

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15087

研究課題名(和文)腸内細菌叢異常に伴うHTLV-1キャリアからATL発症過程解析

研究課題名(英文)Analysis of ATL development dependent on abnormalities of intestinal flora

研究代表者

森下 和広 (Morishita, Kazuhiro)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：80260321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ATL患者16例および健常者11例の糞便サンプルを用いた16SrDNA次世代シーケンス解析を行い、ATLにおける腸内細菌叢の関与を検討した。その結果、ATLでは、免疫機能に重要な働きをもつビフィドバクテリウム属が低下しており、ATLで見られる免疫能の低下との関連が推測された。また、バクテロイデス属などの日和見菌が増加し、また制御性T細胞を分化誘導するクロストリジウム属細菌が増えていたことは、これらが免疫系に何らかの影響を与え、HTLV-1感染細胞の増殖を促進している可能性が推測された。従って、腸内細菌叢は、ATLの予防、診断、治療に有望な標的となると考えられ、今後の更なる解析が必要である。

研究成果の概要(英文)：To study the involvement of gut microbiota in ATL leukemogenesis, we performed a comprehensive intestinal microbiota analysis by next generation sequencing of 16S rDNA using stool samples from 11 healthy volunteers and 16 patients with acute-type ATL. We found that the population of Bifidobacterium, one of the important bacteria for the host immune activity, was significantly decreased in ATL patients, suggesting that the reduced Bifidobacterium species is partly involved in the opportunistic infections observed in ATL patients. Moreover, some of opportunistic bacteria such as Bacteroides were found to be increased in ATL patients. Because these alterations in gut microbiota can be caused by the infiltrated HTLV-1-infected T-cells into the gut, the resulting disturbances in the gut bacteria may contribute to ATL cell growth through deregulation of cytokine production, which may be an invaluable molecular target for ATL therapy.

研究分野：血液学、生化学、分子生物学

キーワード：腸内細菌叢 HTLV-1 ATL

1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞白血病 (ATL) は、ヒト T 細胞白血病ウイルス-1 型 (HTLV-1) 感染を基礎疾患とする難治性の血液腫瘍である。HTLV-1 感染者は、日本、カリブ海沿岸地域、南米、アフリカなどを中心に、2000 万人以上存在しており、特にこのウイルスが CD4 陽性 T 細胞に感染することから、ATL を発症しなくとも糞線虫症等の重篤な感染症にかかりやすく、熱帯地方などの途上国では、深刻な感染症の一つとなっている。HTLV-1 は、ATL の他に、神経系疾患である HAM や眼のぶどう膜炎の原因となるが、ATL は中でも、比較的に高頻度に発症し、さらに発症すると未だ有効な治療法がないことから、患者の予後は極めて不良で、その予防、診断、治療法の開発は喫緊の課題である。

これまでに、我々も含めて、ATL 細胞のゲノム解析が行われたが (Blood, 2008)、ATL のゲノム異常は極めて複雑であり、T 細胞受容体シグナル等のいくつかの異常は、ドライバー遺伝子として ATL 細胞のモノクローナルな増殖に関わることが示唆されている。また、HTLV-1 は、細胞接触による感染後、約 40 年以上の長期の潜伏期を経て、約 5% のキャリアが ATL を発症するが、この潜伏期では、宿主の細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が HTLV-1 感染細胞の増殖抑制に重要であり、HTLV-1 細胞は、その抗原となるウイルス蛋白質 Tax の発現を損失させることで、CTL を回避し、その増殖を維持していることが明らかになっている。一方で、一部のキャリアでは、CTL の低下がみられており、日和見感染なども報告されていることから、HTLV-1 感染により、免疫系の異常が生じている可能性も示唆される。

近年、腸内細菌叢が免疫系の発達や恒常性の維持に重要な役割をもち、腸内細菌叢の攪乱が、大腸の疾患に限らず、循環器系疾患や自己免疫疾患等、様々な病態との関連が指摘されている。腸内細菌は、腸管に存在する免疫担当細胞などと相互作用し、それらの発達や分化、機能などに関わっているが、腸内細菌叢または腸管免疫系のどちらか一方に破綻が生じた場合、腸内細菌-腸管免疫間の平衡状態が崩れ、免疫異常等を来すことが知られている。また、HTLV-1 感染細胞は、免疫において抑制的な機能をもつ制御性 T 細胞 (T-reg) に似た形質をもち、異常な機能を有する HTLV-1 感染細胞が腸管に浸潤し、腸内細菌叢を攪乱している可能性も推測される。さらに、ATL 患者では、日和見感染が多く見られ、予後不良や治療抵抗性の要因となっているが、この ATL 患者で見られる免疫抑制に腸内細菌叢が関わることも推測される。

本研究では、ATL の発がん過程における腸内細菌叢の関与を解明するため、HTLV-1 キャリア及び ATL 患者の腸内細菌叢を網羅的に解析し、さらにその機能解析を *in vitro* 及び *in vivo* 系を用いて行い、HTLV-1 感染細胞や ATL 細胞の増殖に関わる腸内細菌叢およびその代

謝産物を同定し、予防、診断、治療法の開発につなげることを目的とした。

2. 研究の目的

ATL の発がん過程における腸内細菌叢の関与性を検討するため、1) HTLV-1 キャリア及び ATL の各病型の糞便を用いた 16S rDNA 次世代シーケンス解析を行い、ATL 患者と健常者との比較や、健常者、キャリア、ATL 患者との間で比較し、ATL に特徴的な腸内細菌叢を同定し、さらにプロウイルス量や感染症等の臨床症状等との比較検討により、ATL の進行や悪性化に関わる腸内細菌叢を同定する。2) ATL における腸内細菌叢の役割を明らかにするために、細胞培養系および *in vivo* マウスモデルにおいて、腸内細菌及びその成分の投与による ATL 細胞の増殖促進効果や免疫系への影響などを明らかにする。3) キャリア及び ATL 患者の腸内細菌叢の網羅的な代謝物解析を行い、同様に免疫担当細胞や ATL 細胞の増殖効果等を明らかにするとともに、代謝物の血中動態を調べバイオマーカーとしての有用性を検証し、新たな診断法の開発につなげる。

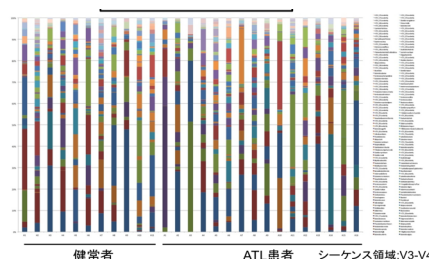
3. 研究の方法

サンプル調整は、健常者及びキャリア、ATL 患者の糞便を採取し、直ちに細菌 DNA を抽出した。すぐに DNA 抽出ができない場合、便サンプルを凍結保存し、後日 DNA 抽出を行った。DNA の抽出は、プロテイナーゼ K および熱処理による溶菌を基礎とするキアゲン社の細菌 DNA 抽出キット QIAamp DNA Stool Mini Kit を用いて行った。DNA は、16S rDNA の V3-V4 領域をターゲットとして PCR 増幅を行い、MiSeq による次世代シーケンス解析を行った。得られた配列データを Silva などの腸内細菌遺伝子のデータセットを用いてアライメントを行い、細菌種のデータを収集した。これらのデータについて、ヒストグラム解析、 α 多様性に基づいた細菌の種類解析、主座標分析による群間での類似性の比較、ランダムフォレストによるマーカーとなる特異的な腸内細菌叢の解析などを行い、ATL 患者の腸内細菌叢に見られる特徴及び異常を解析し、ATL におけるその関与性を検討した。

4. 研究成果

ATL 患者 16 例および健常者 11 例の糞便サンプルを用いて 16SrDNA の次世代シーケン

図 1 菌叢組成の比較



スによる腸内細菌叢解析を行った。菌叢組成

図2 菌叢の多様性

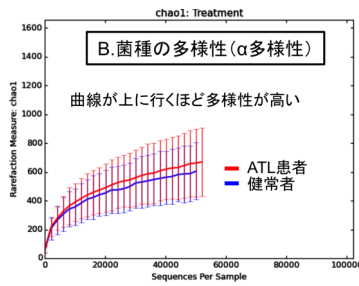
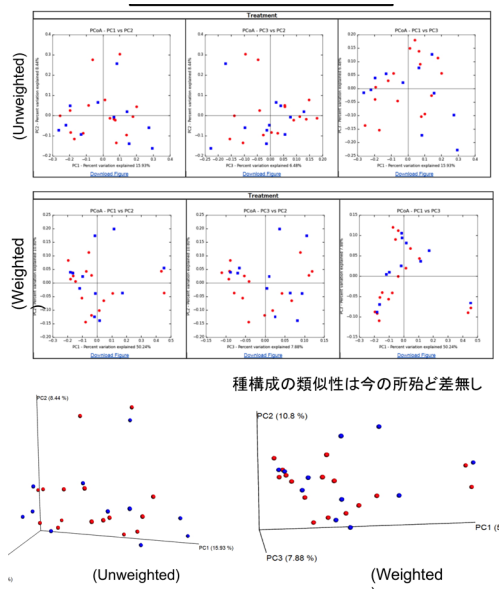


図3B 多様性の比較



の比較に(図1)においては、特異的な差は見られず、しかし、菌叢の多様性についてはやや高い傾向にあるが(図2)、多様性の比較において、種構成の類似性に差は見られなかった(図3)。またランダムフォレスト分析により、

図4上 ランダムフォレスト分析(属)

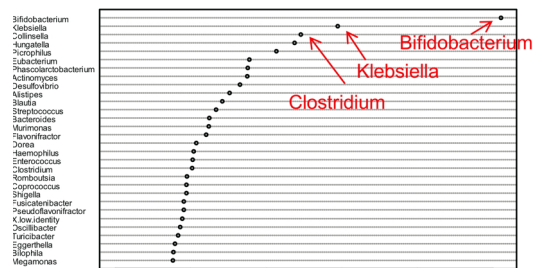
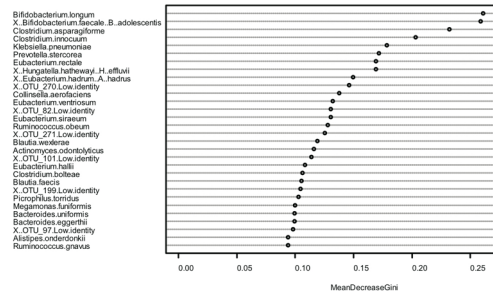


図4下 ランダムフォレスト分析(種)



ビフィドバクテリウム、クレブシエラ、バクテロイデス属において顕著に差があることが示唆された(図4)。ATL患者で顕著な変動が見られたものとして、ナチュラルキラー細胞等の機能に影響することが知られるビフィドバクテリウム属菌の低下が観察され、さらに菌血症等の感染症に関わり日和見菌として知られるクレブシエラ属、バクテロイデス属細菌が増加していることが明らかになった(図5)。

図5-1 ビフィドバクテリウム属

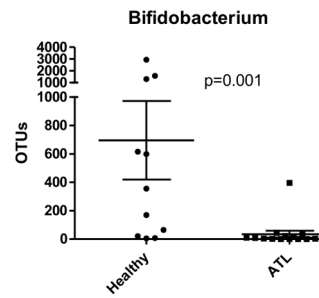


図5-2 クレブシエラ属

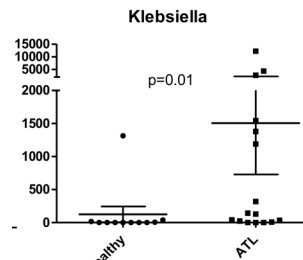
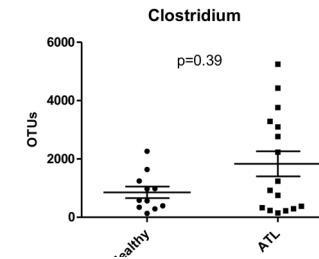


図5-3 クロストリジウム属



さらに、T-reg を分化誘導することが報告されているクロストリジウム属細菌の増加が見られた。以上の結果は、ATL 患者では、腸内細菌叢の不均衡化が生じており、HTLV1 感染細胞や ATL 細胞が腸内細菌叢に影響を及ぼしていること、及び ATL 患者の腸内細菌叢が免疫系を攪乱している可能性が示唆された。

また一方、今回の解析では、健常者と ATL 患者との間で腸内細菌種の多様性の違いや、それぞれのグループを細菌叢で識別化することはできなかったが、以上のように、腸内細菌叢のプロファイルから、腸内細菌叢が宿主の免疫機能や ATL 細胞の増殖に関与する可能性が考えられたことから、これらの解析は、ATL の予防、診断、治療法の開発につながる可能性があり、キャリアの解析とともに、ATL における腸内細菌叢の機能解析を進める予定である。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権] 該当なし

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森下 和広 (MORISHITA, kazuhiko)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号 : 80260321

(2) 研究分担者 ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :

(4) 研究協力者 ()