

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07670

研究課題名（和文）HTLV-1ウイルスゲノムの不安定性と成人T細胞白血病の臨床検査への応用

研究課題名（英文）Genomic instability of HTLV-1 provirus and application to clinical testing for adult T-cell leukaemia.

研究代表者

倉光 球（Kuramitsu, Madoka）

国立感染症研究所・次世代生物学的製剤研究センター・室長

研究者番号：00566383

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：成人T細胞白血病（ATL）では高頻度にHTLV-1ゲノムの欠失があることが知られ、プロウイルスゲノム欠失検出の臨床検査への応用のため、定量的測定法の開発を検討した。

HTLV-1特異的プライマー・プローブを3セット設計し、デジタルPCR法でmultiplex（3-plex）化してHTLV-1各遺伝子領域の相対比の測定を試みた。臨床検体等の検討の結果proviral load 1.0%以上で、pX領域に対して20%以上の違いの欠失が検出できた。またATLの一部では欠失型が極めて高い割合で検出できた。本研究によりデジタルPCRで、HTLV-1ゲノム欠失を定量的かつ高感度に検出できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成人T細胞白血病（ATL）では、高頻度にHTLV-1ゲノムの欠失があることが知られ、また欠失型のプロウイルスを有するATLでは、完全型と比べて治療成績が異なることが報告されたことから、臨床検査でATL発症者のプロウイルスの欠失を簡便かつ鋭敏に捉えることは、治療戦略の策定にも役立ち重要と考えられる。本研究で開発したデジタルPCR法で、一部のATLでは欠失型プロウイルスが極めて高い割合を占めることを示すことが出来、プロウイルス欠失を定量的かつ高感度に検出できることを示した。臨床検査への応用が可能であることが確認された意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Deletion of the HTLV-1 proviral genome is known to occur at a high rate in adult T-cell leukaemia (ATL). In order to apply the detection of deletion of the proviral genome to clinical testing, the development of a quantitative assay was investigated.

Three sets of HTLV-1-specific primer-probes were designed and multiplexed (3-plex) by digital PCR to measure the relative ratio of HTLV-1 gene regions. The results of the examination of clinical specimens showed that deletions with a difference of more than 20% in the pX region could be detected at a viral load of more than 1.0%. Deletions were also detected in an extremely high proportion of some ATLs. This study shows that digital PCR can quantitatively and sensitively detect HTLV-1 provirus deletions.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HTLV-1 genomic deletion provirus digital PCR Adult T-cell Leukemia

1. 研究開始当初の背景

Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) は、全長約 9 千塩基のレトロウイルスであり、HTLV-1 は宿主の血液細胞 (CD4 陽性 T 細胞) に感染後に宿主ゲノムにウイルスゲノムが挿入され生涯に渡り感染が持続する。HTLV-1 感染者の約 95% は生涯にわたって無症候であるが、残り約 5% の感染者で数十年の潜伏期間の後に成人 T 細胞白血病 (Adult T-cell leukemia、以下 ATL) や HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) などを発症する。特に ATL は予後不良であり、年間約 700 人が発症するといわれる。

HTLV-1 のウイルス遺伝子の発現様式は、プラス鎖から転写されたウイルス RNA から選択的スプライシングにより Gag, Pol, Env などの構造タンパク質や Tax, Rex などのアクセサリタンパク質が発現するが、一方でマイナス鎖からも HBZ が発現する。このうち Tax と HBZ は、それぞれ単独で細胞を腫瘍化できることがトランスジェニックマウスモデル等で明らかにされている。

ATL 発症メカニズムは、Tax と HBZ の機能と宿主細胞の遺伝子変異の蓄積によって細胞の癌化が進み、様々な理由で Tax の機能が失われて最終的に HBZ 優位になることで癌化が加速すると考えられる。しかしながら、臨床検査においてこの現象を捕らえることは極めて難しく、HBZ の優位性を検出する何らかのマーカーの存在が必要である。

そこで、ATL の診断マーカーの開発のため、ATL での HTLV-1 ゲノムの特徴について、最も高頻度で生じる HTLV-1 ゲノム欠失変異に着目し、無症候者 (献血 HTLV-1 陽性検体) を対象に、40 セットの高性能 HTLV-1 primer (multiple primer) セットを独自に開発し、HTLV-1 ゲノム内の 40 か所の詳細なコピー数の差を、無症候者を対象に大規模に解析することで HTLV-1 ゲノム欠失を同定した。その結果、驚くことに僅か 2% だけが欠失ウイルスを保有することを見出し、無症候者の HTLV-1 ゲノムは欠失に対して極めて安定であるとの知見を得た。この結果から ATL では約半数で HTLV-1 ゲノム欠失し、無症候者では欠失は極めて稀であるという、ATL 発症と未発症で HTLV-1 のゲノム不安定性に対して明確に相反する事象が明らかになり“HTLV-1 ゲノムの欠失は、ATL 発症への強力なドライバー変異であり、また同時に半数の ATL の発症マーカーとなり得る”と考えた。HBZ 優位の状態を欠失ウイルスの検出で示すことができれば、臨床検査にも導入可能な検査法が開発できると考えた。

2. 研究の目的

ATL に HTLV-1 ゲノムの欠失が高頻度で存在することがよく知られている。これまでは欠失により HTLV-1 Env や Tax など免疫原性の高い因子が消失することで感染細胞が宿主免疫から逃れ易くなるため、欠失型 HTLV-1 の出現は、ATL 発症までの長期潜伏期間において宿主の免疫の選択圧によって引き起こされるイベントの一つと考えられた。しかし申請者は独自の無症候者の大規模解析で、無症候者に欠失がほぼ存在しないことを発見し、欠失型 HTLV-1 が単に残り易いというよりも、HTLV-1 のゲノム欠失が ATL 発症への極めて強力なドライバー変異であると可能性を考案した。つまり欠失が生じた無症候者は、急速に ATL に進む可能性があり、HTLV-1 ゲノム欠失の検出は、ATL 発症を早期に見つけるための重要なマーカーに成り得ると考えられた。特に興味深いことにウイルスゲノムを欠失の検出することは、臨床的にも PCR 等によって実施可能な事象であり、本研究の目的の ATL 診断マーカーとしての HTLV-1 ゲノム欠失検出法の開発は、ATL の臨床検査上の意義が大きいと考えられる。

3. 研究の方法

(1) 臨床検査用の 3-plex digital PCR の開発

HTLV-1 ゲノムに対する 3 セットの高性能 primer-probe を使い、HTLV-1 ゲノムの 4 か所 (5'LTR, 3'LTR, pol, pX, 5'LTR と 3'LTR の Primer-probe は同じ配列) をターゲットとして、それぞれ異なる色素 (FAM, VIC, NED) を設定し、3-plex デジタル PCR 化した系を構築し、QIAcuity digital PCR 機器で測

定する。HTLV-1 プラスミドおよび合成オリゴ DNA を用いて、既知濃度検体を作製し、測定値を元に、pX 領域に対する LTR および pol 領域の比を算出し、分離可能な欠失の割合%を評価した。

(2) AC および ATL における欠失型プロウイルスの検出

AC の末梢血を用いて、検出可能な PVL および欠失型プロウイルスの割合について解析した。また ATL 検体についても同様に、PVL および欠失型プロウイルスを解析し、AC と ATL を分ける基準について検討した。

4. 研究成果

HTLV-1 ゲノムの 4 カ所 (5'LTR, 3'LTR, pol, pX) をターゲットとするデジタル PCR (3-plex) にて HTLV-1 各遺伝子領域の相対比を測定した。臨床検体で安定して検出できる proviral load を評価した結果、HTLV-1 感染細胞が末梢血単核球中に約 1.0% 以上含まれるとデジタル PCR で欠失を定量検出できた。合成オリゴ DNA により分離可能なコピー数の比を求めたところ、pX 領域に対して 20% 以上の違いがあれば、ターゲット領域の定量結果の比の有意な違いとして欠失を検出できた。

HTLV-1 陽性者の PVL 1% 以上の AC および ATL 検体においても欠失解析を行ったところ AC でも ATL でも欠失型プロウイルスがそれぞれ一定の割合で検出された。AC でもある程度の割合で、末梢血中に低い割合で欠失型が存在する場合があることが明らかになり、これまで qPCR では観られなかった微細な違いも検出できることが明らかになった。また、このことから AC で欠失型の存在割合の閾値の設定が可能であると考えられた。また、一部の ATL では末梢血中に欠失型プロウイルスが極めて高い割合を占めて存在することを示す結果が得られた。これらのことからデジタル PCR を用いることで、AC および ATL におけるプロウイルス欠失を定量的かつ高感度に検出できることを示し、HTLV-1 感染におけるプロウイルス欠失の実態を評価できた。AC で基準を作成することで、ATL の欠失型プロウイルス保有者を検出することができ、臨床検査への応用が可能であることが確認された。

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 2件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nomoto Hidetoshi, Kutsuna Satoshi, Okuma Kazu, Kuramitsu Madoka, Tezuka Kenta, Ikebe Emi, Saito Sho, Kinoshita Noriko, Terada Mari, Endo Mio, Suzuki Tetsuya, Miyazato Yusuke, Nakamoto Takato, Inada Makoto, Hamaguchi Isao, Ohmagari Norio	4. 巻 27
2. 論文標題 No SARS-CoV-2 RNA detected in the convalescent plasma of COVID-19 patients with different disease severity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 653 ~ 655
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2021.01.004	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 該当する

1. 著者名 Kuramitsu Madoka, Okuma Kazu, Horiya Madoka, Sekizuka Tsuyoshi, Kaneko Noriaki, Saito Ema, Sokunaga Jun, Kuroda Makoto, Hamaguchi Isao	4. 巻 287
2. 論文標題 First case of molecularly identified and genetically characterized human T-cell leukemia virus type 2 infection in a pregnant woman in non-endemic Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virological Methods	6. 最初と最後の頁 114005 ~ 114005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jviromet.2020.114005	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 該当する

1. 著者名 Okuma Kazu, Kuramitsu Madoka, et al.	4. 巻 17
2. 論文標題 Establishment of a novel diagnostic test algorithm for human T-cell leukemia virus type 1 infection with line immunoassay replacement of western blotting: a collaborative study for performance evaluation of diagnostic assays in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Retrovirology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12977-020-00534-0	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 Ikebe Emi, Matsuoka Sahoko, Tezuka Kenta, Kuramitsu Madoka, Okuma Kazu, Nakashima Makoto, Kobayashi Seiichiro, Makiyama Junya, Yamagishi Makoto, Oyadomari Seiichi, Uchimarui Kaoru, Hamaguchi Isao	4. 巻 4
2. 論文標題 Activation of PERK-ATF4-CHOP pathway as a novel therapeutic approach for efficient elimination of HTLV-1?infected cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 1845 ~ 1858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2019001139	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 Murata Megumi, Yasunaga Jun-ichirou, Washizaki Ayaka, Seki Yohei, Kuramitsu Madoka, Tan Wei Keat, Hu Anna, Okuma Kazu, Hamaguchi Isao, Mizukami Takuo, Matsuoka Masao, Akari Hirofumi	4. 巻 17
2. 論文標題 Frequent horizontal and mother-to-child transmission may contribute to high prevalence of STLV-1 infection in Japanese macaques	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Retrovirology	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12977-020-00525-1	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 Tezuka Kenta, Fuchi Naoki, Okuma Kazu, Tsukiyama Takashi, Miura Shoko, Hasegawa Yuri, Nagata Ai, Komatsu Nahoko, Hasegawa Hiroo, Sasaki Daisuke, Sasaki Eita, Mizukami Takuo, Kuramitsu Madoka, Matsuoka Sahoko, Yanagihara Katsunori, Miura Kiyonori, Hamaguchi Isao	4. 巻 130
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 Journal of Clinical Investigation	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, Horiya Madoka, Sekizuka Tsuyoshi, Kaneko Noriaki, Saito Ema, Sokunaga Jun, Kuroda Makoto, Hamaguchi Isao	4. 巻 287
2. 論文標題 First case of molecularly identified and genetically characterized human T-cell leukemia virus type 2 infection in a pregnant woman in non-endemic Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virological Methods	6. 最初と最後の頁 114005~114005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jviromet.2020.114005	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 Saito Masumichi, Hasegawa Hiroo, Yamauchi Shunsuke, Nakagawa So, Sasaki Daisuke, Nao Naganori, Tanio Michikazu, Wada Yusaku, Matsudaira Takahiro, Momose Haruka, Kuramitsu Madoka, 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 Momose Haruka, Murayama Asako, Yamada Norie, Matsubayashi Keiji, Matsuoka Sahoko, Ikebe Emi, Kuramitsu Madoka, Muramatsu Masamichi, Kato Takanobu, Hamaguchi Isao	4. 巻 20
2. 論文標題 Performance evaluation of in vitro diagnostic kits for hepatitis B virus infection using the regional reference panel of Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Virology Journal	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) 10.1186/s12985-023-02054-7	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 Hasegawa Atsuhiko, Murata Megumi, Fujikawa Tomoka, Katagiri Kuniko, Nagano Yoshiko, Masuda Takao, Kuramitsu Madoka, Nakajima Shinsuke, Fujisawa Jun-ichi, Okuma Kazu, Grover Poonam, Kidiga Maureen, Akari Hirofumi, Kannagi Mari	4. 巻 19
2. 論文標題 Vaccination with short-term-cultured autologous PBMCs efficiently activated STLV-1-specific CTLs in naturally STLV-1-infected Japanese monkeys with impaired CTL responses	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 1011104 ~ 1011104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1011104	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 Wada Yusaku, Sato Tomoo, Hasegawa Hiroo, Matsudaira Takahiro, Nao Naganori, Coler-Reilly Ariella L. G., Tasaka Tomohiko, Yamauchi Shunsuke, Okagawa Tomohiro, Momose Haruka, Tanio Michikazu, Kuramitsu Madoka, et al.	4. 巻 5
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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Koh Nagata, Kenta Tezuka, Madoka Kuramitsu, Naoki Fuchi, Yuri Hasegawa, Kiyonori Miura, Isao Hamaguchi
2. 発表標題 Elucidation of the mechanism of transplacental and horizontal HTLV-1 transmission using a novel cell-free infection system
3. 学会等名 日本産科婦人科学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 倉光球、石塚賢治、久保田龍二、佐藤知雄、山野嘉久、橋倉悠輝、梅北邦彦、野坂生郷、長谷川寛雄、三浦清徳、宇都宮與、高起良、相良康子、蕎麦田理英子、佐竹正博、浜口功
2. 発表標題 イムノクロマト法による新規HTLV-1抗体検査法の性能評価 多施設共同研究
3. 学会等名 第8回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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