

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：17201
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2020～2022
課題番号：20K07700
研究課題名(和文) マルチプレックスRT-PCR法による成人T細胞白血病の病期進展リスク評価法の開発

研究課題名(英文) Development of a multiplex RT-PCR method to assess the risk of stage progression in adult T-cell leukemia/lymphoma

研究代表者
中村 秀明(Nakamura, Hideaki)
佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：10452616
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトT細胞白血病ウイルスI型(HTLV-1)が引き起こす成人T細胞白血病・リンパ腫(ATL)の増悪リスク評価のための基盤研究を行った。ATL患者検体を用い、ATL細胞が特異的に発現するCADM1を標的に磁気ビーズでCADM1陽性と陰性細胞集団に分離した。両細胞からRNA抽出を行い、RNAシーケンスや複数の登録データベース解析から、CADM1陽性細胞で特異的に発現亢進・低下する未報告の遺伝子群を見出した。qPCR解析で抽出した遺伝子群の特異性が高いことを確認し、遺伝子の発現解析を同時に行うマルチプレックス法を検証した。本研究成果はATL増悪リスク評価法の確立に貢献する重要な知見となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CADM1陽性細胞の増加は成人T細胞白血病・リンパ腫(ATL)発症に関わることが報告されている。同細胞をモニターリングすることはATLの病態評価において重要である。CADM1陽性細胞で特異的に発現亢進・低下する未報告の遺伝子群を見出したことはATLの増悪リスク評価法の確立において重要な知見となる。また、磁気ビーズを用いることで簡単に細胞集団の分離が可能であることを示したことは今後の研究発展につながり、学術的意義が高い。ATLの予後は未だ不良であり、本研究成果を基にATL増悪リスク評価を行うことで早期治療が可能となり、ATL患者の予後の改善やQOLを向上することは社会的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：We conducted basic research to assess the progression risk of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) caused by human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1). Using ATL patient samples, CADM1, which is specifically expressed in ATL cells, was targeted and separated into CADM1-positive and negative cell populations using magnetic beads. We extracted RNA from both cells, performed RNA sequence analysis, and analyzed several databases. As a result, we found an unreported group of genes that are specifically up or downregulated in CADM1-positive cells. We confirmed the high specificity of the gene group selected by qPCR analysis and verified the multiplex method that simultaneously analyzes gene expression. The results of this study are important findings that contribute to the establishment of a method for assessing the risk of ATL progression.

研究分野：腫瘍診断および治療学関連

キーワード：HTLV-1 ATL マルチプレックスPCR

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 I 型 (HTLV-1) は主に CD4 陽性 T リンパ球に感染し、感染から数十年を経て HTLV-1 感染者の一部にさまざまな疾患を引き起こす。中でも発症割合が最も高い予後不良な疾患が成人 T 細胞白血病・リンパ腫 (ATL) である。日本は HTLV-1 感染者数が多く、ATL の発症機構や発症危険因子の解明、治療法の開発など多岐にわたる研究が活発に行われてきた。その結果、いくつかの ATL 発症危険因子が明らかとなり、ATL の発症リスクを評価する方法も確立されつつある。しかしながら、ATL 発症後に低悪性度 ATL から治療が効きにくい高悪性度 ATL への進展を早期に見極める手段や臨床病態を評価する精度の高い方法は確立されていない。

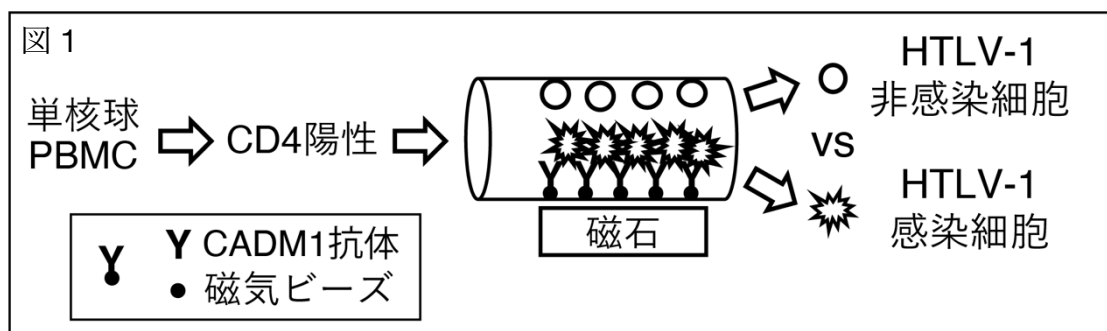
近年、フローサイトメーターを用いた HTLV-1 感染細胞の解析法 (HAS-Flow 法) で、高悪性度 ATL 患者では CD4 陽性 T 細胞の中で細胞表面抗原 CADM1 蛋白質を発現する細胞の割合が高いことが報告された。申請者らは HAS-Flow 法を院内に導入し、経時的な HTLV-1 感染者の解析から多くの知見を得た。そこで、これまでの成果を活かし、HTLV-1 感染細胞特異的に生じる遺伝子の発現変化を捉え、ATL の病態進行を評価する本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では HTLV-1 が主に感染する CD4 陽性 T リンパ球に特化し、磁気ビーズ付きの抗体を用いて簡便に高い精度で HTLV-1 感染細胞と非感染細胞を分離し、HTLV-1 感染細胞特異的に mRNA 発現が変動している遺伝子群を見出す。見出した遺伝子群を効率的に評価できるよう、マルチプレックス PCR 解析に取り組み、これまでより精度の高い ATL の臨床病態評価法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

HTLV-1 感染者の末梢血とフローサイトメーターを用いた解析から ATL の発症リスク評価を行い、リスクの高い感染者を抽出し、抽出された感染者ならびに ATL 発症者は経時的に末梢血単核球細胞 (PBMC) を採取した。採取した PBMC を CD4 分離キット、細胞表面タンパク質 CADM1 を標的とした磁気ビーズ付きの抗体、マグネットスタンドを用い、図 1 のように、PBMC 中の CD4 陽性細胞を CADM1 陽性 (HTLV-1 感染細胞)、CADM1 陰性の細胞集団 (HTLV-1 非感染細胞) に分離した。得られた細胞集団はフローサイトメーターで解析し、目的細胞が得られていることを確認した。

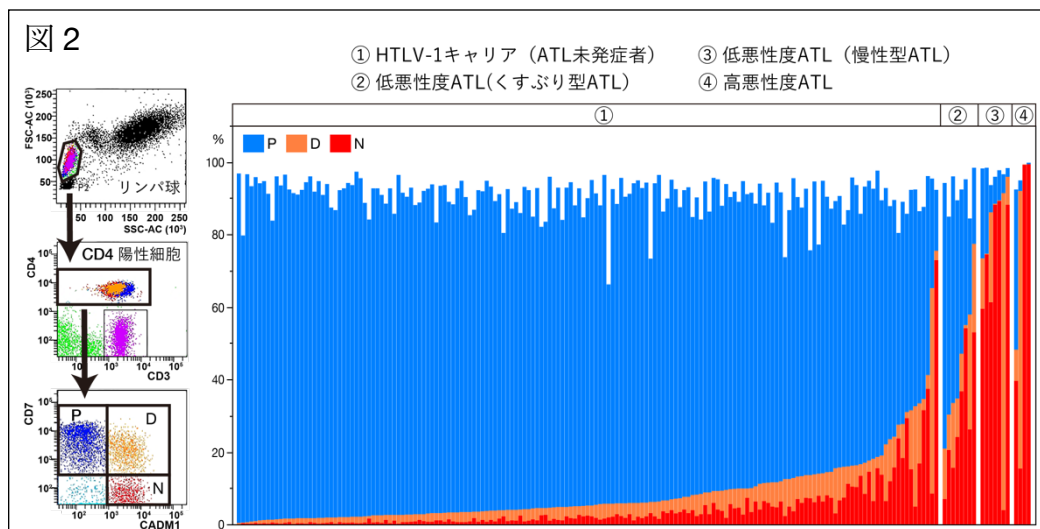


得られた細胞集団から RNA 抽出を行い、RNA シークエンス解析、逆転写反応による cDNA 合成後に qPCR 解析を行った。qPCR 解析をはじめる前に、既報のデータベース、RNA シークエンス解析結果をもとに ATL で mRNA の発現亢進・低下傾向であった遺伝子を抽出し、それぞれの遺伝子のプライマー、プローブを設計した。qPCR 解析の結果、HTLV-1 感染細胞で特異的に発現の変動を認めた遺伝子群に対し、qPCR を同時に行うマルチプレックス PCR 解析を試みた。

4. 研究成果

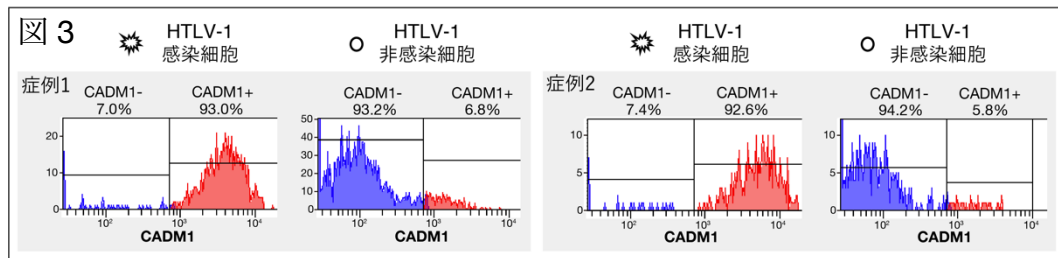
1) 佐賀大学病院に来院し、研究への同意が得られた HTLV-1 感染者の末梢血、フローサイトメーターを用いて HAS-Flow 解析を行なった。

図 2 左のようにフローサイトメーターで末梢血中のリンパ球を絞り込み（ゲーティング）、次に CD4 陽性細胞をゲーティングし、最後に CD4 陽性細胞集団を CD7、CADM1 の発現状態から 3 つの分画（P, D, N）に分類し、D 分画（CD7 弱陽性、CADM1 陽性）、N 分画（CD7 陰性、CADM1 陽性）に HTLV-1 感染細胞が高率に含まれる。年間で約 200 件の解析を行い、患者の初回来院時の解析結果を図 2 右に示した。ATL を発症していない HTLV-1 感染者（HTLV-1 キャリア）の中でも D, N 分画を多く含む症例があり、経過観察中に ATL を発症した症例を認めた。低悪性度 ATL であるくすぶり型、慢性型 ATL の症例はこれまでの報告と同様に病態の進展とともに D, N 分画割合が増加する傾向を示し、高悪性度 ATL の症例は急性化した後に来院された症例であった。経時的な解析により、HAS-Flow 法は HTLV-1 キャリアの中から ATL を発症するリスクが高い人を精度よく検出できることが示唆された。また、HAS-Flow 法で ATL の発症リスクが高いと評価された症例を用い、ATL 発症機構や治療開発などを目的とした複数の論文に貢献した。



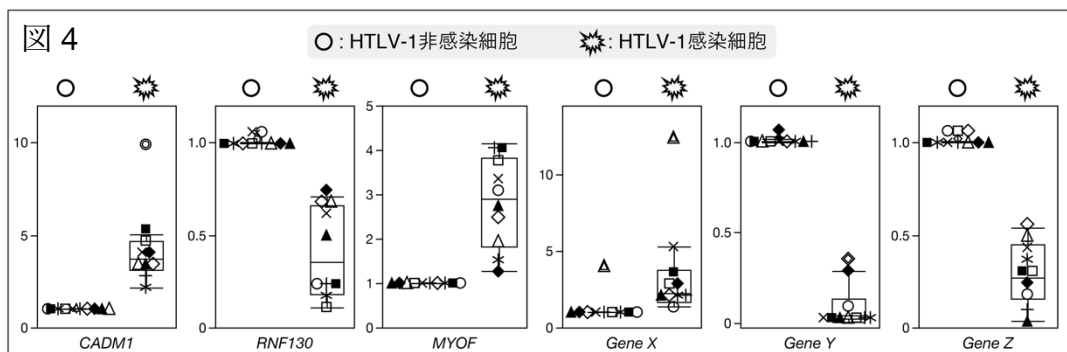
2) ATL 発症者、HAS-Flow 解析で ATL 発症リスクの高い HTLV-1 感染者から得られた PBMC を磁気ビーズ付きの抗体などを用いて細胞分離を行なった。はじめに CD4 分離キットで PBMC から CD4 陽性の細胞集団を集め、次に ATL 細胞で発現の高い CADM1 に対する磁気ビーズ付き CADM1 抗体で細胞を分離した。その結果、CD4 陽性で CADM1 陽性の細胞（HTLV-1 感染細胞）と CADM1 陰性の細胞（HTLV-1 非感染細胞）が得られた。本研究で用いた

磁気ビーズによる細胞分離の精度を確認するため、フローサイトメーターを用いて得られた各々の細胞解析を行なった。その結果、HTLV-1 感染細胞では 90%以上で CADM1 発現が高く、HTLV-1 非感染細胞では 90%以上で CADM1 発現が低かった (図 3)。これより、磁気ビーズを用いた細胞分離法は精度高く細胞の分離が行えたことが示され、この方法を用い 35 例の検体の細胞分離を行い、次の解析まで得られた細胞を冷凍保存した。



- 3) 磁気ビーズで分離した細胞から RNA を抽出し、逆転写反応で cDNA 合成を行なった。また、HAS-Flow 解析で CADM1 細胞割合が高いものと低いもの 1 症例ずつは RNA シークエンス解析を行なった。発現解析に着手する前に、GEO データベースに登録されている HTLV-1 感染者検体の発現データを抽出。ATL 未発症者と発症者の比較を行い、ATL 発症者で特異的に発現が亢進または低下している遺伝子の探索を行った。更に CADM1 細胞割合の違いが大きい検体を用いた RNA シークエンス解析結果を加え、ATL 発症者で未発症者に比べ 2 倍以上に亢進または低下した遺伝子を抽出し、既報の CADM1, RNF130 の qPCR 解析用プライマー、プローブの設計を行なった。また、未報告の遺伝子についても同様の設計を行い、合成した cDNA、設計したプライマー、プローブを用い、qPCR 解析を行なった。

図 4 に qPCR 解析結果の一部を示した。細胞分離に用いた CADM1 の mRNA レベルは ATL 細胞で亢進が報告されており、同様に HTLV-1 非感染細胞に比べ HTLV-1 感染細胞で発現の亢進が確認された。ATL 細胞で発現の低下が報告されている RNF130 は発現低下が確認された。最近報告された MYOF、未報告の Gene X は HTLV-1 感染細胞で発現亢進を、Gene Y, Gene Z の発現は HTLV-1 感染細胞で著名な減少を認めた。数多くの qPCR 解析の結果、HTLV-1 感染細胞で発現亢進または低下を認めたこれまでに報告されていない複数の遺伝子を見出した。最後に、より効率的な反応条件を検討する必要があるが、本研究で見出した遺伝子と qPCR の内部標準として用いた ACTB の発現はマルチプレックス PCR 解析が可能であった。



本研究で ATL の病態進展に関わる HTLV-1 感染細胞で遺伝子の発現が亢進あるいは低下する新たな遺伝子を複数見出した。今後は見出した遺伝子群の中でより病態の変化を反映する遺伝子や、HTLV-1 非感染細胞に比べ発現の変化が大きい遺伝子を調べ、その結果の報告に取り組む。また、本研究で得た HTLV-1 感染者のリスク評価や保存検体などの有効な利活用を行う。

本研究から得られた成果は、今後の ATL 臨床病態評価法の確立や HTLV-1 関連疾患の研究発展の基盤となり、ATL 患者の予後改善や QOL 向上に貢献する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hiroo Katsuya, Hideaki Nakamura, Aya Maeda, Keitaro Ishii, Toshiaki Nagaie, Haruhiko Sano, Haruna Sano, Hidekazu Itamura, Sho Okamoto, Toshihiko Ando, Toshiki Watanabe, Kaoru Uchimar, Yorifumi Satou, Eisaburo Sueoka, Shinya Kimura	4. 巻 -
2. 論文標題 HTLV-1 cell-free DNA in plasma as a potential biomarker in HTLV-1 carriers and adult T-cell leukemia-lymphoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eJHaem	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） なし	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 BJY Tan, K Sugata, O Reda, M Matsuo, K Uchiyama, P Miyazato, V Hahaut, M Yamagishi, K Uchimar, Y Suzuki, T Ueno, H Suzushima, H Katsuya, M Tokunaga, Y Uchiyama, H Nakamura, E Sueoka, A Utsunomiya, M Ono, Y Sato	4. 巻 131
2. 論文標題 HTLV-1 infection promotes excessive T cell activation and transformation into adult T cell leukemia/lymphoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 e150472
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/JCI150472	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 Watanabe, T., Yamashita, S., Ureshino, H., Kamachi, K., Kurahashi, Y., Fukuda-Kurahashi, Y., Yoshida, N., Hattori, N., Nakamura, H., Sato, A., Kawaguchi, A., Sueoka-Aragane, N., Kojima, K., Okada, S., Ushijima, T., Kimura, S., & Sueoka, E.	4. 巻 136(7)
2. 論文標題 Targeting aberrant DNA hypermethylation as a driver of ATL leukemogenesis by using the new oral demethylating agent OR-2100.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 871-884
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/blood.2019003084	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 Kurahashi Yuki, Watanabe Tatsuro, Yamamoto Yuta, Ureshino Hiroshi, Kamachi Kazuharu, Yoshida-Sakai Nao, Fukuda-Kurahashi Yuki, Yamashita Satoshi, Hattori Naoko, Nakamura Hideaki, Kawaguchi Atsushi, Ushijima Toshikazu, Sueoka Eisaburo, Kimura Shinya	4. 巻 7
2. 論文標題 Dual targeting of aberrant DNA and histone methylation synergistically suppresses tumor cell growth in ATL	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 1545 ~ 1559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2022008362	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 Nakamura Hideaki, Sekine Hiroki, Kato Hiroyuki, Masai Hisao, Gradin Katarina, Poellinger Lorenz	4. 巻 298
2. 論文標題 Hypoxia-inducible factor-1 and poly [ADP ribose] polymerase 1 cooperatively regulate Notch3 expression under hypoxia via a noncanonical mechanism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102137 ~ 102137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102137	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

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中村 秀明、末岡 榮三朗
2. 発表標題 フローサイトメーターを用いた解析(HAS-Flow)によるHTLV-1感染者の臨床経過モニタリング
3. 学会等名 第69回日本臨床検査医学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊 達郎、嬉野 博志、中村 秀明、末岡 榮三朗、木村 晋也
2. 発表標題 Biological significance of pyrimidine metabolism enzyme UCK2 of HTLV-1-infected cells in ATL leukemogenesis
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊 達郎、吉田 坂井 奈央、山本 雄大、嬉野 博志、蒲池 和晴、倉橋 祐樹、川副 和紀、倉橋 佑紀、中村 秀明、岡田 誠治、末岡 榮三朗、木村 晋也
2. 発表標題 ATL 発がんにおけるピリミジンヌクレオチド代謝酵素 UCK2 の関与
3. 学会等名 第8回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村 秀明、佐藤 明美、渡邊 達郎、末岡 榮三朗
2. 発表標題 キャリアおよび indolent ATL の臨床経過モニタリングにおける HAS-Flow 法の意義
3. 学会等名 第7回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 タン ベンジー ジェック ヤン、菅田 謙治、Omnia Reda、松尾 美沙希、宮里 パオラ、Vincent Hahaut、鈴島 仁、勝屋 弘雄、徳永 雅仁、内山 良一、中村 秀明、末岡 榮三朗、宇都宮 與、小野 昌弘、佐藤 賢文
2. 発表標題 HTLV-1 hijacks T-cell activation mechanisms for leukemic transformation as revealed by scRNA-seq
3. 学会等名 第7回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊達郎、吉田奈央、山本雄大、嬉野博志、蒲池和晴、倉橋祐樹、倉橋佑紀、中村秀明、服部奈緒子、山下聡、岡田 誠治、牛島俊和、末岡榮三朗、木村晋也
2. 発表標題 メチオニン代謝を介した HTLV-1 感染細胞のエピゲノム調節
3. 学会等名 第7回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 倉橋 祐樹, 吉田 奈央, 嬉野 博志, 蒲池 和晴, 山本 雄大, 中村 秀明, 渡邊 達郎, 末岡 榮三朗, 木村 晋也
2. 発表標題 ATL に対する DNA 脱メチル化剤と EZH2 阻害剤の併用効果とその標的因子 DUSP5 の機能解析
3. 学会等名 第7回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊 達郎、嬉野 博志、中村 秀明、末岡 榮三朗、木村 晋也
2. 発表標題 成人 T 細胞白血病/リンパ腫におけるメチオニンを介したエピジェネティクス制御
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊達郎、吉田 奈央、山本 雄大、蒲池和晴、倉橋祐樹、倉橋佑紀、嬉野博志、中村秀明、末岡榮三朗、木村晋也
2. 発表標題 成人 T 細胞白血病/リンパ腫におけるメチオニン代謝改変を介したエピジェネティクス異常
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasushi Kubota, Haruhiko Sano, Kyosuke Yamaguchi, Hideaki Nakamura, Keita Kai, Kesisuke Kidoguchi, Kana Kusaba, Haruna Kizuka-Sano, Masako Yokoo, Toshihiko Ando, Eisaburo Sueoka, Shinya Kimura
2. 発表標題 胸腺過形成, 低ガンマグロブリン血症を有する成人 T 細胞白血病患者において異なる発症形式を示した赤芽球癆
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
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
研究分担者	末岡 榮三朗 (Sueoka Eizaburo) (00270603)	佐賀大学・医学部・教授 (17201)	
研究分担者	佐藤 明美 (Sato Akemi) (20568357)	佐賀大学・医学部・助教 (17201)	
研究分担者	勝屋 弘雄 (Katsuya Hiroo) (80632041)	佐賀大学・医学部・講師 (17201)	

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