

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17H03594

研究課題名(和文) ATLL及びB細胞性リンパ腫発症リスク評価・判定法の開発

研究課題名(英文) Development of ATLL and B-cell lymphoma risk assesment method

研究代表者

齋藤 益満 (Saito, Masumichi)

国立感染症研究所・感染症危機管理研究センター・主任研究官

研究者番号：20571045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトT細胞白血病ウイルス1型(HTLV-1)感染者の約5%が成人T細胞白血病・リンパ腫(ATLL)を発症するが、その原因・機序は未だ不明であった。またATLL患者末梢血から高頻度で樹立されるHTLV-1/EBV感染B細胞株の性質について不明であった。本研究計画では、HTLV-1感染者、HTLV-1関連脊髄症患者(HAM/TSP)および成人T細胞白血病(ATLL)由来の698検体とATLL患者末梢血由来HTLV-1/EBV感染B細胞株を用いて、網羅的HTLV-1挿入部位・クロナリティ解析および網羅的HTLV-1変異解析を行なった。これらの解析結果からATLL発症リスク評価・判定法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究計画の一つである網羅的HTLV-1挿入部位解析を実施するために、RAISING(Rapid Amplification of Integration Site without Interference by Genomic DNA contamination)法を株式会社ファスマックと共同開発した。本技術は、現在ATLL確定診断に用いられているサザンプロット法より簡便、迅速、低コストかつ高精度であるため、今後のATLL早期診断法としての応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Approximately 10-20 million of Human T-cell leukemia virus type-1 (HTLV-1)-infected carriers have been previously reported, and approximately 5% of these carriers develop adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) with a characteristic poor prognosis. It is unknown why HTLV-1 causes ATLL and why HTLV-1/EBV co-infected B-cell lines are frequently established from ATLL patients. To elucidate the mechanism of ATLL development and characterize the HTLV-1/EBV co-infected B-cell lines, we performed a comprehensive analysis of HTLV-1 mutations and integration sites using approximately 700 specimens obtained from asymptomatic carriers, HAM/TSP patients, and ATLL patients. These analysis demonstrated a finding of ATLL specific HTLV-1 mutations and the usefulness of monitoring HTLV-1 clonality for ATLL risk assessment.

研究分野：腫瘍検査学

キーワード：HTLV-1 キャリア HAM/TSP患者 ATLL患者 HTLV-1変異 HTLV-1挿入部位 クロナリティ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在、ATLL 確定診断にサザンブロット法を用いた HTLV-1 クロナリティ解析が実施されている。この代替法として、次世代シーケンサー (NGS) を用いたアダプターライゲーション法やターゲットキャプチャー法等が開発されてきた。しかしながら、NGS は未だ高価なため、ルーチン検査には不向きであった。

(2) これまでの ATLL 発症モデルは、HTLV-1 感染細胞で Tax 機能優性から HBZ 機能優性になる境界線上に ATLL 発症の引き金となる原因が存在していることが強く示唆されていたが、その存在は明らかにされていない。

2. 研究の目的

(1) 現在、ATLL 確定診断にサザンブロット法を用いた HTLV-1 クロナリティ解析が実施されているが、検出感度が低く、高コストかつ長時間であるため、これらの問題点を克服した新規 HTLV-1 クロナリティ解析法の開発を行なった。

(2) HTLV-1 感染細胞で Tax 機能優性から HBZ 機能優性になる境界線上に ATLL 発症の引き金となる原因が存在していることが強く示唆されていた。われわれは、HTLV-1 変異が Tax 機能優性から HBZ 機能優性となる原因と考え、ATLL 約 200 検体における HTLV-1 完全長配列の決定を行なった。

3. 研究の方法

(1) 我々は、現行の ATLL 確定診断に用いられているサザンブロット法の問題点を克服した新規 HTLV-1 挿入部位・クロナリティ解析法を開発し、RAIS (Rapid Amplification of Integration Site) と命名した (引用文献 1、主な発表論文 1)。また RAIS の改良型である新規ランダムトランスジーン挿入部位同定法 RAISING (Rapid Amplification of Integration Site without Interference by Genomic DNA contamination) の開発に成功した (特許出願済み、引用文献 2、主な発表論文 2)。この RAISING 技術の特徴 (迅速、安価、簡便かつ高感度で安定性、再現性及び汎用性が高い) とクロナリティ解析ソフトである CLOVA を生かし、HTLV-1 キャリア、HAM/TSP 症患者および ATLL 患者の合計 698 検体における網羅的 HTLV-1 挿入部位・クロナリティ解析を実施した。

(2) RAIS および RAISING を開発したことによって、網羅的 HTLV-1 挿入部位・クロナリティ解析が実施可能となった。これらの解析結果を利用し、ATLL 約 200 検体における完全長 HTLV-1 を 1 回の PCR で増幅し、サンガーシーケンスによる HTLV-1 変異解析を行なった。

4. 研究成果

(1) まず RAISING-CLOVA の開発に成功したことによって、HTLV-1 キャリア (AC) と ATLL 患者における HTLV-1 感染細胞のクロナリティを明確に分類することが可能となった。さらに「見た目」の分類だけでなく、HTLV-1 感染細胞のクロナリティの数値化が可能となった (図 1)。本技術は NGS を使用しないため、非常に安価である。そこで、HTLV-1 キャリア、HAM/TSP 症患者および ATLL 患者の合計 698 検体における網羅的 HTLV-1 挿入部位・クロナリティ解析および PVL 解析を実施した。その結果、RAISING-CLOVA を用いた HTLV-1 クロナリティの方が、より HTLV-1 キャリア、HAM/TSP 症患者の 2 群と ATLL 患者を分類可能であることを明らかにした (図 2)。またクロナリティ値と PVL 量を用いて、3 群を 2 次元に展開することによって、ATLL 発症ハイリスクキャリアおよび HAM/TSP 症患者を同定することに成功した (図 3)。さらに ROC (Receiver Operating Characteristic) 解析を行うことによって、ATLL 発症ハイリスク、ミディアム、ローリスクグループに分類するためのカットオフ値を見出し、ATLL 発症リスク評価・判定法を樹立した。

(2) ATLL 約 200 検体における完全長 HTLV-1 配列を決定し、コントロール群である HTLV-1 キャリアにおける HTLV-1 配列と比較したところ、欠損型 HTLV-1 が高頻度で ATLL 患者に存在することを明らかにした。さらにおよそ 10 種類の ATLL 特異的 HTLV-1 ポイント変異が存在することを見出した。これら欠損およびポイント変異をもつ HTLV-1 を作成し、Tax と HBZ の発現パターンについて解析を行なったところ、Tax 発現が低下し、HBZ 発現が亢進することを見出した。これらの研究成果から、HTLV-1 の欠損とポイント変異が ATLL 発症に関与していることが強く示唆された。

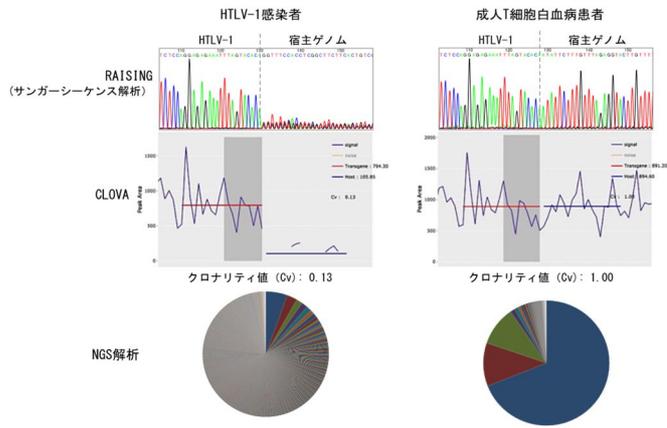


図1 RAISING-CLOVAを用いたHTLV-1感染細胞クロナリティ解析
非白血病発症検体と白血病発症検体の違い（代表例）

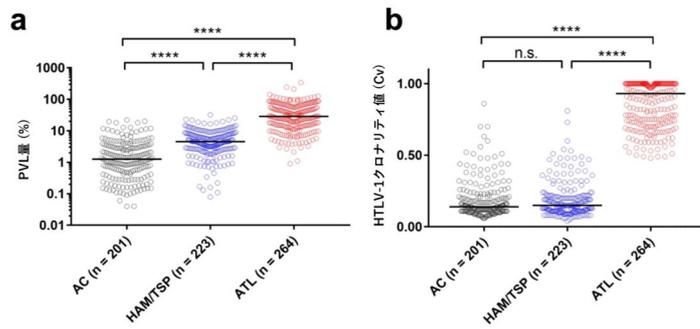


図2 RAISING-CLOVAを用いた網羅的HTLV-1クロナリティ解析
クロナリティ値とプロウイルス量の比較

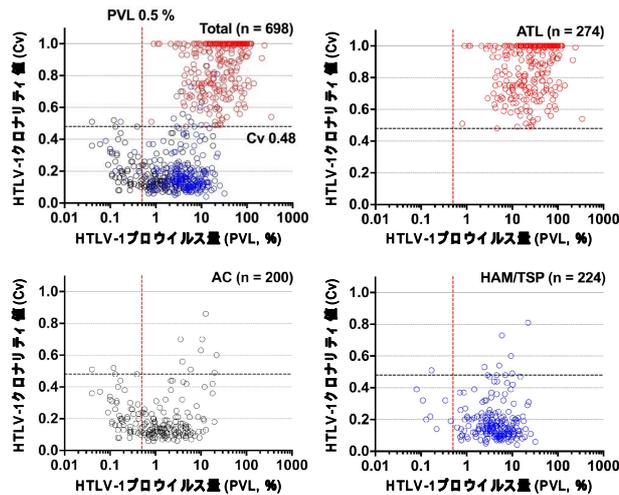


図3 クロナリティ値とPVL量を用いた
ATLL発症ハイリスクキャリア、HAM/TSP患者の同定

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Saito Masumichi, Hasegawa Hiroo, Yamauchi Shunsuke, et al.	4. 巻 112
2. 論文標題 A high-throughput detection method for the clonality of Human T-cell leukemia virus type-1-infected cells in vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 300 ~ 306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-020-02935-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakahata Shingo, Syahrul Chilmi, Nakatake Ayako, Sakamoto Kuniyo, Yoshihama Maki, Nishikata Ichiro, Ukai Yoshinori, Matsuura Tadashi, Kameda Takuro, Shide Kotaro, Kubuki Yoko, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Clinical significance of soluble CADM1 as a novel marker for adult T-cell leukemia/lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2019.234096	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kuramitsu M, Sekizuka T, Yamochi T, Firouzi S, Sato T, Umeki K, et al.	4. 巻 Sep;55(9)
2. 論文標題 Proviral Features of Human T Cell Leukemia Virus Type 1 in Carriers with Indeterminate Western Blot Analysis Results	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Microbiology	6. 最初と最後の頁 2838-2849
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JCM.00659-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Wada Y, Sato T, Hasegawa H, Matsudaira T, Nao N, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 RAISING is a high-performance method for identifying random transgene integration sites.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03467-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齋藤益満、長谷川寛雄、佐々木大介、山内俊輔、和田 悠作、松平 崇弘
2. 発表標題 ランダムインテグレーション評価法（RAIS2）の開発と検査・解析サービスの展開
3. 学会等名 第6回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤益満、山内俊輔、佐々木大介、長谷川寛雄
2. 発表標題 次世代HTLV-1クロナリティ解析法の開発とその応用に向けて
3. 学会等名 第4回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤益満（さいとう ますみち）1）、伊波英克（いは ひでかつ）2）、長谷川寛雄（はせがわ ひろお）3）、他35名
2. 発表標題 成人T細胞白血病・リンパ腫患者におけるHTLV-1/EBV共感染B細胞の存在意義
3. 学会等名 第4回日本HTLV-1学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松橋一彦（まつはし かずひこ）1）2）、齋藤益満（さいとう ますみち）1）、他19名
2. 発表標題 成人T細胞白血病・リンパ腫におけるHBZ活性化 - miR-324-3PによるHBZ発現抑制の崩壊 -
3. 学会等名 第4回日本HTLV-1学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 齋藤益満
2. 発表標題 ヒトT細胞白血病ウイルス1型変異を介した非ホジキンリンパ腫 発症リスク評価・判定法の開発
3. 学会等名 第6回研究交流フォーラム
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 DNA配列の増幅方法及び配列決定方法	発明者 齋藤益満、百瀬暖佳、和田悠作、松平崇弘	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-150535	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	長谷川 寛雄 (Hasegawa Hiroo) (00398166)	長崎大学・病院(医学系)・准教授 (17301)	
研究分担者	緒方 正男 (Ogata Masao) (10332892)	大分大学・医学部・教授 (17501)	
研究分担者	今泉 芳孝 (Imaizumi Yoshitaka) (40404305)	長崎大学・原爆後障害医療研究所・准教授 (17301)	
研究分担者	伊波 英克 (Iha Hidekatsu) (50242631)	大分大学・医学部・准教授 (17501)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	谷生 道一 (Tanio Michikazu) (10416662)	国立感染症研究所・次世代生物学的製剤研究センター・主任研究官 (82603)	
研究分担者	日吉 真照 (Hiyoshi Masateru) (40448519)	国立感染症研究所・次世代生物学的製剤研究センター・主任研究官 (82603)	
研究分担者	百瀬 暖佳 (Momose Haruka) (70415488)	国立感染症研究所・次世代生物学的製剤研究センター・主任研究官 (82603)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関