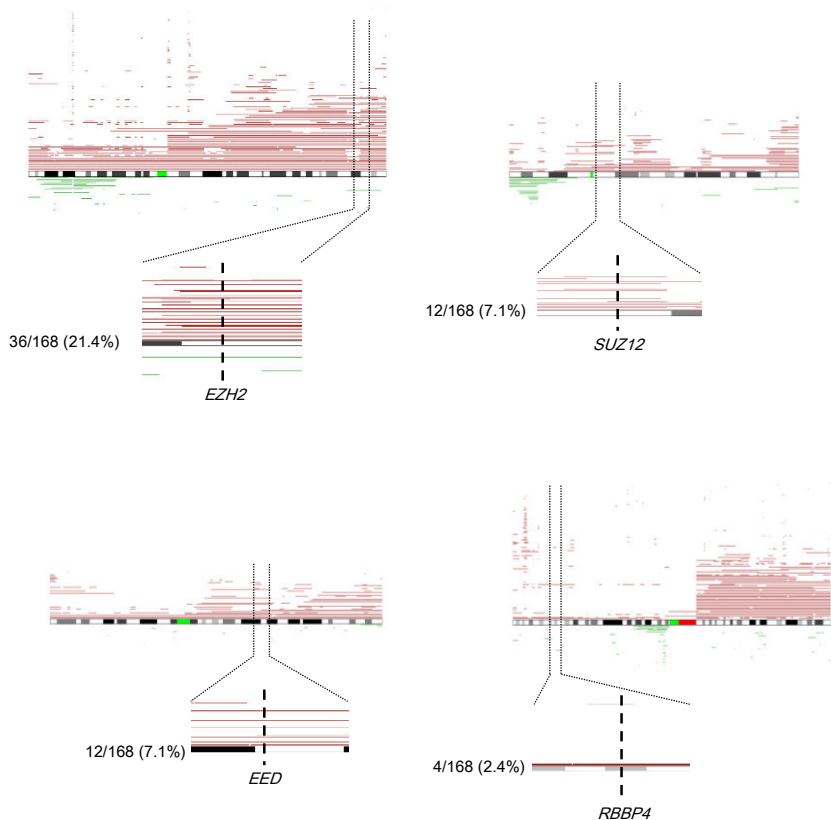


Figure 3 SNPアレイによるPRC2構成因子のゲノムコピーナンバー解析。*EZH2* (7q36.1)、*SUZ12* (17q11.2)、*EED* (11q14.2)、*RBBP4* (1p35.1)の結果を示した。赤が重複、緑が欠失を示している。それぞれ上に染色体全体を、下に拡大したもの、重複のあった検体の割合を表示した。

Figure 4

A



B

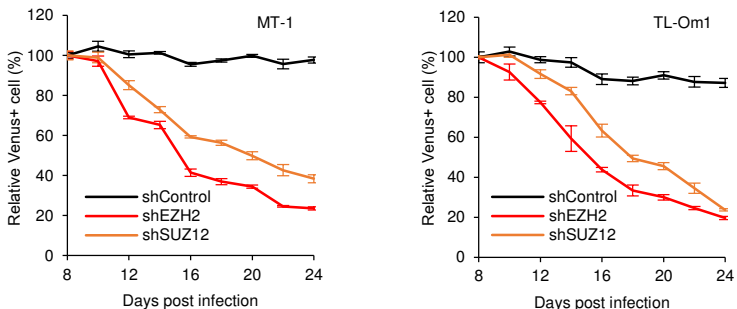


Figure 4 PRC2構成因子の発現減少がATL細胞の生存に与える影響。(A)レンチウイルスベクターの構造。shRNAは(13)と同じものを使用した。(B)ATL細胞株MT-1、TL-Om1に、レンチウイルスベクターを用いてshControl、shEZH2、shSUZ12を導入し、shRNAが導入された細胞の割合をFACS Caliburによって継続的に計測した。

Figure 5

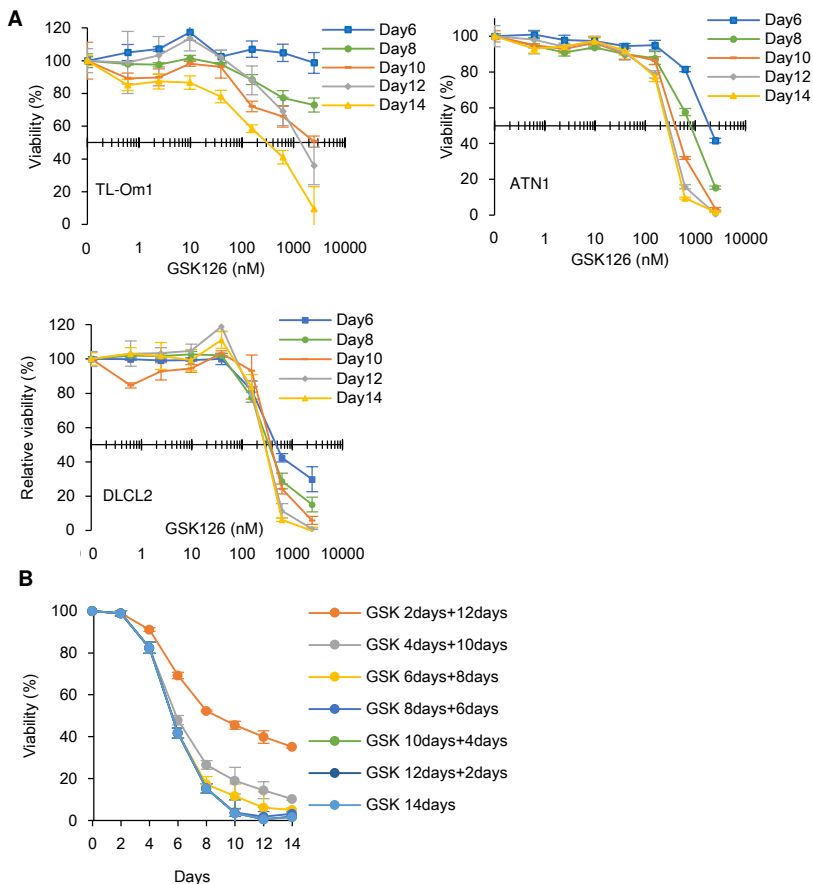


Figure 5 (A) EZH2活性阻害剤GSK126を14日間処理した際の生存率の変化をWST-8法により測定した。GSK126は8点の濃度(0、0.6、2.4、9.8、39、156、625、2500 nM)で処理した。DLBCL細胞株DLCL2はコントロールとして使用した。(B) 2500 nMのGSK126をATN1に2～14日間処理した際の生存率の変化。一部は途中でGSK126処理を中止し、そのまま培養を続けた。GSK126処理を行った日数とGSK126処理を中止し培養のみを行った日数を系列名に表示した。

Figure 6

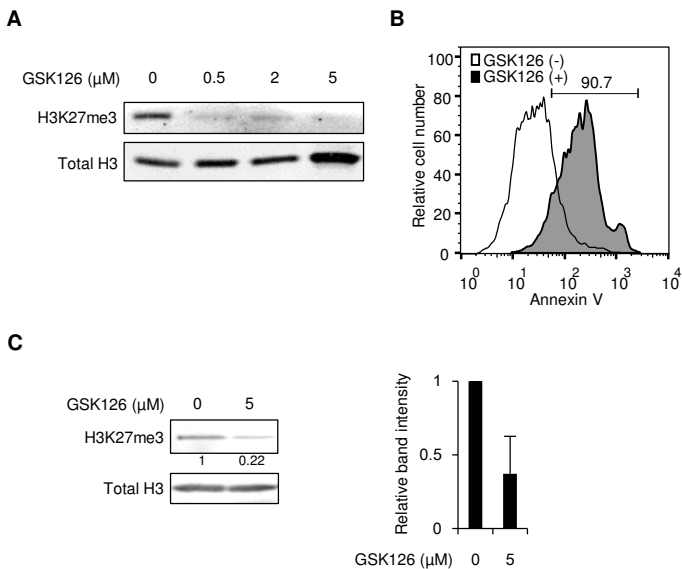


Figure 6 EZH2の阻害はATL細胞のH3K27me3を減少させ細胞死を誘導する。(A) ATL細胞株TL-Om1にGSK126を異なる4点の濃度で6日間処理し、H3K27me3をウェスタンブロットにより検出した。(B) ATL細胞株TL-Om1に対し5 μM のGSK126を6日間処理した際のAnnexin V陽性率を測定した。(C) ATL患者検体にGSK126を処理した際のH3K27me3をウェスタンブロットにより検出した。バンドの強度はImageJを用いて定量し、3検体の平均値をグラフに表示した。

Figure 7

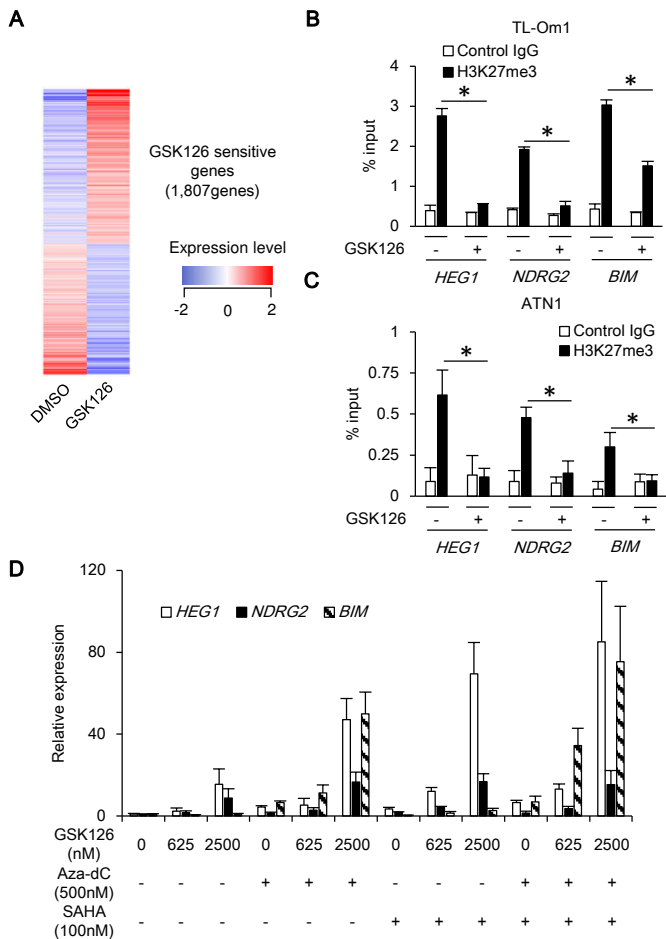


Figure 7 EZH2の阻害は、その標的遺伝子のH3K27me3を減少させ発現上昇を誘導する。(A)ATL細胞株TL-Om1に5 μ MのGSK126を48時間処理し、遺伝子発現の変化を遺伝子発現アレイによって解析した。GSK126処理によって発現が1.5倍以上変動した遺伝子をヒートマップに表示した。(B、C) 5 μ MのGSK126を6日間処理したATL細胞株TL-Om1、ATN1において遺伝子プロモーター上のH3K27me3をChIPアッセイにより検出した。(D)ATL細胞株ATN-1にGSK126を4日間、DNMT阻害剤Aza-dC、HDAC阻害剤SAHAを2日間共処理した際の遺伝子発現の変化をqRT-PCRにより測定した。

Figure 8

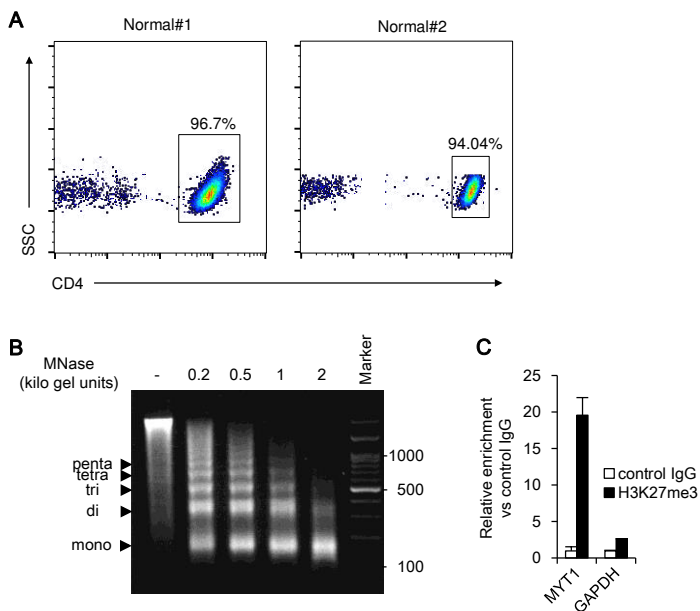


Figure 8 ChIP-on-chipに使用したサンプルの純度、反応条件の確認 (A) 健康人のPBMCよりCD4陽性T細胞を分離し、分離後にその陽性率を測定した。(B) クロマチン断片化の条件検討。ATL細胞株TL-Om1にMNaseを37°Cで20分反応させ、アガロースゲル電気泳動によりその長さを確認した。(C) (B)の1 kilo gel unitsのMNaseを反応させたサンプルを用いて行ったChIPアッセイの結果。H3K27me3の蓄積が正しく評価できていることが確認された。

Figure 9

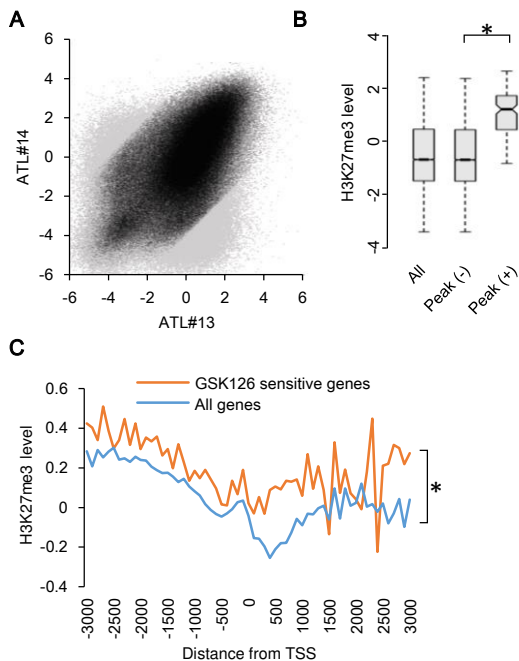


Figure 9 (A) H3K27me3のCocの例。2つのATL検体のH3K27me3の結果を散布図に示した。全てのprobeを灰色で、標準偏差が2以下のprobeを黒で表示した。(B) データベースより取得したChIP-seq (SRX000143) のデータにおいてH3K27me3のピークのあった遺伝子をpeak(+)とし、それ以外の遺伝子を(peak(-))、全遺伝子を(All)とした。今回得られた正常T細胞のH3K27me3のデータから3つの群のH3K27me3レベルを表示した(*、 $P < 1E-5$)。(C) Figure 7AのGSK126処理により発現が上昇した1,807遺伝子について、そのプロモーター領域のH3K27me3のレベルを転写開始点からの距離に従って算出した(*、 $P < 1E-5$)。

Figure 10

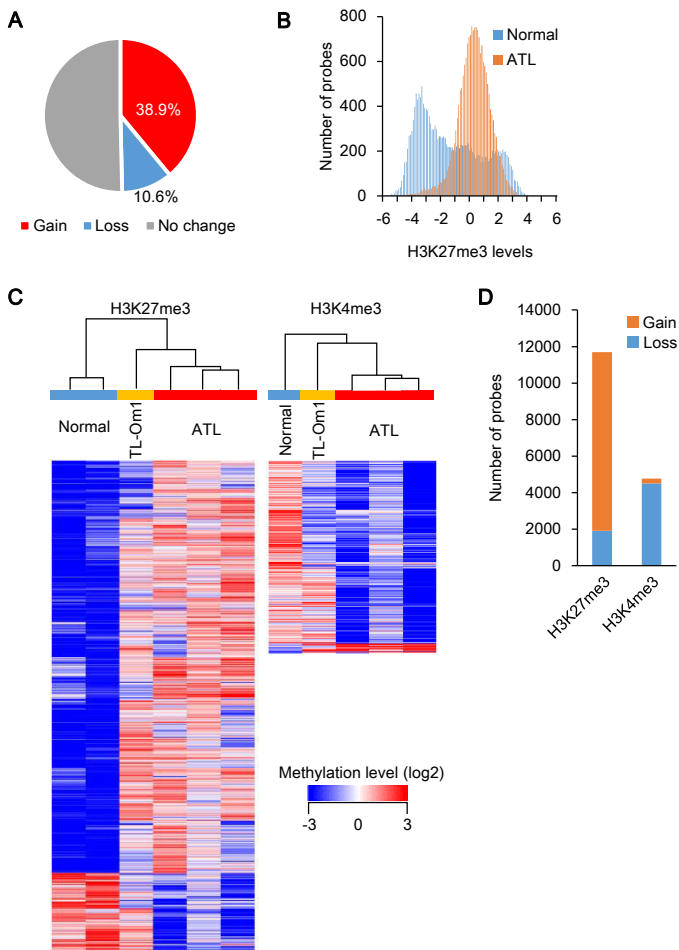


Figure 10 ATL細胞におけるH3K27me3、H3K4me3の変化。(A) 正常T細胞と比較し、ATL細胞においてH3K27me3の変化の見られた遺伝子の割合を円グラフに示した(Gain、LossともにFold change (FC) > ±1.5)。(B) ATL細胞において有意にH3K27me3の変化したprobeについて、そのH3K27me3の平均値のレベルと個数をヒストグラムに示した($P < .05$)。(C) H3K27me3とH3K4me3について、ATL細胞、ATL細胞株TL-Om1、正常T細胞におけるメチル化レベルをクラスター解析し、そのメチル化のレベルに従ってヒートマップに表示した(LogFC > 3)。(D) (C)に表示したprobeについて、正常T細胞と比較してATL細胞で増加/減少した数を棒グラフに表示した。

Figure 11

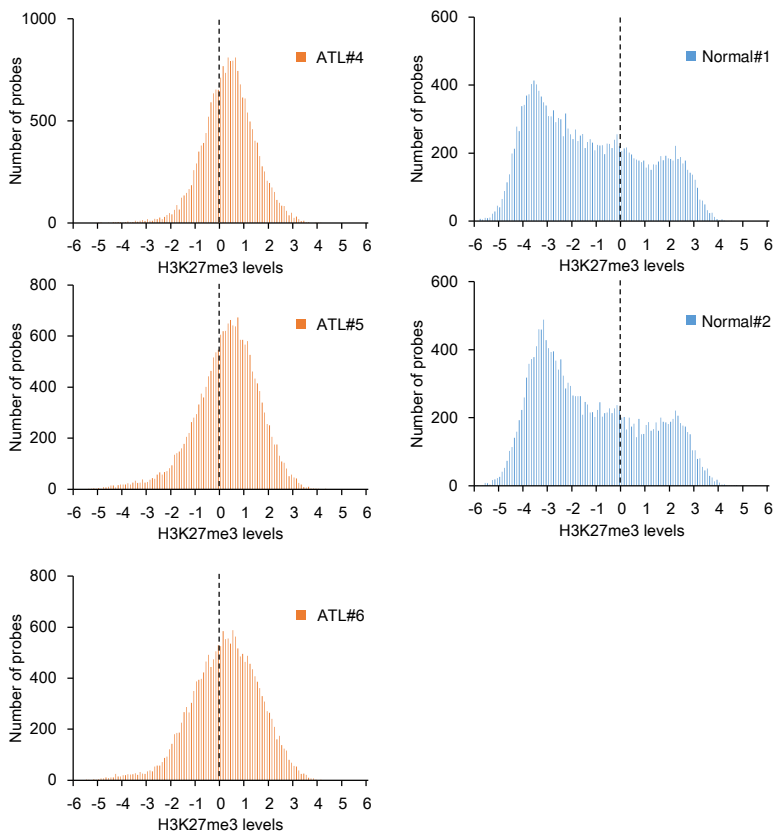


Figure 11 共通したH3K27me3パターン。Figure 10Bに表示したprobeについて、3例のATL検体、2例の正常T細胞の各サンプルのH3K27me3パターンを表示した。

Figure 12

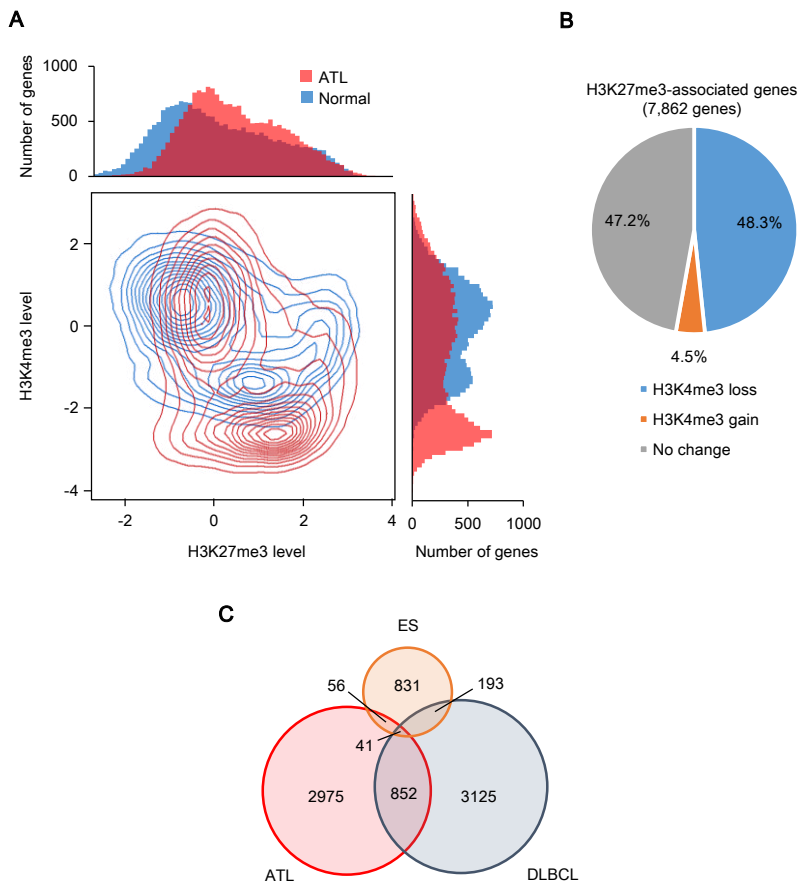


Figure 12 ATL細胞における異常なH3K27me3の蓄積はH3K4me3の減少を伴う。(A)全遺伝子のH3K27me3、H3K4me3のレベルを表示した。上側、右側にそれぞれH3K27me3のみ、H3K4me3のみのメチル化レベルをヒストグラムに表示した。(B) Figure 10Aの、ATLにおいてH3K27me3の蓄積のみられた遺伝子について、H3K4me3の変化を円グラフに表示した(Gain、LossともにFC > ± 1.5)。(C)ATL細胞における異常なH3K27me3の蓄積は、ES細胞、DLBCLにおけるH3K27me3の蓄積とあまり重複しない。ATLにおいて正常T細胞より2倍以上H3K27me3のレベルが高い遺伝子と、ES細胞、DLBCL細胞株DLCL2の結果を比較した。

Figure 13

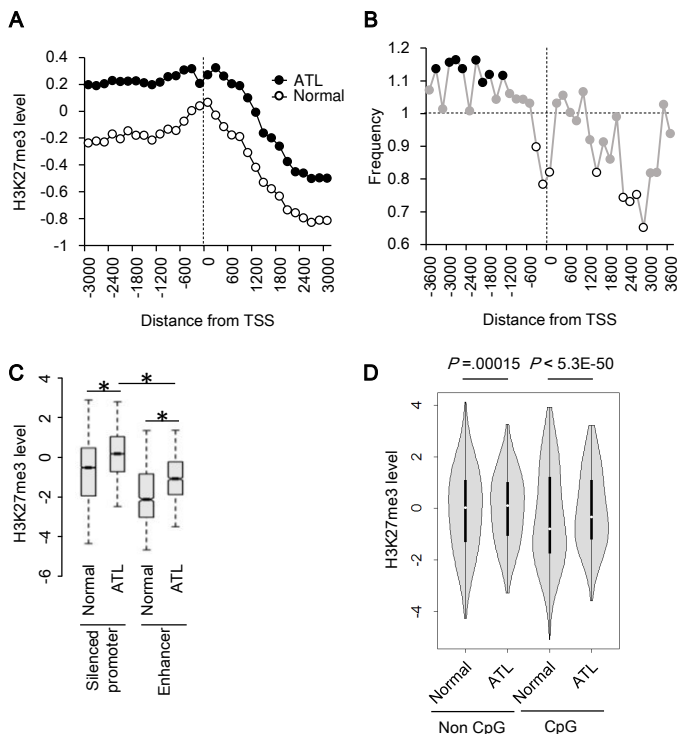


Figure 13 プロモーター近傍及びエンハンサー領域における異常なH3K27me3の蓄積。(A)SD < 2を満たす全てのprobeを転写開始点(TSS)からの距離に従って200bp毎に区切り、それぞれの区画におけるH3K27me3のレベルを平均化し、表示した。(B) Figure 10Bの、有意にH3K27me3が変化したprobeについて(A)と同様に200bp毎に区切り、各区画のprobe数を、設計されているprobe数と比較し、その出現頻度を算出した。黒い丸が有意に頻度が高く、白い丸が有意に頻度が低いことを示す($P < .05$)。(C)ATLにおいて有意に発現が低下している遺伝子($FC < -2$, $P < .001$)のプロモーターを“silenced promoter”、正常T細胞においてH3K4me1とH3K27acの蓄積のある領域を“Enhancer”と定義し、それぞれにおけるH3K27me3のレベルを表示した(*、 $P < 1E-5$)。正常T細胞におけるH3K4me1とH3K27acはEpigenetic roadmap projectのデータを使用した。(D) CpGアイランドの有無とH3K27me3のレベル。CpGアイランドの有無で全遺伝子を2群に分け、それぞれのH3K27me3のレベルを表示した。白い点が中央値を、黒い棒が四分位数範囲を、外側の曲線がカーネル密度を示す。

Figure 14

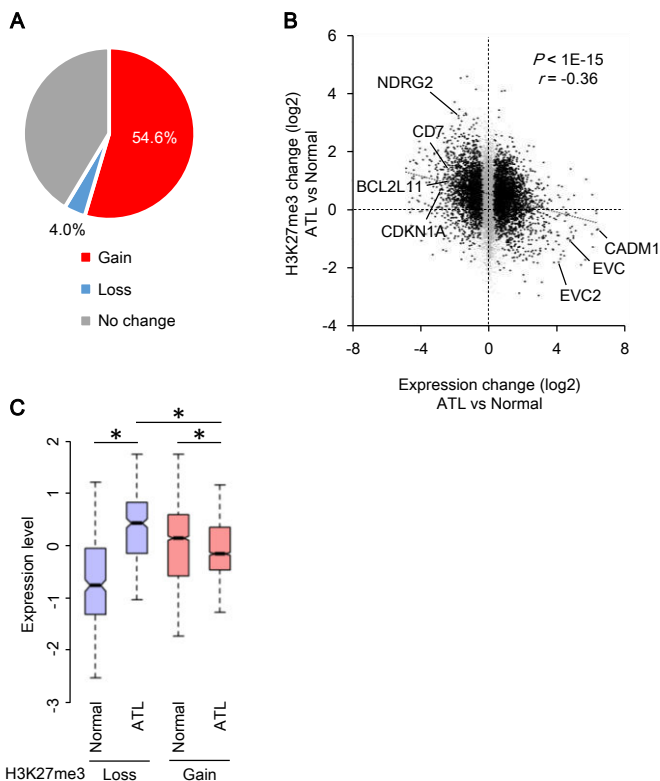


Figure 14 ATLにおける異常なH3K27me3の変化は遺伝子発現の変化と負に相関する。(A)ATLにおいて有意に発現が低下した遺伝子(FC < -1.5、 $P < .001$)について、そのプロモーター上のH3K27me3の変化を円グラフに示した(Gain、LossともにFC > ± 1.5)。(B)遺伝子発現の変化とH3K27me3の変化の緩やかな逆相関関係。相関係数とそのP値を右上に表示した。全遺伝子を灰色に、有意に発現が変動した遺伝子($P < .001$)を黒色に表示した。(C)ATLにおいてH3K27me3の増加(FC > +1.5)、減少(FC < -1.5)の見られた遺伝子について、その発現レベルを示した(*、 $P < 1E-5$)。

Figure 15

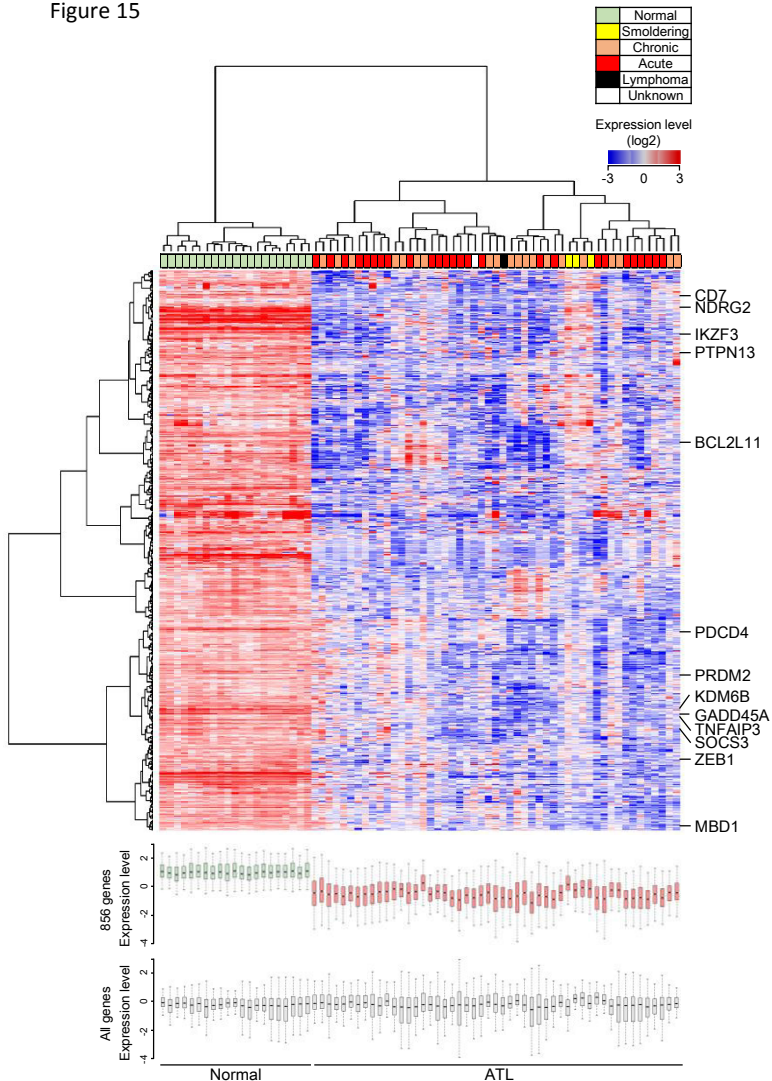


Figure 15 エピジェネティックな抑制はATL検体に共通して見られる。ATLにおいてH3K27me3が増加し、発現が有意に低下した856遺伝子について、その発現レベルを表示した。遺伝子間、サンプル間の距離はPearsonの相関係数で算出し、Ward法に従ってデンドログラムを作成した。856遺伝子と全遺伝子の発現レベルを下の箱ひげ図に表示した。

Figure 16

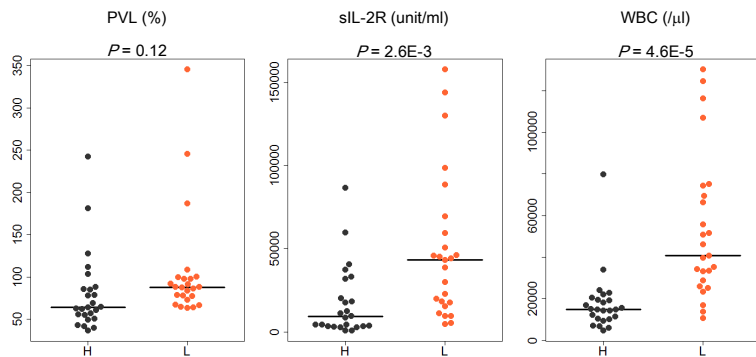


Figure 16 エピジェネティックな抑制の強さと病態との関連

Figure 15に示した856遺伝子の平均値に従って51のATL検体を2群(H、平均値が高い25検体; L、平均値が低い25検体)に分け、それぞれの群におけるPVL、sIL-2R、White blood cell(WBC)の値を比較した。中央値となったの1検体は除外した。黒い横棒は中央値を示す。

Figure 17

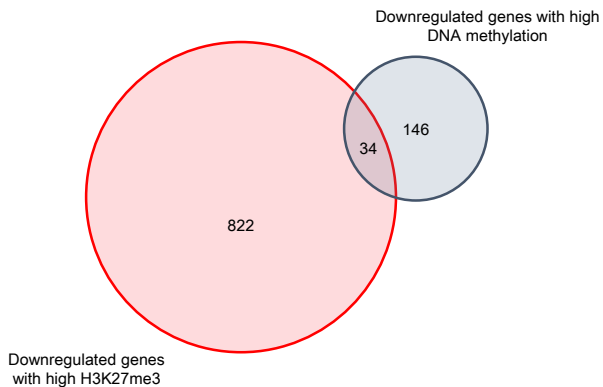


Figure 17 H3K27me3による抑制とDNAのメチル化による抑制はあまり重複しない
Figure 15に示したATLにおいてPRC2依存的に抑制される遺伝子と、DNAの高メチル化を受ける遺伝子(125)とを比較した。

Figure 18

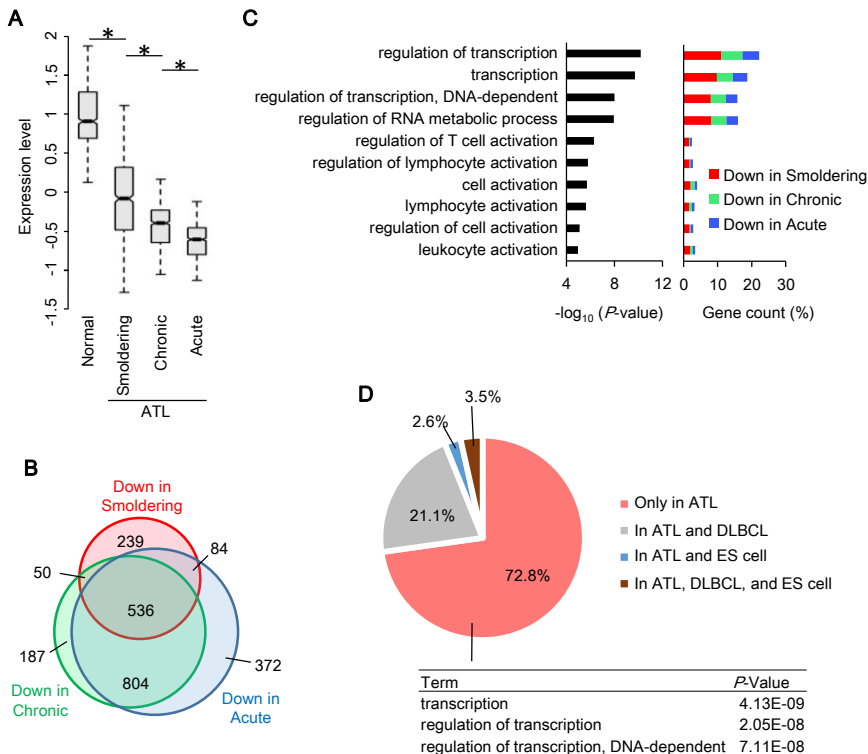


Figure 18 ATLにおけるPRC2依存的なエピジェネティックな異常は病型が進行するにつれて増強され、転写制御因子を抑制する。(A) Figure 15のATLにおいてエピジェネティックに抑制されている856遺伝子について、それぞれの病型におけるその発現値を示した(*、 $P < 1E-10$)。(B) ATLでH3K27me3が増加し、各病型で発現が減少する($FC < -1.5$ 、 $P < .05$)遺伝子の重なり。(C) (A)の856遺伝子のGO解析の結果。P値の低い順に10のカテゴリーを表示した。右側に、各病型において発現が抑制された遺伝子の割合を表示した。(D) (A)の856遺伝子について、ES細胞、DLBCLにおけるH3K27m3の蓄積の有無を割合で表示した。ATLでのみH3K27m3の蓄積の見られた遺伝子についてGO解析を行い、その結果をP値の低い順に3つのカテゴリーを下に示した。

Figure 19

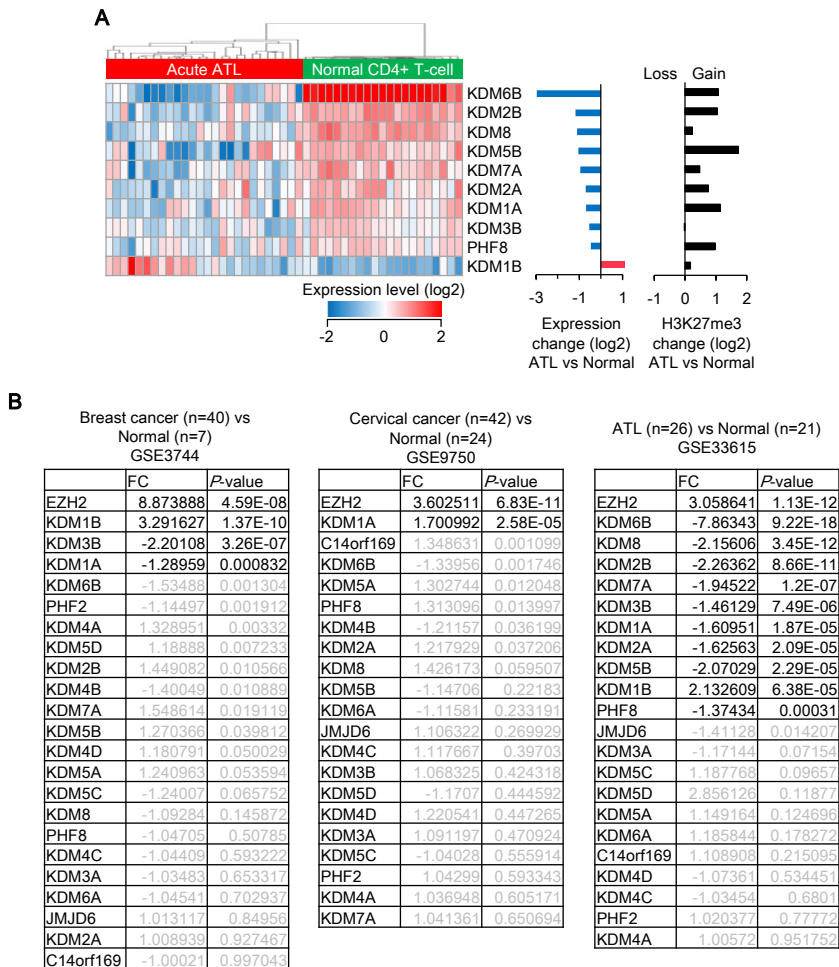


Figure 19 ATL特異的なヒストン脱メチル化酵素の発現抑制。(A) ATLにおいて有意に発現の変動していたヒストン脱メチル化酵素についてその発現値をヒートマップに、発現変化、H3K27me3の変化を棒グラフに表示した。(B) 乳がん(GSE3744)、子宮頸がん(GSE9750)、ATLにおけるヒストン脱メチル化酵素群の発現変動。 $P < 1E-3$ を満たす遺伝子を黒色に、それ以外を灰色に表示した。

Figure 20

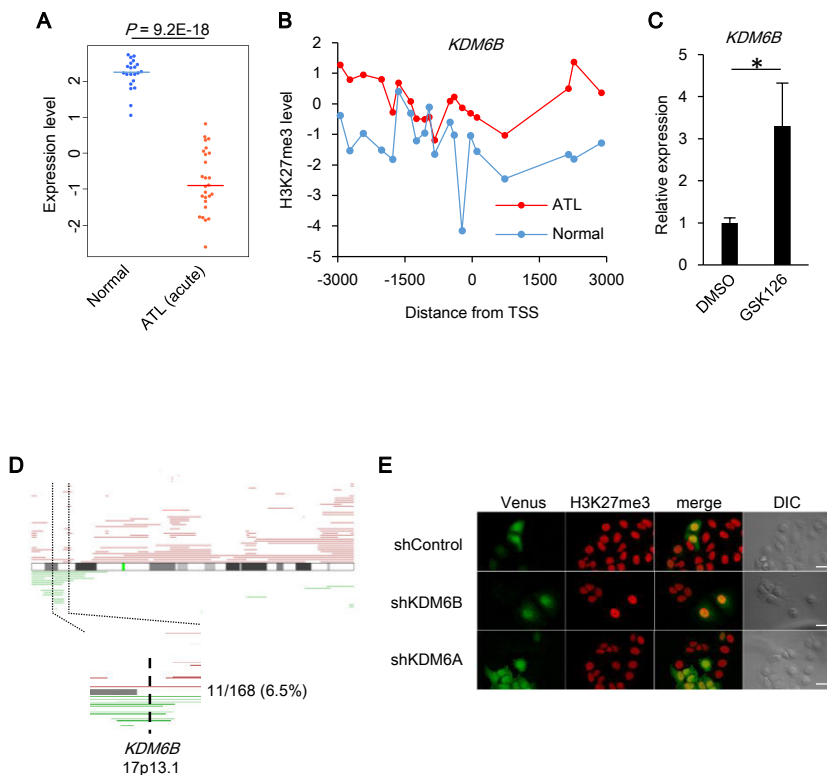


Figure 20 ATLにおけるエピジェネティックなKDM6Bの抑制はH3K27me3の蓄積に寄与する。(A) ATL検体(急性型、 $n=26$)、健康人由来正常CD4陽性T細胞($n=21$)のKDM6Bの発現レベル。中央値を線で表示した。(B) KDM6Bのプロモーター領域におけるH3K27me3のレベル。(C) ATL細胞株MT-1に $1\mu\text{M}$ のGSK126を5日間処理した際のKDM6Bの発現変化($n=3$ 、 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 、 $P < .05$)。(D) KDM6Bを含む領域のゲノムコピーナンバー解析の結果。上に染色体全体、下に拡大した領域とゲノムの欠失の割合を表示した。(E) 乳がん細胞株MCF7において3種類のshRNAを作用させた際のH3K27me3のレベル。レンチウイルスベクターはFigure 4に示したものを使用した。スケールバーは $20\mu\text{m}$ の長さを示す。

Figure 21

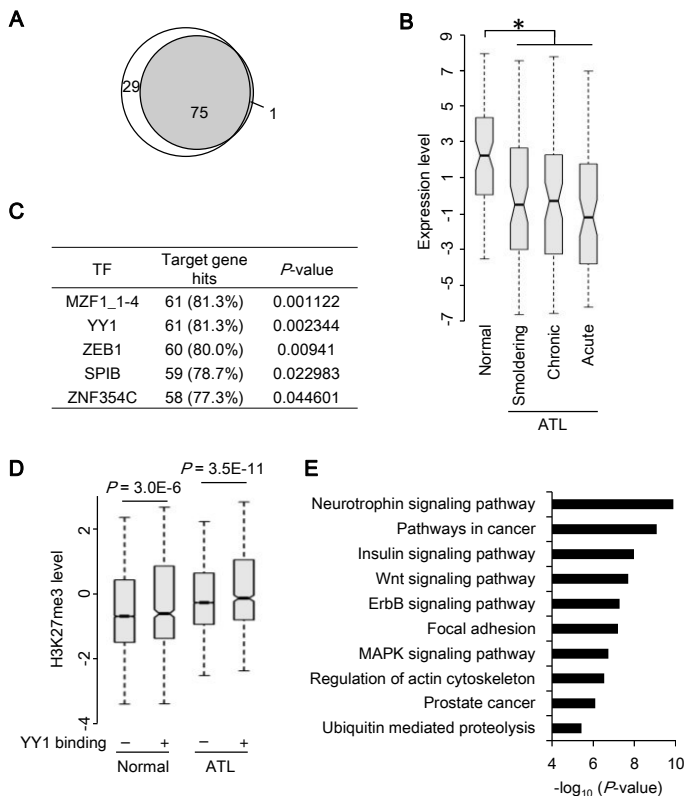


Figure 21 エピジェネティックなmiRNA群の抑制。(A) ATL検体(n=40)、健康人由来正常CD4陽性T細胞(n=22)のmiRNAアレイ解析の結果とCocの統合解析。ATLにおいて発現の減少しているmiRNAを白円で、H3K27me3の増加しているmiRNAを灰円に示した。(B) (A)の重複した75のmiRNAについて、病型毎の発現値を示した(*、 $P < .0001$)。(C) ATLにおいてエピジェネティックに抑制される75のmiRNAのプロモーター領域における転写因子の結合配列解析。 $P < .05$ を満たす上位5つの転写因子を示した。(D) YY1の結合とH3K27me3のレベル。YY1の結合配列の有無で全遺伝子を2群に分け、それぞれのH3K27me3のレベルを表示した。(E) (A)の75のmiRNAのmiRNA-pathway解析。それぞれのmiRNAの標的遺伝子をmirPathより取得し、その遺伝子を有意に含む上位10のKEGG pathwayを表示した。

Figure 22

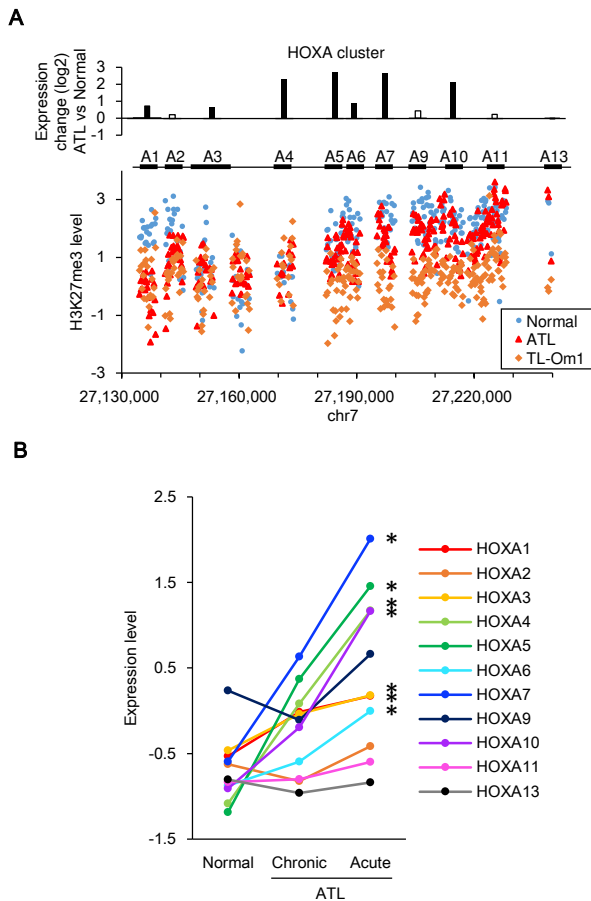


Figure 22 ATLにおけるHOXA遺伝子領域の脱抑制。(A)HOXA遺伝子領域におけるH3K27me3のレベルをその染色体上の位置に従って表示した。(B)HOXA遺伝子群の発現レベルを表示した(*、 $P < .05$)。

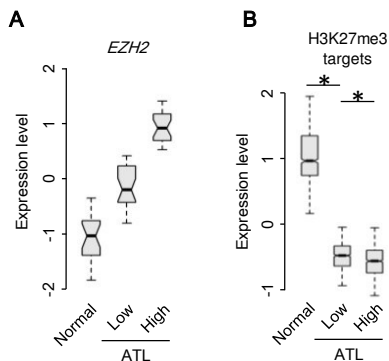


Figure 23 EZH2の発現レベルはその抑制の強さと相関する。(A)ATLのくすぶり型、慢性型、急性型の計50例をEZH2の発現レベルで2群に分け、それぞれのEZH2の発現レベルを示した。(B)Figure 15の、ATLでエピジェネティックに抑制される856遺伝子について、(A)の分類に従ってその発現値を表示した(*、 $P < .001$)。

Figure 24

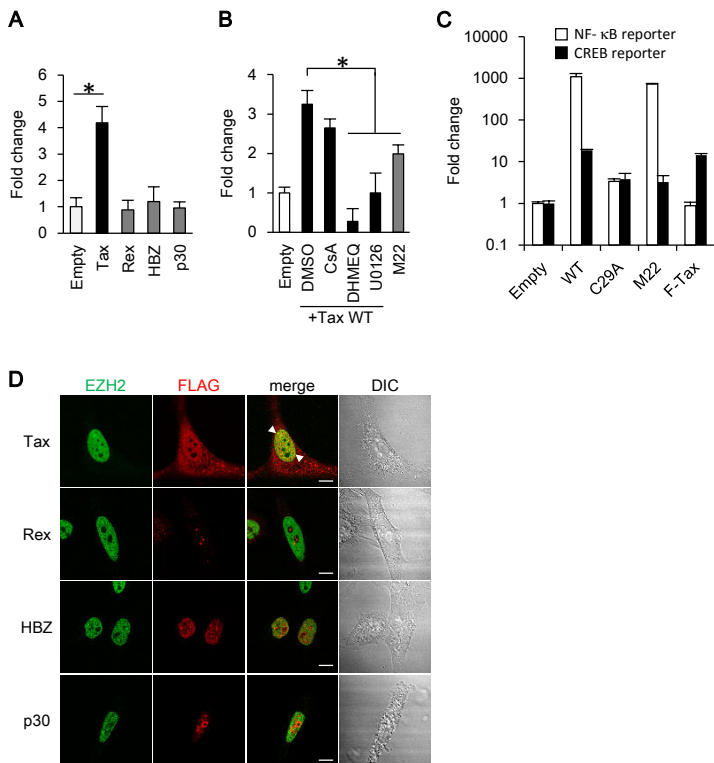


Figure 24 HTLV-1 TaxはEZH2のプロモーター活性を上昇させ、核内において共局在する。(A) EZH2 promoter Luciferaseに対するHTLV-1タンパク質の影響。HEK293FT細胞にプラスミドを発現させ、2日後にLuciferaseの活性を測定した($n = 3$ 、mean \pm SD、 $P < .05$)。 (B) TaxによるEZH2プロモーターの活性化はNF- κ B、MEK-ERK経路の抑制により減弱する($n = 3$ 、mean \pm SD、 $P < .05$)。DHMEQはNF- κ Bの阻害、cyclosporin A(CsA)はNAFTの阻害、U0126はERK1/2の阻害に使用した。(C) Taxの野生型、変異体によるNF- κ B、CREBの活性化。(D) HTLV-1タンパク質をHeLa細胞に発現させ、免疫染色によりEZH2との局在を比較した。(注、TaxがEZH2と共局在することは当研究室の先行研究により明らかとなっている。)

Figure 25

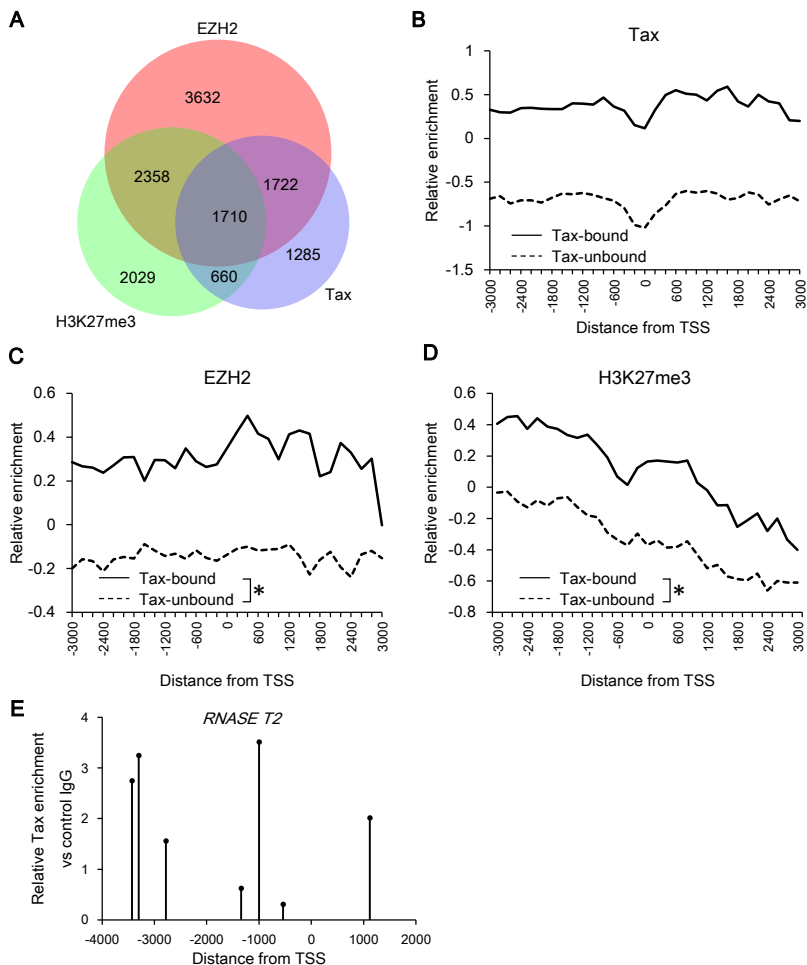


Figure 25 Taxはクロマチン上にEZH2と共局在する。(A) H3K27me3、EZH2、Taxの蓄積する遺伝子の重なり(FC > 0 vs control IgG)。HTLV-1感染細胞株MT-2を用いて、H3K27me3、Tax、EZH2のCoc解析を行った。この実験は当研究室の修士学生 堀真琴氏と共同で行った。(B-D) Taxの蓄積の有無で遺伝子を2群に分け、それぞれの遺伝子プロモーター上の(B) Tax、(C) EZH2、(D) H3K27me3のレベルを転写開始点からの距離に従って表示した(*、 $P < 1E-10$)。(E) Taxの結合し抑制性に機能することが報告されているRNASE T2遺伝子プロモーターにおけるTaxの結合。

Figure 26

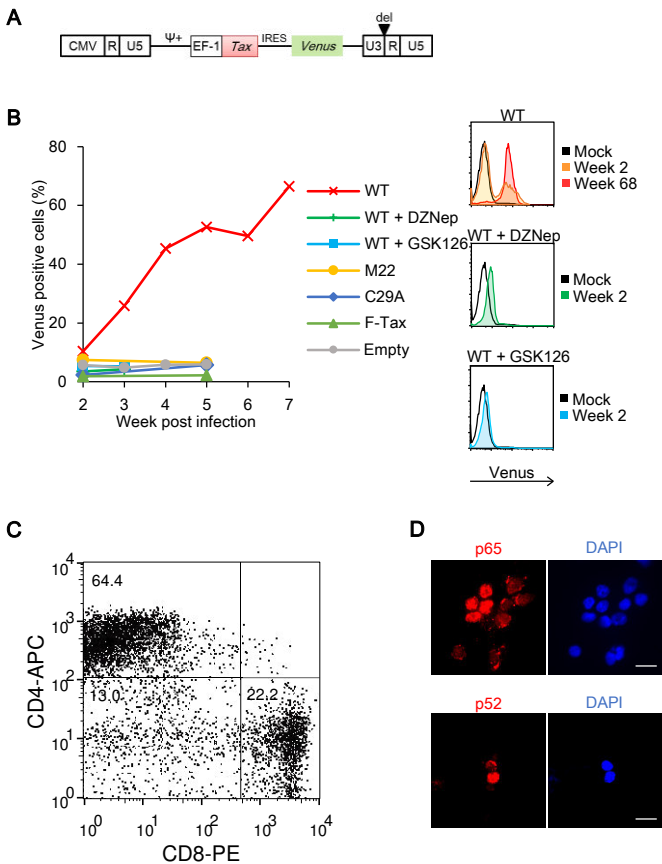
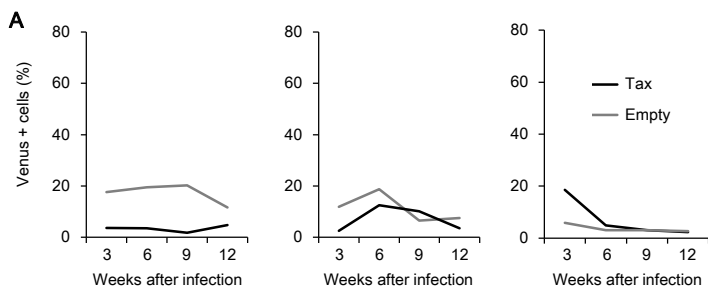


Figure 26 EZH2の活性はTaxによる不死化に必須である。(A) Taxの導入に使用したレンチウイルスベクターの構造。(B) 健康人由来PBMCにTaxを遺伝子導入した後のVenus陽性率の変化。野生型を除き、各群の細胞が死滅した時点で測定を中止した。(C) Tax-cellのCD4、CD8の陽性率。(D) Tax-cellにおけるNF- κ Bの活性化。p65、p52の核内移行を免疫染色により確認した。



B

文献	NF- κ B activation	CREB/ATF activation	Cell type	Vector	Immortalization
106	○	○	PBMC	Lentivirus	○
	○	×			×
	×	○			×
139	○	○	cord blood cell	Herpes virus	○
	×	○			○
	×	×			×
140	○	○	PBMC	Molecular clone	○
	×	○			×
	○	×			○

Figure 27 Taxによる細胞の増殖、不死化は限定的である (A) Figure 26の健常人とは異なる3人の健常人由来のPBMCにTaxを遺伝子導入し、Venus陽性率を継時的に測定した。いずれの細胞も12週間の培養で死滅したため、測定を中止した。(B) Taxによる細胞の不死化の文献情報をまとめた。

Figure 28

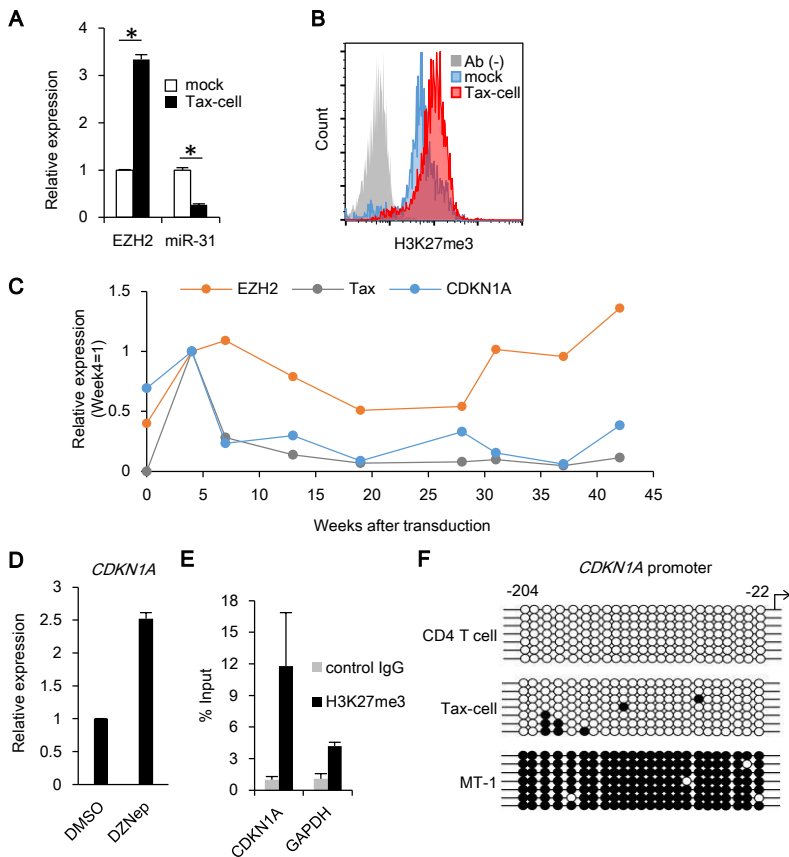


Figure 29

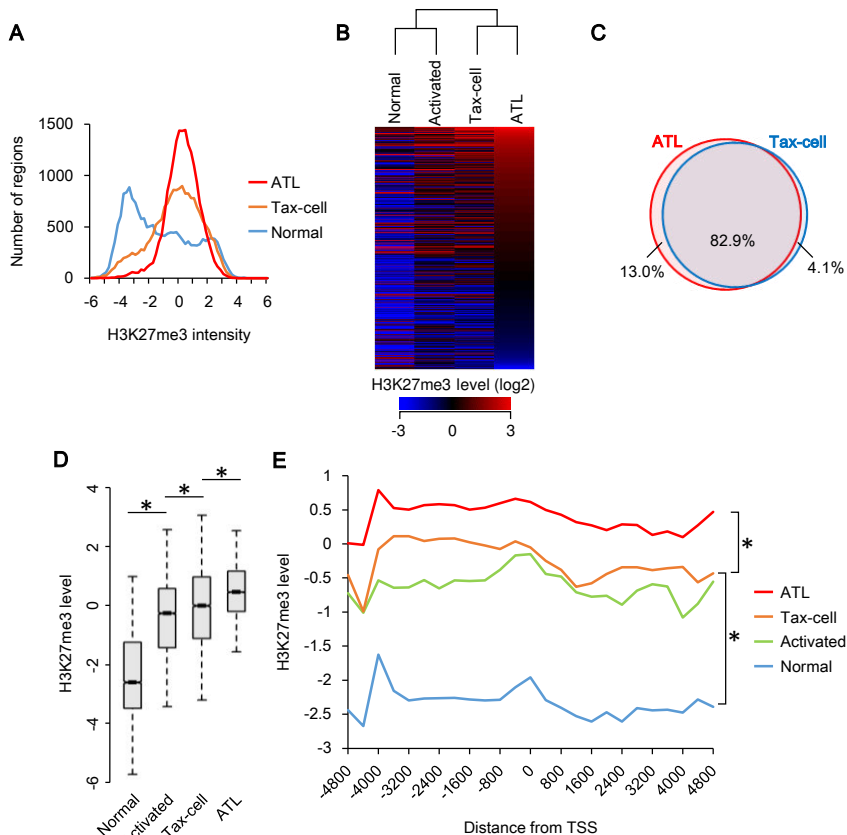


Figure 29 Tax-cellにおけるATL様なエピゲノムの異常。(A) CocによるTax-cellと正常T細胞、ATL細胞のH3K27me3の比較。Figure 10Bの、ATLで有意にH3K27me3が変化したprobeについてTax-cellのデータを加え表示した。(B) (A)に示したprobeについて、CD3/28の刺激を行った活性化T細胞の結果を加え、クラスター解析を行った。サンプル間の距離はPearsonの相関係数で算出し、Ward法に従ってデンドログラムを作成した。(C)正常T細胞に比べATLで有意にH3K27me3が高いprobe ($P < .05$)と、Tax-cellで高いprobeの比較。Probeの割合を表示した。(D) (C)のATL、Tax-cellのどちらにおいても正常T細胞よりH3K27me3の高いprobeについて、そのレベルを箱ひげ図に表示した(*、 $P < 1E-10$)。(E) (D)に示したprobeのH3K27me3レベルを、転写開始点からの距離に従って示した(*、 $P < 1E-10$)。

Figure 30

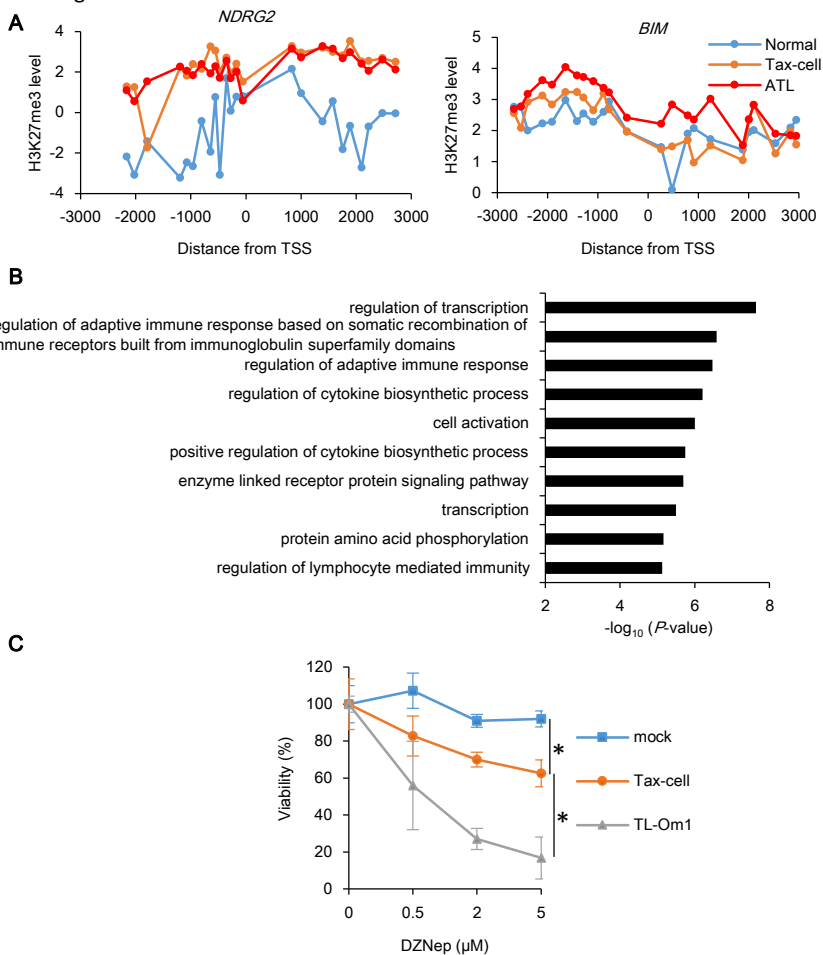


Figure 30 Tax-cellにおけるエピゲノムの異常はがん抑制遺伝子、転写因子など様々な遺伝子に影響を与え、細胞の生存に寄与する。(A) *NDRG2*、*BIM*のプロモーター領域のCocの結果。(B) Tax-cellにおいてH3K27me3の異常な蓄積のある遺伝子のGO解析結果。Figure 29D、Eで使用した、ATLとTax-cellにおいてH3K27me3の蓄積があるprobeの遺伝子と、ATLにおいて発現の低下した遺伝子 ($FC < -1.5$, $P < .05$)を比較し、重複した遺伝子をGO解析に使用した。(C) EZH2阻害剤DZNepが生存率に与える影響。Tax-cell、非感染細胞、ATL細胞株TL-Om1にDZNepを48時間処理し、WST-8法により定量した ($n = 3$, mean \pm SD, $P < .05$)。

Figure 31

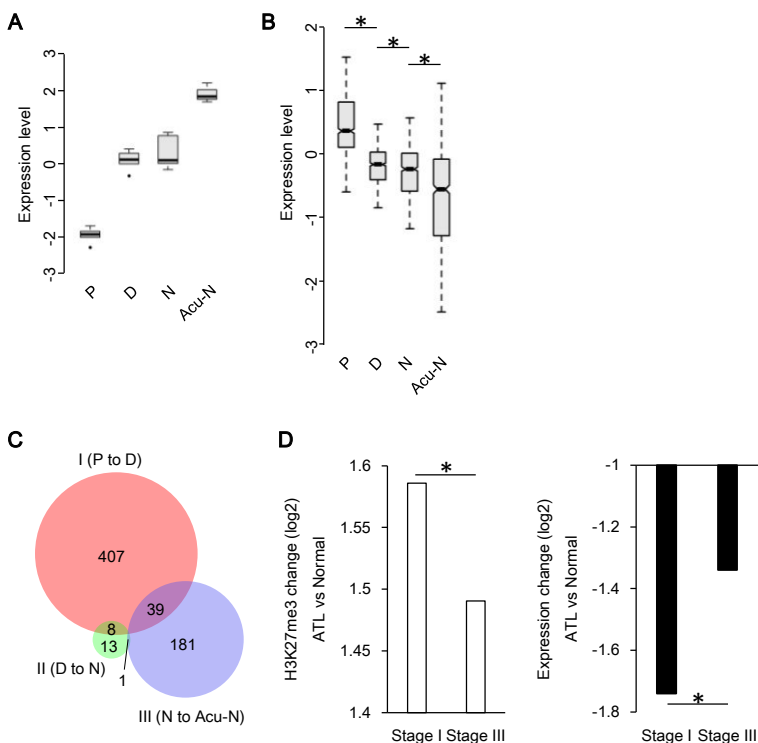


Figure 31 HTLV-1感染細胞におけるEZH2の発現上昇とエピジェネティックな抑制 (A)HTLV-1感染細胞、ATL細胞におけるEZH2の発現上昇 (P、CD7+/CADM1-分画; D、CD7+/CADM1+分画; N、CD7-/CADM1+分画; Acu-N、急性型ATLのCD7-/CADM1+分画)。(B)HTLV-1感染細胞における856遺伝子の発現低下。ATLでエピジェネティックに抑制される856遺伝子について、P、D、N、Acu-N分画における発現値を表示した。(C)正常細胞からATL細胞への変遷を3つの段階に分け(ステージI、PからD; II、DからN; III、NからAcu-N)、各段階で発現が低下する遺伝子(FC < -1.5、 $P < .05$)とATLにおいてH3K27me3の蓄積のある遺伝子を比較しベン図に表示した。(D)(C)のIでのみ発現が低下した407遺伝子と、IIIでのみ発現が低下した181遺伝子について、正常T細胞とATL細胞における発現変化、H3K27me3の変化を表示した(*、 $P < .05$)。

Figure 32

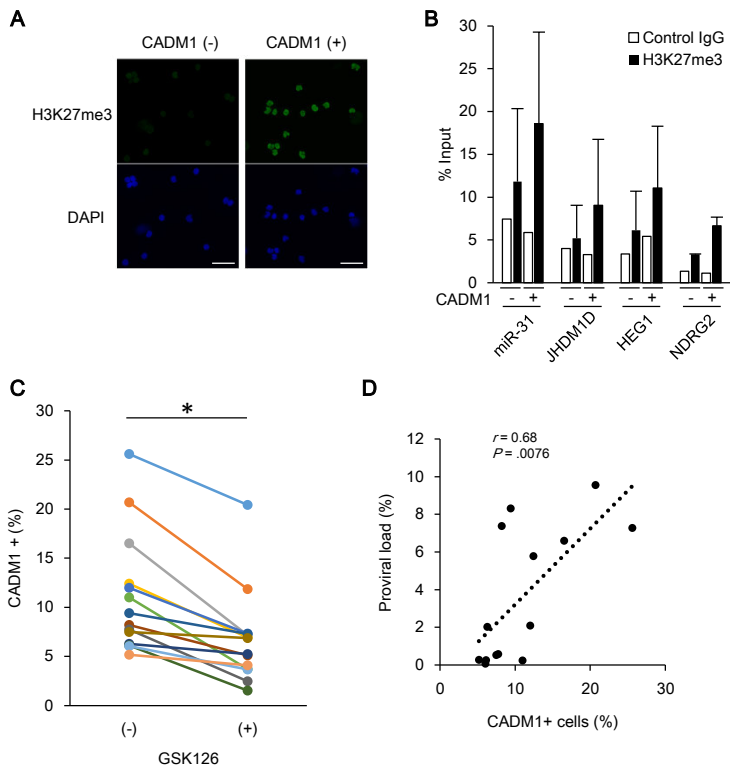


Figure 32 HTLV-1感染細胞におけるエピジェネティックな異常 (A) HTLV-1感染細胞におけるH3K27me3の蓄積。HTLV-1キャリアのCD4陽性T細胞をCADM1陰性、陽性に分け、それぞれを免疫染色に供した(スケールバー=20 μ m)。(B) CADM1陽性細胞におけるH3K27me3の蓄積を μ ChIPアッセイにより評価した(n=3, mean \pm SD)。(C) EZH2阻害はHTLV-1キャリア中のCADM1陽性率を低下させる。HTLV-1キャリアのPBMCに5 μ MのGSK126を9日間処理し、CD4陽性T細胞中のCADM1陽性細胞の割合を測定した。(D) CD4陽性CADM1陽性T細胞とPVLは正に相関する。(C)の14検体のCADM1陽性率とPVLの関係を表示した。

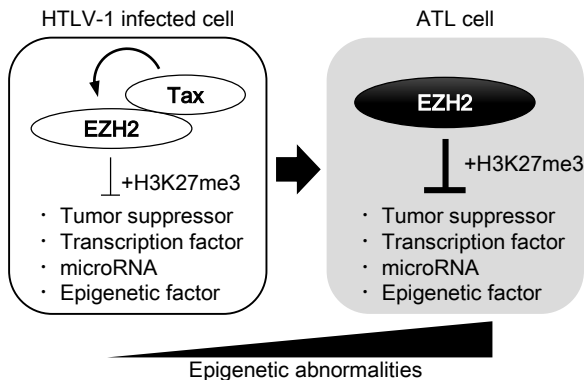


Figure 33 本研究により明らかになったエピゲノム異常の概念図。Taxを発現するHTLV-1感染細胞において、TaxはEZH2の発現を上昇させ、またEZH2との結合を介してエピジェネティックな抑制を行う。ATL細胞においてはTaxはほとんど発現していないが、NF- κ BとEZH2とのpositive feedback loopによりEZH2の発現が恒常的に亢進した状態になっており、エピジェネティックな抑制がより増強され、エピゲノムの再構成が起きていると考えられる。それにより多数のがん抑制因子が抑制され、細胞の生存、増殖に寄与し、また、転写因子、miRNA、ヒストン脱メチル化酵素が抑制されることでより広範な遺伝子発現の変動、維持しているものを考えられる。

Table 1 使用した検体の情報

Western blot (Figure 6C)

#	Diagnosis	Age	Sex	Proviral load (%)
1	Acute	56	M	57.01
2	Chronic	62	F	Not Tested
3	Smoldering	62	F	Not Tested

ChIP-on-chip (Figure 9~)

#	Diagnosis	Age	Sex	Proviral load (%)
4	Acute	61	F	108.03
5	Chronic	58	F	111.74
6	Acute	56	M	345.83

Flow cytometry for TSLC1 (Figure 32C)

#	Diagnosis	Age	Sex	Proviral load (%)
7	Asymptomatic carrier	38	M	0.06
8	Asymptomatic carrier	49	F	0.25
9	Asymptomatic carrier	64	M	8.31
10	Asymptomatic carrier	61	F	0.28
11	Asymptomatic carrier	29	M	7.37
12	Asymptomatic carrier	71	M	9.55
13	Asymptomatic carrier	49	F	0.23
14	Asymptomatic carrier	63	F	6.60
15	Asymptomatic carrier	65	F	2.10
16	Asymptomatic carrier	66	M	0.53
17	Asymptomatic carrier	54	M	7.27
18	Asymptomatic carrier	55	F	2.02
19	Asymptomatic carrier	84	M	5.78
20	Asymptomatic carrier	68	F	0.58

Table 2 使用したprimer

Quantitative PCR Primer List (Target Gene: Sequence)

Gene symbol	Forward	Reverse
EZH2	5'-GCC AAG AGA GGC ATC CAG AC-3'	5'-CCG ACA TAC TTC AGG GCA TCA-3'
RPL19	5'-ACC AAG GAA GCA CGC AAG C-3'	5'-CAG ACA AAG TGG GAG GTT TTA TTT C-3'
SUZ12	5'-CTC ATC AAG CAT GGG TTT ATT C-3'	5'-TGA CTA GAT GAA GCA TGA AGT TTC G-3'
EED	5'-CAT GAG GTT TTC TAT GGA TTT CTG G-3'	5'-AGC AGC ACC ACA TTT ATG ATG AG-3'
Tax	5'-CGG ATA CCC AGT CTA CGT GTT-3'	5'-CAG TAG GGC GTG ACG ATG TA-3'
KDM6B	5'-GCG GGC AGG GAA GAA AA-3'	5'-TCT CAC TTG TCA CGA ACA GGA TG-3'
NDRG2	5'-AGC TGA CCG AGG CCT TCA AG-3'	5'-CAA CGG ATC CTG CAC TGG TC-3'
BIM	5'-CGG CGT ATT GGA GAC GAG TT-3'	5'-ACC ATT CGT GGG TGG TCT TC-3'
HEG1	5'-CGA GAA GCT ATT GAA ATG CAT GAG-3'	5'-CGG GTA GAG TGC GTT TCG TT-3'
CDKN1A	5'-CTG TCA CTG TCT TGT ACC CTT GTG-3'	5'-CGG CGT TTG GAG TGG TAG A-3'

Primer List for CHIP Assay (Site: Sequence)

Gene symbol	Forward	Reverse
miR-31	5'-AAT GGG CCC TGC ATT CTC T-3'	5'-AAA ACC CAC ACC CTC ACC AC-3'
JHDM1D	5'-CCA GCG GAC GAC AGT GAT GA-3'	5'-AGC AAG GAG ACC AGA GCG TC-3'
HEG1	5'-TGT CCT CGC GGT GAC ATC TC-3'	5'-ACG CCC TCT CAA GCT TGG AT-3'
NDRG2	5'-CAA AGG GCC CTA GAA TCT GTA TGT-3'	5'-GTT TCC CAC CCT TCT CAA GTG G-3'
GAPDH	5'-AAC TTT CCC GCC TCT CAG C-3'	5'-CAG GAG GAC TTT GGG AAC GA-3'
BIM	5'-ACA ACG CCT CCT CAC TTG CT-3'	5'-AGG GAC CAC CCT ACA CAC CA-3'
HEG1	5'-TGT CCT CGC GGT GAC ATC TC-3'	5'-ACG CCC TCT CAA GCT TGG AT-3'
CDKN1A	5'-GGG GCG GTT GTA TAT CAG G-3'	5'-CTC TCT CAC CTC CTC TGA GTG C-3'

Primer List for bisulfite sequence (Site: Sequence)

Gene symbol	Forward	Reverse
CDKN1A	5'-GGG AGG AGG GAA GTG TTT TT-3'	5'-ACA ACT ACT CAC ACC TCA ACT-3'

Insert Sequences for Lentiviral Vector (Name: Sequence) (Underlines represent antisense of shRNA target sequences)

Name	Sequence
LV-shCtrl-top	5'-GAT CCC CCA TCG ACT GAA ATC CCT GGT AAT CCG TTG TTA ACA ACG GAT TAC CAG GGA TTT CAG TCG ATG TTT TTG GAA AT-3'
LV-shCtrl-bottom	5'-CTA GAT TTC CAA AAA CAT CGA CTG AAA TCC CTG GTA ATC CGT TGT TAA CAA CCG ATT ACC AGG GAT TTC AGT CGA TGG GG-3'
LV-shEZH2-top	5'-GAT CCC CGA GTG GAA GCA GTG AAG GAA CCG GTG CTG TCC <u>GTT CCT GCG CTG TTT CCA TGC</u> TTT TTG GAA AT-3'
LV-shEZH2-bottom	5'-CTA GAT TTC CAA AAA GAA TGG AAA CAG CGA AGG AAC GGA CAG CAC ACG TTG CTT CAC TGC TTC CAC TCG GG-3'
LV-shSUZ12-top	5'-GAT CCC CAA GTT GTT GCC AAG TTC CGT AAC GTG TCG TGT CCG <u>TTA CCG AGC TTG GTA ACA GCT</u> TTT TTT GGA AAT-3'
LV-shSUZ12-bottom	5'-CTA GAT TTC CAA AAA AAG CTG TTA CCA ACG TCC GTA ACG GAC AGC ACA CST TAC GSA ACT TGG CAA CAA CTT GGG-3'
LV-shKDM6A-top	5'-GAT CCC CGG TGT GAG TCT CTA GTC TTA CGT GTG CTG TCC <u>GTA AGA TTA GAG ATT CAT AGC</u> TTT TTG GAA AT-3'
LV-shKDM6A-bottom	5'-CTA GAT TTC CAA AAA GCT ATG AAT CTC TAA TCT TAC GGA CAG CAC ACG TAA GAC TAG AGA CTC ACA GCG GG-3'
LV-shKDM6B-top	5'-GAT CCC CGG TGC TGA TCA TTG CCA AAA CGT GTG CTG TCC <u>GTG TTA GTA ATG CTC AGC</u> CCG TTT TTG GAA AT-3'
LV-shKDM6B-bottom	5'-CTA GAT TTC CAA AAA GGC GCT GAC CAT TAC CAA AAC GGA CAG CAC ACG TTT TGG CAA TGA TCA GCA CCG GG-3'

Table 3 ChIP-on-chipに使用したサンプルのDNAの収量とラベリング効率

Sample Type		Yield (μg)	Specific activity ($\text{pmol}/\mu\text{g}$)
CD4+T-cell#1	Input	9.53	46.04
	H3K27me3	10.78	37.66
CD4+T-cell#2	Input	15.04	33.25
	H3K27me3	16.16	31.18
ATL#1	Input	14.19	34.10
	H3K27me3	15.33	27.55
ATL#2	Input	10.64	45.45
	H3K27me3	10.71	38.28
ATL#3	Input	8.66	48.77
	H3K27me3	9.28	41.96
TL-Om1	Input	5.60	36.58
	H3K27me3	6.12	33.51
Activated T-cell	Input	15.58	32.09
	H3K27me3	15.18	30.31
Tax-cell	Input	15.18	32.14
	H3K27me3	16.30	26.41
MT2	Input	9.44	41.95
	H3K27me3	9.54	36.07
MT2	Input	9.77	40.11
	Control IgG	9.18	35.31
MT2	Input	9.70	41.65
	EZH2	9.37	35.00
CD4+T-cell#1	Input	7.18	19.41
	H3K4me3	5.06	20.26
ATL#1	Input	8.06	19.85
	H3K4me3	5.13	21.58
ATL#2	Input	12.73	49.94
	H3K4me3	14.08	38.44
ATL#3	Input	10.85	47.22
	H3K4me3	13.58	35.94
TL-Om1	Input	5.65	36.31
	H3K4me3	6.23	32.89

Table 4 Figure 18BのRegulation of transcriptionに含まれた遺伝子リスト

ID	GO term	Gene list
GO:0045449	regulation of transcription	ABCG1, ABL1, ADRB2, APBB1, APP, ARID5A, ASXL2, BACH2, BAZ1A, BCL9L, BCOR, BMP6, BTG1, BTG2, CAND2, CCR6, CDYL, CHD3, CHD6, CREBZF, CREM, CRK, CSRNP1, CSRNP2, DENND4A, DNAJA3, ELK3, EPC2, ETV3, FAM120B, FOS, FOSB, FOSL2, FOXJ1, FOXK1, FOXP1, GATAD2B, GTF2H1, GTF2IRD1, HABP4, HINFP, HIVEP2, HLF, IFNG, IKZF3, IL1B, IRF1, JUNB, KDM2B, KDM5B, KDM6B, KLF3, KLF5, KLF9, LZTS1, MAML1, MAML2, MBD1, MED31, MLLT3, MOV10, MXI1, MYBL1, NCOA5, NFE2L2, NFKB1, NFKB2, NOTCH2, NPAT, NR3C2, NRIP1, PBX4, PDCD4, PDE8A, PHF20, PIM1, PLAG1, PNRC1, POU6F1, PRDM2, PURA, RAD54B, RARA, RASD1, RELB, RHOH, RPS6KA5, RQCD1, S1PR1, SALL2, SATB1, SCML1, SEC14L2, SETD1B, SIK1, SIRT1, SKI, SKIL, SMAD7, SMURF2, SNAPC1, SOX8, SREBF1, SSBP2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B, TAF4B, TBL1X, TBX21, TCEA3, TCEAL1, TCEAL2, TCEAL3, TCEAL4, TCF7, TFDP2, TGFBR3, TGIF1, TGIF2, THRA, TIGD2, TLE2, TLR3, TNF, TRPS1, WNT1, XBP1, ZBTB10, ZBTB3, ZBTB4, ZBTB6, ZEB1, ZFP14, ZHX2, ZIK1, ZNF10, ZNF132, ZNF155, ZNF165, ZNF175, ZNF189, ZNF200, ZNF219, ZNF222, ZNF223, ZNF250, ZNF256, ZNF268, ZNF283, ZNF284, ZNF287, ZNF320, ZNF347, ZNF354B, ZNF383, ZNF395, ZNF420, ZNF425, ZNF43, ZNF461, ZNF469, ZNF485, ZNF526, ZNF540, ZNF541, ZNF550, ZNF563, ZNF572, ZNF573, ZNF583, ZNF584, ZNF606, ZNF616, ZNF619, ZNF629, ZNF641, ZNF658, ZNF681, ZNF696, ZNF747, ZNF790, ZNF827, ZNF841, ZNF879, ZSCAN12, ZSCAN20, ZSCAN22, ZSCAN5A

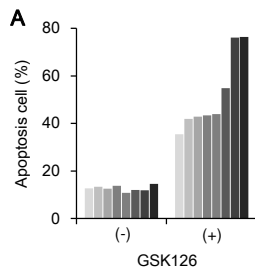
Appendix 1

Diagnosis	Proviral load (%)	sIL-2R (unit/mL)	WBC (μ/L)
Chronic	78.43	40600	15180
Chronic	91.44	4890	26110
Acute	77.71	29900	50800
Acute	242.77	11100	10310
Acute	64.46	9730	10800
Acute	92.40	144000	130300
Chronic	78.28	20300	14300
Chronic	55.51	2920	9500
Chronic	69.07	4450	19600
Chronic	56.81	3920	16900
Acute	245.63	17700	40800
Smoldering	43.03	-	4720
Smoldering	36.39	814	7000
Smoldering	39.62	723	6200
Chronic	55.40	4430	18200
Chronic	63.88	4400	24300
Chronic	50.45	3470	14920
Acute	109.00	11300	39700
Chronic	66.83	9720	28900
Acute	181.36	31900	22900
Chronic	88.04	130000	51600
Acute	85.49	9720	22100
Chronic	111.74	18400	79900
Acute	97.68	38900	34200
Acute	86.57	46100	75300
Acute	78.63	45800	55700
Chronic	100.51	20100	35400
Acute	345.83	98600	116400
Chronic	98.17	5470	66500
Acute	78.38	15300	25200
Chronic	88.39	17800	7200
Chronic	85.34	12400	34000
Acute	88.23	22800	23500
Unknown	67.28	43300	16900
Lymphoma	84.11	158000	33300
Chronic	128.11	3430	12300
Acute	2.12 (Mutation)	50800	46300
Acute	87.54	18500	33600
Chronic	65.00	2800	14400
Acute	41.67	59800	15000
Acute	82.83	45000	14400
Acute	72.91	88600	124700
Chronic	61.06	8760	20500
Acute	49.33	86600	11600
Acute	63.97	44200	107100
Acute	103.36	33300	19200
Acute	62.10	37500	10600
Acute	63.33	59500	69400
Acute	99.85	69500	13900
Acute	187.23	45200	74300
Chronic	62.78	3240	15660

Appendix 1 遺伝子発現アレイ解析に使用したATL検体の情報。

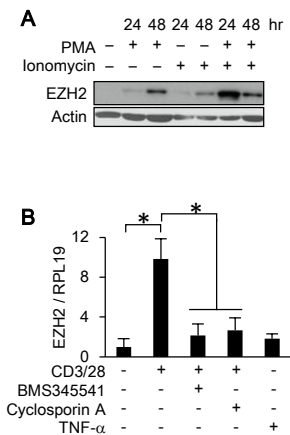
ATL subtype	Tyr641 mutation	Ala677 mutation	Ala687 mutation	Cell type
Acute	0/28	0/37	0/37	Primary
Chronic	0/16	0/11	0/11	
Smoldering	0/4	0/1	0/1	
Unknown	0/2	0/1	0/1	
Total	0/50	0/50	0/50	
TL-Om1 (ATL)	WT	WT	WT	Cell line
MT-1 (ATL)	WT	WT	WT	Cell line
KOB (ATL)	WT	WT	WT	Cell line
KK1 (ATL)	WT	WT	WT	Cell line
ST1 (ATL)	WT	WT	WT	Cell line
Pfeiffer (DLBCL)	ND	A677G	WT	Cell line
SUDHL4 (DLBCL)	Y641S	ND	ND	Cell line

Appendix 2 ATL検体50例、ATL細胞株におけるEZH2の活性化変異の有無。当研究室の修士学生中川翔太氏の修士論文の結果を引用した。中川翔太氏の調査時には病型が不明であった6例の検体について新たに照合した結果、4例の病型が明らかになったため、一部修正した。最下部のPfeiffer、SUDHL4については活性化変異が論文に報告されているためPositive controlとして使用している。

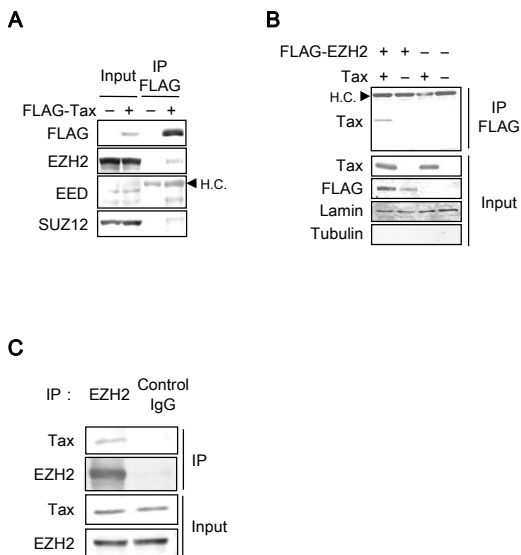
**B**

Diagnosis	Age	Sex	Proviral load (%)
Chronic	83	F	45.27
Chronic	65	F	49.12
Chronic	67	M	66.46
Acute	47	M	16.67
Acute	60	M	49.19
Chronic	51	M	43.64
Chronic	77	F	48.17
Chronic	63	F	121.67

Appendix 3 EZH2阻害剤GSK126は患者由来ATL細胞にアポトーシスを誘導する (A) 5 μ MのGSK126を4日間処理した際のCD4陽性T細胞中のAnnexin V陽性率を測定した。(B) (A)に使用した検体情報。



Appendix 4 TCRの活性化によるEZH2の発現上昇 この実験は山岸誠博士が行ったものであり、許可を得て掲載している。(A) 健康人由来T細胞にPMA、Ionomycinを処理した際のEZH2の発現量。(B) 健康人由来T細胞に抗CD3、CD28抗体による刺激とNF- κ B阻害剤BMS345541、NFAT阻害剤Cyclosporin Aを共処理した際のEZH2の発現変化。同時にTNF- α によるNF- κ Bの活性化による影響についても検討した。



Appendix 5 TaxはEZH2と核内で相互作用する

A、Bは当研究室の修士学生、黒川直也氏、Cは副島あい氏の結果である。
 (A-B) FLAG-Tax(A)、TaxとFLAG-EZH2(B)を発現させたHEK293FT細胞の核抽出液を抗FLAG抗体を加えて免疫沈降を行い、図に示した抗体で検出した。
 (C) HTLV-1感染細胞株HUT102の細胞抽出液に抗EZH2抗体を加えて免疫沈降を行い、図に示した抗体で検出した。