

成人 T 細胞白血病ハイリスク群検索のための新規検査法の開発

(課題番号：17590495)

平成17年度～平成18年度科学研究費補助金
(基盤研究(C)) 研究成果報告書

平成19年5月

研究代表者 岡山 昭彦
(宮崎大学医学部 教授)

序 文

ヒト T リンパ向性ウイルス 1 型 (HTLV-1) 感染により T リンパ球の腫瘍化がおり、成人 T 細胞白血病 (ATL) が引き起こされる。いったん発症すると ATL は予後の悪い疾患であり、強力な多剤併用療法によっても 50% 生存期間は 6 ヶ月前後にすぎない。このため、ウイルスキャリアからの ATL 発症予防は重要な課題である。しかしながらウイルスキャリアのうち ATL 発症にいたるのはその 5% 未満であり、キャリアのなかでの ATL 発症リスクは一律ではなく、ハイリスク群が存在すると考えられる。このハイリスク群を同定することが今後、免疫療法や抗ウイルス療法による ATL 発症予防を考えるうえで重要である。

これまで我々を含め、このハイリスク群を同定するための研究が行われ、母児感染、感染細胞数の増加、感染細胞のオリゴクローナルな増殖などが危険因子であることが判明した。しかしながら、これら個体レベルでの因子によってハイリスク群の絞込みを行うには限界があり、細胞レベルでの検討を行う必要がある。細胞レベルの知見としては、キャリアの T 細胞 population として何百種類もの感染細胞のクローンが存在しており、その一部は数十年にわたり増殖、維持されていることがわかっている。このような長期的な感染細胞の維持は HTLV-1 Tax 蛋白による増殖のドライブと宿主の免疫サーベイランス機構とのバランスによって成り立っていると考えられている。感染細胞のクローナルな増殖維持を感染初期のキャリア (夫婦感染による抗体陽転者) と感染から 50 年を経たキャリア (母子感染による成人キャリア) において比較検討したところ、前者ではクローナリティが多様で経時的に不安定であるのに対して後者では限られたクローンが増殖維持され、経時的に安定であることが示された。また、ATL 発症者の検討から、白血病細胞クローンは発症の 8 年前にはすでに存在していることが明らかとなった。

このような治験をふまえ、本研究では将来腫瘍化すると予測される HTLV-1 感染クローンを同定し、またその性状をあきらかにすることによって、ATL 発症前診断のツールとなる新規検査法の確立を最終目的とする。

【研究組織】

研究代表者：岡山 昭彦 (宮崎大学医学部 教授)

研究分担者：梅木 一美 (宮崎大学附属病院 検査技師長)

【交付決定額】

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 17 年度	2,500,000	0	2,500,000
平成 18 年度	900,000	0	900,000
総計	3,400,000	0	3,400,000

【研究発表】

1. 学会誌等

- 1) Sasaki H, Nishikata I, Shiraga T, Akamatsu E, Fukami T, Hidaka T, Kubuki Y, Okayama A, Hamada K, Okabe H, Murakami Y, Tsubouchi H, Morishita K.
Overexpression of a cell adhesion molecule, TSLC1, as a possible molecular marker for acute-type adult T-cell leukemia. *Blood* 105:1204-1213, 2005
- 2) Tanaka G, Okayama A, Watanabe T, Aizawa S, Stuver S, Mueller N, Hsieh CC, Tsubouchi H. : The Clonal Expansion of Human T Lymphotropic Virus Type 1-Infected T Cells: A Comparison between Seroconverters and Long-Term Carriers. *J Infect Dis* 191: 1140-1147, 2005
- 3) Kubuki Y, Suzuki M, Sasaki H, Toyama T, Yamashita K, Maeda K, Ido A, Matsuoka H, Okayama A, Nakanishi T, Tsubouchi H. : Telomerase activity and telomere length as prognostic factors of adult T-cell leukemia. *Leuk Lymphoma* 46: 393-399, 2005
- 4) Doi K, Wu X, Taniguchi Y, Yasunaga J, Satou Y, Okayama A, Nosaka K, Matsuoka M. : Preferential selection of human T-cell leukemia virus type I provirus integration sites in leukemic versus carrier states. *Blood* 106:1048-1053, 2005
- 5) Watanabe M, Ohsugi T, Shoda M, Ishida T, Aizawa S, Maruyama-Nagai M, Utsunomiya A, Koga S, Yamada Y, Kamihiro S, Okayama A, Kikuchi H, Uozumi K, Yamaguchi K, Higashihara M, Umezawa K, Watanabe T, Horie R. : Dual targeting of transformed and untransformed HTLV-1-infected T cells by DHMEQ, a potent and selective inhibitor of NF-kappaB, as a strategy for chemoprevention and therapy of adult T-cell leukemia. *Blood* 106:2462-2471, 2005
- 6) Dewan MZ, Uchihara J, Terashima K, Honda M, Sata T, Ito M, Fujii N, Uozumi K, Tsukasaki K, Tomonaga M, Kubuki Y, Okayama A, Toi M, Mori N, Yamamoto N: Efficient intervention of growth and infiltration of primary adult T-cell leukemia cells by an HIV protease inhibitor, ritonavir. *Blood* 107: 716-724, 2006
- 7) 岡山昭彦 : HTLV-1 感染の自然史. *臨床病理* 53: 837-844, 2005
- 8) 梅木一美, 岡山昭彦: HTLV-1 感染症の検査法 *日本臨床検査自動化学会誌* 31: 775-783, 2006

9) 岡山昭彦 : HTLV-1 感染症 宮崎県医師会医学会誌 30(2) : 61-66, 2006

2. 口頭発表

- 1) Shoda M, Ito M, Aizawa S, Ishida T, Aoki S, Maruyama-Nagai M, Kuroki R, Utsunomiya A, Koga S, Okayama A, Yamada Y, Kamihira S, Uozumi K, Kikuchi H, Yamaguchi K, Watanabe S, Watanabe T: Characterization of the expression profile signature of ATL cells and detection of ATL cells in vivo. 12th International Conference on Human Retrovirology. June, 2005 (Jamaica)
- 2) Mueller N, Okayama A, Stuver S, Cranston B, Hanchard B, Birmann B, Hisada M: The epidemiology of HTLV-I infection: Where do we go from here? 12th International Conference on Human Retrovirology. June, 2005 (Jamaica)
- 3) Birmann B, Mueller N, Breen EC, Stuver S, Okayama A, MartInez-Maza O, Raker CA, Aziz N, Li H, Cranston B, Hanchard B, Hisada M: HTLV-I infection is associated with elevated plasma biomarkers of immune activation in Jamaican but not in Japanese carriers. 12th International Conference on Human Retrovirology. June, 2005 (Jamaica)
- 4) Yo-ichi Ishida, Kiyoshi Yamashita, Hidenori Sasaki, Ichirou Takajou, Yoko Kubuki, Kazuhiro Morishita, Hirohito Tsubouchi, and Akihiko Okayama.: "Search for ATL Markers by Serum Proteomic Analysis: Identification of C3f, Cystatin A, and Thymosin β 4." , 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006. 6. 18-23 (Kyoto, Japan).
- 5) 田中弦一, 岡山昭彦, 梅北邦彦, 鶴村佳人子, 上野史郎, 高城一郎, 甲斐泰文, 森祐一郎, 黒木昌幸, 佐々木隆, 坪内博仁, 久田充絵 : 配偶者間および母児間感染 HTLV-1 抗体陽転者の感染細胞クローナリティの検討. 第 79 回日本感染症学会総会. 2005 年 4 月 (名古屋)
- 6) 石田洋一, 山下清, 佐々木秀法, 高城一郎, 久富木庸子, 森下和広, 坪内博仁, 岡山昭彦 : 成人 T 細胞白血病 (Adult T-cell leukemia; ATL) の血清マーカーの探索 ; C3f, Thymosin β 4, 及び Cystatin A の同定. 日本プロテオーム機構第 4 回大会. 2006 年 7 月 (東京)
- 7) 岡山昭彦, 田中弦一, 野村創 : 異なる感染経路による HTLV-1 感染細胞クローナリティの成立過程の検討. 第 64 回日本癌学会学術総会. 2005 年 9 月 (札幌)
- 8) 梅木一美, 田中弦一, 野村創, 岡山昭彦 : HTLV-1 感染キャリアおよび配偶者間感染者における感染細胞クローンの増殖と組み込み部位の解析. 第 52 回日本臨床検査医学会 2005

年 11 月 (福岡)

9) 梅木一美、山本成郎、高城一郎、畠山金太、久富木庸子、片岡寛章、森下和広、岡山昭彦：
NOG マウスへの HTLV-1 キャリア細胞の移植. 第 65 回日本癌学会学術総会 2006 年 9 月(横
浜)

10) 梅木一美、野村創、高城一郎、山本成郎、小林樹、梅北邦彦、山下清、久富木庸子、岡山
昭彦：遺伝子多型解析により HTLV-1 家族内感染が推定された ATL の家系. 日本臨床検査
医学会総会 2006 年 11 月 (弘前)

3. 研究会・シンポジウム・セミナー

1) 岡山昭彦：HTLV-1 感染細胞クローナリティから見たキャリアの自然史. ATL/ATL 4th
symposium. 2005 年 7 月 (東京)

2) 高城一郎、山本成郎、岡山昭彦：末梢血における HTLV-1 感染の感受性の検討. 科学技術シ
ンポジウム in 宮崎 2006. 2006 年 2 月 (宮崎)

3) 山本成郎、高城一郎、岡山昭彦：農作物 X 抽出物による HTLV-1 感染の制御. 科学技術シ
ンポジウム in 宮崎 2006. 2006 年 2 月 (宮崎)

4) 梅木一美、田中弦一、野村創、岡山昭彦：HTLV-1 感染キャリアおよび配偶者間感染者にお
ける感染細胞クローンの解析. 科学技術シンポジウム in 宮崎 2006. 2006 年 2 月 (宮崎)

5) 岡山昭彦：HTLV-1 感染と関連疾患. 宮崎県医師会勤務医部会講演会. 2006 年 3 月 (宮
崎)

6) 岡山昭彦：HTLV-1 感染症：最近の進歩. 第 15 回大分造血器疾患研究会. 特別講演 2006
年 3 月 (大分)

7) 岡山昭彦：HTLV-1 と疾患. 連続公開講座 第 1 回 HTLV-1 感染の自然史と疫学—ヒトと
の長期の共存—. 2006 年 4 月 (東京)

8) 石田洋一、山下清、佐々木秀法、高城一郎、久富木庸子、森下和広、坪内博仁、岡山昭彦：
成人 T 細胞白血病 (Adult T-cell leukemia; ATL) の血清マーカーの探索 ; C3f、Thymosin
β4、及び Cystatin A の同定. 宮崎大学技術・研究発表交流会. 2006 年 7 月 (宮崎)

9) 岡山昭彦：HTLV-1 感染症の疫学と自然史. 第 4 回 エイズ/ATL の疫学及びその予防対策

セミナー. 2006年7月26日(熊本)

10) 岡山昭彦: 成人T細胞白血病(ATL)の発症メカニズムの解明と予防・治療法開発. 科学技術シンポジウム in 宮崎 2007. 2007年2月(宮崎)

4. 出版物

1) 岡山昭彦 (分担執筆). HTLV-1と疾患. 文光堂. 2007年5月1日

【研究成果】

1. HTLV-1 プロウイルス量の経時的変化

ヒト T リンパ向性ウイルス 1 型 (HTLV-1) 感染により成人 T 細胞白血病 (ATL) が引き起こされる。しかしながら ATL 発症にいたるのは 5% 未満であり、キャリアのなかでの ATL 発症リスクは一様ではない。本研究では、将来腫瘍化すると予測される HTLV-1 感染クローンの同定などにより ATL 発症前診断のツールを確立することを目的とする。この目的のため、10 年以上フォローアップが行われ、その末梢血液が保存されていた HTLV-1 キャリア 84 名についてプロウイルス量を経時的に測定した。その結果プロウイルス量 1% 未満のキャリア 37 名では平均 0.29% から 0.39% とほとんど 10 年間で変化がなかったのに対して、プロウイルス量 1% 以上の高ウイルス量キャリア 47 名では平均 5.1% から 3.4% へと有意に低下していた ($p < 0.005$) (図 1)。これはこれまでの HTLV-1 無症候性キャリアの感染量は経時的に一定であるという考えとは異なる結果であり、高ウイルス量キャリアがすべて ATL のハイリスク群ではないということを示唆するものと思われた。

2. 感染細胞クローナリティ解析

30 名の高ウイルス量キャリア中には数名 10 年間でプロウイルス量の増加する個体が認められ、現在その HTLV-1 感染細胞クローナリティ (図 2) を Tanaka らの方法などにより行っている。また感染細胞クローナリティは、HTLV-1 ゲノムの flanking region に基づいた解析であるため、非感染細胞も含めた末梢血液リンパ球のなかで特定の T 細胞クローンが増加しているかどうか不明であった。この問題を克服するため現在や T 細胞レセプター再構成を検出する方法を用いて解析を進めている。

図1 10年の経過を追えたHTLV-1キャリア84名の感染細胞数の変化

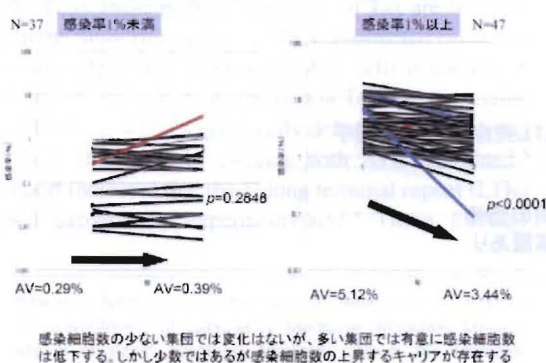
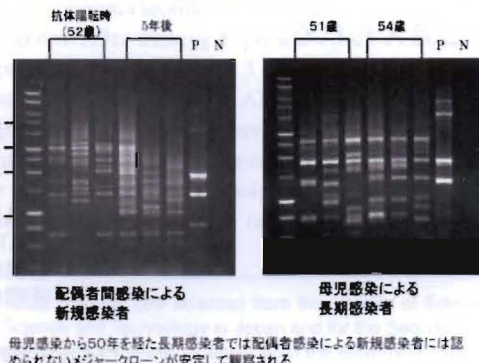


図2 新規感染者と長期感染者の感染細胞クローナリティの比較



3. 新規マーカーの開発

①共同研究者である Sasaki らにより新規癌関連遺伝子産物 TSLC-1 が ATL 細胞に特異的に発現していることが判明しており、現在 TSLC-1 の遺伝子発現などをリアルタイム

RTPCR 法により検討している。

②共同研究者である石田はプロテオーム解析の手法を用いて、ATL 患者と健常者の血清中のペプチドを解析することにより C3f、Thymosin β 4、及び Cystatin A などの成分が ATL 患者で増加していることを見出した。さらに現在無症候性キャリアにおける感染細胞数の多寡によって異なる血清ペプチドについて解析を進めている。

③共同研究者である高濱は無症候性キャリアと非キャリアの末梢血液単核細胞の遺伝子発現について gene chip を用いた解析を開始し、HTLV-1 感染者でのみ発現が更新している遺伝子を同定している。今後リアルタイム PCR などを用いてより特異性の高い発現パターンの確認を行う予定である。

まとめ

ヒト T リンパ向性ウイルス 1 型 (HTLV-1) 感染により成人 T 細胞白血病 (ATL) が引き起こされる。しかしながら ATL 発症にいたるのは 5% 未満であり、キャリアのなかでの ATL 発症リスクは一様ではない。本研究では、将来腫瘍化すると予測される HTLV-1 感染クローンの同定などにより ATL 発症前診断のツールを確立することを最終目的としている。これまでの研究により、HTLV-1 感染細胞数、感染細胞クローナリティなどが新規マーカーとして重要であるということが明らかとなってきた (表 1)。さらに TSLC1 や血清ペプチドパターン、遺伝子発現解析結果を加えることにより精度の高い予測が可能になると期待できる。今後これらのマーカーを用いて①長期にわたってキャリア末梢血液で維持されている感染細胞クローンの同定、②それらのクローンのプロウイルス DNA sequence・欠損の有無・染色体異常および somatic mutation の検討③長期感染細胞クローンを培養、クローニングし、その染色体異常および somatic mutation を同定などを進める予定である。これらの研究を進めることにより、新規マーカーの組み合わせによる ATL 発症リスク評価を個体レベルで行うことが可能となり、臨床検査に応用できるものと考えられる。

表 1 キャリアからの ATL 発症推定危険因子

背景因子

- ①乳児期以前の感染
- ②ATL の家族歴あり
- ③男性
- ④喫煙者

ウイルス学的因子

- ①白血球数の増加
- ②異型リンパ球の出現
- ③感染細胞の単クローン増殖の検出
- ④可溶性 IL-2 レセプター高値
- ⑤感染細胞数の増加