

α -インターフェロンはHTLV-I pX遺伝子発現を抑制し HTLV-I感染細胞の増殖を抑制する

共同研究者	田中昭人	鹿児島大学医学部皮膚科学
共同研究者	李 洪川	鹿児島大学医学部ウイルス学
	楼 宏	同上
	屋敷伸治	同上
主任研究者	園田俊郎	鹿児島大学医学部ウイルス学・教授

【目的】

成人T細胞白血病（ATL）に対しては主に種々の組み合わせによる化学療法が行われているが満足できる奏功率は得られていない。1980年代後半より α -インターフェロン（IFN- α ）がATLに対し有効という報告がなされ、1990年代半ばより抗HIV薬であるAZTをIFN- α と併用しATLに対して有効とする報告もなされている。

今回、我々はHLAハプロタイプの異なるATL患者5例の末梢血リンパ球より樹立したHTLV-I感染T細胞株に対しIFN- α 及びAZTの増殖抑制作用とHTLV-I pX遺伝子発現抑制効果について検討した。

【結果と考察】

HTLV-I感染T細胞株はIFN- α 及びAZTにより有意な増殖抑制作用を認めた。さらにIFN- α はHTLV-I pX遺伝子の発現を抑制し、一方、AZTはその発現抑制効果は認めなかった。特にHTLV-Iに対し高応答性のHLAハプロタイプを有する2つのHTLV-I感染T細胞株は著明な増殖抑制を受け、HTLV-I pX遺伝子発現も同様に強く抑制されていた。

以上の結果、IFN- α は無症候性キャリアーのATL発症予防やATL患者に対して選択可能な薬剤であると考えられた。特にATL患者への治療を選択する際にHLAを指標とする遺伝的背景を考慮する必要があると思われる。

緑茶ポリフェノール成分は ATL 細胞のアポトーシス誘導と HTLV-I pX 遺伝子発現を抑制する

共同研究者	屋敷伸治	鹿児島大学医学部ウイルス学
	李 洪川	同上
	楼 宏	同上
主任研究者	園田俊郎	鹿児島大学医学部ウイルス学・教授

【目的】

緑茶ポリフェノール成分は抗酸化作用 (Ruch ら 1989, Leanderson ら 1997) の他に種々の抗ウイルス作用 (Nakane ら 1990, Moor ら 1992, Nakayama ら 1995)、がん細胞などに対する増殖抑制作用 (Asano ら 1997)、アポトーシス誘導作用 (Ahmad ら 1997) などが知られている。今回、緑茶の発がん抑制作用に注目し緑茶ポリフェノール成分の ATL 細胞に対する増殖抑制、アポトーシス作用および HTLV-I pX 遺伝子発現に対する抑制効果を検討した。

【方法】

1. 緑茶成分の抽出

鹿児島県茶業試験場で栽培された荒茶 (品種名: やぶきた) 10 g を温湯 (95°C) 100ml で 30 分間浸出後、濾過液を 1 容の酢酸エチルで振とうして、酢酸エチル層に抽出された成分を減圧濃縮乾固させて緑茶成分粗抽出物 (TEA) を調製した。比較対照として緑茶ポリフェノール成分の主要成分であるエピガロカテキンガレート (EGCg) を用いた (図 1)。

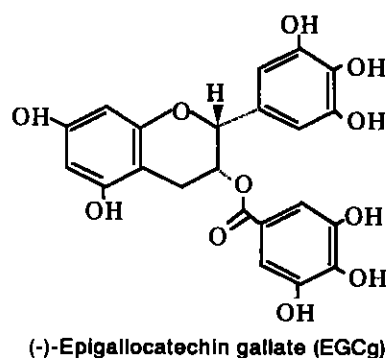


図1 緑茶ポリフェノール主要成分の構造式

2. T細胞増殖反応の測定

3例の ATL 患者 (Case 1-3: 表 1) および 1例の HTLV-I 抗体陰性者の末梢血リンパ球 (Normal PBL) を試験管内で培養し、増殖反応の抑制効果を測定した。ここでは、TEA と EGCg の 3 倍希釈段階液 (3~81 μ g/ml) をつくり、それぞれの末梢血リンパ球と rIL-2 存在下で 3 日間培養後、細胞増殖の変化を Cell Counting Kit-8 を用いて測定した。

3. アポトーシス細胞の検出

- ① ATL 細胞 5×10^4 個を Herrmann らの方法に準じた Apoptosis Ladder Detection Kit を用い、細胞溶解後 DNA を抽出し電気泳動後、SYBR Gold による染色で DNA ラダーの検出を行った。
- ② TUNEL 法によるアポトーシス細胞の検

出：培養 ATL 細胞 5×10^4 個を中性緩衝ホルマリンで固定し、Apoptosis in situ Detection DNA fragments の検出：3 日間培養後の培養 Kit を用いて、アポトーシス細胞の検出を行った。

4. HTLV-I pX mRNA の測定

3 日間培養後の培養 ATL 細胞から mRNA を抽出し、mRNA 検体を 10 倍段階希釈し、それぞれを第 1 段プライマーセット (RPX11, PX9) で 40 サイクルの RT-PCR を行い、これを第 2 段プライマーセット (RPX3, RPX4) で 20 サイクルの nested-PCR を行い HTLV-I pX mRNA の発現量を半定量法で検出した。

【結果】

1. T細胞増殖の抑制

緑茶ポリフェノール成分の ATL 細胞に対する効果では濃度依存性に細胞増殖の抑制効果が観察された。TEA と EGCg は $27 \mu\text{g/ml}$ の濃度で ATL 細胞 (Case 1~3) の増殖を 79~97% 抑制していた。一方、健常人リンパ球では 24~38% の増殖抑制のみであった (図 2)。

2. アポトーシス作用効果

TEA と EGCg でそれぞれ $27 \mu\text{g/ml}$ の濃度で 3 日間培養した細胞は、アポトーシスによる DNA 切断 (ラダー) が著明に検出された (図 3)。さらに Apoptosis in situ 法による染色で TUNEL 陽性細胞が高率 (49.1%~89.3%) に観察された (図 4)。

3. HTLV-I pX mRNA の発現抑制効果

TEA ($27 \mu\text{g/ml}$) で培養した ATL 細胞での HTLV-I pX 遺伝子の発現抑制は、2 例の ATL 細胞 (Case 2, 3) で部分抑制がみられた。一方、EGCg ($27 \mu\text{g/ml}$) は 2 例の ATL 細胞 (Case 1,

3) で完全抑制と Case 2 で部分抑制がみられた。Case 2 の HTLV-I pX mRNA の発現量を定量したところ、HTLV-I pX mRNA 発現を TEA は 1/100、EGCg では 1/1000 抑制していた (図 5)。

【考察】

緑茶から抽出したポリフェノール成分 (TEA) とその主成分とされる EGCg を用いて ATL 細胞に対する増殖抑制効果を健常人リンパ球と比較して検討した。TEA および EGCg は $27 \mu\text{g/ml}$ で ATL 細胞の増殖を 79~97% 抑制した。この ATL 細胞抑制効果はアポトーシス (細胞死) の誘導と HTLV-I pX 遺伝子発現の抑制を伴っていた。ここでは、HTLV-I pX 分子が標的となり HTLV-I 感染細胞の増殖抑制も期待されることから、HTLV-I キャリアから ATL への発症が予防できる可能性が考えられる。今後、HTLV-I キャリアにおける緑茶飲用と HTLV-I ウイルス量の低減作用を測定し、ATL の予防効果を疫学的に確認していきたい。

【参考文献】

- 1 Ruch RJ, Cheng SJ and Klaunig JE. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis* 10:1003-8 (1989).
- 2 Leanderson P, Faresjo AO and Tagesson C. Green tea polyphenols inhibit oxidant-induced DNA strand breakage in cultured lung cells. *Free Radic Biol. Med.*, 23: 235-42 (1997).
- 3 Nakane H and Ono K. Differential inhibitory effects of some catechin derivatives on the

- activities of human immunodeficiency virus reverse transcriptase and cellular deoxyribonucleic and ribonucleic acid polymerases. *Biochemistry* 29: 2841-5 (1990).
- 4 Moore PS and Pizza C. Observations on the inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by catechins. *Biochem. J.*, 288 : 717-9 (1992).
- 5 Nakayama M, Suzuki K, Toda M, Okubo S, Hara Y and Shimamura T. Inhibition of the infectivity of influenza virus by tea polyphenols. *Antiviral Res.* 21: 289-99 (1993).
- 6 Asano, Y., Okamura, S., Ogo, T., Eto, T., Otsuka, T. and Niho. Y. Effect of (-)-epigallocatechin gallate on leukemic blast cells from patients with acute myeloblastic leukemia. *Life Sci.*, 60, 135-142 (1997).
- 7 Ahmad N, Feyes DK, Nieminen AL, Agarwal R and Mukhtar H. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 89: 1881-6 (1997).

【学会発表】

屋敷伸治、園田俊郎. 緑茶成分は HTLV-I 感染細胞の増殖を抑制する. 第 57 回日本癌学会総会、横浜市、1998.

表 1. ATL患者の臨床症状

Patient #	Age	Sex	Diagnosis	HTLV-I antibody*	WBC per mm³	% atypical lymphocytes
Case 1	65	M	acute type	4096	53,400	89.0
Case 2	62	M	acute type	256	19,800	14.5
Case 3	54	M	acute type	4096	31,700	82.0

*anti-HTLV-I antibody was titered by the particle agglutination method (SERODIA HTLV-I: Fujirebio)

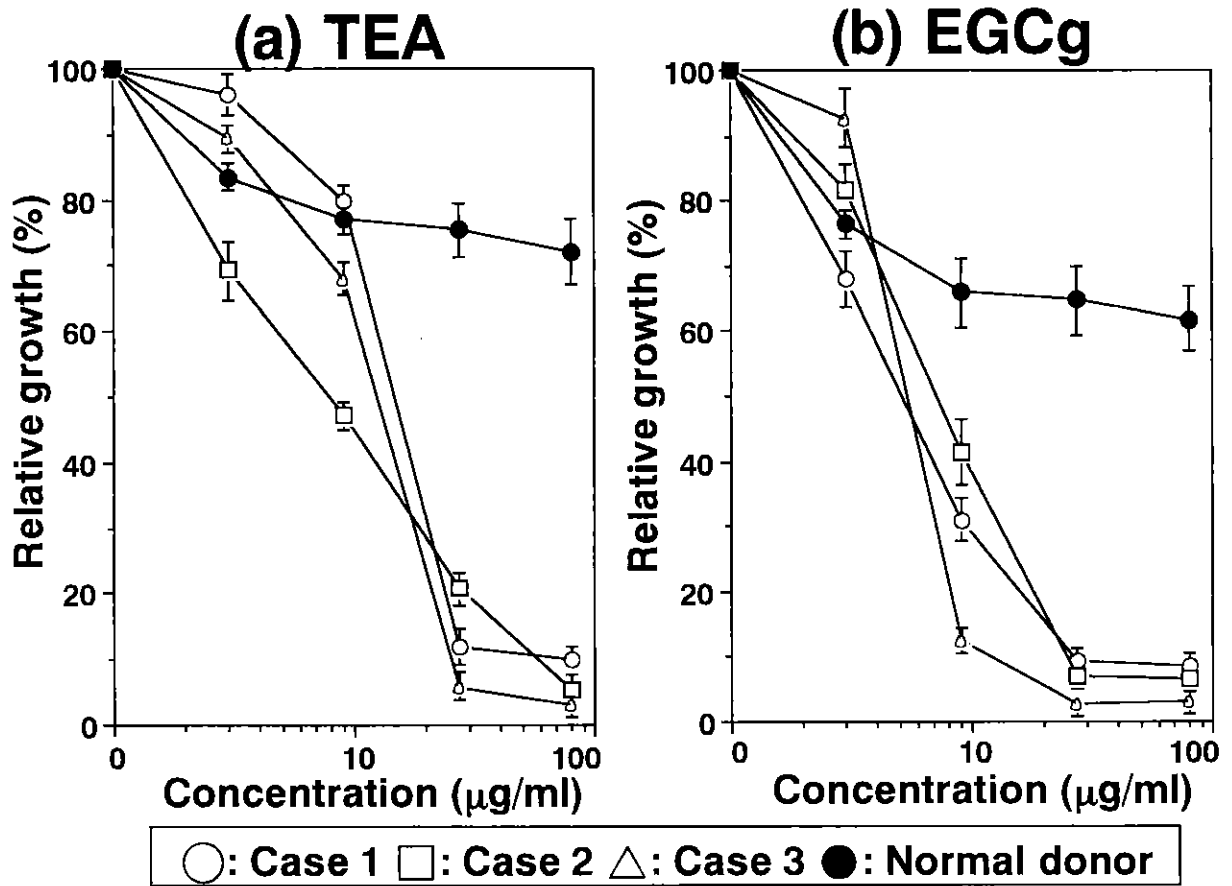


図2 緑茶ポリフェノール成分のATL細胞抑制作用

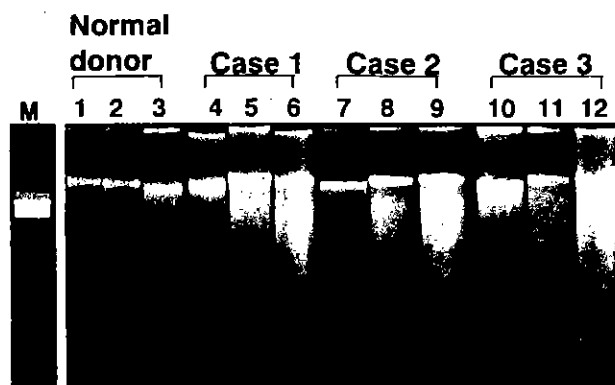


図3 緑茶成分によるATL細胞のアポトーシス—DNA切断 (ラダー) の検出—

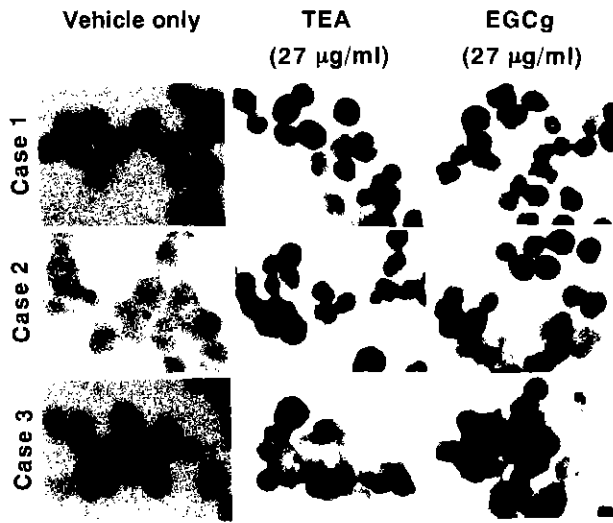
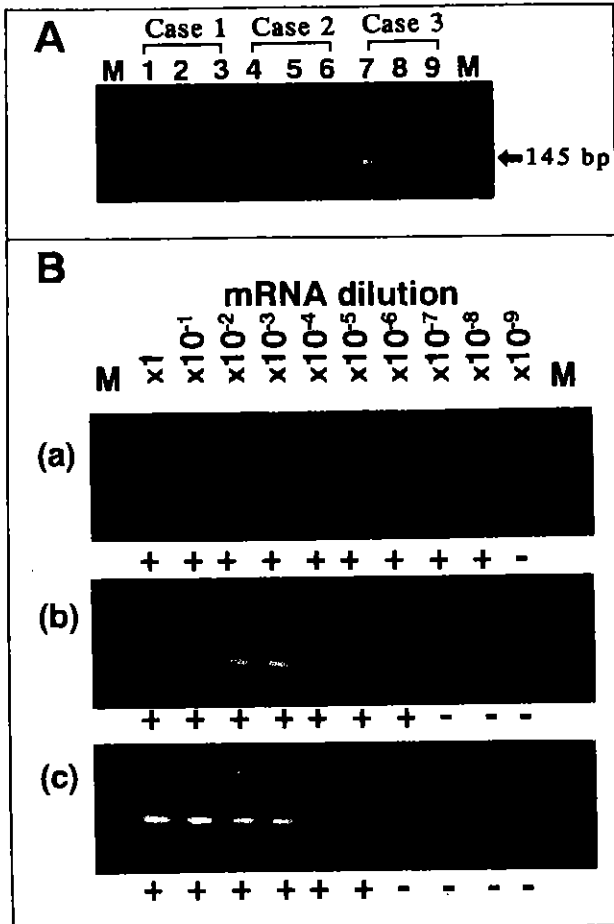


図4 緑茶成分によるATL細胞のアポトーシス
—TUNEL陽性細胞の検出—



lane 1, 4, 7: Vehicle only
lane 2, 5, 8: TEA (27 µg/ml)
lane 3, 6, 9: EGCg (27 µg/ml)

Case 2
(a) Vehicle only
(b) TEA (27 µg/ml)
(c) EGCg (27 µg/ml)

図5 緑茶成分のHTLV-1 pX遺伝子
発現抑制効果

ATL 発症予防のための HTLV-I ペプチドワクチンの開発

共同研究者 屋敷伸治 鹿児島大学医学部ウイルス学……………
主任研究者 園田俊郎 鹿児島大学医学部ウイルス学・教授

【目的】

HTLV-I キャリアならびに ATL 患者の HLA-class I 分子が介在する CD8+CTL の HTLV-I 抗原エピトープと HLA の anchor motif を同定し、ATL の発症を予防する HTLV-I ペプチド (Tax, Env) ワクチンの開発を目的とする。

【方法】

ATL 患者にみられる HLA-class I 型 (A*02, A*11, A*24, A*26, A*31, A*33, B*07, B*35, B*44, B*51, B*52, B*54, B*15, B*4001, B*4002, B*4006) を保有する HTLV-I キャリアの凍結末梢血リンパ球 (40 例) から、CD8+T 細胞を分画したのち、HTLV-I Tax の合成ペプチド (15 残基、69 種類) および HTLV-I Env の合成ペプチド (15 残基、96 種類) とマイトマイシン処理した autologous PBL または HLA が一致した allogeneic PBL 存在下で 30 日間培養し、それぞれのペプチドに対する特異的 CD8+CTL を誘導した。HLA-class I の anchor motif と HTLV-I Tax、Env 抗原のエピトープ解析は T 細胞増殖反応と細胞障害性反応でおこなった。

【結果】

① HLA 分子の anchor motif 解析 :

HLA-A*02 は-Leu-----Leu, -Leu-----Ile, -Leu---
---Val, -Ile-----Leu の 4 種, HLA-A*11 は-Thr---
---Lys, -Phe-----Lys, -Arg-----Lys, -Met-----Lys,

-Ala-----Lys, -Ser-----Lys, -Val-----Lys の 7 種,
HLA-A*24 は-Phe-----Phe, -Tyr-----Leu, -Phe---
---Ile の 3 種, HLA-A*26 は-Val-----Leu, -Val---
---Val, -Arg-----Val の 3 種, HLA-A31 は-Leu---
---Arg, -Pro-----Arg, -Arg-----Arg の 3 種, HLA-
A*33 は-Ile-----Arg, -Leu-----Arg, -Met-----Arg
の 3 種, HLA-B*07 は-Pro-----Leu, -Pro-----Ile,
-Arg-----Lys の 2 種, HLA-B*35 は-Pro-----Leu,
-Pro-----Ala, -Pro-----Tyr, -Pro-----Trp, -Pro---
-Glu, -Pro-----Val の 6 種, HLA-B*44 は-Glu-----
-Leu の 1 種, HLA-B*51 は-Ala-----Ile, -Pro-----
Leu, -Ala-----Leu, -Phe-----Phe の 4 種, HLA-
B*52 は-Gln-----Ile の 1 種, HLA-B*54 は-Pro---
---Ala の 1 種, HLA-B*15 は-Leu-----Tyr, -Leu-
-----Phe の 2 種, HLA-B*4001 は-Glu-----Leu の
1 種の anchor motif を上記 HTLV-I Tax, Env ペ
プチドで同定した。

② CD8+CTL が認識する HTLV-I Tax, Env エ ピトープ解析 :

HLA-A*02 拘束性 CD8+CTL は 18 種類 (Tax:6,
Env:12), HLA-A*11 は 7 種類 (Tax:4, Env:3),
A*24 は 9 種類 (Tax:5, Env:4), A*26 は 4 種類
(Tax:0, Env:4), A*31 は 6 種類 (Tax:3, Env:3),
A*33 は 6 種類 (Tax:3, Env:2), B*07 は 21 種
類 (Tax:10, Env:11), B*35 は 25 種類 (Tax:9,
Env:16), B*44 は 6 種類 (Tax:3, Env:3), B*51 は
30 種類 (Tax:12, Env:18), B*52 は 15 種類
(Tax:7, Env:8), B*54 は 5 種類 (Tax:2, Env:3),

B*15 は 12 種類 (Tax:6, Env:6), B*4001 は 6 種類 (Tax:3, Env:3), B*4002 は 2 種類 (Tax:0, Env:2), B*4006 は 1 種類 (Tax:0, Env:1) の HTLV-I エピトープを認識した。

以上、本研究で同定した HLA anchor motif と既に報告されている HLA anchor motif をもとに CD8⁺CTL が認識する HTLV-I Tax, Env エピトープを解析した (表 1)。

【考察】

HLA-A*26, B*4002, B*4006 を保有する HTLV-I キャリアは、HTLV-I Tax に対し CD8⁺CTL を全く誘導できないことが明らかになった。このことは ATL 患者では HTLV-I 感染細胞の免疫排除ができず白血病のリスクを高めていることが示唆された。他の HLA-class I 分子は HTLV-I Tax, Env ペプチドを多数認識していた。以上のことから、ATL の発症予防に HTLV-I ペプチドをワクチンとして応用できる可能性が示唆された。

【参考文献】

- 1 DiBrino M, Tsuchida T, Turner RV, Parker KC, Coligan JE, Biddison WE HLA-A1 and HLA-A3 T cell epitopes derived from influenza virus proteins predicted from peptide binding motifs. *Immunol* 151(11): 5930-5 1993.
- 2 Hill AB, Lee SP, Haurum JS, Murray N, Yao QY, Rowe M, Signoret N, Rickinson AB, McMichael AJ Class I major histocompatibility complex-restricted cytotoxic T lymphocytes specific for Epstein-Barr virus (EBV)-transformed B lymphoblastoid cell lines against which they were raised. *Exp Med* 181(6): 2221-8 1995.
- 3 Brooks JM, Colbert RA, Mear JP, Leese AM, Rickinson AB HLA-B27 subtype polymorphism and CTL epitope choice: studies with EBV peptides link immunogenicity with stability of the B27:peptide complex. *J Immunol* 161(10):5252-9 1998.
- 4 Barber LD, Gillece-Castro B, Percival L, Li X, Clayberger C, Parham P Overlap in the repertoires of peptides bound in vivo by a group of related class I HLA-B allotypes. *Curr Biol* 5(2):179-90 1995.
- 5 Martinez-Naves E, Barber LD, Madrigal JA, Vullo CM, Clayberger C, Lyu SC, Williams RC, Gorodezky C, Markow T, Petzl-Erler ML, Parham P Interactions of HLA-B*4801 with peptide and CD8. *Tissue Antigens* 50(3):258-64 1997.
- 6 Rammensee HG, Friede T, Stevanovic S MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*; 41(4): 178-228 1995
- 7 Falk K, Rotzschke O, Takiguchi M, Gnau V, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG Peptide motifs of HLA-B58, B60, B61, and B62 molecules. *Immunogenetics*;41(2-3):165-8 1995.
- 8 Tanigaki N, Fruci D, Chersi A, Falasca G,

Tosi R, Butler RH HLA-A2-binding peptides cross-react not only within the A2 subgroup but also with other HLA-A-locus allelic products. Hum Immunol 39(3):155-62 1994.

- 9 Koenig S, Woods RM, Brewah YA, Newell AJ, Jones GM, Boone E, Adelsberger JW, Baseler MW, Robinson SM, Jacobson S Characterization of MHC class I restricted cytotoxic T cell responses to tax in HTLV-1 infected patients with neurologic disease. J Immunol 151(7):3874-83 1993.

【学会発表】

屋敷伸治、園田俊郎 ATL 発症予防のための HTLV-I ペプチドワクチンの開発、第 2 回基盤的癌免疫研究会、名古屋市 1998 年 6 月.

表1 HLA anchor motifs and number of CD8⁺CTL epitopes for HTLV-I Tax and Env region

HLA alleles	HLA anchor motifs ^{a)}									References	number of epitopes for HTLV-I ^{b)}		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		Tax	Env	Total
A*01	-	-	D	-	-	-	-	-	Y	DiBrino M et al. 1993	0	0	0
	-	-	E	-	-	-	-	-	Y				
A*02	-	L	-	-	Y	-	-	-	L	This study	6	12	18
	-	L	-	-	I	-	-	-	V	Koenig S et al. 1993			
	-	L	-	-	Y	-	-	-	I	Rammensee HG et al. 1995			
	-	I	-	-	I	-	-	-	L				
A*03	-	L	-	-	-	-	-	-	Y	DiBrino M et al. 1993	3	5	8
	-	L	-	-	-	-	-	-	K				
	-	V	-	-	-	-	-	-	K				
	-	P	-	-	-	-	-	-	K				
A*11	-	M	-	-	-	-	-	-	K	This study	4	3	7
	-	V	-	-	-	-	-	-	K	Rammensee HG et al. 1995			
	-	F	-	-	-	-	-	-	K				
	-	T	-	-	-	-	-	-	K				
	-	Y	-	-	-	-	-	-	K				
A*24	-	F	-	L	Y	-	-	-	F	This study	5	4	9
	-	F	-	-	I	-	-	-	I	Rammensee HG et al. 1995			
	-	F	-	-	-	-	-	-	L				
	-	Y	-	-	I	-	-	-	L				
A*26	A	V	-	-	Y	-	-	-	V	This study	0	4	4
	E	V	-	-	I	-	-	-	L	Tanigaki N, et al. 1994			
	E	V	-	-	L	-	-	-	L	Goulder P, et al. 1996			
	E	R	-	-	L	-	-	-	V				
A*31	-	L	-	-	P	-	-	-	R	This study	3	3	6
	-	R	-	-	-	-	-	-	R	Rammensee HG et al. 1995			
A*33	-	L	-	-	-	-	-	-	R	This study	4	2	6
	-	V	-	-	-	-	-	-	R	Rammensee HG et al. 1995			
	-	I	-	-	-	-	-	-	R				
	-	M	-	-	-	-	-	-	R				
B*07	-	P	-	-	-	-	-	-	L	This study	10	11	21
	-	P	-	-	-	-	-	-	I	Rammensee HG et al. 1995			
B*15	-	L	-	-	-	-	-	-	Y	This study	6	6	12
	-	L	-	-	-	-	-	-	F	Rammensee HG et al. 1995			
	-	Q	-	-	-	-	-	-	F				
B*27	-	R	-	-	-	-	-	-	I	Brooks JM, et al. 1998	2	3	5
	-	R	-	-	-	-	-	-	L	Rammensee HG et al. 1995			
	-	R	-	-	-	-	-	-	F				
	-	R	-	-	-	-	-	-	Y				
B*35	-	P	-	-	-	-	-	-	L	This study	9	16	25
	-	P	-	-	-	-	-	-	M	Rammensee HG et al. 1995			
	-	P	-	-	-	-	-	-	I				
	-	P	-	-	-	-	-	-	Y				
	-	P	-	-	-	-	-	-	F				
B*39	-	K	-	-	-	-	-	-	L	Hill AB, et al. 1995	2	7	9
	-	R	-	-	-	-	-	-	L	Rammensee HG et al. 1995			
	-	Q	-	-	-	-	-	-	L				
B*4001(B60)	-	E	-	-	L	-	-	-	L	This study	3	3	6
										Falk K, et al. 1995			
B*4002(B61)	-	E	-	-	-	-	-	-	V	This study	0	2	2
B*4006(B61)	-	E	-	-	-	-	-	-	A	This study	0	1	1
										Falk K, et al. 1995			
B*44	-	E	-	-	-	-	-	-	L	This study	3	3	6
										Rammensee HG et al. 1995			
B*48	-	K	-	-	L	-	-	-	L	Martinez-Naves E, et al. 1997	1	3	4
B*51	-	A	-	-	-	-	-	-	L	This study	12	18	30
	-	P	-	-	-	-	-	-	L	Rammensee HG et al. 1995			
	-	A	-	-	-	-	-	-	I				
	-	G	-	-	-	-	-	-	V				
	-	P	-	-	-	-	-	-	I				
B*52	-	Q	-	-	L	-	-	-	V	This study	7	8	15
	-	Q	-	-	L	-	-	-	I	Rammensee HG et al. 1995			
	-	L	-	-	L	-	-	-	F				
	-	L	-	-	L	-	-	-	I				
	-	L	-	-	L	-	-	-	V				
B*54	-	P	-	-	L	-	-	-	A	This study	2	3	5
										Barber LD, 1995			
B*55	-	P	-	-	-	-	-	-	A	Barber LD, 1995	2	3	5
B*56	-	P	-	-	-	-	-	-	A	Barber LD, 1995	2	3	5
B*58	-	A	-	-	-	-	-	-	F	Philip JR et al. 1996	3	3	6
	-	A	-	-	-	-	-	-	W	Rammensee HG et al. 1995			
B*67	-	P	-	-	-	-	-	-	L	Barber LD, 1995	8	4	12

^{a)} HLA class I anchor motifs was identified by this study and references.

^{b)} Number of CTL epitopes were estimated from HLA class I-binding anchor motifs determined by this study and references.

HTLV-I の局在に関する研究

協力研究者	瀬戸山 充	鹿児島大学医学部皮膚科・助教授
共同研究者	溝口志真子	鹿児島大学医学部皮膚科.....
共同研究者	栄鶴義人	鹿児島大学難治性ウイルス疾患研究センター・教授

研究要旨

HTLV-I 保菌者には悪性新生物としての成人 T 細胞性白血病・リンパ腫のみならず HAM をはじめとする種々の変性、炎症性疾患が合併することはよく知られている。我々はシェーグレン症候群の合併が多いとの報告に注目し、ATL 患者及びキャリアの汗腺を単離し、nested PCR 法を使って HTLV-I の組込みの有無を検討した。その結果 HTLV-I 保菌者 8 例中 4 例のエックリン汗腺上皮に HTLV-I の組込みが認められた。

【研究目的】

我々は現在まで免疫組織化学、培養、in situ hybridization 法、in situ PCR 法等を使い、組織内における HTLV-I の分布を検討してきた。HTLV-I 保菌者における HTLV-I の分布を知ることはこのウイルスにより引き起こされる様々な病態、感染様式の解析に有用な手がかりを与え、しかも現在まで原因不明とされ、ウイルスの関与も推察されている一連の疾病の病態解明の手がかりになるものと考えられるからである。今回成人 T 細胞性白血病・リンパ腫の患者のなかにシェーグレン症候群類似の症状を呈する患者やドライスキン、魚鱗癬様皮膚変化を見いだすことが稀でないため、エックリン汗腺組織への HTLV-I の関与を検討するためこの研究を行った。

【研究方法】

生検により得られた皮膚組織 (ATLL4 例、HTLV-I キャリア 4 例、陰性コントロール 7 例) を Uchida らの方法で dispase 含有 Eagle's 培地中に 4°C で一晚 incubate 後、皮膚組織からエックリン管器官を分離、型通り DNA 抽出後、nested PCR を行った。全てのプライマーとインターナルプローブは HTLV-I の pX 領域に位置するものである。最初の PCR 反応は 40 サイクル行い、nested PCR は 30 サイクル行った。PCR 産物については型通り 2% アガロースに電気泳動し UV ランプで DNA バンドを観察した。また同時に PCR 産物をメンブレンにブロットし先述のインターナルプローブを用いてドットブロットハイブリダイゼーションを行った。

【研究結果】

8例の HTLV-I 抗体陽性者の内、4例のエックリン腺上皮に nested PCR 法で pX sequence を検出し、これはドットプロットハイブリダイゼーション法で確認された。

【考察】

HTLV-I 感染は悪性腫瘍である ATLL のみでなくシェーグレン症候群など種々の免疫異常症を引き起こすことは周知の事実である。シェーグレン症候群はリンパ球浸潤による腺組織の破壊により腺分泌の欠如及び粘膜の乾燥を引き起こす疾患であるとも考えられている。その原因は未だ不明であるが、遺伝的、内分泌的、環境的背景が関与すると考えられている。ウイルスもそのひとつであるかもしれない。いくつかのグループは EB ウイルスの関与を考えているが、一方レトロウイルスによる自己免疫誘導との関連も注目されている。

トランスジェニック動物において HTLV-I は唾液腺や涙腺上皮向性があるとの報告がある。これらの外分泌腺は発生学的にエックリン腺と近縁であり、実際シェーグレン症候群の患者では発汗異常やドライスキンを示す例もある。

Sumida や Mariette らは tax sequence をシェーグレン症候群患者の唾液腺に検出したと報告しているが、Mariette らは gag, pol, env gene は発現していなかったと報告し、これらのことから非流行地域において検出された tax sequence については新しいレトロウイルス感染か内在性レトロウイルスのものか、あるいは欠失 HTLV-I の感染を示すものかなどと推測されている。

我々が得た HTLV-I pX sequence の検出結果は HTLV-I 陽性患者にのみ認められており、このことは HTLV-I がエックリン汗腺上皮に感染していることを示すものである。このことがリンパ球浸潤を引き起こしシェーグレン症候群患者の何らかの遺伝的要因と相まって発汗異常、外分泌異常を引き起こすものと考えた。

この論文は単核細胞以外にエックリン腺上皮にも HTLV-I は感染するという最初の報告である。

【結論】

ATL 患者及びキャリアの汗腺を単離し、nested PCR 法を使って HTLV-I の有無を検出した。その結果 HTLV-I 保菌者 8 例中 4 例のエックリン汗腺上皮に HTLV-I の存在が認められた。

これは単核細胞以外にエックリン腺上皮にも HTLV-I は感染するという最初の報告である。

【研究発表】

1. 論文発表

- 1 Mitsuru Setoyama, Francisco A. Kerdel, George Elgart, Tamotsu Kanzaki, John J. Byrnes. Detection of HTLV-I by polymerase chain reaction in situ hybridization in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Am J Pathol* 152: 683-689, 1998
- 2 Tomoko Takezaki, Mitsuru Setoyama, Toshiro Takezaki, Shuji Takei, Shinji Yashiki, Kazunobu Sueyoshi, Hidetomo. Fukunaga, Spontaneous proliferative response of peripheral blood cells in vitro as an indicator of high response to human T-lymphotropic virus type I

infection in an infant with interstitial pneumonia.

Pediatr Infect Dis J 17:166-168, 1998

3 M. Setoyama, S. Mizoguchi, Y. Eizuru.

Human T-lymphotropic virus type I infects
eccrine sweat gland epithelia. Int J Cancer (in
press)

2. 学会発表

1 Mitsuru Setoyama, Francisco A. Kerdel,

George Elgart, Tamotsu Kanzaki and John J.

Byrnes. Detection of HTLV-I by PCR-insitu
hybridization in adult T-cell

leukemia/lymphoma. The 3rd tricontinental
meeting of investigative dermatology. May.

1998, Cologne

2 Mitsuru Setoyama, Yoshihiko Katahira, Akito

Tanaka, Tamotsu Kanzaki. Radiation therapy of

skin lesions in patients with adult T-cell

leukemia/lymphoma EORTC-Cutaneous

lymphoma project group clinical meeting

(1998). September 1998

扁桃原発の組織学的形質転換を示した成人 T 細胞性白血病・リンパ腫における HTLV-1 Tax と Rex 蛋白の発現について

協力研究者 佐藤栄一 鹿児島大学医学部病理学第2・教授
共同研究者 蓮井和久 鹿児島大学医学部病理学第2・講師

【研究要旨】

扁桃原発の組織学的に小細胞から多形細胞へ形質転換を示した成人 T 細胞性白血病・リンパ腫 (ATLL) 例で、それぞれ特異な 2 腫瘍性病変と 2 浸潤性病変を経験し、これらの病変に於ける HTLV-1 proviral DNA pX 領域の関連蛋白 p40tax (tax) と p27rex (rex) を modified ImmunoMax 法で検出し、それぞれの病変と HTLV-1 proviral DNA の活性化の様相を検討した。本例は、monoclonal な HTLV-1 proviral DNA の組み込みが確認された CD4 ATLL である。切除扁桃では、類結節性の増殖を示す小細胞性 ATLL 細胞の増殖を認め、化学療法に反応しない扁桃で CD30 陽性大型異型リンパ腫細胞を混じる ATLL 浸潤増殖と B 細胞の介在と血管の増生を認めた。頸部リンパ節では小細胞性 ATLL 細胞ないし異型リンパ球の浸潤を認め、腋窩リンパ節で血管増生を伴う多形細胞性 ATLL を認めた。扁桃の小細胞性 ATLL から腋窩の多形細胞性 ATLL への tax と rex の漸増を認め、化学療法後の扁桃と頸部リンパ節では多量の rex を含有する大型リンパ球を認めた。B 細胞の介在や血管の増生を伴う多形細胞性への形態学的形質転換は漸増した tax によるものであり、ATLL 浸潤部位での rex を多量に含有する細胞の出現は HTLV-1 の再生産を示唆した。

【研究目的】

ATLL 発病後の HTLV-1 proviral DNA の活性化の様相を知る為に、ATLL の一例に見られた多彩な病変で HTLV-1 proviral DNA pX 領域の関連蛋白 tax と rex の発現を抗 tax 抗体 (WATM-1) と抗 rex 抗体 (Rec-6) の modified ImmunoMax 法で検討した。

【症例と研究方法】

症例は、51 才の HTLV-1 キャリアーの日本人女性である。扁桃の腫大で発症した。生検で小細胞性末梢 T 細胞性悪性リンパ腫 (CD4+ PTML) が確認され、摘出扁桃で HTLV-1 proviral DNA の組み込みと TCR の再構成がサザンブ

ロット法で確認され、小細胞性 ATLL と診断された。化学療法が行われたが、腫大扁桃は縮小せず、頸部と腋窩のリンパ節が腫大した。扁桃の生検、頸部と腋窩のリンパ節の生検が行われ、それぞれ、CD30 陽性細胞を含む ATLL の浸潤、ATLL 細胞ないし異型リンパ球浸潤、CD4+ CD30+ 多形細胞性 ATLL と診断された。摘出扁桃と腋窩リンパ節切片からの抽出 DNA の PCR で、同じ長さの TCR β の再構成が確認され、両組織の ATLL は同一クローンであることが示唆された。患者は、その後、全身放射線照射と化学療法と末梢血幹細胞移植が行われ、現在、寛解状態で、初発より 1 年以上経過している。

上記の摘出扁桃、扁桃生検と頸部と腋窩リンパ節のパラフィン切片で、WATM-1、Rec-6と抗体希釈液の modified ImmunoMax 法を実施し、抗体希釈液での染色を背景染色として、WATM-1 と Rec-6 の染色結果を評価した。

【研究結果】

摘出扁桃の小細胞性 ATLL 細胞では、淡い核内 WATM-1 陽性像が認められた。摘出扁桃、扁桃生検と腋窩リンパ節の ATLL 細胞で、WATM-1 と Rec-6 の漸増する陽性像が認められた。また、扁桃生検と頸部リンパ節では、Rec-6 に濃染する大型細胞を認めた。扁桃生検では、この細胞は CD30 陽性 ATLL 細胞であった。

【考察】

吉田光昭らの HTLV-1 関連蛋白の分子生物学的研究によれば、摘出扁桃の小細胞性 ATLL 細胞の核の淡い WATM-1 陽性像で示唆される微量 tax は細胞遺伝子の transactivation に関与するものであることが示唆された。WATM-1 染色の漸増した細胞質陽性像は漸増する細胞質 tax を意味し、CD30 陽性多形細胞性への ATLL 細胞の形態学的形質転換は tax の影響であることが示唆された。ATLL 細胞の浸潤増殖部の大型細胞での Rec-6 で標識される rex の増加は HTLV-1 の再生産を示唆した。

【結論】

HTLV-1 proviral DNA の活性化は、ATLL 発病後も多彩な発現を示すことが示唆された。

【研究発表】

1, 論文発表

Hasui K, Sato E et al. Cytophagic histiocytic panniculitis/panniculitis-like

T-cell lymphoma (CHP/PLTL) in a two-year-old boy. DENDRITIC CELLS 8: 36-42, 1998

2, 研究発表

蓮井和久, 佐藤栄一, 田中勇悦, 出雲周二. シンポジウム"ATL20年" 追加発言 HTLV-1 pX 関連蛋白の高感度免疫組織化学. 第37回日本網内系学会, 熊本, 1998

ATL の抗がん剤耐性に関する研究

協力研究者 秋山伸一 鹿児島大学医学部附属腫瘍研究施設・教授

【研究要旨】

ATL 患者 50 例について MRP, LRP の発現を見た。MRP の高発現は急性型で 26.5%、慢性型で 66.7%認められ、リンパ腫型ではみられなかった。LRP の発現は、急性型で 17.2%、慢性型で 28.6%にみられた。治療経過を追って観察できた症例は 2 例中 1 例で治療開始後に LRP 発現が増加していたこと、治療開始後に採取した例で MRP と LRP の高発現がみられる症例の割合が高く、化学療法により多剤耐性遺伝子が誘発されている可能性がある。また、初診時より MRP の発現が高い症例は治療開始からの生存期間が短い傾向にあり治療抵抗性との関連が示唆された。

【研究目的】

悪性リンパ腫は治療法の改善により寛解率、生存期間共に上昇しているが、その中で ATL は依然として予後不良の悪性リンパ腫である。ATL の治療成績を改善できない理由としては易感染症による数々の合併症に加えて腫瘍細胞が再増悪することあるいは初診時より薬剤に対して治療抵抗であることも関与している。今まで薬剤抵抗性に関与する蛋白として P 糖蛋白質が知られている。P 糖蛋白質が過剰に発現した細胞株はアドリアマイシン等に耐性を持つことが知られており ATL でも治療抵抗性の一つのメカニズムであることが報告されている。初診時の患者で 20 例中 8 例で高発現がみられ、ATL 再増悪時の患者では全例で高発現が見られている。

一方、1992 年に Cole らがアドリアマイシン耐性肺癌の細胞株より multidrug resistance protein (MRP)の cDNA を分離した。MRP は ATP 依存性の排出ポンプである ABC transporter superfamily に属し、グルタチオン抱合体の

排出と治療抵抗性に関与していることが知られている。また、すでに AML や CLL では再発時に高発現が見られることや、neuroblastoma では MRP 発現は生存期間の短縮と相関のあることが報告されている。

1993 年になって Sheper らが lung resistance protein (LRP)を同定した。LRP は固形腫瘍での化学治療抵抗性や予後不良と関連していることが報告された。

MRP、LRP については ATL での発現を調べた報告はなく、抗がん剤耐性、予後との関連を調べるため遺伝子の発現を調べた。

【研究方法】

ATL 患者の 50 例を対象にし男性 29 例 女性 21 例、年齢 38~82 歳 (平均 61.1 歳)。急性型は 34 例で末梢血単核球から検体を採取したのは 28 例、リンパ節から 8 例である。慢性型は 9 例で、すべて末梢血単核球から採取した。リンパ腫型は 7 例で、すべてリンパ節から採取した。

末梢血単核球もしくはリンパ節から得た細胞より total RNA を抽出し slot blot を行い、BioRad の image analyzer で強度を測定した。Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(G3PDH)の発現量で標準化し、MRP については CV60 細胞株、LRP については fibrosarcoma の細胞株 HT1080 細胞をそれぞれ 1 として定量化した。正常人の末梢血単核球の発現量をコントロールとして用いた。用いたプローブは MRP は cDNA の 3' 側 660bp(4076~4739)、LRP は 950bp(1881~2794)、G3PDH は cDNA ほぼ全長 982bp(6~987)、を T ベクターに組み込み Dig ラベルの RNA プローブを作成し使用した。

【研究結果】

ノーザンブロットにより MRP は 6.5kb、LRP は 2.8kb、G3PDH は 1.27kb の部位に単一のバンドが見られた。それぞれのプローブでスロットブロットを行った後イメージライザーで取り組みシグナルの強度を定量化した。急性型では MRP について 26.5%に高発現が見られ、末梢血から得た 28 例のうち 9 例(32.1%)で高発現であった。LRP については 17.2%に高発現がみられ、末梢血から得たサンプルでは 22 例中 5 例(22.7%)で高発現が見られた。急性型 8 例からのリンパ節検体に高発現のものはなかった。リンパ節と末梢血から同時に検体を得た 2 症例はいずれも MRP、LRP ともに低発現であった。初診時と治療経過中に末梢血から検体を得た 2 例のうち 1 例で治療経過中 LRP が高値となった。MRP については治療開始前に 28 例中 6 例(21.4%)、治療中 3/8(37.5%)、LRP はそれぞれ 2/22(9.1%)

と 3/6(50%)高発現がみられた。

慢性型 9 例中 6 例(66.7%)に MRP が高発現し、LRP は 7 例中 2 例(28.6%)に高発現が見られた。リンパ腫型 7 例はいずれも MRP、LRP ともに低発現であった。高 Ca 血症の見られた 13 例で MRP は 1 例(7.8%)、LRP 高発現例はなかった。急性型で治療開始前に検体を採取できた 28 例で高発現、低発現にわけて生存期間を調べた。MRP については高発現 6 例、低発現 22 例で高発現のもので生存期間の短い傾向があり、検定で有意差が見られた。LRP については 22 例中高発現の症例が 2 例と少ないが、MRP と同様に陽性例は生存期間が短い傾向にあった。ゲノム DNA を EcoRI で消化し MRP プローブでサザンブロットしたところ、各症例の MRP 遺伝子に増幅は見られなかった。

【考察】

MRP については AML、CLL 患者で臨床的治療抵抗性との関連が報告されている。今回 ATL 患者 50 例について MRP、LRP の発現を調べた。初診時より MRP の発現が高い症例は治療開始からの生存期間が短い傾向にあり治療抵抗性との関連が示唆された。

MRP 遺伝子は 16 番染色体に存在し、MRP 遺伝子の増幅は MRPmRNA の発現の亢進が見られた培養細胞では知られているが、今回調べた症例では遺伝子の増幅は見られず、MRP の発現の亢進は mRNA の安定性の増加または転写の増加によると考えられた。

今後 ATL に対するより有効な治療法を開発するについては P 糖蛋白質、MRP あるいは LRP による薬剤耐性の克服、またはこれらの多剤

耐性に関与する因子とは関係のない抗がん剤の開発が必要である。また、ATLにおける多剤耐性因子の発現のメカニズムの解明も必要であろう。

【結論】

多剤耐性に関与する因子 MRP、LRP が発現した ATL 症例は生存期間が短い傾向にあり、治療抵抗性との関連が示唆された。

【研究発表】

1. 論文発表

1. Takebayashi, Y., Akiyama, S., Natsugoe, S., Hokita, S., Niwa, K., Kitazono, M., Sumizawa, T., Haraguchi, M., Furukawa, T., Nagayama, S. and Aikou, T. (1998) The expression of multidrug resistance protein (MRP) in human gastrointestinal tract carcinoma. *Cancer* 82: 661-666
2. Chen, Z - S., Mutoh, M., Sumizawa, T., Haraguchi, M., Tani, A., Saijo, N., Kondo, T. and Akiyama, S. (1998) An active efflux system for heavy metals in cisplatin-resistant human KB carcinoma cells. *Exp. Cell Res.*, 240: 312-320
3. Aoki, S., Yoshioka, Y., Miyamoto, Y., Higuchi, K., Setiawan, A., Murakami, N., Chen, Z-S, Sumizawa, T., Akiyama, S. and Kobayashi, M. (1998) Agosterol A, a novel polyhydroxylated sterol acetate reversing multidrug resistance from a marine sponge of spongia sp. *Tetra. Lett.*, 39: 6303-6306
4. Takebayashi, Y., Natsugoe, S., Baba, M., Fukumoto, T., Takao, S., Akiba, S., Akiyama, S. and Aikou, T. (1998) Angiogenesis in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.*, 5: 401-404
5. Takao, S., Takebayashi, Y., Che, X., Shintchi, H., Natsugoe, S., Miyadera, K., Yamada, Y., Akiyama, S. and Aikou, T. (1998) Expression of thymidine phosphorylase is associated with a poor prognosis in patients with ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Clin. Cancer Res.*, 4: 1619-1642
6. Chuman, Y., Chen, Z-S., Seto, K., Sumizawa, T., Furukawa, T., Tani, A., Haraguchi, M., Niwa, K., Yamada, K., Aikou, T. and Akiyama, S. (1998) Reversal of MRP-mediated vincristine resistance in KB cells by buthionine sulfoximine in combination with PAK-104P. *Cancer Lett.*, 129: 69-76
7. Nagayama, S., Chen, Z-S., Kitazono, M., Takebayashi, Y., Niwa, K., Yamada, K., Tani, A., Haraguchi, M., Sumizawa, T., Furukawa, T., Aikou, T. and Akiyama, S. (1998) Increased sensitivity to vincristine of MDR cells by the leukotriene D4 receptor antagonist, ONO-1078. *Cancer Lett.*, 130: 175-182
8. Yonenaga, F., Takasaki, T., Ohi, Y., Sagara, Y., Akiba, S., Yoshinaka, H., Aikou, T., Miyadera, K., Akiyama, S. and Yoshida, H. (1998) The expression of thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor is correlated to angiogenesis in breast cancer. *Pathol. Int.*, 48:

9. Uchiyama, T., Hinoshita, E., Haga, S., Nakamura, T., Tanaka, T., Toh, S., Furukawa, M., Kawabe, T., Wada, M., Kagotani, K., Okamura, K., Kohno, K., Akiyama, S. and Kuwano M. (1998) Isolation of a novel human canalicular multispecific organic anion transporter, cMOAT2/MRP3, and its expression in cisplatin-resistant cancer cells with decreased ATP-dependent drug transport. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 252: 103-110
10. Fukuiwa, T., Takebayashi, Y., Akiba, S., Matsuzaki, T., Hanamura, Y., Miyadera, K., Yamamada, Y. and Akiyama, S. (1998) Expression of thymidine phosphorylase and vascular endothelial cell growth factor in human head and neck squamous cell carcinoma, as a prognostic factor. *Cancer*, 85:960-969.
11. Kitazono, M., Takebayashi, Y., Ishitsuka, K., Takao, S., Tani, A., Furukawa, T., Miyadera, K., Yamada, Y., Akiyama, T. and Akiyama, S. (1998) Prevention of hypoxia-induced apoptosis by the angiogenic factor thymidine phosphorylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 253:797-803.
12. Takebayashi, Y., Natsugoe, S., Akiba, S., Furukawa, T., Miyadera, K., Takao, S., Akiyama, S. and Aikou, T. Thymidine phosphorylase in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 85: 282-289.
13. Chu, X-Y., Suzuki, H., Uesa, K., Kato, Y., Akiyama, S. and Sugiyama, Y. (in press) Active efflux of CPT-11 and its metabolites in human KB-derived cell lines. *JPharmacol. Exp. Ther.*
14. Fukuda, S., Shirahama, T., Imazono, Y., Tushima, T., Ohmori, H., Kayajima, T., Take, S., Nishiyama, K., Yonezawa, S., Akiba, S., Akiyama, S. and Ohi, Y. (In press) Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in testicular germ cell tumors as an indicator of metastatic disease. *Cancer*
15. Chen, Z-S., Sumizawa, T., Furukawa, T., Ono, K., Tani, A., Komatsu, M. and Akiyama, S. (In press) An enhanced active efflux of CPT-11 and SN-38 in cisplatin-resistant human KB carcinoma cells. *Cancer Lett.*
16. Ueda, K., Suzuki, H., Akiyama, S. and Sugiyama, Y. (In press) Differences in substrate specificity among GS-X pump family members: Comparison between MRP and a novel transporter expressed on a cisplatin-resistant cell line (KCP-4). *Jpn. J. Cancer Res.*
17. Matsushita, S., Nitanda, T., Furukawa, T., Sumizawa, T., Tani, A., Nishimoto, K., Akiba, S., Miyadera, K., Fukushima, M., Yamada, Y., Yoshida, H., Kanzaki, T. and Akiyama, S. (In press) The effect of a thymidine phosphorylase inhibitor on angiogenesis and apoptosis in tumors. *Cancer Res.*
18. Chen, Z.S., Furukawa, T., Sumizawa, T.,

Ono, K., Seto, K. and Akiyama, S. (in press) ATP-dependent efflux of CPT-11 and SN-38 by the multidrug resistance protein (MRP) and its inhibition by PAK-104. *Mol. Pharmacol.*

2. 学会発表

1. Miyadera, K., Emura, T., Suzuki, N., Akiyama, S., Fukushima, M. and Yamada, Y. Novel functional antitumor nucleoside TAS-102, combined from of F3dThd and its modulator (2): Inhibitory effect of TPI on tumor-derived angiogenesis and metastasis. 第 89 回アメリカ癌学会総会 (ニューオーリンズ) 1998 年 3 月 28 日~4 月 1 日

2. Matsushita, S., Tani, A., Furukawa, T., Sumizawa, T., Miyadera, K., Yamada, Y., Kanzaki, T. and Akiyama, S. The mechanism of cytotoxic action of 5-fluoro-2'-deoxyuridine in thymidine phosphorylase expressing cell lines. 第 88 回 第 89 回アメリカ癌学会総会 (ニューオーリンズ) 1998 年 3 月 28 日~4 月 1 日

3. Kitazono, M., Takebayashi, Y., Nagayama, S., Tani, A., Chen Z.S., Furukawa, T., Sumizawa, T., Takao, S., Aikou, T. and Akiyama, S. Induction of MRP and LRP by a differentiating agent, sodium butyrate.

第 89 回アメリカ癌学会総会 (ニューオーリンズ) 1998 年 3 月 28 日~4 月 1 日

4. Akiyama, S., Chen Z.S., Sumizawa, T., Furukawa, T. and Kuwano, M. Cisplatin resistance. 第 5 回中央ヨーロッパ肺癌会議 (ミニシンポ

ジウム) (プラハ、チェコ共和国) 1998 年 9 月 13 日-9 月 16 日

5. 秋山伸一、松下茂人、北薊正樹、谷 綾子、住澤知之、古川龍彦、宮寺和孝、山田雄次「チミジンホスホリラーゼの関与する腫瘍増殖血管新生とその阻害」第 57 回日本癌学会総会(ワークショップ) (横浜) 1998 年 9 月 30 日-10 月 2 日

(英文総説)

Akiyama, S., Chen, Z.S., Sumizawa, T. and Furukawa, T. Resistance to cisplatin. *Anticancer Drug Design* (in press)

(和文著書)

1. 秋山伸一 . チミジンホスホリラーゼと血管新生 (分担) 新臨床医のための分子医学シリーズ、血管新生の分子生物学 羊土社 (1999 年)

2. 秋山伸一 . 抗がん剤耐性 (分担) 改訂版 臨床腫瘍学 癌と化学療法社 (印刷中)

(和文総説)

1. 秋山伸一、北薊正樹、松下茂人、竹林勇二、谷 綾子、住澤知之、古川龍彦. チミジンホスホリラーゼと血管新生 血液・腫瘍科, 37:(1) 58-65, 1998.

2. 古川龍彦、陳 哲生、住澤知之、秋山伸一. 抗癌剤の耐性とその克服 抗癌剤の耐性機序 2) シスプラチン 医薬ジャーナル, 34: 1930-1936, 1998.