

**サブテーマ 1 : ウイルス発がんの機序解明と予防・治療法の創出**  
**小テーマ 1-2: ATL 発症機構の解明と発症前診断及び予防・治療法の開発**  
**b) ATL 発症関連因子群を用いた新規診断法の開発と臨床応用**

**サブテーマリーダー** 鹿児島大学医歯学総合研究科：教授 坪内博仁

**研究従事者** 宮崎大学医学部：教授 森下和広、医員 日高智徳、講師 山下清、助教 中畑新吾、助教 山川哲生、  
 助教 西片一朗、講師 久富木庸子

宮崎県産業支援財団：研究員 高見陽一郎、研究員 石田洋一、研究員 高濱由香、  
 技術スタッフ 濱崎誠

アドテック：部長 小林行治、研究員 福田健太

京都府立医科大学：教授 谷脇雅史

イムナス：研究員 高松尚文、研究員 真鍋香澄

**研究の概要、新規性及び目標**

**①研究の概要**

一般に、がんの進行に伴い、染色体切断などのゲノム構造異常や遺伝子・蛋白質の発現異常が生じる。HTLV-1 感染後 ATL の発症に関わるゲノム異常・遺伝子発現異常を同定するため、SKY 染色体分析、SNP アレイ CGH (ゲノム解析)、遺伝子の網羅的発現解析 (トランスクリプトーム解析)、及び蛋白質の網羅的発現解析 (プロテオーム解析) を行う。同定された異常については、分子生物学的手法で詳細に機能解析し、ATL の発症前診断法の開発を行う。

**②研究の独自性・新規性**

特定の疾患に対し、染色体ゲノム、遺伝子発現、蛋白質発現様式の 3 方面から、同時に解析した例はほとんどない。これらの解析結果を単独で用いることは勿論、組み合わせることで、未知の発症進展因子が見付かり、ATL の発症や病態に関して、新たな知見が得られる可能性が高く、独自性・新規性に富む研究である。また、ATL は南九州に特有の白血病であることを考えると、地域的な側面からも独自性が認められる。

**③研究の目標**

- ・フェーズ I：染色体解析では、ATL 特異的な染色体異常を同定し、その異常領域に存在する遺伝子を検索することで、ATL の発症に関わる遺伝子を探索する。トランスクリプトーム解析とプロテオーム解析では、急性型 ATL において発現の増減が見られる遺伝子・蛋白質を同定し、ATL のマーカー候補とする。
- ・フェーズ II：ATL のマーカー候補を臨床応用し、新規診断法を開発する。特に、血清・血漿による診断が臨床上有用であることから、これらのマーカーを組み合わせ、マルチマーカーによる血清・血漿診断系を構築し、ATL の発症前診断を可能にする。
- ・フェーズ III：開発した診断法について、より多くの症例で有用性を確認する。また、診断法の技術移転や診断キットの販売も含め、事業化を目指す。

**研究の進め方及び進捗状況**

染色体並びにゲノム構造解析として、統合的ゲノム解析手法を駆使することで、3カ所の染色体切断点集中領域を認め、その領域より癌抑制遺伝子候補を同定した。トランスクリプトーム解析として、急性型 ATL 患者において特異的な遺伝子発現遺伝子群を同定、診断マーカー候補を同定した。その中で TSLC1 は診断応用開発を行い、さらなるマルチマーカー診断法の構築を行っている。血清のプロテオーム解析の結果、4種の蛋白質・ペプチドを同定し、C3f はその活性化機構を検討した。このように三方向からのアプローチにより、診断として有用なマーカーを 10 種以上単離できたことで、研究の目的はほぼ達成されたものと考えられる。

**主な成果**

**具体的な成果内容：**

- 1) 急性型 ATL 患者 61 名に対して SKY 法による染色体分析を行い、605 転座点を染色体上に同定した。3カ所の染色体転座点集中領域を同定し、それぞれに TCF8(10p11.2 領域)、GeneX(14q11 領域)、BCL11B(14q32 領域)遺伝子とそのゲノム異常領域より癌抑制遺伝子として同定した。TCF8、GeneX は健常人 CD4+末梢血リンパ球と比較し優位に転写が低下しており、遺伝子発現による診断法として有用であることがわかった。
- 2) 健常人末梢血 CD4 陽性細胞 5 検体、CD4 陽性 CD45O 陽性細胞 3 検体をコントロールとして、急性型 ATL 白血病細胞 8 検体との網羅的遺伝子発現解析を行い、192 遺伝子をマーカー候補として同定した。この中で TSLC1、CCR4、Caveolin-1、PGDS をマーカーとして同定、さらに PTHLH、IL2Ra、TNFSF7 を可溶性血清マーカー候補として同定した。
- 3) TSLC1 においては、ウェスタン法により血中可溶性 TSLC1 を各種 ATL 患者 23 人中 21 人に同定でき、健常人 10 人では陰性であった。HTLV-1 キャリア 13 人中 5 人に陽性であり HTLV-1 高感染細胞数とやや相関が見られた。末梢血中可溶性 TSLC1 たんぱく質を同定する目的で、ELISA 法、イムノクロマト法を開発し、それぞれ、0.3ng/ml の感度で測定可能となった。FACS 解析法により、41 症例の各種 ATL 患者、37 例の HTLV-1 キャリア、10 例の健常人を検討し、末梢血白血病 DNA と CD4+TSLC1+細胞分画が相関することを同定した。さらには CD4+TSLC1+細胞分画に HTLV-1 ゲノム DNA が含まれ、ATL 細胞分画であること、TSLC-1 抗体磁気ビーズで ATL 細胞を分離できることを確認した。
- 4) ATL 血清に対してプロテオーム解析を行い、ATL 特異的なマーカー候補として、細胞増殖・運動制御因子の Thymosin  $\beta$  4、プロテアーゼ阻害剤の一種である Cystatin A、補体関連ペプチド C3f、Fibrinogen- $\alpha$  を同定した。C3f に対してはその活性化機構を検討した。

## 研究成果に関する評価

## 1 国内外における水準との対比

HTLV-1 感染以降に ATL 発症には少なくとも 5 段階の因子が関与すると考えられているが、これまでその因子について明らかになっていなかった。今回行った ATL のゲノム解析で少なくとも 4 因子を同定し、その発症機構を検討していること、Blood、J of virology など一流の雑誌にこれらの結果を発表できており、世界的にも高水準の研究成果を出せたものと考えられる。TSLC1 に関しては、診断的価値が高く、特許の取得ができた。

## 2 実用化に向けた波及効果

本研究で同定された遺伝子・蛋白質・ペプチドは、ATL の発症や病態と密接に関与している可能性が高く、診断・予防・治療法の開発に寄与することが期待される。ATL 診断法として HTLV-1 キャリアの中で ATL 発症する患者を絞り込むことが出来れば、ATL 発症前に抗がん剤による予防的治療や、発症予防法として抗ウイルス剤を用いるなどの対処が考えられる。このことにより発症後の治療がほとんど不可なのに対して、かなりの治療効果が望まれる。そのために発症に繋がるマーカーの同定は不可欠であり、その第一候補として TSLC1 抗原がある。実際に TSLC1 抗体を用いた診断系の構築によりアドテック社によりイムノクロマト法による診断キットの開発を行っている。また抗体研究所において ATL 細胞の表面マーカーとして FACS 解析のための蛍光ラベル抗体の作成や、細胞分離のための磁気ビーズの開発も進んでおり、さらなる実用化が見込まれる。

## 残された課題と対応方針について

ATL のゲノム異常に基づく、HTLV-1 キャリアのゲノム診断法の開発について、HTLV-1 キャリア、各種 ATL 患者検体の収集と HTLV-1 感染細胞の効率的な分離法の開発が重要である。今後引き続き TSLC1 抗体を用いた磁気ビーズ法、並びにセルソーターを用いた分離法を開発を行う。TSLC1 のイムノクロマト法による診断キット作成について、バックグラウンドの改善がありアドテック社においてその開発が進行中である。さらには、診断法としてはマルチマーカーとして診断効率を上げることが必要であり、これまでに同定した他のマーカー候補についても同時に診断法として開発を進める必要があり、アドテック社、抗体研究所との共同研究により検討を進めている。

	JST 負担分 (千円)							地域負担分 (千円)							合計
	15年度	16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	小計	15年度	16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	小計	
人件費	1,070	6,223	8,235	3,616	3,622	2,187	24,953	0	1,950	1,950	1,100	2,200	2,200	9,400	34,353
設備費	4,224	18,109	22,340	16,078	16,895	12,058	89,704	0	0	0	0	0	0	0	89,704
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)	3,200	13,077	11,820	18,674	10,615	2,200	59,586	0	3,000	2,000	1,500	2,500	1,500	10,500	70,086
旅費	73	219	216	184	326	330	1,348	0	200	200	0	300	300	1,000	2,348
その他	27	46	32	304	329	170	908	0	0	0	200	0	0	200	1,108
小計	8,567	37,674	42,643	38,856	31,787	16,945	176,499	0	5,150	4,150	2,800	5,000	4,000	21,100	197,599

代表的な設備名と仕様 [既存 (事業開始前) の設備含む]

JST 負担による設備: プロテインチップシステム (Cipergen Biosystems, ProteinChip)、プロテオーム解析装置 (Bruker Daltonics, autoflex TOF/TOF)、DNA マイクロアレイ (Affymetrix Japan, GeneChip Scanner 3000)、DNA シークエンサー (Beckman Coulter CEQ-8000)、ナノ LC システム (KYA, DiNaS)、蛍光ディフュージョン解析装置 (Perkin Elmer, ProXPRESS)、小型超遠心分離器 (Beckman Coulter, Optima TLX)

地域負担による設備: