

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07693

研究課題名（和文）腸内細菌叢解析に基づいた成人T細胞白血病(ATL)発症機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of adult T-cell leukemia (ATL) development based on gut microbiota analysis

研究代表者

中畑 新吾（Nakahata, Shingo）

鹿児島大学・総合科学域総合研究学系・教授

研究者番号：80437938

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：腸内細菌叢は、腸管免疫や代謝産物を介して宿主の恒常性維持に重要な働きをもつ。本研究では、腸内細菌叢の変化がATLの増悪のリスクファクターとなりうる可能性を初めて証明した。健康者と比べてATL患者で有意に増加する細菌群の同定に成功し、腫瘍マーカーとして知られるsIL2Rと相関する細菌群を見出した。さらに、HTLV-1キャリアで増加している細菌群から、HTLV-1プロウイルス量と相関する細菌が存在することがわかった。また、ショットガンメタゲノムデータの解析から、ATL患者において腸内代謝異常が起こっている可能性を示唆する結果が得られ、ATLの病態形成に関わる可能性が推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によってATL患者における腸内細菌叢の動態が初めて明らかになり、ATL患者の代謝や免疫機能にも関わる可能性を見出した。つまり、ATLの病態形成における宿主環境因子としての腸内細菌叢の関与が明らかになり、ATLの病態解析の一助となるものと考えられる。さらに、ATL発症予測マーカーとなりうる腸内細菌を同定できたことは、これまでなし得なかった発症予測診断や発症予防法の開発につながるものと期待している。今後、ATLの病態における腸内細菌叢の役割を解明し、臨床応用に繋げていきたいと考えている。

研究成果の概要（英文）：The gut microbiota plays an important role in maintaining host homeostasis through intestinal immunity and metabolism. In this study, we have demonstrated for the first time that changes in the gut microbiota may be a risk factor for ATL exacerbations. We succeeded in identifying a bacterial group that significantly increased in ATL patients compared to healthy subjects, and found a bacterial group that correlates with sIL2R, which is known as a tumor marker. Furthermore, from the bacterial group that was increased in HTLV-1 carriers, it was found that there are bacteria that correlate with the HTLV-1 provirus loads. In addition, analysis of shotgun metagenome data provided results suggesting the possibility of intestinal metabolic disorders in ATL patients, suggesting that they may be involved in the pathogenesis of ATL.

研究分野：病態医科学

キーワード：腸内細菌叢 成人T細胞白血病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々の身体は膨大な数の微生物と共生しており、宿主とのクロストークが我々の健康に大きな影響を持つことが近年の研究でわかりつつある。特に腸内細菌叢は、最大の共生生物であり、腸管免疫や代謝産物を介して、宿主の恒常性維持に重要な働きをもつ。従って腸内細菌叢の異常は、慢性炎症・免疫機能異常に繋がり、様々な疾病の発症と関係することがわかってきた。ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) は CD4+ヘルパー T 細胞に感染し、長期の潜伏後、HTLV-1 キャリアの数%が成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (ATL)、HAM/TSP などの HTLV-1 関連疾患を発症する。ATL は、進行が緩慢なインドレントタイプと呼ばれるくすぶり型、慢性型 ATL と進行が急速なアグレッシブタイプである急性型、リンパ腫型に分類される。ATL は、血液腫瘍の中でも特に予後不良であり、急性型 ATL 患者の平均生存期間は半年程度である。未だ標準的な治療方法は確立されておらず、新たな治療薬の開発は喫緊の課題である。

HTLV-1 の遺伝子産物 Tax 及び HBZ は、HTLV-1 感染 T 細胞の増殖を促す一方で、Tax は細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の標的となる。その結果、若年者では HTLV-1 感染 T 細胞数の増加は抑制され、平衡状態となる。ATL は、ゲノム・エピゲノム変異の蓄積によるクローナル増殖の結果として発症する。一方で、約 95% のキャリアは生涯無症状であることから、ATL の発症にはこれらゲノム変異を促進する付加的な因子 (群) が必要であることが示唆される。このような ATL 発症促進因子の一つとしてこれまでに日和見感染が挙げられてきた。HTLV-1 キャリアは Th2 機能が抑制され、感染防御に必要なサイトカインの分泌が低下、好酸球や IgE の低下し、糞線虫感染症は重複感染症として重要な ATL 発症の危険因子として、30 年前の沖縄を始め南米諸国で報告されている (Lancet 1987, Am J Trop Med Hyg. 2006)。この糞線虫感染は HTLV-1 感染細胞を含む制御性 T 細胞 (T-reg) の増殖と単クローン性を促し、ATL 発症を促進することが示唆されている (PLoS Negl Trop Dis. 2009)。

これらの日和見感染は一部の ATL 患者しか同定されていないことから、最大の共生生物である腸内細菌叢に注目した。特に母乳からの母子感染による初期感染は腸管内で起こること、腸内細菌叢の調節には T-reg が深く関係しており、T-reg 様 HTLV-1 感染細胞や ATL 細胞が消化管へ高頻度に浸潤が見られること等から直接的に腸内細菌叢に接触、炎症性サイトカインなどの分泌や、代謝物により HTLV-1 感染 T 細胞が増殖促進につながる機構が考えられた。

2. 研究の目的

我々は、長期的な腸内細菌叢の乱れが ATL 発症に影響する可能性を考え、ATL 患者の網羅的な腸内細菌叢解析を行ったところ、ATL 患者に共通の腸内細菌叢異常が存在する可能性を見出した。腸内細菌叢の乱れは、腸管免疫や代謝異常に繋がり、慢性炎症反応あるいは免疫異常による HTLV-1 感染 T 細胞の癌化を促進する機構となりうることから、本研究では、腸内細菌叢を介した ATL 発癌機構を明らかにし、発症予防法の開発に繋げることを目的に以下の研究を実施した。

3. 研究の方法

患者検体

本研究は、宮崎大学倫理委員会の承認後、対象となる患者からインフォームド・コンセントを取得し、宮崎大学医学部附属病院血液内科、および研究共同機関である今村総合病院 (鹿児島市) において糞便検体を採取した。糞便検体は速やかに凍結保存し、一部を細菌 DNA の抽出を行なった。また、外来患者の糞便採取に際しては、グアニジン溶液を含む採便キット (株式会社テクノスルガ・ラボ、静岡県) を使用した。

DNA 抽出

糞便からの細菌 DNA の抽出は、新鮮便に対して QIAamp DNA Stool Mini Kit (株式会社キアゲン、東京都) を使用した。グアニジン溶液保存便に対しては、QIAamp Power Fecal DNA Kit (キアゲン) を用いた。抽出した DNA は、シーケンス解析まで -30℃ で保存した。なお、両キット間の違いにより、抽出できる細菌群が若干異なり、使用したキットによる腸内細菌叢の変動が生じることから、本研究では解析の際、同一のキットで抽出したサンプル間でのみ群間比較を実施した。

16SrDNA 解析

細菌 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を PCR で増幅し、MiSeq によりシーケンスデータを抽出した。プロトコールは、16S Metagenomics Sequencing Library Preparation (イルミナ) を参照した。16SrDNA V3-V4 領域の増幅 (1st_PCR) 後、アダプター・インデックス配列の付与 (2nd_PCR) を行い、次世代シーケンス (MiSeq) に供した (ゲノムリード株式会社、香川県)。

メタゲノム解析

イルミナ社 Nextera DNA Flex Library preparation kit のプロトコールに従い、糞便 DNA を断片化し、インデックスプライマーによる PCR、ビーズ精製を行い、ライブラリーを調整した。サンプルは、NovaSeq を用いてシーケンス解析を行った。

4. 研究成果

(1) 16S メタゲノム解析による ATL の腸内細菌叢解析

健常者、HTLV-1 キャリア、及び ATL 患者の糞便サンプルを収集、次世代シーケンスによる 16S r DNA 解析とメタゲノム解析を行った。また、末梢血検体を取得し、各種解析を実施した。バイオインフォマティクス解析は東京工業大学山田拓司博士の協力を得た。16S メタゲノム解析では、健常者と比較して ATL 患者群やキャリア群で有意な増加を示す細菌群を同定し、ATL 患者の憎悪に関与する可能性を示した。ATL 患者群に有意に増加する細菌に注目し、腫瘍マーカー、HTLV-1 プロウイルス量、炎症マーカーである CRP との相関解析を行なった。その結果、ATL 患者で有意にエンリッチメントされ、かつ、sIL2R と相関する細菌群が存在することを見出した。さらに、重要なことに、HTLV-1 キャリアで増加している細菌群から、HTLV-1 プロウイルス量と相関する細菌が存在することがわかった。

HTLV-1 キャリアの解析では、一部のキャリアと ATL 患者に特徴的な腸内細菌が存在することを見出した。さらに、健常者にはほとんど検出されず、くすぶり型 ATL 患者の多くで増加する腸内細菌を同定した。重要なことに、この腸内細菌はキャリアの一部でも増加しており、特に HTLV-1 プロウイルス量の高い HTLV-1 キャリアで顕著に増加していた。つまり、発症早期バイオマーカーとしての可能性があり、これらの細菌の更なる解析が必要であると考えられた。

一方で、Clostridium 属等が産生することが知られる酪酸は、T-reg 細胞への分化を誘導し、腸管の炎症を防ぐ重要な因子であることがこれまでに多くの報告がなされている。ATL 細胞は、T-reg 細胞の性質を持つことから、免疫抑制作用を示すことが指摘されている。我々はまた、Bacteroides 属、Clostridium 属など、ATL 患者で変動する腸内細菌叢が存在すること、腸内代謝産物解析から ATL 患者の腸内細菌叢による短鎖脂肪酸の産生は全体的に増加しており、特異代謝物として酪酸、吉草酸等、特定の短鎖脂肪酸が増加していることを明らかにした(京都大学木村郁夫博士との共同研究)。さらに、酪酸を産生することが知られている腸内細菌群が ATL 患者で有意に増加しており、これらはプロウイルス量や腫瘍マーカーとも相関することがわかった。このことから、酪酸が T-reg を介してあるいは直接的に HTLV-1 感染細胞や ATL 細胞の増殖促進因子として機能し、ATL の病態形成に関わる可能性が推測された。

(2) 16S メタゲノム解析による ATL の腸内細菌叢解析

健常者及び急性型 ATL 患者の糞便から、Nova seq を用いてショットガンメタゲノムデータを抽出し、ATL に特徴的な腸内遺伝子機能の網羅的な探索を行なった。その結果、健常者には検出されず、急性型 ATL 患者の腸内で特異的に存在する遺伝子群を単離した。これらの遺伝子群は、代謝関連酵素をコードしているものが多く、ATL 患者において腸内代謝異常が起こっている可能性を示唆する結果であった。

以上、本研究によって、ATL 患者における腸内細菌叢の動態が初めて明らかになり、ATL 患者の免疫機能にも関わる可能性がわかった。さらに、ATL 発症予測マーカーとなりうる腸内細菌を同定できたことは、これまでなし得なかった発症予測診断や発症予防法の開発につながるものと期待している。今後、ATL の病態における腸内細菌叢の役割を解明し、臨床応用に繋げていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 千葉のどか、中畑新吾、山田拓司
2. 発表標題 腸内細菌叢と成人T細胞白血病の関連性の解析
3. 学会等名 日本バイオインフォマティクス学会
4. 発表年 2021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
研究協力者	山田 拓司 (Yamada Takuji)		

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
---------	---------