

こと、p120 のカドヘリンとの結合には関与しないN末端側領域を除去したp120 を発現させることにより、それまで接着活性を示さなかった細胞が示すようになることより判明した。興味深いことは、セリン／スレオニンキナーゼの阻害剤であるスタウロスポリンを接着活性を示さなかった上記細胞に与えると、p120 のリン酸化が抑制され、細胞が接着性を示すようになることである。

### 【考察】

白血病細胞に発現されるカドヘリンの接着活性が、いかなる要因により制御されるかを明らかにすることは、カドヘリン陽性の白血病細胞の皮膚浸潤あるいは神経系への浸潤をコントロールするためには不可欠であると考えられる。昨年度はβ-カテニンのチロシンリン酸化が同分子のα-カテニンとの結合を弱め、その結果、カドヘリンが活性を失うことを明らかにしたが、本年度はp120 のセリン／スレオニンリン酸化もカドヘリンの活性制御に関与していることを明らかにした。このようにカドヘリンの接着活性は複数のシステムにより制御されており、その全体像を明らかにすることは急務であると考えられる。

### 【結論】

ATL 細胞上に発現されるカドヘリンの活性を、p120 のセリン／スレオニンリン酸化レベルを変えることによっても制御しうる可能性が示された。

### 【研究発表】

#### 論文発表

- 1) Ohkubo, T. and Ozawa, M. p120ctn binds to the membrane-proximal region of the E-cadherin cytoplasmic domain and is involved in modulation of adhesion activity. *J. Biol. Chem.*, 274, 21409-21415, 1999.
- 2) Kawamura-Kodama, K., Tsutsui, J., Suzuki, S. T., Kanzaki, T., and Ozawa, M. N-cadherin expressed on malignant T cell lymphoma cells is functional, and promotes heterotypic adhesion between the lymphoma cells and mesenchymal cells expressing N-cadherin. *J. Invest. Dermatol.*, 112, 62-66, 1999.
- 3) Toyoyama, H., Nuruki, K., Ogawa, H., Yanagi, M., Matsumoto, H., Nishijima, H., Shimotakahara, T., Aikou, T., and Ozawa, M. The reduced expression of E-cadherin, α-catenin and γ-catenin but not β-catenin in human lung cancers. *Oncol. Rep.*, 6, 81-85, 1999.

## HAM 及び HTLV-I キャリアにおける unintegrated proviral DNA に関する研究

協力研究者：出雲周二（鹿児島大学医学部難治性ウイルス疾患研究センター教授）

共同研究者：竹之内徳博、松岡英二、伊佐敷靖

（鹿児島大学医学部難治性ウイルス疾患研究センター）

宇宿功市郎（鹿児島大学医学部医療情報管理学）

分担研究者：納 光弘（鹿児島大学医学部第三内科学講座教授）

### 【研究要旨】

HTLV-I プロウイルスは生体内では 1 細胞 1copy であると推定されている。これまで我々が行った PBMC を用いた PCR-ISH では HTLV-I 感染細胞率は常に 10% 以下であったが、一方で定量的 PCR 法では 20~40% のキャリアーが少なからず存在していた。この事実より unintegrated proviral DNA の存在の可能性を検討した。標本は、感染株化細胞及び HTLV-I 感染者の PBMC よりの抽出 DNA を用い、inverse-PCR を用いた Southern blot analysis 及び Sequence analysis 行った。その結果、感染株化細胞すべてにおいて unintegrated proviral DNA の inverse-PCR 産物と思われる陽性バンドと塩基配列が検出され、HTLV-I 感染者の末梢血リンパ球においては 10 人中 4 人に検出された。今回の研究により unintegrated proviral DNA が感染株化細胞に存在する事が強く疑われ、生体内においても存在する可能性が示唆された。

### 【研究目的】

HTLV-I プロウイルスは生体内では 1 細胞 1copy であると推定されている。また一方で、MT-2 などの HTLV-I 感染株化細胞では 1 細胞複数 copy 感染していることが知られている。これまで我々が行った末梢血リンパ球 (PBMC) を用いた in situ PCR hybridization (PCR-ISH) では、HAM 患者及び HTLV-I キャリアーの HTLV-I 感染細胞率は高値の人でも 10% 以下であった。一方近年、定量的 PCR 法が確立し、それによる多数例の検討では 20~40copy/100cell のキャリアーが少なからず存在していた。これらの事実は生体内で 1 細胞に複数 copy がインテグレートされた感染細胞が存在するか、あるいは unintegrated proviral DNA が存在することを示唆している。本研究では unintegrated proviral DNA の存在の可能性を検討した。

### 【研究方法】

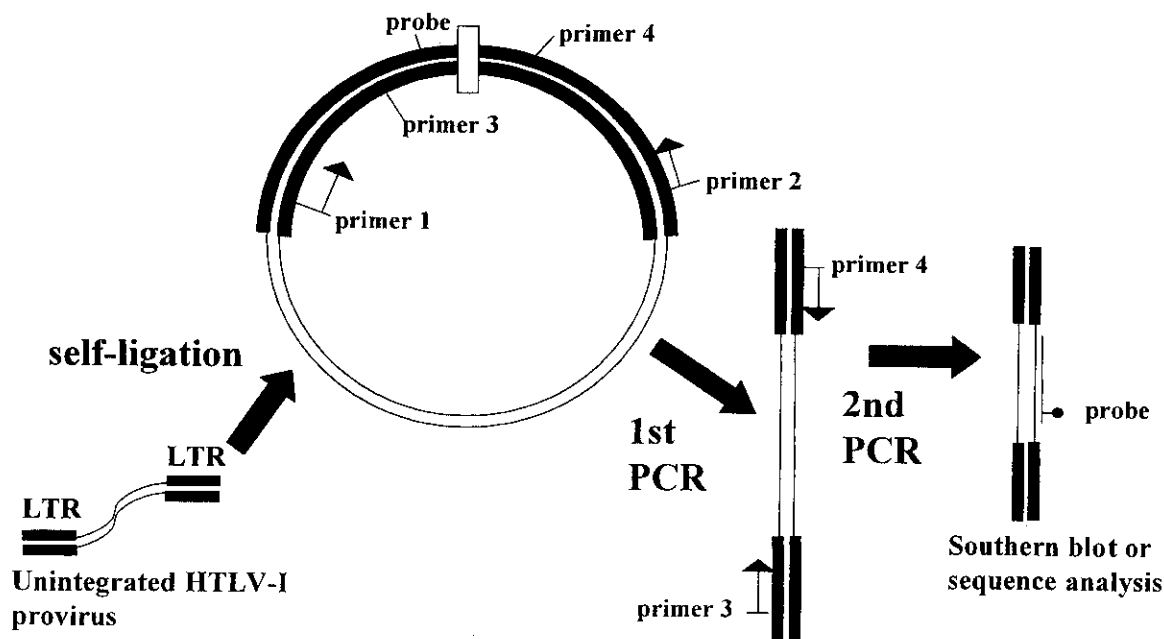
感染株化細胞 (MT-1, MT-2, HUT102) 及びあらかじめ定量的 PCR にてプロウイルス高値を示した 10 人の HTLV-I 感染者の末梢血リンパ球を用いた。各々の細胞より DNA を機械的断片化をさけるために丁寧に抽出し RNAase 処理を施した。ゲル分画を用いた PCR: 感染株化細胞より取り出した未消化の DNA を各々 5mg ずつ 1% アガロース

ゲルで電気泳動し、そのゲルを分子量マーカーを参考にして 7kbps 以下、7~9kbps、9~11kbps、11~16kbps、16~40kbps、40kbps 以上に分割した。その後各々の分画より DNA を抽出し HTLV-I の pX 領域を標的とした PCR を行った。

Inverse-PCR を用いた Southern blot analysis : 感染株化細胞及び HTLV-I 感染者の末梢血リンパ球より取り出した未消化の DNA を self-ligation させた後、LTR 領域を標的とした primer を用いて inverse-PCR を行った。さらにその product の内側に primer を set し 2 度目の PCR を行い、その product を用いて Southern blot analysis を行った (Fig 1.)。

Sequence analysis : 感染株化細胞より取り出した未消化の DNA を self-ligation させた後、LTR 領域を標的とした primer を用いて inverse-PCR を行った。その product を 3% アガロースゲルで電気泳動し、予想される bps のバンドを切り出して Sequence analysis を行った。

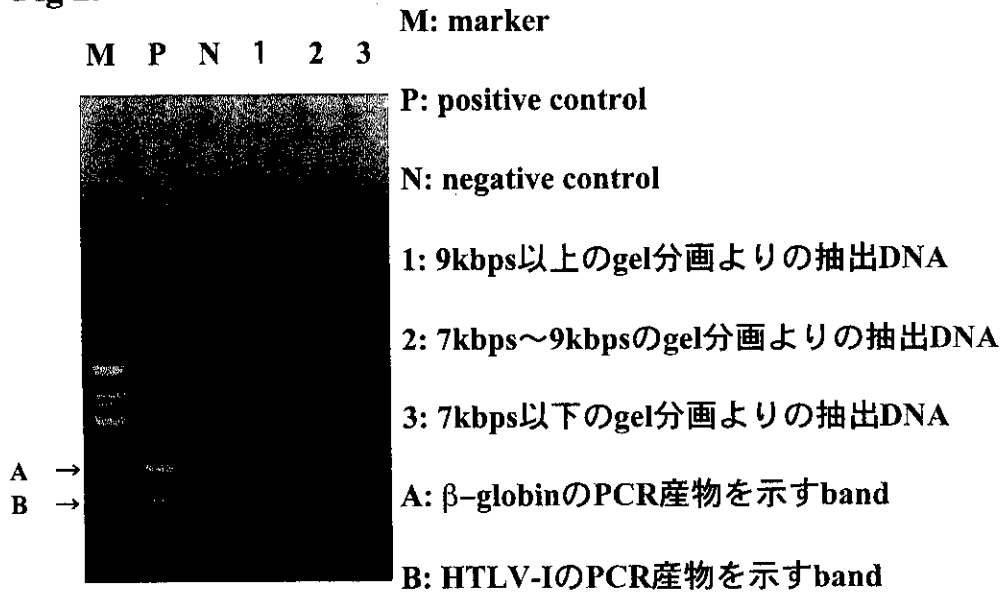
**Fig 1. IS-PCR を用いたsouthern blot analysisとsequence**



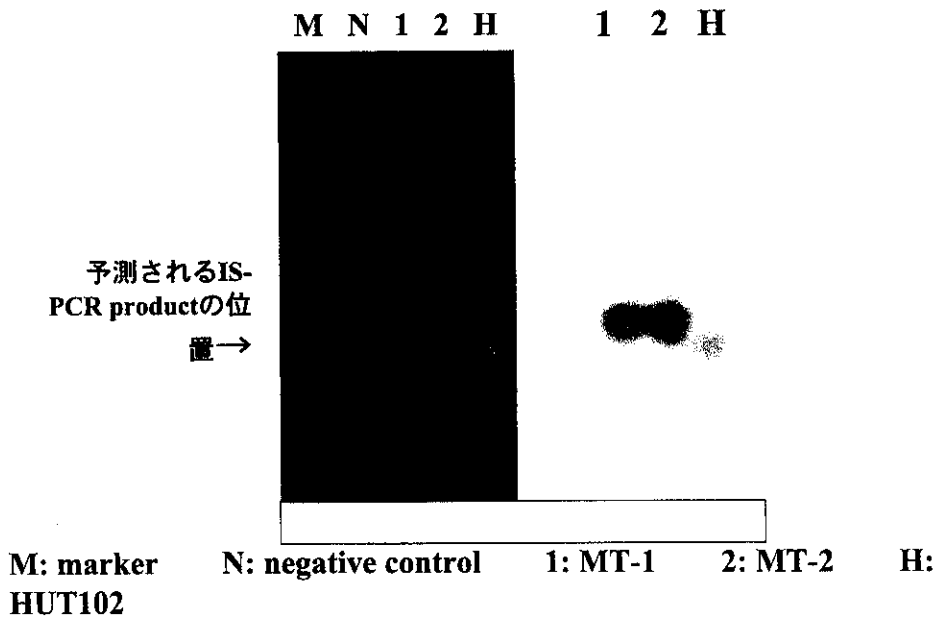
**【研究結果】**

感染株化細胞において HTLV-I は 7~9kbps と 40kbps 以上に検出され、コントロールとした  $\beta$ -globin は 40kbps 以上にのみ検出された (Fig 2)。感染株化細胞すべてにおいて 3' LTR と 5' LTR が直接 binding していると考えられる inverse-PCR 産物が検出された (Fig 3,4,5)。ただし、HUT102 の product については一部 delition が認められた (Fig 6)。HTLV-I 感染者の末梢血リンパ球においては 10 人中 4 人に 3' LTR と 5' LTR が直接 binding していると考えられる inverse-PCR 産物が検出された (Fig 7)。

**Fig 2.**



**Fig 3.**



**Fig 4. MT-1のRT-PCR productのsequence**

```
133TGACCTTTTCAGACTTCTGTTTCTCGGAAATGTTTTTCACTGGGAGGCTCTAAGCCCCCG
193GGGGATATTTGGGGCTCATGGTCATTGTCA—TGTGTACTAAATTTCTCTCCTGAGAGTG
255CTATAGGATGGGCTGTCGCTGGCTCCGAGCCAACGGAGTCGCCGGTACTTGGCCGTGGGC
```

■ 予測 sequence    ■ 実際のPCR産物のsequence

**Fig 5. MT-2のRT-PCR productのsequence**

```
117TGACCTTTTCAGACTTCTGTTTCTCGGAAATGTTTTTCACTGGGAGGCTCTAAGCCCCCG
177GGGGATATTTGGGGCTCATGGTCATTGTCA—TGTGTACTAAATTTCTCTCCTGAGAGTG
235CTATAGGATGGGCTGTCGCTGGCTCCGAGCCAACGGAGTCGCCGGTACTTGGCCGTGGGC
```

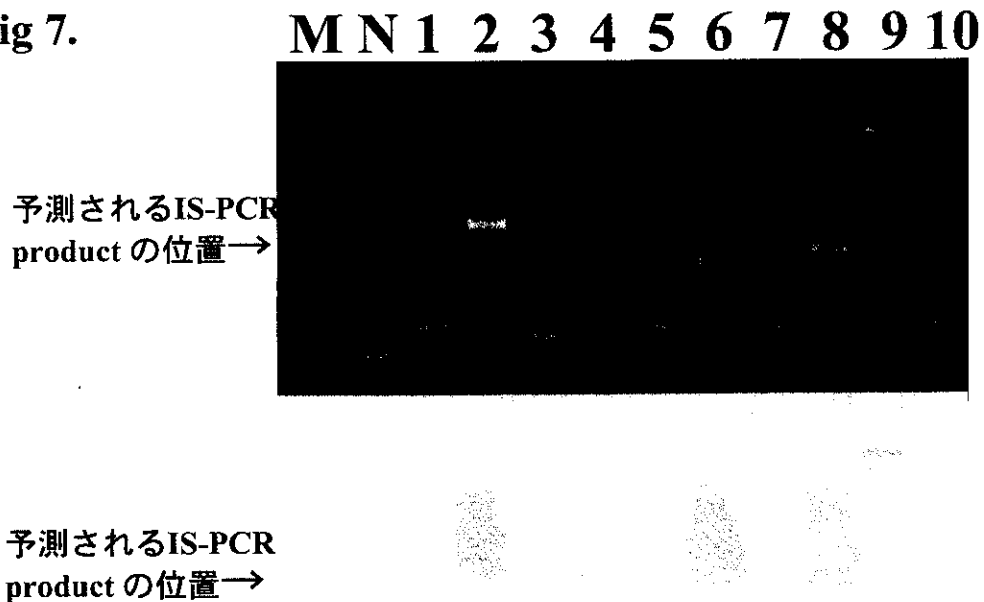
■ 予測 sequence    ■ 実際のPCR産物のsequence

**Fig 6. HUT102のRT-PCR productのsequence**

```
001CCCTTTCCCTTTCATTACGACTGACTGCCGGCTTGGCCCACGGCCAAGTACCGGCGACT
061CCGTTGGCTCGGAGCCAGCGACAGCCCATCCTATAGCACTCTCAGGAGAGAAAATTTAGTA
121CACATGACAATGACCATGAGCCCCAAATATCCCCGGGGGCTTAGAGCCTCCCAGTGAAA
181AACATTTCCGAGAAAACAGAAGTCTGAAAAGGTCAGGGCCCAGACTAAGGCTCTGACGTCT
```

■ 予測 sequence    ■ 実際のPCR産物のsequence

Fig 7.



**M: marker N: negative control 1~10: high proviral loadのHTLV-I infected individuals のPBMC**

**【考察】**

ゲル分画を用いた PCR で 40kbps 以上では HTLV-I と同時に  $\beta$ -globin も検出されており、ここで検出されている HTLV-I は DNA にインテグレートされたプロウイルスであることが推定される。7~9kbps では HTLV-I のみが検出されている。7~9kbps では  $\beta$ -globin は検出されておらず DNA が抽出段階で断片化している可能性は低いことが予想され、RNAase 処理を施されていることをあわせると 7~9kbps 付近に、インテグレートされたプロウイルスとは別に HTLV-I DNA が存在していることが推定された。Southern blot analysis と Sequence analysis の結果を合わせると感染株化細胞においては unintegrated proviral DNA の存在が強く疑われた。HTLV-I 感染者については一部の患者で unintegrated proviral DNA の存在が示唆された。しかし、検出されなかった例についても検出限界をあげることで、検出率が上がる可能性も考えられる。今後は検出限界を上げて、さらに定量的 PCR にて HTLV-I プロウイルスが低い群についても同様の検査が必要と思われる。

**【結論】**

今回の研究により unintegrated proviral DNA が生体内においても存在する可能性が示唆された。今後 PCR を用いた定量を行う場合はこのことを考慮に入れる必要があると思われる。

## ATLL 患者、キャリアにおけるエクリン汗腺上皮 への HTLV-I 感染の研究

協力研究者：瀬戸山 充 (鹿児島大学医学部皮膚科学講座助教授)  
共同研究者：溝口志真子 (鹿児島大学医学部皮膚科学講座)  
共同研究者：栄鶴義人 (鹿児島大学医学部難治ウイルス疾患センター)

### 【研究要旨】

HTLV-I が ATLL 以外にも HAM や HTLV-I 関連ブドウ膜炎などの非腫瘍性炎症性疾患と関連が深いことは知られており、またシェーグレン症候群と HTLV-I の関連についても既に報告がなされている。これらの事実以外に、シェーグレン症候群の皮膚症状の 1 つに発汗低下が知られていること、また、日常診療において、乾皮症様の症状を呈したり、発汗低下を認める ATLL 患者やキャリアを目にすることから、皮膚のエクリン汗腺上皮への HTLV-I の感染を検討してみることにした。

### 【研究目的】

我々は現在まで免疫組織化学、培養、in situ hybridization 法、PCR in situ hybridization (PCR-ISH) 法等を使い、組織内における HTLV-I の分布を検討してきた。キャリアにおける HTLV-I の組織内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患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。HTLV-I キャリアの中にシェーグレン症候群類似の症状や乾皮症様の症状を見い出すことが稀でないため、エクリン汗腺組織への HTLV-I の関与を検討するために研究を行った。前回の報告会において、HTLV-I キャリア 8 例中 4 例のエクリン汗腺上皮に HTLV-I の組み込みが認められたことは既に報告している。今回は更に症例数を追加し、また、PCR-ISH 法も用い、組織における局在の確認も含め、再検討した。

### 【研究方法】

HTLV-I のエクリン汗腺上皮への感染を Nested PCR (PCR 産物はサザンブロットハイブリダイゼーションで確認) と PCR-ISH を用いて検討した。尚、診断の為に同意を得て生検した皮膚の一部を検体として用いた。

#### 1) Nested PCR

生検皮膚から Uchida らの方法に従い dispase 処理して単離したエクリン汗腺 (ATLL 10, キャリア 15, 抗体陰性者 15) から DNA を抽出し、nested PCR を行った。

全てのプライマ-とインタ-ナルプロ-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、nested PCR は 30 サイクル行った。PCR 産物は、2% アガロ-スで電気泳動し UV ランプで DNA バンドを観察した。また、同時に PCR 産物はメンブレンにブロットし先述のインタ-ナルプロ-ブを用いて in situ hybridization を行った。

## 2) PCR-ISH

15% ホルマリンで再固定した皮膚のパラフィン切片 (ATLL 10, キャリア 15, 抗体陰性者 10) を用いて、in situ hybridization を行った。プライマ-とインタ-ナルプロ-ブは全て HTLV-I の tax 領域に位置するものである。PCR を 30 サイクル行い、その後先述のインタ-ナルプロ-ブを用いてサザンブロットハイブリダイゼ-ションを行った

### 【研究結果】

Nested PCR : HTLV-I-pX sequences が 15 人の抗体陽性者 (ATLL 8/10, carrier 7/15) のエクリン汗腺から検出された。しかし、15 人の抗体陰性者からは検出されなかった。PCR-ISH : HTLV-I tax sequences が 10 人の抗体陽性者 (ATLL, 3/10; carrier, 7/15) のエクリン汗腺から検出されたが、10 人の抗体陰性者からは検出されなかった (表 1)。

### 【考察】

シェ-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分泌の欠如及び粘膜の乾燥を引き起こす疾患であると考えられている。その原因については未だ不明であるが、遺伝的、内分泌的、環境的背景以外にウイルス (HTLV-I も含め) の関与も考えられている。シェ-グレン症候群患者に発汗異常や乾皮症を示す例があること、唾液線や涙腺は発生学的にエクリン腺と近縁であることから、HTLV-I 感染者の乾皮症様の皮疹や発汗の低下の発症機序にこのウイルスが関与している可能性は十分考えられる。

今回の研究から、エクリン汗腺上皮は、HTLV-I の標的細胞の 1 つであることが示唆された。今回検討した症例において、汗腺上皮細胞周囲への炎症性細胞の浸潤については、一連の傾向は認められなかったが、アポト-シスを起こしている上皮細胞は観察された。(これについては現在更に検討中) 今後更に臨床症状との相関、症状発症の機序などを検討していく必要があると考えている。

皮膚は外界と接した最も観察しやすい臓器である。そこに現れる症状を詳細に観察することは HTLV-I 感染の早期発見、ひいては発症予防、治療に帰依するものと考え、今回報告した。



表1 ATLL患者、キャリアにおけるエクリン汗腺上皮へのHTLV-I感染

Case	Age/gender	Anti-HTLV-I Ab	Nested PCR	PCR-ISH
ATLL				
1	37/F	+	+	+
2	54/F	+	+	+
3	81/M	+	+	-
4	50/F	+	+	-
5	78/M	+	+	+
6	67/M	+	+	-
7	77/M	+	+	-
8	52/M	+	+	-
9	69/M	+	-	-
10	54/M	+	-	-
HTLV-I キャリア				
11	61/M	+	-	-
12	71/M	+	+	+
13	61/M	+	-	+
14	46/M	+	-	+
15	72/M	+	+	+
16	38/M	+	+	-
17	71/M	+	+	-
18	89/F	+	+	+
19	26/F	+	+	-
20	85/F	+	-	+
21	56/M	+	-	+
22	44/M	+	-	-
23	79/F	+	-	-
24	74/F	+	-	-
25	36/F	+	+	-
HTLV-I 抗体陰性者				
26	50/F	-	-	N.D.
27	81/F	-	-	N.D.
28	48/M	-	-	-
29	70/F	-	-	-
30	50/M	-	-	N.D.
31	74/F	-	-	-
32	70/F	-	-	-
33	63/F	-	-	-
34	31/F	-	-	N.D.
35	63/M	-	-	N.D.
36	44/F	-	-	-
37	62/F	-	-	-
38	76/M	-	-	-
39	19/M	-	-	-
40	47/F	-	-	-

## 【結論】

HTLV-IがATLL患者およびキャリアのエクリン汗腺上皮に感染していることが証明された。

## 【研究発表】

(論文発表)

- 1) M.Setoyama, S. Mizoguchi, Y. Eizuru. Human T-lymphotropic virus type I infects eccrine sweat gland epithelia. *Int J Cancer*.80,652-655,1999
- 2) Mitsuru Setoyama, Yoshihiko Katahira, Tamotsu Kanzaki. Clinicopathological analysis of 124 cases of adult T-cell leukemia/lymphoma with cutaneous manifestation: The smoldering type with skin manifestation has poorer prognosis than previously thought. *J Dermatol*. 26;785-90,1999

(学会報告)

- 1) M. Setoyama. HTLV-I cutaneous disease. 57th Annual Meeting of American Academy of Dermatology, New Orleans (3/99).
- 2) S. Mizoguchi, M.Setoyama, Y. Eizuru. Eccrine gland epithelium is one of the target cells of human T-lymphotropic virus type I. The JSID 24 th annual meeting, 7/1999

## 成人 T 細胞白血病リンパ腫に対する同種骨髄移植に関する研究

協力研究者：宇都宮 與 （慈愛会今村病院血液内科部長）

### 【研究要旨】

血縁者間同種骨髄移植 (all-BMT) を施行した成人 T 細胞白血病リンパ腫 (ATL) 9 例について検討した。4 例が死亡したが 5 例は無病生存中であり、無病生存期間の中央値は 15.4+ヶ月と良好な成績であった。ATL の all-BMT は長期生存の可能性がある。

### 【研究目的】

成人 T 細胞白血病リンパ腫 (ATL) の急性型やリンパ腫型の化学療法の成績も改善はみられるものの長期予後は依然として不良である。今回、ATL に対する同種骨髄移植 (all-BMT) の有効性について検討した。

### 【研究方法】

1995 年～99 年 2 月に九州地区を中心に血縁者間 all-BMT を施行した ATL 9 例について集計した。

### 【研究結果】

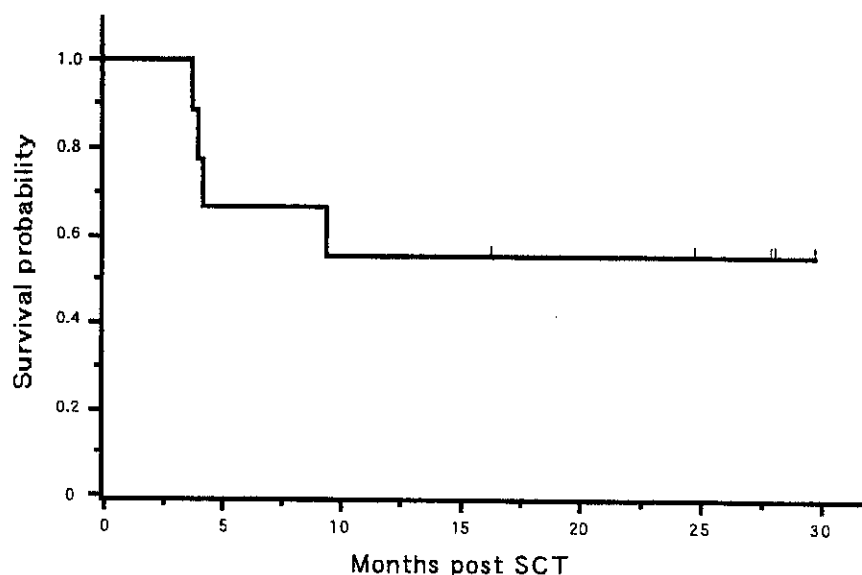
対象患者は ATL 9 例（急性型 7 例、リンパ腫型 1 例、慢性型 1 例）。男性 6 例、女性 3 例、年齢 33～51 歳（中央値 42 歳）。ATL 診断時の臨床データは Table 1 に示した。移植前の寛解状態は完全寛解 3 例、部分寛解 5 例、非寛解 1 例、移植前までの期間は 3.5～20.1 ヶ月（中央値 7.3 ヶ月）であった。ドナーは全例 HLA 一致の同胞で、3 例が HTLV-I 抗体陽性であった。7 例が BMT、1 例が末梢血幹細胞移植 (PBSCT)、1 例が BMT+PBSCT で、前処置には全例全身放射線照射を併用した。全例生着し 6 例が生存中である。急性 GVHD が 5 例（I 度 1 例、II 度 3 例、IV 度 1 例）、慢性 GVHD が 3 例（limited 1 例、Extensive 2 例）にみられた。死亡例 3 例の死因は再発後の腎不全 1 例、間質性肺炎 1 例、急性 GVHD 1 例であった。生存期間は 4.1～29.6+ヶ月（中央値 15.9+ヶ月）であった。無病生存 5 例の生存期間中央値は 15.9+ヶ月であった (Figure 1)。

### 【考察】

ATL に対する all-BMT の生存期間中央値は、15.9 ヶ月（無病生存期間の中央値も 15.9+ヶ月）であり、従来の治療成績よりも良好であった。移植後の再発は 9 例中 2 例のみであった。GVHD は 6 例（急性型 5 例、慢性型 3 例）にみられ、GVHD のみ

**Table 1 Patient characteristics at the diagnosis of ATL**

Patient No. /Gender	Age at diagnosis (years)	Subtype of ATL	WBC (/ $\mu$ l)	Abnormal lymphocyte (%)	Serum calcium (mEq/l)	LDH (IU)	LN swelling	Organ involvement
1 / F	38	Acute	28800	84	5.3	2740	+	liver, spleen
2 / F	41	Acute	43300	83	5.0	1250	-	-
3 / M	33	Chronic	10200	45	4.5	477	-	skin
4 / M	37	Acute	5300	7	4.9	268	+	bone, skin
5 / M	44	Acute	58500	84	6.0	993	+	-
6 / M	51	Lymphoma	9100	0	4.6	787	+	-
7 / M	42	Acute	8300	7	4.9	595	+	-
8 / M	48	Acute	7000	5	4.2	300	+	+
9 / F	47	Acute	11300	10	4.2	13080	+	G-I, pleural, ascites



**Figure 1 Kaplan-Meier plot of leukemia-free survival following allogeneic stem cell transplantation for adult T-cell leukemia/lymphoma**

られた症例からの再発はみられず、ATLの allo-BMTにおいても graft versus leukemia 効果が存在する可能性が示唆された。

今後、ATLの all-BMT 施行例の長期観察とATLの allo-9BMTの適応基準の決定が必要である。

#### 【結論】

ATLの allo-BMTは長期生存の可能性があり、極めて予後不良なATLの新しい治療法となり得る。

#### 【研究発表】

論文発表

Utsunomiya A, Takatsuka Y and Uozumi K. Stem cell transplantation for adult T-cell leukemia/lymphoma. Hematology & Oncology 40(4): 326-33 (2000).

#### 【共同研究機関】

鹿児島大学、長崎大学、大分医科大学、鹿児島市立病院、愛媛県立中央病院、国立熊本病院、大分県立病院、名鉄病院、愛知県がんセンター

## 緑茶ポリフェノール成分による ATL 発症予防 —緑茶介入試験に向けての基礎研究—

主任研究者：園田俊郎（鹿児島大学医学部ウイルス学講座教授）

共同研究者：屋敷伸治、李 洪川、園田純一郎、楼 宏、藤吉利信  
（鹿児島大学医学部ウイルス学講座）

共同研究者：吉永光裕（鹿児島大学医学部附属病院周産母子センター）

### 【研究要旨】

緑茶ポリフェノールの主成分であるエピガロカテキンガレート（EGCg）には抗酸化作用のほかに抗ウイルス作用と抗がん作用が知られている。本研究では EGCg によるヒト白血病ウイルス（HTLV-I）の増殖抑制と白血病（ATL）のアポトーシス（がん細胞の自殺誘導）が検討され以下の研究成果が得られた。

(1) EGCg は ATL 細胞の増殖を抑制することが明らかになった。この EGCg の用量は緑茶 10 杯分に相当するものであった。(2) EGCg は ATL 細胞に潜む HTLV-I ウイルスの遺伝子（pX）を抑制しアポトーシスを誘導する。これにより ATL 細胞は死滅する。以上の研究成果にもとづいて、緑茶飲用による ATL 予防効果の臨床試験が計画されている。この計画は鹿児島大学医学部倫理委員会で承認され平成 12 年 4 月から実施される。ここでは、緑茶抽出物（EGCg を含む）がカプセルにつめられ服用される。服用の前後で血中ポリフェノール濃度と血中 HTLV-I プロウイルス量の変化をしらべる ATL 予防の介入試験がおこなわれる。

### 【研究目的】

HTLV-I キャリアの生体内では HTLV-I 感染 T 細胞が増減している(1)。この背景に HTLV-I 感染 T 細胞に対する CTL 反応 (2) とアポトーシスによる細胞死が関与していると考えられている。今回、緑茶ポリフェノールの抗 HTLV-I 作用と HTLV-I 感染 T 細胞のアポトーシス誘導能 (Li HC, et al. Jpn. J. Cancer Res. 91: 34-40, 2000) に着目して、緑茶飲用による ATL 発症予防の基礎研究をおこなった。

### 【方法と材料】

1. 血中緑茶ポリフェノール（EGCg）の測定：

緑茶（2g/cup）10 杯を飲用、その前後で採血した血漿中の EGCg をメタノール除蛋白方法などで抽出し、HPLC 化学発光法で経時的に測定した。

2. HTLV-I プロウイルスの定量：

HTLV-I キャリアならびに患者 (ATL, HAM) の末梢血リンパ球 DNA を分離、HTLV-I プロウイルス量を  $\beta$ -グロビン DNA を内部コントロールとしてライトサイクラー法で定量した。

**【結果】**

1. 血中ポリフェノール (EGCg) の測定：

緑茶飲用の前後で採血し血中 EGCg を経時的に測定した結果、60 分後に 315 ng/ml plasma の濃度に達した (図 1)。緑茶 10 杯分 (茶葉 20g 相当) の EGCg 量は 125 mg であり、経口摂取による EGCg の吸収率は 1.2 % (315 ng x 4700/125 mg) であった。

2. HTLV-I プロウイルスの定量：

HTLV-I キャリア (AC) の HTLV-I プロウイルス量は <0.1-48 copies/1000 cells, HAM 患者は 29-449 copies/1000 cells, ATL 患者は 1.7-2666 copies/1000 cells であった (図 2)。これらの DNA32 検体 (AC=12, HAM=10, ATL=10) は一括してライトサイクラーで定量した。所要時間は 20-30 分で終了した。

**【考察】**

緑茶飲用による EGCg の体内吸収を正しく知るためには、血中 EGCg 濃度を経時的に測定する必要がある。今回の HPLC 化学発光法はこの目的に合致する高感度測定法であった。これによって、緑茶飲用 60 分後の吸収率 (1.2%) を把握することができた。この化学発光法は従来の UV 法の 560 倍の高感度測定が可能であった。ライトサイクラー法による HTLV-I プロウイルスの定量では 0.1-2 copies/cell の感度で測定することができた。AC の HTLV-I プロウイルス量は <0.1-48 copies/1000 cells であり、480 倍以上の個体差がみられた。HAM では 29-449 copies/1000 cells であり 15 倍の個体差、ATL では 1.7-2666 copies/1000 cells であり 1568 倍の個体差がみられた。HTLV-I キャリアと ATL における HTLV-I プロウイルス量の wide range variation は HAM の narrow range variation にくらべ特筆すべき現象である。今後の研究で、HTLV-I キャリアを対象とした緑茶飲用で HTLV-I プロウイルスが減少するか否かを長期追跡する。

以上の研究成果にもとづいて、緑茶飲用による ATL 予防効果の臨床試験計画は鹿児島大学医学部倫理委員会で承認され平成 12 年 4 月から実施される。

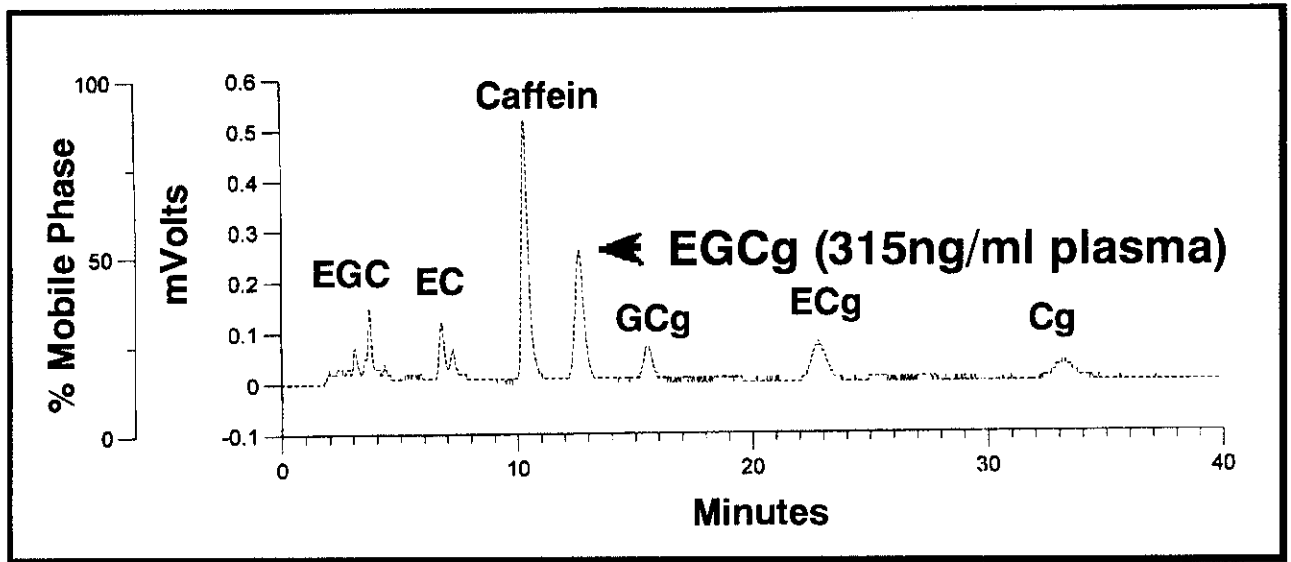


図1 緑茶飲用60分後の血中ポリフェノール（EGCg）の測定

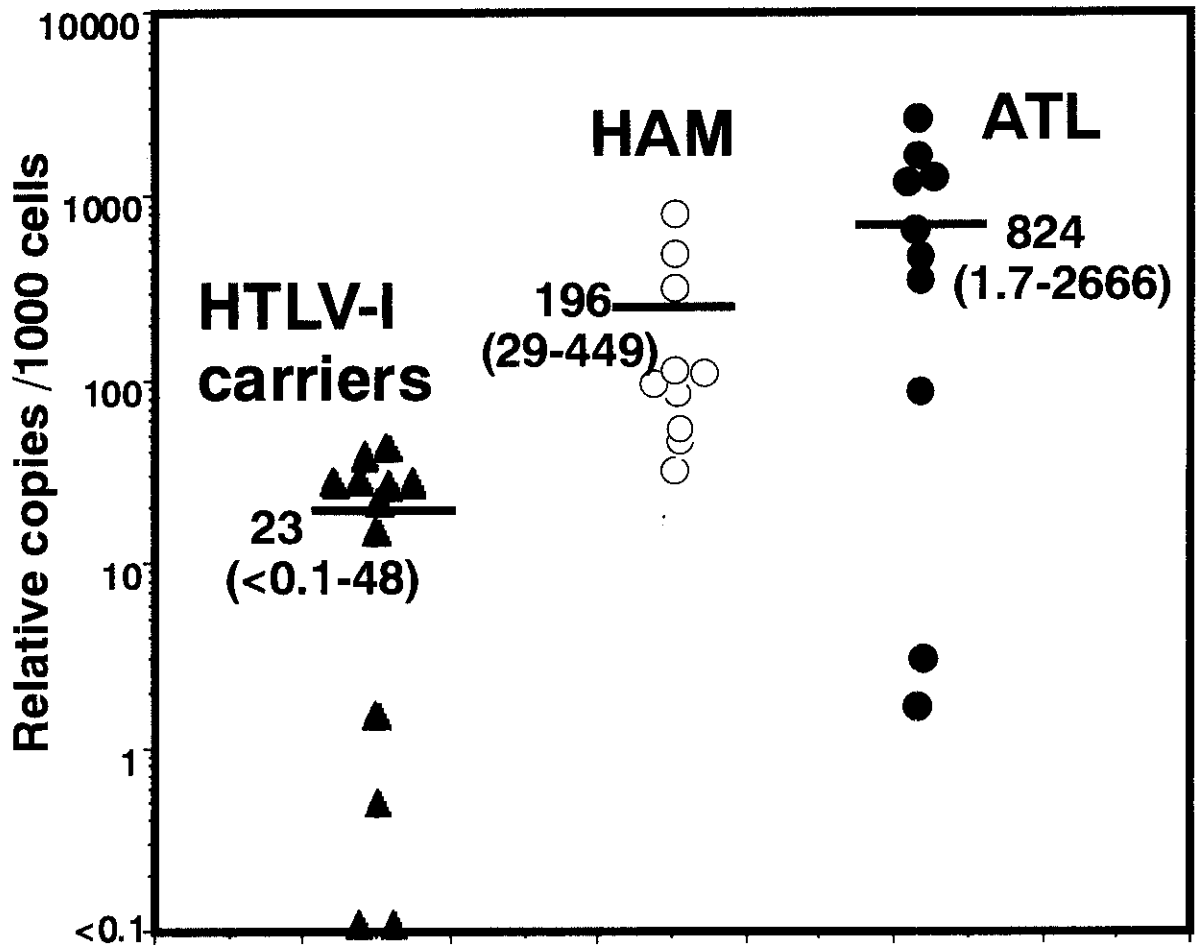


図2 血中HTLV-Iプロウイルスの定量



## 【引用文献】

1. Kubota R, Fujiyoshi T, Izumo S, Yashiki S, Maruyama I, Osame M, Sonoda S. Fluctuation of HTLV-I proviral DNA in peripheral blood mononuclear cells of HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuroimmunol* 42: 147-54 (1993).
2. Katahira Y, Yashiki S, Fujiyoshi T, Nomura K, Tara M, Mori M, Setoyama M, Kanzaki T, Shida H, Sonoda S. In vitro induction of cytotoxic T lymphocytes against HTLV-I-infected T-cells from adult T-cell leukemia patients, asymptomatic HTLV-I carriers and seronegative healthy donors. *Jpn J Cancer Res* 86: 21-7 (1995).

## 【研究発表】

論文発表：

Li H-C, Yashiki S, Sonoda J, Lou H, Ghosh SK, Byrnes JJ, Lema C, Fujiyoshi T, Karasuyama M and Sonoda S. Green tea polyphenols induce apoptosis in vitro in peripheral blood T lymphocytes of adult T-cell leukemia patients. *Jpn. J. Cancer Res.* 91: 34-40 (2000).

学会発表：

1. 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 年 10 月.
2. Yashiki S, Lou H, Li H-C, Ghosh SK, Byrnes JJ, Karasuyama M and Sonoda S. Green tea Polyphenols induce apoptosis in Adult T-cell leukemia cells. 第 9 回国際レトロウイルス学会、鹿児島市、1999 年 4 月.

## 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】

多剤耐性に関与する MRP、LRP の ATL 細胞における発現を調べると、ともに ATL 患者の一部で高発現の症例が見られ、特に末梢血から採取した ATL 細胞に高い発現のものが多かった。ATL 細胞で発現している MRP、LRP はともに機能を有していること、MRP による膜からの薬剤排出、LRP による核からの薬剤排出はそれぞれ特異的な阻害剤を併用することで克服できることを明らかにした。ATL の化学療法を行う場合これらの多剤耐性克服薬剤を併用することの有用性が示唆された。

### 【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。

ATL 細胞では MRP、LRP が発現しているがそれらの機能を調べた報告はなく、機能を調べこれらの機能が耐性に関与し、耐性克服薬剤により阻害されるかを調べた。

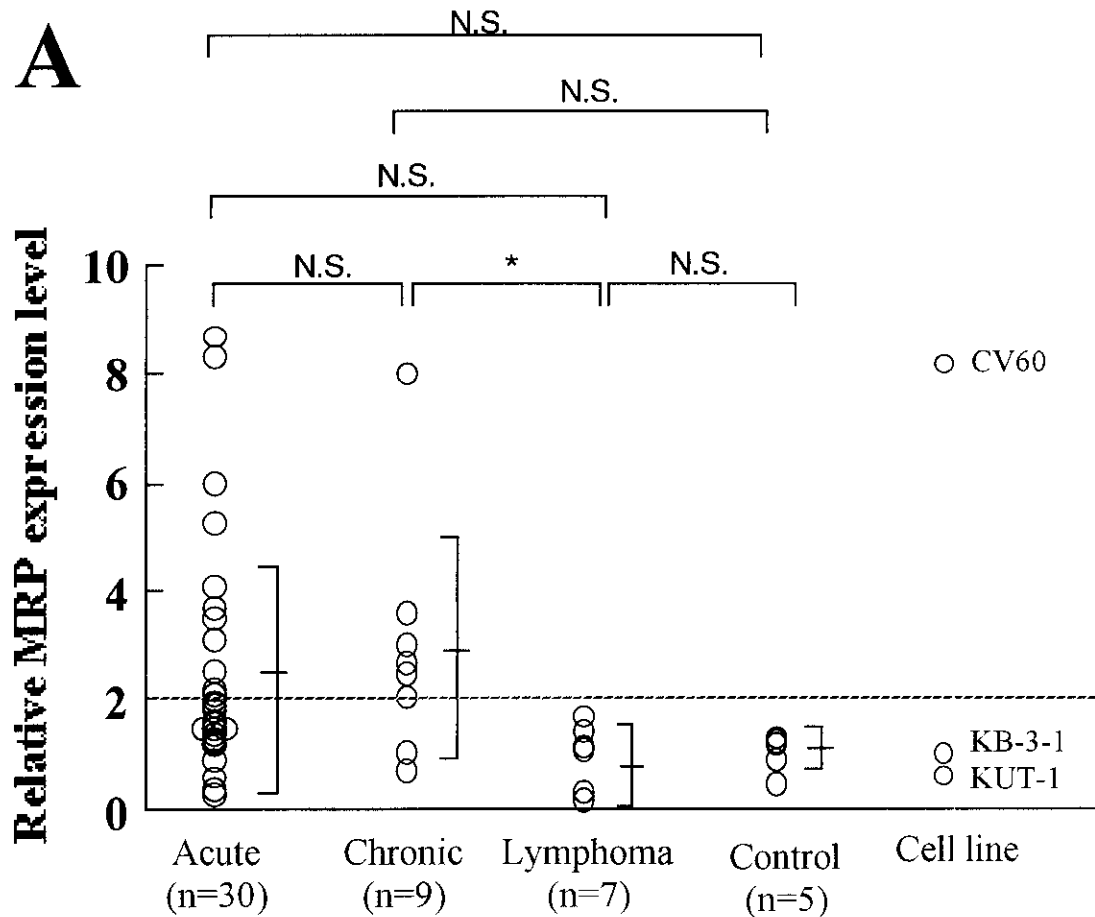
### 【研究の方法】

ATL 患者の末梢血またはリンパ球より RNA を抽出して MRP 遺伝子と LRP 遺伝子の発現量を測定した。MRP の発現が強い患者から膜 vesicle を調整し MRP の機能及びその阻害薬について検討した。さらに LRP 高発現症例では単離核を用いてアドリアマイシンの蓄積と PAK104P による LRP 機能の阻害について検討した。

【研究結果】

MRP の発現は慢性型、急性型で発現が強く、リンパ腫型では低かった。急性型で治療後に残存している ATL 細胞では健常者の単核球に比べて有意に MRP の発現が高かった (図 1)。MRP を高発現している ATL 患者の細胞より調整した膜 vesicle への LTC<sub>4</sub> の取り込みは MRP 低発現細胞株の取り込みに比べて高く、その取り込みは MRP に対する抗体で特異的に阻害された。また多剤耐性克服薬剤 ONO1078、MK571 でも同様に阻害できた。

LRP の発現は急性型、慢性型の症例はリンパ腫型に比べて有意に発現が高かった。また健常者の末梢血単核球でも発現は高かった (図 2)。LRP 高発現患者 ATL 細胞より単離した核はアドリアマイシンの蓄積が少なく、LRP に対する抗体を作用させることで蓄積が増加した。多剤耐性克服薬剤 PAK104P を作用させても同様に核へのアドリアマイシンの蓄積が増加した。



# B

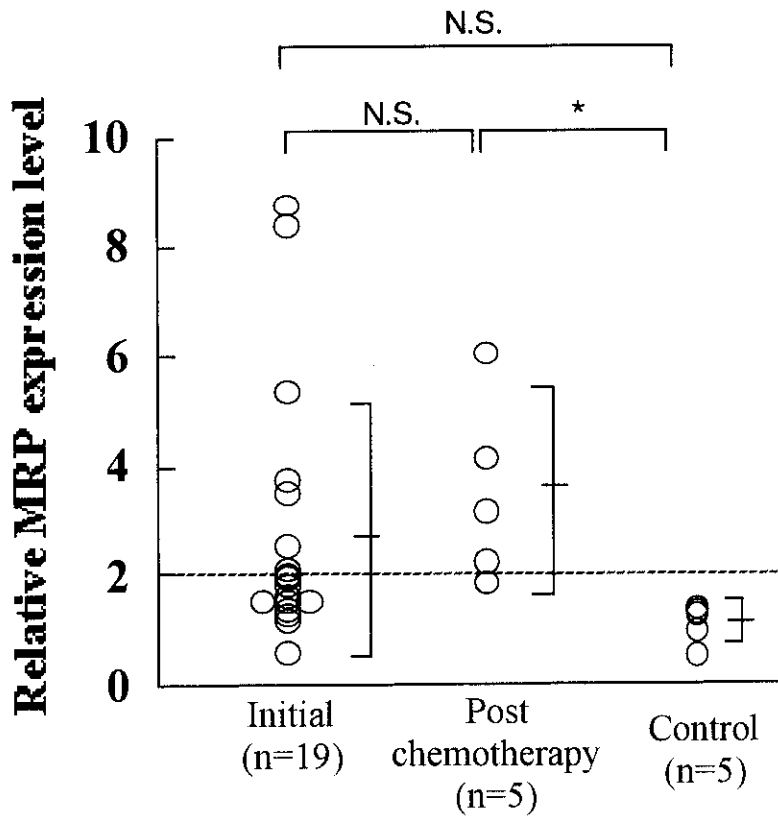


図1 ATL患者のMRP発現

- (A) :急性型、慢性型、リンパ腫型ATL患者のMRP発現  
 (B) :治療後の急性型ATL患者のMRP発現

## 【考察】

MRP、LRPともにATL患者の一部で高発現の症例が見られ、特に末梢血から採取したATL細胞に高い発現のものが多かった。MRPによる膜からの薬剤排出、LRPによる核からの薬剤排出はそれぞれ特異的な阻害剤を併用することで克服することが出来た。ATLの化学療法を行う場合これらの多剤耐性克服薬剤を併用することの有用性が示唆される。

## 【結論】

ATL細胞で発現しているMRP、LRPは機能を有し耐性に関与しており、これらの機能を阻害する薬剤によりATL細胞の抗癌剤耐性が克服できることが示唆された。