

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590581

研究課題名(和文) HTLV-1 感染関連分子と ATL 発症危険群の同定

研究課題名(英文) The molecules related with HTLV-1 infection and the identification of the risk factors for ATL.

研究代表者

野村 創 (Nomura Hajime)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：80253839

研究成果の概要(和文): 臨床検体における HTLV-1 感染細胞関連分子(HBZ、TSLC1)の発現変動を検討したが、キャリア患者の検体においては、TSLC1 の可溶化型分子の増減、あるいは、抗 HBZ 抗体の経時変化は確認できなかった。キャリア患者検体のプロウイルス解析では、欠損型ウイルス保有細胞のクローナルな増加が一部認められた。今後 HTLV-1 感染細胞株が示した細胞特性(形態、細胞間相互作用、蛋白放出)に関連する分子を解析し、得られた情報に基づく新規の発症リスク評価の可能性について更なる検討を行いたい。

研究成果の概要(英文): The expression of HTLV-1 infection-related molecules (TSLC1, HBZ) in the clinical samples were examined. The solubilized form of TSLC1 and anti-HBZ antibody were definitely not detected in the samples of career patients. The analysis of provirus value in career patients demonstrated that clonal increase of cells carried deleted form of provirus were detected. The evaluation of risk factors concerning pathogenic mechanism of ATL would be performed with the new molecular information obtained.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：ウイルス、感染症、生体分子

1. 研究開始当初の背景

(1) 成人 T 細胞白血病(ATL)はヒト T 細胞白血病ウイルス型(HTLV-1)感染細胞が長い潜伏期間を経て形質転換することで発症する。HTLV-1 保有者(キャリア)においては免疫監視機構によりその発症が抑制されていると思われるが、宿主細胞の増殖に關与す

る種々の調節遺伝子がウイルスによる制御を受け、その作用が集積することで、約 5% のキャリアに ATL が引き起こされる。研究は精力的に進められてはいるが、発癌機構の詳細はまだ不明な点が多い。これまで、HTLV-1 ゲノムの pX 領域にコードされる Tax 遺伝子と 3' 側のマイナス鎖にコードされる HBZ

(HTLV-1 bZIP factor) 遺伝子が T 細胞の発癌メカニズムにおける中心的な機能を担うとして注目されている。HBZ 蛋白はウイルス蛋白の機能に抑制的に、HBZ mRNA は感染細胞の増殖に促進的に機能するという非常に珍しい特性を持つ。このような特性より潜伏期から ATL 発症の転換メカニズムにおいて、Tax と HBZ との発現のバランスが注目された。また、ATL 新規マーカー探索の過程で ATL 白血病細胞において TSLC1 遺伝子の高発現が認められた。TSLC1 は固形癌では癌抑制遺伝子に分類されるが、ATL においては TSLC1 の高発現は臓器浸潤能との関連から、「癌遺伝子」としての捉え、ATL 発症への強い関与が考えられる。ATL 発症における危険因子リストと上記の感染関連分子 (Tax、HBZ、TSLC1) 異常との関連は今のところ明確でない。今回の研究計画で、臨床検体における各分子の動態を検討し、危険因子としての特性を明らかにすることで、発症危険群のスクリーニングが可能な臨床検査システムを構築できることを期待した。

(2) ATL 発症においては HTLV-1 感染細胞内の Wnt シグナル伝達系や NF- κ B の活性化などがウイルス由来蛋白の働きにより制御され、選択的増殖につながる可能性がある。キャリア患者由来の T 細胞を用いた培養解析系を確立し、上記の蛋白群が関連する発症の分子メカニズムについての詳細な検討を試みた。

2 . 研究の目的

(1) 当研究室において、HTLV-1 キャリアに関する長期間のコホート研究が研究分担者の岡山により行われており、多くのキャリア検体 (血清、血漿、細胞) が保存されている。それら保存検体および、日常診療で見出されるキャリア患者検体に対して、HTLV-1 感染細胞関連分子の発現 (RNA、蛋白) 変動について検討した。得られた結果について対象者の背景、血液学的解析結果、感染細胞数、発病の有無などのデータと照らして、キャリアからの発症リスクに関して実証を行う。

(2) キャリア由来 T リンパ球の培養系の確立

を試みた。回収した細胞検体において HTLV-1 ウイルス分子 (Tax、HBZ)、T 細胞内機能分子 (TSLC1、NF- κ B、 β -catenin) の発現や活性化の変化など検討した。キャリアの病態の違いによって生じる分子メカニズムの変化について解析を行う。

3 . 研究の方法

(1) ATL 発症危険群の検討：臨床検体の HTLV-1 感染細胞関連分子 (Tax、HBZ、TSLC1) について mRNA・蛋白発現、各分子に対する血清中抗体の検出などをそれぞれ検討した。臨床検体はコホート検体、HTLV-1 キャリア患者および対照として年齢と性別を一致させた健常人ボランティアの検体を用いた。患者血清や感染細胞の抽出物を作成し、それぞれリアルタイム PCR やイムノプロット、免疫沈降法を用いて、各分子の mRNA やタンパクの発現変動や相互作用を測定した。得られた結果と臨床データや他の発症リスク因子との相関について検討し、発症危険群の検索に必要な測定条件やデータの範囲などについての解析を行った。更に蓄積された結果を総合的に評価し、発症危険群の同定に必要な危険因子の確定を行う。

(2) T 細胞培養系の確立：臨床検体 (キャリア血清) から得られる T 細胞の培養を実施し、コンスタンに細胞の維持が可能な条件を検討した。T 細胞内機能タンパク質 (NF- κ B、Wnt、Frizzled、 β -catenin や TSLC-1) の制御機構の解析：細胞抽出物を作成し、リアルタイム PCR やイムノプロット、免疫沈降法を用いて、各分子の mRNA やタンパクの発現変動や相互作用を測定した。

4 . 研究成果

(1) 臨床検体に対する HTLV-1 感染細胞関連分子 (HBZ、TSLC1) の発現変動について検討を行った。

TSLC1 は膜蛋白であるが、その異なった領域に対する数種の抗体を用いて検体における検出を試みた。TSLC1 は細胞膜に貫通した状態で機能するが、血清等の検体中では、膜貫通領域を欠いた分子 (可溶化型分子) とし

て存在すると考えられた。ATL 患者血清においては、可溶化型分子に相当する蛋白を検出できたが、コホート研究のキャリア検体では、可溶化型 TSLC1 発現の明確な増減を検出することができなかった。コホートのキャリア検体はその種類（血清、血漿）や保存期間の違いによる TSLC1 検出の差はやはり認められなかった。検体における TSLC1 蛋白の発現量が検出限界以下であった可能性もあるが、TSLC1 の分子構造における糖鎖修飾の変化によって抗体による検出が阻害されたかもしれない。

HBZ 分子については、検体における蛋白検出に利用できる適切な抗体がなかった。そこで、感染細胞内のウイルス由来 HBZ 蛋白は患者の免疫系が刺激し、抗 HBZ 抗体が産生されるものと考え、キャリア血清における抗 HBZ 抗体の検出を試みた。HBZ 分子の各領域の組換え体を作成し、それを利用した検体における抗体のスクリーニングを実施した。キャリア患者の病態に応じて、HTLV-1 感染細胞由来の HBZ 蛋白発現に変動があれば、その抗体価にも影響があると思われた。しかし、コホート研究における検体の経時変化に伴った抗 HBZ 抗体の変動は検出できなかった。

HTLV-1 プロウイルス定量やクローナリティー解析により、HTLV-1 感染患者の無症候性キャリアにおける欠損型プロウイルスを有する感染細胞の存在様式について検討を行ったところ、一部、欠損プロウイルス保有細胞のクローナルな増加が認められた。欠損ウイルス保有細胞は、免疫系からの回避などの機序により、クローナルに増加していると考えられた。

(2) T 細胞培養系の確立を目指し、臨床検体（キャリア血清）から得られる T 細胞の培養を試みたが、恒常的に検体から細胞の回収、維持を行うことができなかった。そこで、これまでに確立されている HTLV-1 感染細胞株（HUT102、MT2）や ATL 細胞株（ED、S1T）について、T 細胞白血病細胞株（Jurkat、MOLT-4）との比較から、ウイルス感染による細胞特性の変化について検討を行った。

TSLC1 蛋白が検出されたのは、感染細胞株（MT2、S1T）のみであったが、それらの細胞の形態や細胞間相互作用には、他の細胞株とは異なる特殊性があった。このような細胞株の特殊性には細胞膜において機能する分子（細胞間接着分子や受容体など）が関連すると思われるが、その分子に関する情報が発症リスク評価に利用できるか今後検討を続けたい。

細胞株の培養上清中には細胞由来の多数の蛋白が出現するが、ATL 細胞株や感染細胞株の上清の蛋白組成に Jurkat、MOLT-4 との違いが認められた。該当する蛋白については今後の検討課題であるが、感染細胞は宿主であるヒトの免疫系からのストレスに対して、抵抗性を示し、生き延びるためのメカニズムを準備していると思われる。そこで機能する分子と発症リスクとの関連を十分に解析しなければならないと考える。

(3) 今回、検体中の感染関連分子の変動について得られた結果は、他の臨床データに照らして、発症リスク評価に活用できるまでは至っていない。今後、HTLV-1 感染キャリアや ATL 患者検体において著明な変化を示す他の因子の検索を継続し、必要な測定条件や解析法などについての検討を行いたい。ATL 発症メカニズムには未知の領域も多く、コホート研究で蓄積された結果を総合的な評価に活用できる、発症危険群の同定に必要な新規の危険因子についての解析が必要だと考える。上述したような分子がその候補としてふさわしいものとなるよう、検討を進めたい。

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 5 件)

1) Kamihira S, Yamano Y, Iwanaga M, Sasaki D, Satake M, Okayama A, Umeki K, Kubota R, Izumo S, Yamaguchi K, Watanabe T. Intra- and inter-laboratory variability in human T-cell leukemia virus type-1 proviral load quantification using real-time polymerase chain reaction assays: A multi-center study. *Cancer Science*. 2010, 101(11), p. 2361-2367. 査読有.

2) Takenouchi H, Umeki K, Sasaki D, Yamamoto I, Nomura H, Takajo I, Ueno S, Umekita K, Kamihira S, Morishita K, Okayama A. Defective human T-lymphotropic virus type 1 provirus in asymptomatic carriers. Int J Cancer. 2011, 128(6), p. 1335-1343. 査読有.

3) Umeki K, Hisada M, Maloney ME, Hanchard B, Okayama A. Proviral, Loads and Clonal Expansion of HTLV-1 Infected Cells Following Vertical Transmission: A 10-year Follow-up of Children in Jamaica. Intervirology. 2009, 52, p. 115-122. 査読有.

4) Yamamoto I, Takajo I, Umeki K, Morishita K, Hatakeyama K, Kataoka H, Nomura H, Okayama A. Multiple Integrations of Human T-Lymphotropic Virus Type 1 Proviruses in the Engrafted Cells from the Asymptomatic Carriers in NOD/SCID/ c^{null} Mice. Intervirology. 2010, 53, p. 229-239. 査読有.

5) Okayama A. Natural history of human T-lymphotropic virus type 1 infection and immune system imbalances. Inflammation and Regeneration. 2010, 30(2), p. 103-108. 査読有.

〔学会発表〕(計 9 件)

1) 上野史朗, 梅木一美, 野村創, 山本成郎, 竹之内博之, 高城一郎, 岡山昭彦. HTLV-1 無症候性キャリアの異なる領域のプロウイルス量に基づいた感染経路の同定. 第 69 回日本癌学会学術総会. 2010年9月22日発表, 大阪府大阪市, 大阪インターナショナルコンベンションセンター.

2) 梅木一美, 竹ノ内博之, 山本成郎, 岡山昭彦, 佐々木大介, 上平憲. 無症候性キャリアにおける欠損型HTLV-1 プロウイルス. 第 57 回日本臨床検査医学会学術集会. 一般演題(ポスター), 遺伝子感染症(2). 2010年9月11日発表, 東京都新宿区, 京王プラザホテル.

3) 山本成郎, 梅木一美, 高城一郎, 岡山昭彦. 末梢血の異常リンパ球の消失、プロウイルス量およびHTLV-1 抗体価の著明な低下を認めたATLの解析. 第 56 回日本臨床検査医学会学術集会. 2009年8月27日発表, 北海道札幌市, 札幌コンベンションセンター.

4) 高城一郎, 山本成郎, 梅木一美, 久保和

義, 宮内俊一, 梅北邦彦, 上野史朗, 甲斐泰文, 長友安弘, 岡山昭彦. HTLV-1 キャリアにみられる欠損プロウイルスの多様性. 第 83 回日本感染症学会総会・学術講演会. 2009年4月23日発表, 東京都新宿区, 京王プラザホテル.

5) 梅木一美, 竹之内博之, 山本成郎, 釈迦野忍, 高濱由香, 岡山昭彦. HTLV-1 キャリアにおける欠損プロウイルスの解析. 第 19 回日本臨床化学会九州支部総会. 第 53 回日本臨床検査医学会九州地方会. 2009年2月14日, 福岡県福岡市, エルガーラホール.

6) 高濱由香, 梅木一美, 高見陽一郎, 森下和広, 岡山昭彦. HTLV-1 感染者末梢血単核球におけるCYP1B1 発現. 第 55 回日本臨床検査医学会学術集会. 2008年11月29日発表, 愛知県名古屋市, 名古屋国際会議場.

7) 竹ノ内博之, 梅木一美, 山本成郎, 野村創, 高城一郎, 岡山昭彦. HTLV-1 キャリアにおける欠損型プロウイルス感染細胞の推移. 第 67 回日本癌学会学術総会. 2008年10月29日, 愛知県名古屋市, 名古屋国際会議場.

8) 岡山昭彦. HTLV-1 キャリアの免疫異常. シンポジウム 13「レトロウイルスと炎症・免疫」 第 29 回日本炎症・再生医学会. 2008年7月10日, 東京都千代田区, 都市センターホテル.

9) 山本成郎, 高城一郎, 梅木一美, 岡山昭彦. NOGマウスを用いたHTLV-1 感染の解析. 第 82 回日本感染症学会総会・学術講演会. 2008年4月18日, 島根県松江市, 島根県民会館 サンラポーむらくも.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
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

野村 創 (Nomura Hajime)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号：80253839

(2) 研究分担者

岡山 昭彦 (Okayama Akihiko)
宮崎大学・医学部・教授
研究者番号：70204047

(3) 連携研究者

研究者番号：