

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02733

研究課題名(和文)ATL発症クローンの同定・解析に基づく病因解明と個別化検査法の確立

研究課題名(英文)Establishment of individualized test method for HTLV-1 carriers based on identification and analysis of ATL-onset clones

研究代表者

長谷川 寛雄 (HASEGAWA, Hiroo)

長崎大学・病院(医学系)・准教授

研究者番号：00398166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,200,000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%が難治性の成人T細胞白血病・リンパ腫(ATL)を発症する。ATLの臨床診断におけるモノクロナリティの証明は、サザンブロット法に拠っている。本研究の目的はHTLV-1変異とヒトゲノムへの組込み部位を同時かつ簡便に検出可能な方法を樹立することである。これによりサザンブロット法の欠点を克服することである。我々はその基本となる方法を開発し、論文報告をおこなうことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトT細胞白血病ウイルス1型(HTLV-1)感染者の約5%が難治性の成人T細胞白血病・リンパ腫(ATL)を発症するが、その原因・機序は不明である。ATLの臨床診断における腫瘍性獲得の証明は、サザンブロット法に拠っているが欠点(大量のDNAを要し、工程が複雑、感度が不十分、結果報告に時間を要するなど)も多いことが問題であった。本研究によりHTLV-1変異とヒトゲノムへの組込み部位を同時かつ簡便に検出可能な方法を樹立することができた。これによりATL症例におけるHTLV-1変異とHTLV-1組込み部位解析がより簡便になり、発症原因・機序の解明に役立てることができる。

研究成果の概要(英文)：Approximately 5% of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-infected individuals develop refractory adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL), and the demonstration of monoclonality in the clinical diagnosis of ATL relies on Southern blot analysis. The objective of this study was to establish a method to simultaneously and easily detect HTLV-1 mutations and their integration sites into the human genome. This will overcome the disadvantages of Southern blotting. We have developed the basic method and published a paper.

研究分野：臨床検査、血液内科学

キーワード：HTLV-1 成人T細胞白血病・リンパ腫(ATL) 発症クローン クロナリティ検査

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) は長い潜伏期間後に数%のキャリアに成人 T 細胞白血病・リンパ腫 (ATL) を引き起こす発がん性レトロウイルスであり、世界に約 1000 万人のキャリアが存在する。ATL はくすぶり型・慢性型 (indolent ATL)、急性型・リンパ腫型 (aggressive ATL) の 4 つの臨床病型に分類され、aggressive ATL に進展すると、強力な化学療法によっても生存期間中央値は約 10 ヶ月と予後不良である。よって新規治療薬の開発だけでなく、aggressive ATL へ進展するリスク評価可能な検査が必要とされている。

HTLV-1 は主に T リンパ球に感染し、ひとつの感染細胞は細胞数 (ウイルスコピー数) を増加させ、ひとつのクローンを形成する。キャリアや indolent ATL では個体内に様々な異なる多数の小クローンが混在するが、その中のあるクローンが爆発的に増殖し aggressive ATL に進展する。ATL の分子生物学的診断は、感染細胞数の増加 (プロウイルス定量 PCR 検査)、モノクロナリティーの確認 (サザンブロット検査) によるが、あるクローンが増加したこと以上の情報は得られない。また、HTLV-1 のヒトゲノムへの組込みはランダムであり、多くの造血器悪性腫瘍と異なり ATL を規定するような染色体・遺伝子異常は認められず、組込み部位の研究は停滞している。HTLV-1 の TAX タンパクは細胞増殖、不死化、遺伝子変異の誘導作用を有し、ATL 発症の引き金となりうるが、同時に Cytotoxic T-Lymphocyte (CTL) の主な標的でもあり、TAX 発現細胞の増殖は生体内では抑えられている。また、発症後の ATL 細胞のほとんどは TAX を発現していない。TAX による説明だけでは矛盾を生ずる発症仮説であったが、マイナス鎖から翻訳される HTLV-1 bZIP factor (HBZ) の役割に関するエビデンスが蓄積され、HBZ 遺伝子が何らかの機序で活性化し、さらにジェネティック・エピジェネティックな異常の蓄積したクローンが ATL 化する、という説が現在では支持されている (図 1)。

よって、TAX 減少かつ HBZ 活性化現象を捉えることができれば、発症機序に基づく新しい検査法となり得る。

ATL においては、現在までの研究の積み重ねにも関わら

ず「感染細胞中のどのクローンが、なぜ発症に至るのか」という最重要課題は解決されていない。

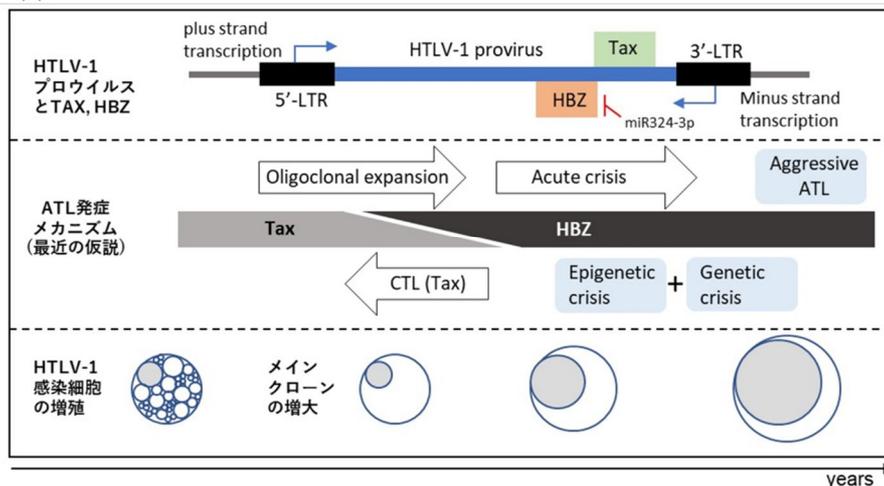
2. 研究の目的

上記の問題の解決のため、研究代表者らは、発症クローンを正確に捉えることと発症機序を捉えることを連動させた新しい検査法の確立を本研究の目的とする。

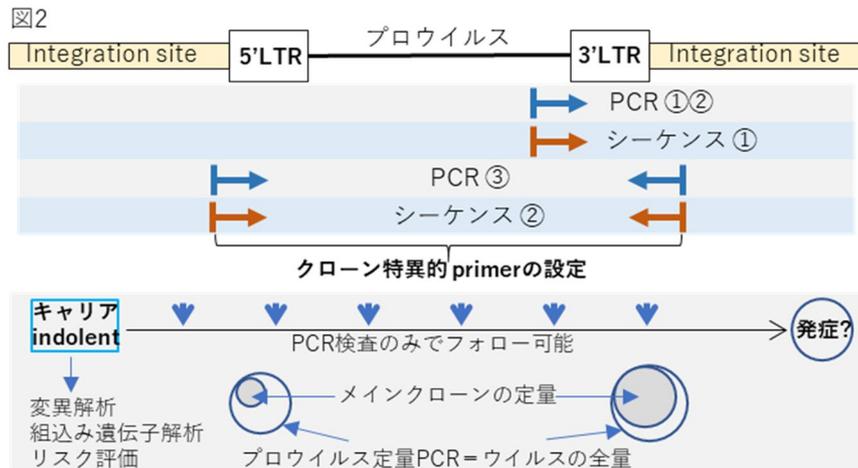
3. 研究の方法

本検査法の確立のためには、発症クローンを正確に捉えるため、HTLV-1 ゲノム配列・組込み部

図1



位解析を患者毎におこなうことが必要となる。我々はPCR法（計3回）とシーケンス解析（計2回）の組合せのみで、これらが可能な独自の方法の原型を開発した（図2）。本手法は増殖中のクローンの組込み部位を患者毎に個別に同定し、そのウイルスゲノム配列、ウイルス総量に占めるクローンの割合を定量的に捉えることが可能である。



4. 研究成果

本研究においてまず、発現実験などに基づき、TAX 減少・HBZ 増加を誘導する3つの機序を見出した。(1)ATL 発症者の約20%に認められるHTLV-1ゲノム変異、(2)40-60%に認められるHTLV-1ゲノムの5'領域の欠損、(3)HBZ発現抑制能をもつmiR324-3Pの低下、である。これらを合わせ80%以上の発症ハイリスク者を把握することが可能と考えられた。また、発症クローンを正確かつ簡便に捉えることができる検査法についてはその原型を確立することができた。本手法を用いて研究代表者らが発症者約40例を対象におこなった組込み部位解析ではがん遺伝子、がん抑制遺伝子に組込まれているものが一定数含まれていた（表1）。このような解析の結果から、組み込み部位にがん遺伝子やがん抑制遺伝子内が含まれている場合、宿主遺伝子発現に影響を及ぼしATL発症に寄与すると考えられた。よって、今日的な視点でクローンの組込み部位情報を解析することで、発症リスク評価に役立てることが可能と考えられた。上記(1)-(3)の解析に加え、発症クローンを正確・簡便に捉えるため、HTLV-1ゲノム配列・組込み部位解析を患者毎におこなう検査法の確立が求められた。図2に示した方法は本手法の原型であるが、すでに検査法として十分な正確性・簡便性を有していると考え、この方法について論文報告をおこなった（Int J Hematol.2020;112(3):300-306.）。本研究の目的は研究代表者らの手法をスタンダードな検査として確立することでもあり、遺伝子検査室のある検査施設（含外注検査施設）で無理なくおこなえる妥当性も追求している。

表1	chromosome	gene	function
Cell line A	2p25.2, 8q24.21, 11p11.2	MYC, PTPRJ	Oncogene, Tumor suppressor gene
Cell line B	3p12.3	ROBO1	Tumor suppressor gene
ATL-A	9q22.31	PHF2	Tumor suppressor gene
ATL-B	3p14.2	FHIT	Tumor suppressor gene
ATL-C	Xp22.2	ARHGAP6	Tumor suppressor gene
ATL-D	9q21.32	FRMD3	Tumor suppressor gene

世界的にみるとHTLV-1キャリアの分布には地域性があり、ATL発症者の多い先進国は日本のみであるという現状もあり、患者データの蓄積に基づく本検査法は国内外の検査法をリードするものと位置付けられる。臨床検査の視点から考えると、ATLの臨床診断におけるモノクローナ

リティの証明は、サザンブロット法に拠っている現状がある。我々の方法はサザンブロット法の欠点（大量の DNA を要し、工程が複雑、感度が不十分、結果報告に時間を要するなど）を克服することができたと言える。そこで本手法をさらに発展させ、より実用的な新規 ATL 個別化検査法を確立にも取り組んでいる。本手法により ATL 約 300 症例における HTLV-1 ゲノムの 5' 領域の欠損および HTLV-1 変異について情報を得ることができたため、今後は HTLV-1 組込み部位情報と合わせ、ATL 発症原因の解明のための情報整理や裏付け実験が必要となってくる。同時に、検査法に関してもこの方法による解析・検査結果報告が臨床科のニーズに見合うものであるか検証をおこない検査法の改善に取りくんていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Uno N, Kaku N, Morinaga Y, Hasegawa H, Yanagihara K	4. 巻 48(15)
2. 論文標題 Flow cytometry assay for the detection of single-copy DNA in human lymphocytes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res	6. 最初と最後の頁 e86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkaa515	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 Saito M, Hasegawa H, Yamauchi S, Nakagawa S, Sasaki D, Nao N, Tanio M, Wada Y, Matsudaira T, Momose H, Kuramitsu M, Yamagishi M, Nakashima M, Nakahata S, Iha H, Ogata M, Imaizumi Y, Uchimaru K, Morishita K, Watanabe T, Miyazaki Y, Yanagihara K	4. 巻 112(3)
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 Int J Hematol	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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tezuka K, Fuchi N, Okuma K, Tsukiyama T, Miura S, Hasegawa Y, Nagata A, Komatsu N, Hasegawa H, Sasaki D, Sasaki E, Mizukami T, Kuramitsu M, Matsuoka S, Yanagihara K, Miura K, Hamaguchi I	4. 巻 130(11)
2. 論文標題 HTLV-1 targets human placental trophoblasts in seropositive pregnant women	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Invest	6. 最初と最後の頁 6171-6186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI135525	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 Yamakawa T, Uno N, Sasaki D, Kaku N, Sakamoto K, Kosai K, Hasegawa H, Miyazaki Y, Yanagihara K.	4. 巻 19
2. 論文標題 A Methodology for Assessing Tumor Clonality of Adult T Cell Leukemia/Lymphoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Ther Methods Clin Dev	6. 最初と最後の頁 467-473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtm.2020.10.015.	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 Nishimura F, Uno N, Chiang PC, Kaku N, Morinaga Y, Hasegawa H, Yanagihara K	4. 巻 2
2. 論文標題 The Effect of In Vitro Hemolysis on Measurement of Cell-Free DNA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Appl Lab Med	6. 最初と最後の頁 235-240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1373/jalm.2018.027953	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 Morinaga Y, Take Y, Sasaki D, Ota K, Kaku N, Uno N, Sakamoto K, Kosai K, Miyazaki T, Hasegawa H, Izumikawa K, Mukae H, Yanagihara K	4. 巻 14(9)
2. 論文標題 Exploring the microbiota of upper respiratory tract during the development of pneumonia in a mouse model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0222589
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0222589	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 Toriyama E, Imaizumi Y, Tsuruda K, Itonaga H, Sato S, Ando K, Sawayama Y, Hasegawa H, Hata T, Niino D, Yanagihara K, Miyazaki Y	4. 巻 58(15)
2. 論文標題 Oligosecretory Primary Plasma Cell Leukemia with Atypical Morphological Abnormality	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Intern Med	6. 最初と最後の頁 2213-2217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.2472-18	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 Nomura Hajime, Umekita Kunihiro, Hashikura Yuuki, Umeki Kazumi, Yamamoto Ikuo, Aratake Yatsuki, Saito Mineki, Hasegawa Hiroo, Yanagihara Katsunori, Okayama Akihiko	4. 巻 32
2. 論文標題 Diversity of cell phenotypes among MT-2 cell lines affects the growth of U937 cells and cytokine production	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 185 ~ 192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13577-018-00231-3	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 Kuramitsu Madoka, Okuma Kazu, Nakashima Makoto, Sato Tomoo, Sasaki Daisuke, Hasegawa Hiroo, et.al.	4. 巻 62
2. 論文標題 Development of reference material with assigned value for human T-cell leukemia virus type 1 quantitative PCR in Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 673 ~ 676
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12644	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 Fuchi Naoki, Miura Kiyonori, Tsukiyama Takashi, Sasaki Daisuke, Ishihara Kaori, Tsuruda Kazuto, Hasegawa Hiroo, Miura Shoko, Yanagihara Katsunori, Masuzaki Hideaki	4. 巻 217
2. 論文標題 Natural Course of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Proviral DNA Levels in Carriers During Pregnancy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 1383 ~ 1389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/infdis/jiy017	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 Fukumoto Takuro, Ikebe Emi, Ogata Masao, Kohno Kazuhiro, Kuramitsu Madoka, Sato Yusuke, Fife Nichole, Matsumoto Takashi, Yahiro Takaaki, Ikeda Masanori, Kusano Shuichi, Okayama Akihiko, Hori Mitsuo, Hijiya Naoki, Tsukamoto Yoshiyuki, Hirashita Yuka, Moriyama Masatsugu, Ahmed Kamruddin, Hasegawa Hiroo, et.al.	4. 巻 6
2. 論文標題 Complete Sequences of the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Proviral Genomes from Newly Established Adult T-Cell Leukemia Cell Lines in Oita Prefecture, Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genome Announcements	6. 最初と最後の頁 e00090-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/genomeA.00090-18	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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山内 俊輔、斎藤 益満、長谷川 寛雄、佐々木 大介、淵上 麻衣、森 沙耶香、鶴田 一人、今泉 芳孝、宮崎 泰司、柳原 克紀
2. 発表標題 次世代HTLV-1クロナリティ解析法(RAIS1)の開発
3. 学会等名 日本検査血液学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名	林田 章也、長谷川 寛雄、鶴田 一人、森 沙耶香、淵上 麻衣、山内 俊輔、岡本 南、高田 侑実、松本 慧介、柳原 克紀
2. 発表標題	AML with t(8;21)(q22;q22.1)における細胞抗原発現の解析
3. 学会等名	日本検査血液学会
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	新野 大介、佐々木 大介、山内 俊介、長谷川 寛雄、柳原 克紀、岩永 正子
2. 発表標題	HTLV-1キャリアに対する血漿miRNAを用いたATL発症スクリーニング検査の確立
3. 学会等名	日本病理学会
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	斎藤 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	手塚 健太、淵 直樹、大隈 和、築山 尚史、長谷川 ゆり、長谷川 寛雄、佐々木 大介、三浦 生子、東島 愛、佐々木 永太、水上 拓郎、倉光 球、松岡 佐保子、増崎 英明、三浦 清徳、浜口 功
2. 発表標題	キャリア妊婦におけるHTLV-1 経胎盤感染の実態解明の試み
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 山川 智弘、宇野 直輝、賀来 敬仁、坂本 啓、森永 芳智、長谷川 寛雄、柳原 克紀
2. 発表標題 HTLV-1 ウイルス組み込み配列の決定およびクローン特異的定量PCR 法の開発
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 伊波 英克、池辺 詠美、下崎 俊介、ファイフ ニコール、ファジャード リンゼイ、堀 光雄、長谷川 寛雄、 泥谷 直樹、塚本 義之、守山 正胤、草野 秀一、斎藤 益満、森下 和宏
2. 発表標題 Combination of lenalidomide and epigenetic drug against hematologic malignancies
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 山内 俊輔、長谷川 寛雄、斎藤 益満、佐々木 大介、今泉 芳孝、柳原 克紀
2. 発表標題 次世代HTLV-1 クロナリティ解析法(RAIS1)の開発とその進捗
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 長谷川 寛雄、斎藤 益満、今泉 芳孝、宮崎 泰司
2. 発表標題 HTLV-1感染におけるモノクロナリティと挿入部位を同定する新しい検査法
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川 寛雄、斎藤 益満、今泉 芳孝、宮崎 泰司
2. 発表標題 HTLV-1のモノクローナル組込みと挿入部位を同定する新しい検査法
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 斎藤益満、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5回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山内俊輔、斎藤益満、長谷川寛雄、佐々木大介、賀来敬仁、宇野直輝、森永芳智、今泉芳孝、宮崎泰司、柳原克紀
2. 発表標題 次世代HTLV-1クロナリティ解析法の開発
3. 学会等名 第65回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	斎藤 益満 (SAITO Masumichi) (20571045)	国立感染症研究所・血液・安全性研究部・主任研究官 (82603)	

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	柳原 克紀 (YANAGIHARA Katsunori) (40315239)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授 (17301)	
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	佐々木 大介 (SASAKI Daisuke) (90624784)	長崎大学・病院(医学系)・技術職員 (17301)	

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