

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791282

研究課題名(和文) ATL 既感染者に生じた菌状息肉症と、皮膚型 ATL の鑑別アルゴリズムの開発

研究課題名(英文) The histological algorithm to discriminate mycosis fungoides from cutaneous ATL in HTLV1 carrier

研究代表者

平良 清人 (Taira, Kiyohito)

琉球大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90404566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円、(間接経費) 960,000 円

研究成果の概要(和文)：HTLV1 既感染者に生じた菌状息肉症と皮膚型 ATL の病理学的な鑑別を目標とした。T 細胞膜抗原、FoxP3、RNA 編集酵素群、CXCR4 等ケモカイン受容体群などの、ATL の発癌機序に直接関係のない蛋白の発現では、両者の鑑別は困難であると結論した。

そこで各リンパ腫に必須のマイクロRNA を発見し、その下流に制御される蛋白群の解析を目指した。皮膚型 ATL には microRNA -146b, -5p, -451 を、菌状息肉症には -20a, 29a, 30b, 31, 181a, 222, 320a を選別した。抗 CCR4 抗体による治療前後の発現を比較することで、より特異的なマイクロRNA の選別を進めている。

研究成果の概要(英文)：We aimed to establish the pathological algorithm to discriminate mycosis fungoides from cutaneous ATL in HTLV1 carrier. The differentiation by the expression of proteins such as FoxP3, RNA-editing enzymes, CXCR4 those are directly unrelated to carcinogenic mechanisms of ATL, were quite difficult and unreliable. Then, we tried to discover the indispensable specific microRNA to each lymphoma, and aimed at the analysis of the proteins controlled in the downstream in an early-phase lesion.

To cutaneous ATL, I sorted out microRNA-146b, -5p, and -451, and -20a, 29a, 30b, 31, 181a, 222, 320a to mycosis fungoides, respectively. By comparing the expressions of microRNAs before and behind the treatment by anti-CCR4 antibody, we are also advancing sorting of the more specific microRNAs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：成人T細胞リンパ腫 菌状息肉症 ATL HTLV-1 皮膚T細胞リンパ腫 遺伝子再構成 レトロウイルス

1. 研究開始当初の背景

数世代前までの歴史的・地理的な背景から、沖縄県、島嶼部では日本国内や世界でも稀な腫瘍が、地域性に多発する。古典型のカポシ肉腫は宮古島出身者に頻発し、血管肉腫は沖縄県全体に多発する。背部弾性線維腫という特殊な家族性の間葉系良性腫瘍の発症もフィンランドともに沖縄県西方諸島に集中する。

これら間葉系の腫瘍以外にも、皮膚リンパ腫型の成人T細胞リンパ腫（ATL）患者は西日本の中でも特に沖縄県には高率に発症する。全世界・日本全国に散らばるこの成人T細胞白血病ウイルス（HTLV-1）感染者であるが、沖縄・八重山地方では、特にその感染頻度が高く、沖縄県内の特定地域出身の健常な中高齢者では、その感染率、即ち、抗HTLV-1抗体陽性者、ウイルスキャリアーは30%以上にも達する。その感染者中より毎年、少数の割合ではあるが急性白血病、リンパ腫、慢性型、くすぶり型、あるいは皮膚型の成人T細胞リンパ腫の各型として発症する。

このATLは、他のT細胞系リンパ腫と同様に、皮膚、特に表皮への親和性が強いことが知られている。そのため、しばしば皮膚型のATLとしての症状を呈する。HTLV-1により引き起こされた皮膚型のATLは、他のATLによる病型と同様に、往々にして急速に浸潤性の紅斑より腫瘤の形成、腫瘍、白血化へ至り、急速で非可逆的な進行を取ることが多い。さらに従来の白血病・リンパ腫・菌状息肉症などに対する治療・化学療法メニューがしばしば無効であり抵抗性を示す。現状では、皮膚型のATLの治療には、電子線を含めた皮膚への放射線療法から、骨髄移植による治療を選択する症例が多いが、骨髄

移植の導入に至ることができず、死亡される症例も非常に多い。

一方、皮膚リンパ腫の中には、従来より菌状息肉症とよばれる、非常に経過の長い慢性型の皮膚リンパ腫が存在する。勿論、この菌状息肉症の発症には成人T細胞白血病ウイルス（HTLV-1）の関与はなく、HTLV-1感染者にも非感染者にも同じように、一定の割合で罹患し、その発症は全世界にわたり地域性は見られない。この菌状息肉症に代表される皮膚T細胞リンパ腫は、経過が非常に緩慢で、紫外線治療やステロイド剤の外用などの保存的治療が有効であり、病初期における早急な強力な化学療法の導入は、患者の予後を悪化させる可能性が大きい。

この皮膚型ATLとHTLV-1の関与のない菌状息肉症は、早期の紅斑浸潤期、進行期の腫瘍期、白血化した段階においても、非常に類似した病理的な形態を呈する。即ち、表皮内へのCD4陽性の腫瘍性T細胞の浸潤・増殖によるポトリエの微小膿瘍、わずかに大型化し異型性のあるリンパ球の表皮組織内への浸潤など両者に共通の病理像である。

近年は、皮膚リンパ腫の確定診断の一助として、ATLと菌状息肉症に共通して、T細胞受容体の単クローン性の遺伝子組換えの有無の確認と、ATLとしての証明に末梢血中の抗HTLV-1抗体の有無と、HTLV-1プロウイルスの単クローン性の組み込みを、サザンブロット法にて確認する。サザンブロット法により、単クローン性の組換えが確認されると、炎症性の細胞浸潤ではなく、腫瘍性のT細胞の増殖であると判断する。沖縄などHTLV-1ウイルスの高感染地域以外では、現実的な問題として、この手法を菌状息肉症と皮膚型ATLの鑑別手法として

問題は少ないが、沖縄諸島における高率なHTLV-1ウイルスに対する感染率を勘案すると、臨床的にも必ずしも完全に満足できる手法ではない。即ち、これらHTLV-1既感染者に、通常の菌状息肉症と同様の発がん機序で、HTLV-1ウイルスの発がん機序ではなくT細胞の腫瘍化が生じた際には、上記の単クローン増殖を検出すべくサザンブロット法では違いが現れない。HTLV-1既感染者のCD4陽性T細胞が腫瘍化したのであれば、いずれにせよ血清中のHTLV-1への抗体価は陽性であり、T細胞受容体の遺伝子組換えとHTLV-1プロウイルスの組み込みは単クローン性にサザンブロット法にて確認されてしまう。よってHTLV-1既感染者は全て菌状息肉症であっても、皮膚型のATLであると判断されてしまわれる可能性が、他地域よりも高い。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、成人T細胞白血病ウイルス既感染者に生じた皮膚リンパ腫を、古典的な菌状息肉症か、あるいはHTLV-1の発癌機序に依存性の皮膚型ATLであるのか、臨床現場における簡便な鑑別手法を開発することである。成人T細胞白血病ウイルス既感染者に生じた菌状息肉症と皮膚型ATLという、病理学的には非常に類似するが、その予後や治療法の全く異なる皮膚リンパ腫の混乱による患者の不利益を防ぐことを最終的な目標とした。

本研究により、沖縄地方に多いHTLV-1既感染者に生じた菌状息肉症の患者の治療に福音となる。また全国の保健衛生対策の一環として、成人T細胞白血病ウイルスの垂直感染の防止が、国民的興味・願いとなっている今日の状況に合致した研究目的である。

3. 研究の方法

HTLV-1既感染者（キャリア）に生じたT細胞の腫瘍化が、HTLV-1の発がん機序に依存性の皮膚型のATLであるのか、あるいはHTLV-1ウイルスの感染自体には非依存性な古典的な菌状息肉症に該当するのか、簡便に鑑別可能な腫瘍マーカーを探索する。

AID (Activation-induced deiminase) 蛋白やAPOBEC (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like) 1-4 蛋白群、あるいはFOX P3に代表されるT細胞・制御性T細胞の分化マーカー蛋白などの遺伝子変換酵素、CXCR4 サイトカイン受容体などの候補遺伝子を中心に、患者組織を用いた免疫組織学的な初期解析を行う。

沖縄・八重山地方に代表されるHTLV-1感染の多発地域においては、新生児期の授乳による垂直感染が最多の感染機会であると考えられている。乳児期より数十年後の発がん機序の完了という長き過程は、ピロリ菌やC型肝炎による胃癌や肝臓がんの発症と同様に、AIDやAPOBEC蛋白など遺伝子編集酵素の発現による長年の微細な遺伝子変異の蓄積が、中年期以降のT細胞での発がんにつながると思われる。

HTLV-1既感染者に生じた古典的な菌状息肉症と、皮膚型ATLの鑑別を目的とする。両者は病理学的には、ほぼ同じCD4陽性、CD25陽性のT細胞に生じた、表皮親和性の強い腫瘍である。

HTLV-1依存性であるか、非依存性のT細胞の腫瘍化であるか、大きく異なるその発症機序から、その腫瘍T細胞のプロファイルを行い、細胞表面蛋白の発現の違いを多数の患者組織において探査する。病理学的な完全な鑑別手段が上記の理由で存在しない以上、

病理診断後の臨床経過も、結果的に両者の鑑別する際の非常に重要な必須の観察事項である。

腫瘍化機序を元に、その腫瘍細胞の鑑別を可能とする手法を確立する際、その候補遺伝子・候補蛋白を網羅的に探索する手法としては、最近では腫瘍細胞が発現するRNAのプロファイルをマイクロアレイで横断的に解析し、菌状息肉症と皮膚リンパ腫型のATLを比較する。

4. 研究成果

FoxP3に代表される制御性T細胞マーカー蛋白、AID蛋白、APOBEC1-4蛋白群などmRNA編集酵素群、CXCR4等ケモカイン受容体群や、ATLウイルス由来の転写因子であるHBZを指標に、免疫組織学的な解析を行った。CD25, FoxP3に関しては、大部分の両者に陽性に発現し、OX40は菌状息肉症には発現は乏しいが、皮膚型ATLで半数以下の症例では陰性と臨床鑑別には不十分であった。さらにAID, POBEC蛋白群のmRNAおよび遺伝子改変酵素の発現も両皮膚リンパ腫間に特異的とまでは言い難い結果となり、厳密な差別化の必要な臨床鑑別のアルゴリズムとしては使用が難しいかとの印象を受けた。

ここまでの検討により、発癌機序に直接関係のない蛋白群の発現では、皮膚型ATLあるいは菌状息肉症の患者間の差異や経時的変化あるいは病期による腫瘍細胞の変貌・脱分化により、これらの発現プロファイルが一定せず、特定の蛋白発現を選択しての鑑別は困難であると考えた。また感染細胞と腫瘍細胞の染色強度の違いに、臨床現場で使用可能なほどの強弱は得られなかった。従来のCD膜抗原、腫瘍マーカーによる免疫組織学的な鑑別診断では限界があると最終的には判断し

た。(付図1, 2参照)

図1：皮膚型ATLの病理組織

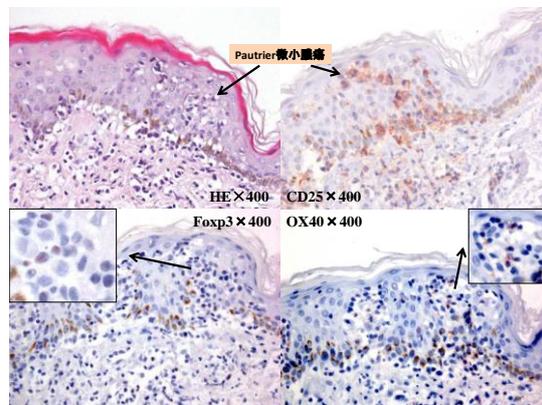
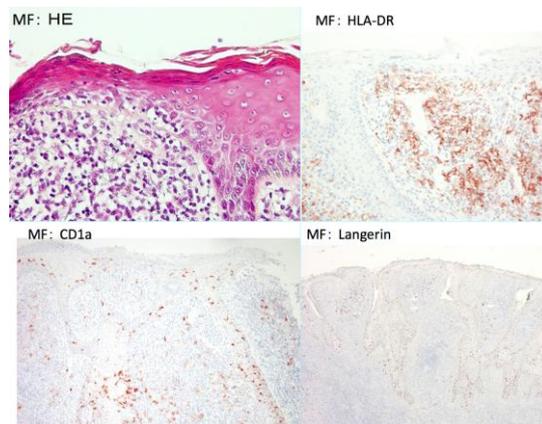


図2：菌状息肉症の病理組織



そこでT細胞の腫瘍化の機序に根ざし、悪性腫瘍として増殖する限り、その発現を欠くことの出来ない因子を、鑑別マーカーとして使用しなければ、完全な鑑別手法として成立しえないと考えるに至り、マイクロRNAを利用したプロファイル化を目指した。各リンパ腫瘍の形成・維持において必須の特異的マイクロRNAを文献上、網羅的に拾い上げ、その下流に制御される蛋白群の発現をも解析することで、初期病変における両皮膚リンパ腫の病理学的な鑑別アルゴリズムの確立を目指した。皮膚型ATLにはmicroRNA-146b, -5p, -451を、菌状息肉症にはmicroRNA-20a, 29a, 30b, 31, 181a, 222, 320aを選別した。

これらマイクロRNAの in situ ハイブリをプローベ毎に条件設定した。さらに本研究課題の遂行中にATLの治療に最近導入された抗CCR4抗体(ポテリジオ)の注射を用いたATL患者の治療前後における、皮膚組織におけるマイクロRNAの発現の差を比較することで、治療前に皮膚型ATLで発現するマイクロRNAの選別を進めている。

これにより皮膚型ATLに特異的な腫瘍化機序に直結する鍵となる疾患特異的なマイクロRNAを決定すると共に、その鍵となるマイクロRNAの下流に支配される蛋白の発現を決定することで、病理学的には鑑別の困難な初期病変における両皮膚リンパ腫の鑑別アルゴリズムの確立をすすめる。さらに両疾患に特異的なマイクロRNAの組み合わせを選択し、マイクロRNAの機能支配プログラムを利用して、この特異的なマイクロRNAの組み合わせにより、皮膚型ATLと菌状息肉症とは違った発現調節を受け、かつT細胞で発現する蛋白の選別を続ける。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計9件)

①myoid typeの隆起性皮膚線維肉腫:仲村 郁心, 小原 あずさ, 平良 清人, 高橋 健造, 上里 博. 皮膚病診療, 査読無, 35, 589-594, 2013.

②感染症症候群(第2版)-症候群から感染性単一疾患までを含めて-[上] 原虫症、寄生虫症 寄生虫症 シラミ症、ダニ症: 平良 清人. 感染症症候群(上), 査読無, 770-773, 別冊, 2013.

③ミクロネシア出身米軍兵に発症したLL型ハンセン病の1例: 仲村郁心, 山口さやか,

荻谷嘉之, 眞鳥繁隆, 平良清人, 山本雄一, 高橋健造, 上里博. 西日本皮膚科, 査読有, 75, 2013, 326-330.

Doi.org/10.2336/nishinihonhifu.75.326

④【旅行皮膚病】〈臨床例〉黒癬 ダーモスコープ所見を踏まえて:大久保優子, 山口さやか, 宮城拓也, 平良清人, 山本雄一, 高橋健造, 上里博. 皮膚病診療, 査読無, 35, 2013, 689-692.

⑤Ono M, Takahashi K, Taira K, Uezato H, Takamura S, Izaki S. Cutaneous leishmaniasis in a Japanese returnee from West Africa successfully treated with liposomal amphotericin B. J Dermatol. 査読有, 38, 2011, 1062-5.

Doi:10.1111/j.1346-8138.2011.01270.x.

⑥Mine Y, Higuchi W, Taira K, Nakasone I, Tateyama M, Yamamoto T, Uezato H, Takahashi K. Nosocomial outbreak of multidrug-resistant USA 300 methicillin-resistant Staphylococcus aureus causing severe furuncles and carbuncles in Japan. J Dermatol. 査読有, 38, 2011, 1167-71.

Doi:10.1111/j.1346-8138.2011.01284.x.

⑦Miyasato H, Yamaguchi S, Taira K, Hosokawa A, Kayo S, Sano A, Uezato H, Takahashi K. Tinea corporis caused by Microsporum gallinae: first clinical case in Japan. J Dermatol. 査読有, 38, 2011, 473-8.

Doi:10.1111/j.1346-8138.2010.01090.x.

⑧Miyazato H, Yamaguchi S, Taira K, Asato

Y, Yamamoto Y, Hagiwara K, Uezato H.
Allergic contact dermatitis due to
diclofenac sodium in eye drops. J Dermatol.
査読有, 38, 2011, 276-9.
Doi: 10.1111/j.1346-8138.2010.00934.x

⑨低用量ステロイドとシクロスポリン併用
が奏効した Hypereosinophilic Syndrome の 1
例: 栗澤 遼子, 山本 雄一, 栗澤 剛, 安里
豊, 平良 清人, 高橋 健造, 上里 博. 西日
本皮膚科, 査読有, 2011 73, 345-349.

[学会発表] (計 29 件)

①崎枝薫、内海大介、平良清人、高橋健造、
上里博：サメハダテナゴダコ（鮫肌手長蛸）
咬傷の 1 例. 日本皮膚科学会第 69 回沖縄地
方会、2014 年 2 月 9 日、那覇市.

②仲村郁心、眞鳥繁隆、平良清人、山本雄一、
高橋健造、上里博：COL1A2-PDGFB 融合遺伝子
をみとめた隆起性皮膚線維肉腫の 1 例. 日
本皮膚科学会第 67 回沖縄地方会、2013 年 7
月 14 日、那覇市.

③仲宗根尚子、平良清人、高橋健造、上里博、
山田智史：アルブチン接触性皮膚炎の 1 例.
日本皮膚科学会第 64 回沖縄地方会、2012 年
11 月 29 日、西原町.

④栗澤剛、苅谷嘉之、眞鳥繁隆、平良清人、
高橋健造、上里博：受傷状況よりクモ膜下出
血を疑い診断した熱傷の 1 例. 日本皮膚科
学会第 63 回日本皮膚科学会、2012 年 7 月 7
日、宮崎市.

⑤平良清人、前里春奈、山本雄一、高橋健造、
上里博、安里哲時：妊娠を契機に発症した
blaschkitis の 1 例、日本皮膚科学第 126 回

徳島地方会、2011 年 12 月 3 日、徳島市

⑥平良清人：血管肉腫と古典型カポジ肉 沖
縄の現状、第 63 回日本皮膚科学会西部支部
学術大会、2011 年 10 月 8 日、宜野湾市.

⑦平良清人：南に多い真菌症 黒癬、第 63
回日本皮膚科学会西部支部学術大会、2011 年
10 月 8 日、宜野湾市

⑧平良清人、仲村郁心、小原あずさ、眞鳥繁
隆、高橋健造、上里博：隆起性皮膚線維肉腫
の 1 例、日本皮膚科学会第 54 回愛媛地方会、
2011 年 9 月 24 日、愛媛市

⑨平良清人、安里豊、高橋健造、上里博：仙
骨部褥瘡を発生母地とした有棘細胞癌の 1 例、
第 13 回日本褥瘡学会学術大会、2011 年 8 月
27 日、福岡市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 0 件)

○ 取得状況 (計 0 件)

[その他] ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平良 清人 (TAIRA KIYOHITO)
琉球大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90404566

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし