

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08647

研究課題名(和文) HTLV-1キャリアクローン解析に基づく新規バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Exploration new biomarkers based on HTLV-1 carrier clone analysis

研究代表者

長谷川 寛雄 (HASEGAWA, Hiroo)

長崎大学・病院(医学系)・講師

研究者番号：00398166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：くすぶり型ATL細胞株と急性型ATL細胞株を比較対照とし、キャリア細胞株10株における(1)種々のCD抗原やケモカインレセプター等の表面抗原解析、(2)cDNAマイクロアレイ解析、及び(3)miRNA発現解析などの網羅的発現解析をおこない、HTLV-1キャリア特有の新規マーカー候補を検討することができた。また、HTLV-1サザンブロット、HTLV-1 TAX、HBZ定量検査、フローサイトメトリー解析をおこなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we clarified the hematological and immunological characteristics of HTLV-1 infected cells in carriers using 10 cell lines established from HTLV-1 carriers in our laboratory. As a comparative control, 10 smoldering ATL cell lines and 7 acute type ATL cell lines, also established in our laboratory, are used. First, we performed surface antigen analysis of various CD antigens, cDNA microarray analysis, and miRNA expression analysis using these cell lines. Then, Southern blot analysis for HTLV-1, quantitative RT-PCR test for HTLV-1 TAX and HBZ, and flow cytometric analysis were performed using carrier cell lines. Thus far, we analyzed the results of flow cytometry analysis and microarray analysis.

研究分野：検査血液学

キーワード：HTLV-1 細胞株 分子標的 表面抗原 遺伝子発現解析

1. 研究開始当初の背景

(1) HTLV-1 感染症の特徴: HTLV-1 は主に母乳から感染し、長い潜伏期間後に数%の感染者に成人 T 細胞白血病・リンパ腫(ATL)、HTLV-1 関連脊髄症(HAM/TSP)、あるいは HTLV-1 ぶどう膜炎などの HTLV-1 関連疾患を引き起こす発がん性レトロウイルスである。

(2) ATL を発症するのはひとつのクローンである: HTLV-1 感染者(キャリア)においてウイルスは主に CD4+リンパ球にプロウイルスの形で存在している。感染細胞は体細胞分裂を繰り返し結果的に感染細胞数(プロウイルスのコピー数)を増加させる。感染細胞の増殖の程度は個々のクローンによって異なり、同一個体内にさまざまな小さなクローンが混在していると理解されてきた。最近、次世代シーケンサー等を用いた研究成果によって、キャリアやくすぶり型 ATL では莫大な数の小クローンが存在することが示され、いわゆるポリクローナルな増殖状態の理解が深まった。一方、現在までの研究の積み重ねにも関わらず、「キャリアの感染細胞中のどのようなクローンが、どのようなメカニズムで ATL 発症に関与するのか」という最重要課題は解決されていない。

(3) ATL 発症メカニズム解析の現状: HTLV-1 の Tax タンパクは細胞増殖や不死化、遺伝子変異の誘導作用を有することから ATL 発がんの引き金を引くものと考えられている。一方で Tax は Cytotoxic T-Lymphocyte(CTL)の主な標的でもあるため、Tax 発現細胞の増殖は抑えられる。また、発症後の ATL 細胞では蛋白レベルでの Tax 発現はみられないことから、ATL 細胞では Tax の作用がなくとも悪性形質は維持されると考えられている。近年、Tax だけでは説明のつきにくかった ATL 発症機序において HTLV-1 bZIP factor(HBZ)などの役割が重要とのエビデンスが蓄積されつつある。

(4) ATL 発症に至った場合: ATL はくすぶり型・慢性型・急性型・リンパ腫型の 4 臨床病型に分類されており、急性型・リンパ腫型を発症した場合、多剤併用の強力な化学療法をおこなっても、生存期間中央値は約 10 ヶ月と予後は非常に不良である。よって、鍵となるのは新しい治療薬の開発だけでなく、キャリアの適切なフォローアップであるが、フォローアップに有効なマーカーの開発は長年の課題であり続けている。

(5) キャリアに対する検査の現状: ATL 発症のリスク因子の一つはプロウイルス量の増加であることが報告されている。しかし、キャリアに対してプロウイルス量を測定することが臨床的に有用であるかは不明である。プロウイルス量が少ない場合、どの程度のリスクなのか判断できるエビデンスはなく、また抗 HTLV-1 ウイルス薬が存在しない現状では治療にも直結しないためである。よって、プロウイルス量ではなく、キャリアにおける HTLV-1 感染細胞の「質」の解析が重要となる。

しかし、細胞形態やフローサイト検査を組み合わせても正常細胞と感染細胞を見極める手段はない。すなわち、正常細胞の混入なしに感染細胞のみを解析することは非常に困難であり、実際キャリアにおける感染細胞の振る舞いはほとんど解明されていない。

(6) 世界で他にはないキャリア細胞株の復元: 1997年に藤本、波多らは、IL2を含んだセルロース培地を用い、研究の同意を得たキャリアやくすぶり型 ATL 患者の末梢血からシングルコロニー(1クローン)として増殖してきた細胞を培養し、感染細胞株の樹立に成功した。当時はこれらの細胞の染色体異常解析が目的であった。急性型 ATL と比較するとこれらの細胞の染色体異常は非常に少ないことを報告した後、研究は終了し、細胞株は凍結保存されていた。当時から 17 年が経過したが、まとまった数のキャリア細胞株を樹立・解析した報告はいまだにない。そこで今回、凍結細胞を再培養し、キャリア細胞株 10 株、くすぶり型 ATL 細胞株 10 株の培養に成功した。研究代表者らは、これらの細胞株を用いて 1997 年当時はおこなわれなかった次のような解析をおこなうことで、キャリアにおける HTLV-1 感染細胞の「質」の解析が初めて可能になると考える。

2. 研究の目的

本研究において研究代表者らは、独自に確立した HTLV-1 キャリア細胞株 10 株を用いて、キャリアにおける HTLV-1 感染細胞の血液・免疫学的特徴を明らかにする。比較対照として、やはり独自に確立した、くすぶり型 ATL 細胞株 10 株と急性型 ATL 細胞株 7 株を使用する。これらの細胞株を使用し、さらに遺伝子発現プロファイルも併せて解析し、キャリアのフォローアップに有効なキャリア特異的マーカーを見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) くすぶり型 ATL 細胞株と急性型 ATL 細胞株を比較対照とし、キャリア細胞株 10 株における種々の CD 抗原やケモカインレセプター等の表面抗原解析、cDNA マイクロアレイ解析、及び miRNA 発現解析などの網羅的発現解析をおこない、HTLV-1 キャリア特有の新規マーカー候補を抽出する。臨床検体を用いてマーカー候補の有効性を検証する。細胞株の由来となった患者の追跡調査も重要であり、その調査も並行しておこなう。このような研究の 2 面性から、細胞解析部門の統括者に加え、臨床血液学の視点を持つ統括者を別個に置き、連携をとりながら研究を進める。

(2) HTLV-1 サザンブロット検査にて全細胞株のモノクロナリティーを確認する。HTLV-1 Tax 定量、HBZ 定量検査もおこない発現量の特徴を解析する。フローサイトメトリー解析に関しては、ATL 細胞を中心にこれまで様々な抗原発現を研究してきた経緯がある。種々

の CD 抗原、ケモカインレセプターなどのサイトカイン発現パターン解析を約 80 種の抗原を使用し網羅的に行う。同時に研究期間を通じて適切な細胞株継代・管理をおこなう。

(3) キャリア細胞株ドナーの追跡調査

キャリア細胞株のドナーとなった患者の追跡調査を開始する。当院及び、県内の 2 つの地域中核病院にて血液内科医が保存カルテを検索し、患者情報を収集・整理し、管理する。現在もなんらかの疾患にて当院あるいは当該病院を受診されている場合はこれまでの臨床経過・検査値の情報を収集・管理する。

(4) 研究代表者らはこれまでの研究において cDNA マイクロアレイ解析の結果を用いた pathway 解析や ATL 患者細胞や血漿を用いた miRNA 発現解析、さらに細胞株を用いた種々の siRNA 実験をおこなってきた。キャリア細胞株 10 株を解析のターゲットとして、ATL 細胞株を対照とした cDNA マイクロアレイ解析による網羅的遺伝子解析をおこなう。

(5) 最後のステップとして 2~3 個に絞られたマーカー候補分子の機能解析を行う。機能解析の指標は、細胞増殖能や HTLV-1 TAX や HBZ の発現に対する影響力を予定するが、マーカー候補分子の既知の機能に着目することもあり得る。これらのテストの評価に耐えた分子をキャリア特有のマーカー分子として提唱する。

4. 研究成果

(1) くすぶり型 ATL 細胞株と急性型 ATL 細胞株を比較対照とし、キャリア細胞株 10 株における種々の CD 抗原やケモカインレセプター等の表面抗原解析、cDNA マイクロアレイ解析、及び miRNA 発現解析などの網羅的発現解析をおこない、HTLV-1 キャリア特有の新規マーカー候補を検討した。

(2) キャリア細胞株を解析のターゲットとし、HTLV-1 サザンプロット、HTLV-1 TAX、HBZ 定量検査、フローサイトメトリー解析をおこなった。HTLV-1 サザンプロット検査にて全細胞株のモノクロナリティーの有無を確認することができた。HTLV-1 Tax 定量、HBZ 定量検査もおこない発現量の特徴を解析した。フローサイトメトリー解析に関しては、種々の CD 抗原、ケモカインレセプターなどのサイトカイン発現パターン解析を約 80 種の抗原を使用し網羅的に解析した。また、研究期間を通じて適切な細胞株継代・管理をおこなった。

(3) キャリア細胞株ドナーの追跡調査に関しては、当院及び、県内の 2 つの地域中核病院にて血液内科医が保存カルテを検索し、患者情報を収集した。

(4) フローサイトメトリー解析、マイクロア

レイ解析の結果が出揃い、miRNA 発現解析の結果を加味し、得られたキャリア特有のマーカー候補分子(数個を想定)を、さらにできる限り少数(2~3 個)に絞ることで報告する事が課題である。機能解析の指標は、細胞増殖能や HTLV-1 TAX や HBZ の発現に対する影響力を評価、及びマーカー候補分子の既知の機能の双方を取り組んだ。

これらの主となる成果は論文作成中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

Kuramitsu M, Sekizuka T, Yamochi T, Firouzi S, Sato T, Umeki K, Sasaki D, Hasegawa H, Kubota R, Sobata R, Matsumoto C, Kaneko N, Momose H, Araki K, Saito M, Nosaka K, Utsunomiya A, Koh KR, Ogata M, Uchimar K, Iwanaga M, Sagara Y, Yamano Y, Okayama A, Miura K, Satake M, Saito S, Itabashi K, Yamaguchi K, Kuroda M, Watanabe T, Okuma K, Hamaguchi I. Proviral Features of Human T Cell Leukemia Virus Type 1 in Carriers with Indeterminate Western Blot Analysis Results. *J Clin Microbiol.* 55(9):2838-2849, 2017、査読有 DOI: 10.1128/JCM.00659-17

Hashikura Y, Umeki K, Umekita K, Nomura H, Yamada A, Yamamoto I, Hasegawa H, Yanagihara K, Okayama A.: Infection of defective human T-lymphotropic virus type 1. *Hum Cell* 30:117-123, 2017、査読有 DOI: 10.1007/s13577-016-0156-4

Fukui S, Nakamura H, Takahashi Y, Iwamoto N, Hasegawa H, Yanagihara K, Nakamura T, Okayama A, Kawakami A.: Tumor necrosis factor alpha inhibitors have no effect on a human T-lymphotropic virus type-1 (HTLV-1)-infected cell line from patients with HTLV-1-associated myelopathy. *BMC Immunol* 18:7, 2017、査読有 <https://doi.org/10.1186/s12865-017-0191-2>

Fuchi N, Miura K, Imaizumi Y, Hasegawa H, Yanagihara K, Miyazaki Y, Masuzaki H.: Adult T-cell leukemia-lymphoma in a pregnant woman diagnosed as a human T-cell lymphotropic virus type 1 carrier. *J Obstet Gynaecol Res* 42(3):336-40, 2016、査読有 DOI: 10.1111/jog.12904

Hashikura Y, Umeki K, Umekita K, Nomura H, Yamamoto I, Hasegawa H, Yanagihara K, Okayama A.: The diversity of the structure and genomic integration sites of HTLV-1 provirus in MT-2 cell lines. *Hum Cell*

29(3):122-9, 2016、査読有 DOI:
10.1007/s13577-016-0136-8

Hasegawa H, Bissonnette RP, Gillings M, Sasaki D, Taniguchi H, Kitano H, Tsuruda K, Kosai K, Uno N, Morinaga Y, Imaizumi Y, Miyazaki Y, Yanagihara K: Induction of apoptosis by HBI-8000 in adult T-cell leukemia/lymphoma is associated with activation of Bim and NLRP3. *Cancer Sci* 107(8):1124-33. 2016、査読有 DOI: 10.1111/cas.12971

Matsumoto N, Mori S, Hasegawa H, Sasaki D, Mori H, Tsuruda K, Imanishi D, Imaizumi Y, Hata T, Kaku N, Kosai K, Uno N, Miyazaki Y, Yanagihara K: Simultaneous screening for JAK2 and calreticulin gene mutations in myeloproliferative neoplasms with high resolution melting. *Clin Chim Acta* 462:166-173, 2016、査読有 DOI: 10.1016/j.cca.2016.09.023

Osteopontin-integrin interaction as a novel molecular target for antibody-mediated immunotherapy in adult T-cell leukemia. Maeda N, Ohashi T, Chagan-Yasutan H, Hattori T, Takahashi Y, Harigae H, Hasegawa H, Yamada Y, Fujii M, Maenaka K, Uede T. *Retrovirology*. 2015 Nov 24;12(1):99. 査読有 DOI: 10.1186/s12977-015-0225-x

Standardization of Quantitative PCR for Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 in Japan: a Collaborative Study. Kuramitsu M, Okuma K, Yamochi T, Sato T, Sasaki D, Hasegawa H, Umeki K, Kubota R, Sobata R, Matsumoto C, Kaneko N, Naruse I, Yamagishi M, Nakashima M, Momose H, Araki K, Mizukami T, Mizusawa S, Okada Y, Ochiai M, Utsunomiya A, Koh KR, Ogata M, Nosaka K, Uchimarui K, Iwanaga M, Sagara Y, Yamano Y, Satake M, Okayama A, Mochizuki M, Izumo S, Saito S, Itabashi K, Kamihira S, Yamaguchi K, Watanabe T, Hamaguchi I. *J Clin Microbiol*. 2015 Nov;53(11):3485-91. 査読有 DOI: 10.1128/JCM.01628-15

Superoxide-Generating Nox5 Is Functionally Required for the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Induced Cell Transformation Phenotype. Shigemura T, Shiohara M, Kato M, Furuta S, Kaneda K, Morishita K, Hasegawa H, Fujii M, Gorchak A, Koike K, Kamata T. *J Virol*. 2015 Sep;89(17):9080-9. 査読有 DOI: 10.1128/JVI.00983-15

Molecular analysis of loss of CCR4

expression during mogamulizumab monotherapy in an adult T cell leukemia/lymphoma patient. Taguchi M, Imaizumi Y, Sasaki D, Higuchi T, Tsuruda K, Hasegawa H, Taguchi J, Sawayama Y, Imanishi D, Hata T, Yanagihara K, Yoshie O, Miyazaki Y. *Ann Hematol*. 2015 Apr;94(4):693-5、査読有 DOI: 10.1007/s00277-014-2239-1

〔学会発表〕(計 12 件)

臨床検体の HTLV-1 定量検査におけるデジタル PCR 法とリアルタイム PCR 法の比較
佐々木 大介, 長谷川 寛雄, 淵 直樹, 三浦 清徳, 上野 友郁, 吉田 彩香, 松本 成良, 山川 嘉美, 賀来 敬仁, 小佐井 康介, 宇野 直輝, 増崎 英明, 柳原 克紀, 第 4 回日本 HTLV-1 学会学術集会 2017 年

妊婦スクリーニング検体の HTLV-1 定量検査におけるデジタル PCR 法とリアルタイム PCR 法の比較
淵 直樹, 三浦 清徳, 佐々木 大介, 鶴田 一人, 長谷川 寛雄, 柳原 克紀, 増崎 英明, 第 4 回日本 HTLV-1 学会学術集会 2017 年

成人 T 細胞白血病・リンパ腫 (ATL) 細胞に対する新規経口 HDAC 阻害剤 HBI-8000 (Chidamide) の効果
長谷川 寛雄, 佐々木 大介, 鶴田 一人, 今泉 芳孝, 宮崎 泰司, 柳原 克紀, 第 3 回日本 HTLV-1 学会学術集会 2016 年

HTLV-1 感染 B 細胞株を用いた HTLV-1 感染細胞の解析
中村 正幸, 長谷川 寛雄, 宇野 直輝, 伊波 英克, 山田 恭暉, 上平 憲, 緒方 正男, 幸野 和洋, 佐々木 大介, 鶴田 一人, 森 紗耶香, 山内 俊輔, 今泉 芳孝, 宮崎 泰司, 柳原 克紀, 第 3 回日本 HTLV-1 学会学術集会 2016 年

免疫調節薬 Lenalidomide の抗 ATL 効果と作用機序の検討
池辺 詠美, 下崎 俊介, 緒方 正男, ファイフ ニコール, 松本 昂, 堀 光雄, 長谷川 寛雄, 森下 和広, 伊波 英克, 第 3 回日本 HTLV-1 学会学術集会 2016 年

HTLV-1 欠損プロウイルスの細胞間感染
橋倉 悠輝, 梅木 一美, 山田 明輝, 山本 成郎, 梅北 邦彦, 長谷川 寛雄, 柳原 克紀, 岡山 昭彦, 第 3 回日本 HTLV-1 学会学術集会 2016 年

Mogamulizumab 投与後の再発・再燃 ATL 症例における CCR4 発現の検討
中島 潤, 今泉 芳孝, 北之園 英明, 加藤 丈晴, 谷口 広明, 牧山 純也, 佐々木 大

介、鶴田 一人、長谷川 寛雄、吉田 真一郎、森内 幸美、柳原 克紀、宮崎 泰司、第3回日本 HTLV-1 学会学術集会 2016 年

Induction of apoptosis by an HDAC inhibitor HBI8000 in ATL cells through activation of Bim and NLRP3

長谷川 寛雄、第 78 回日本血液学会学術集会 2016 年

モガムリズマブ使用後に CCR4 抗原が陰性化した ATL の 2 症例

淵上 麻衣、長谷川 寛雄、鶴田 一人、佐々木 大介、北之園 英明、田口 正剛、今泉 芳孝、波多 智子、宮崎 泰司、柳原 克紀 第 16 回日本検査血液学会学術集会 2015 年

教育講演 1 「成人 T 細胞白血病 (ATL)」
長谷川 寛雄、鶴田 一人、第 16 回日本検査血液学会学術集会 2015 年

日常検査における成人 T 細胞白血病 (ATL) の表面マーカー解析：過去 15 年間の集計解析

長谷川 寛雄、淵上 麻衣、鶴田 一人、佐々木 大介、中島 潤、今泉 芳孝、宮崎 泰司、柳原 克紀、第 2 回日本 HTLV-1 学会学術集会 2015 年

HTLV-1 核酸検査の標準化および検出感度の検討：多施設共同研究

倉光 球、大隈 和、矢持 忠徳、山野 嘉久、長谷川 寛雄、上平 憲、岡山 昭彦、久保田 龍二、出雲 周二、成瀬 功、相良 康子、佐竹 正博、渡邊 俊樹、山口 一成、浜口 功、第 2 回日本 HTLV-1 学会学術集会 2015 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：非ホジキンリンパ腫発症のリスク判定補助方法

発明者：斎藤益満、長谷川寛雄

権利者：斎藤益満、長谷川寛雄

種類：特許

番号：特願 2016-150300

出願年月日：2016 年 7 月 29 日

国内外の別： 国内

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：

<http://www.mh.nagasaki-u.ac.jp/kensa/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 寛雄 (HASEGAWA, Hiroo)

長崎大学・病院 (医学系)・講師

研究者番号：00398166

(2) 研究分担者

波多 智子 (HATA, Tomoko)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・准教授

研究者番号：10346968

宮崎 泰司 (MIYAZAKI, Yasushi)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授

研究者番号：40304943

柳原 克紀 (YANAGIHARA, Katsunori)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・

教授

研究者番号：40315239

今泉 芳孝 (IMAIZUMI, Yoshitaka)

長崎大学・病院 (医学系)・講師

研究者番号：40404305

佐々木 大介 (SASAKI, Daisuke)

長崎大学・病院 (医学系)・技術職員

研究者番号：90624784